

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLES.....	17
INTRODUCTION GENERALE	19
CHAPITRE I : Les vaccins et le système immunitaire	22
I.1 Les vaccins : comment se défendre contre les pathogènes.....	24
I.1.1 Contexte historique et découverte	24
a. Les grandes épidémies	24
b. La variolisation.....	26
c. La vaccination	26
I.1.2 L'évolution des vaccins.....	28
a. Généralisation de la vaccination avec les premiers vaccins atténués.....	28
b. L'essor des vaccins atténués et inactivés	29
c. Les vaccins modernes	31
I.2 Les réponses du système immunitaire.....	34
I.2.1 Systèmes immunitaires inné et adaptatif	34
I.2.2 Les acteurs du système immunitaire.....	35
I.2.3 Les différentes phases de la réponse immunitaire	43
a. La phase d'identification du pathogène	43
b. La phase effectrice	46
c. La phase de régulation : les lymphocytes T régulateurs.....	51
d. La phase de mémoire immunologique.....	52
CHAPITRE II : Les adjuvants de vaccins	56
II.1 L'alum : le premier adjuvant	58
II.2 Les immunostimulants inducteurs de signaux de danger	61
II.2.1 Activation des Toll-like récepteurs (TLR).....	61
a. Les TLR-1, TLR-2 et TLR-6 reconnaissent des protéines de surface de pathogènes	62
b. Le TLR-4 reconnaît des sucres de surface de pathogènes.....	63
c. Le TLR-5 reconnaît des protéines bactériennes	65
d. Les TLR-3, TLR-7/8 et TLR-9 reconnaissent des acides nucléiques viraux.....	66
II.2.2 Les autres récepteurs : CLR, NLR et RLR.....	71

a. Les C-type lectin récepteurs (CLR)	71
b . Les NOD-like récepteurs (NLR) et (RIG-1)-like récepteurs (RLR)	71
II.3 Les vecteurs pour la délivrance d'antigènes	73
II.3.1 Les propriétés physico-chimiques clés des vecteurs	74
a. L'effet de la taille des particules.....	74
b. L'effet du revêtement de surface des particules	75
II.3.2 Les différentes classes de vecteurs utilisés en vaccin	76
a. Les émulsions.....	76
b. Les liposomes	77
c. Les virosomes.....	79
d. Les virus-like particles (VLP)	80
e. Les vecteurs bactériens atténués	81
f. Les ISCOM.....	82
g. Les vecteurs polymériques	84
h. Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) et nanostructurées (NLC)	86
II.4 Les adjuvants commercialisés et en essais cliniques	90
CHAPITRE III : Innovation technologique au service des vaccins	94
III.1 Les enjeux des vaccins du XXI ^{ème} siècle	96
III.1.1 Une couverture vaccinale suffisante	96
III.1.2 La perte de confiance envers les vaccins	97
III.1.3 Les perspectives des vaccins	99
III.2 Le cas particulier du VIH	101
III.2.1 Présentation du VIH	101
a. Le VIH et ses sous-groupes	102
b. Description de la particule virale.....	103
III.2.2 Le cycle de vie du VIH	105
a. La transmission du virus	105
b. Le cycle de réplication du virus	105
III.2.3 Le traitement du VIH	108
a. Les symptômes de la maladie.....	108
b. La thérapie antirétrovirale	109
III.2.4 Les attentes d'un vaccin anti-VIH.....	110
III.3 Définition du matériel et des objectifs de la thèse	111
III.3.1 Définition des Lipidots®	111
III.3.2 Enoncé des objectifs de la thèse	113

RESULTATS.....	114
CHAPITRE IV : Vectorisation d'un antigène par les LNP : Preuve de concept avec le modèle ovalbumine	116
IV.1 Démonstration de l'intérêt de la vectorisation de l'OVA par les LNP	118
IV.1.1 Préparation des formulations antigéniques	118
a. Formulation des LNP	118
b. Greffage de l'antigène modèle ovalbumine sur les LNP	120
c. Etude de la stabilité du greffage.....	125
IV.1.2 Etude de l'impact des LNP sur des cellules	126
a. Evaluation de la toxicité des formulations préparées.....	126
b. Evaluation de la présentation de l'antigène par les DC	128
IV.1.3 Evaluation des réponses immunitaires <i>in vivo</i>	130
IV.2 Etude de l'effet de la taille du vecteur sur l'immunogénicité de l'OVA.....	135
IV.2.1 Formulation de LNP de tailles différentes.....	135
IV.2.2 Evaluation des interactions LNP/cellules	136
a. Evaluation <i>in vitro</i> de la cytotoxicité des LNP.....	136
b. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activation des DC par les LNP	138
c. Evaluation <i>in vitro</i> de la cinétique de capture des LNP par les DC	139
d. Evaluation <i>in vivo</i> de la capture des LNP par les cellules présentatrices d'antigène	141
e. Evaluation des LNP à promouvoir la présentation de l'antigène	144
f. Présentation croisée de l'antigène sur le CMH-I.....	145
IV.2.3 Evaluation de l'effet de la taille des LNP <i>in vivo</i>	147
IV.3 Ciblage actif des cellules présentatrices d'antigène	151
IV.3.1 Intégration de ligands de ciblage à la surface des LNP	151
IV.3.2 Etude de l'effet du ligand de ciblage sur la capture cellulaire <i>in vitro</i>	155
IV.4 Etude des paramètres d'immunisation.....	157
Discussion du chapitre IV	160
CHAPITRE V : Augmentation de l'immunogénicité de l'ovalbumine par la vectorisation d'immunostimulants	164
V.1 Stratégie de vectorisation de l'immunostimulant sur le modèle du MPLA et de l'Imiquimod	166
V.1.1 Préparation des LNP immunostimulantes	167
a. Incorporation du MPLA dans la couronne des LNP	167
b. Encapsulation de l'Imiquimod dans le cœur des LNP	168
c. Double délivrance de l'antigène et de l'immunostimulant par une LNP unique	170
V.1.2 Etude d'immunogénicité des LNP immunostimulantes chez la souris	172
V.2 Conception d'une formulation immunostimulante à base de CpG	175

V.2.1 Préparation de LNP cationiques pour la délivrance du CpG	175
V.2.2 Comportement des LNP ⁺ en milieu cellulaire	179
a. Evaluation de la cytotoxicité des LNP ⁺	179
b. Evaluation de la délivrance intracellulaire du CpG par les LNP ⁺	179
c. Evaluation de l'activation des DC par les formulations de CpG	180
d. Impact de la combinaison immunostimulante sur la présentation de l'antigène	182
V.2.3 Etude d'immunogénicité des formulations de CpG chez la souris.....	183
V.3 Etude de protection chez la souris à l'aide d'un modèle de tumeur exprimant l'OVA.....	190
V.3.1 Protocole de l'étude.....	190
V.3.2 Test préliminaire de validation	191
V.3.3 Campagne de challenge tumoral sur souris.....	193
Discussion du chapitre V	197
CHAPITRE VI : Application à un antigène du VIH : la p24	202
VI.1 Préparation de particules vectorisant la p24	205
VI.1.1 Choix de la technique de greffage	205
VI.1.2 Optimisation du greffage de la p24	207
VI.1.3 Quantification de la p24 greffée sur les LNP.....	210
VI.1.4 Contrôle de la cytotoxicité des LNP-p24	212
VI.2 Etude d'immunogénicité des formulations de p24 chez la souris	213
VI.2.1 Intérêt de la vectorisation de la p24	213
VI.2.2 Comparaison des voies d'administration et doses d'antigène	214
VI.2.3 Intérêt de la double vectorisation de la p24 et du CpG	217
VI.3 Etude d'immunogénicité des formulations de p24 chez le macaque.....	221
VI.3.1 Conception de l'étude et préparation des formulations	221
VI.3.2 Evaluation des réponses immunitaires chez le macaque	226
Discussion du chapitre VI	229
PARTIE EXPERIMENTALE	234
VII.1 Préparation des LNP	236
VII.1.1 Formulation des LNP	236
VII.1.2 Intégration de ligands de ciblage des cellules dendritiques	238
VII.1.3 Greffage de l'OVA sur les LNP	239
VII.1.4 Greffage de la p24 sur les LNP	240
VII.1.5 Incorporation de MPLA dans les LNP	241
VII.1.6 Encapsulation d'imiquimod dans les LNP	241
VII.1.7 Complexation du CpG sur les LNP ⁺	241
VII.2 Caractérisation physico-chimique des LNP	242

VII.2.1 Mesure de taille par DLS et charge de surface par ELS.....	242
VII.2.2 Quantification des ligands mannosylés.....	244
VII.2.3 Quantification de l'antigène greffé sur les LNP	244
VII.2.4 Quantification du MPLA incorporé dans les LNP	246
VII.2.5 Quantification de l'imiquimod encapsulé dans les LNP	246
VII.2.6 Quantification des acides nucléiques complexés aux LNP ⁺	246
VII.3 Caractérisation biologique des LNP <i>in vitro</i>	247
VII.3.1 Culture cellulaire	247
a. Lignées cellulaires.....	247
b. Extraction et culture de cellules dendritiques primaires	248
c. Extraction de lymphocytes T primaires	249
VII.3.2 Analyse de cytotoxicité	250
VII.3.3 Analyse de capture cellulaire	250
VII.3.4 Imagerie confocale	251
VII.3.5 Analyse d'activation cellulaire	251
VII.3.6 Analyse de la présentation de l'antigène.....	252
a. Présentation de l'OVA aux lymphocytes T OT-II.....	252
b. Présentation croisée de l'OVA.....	252
VII.4 Caractérisation biologique des LNP <i>in vivo</i>	252
VII.4.1 Imagerie <i>in vivo</i> des ganglions lymphatiques	252
VII.4.2 Analyse de capture <i>in vivo</i> des LNP.....	253
VII.5 Campagnes d'immunisation.....	253
VII.5.1 Animaux	253
VII.5.2 Immunisations et prélèvements	254
VII.5.3 Dosage des anticorps	254
VII.5.4 Analyse de la réponse cellulaire.....	255
VII.5.5 Marquage intracellulaire de cytokines.....	256
VII.5.6 Challenge tumoral.....	256
VII.5.7 Suivi de la croissance tumorale.....	256
VII.5.8 Prélèvement des tumeurs	257
VII.5.9 Analyse statistique	257
CONCLUSION GENERALE.....	258
ANNEXE : VALORISATION	263
REFERENCES	264

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

APC : allophycocyanin

ARN : acide ribonucléique

ART : antiretroviral therapy

BCR : récepteur de cellule B

BSA : bovine serum albumine

CD : cluster de différenciation

CFA : complete Freund adjuvant

CLR : C-type lectin récepteur

CMH : complexe majeur d'histocompatibility

DC : cellules dendritiques

DLS : dynamic light scattering

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

DOTAP : N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate

FDA : food and drug administration

FITC : fluorescein isothiocyanate

HAART : highly active antiretroviral therapy

HPV : papillomavirus humain

ID : intradermique

IFA : Incomplete Freund adjuvant

IFN : interferon

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

IP : intrapéritonéal

LB : lymphocytes B

LBm : lymphocytes B mémoires

LNP : lipid nanoparticles

LPB : lipoprotéines bactériennes

LPS : lipopolysaccharide

LT : lymphocytes T

LTm : lymphocytes T mémoires

Mal : maleimide

MPLA : monophosphoryl lipid A

NLR : NOD-like récepteur

NK : natural killer

NLC : nanostructured lipid carriers

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OVA : ovalbumine

PAMP : pathogen associated molecular pattern

PBS : phosphate buffer saline

PDI : polydispersity index

PE : phycoerythrin

PEG : poly(ethylene glycol)

PLGA : polylactic co glycolic acid

PRR : pathogen recognition récepteur

RLR : (RIG-1)-like récepteur

RSV : virus respiratoire syncytial

SC : sous-cutané

SEP : schlérose en plaques

SH : thiol

SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise

SLN : solid lipid nanoparticles

Sulfo-SMCC : sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate

SVF : serum de veau fœtal

TAA : tumor associated antigens

TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine

TCR : récepteur de cellule T

TGF : transforming growth factor

Th : T helper

TLR : Toll-like récepteur

TNF : tumor necrosis factor

T_{REG} : lymphocytes T régulateurs

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VLP : virus-like particles

LISTE DES FIGURES

Figure I.1. Représentation de la variolisation et de la vaccination.	27
Figure I.2. Modélisation du système immunitaire inné et adaptatif.....	35
Figure I.3. Représentation des principales cellules immunitaires issues de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes.	36
Figure I.4 : Les organes lymphatiques du corps humains.	37
Figure I.5 : Structure globulaire d'une immunoglobuline (IgG).	39
Figure I.6. Représentation des différents isotypes d'anticorps.	40
Figure I.7. Schéma représentant les différentes étapes de la phagocytose de pathogènes extracellulaires par les macrophages.....	44
Figure I.8: Schéma représentant la présentation de l'antigène par les DC aux LT et les réponses immunes qui en découlent.....	47
Figure I.9: Evolution de la réponse immunitaire avec le temps après une première ou deuxième exposition à un même pathogène.....	53
Figure II.1. Structure générale des lipoprotéines bactériennes, ligand de TLR-2.	62
Figure II.2: Structure générale du LPS, ligand de TLR-4.....	63
Figure II.3: Structure du MPLA, dérivé synthétique du LPS, dont le retrait d'un groupe phosphate diminue la toxicité.....	64
Figure II.4: Structure générale de la flagellin, ligand de TLR-5.....	65
Figure II.5: Structure générale du Poly(I:C), ligand de TLR-3.....	66
Figure II.6: Structure de l'imiquimod et du resiquimod, ligands de TLR-7/8.	67
Figure II.7: Structure du CpG, oligonucléotide composé de motifs cytosine-guanine non méthylés reliés par un groupement phosphate.....	68
Figure II.8. Répartition des différents TLR à l'échelle de la cellule.....	70
Figure II.9 : Schéma représentant une émulsion huile-dans-eau.	76
Figure II.10: Schéma représentant un liposome.	78
Figure II.11 : Schéma représentant la structure d'un virosome comparé au virus de la grippe.....	79
Figure II.12: Schéma représentant une VLP.	80
Figure II.13: Schéma représentant la structure en forme de cage d'un ISCOM pouvant piéger des molécules hydrophobes.	83
Figure II.14: Structure chimique du PLGA.	84
Figure II.15 : Structure chimique du chitosane préparé à partir de la chitine.	85
Figure II.16. Schéma comparatif des SLN et NLC.....	87
Figure III.1. Schéma représentant l'intérêt d'une couverture vaccinale élevée afin d'empêcher une épidémie. Adapté de Inserm Vaccinations, séminaires Ketty Schwartz 2014.	97
Figure III.2: Répartition de la mortalité causée par le VIH dans le monde.	101

Figure III.3. Organigramme représentant les différents groupes et clades de la forme HIV-1 la plus répandue dans le monde.....	102
Figure III.4: Schéma représentant la structure moléculaire du VIH.....	103
Figure III.5. Rappel des fonctions des 9 gènes du VIH.....	104
Figure III.6. Schéma représentant la fusion d'une particule virale du VIH avec une cellule porteuse du récepteur CD4.	106
Figure III.7: Schéma représentant le cycle général de réplication du VIH.	107
Figure III.8 : Représentation des différentes phases de l'infection par le VIH.....	109
Figure III.9. Schéma représentant les Lipidots (LNP) et leur composition.	111
Figure IV.1. Stabilité colloïdale des LNP.	120
Figure IV.2. Fonctionnalisation de l'ovalbumine.....	121
Figure IV.3. Fonctionnalisation des LNP.	122
Figure IV.4. Greffage de l'OVA sur les LNP.	123
Figure IV.5. Purification des LNP-OVA par chromatographie d'exclusion stérique	124
Figure IV.6. Stabilité colloïdale des LNP-OVA.....	125
Figure IV.7. Stabilité du greffage de l'OVA.	126
Figure IV.8. Cytotoxicité des LNP sur des fibroblastes NIH/3T3 après une exposition de 24h.	127
Figure IV.9. Présentation de l'antigène par les DC aux LT issus d'OT-II.	129
Figure IV.10. Schéma représentant le planning d'immunisation des souris.	130
Figure IV.11. Analyse de la réponse humorale anti-OVA et intérêt de la vectorisation de l'OVA.	132
Figure IV.12. Analyse de la réponse humorale anti-OVA et comparaison des immunostimulants.	133
Figure IV.13. Cytotoxicité des LNP et LNP-OVA en fonction de leur taille.	137
Figure IV.14. Activation des DC par les LNP.	138
Figure IV.15. Capture des LNP par les DC.....	140
Figure IV.16. Drainage lymphatique des LNP.....	142
Figure IV.17. Capture cellulaire in vivo des LNP.....	143
Figure IV.18. Présentation de l'antigène par les DC aux LT issus d'OT-II.	144
Figure IV.19. Présentation croisée de l'OVA sur le CMH-I de DC primaires.....	146
Figure IV.20. Analyse de la réponse humorale anti-OVA et étude de la taille du vecteur.....	148
Figure IV.21. Structure des composés mannosylés utilisés pour le ciblage des cellules présentatrice d'antigène.....	151
Figure IV.22. Schéma de la réaction de couplage PEG-COOH/MAN-NH ₂ en présence d'EDC/NHS....	152
Figure IV.23. Gamme étalon réalisée à partir de quantités connues de ligands mannosylés.	153
Figure IV.24. Capture des LNP-MAN par les DC.	155
Figure IV.25. Analyse de la réponse humorale anti-OVA et étude de la dose d'OVA en SC.	158
Figure IV.26. Analyse de la réponse humorale et étude de la dose d'OVA en IP.....	159
Figure V.1. Dosage du MPLA incorporé dans les LNP par activité d'endotoxine.	167

Figure V.2. Dosage de l'Imiquimod encapsulé dans les LNP par spectroscopie de fluorescence.....	169
Figure V.3. Purification des LNP-OVA par chromatographie d'exclusion stérique.	171
Figure V.4. Analyse de la réponse humorale anti-OVA et étude de la délivrance d'immunostimulants.	173
Figure V.5. Stabilité des LNP ⁺	176
Figure V.6. Définition du rapport N/P.	177
Figure V.7. Analyse de la complexation du CpG sur les LNP+ par électrophorèse sur gel.....	178
Figure V.8. Evaluation de la cytotoxicité des LNP ⁺	179
Figure V.9. Localisation des LNP ⁺ /CpG après 1h d'exposition aux DC.....	180
Figure V.10. Activation des DC par les formulations de CpG.	181
Figure V.11. Présentation de l'antigène par les DC aux LT issus d'OT-II.	183
Figure V.12. Analyse de la réponse humorale et cellulaire anti-OVA sur les groupes avec le CpG.	184
Figure V.13. Analyse de la réponse humorale et cellulaire anti-OVA et effet des LNP ⁺	185
Figure V.14. Analyse des cellules impliquées dans la réponse cellulaire anti-OVA.	187
Figure V.15. Analyse des isotypes d'anticorps anti-OVA produits.	189
Figure V.16. Analyse de la croissance tumorale.....	192
Figure. V.17. Analyse de la croissance tumorale.....	195
Figure. V.18. Analyse de la survie des animaux.	196
Figure VI.1. Formation d'agrégats de p24 en présence des LNP (fractions 10 à 20) après 2h d'exposition.....	206
Figure VI.2. Greffage de p24 à la surface des LNP-mal.	207
Figure VI.3. Comparaison des paramètres de greffage de la p24 à la surface des LNP.	208
Figure VI.4. Comparaison des paramètres de greffage de la p24 à la surface des LNP.	209
Figure VI.5. Dosage de p24 dans les fractions rassemblées de LNP-p24 par réaction avec le CBQCA.	211
Figure VI.6. Cytotoxicité des LNP-p24 sur des fibroblastes NIH/3T3 après une exposition de 24h....	212
Figure VI.7. Analyse de la réponse humorale anti-p24 et intérêt de la vectorisation de la p24.....	213
Figure VI.8. Analyse de la réponse humorale et étude de la voie d'injection et de la dose de p24... ..	214
Figure VI.9. Analyse de la réponse humorale anti-p24 et étude de la dose de p24.	215
Figure VI.10. Analyse de la réponse humorale anti-p24 et étude de la voie d'injection.	216
Figure VI.11. Analyse de la réponse humorale et cellulaire anti-p24 et étude des combinaisons de CpG.	218
Figure VI.12. Analyse des isotypes d'anticorps et des cellules impliquées dans la réponse cellulaire.	219
Figure VI.13. Planning d'expérience de la campagne d'immunisation sur macaques.	222
Figure VI.14. Purification des LNP-p24 témoin et contrôle p24 par chromatographie d'exclusion stérique.....	224

Figure VI.15. Contrôle du greffage de la p24 sur les LNP par immunoassay.	225
Figure VI.16. Stabilité des LNP-p24.	226
Figure VI.17. Analyse de la réponse humorale et cellulaire anti-p24 sur NHP.	228
Figure VII.1. Représentation du potentiel zêta d'une particule.	243

LISTE DES TABLES

Table I.1 : Les caractéristiques principales des différents types de vaccins.	32
Table I.2 : Les principales cellules du système immunitaire et leurs fonctions.	42
Table I.3: Les principales cytokines sécrétées par les cellules immunitaires et leurs fonctions.....	54
Table II.1. Liste non exhaustive de vaccins formulés avec l'alum comme adjuvant ⁶⁷	60
Table II.2: Résumé des caractéristiques principales des TLR.	70
Table II.3. Avantages et inconvénients des principaux vecteurs synthétiques.....	89
Table II.4: Principaux vaccins commerciaux à base d'adjuvants autres que l'alum.....	92
Table II.5: Adjuvants en essais cliniques pour le développement de vaccins contre les maladies infectieuses depuis 2010.	93
Table IV.1. Valeurs moyennes et écarts-types de la taille, du PDI et du potentiel zéta des LNP.....	119
Table IV.2. Diamètre hydrodynamique et potentiel zéta moyens des LNP-OVA et LNP de base.....	124
Table IV.3. Taux de charge des LNP-OVAméd et LNP-OVAhig.	134
Table IV.4. Valeurs moyennes et écarts-types de la taille, le PDI et le potentiel zéta des différentes particules étudiées.	135
Table IV.5. Taux de charge des LNP-OVA préparées en fonction de leur taille.	136
Table IV.6. Quantité de ligands mannosylés greffés sur les PEG.	153
Table IV.7. Taux de charge de ligands mannosylés greffés sur les LNP.	154
Table IV.8. Mesure du diamètre hydrodynamique des LNP-MAN par DLS.....	154
Table V.1. Calcul de la quantité de MPLA incorporée dans les LNP.....	168
Table V.2. Comparaison des formulations de LNP(imi) en fonction du ration massique d'Imiquimod introduit.....	169
Table V.3. Quantification du taux de charge des LNP doublement chargées en antigène et immunostimulant.....	171
Table V.4. Doses d'antigène et d'immunostimulant administrées aux souris.....	172
Table V.5. Taille et charge de surface moyennes des LNP ⁺ en comparaison avec leur équivalent neutre.....	175
Table V.6. Taux de charge du complexe formé entre les LNP ⁺ et le CpG.....	177
Table V.7 : Signaux de détresses à surveiller au cours de l'étude et leur degré de gravité.....	191
Table V.8. Analyse de la croissance tumorale.	194
Table VI.1. Caractéristiques principales des différentes stratégies préalablement testées pour le greffage de la p24 sur les LNP.	206
Table VI.2. Taille et charge de surface moyennes des LNP-p24 et LNP de base.....	210
Table VII.1 : Masses des ingrédients entrant dans la composition des LNP de tailles et charges différentes.	237
Table VII.2. Formulation de PEG-MAN.	238

Table VII.3. Concentration des facteurs de croissance à ajouter au milieu de culture des DC primaires.	249
--	-----

INTRODUCTION GENERALE

Les vaccins représentent l'un des progrès majeurs de l'Histoire pour la santé publique, concrétisant notamment l'éradication de la variole en 1980. Les premiers vaccins étaient développés à partir de pathogènes entiers atténus ou inactivés, ce qui présentait alors l'avantage d'une grande efficacité, au prix d'un certain nombre d'effets indésirables. Au fur et à mesure des avancées réalisées dans ce domaine, les vaccins ont naturellement évolué vers des prototypes plus sûrs, constitués de sous-unités de pathogènes, appelées antigènes. Le gain en sécurité de ces nouveaux candidats s'est vu compensé par un cruel manque d'immunogénicité, imposant l'ajout d'adjuvants. Ceux-ci ont pour but d'augmenter l'immunogénicité des antigènes par plusieurs moyens, en délivrant un signal de danger aux cellules immunitaires afin de les activer et en vectorisant l'antigène auprès de leur cible. L'objectif de ces formulations vaccinales est de générer de puissantes réponses immunitaires, comme le faisaient les vaccins historiques. Ces réponses immunitaires se traduisent par une médiation humorale à l'origine de la production d'anticorps permettant de neutraliser les pathogènes circulants, ainsi que par une médiation cellulaire destinée à éliminer les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires. A l'heure actuelle, les principaux adjuvants autorisés pour une utilisation chez l'homme génèrent exclusivement une réponse immunitaire de type humoral. Bien que cela soit suffisant pour certains pathogènes, d'autres comme le VIH requièrent une immunité cellulaire indispensable à l'élimination du virus persistant dans les cellules infectées. Dans ce contexte, les adjuvants de vaccin sont en plein essor dans le but d'identifier de nouveaux candidats plus performants permettant de répondre à ce manque d'immunogénicité, tout en s'attachant à conserver un bon profil de sécurité. Une large gamme de vecteurs de différentes natures et propriétés ont alors vu le jour. Parmi ceux-ci, les vecteurs de type NLC (nanostructured lipid carriers) sont d'un grand intérêt. Ces vecteurs n'ont été que récemment développés, de manière à combiner les avantages des autres vecteurs en s'affranchissant de leurs inconvénients. Ces candidats stables, sûrs, biocompatibles et faciles à produire n'ont néanmoins été que très peu exploités pour des applications de vaccins, en faveur de la délivrance de médicaments. Par conséquent, l'utilisation de NLC pour la délivrance d'antigènes a tout intérêt à être explorée, ce que nous nous sommes employés à faire au cours de ce travail de thèse.

Ainsi, ce manuscrit décrit la démarche suivie afin de proposer une plateforme de délivrance d'antigènes de type NLC capable d'induire des réponses immunitaires d'une grande amplitude, à médiation humorale et cellulaire. Le manuscrit est organisé en plusieurs chapitres suivant les différents axes de travail suivis. Le chapitre I présente le contexte général des vaccins en parcourant leur évolution d'hier à aujourd'hui et détaille le fonctionnement du système immunitaire et les caractéristiques sur lesquelles repose le concept de la vaccination. Dans le chapitre II, nous faisons l'état de l'art des adjuvants, en veillant à évoquer d'une part les immunostimulants et d'autre part les vecteurs d'antigènes. Puis, le chapitre III rappelle les enjeux des vaccins du XXI^{ème} siècle en s'attardant sur le cas particulier du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et définit le vecteur qui sert de base à ce travail de thèse ainsi que les objectifs qui le gouvernent. Dans le chapitre IV qui suit, nous décrivons les expériences menées pour réaliser la preuve de concept de la vectorisation d'un antigène sur le modèle de l'ovalbumine. La technique de vectorisation est rapportée ainsi que l'étude d'un grand nombre de paramètres tels que la taille du vecteur, la dose d'antigène, la combinaison avec un immunostimulant, ou encore la voie d'administration. Ces différentes configurations sont comparées sur la base de leur immunogénicité évaluée chez la souris. Le chapitre V est quant à lui focalisé sur la double délivrance de l'antigène et de l'immunostimulant associé. Nous comparons alors plusieurs stratégies de délivrance de ces deux éléments, sur des vecteurs distincts ou bien sur un même vecteur. Parmi les différentes combinaisons testées, la plus immunogène est retenue pour une évaluation de protection anti-tumorale à l'aide d'un modèle de cellules tumorales exprimant l'ovalbumine. Finalement, le chapitre VI décrit l'application de ces technologies au cas concret du VIH, pour lequel nous avons sélectionné l'antigène p24. Sur le même principe que l'ovalbumine, l'antigène p24 a été greffé à la surface du vecteur et plusieurs configurations et combinaisons ont été comparées chez la souris afin d'identifier le candidat le plus performant. Celui-ci fait enfin l'objet d'une étude approfondie d'immunogénicité chez le primate non-humain. L'ensemble de ces résultats sont discutés en fin de chapitres. Suit le chapitre VII, qui détaille les méthodes utilisées pour réaliser les expériences décrites dans les chapitres de résultats. Enfin, ce manuscrit s'achève par une conclusion générale qui met en relief la pertinence des résultats obtenus en réponse aux objectifs définis en introduction.

Chapitre I

Les vaccins et le système immunitaire

Ce chapitre a pour but d'introduire la notion de vaccin en décrivant le contexte historique de leur découverte et leur évolution au travers des âges vers les vaccins modernes. Dans un deuxième temps, nous présentons les réponses du système immunitaire sur lesquelles sont basés les vaccins pour induire une protection contre des pathogènes de différentes natures. Nous dressons ainsi un tableau des principaux acteurs de l'immunité et détaillons leur rôle au cours des différentes phases de la réponse immunitaire.

I.1 Les vaccins : comment se défendre contre les pathogènes

I.1.1 Contexte historique et découverte

a. Les grandes épidémies

L'Histoire a connu un grand nombre d'épidémies, certaines dévastatrices, qui ont été favorisées par le manque d'hygiène de l'époque. Les premiers écrits relatant la propagation de maladies infectieuses datent de l'Antiquité et décrivent les fléaux tels que la peste ou la variole. Thucydide rapporte en 430 avant JC dans « L'histoire de la guerre du Péloponnèse » comment la terrible peste d'Athènes a emporté près de 30 000 Athéniens, soit à l'époque un à deux tiers de la population¹. Il décrit une maladie à laquelle il survécut, causant de violentes fièvres accompagnées de saignements au niveau de la gorge et de la langue et suivis par l'apparition d'ulcères. Plus tard, c'est au tour de l'Empire Romain d'être touché par un épisode de peste dite antonine (d'après la dynastie des Antonins) en l'an 165 après JC, amenée par les soldats de retour de Mésopotamie. Il est estimé que cette épidémie causa près de 5 millions de morts² au sein de l'Empire. Les symptômes décrits, notamment les nombreuses éruptions cutanées sous la forme de pustules, suggèrent que la variole est à l'origine de cette épidémie, plutôt que la peste. La première pandémie de peste bubonique remonte à l'Empire Byzantin en l'an 541, et est caractérisée par l'apparition de bubons (inflammation intense d'un ganglion lymphatique généralement observée au niveau de l'aine ou de l'aisselle), la nécrose de la main et la septicémie³. Connue sous le nom de peste justinienne, d'après l'empereur Justinien I, elle trouve son origine en Ethiopie et se propage par l'Egypte vers Jérusalem avant d'atteindre Constantinople par bateau en suivant les routes du commerce. C'est à Constantinople que la maladie fit le plus de dégâts, causant jusqu'à 5 000 à 10 000 morts par jour selon les estimations. Les victimes furent si nombreuses qu'il fût impossible de les inhumer et les corps furent entassés dans les églises et les tours de la ville afin d'être brûlés. Au cours des années qui suivirent, la peste se propagea en Italie, en France, dans la vallée du Rhin et au nord jusqu'au Danemark et en Irlande, puis à l'est en direction de l'Asie. A l'échelle mondiale, cette pandémie tua près de 100 millions de personnes. La deuxième pandémie de peste bubonique apparut bien plus tard en 1346

sous le nom de peste noire et se répandit depuis l'Asie en direction de l'Europe en suivant la route de la soie, par des rats contaminés, des soldats et le commerce³. La maladie se manifesta aussi sous sa forme pulmonaire, plus mortelle et contagieuse que la forme bubonique, entraînant la mort en quelques jours. En conséquence, entre 30 et 50 % de la population européenne fût tuée en l'espace de 5 ans, soit environ 25 millions de victimes.



The Plague of Athens, Michiel Sweerts, 1652-1654



Enluminure représentant la variole, *Bible de Toggenburg* (Suisse), 1411



Gravure de Paul Fürst (1656) représentant le costume du médecin à l'époque de la peste noire : tunique recouvrant tout le corps, gants, bésicles de protection portées sur un masque en forme de bec, chapeau et baguette.

A cette époque, les maladies infectieuses et contagieuses se propagent très vite et facilement, en raison des conditions d'hygiène, notamment l'absence d'eau potable, et de l'inexistence de traitements. Ces épidémies sont par conséquent particulièrement redoutées par l'ensemble des classes sociales, car les maladies touchent sans discrimination les pauvres comme les riches, même les rois. Au cours de ces épidémies, il est remarqué que ceux qui survivent à une maladie semblent résister aux infections futures et sont les seuls capables d'approcher et soigner les malades⁴. Ces observations sont les prémisses de la conscience de notre système immunitaire et serviront de base pour le développement des vaccins.

b. La variolisation

Le premier traitement préventif contre une maladie infectieuse a été mis au point dans un contexte d'épidémie de variole. La variole est une maladie infectieuse causée par un virus, transmise par simple contact avec un individu infecté. La maladie produit une fièvre intense suivie d'éruptions de multiples pustules sur la totalité du corps et causant finalement la mort dans 30 % des cas. Afin de protéger les personnes de la maladie, le procédé de variolisation fût développé en Asie au X^{ème} siècle. Les chinois réduisaient en poudre des extraits de pustules de variole et les administraient par inhalation à des individus sains. En inde, un processus similaire était appliqué avec une administration cutanée⁵. Cette technique consiste en fait à inoculer le virus de la variole vivant et virulent à des personnes saines, qui dans la plupart des cas ne développent que des symptômes diminués de la maladie pendant quelques jours avant d'être protégés. Ce procédé est néanmoins risqué avec un taux de mortalité d'environ 1 à 2 %, mais qui demeure bien moindre qu'en cas d'épidémie avec 20 à 30% de mortalité. Au cours du procédé de variolisation, les individus sont contagieux donc isolés pour éviter la transmission du virus et une nouvelle épidémie. Les bénéfices de la variolisation traversent alors les frontières : elle apparaît en Egypte au XIII^{ème} siècle, puis en Afrique au XVII^{ème} siècle et enfin en Europe et en Amérique au début du XVIII^{ème} siècle. La variolisation fût acceptée en France en 1774 après que Louis XV meurt de la variole⁵.

c. La vaccination

A la fin du XVIII^{ème} siècle, malgré la variolisation l'Europe est touchée par une grave épidémie de variole qui contamine près de 60 % de la population. Les survivants sont quant à eux défigurés par les cicatrices laissées par les pustules⁶. Cependant, il se trouve que les fermiers ayant été contaminés par la « vaccine », ne sont pas atteints par la variole. La vaccine est en fait une maladie infectieuse des bovidés causée par un virus de la même famille que celui de la variole. Sur ces observations, le médecin Edward Jenner fait alors l'hypothèse que la vaccine peut protéger l'homme de la variole. En 1796, afin de tester son hypothèse il récolte du pus issu de pustules de vaccine sur une fermière et l'inocule à James Phipps, un enfant de 8 ans. L'enfant ne développe alors que de légers symptômes (lésions bénignes, fièvre). Trois mois plus tard, Jenner inocule cette fois-ci à l'enfant la variole humaine par le procédé de variolisation, qui ne déclare pas la maladie et ne montre aucun symptôme. Jenner en conclut alors que l'enfant est protégé grâce à la « vaccination », terme choisi en référence à la vaccine. Après avoir confirmé ses résultats sur d'autres sujets, Jenner décrit en 1798 son nouveau procédé et préconise de l'utiliser comme traitement préventif de la variole en prélevant directement la lymphe dans les pustules de vaches⁷. Bien que suscitant de nombreuses

critiques, la vaccination finit par être reconnue comme étant beaucoup plus sûre que la variolisation, et la pratique se généralise rapidement à toute l'Europe. En effet, les effets indésirables de la vaccination sont bien moins graves, avec une estimation de seulement 1 cas mortel sur 1 million. La grande différence entre la variolisation et la vaccination est que dans le premier cas on inocule directement le virus humain, tandis que dans le deuxième cas le virus provient d'une autre espèce et est transmissible à l'homme avec peu de symptômes. Le virus de la vaccine est suffisamment proche de celui de la variole pour induire une protection de la même manière que par le procédé de variolisation, avec pour avantages un risque moindre de contamination et des symptômes beaucoup plus légers (*Figure I.1*).



Figure I.1. Représentation de la variolisation et de la vaccination.

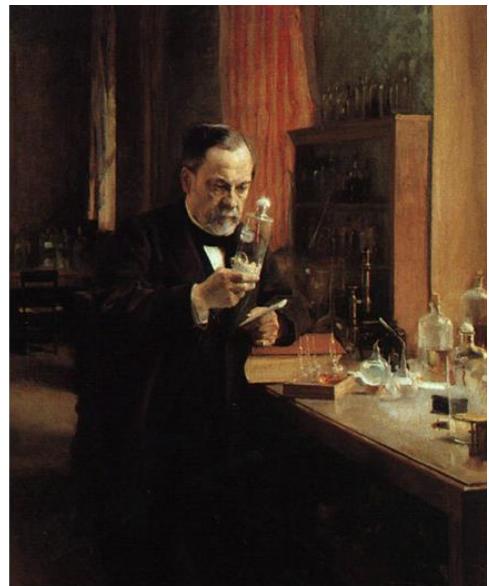
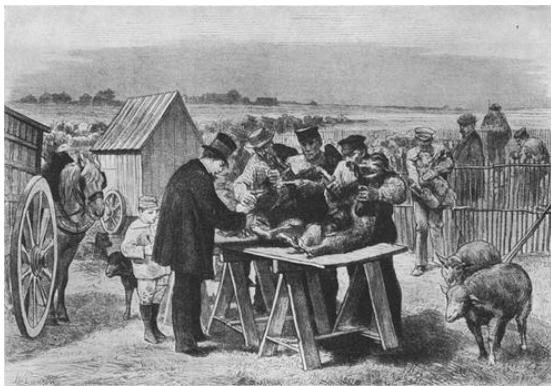
Aquarelle de Kirtland (1802) représentant à gauche le résultat d'une variolisation et à droite les effets de la vaccination 14 jours après inoculation. La variolisation provoque des réactions locales beaucoup plus importantes que la vaccination.

I.1.2 L'évolution des vaccins

a. Généralisation de la vaccination avec les premiers vaccins atténués

Dès la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle, la microbiologie est en plein essor, en particulier avec la théorie germinale décrite par Louis Pasteur en France. D'après cette théorie, les maladies infectieuses sont causées par des microorganismes invisibles à l'œil nu. Dès lors, de nombreux scientifiques recherchent les microbes responsables des maladies infectieuses connues de l'époque. Pasteur mène ses recherches sur le choléra aviaire et parvient à isoler la bactérie virulente en 1878. Sur le modèle de Jenner, il tente d'induire une protection contre la bactérie en l'inoculant à des poules. Ce n'est qu'un an plus tard qu'il réalise par hasard que de vieilles cultures de bactéries perdent leur virulence : les poules ne présentent que de légers symptômes et survivent à l'inoculation de ces bactéries. De plus, ces poules résistent ensuite à l'administration de bactéries fraîches. Il en déduit que l'exposition des bactéries à l'oxygène est capable d'atténuer leur virulence⁸. Il est alors convaincu que le concept d'atténuation peut être appliqué à d'autres microbes. Lors de ses travaux sur le bacille du charbon (anthrax), il étudie l'effet de traitements physiques tels que l'exposition à la chaleur mais aussi de traitements chimiques comme l'acide. Il démontre sur des moutons que les bacilles atténués à la chaleur protègent contre une infection avec des bacilles frais. La notion de vaccination est alors généralisée à l'administration de n'importe quel microorganisme dans le but d'induire une immunité et de prévenir une maladie infectieuse ou ses séquelles. Les vaccins mis au point par Pasteur sont qualifiés de « vivants atténués ». Ils sont en effet composés d'un pathogène entier dont la virulence a été diminuée. Le pathogène vivant est capable de se multiplier dans l'hôte et d'infecter ses cellules avec pour autant peu ou pas de symptômes, grâce au processus d'atténuation.

Fort de la mise au point de ses deux vaccins vétérinaires (choléra aviaire en 1879 et charbon des moutons en 1881), Pasteur s'intéresse désormais à une maladie qui touche aussi l'homme : la rage. La difficulté est qu'à cette époque il est impossible d'observer le virus, trop petit pour les microscopes disponibles, et de l'isoler pour le cultiver comme une bactérie. La rage touchant le système nerveux, Pasteur réalise des prélèvements de cerveaux de chiens enragés et s'en sert pour inoculer des lapins. Il effectue un grand nombre de transferts d'un lapin à un autre jusqu'à observer une atténuation du virus. Il perfectionne sa méthode en isolant les moelles épinières de ces lapins infectés et en les vieillissant au contact de l'air jusqu'à supprimer la virulence du virus. L'injection de ces moelles à des chiens enragés empêche la maladie de se déclarer.



Haut: Illustration représentant Pasteur en train de vacciner des moutons contre le charbon à Pouilly-le-Fort (XX^{ème} siècle). Droite: Tableau d'Edelfelt représentant Pasteur qui observe une moelle épinière de lapin enragé suspendue dans un bocal au-dessus de cristaux de potasse.

En 1885, l'occasion se présente de tester ce vaccin chez l'homme, car Joseph Meister, âgé de 9 ans, vient d'être mordu par un chien enragé. L'enfant reçoit sur une période de 10 jours 13 inoculations par injection d'une suspension de moelle de lapin enragé broyée et atténuée. Suite à ce traitement, l'enfant ne développe pas la rage. Certains émettent un doute concernant le chien ayant mordu l'enfant, qui n'était finalement peut-être pas enragé. Pour conclure sur l'efficacité de son vaccin, Pasteur réalise alors un contrôle qui consiste à injecter à l'enfant vacciné une souche de la rage d'une telle virulence qu'il ne pourrait en réchapper sans traitement⁹. Ce succès illustre la découverte du premier vaccin atténué humain.

b. L'essor des vaccins atténués et inactivés

En 1882, Koch parvient à mettre en évidence la bactérie responsable de la tuberculose, maladie infectieuse contagieuse dont la forme pulmonaire est la plus fréquente. S'ensuit plusieurs tentatives pour développer un vaccin. Sur le modèle de la vaccination contre la variole, des travaux sont réalisés sur le bacille tuberculeux bovin qu'il est nécessaire d'atténuer car il peut induire des infections chez l'homme. Sous l'influence de Pasteur, Calmette et Guérin réalisent une centaine de cultures successives du bacille tuberculeux bovin sur des tranches de pommes de terres immergées dans de la bile de bœuf, ce qui a pour effet de réduire la virulence de la bactérie jusqu'à la rendre inoffensive. Ce bacille bovin atténué, suffisamment proche du bacille responsable de la tuberculose humaine, est donc utilisé comme vaccin pour prévenir la tuberculose chez l'homme : le BCG (Bilié de Calmette et Guérin) qui est toujours d'actualité¹⁰. Le concept d'atténuation va inspirer de nombreux chercheurs

et permettre le développement d'autres vaccins, par exemple contre la fièvre typhoïde, le choléra ou la peste.

A la même période, Roux découvre que la diphtérie est causée non pas par une bactérie (bacille de Löffler-Klebs) mais par la toxine qu'elle libère¹¹. La diphtérie est une maladie infectieuse contagieuse affectant les voies respiratoires puis le cœur et le système nerveux périphérique, entraînant la mort par suffocation. En parallèle, Kitasato cultive la bactérie tétanique, causant également le tétanos par l'intermédiaire de toxines ciblant le système nerveux central. En 1890, Kitasato et Behring travaillent ensemble sur ces toxines et découvrent que le sérum de lapins immunisés avec les toxines contient des antitoxines capables de protéger d'autres animaux¹². Grâce à cette découverte, Behring reçoit en 1901 le premier prix Nobel de médecine. C'est le début de la sérothérapie, qui consiste à administrer du sérum provenant d'animaux immunisés afin de protéger contre la diphtérie et le tétanos. La mise au point d'un vaccin est rendue délicate par le manque de stabilité des toxines atténuées, qui peuvent retrouver leur toxicité. En 1923, Ramon décrit l'inactivation des toxines par un traitement au formaldéhyde, qui sont utilisées par Glenny pour produire des vaccins contre la diphtérie et le tétanos¹³. Dans le cas où l'immunogénicité de la toxine est réduite de manière trop importante par le traitement, des sels d'aluminium sont ajoutés comme adjuvants.

En 1918, l'Europe est frappée par une terrible épidémie de grippe très contagieuse, qui s'étendra rapidement dans le monde entier. Sa virulence est telle qu'elle fait entre 50 et 100 millions de victimes dans le monde en moins de 2 ans, plus que la première guerre mondiale. D'abord attribuée à tort à une bactérie, le virus de la grippe est identifié chez le porc par Schope en 1931. Le virus est ensuite isolé chez l'humain et propagé dans des furets. En 1935, Smith démontre que le virus peut être cultivé dans des œufs embryonnés. Le russe Smorodintseff propose un premier vaccin en 1936, qu'il a obtenu en atténuant le virus par 30 passages successifs dans des œufs¹⁴. L'année 1949 constitue un tournant dans la recherche de nouveaux vaccins, avec la possibilité de cultiver des virus *in vitro*. Le travail des chercheurs est par conséquent facilité et une vague de nouveaux vaccins suit. Un vaccin inactivé contre la poliomyélite a notamment été développé en 1952 par Salk¹⁵. La poliomyélite est une maladie infectieuse contagieuse due à un virus qui atteint la moelle épinière et entraîne la paralysie, généralement des membres inférieurs. Le virus a été cultivé sur des lignées cellulaires simiennes avant d'être inactivé par traitement au formaldéhyde. Dans le cas du vaccin inactivé, le pathogène est détruit et est donc incapable de se multiplier. La destruction du pathogène est néanmoins suffisamment douce pour que sa structure globale soit conservée, et qu'il ne perde pas toute son immunogénicité. Dans les années suivantes, des vaccins atténués contre la rougeole¹⁶, les oreillons¹⁷ et la rubéole¹⁸ furent également développés.

c. Les vaccins modernes

Le développement des vaccins atténus a permis de contrôler un grand nombre de pathogènes et de protéger efficacement les populations contre les épidémies associées. L'utilisation du pathogène entier vivant rend le vaccin très efficace car il stimule fortement notre système immunitaire qui met en place des défenses robustes et durables. Cependant, ce pathogène vivant peut se répliquer dans l'organisme et est transmissible par contagion, donc peut continuer de se propager. En outre, le procédé d'atténuation manque de contrôle car la quantité de mutations requises pour que le pathogène soit suffisamment atténué afin de ne pas provoquer de symptômes sans pour autant perdre toute son immunogénicité est souvent mal défini¹⁹. Considérant le taux de mutations élevé et rapide de la plupart des virus, il n'est pas exclu que le pathogène recouvre sa virulence après injection dans l'organisme. Un exemple marquant est le cas du premier vaccin développé contre la poliomyélite (vaccin atténué), qui provoque la maladie paralysante chez 1 enfant sur 750 000 des suites de la vaccination²⁰. Par conséquent, ce vaccin fût remplacé par l'actuel vaccin inactivé, plus sûr car le pathogène est tué et ne peut donc pas se répliquer ni recouvrir sa virulence. Les vaccins inactivés sont donc accessibles à tous, y compris les individus immunodéprimés qui ne peuvent pas recevoir de vaccins vivants atténus. En contrepartie de leur plus grande sûreté, les vaccins inactivés perdent en immunogénicité à cause des traitements (formaldéhyde, chaleur) effectués sur le pathogène. Leur efficacité est rehaussée en augmentant les doses administrées ainsi que le nombre d'injection. Néanmoins, le développement des vaccins inactivés connut également quelques échecs. Dans les années 1960, un essai clinique fût mené sur de jeunes enfants afin de tester un vaccin inactivé contre le virus respiratoire syncytial (RSV), virus très contagieux qui touche les nourrissons de moins de 2 ans et cause des infections respiratoires. Environ 9 mois après le début de l'essai clinique, les enfants vaccinés furent touchés par une épidémie de RSV, mettant en évidence le manque d'efficacité du vaccin. En outre, les malades développèrent des complications respiratoires (pneumonies) associées à une forme sévère du RSV à cause du vaccin, les enfants non vaccinés étant atteint par la forme habituelle du RSV²¹. Ces expériences douloureuses, ainsi que les progrès réalisés en biologie moléculaire et immunologie encouragèrent les scientifiques à développer une nouvelle classe de vaccins plus sûrs : les vaccins à sous-unités.

Les vaccins à sous-unités, à l'inverse des vaccins entiers atténus ou inactivés ne contiennent qu'une fraction du pathogène, généralement une protéine ou peptide appelé antigène. Cet antigène doit être sélectionné en fonction de la pathogénèse et des mécanismes immunologiques impliqués lors d'une infection, de sorte que cet antigène soit reconnu par le système immunitaire et capable de déclencher des réponses immunitaires adaptées. Les antigènes peuvent être extraits et purifiés

directement à partir des pathogènes, mais ce sont des procédures coûteuses et risquées²². D'autres méthodes, dites recombinantes, ont alors été développées pour produire les antigènes désirés à l'aide d'hôtes vivants servant de systèmes d'expression. Le gène impliqué dans la production de la protéine antigénique au sein du pathogène est isolé et inséré dans l'ADN de l'hôte, à savoir des cellules de levures, mammifères ou insectes. La machinerie cellulaire est ainsi utilisée pour produire et sécréter l'antigène en grandes quantités²³. Ce procédé a été utilisé pour mettre au point le premier vaccin recombinant en 1986 contre l'hépatite B, maladie contagieuse causée par un virus qui induit une inflammation du foie et peut entraîner de graves complications comme des cirrhoses et cancers du foie. L'antigène de surface du virus ainsi produit par des levures s'assemble pour former des particules d'apparence similaire au virus, d'où le nom de virus-like particles (VLP)²⁴. Cette structure confère à la protéine antigénique une grande immunogénicité. Sur le même principe, un vaccin contre le papillomavirus humain a été développé dans les années 2000 en se servant de levures ou de cellules d'insectes pour produire la protéine virale de capsid. Selon son génotype, le papillomavirus humain se transmet par voie cutanée et infecte la peau ou par voie sexuelle et est responsable de 99 % des cancers du col de l'utérus^{25,26}. Plus tard, des peptides antigéniques pourront également être produits par synthèse chimique²². Un candidat vaccin contre le paludisme sera ainsi proposé à base d'un peptide synthétique et évalué en essais cliniques²⁷.

Type de vaccin	Immunogénicité	Sûreté	Exemple
Vaccin vivant atténué	Forte Dose faible Peu d'injections Réponses humorale et cellulaire Protection longue durée	Faible Risque d'infection Effets secondaires	Rage Rougeole Oreillons Rubéole
Vaccin tué inactivé Vaccin anatoxine	Moyenne Dose élevée Injections de rappel Réponses humorale et cellulaire Protection longue durée	Moyenne Faible risque d'infection Effets secondaires	Coqueluche Poliomyélite Diphthérie Tétanos
Vaccin à sous-unités	Faible Dose élevée Injections de rappel Réponse humorale seule	Forte Aucun risque d'infection Peu d'effets secondaires	Hépatite B HPV

Table I.1 : Les caractéristiques principales des différents types de vaccins.

La sûreté est inversement proportionnelle à l'immunogénicité du type de vaccin.

Les vaccins à sous-unités présentent des avantages certains par rapport aux vaccins atténués et inactivés, tels qu'une plus grande sûreté, un meilleur contrôle qualité, un moindre coût de production, la possibilité de cibler des réponses immunitaires envers un épitope précis du pathogène, ainsi que des conditions de conservation facilitées²⁸. En contrepartie, de tels vaccins sont bien moins immunogènes et nécessitent d'être associés à des adjuvants²⁹. Les vaccins contre l'hépatite B et le HPV sont par exemple combinés avec des sels d'aluminium. Les différentes classes de vaccins sont comparées dans la *Table I.1*.

I.2 Les réponses du système immunitaire

Les vaccins reposent sur l'existence de défenses naturelles de notre organisme contre les pathogènes infectieux. En présentant à l'organisme le pathogène sous une forme atténuée, inactivée ou fractionnée, celui-ci développe des défenses capables de protéger lors de futures infections par le pathogène. Ces défenses sont le fait de notre système immunitaire, dont la fonction est d'identifier les pathogènes infectieux afin de mettre en place des réponses adaptées à l'élimination de ces pathogènes.

I.2.1 Systèmes immunitaires inné et adaptatif

Le corps humain est constitué de plusieurs barrières qui bloquent l'entrée des microorganismes étrangers. La peau constitue une première barrière physique imperméable aux particules solides et liquides. Les voies d'entrées du corps humain, telles que la bouche, sont tapissées de muqueuses et contiennent des fluides antiseptiques comme la salive. De plus, l'intestin est colonisé par une flore bactérienne commensale, qui entre en compétition avec les éventuelles bactéries étrangères et les empêche de se développer. Au niveau de l'ensemble de ces barrières (peau, muqueuses) se situent des cellules du système immunitaire inné, qui constituent notre première ligne de défense contre les agents infectieux. Les cellules immunitaires innées identifient l'intrus en reconnaissant des motifs particuliers présents à la surface d'un grand nombre de microorganismes et le détruisent. Cette réponse immunitaire innée est opérationnelle en quelques heures contre une grande variété de pathogènes, mais n'est pas spécifique. Dans le cas où la réponse immunitaire innée ne suffit pas à éliminer le pathogène, la phase adaptative est déclenchée³⁰.

Après avoir capturé le pathogène, les cellules immunitaires innées, plus précisément les cellules dendritiques (DC), migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques qui est le siège du système immunitaire adaptatif, afin d'instruire les cellules professionnelles de la nature du pathogène. En réponse, ces cellules se différencient en cellules spécifiques du pathogène et se multiplient en grand nombre dans le but de neutraliser complètement le pathogène. La réponse immunitaire adaptative intervient donc en second lieu et nécessite quelques jours pour être opérationnelle, mais est plus efficace car hautement spécifique du pathogène. Une fois le pathogène éliminé, le système immunitaire adaptatif garde en mémoire des cellules immunitaires spécifiques qui pourront être sollicitées lors d'une nouvelle infection par le même pathogène. Ces cellules mémoires interviendront beaucoup plus rapidement et avec une intensité telle que le pathogène pourra être neutralisé et éliminé avant

d'avoir pu se multiplier et provoquer des symptômes. Le principe du vaccin repose sur l'existence de cette mémoire immunitaire. Ainsi, le vaccin mime une première infection par un pathogène afin que le système immunitaire adaptatif soit éduqué et développe des défenses efficaces et spécifiques qu'il garde en mémoire en cas de future infection³⁰. Une modélisation du système immunitaire inné et adaptatif est proposée en *Figure I.2*.

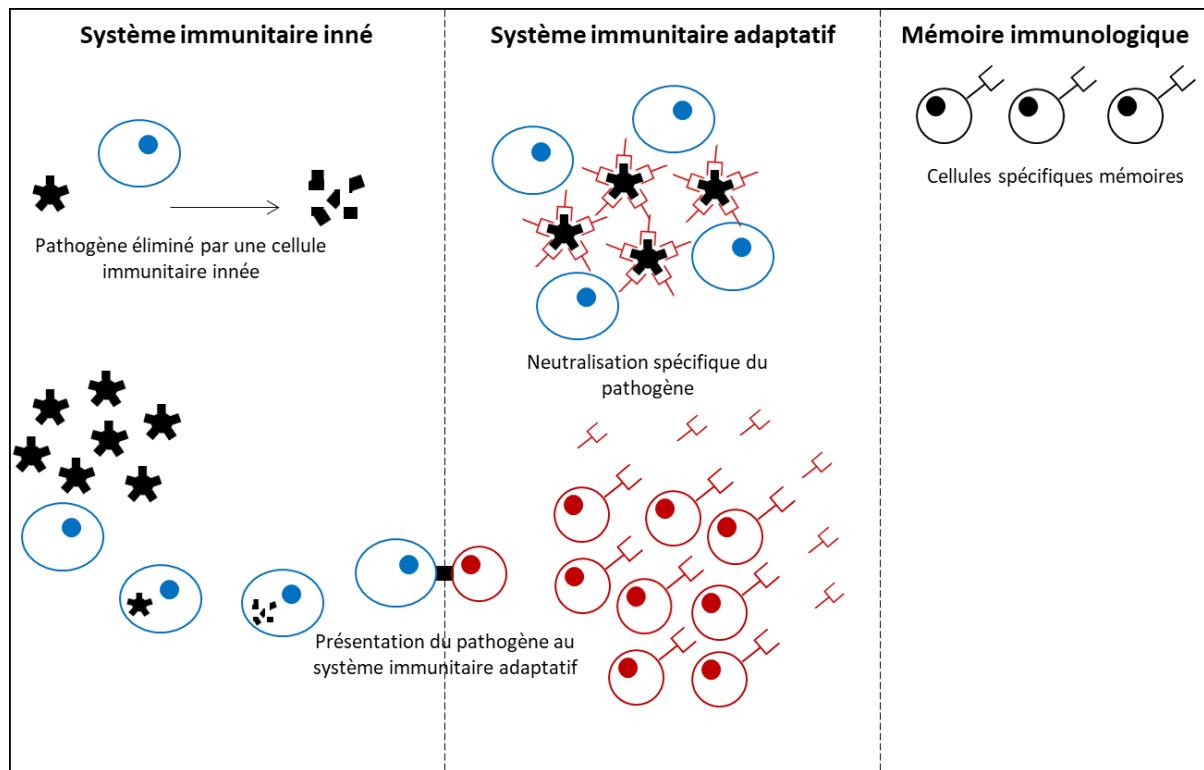


Figure I.2. Modélisation du système immunitaire inné et adaptatif.

Les cellules du système immunitaire inné (en bleu) capturent le pathogène et vont le présenter aux cellules immunitaires adaptatives (en rouge). Celles-ci se différencient en cellules spécifiques et se multiplient afin de neutraliser le pathogène de manière spécifique. Lorsque le pathogène est éliminé, quelques exemplaires des cellules spécifiques sont gardées en mémoire en prévision d'une future infection par le même pathogène.

I.2.2 Les acteurs du système immunitaire

Toutes les cellules immunitaires descendent de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes situées dans la moelle osseuse. Ces cellules souches donnent naissance aux progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes. La famille des lymphoïdes comprend les cellules NK (« natural killer ») ainsi que les lymphocytes B et T. La famille des myéloïdes comprend les érythrocytes (globules rouges), les

mégacaryocytes qui produisent les plaquettes, les cellules dendritiques, les granulocytes et les monocytes. Ces derniers se différencient finalement en macrophages après migration du sang vers les tissus³¹ (*Figure I.3*). Ces cellules immunitaires, ayant en général une durée de vie courte, sont renouvelées dans la moelle osseuse qui fait partie des organes lymphoïdes primaires. La moelle osseuse est également le lieu de maturation des lymphocytes B. Le thymus, où matures les LT, est un autre organe lymphoïde primaire³². Une fois produites, toutes ces cellules immunitaires sont stratégiquement réparties dans le corps humain, au niveau des organes lymphoïdes secondaires : la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes localisés au niveau des muqueuses et des barrières épithéliales près des potentielles voies d'entrée des pathogènes (*Figure I.4*).

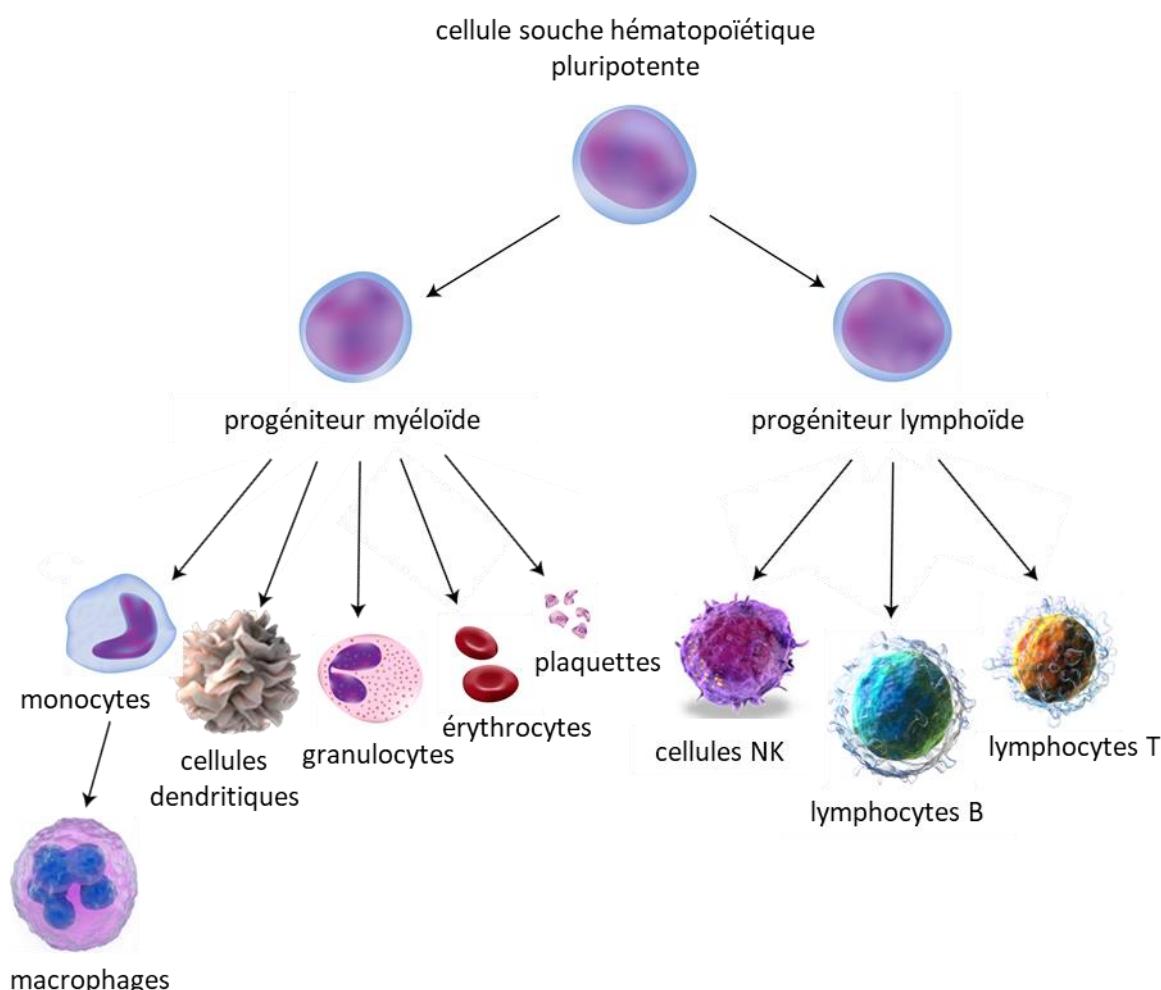


Figure I.3. Représentation des principales cellules immunitaires issues de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes.

Les macrophages, cellules dendritiques, granulocytes, érythrocytes et plaquettes appartiennent à la lignée myéloïde. Les lymphocytes B, LT et cellules NK proviennent de progéniteurs lymphoïdes.

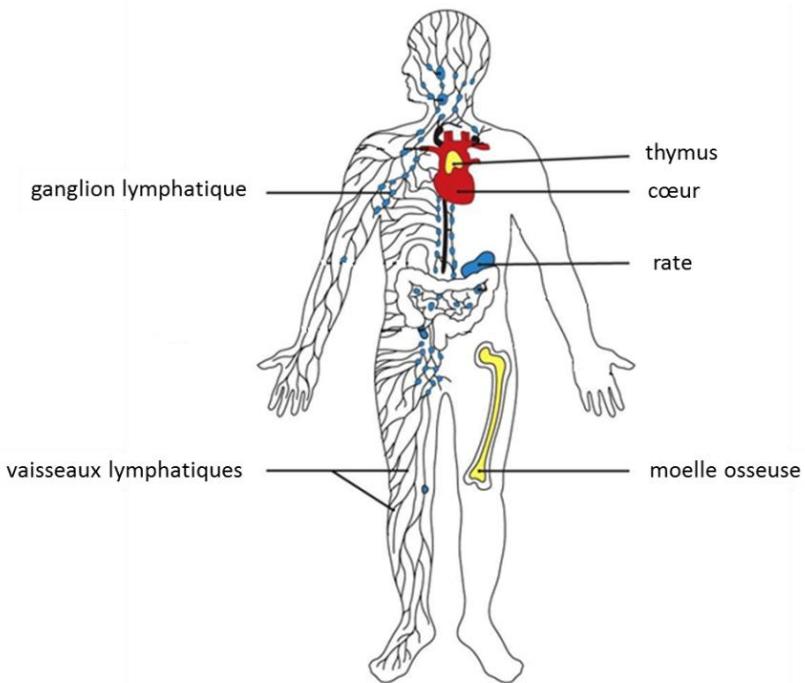


Figure I.4 : Les organes lymphatiques du corps humains.

Parmi l'ensemble des cellules immunitaires, certains acteurs jouent un rôle clé dans la défense contre les pathogènes infectieux. Les fonctions des cellules principales sont décrites ci-dessous et résumées dans la *Table I.2*.

Les **macrophages** sont des cellules phagocytaires présentes en grand nombre dans les tissus. Leur fonction principale est l'élimination des corps étrangers et cellules mortes par phagocytose. En cela, les macrophages contribuent au maintien de l'homéostasie des tissus en détruisant les cellules mortes. D'autre part, ce sont des acteurs de l'immunité innée capables d'identifier les pathogènes et de les éliminer de manière non spécifique. De plus, les macrophages participent à la réaction inflammatoire associée à une infection en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires³³.

Les **cellules dendritiques** (DC) sont ainsi nommées en raison des dendrites formées par leur membrane. Ces cellules présentes dans les tissus et circulant dans la lymphe ont pour principale fonction la présentation d'antigènes exogènes ou endogènes aux cellules de l'immunité adaptative³⁴. La famille des DC contient plusieurs sous-populations de cellules. Les DC myéloïdes ont une forte capacité migratoire et sont spécialisées dans la présentation de l'antigène. Lorsqu'elles sont immatures, elles ont une activité phagocytaire élevée et une fois activées sécrètent activement des cytokines. Les DC plasmacytoides diffèrent des myéloïdes par leur durée de vie plus longue. Ces

cellules sont spécialisées dans la réponse aux infections virales par la production massive de cytokines³⁵. Parmi les DC on trouve également les cellules de Langerhans, localisées dans l'épiderme et les épithéliums des bronches et muqueuses. Cependant, leurs fonctions sont encore mal connues.

Les **lymphocytes** sont des cellules de l'immunité circulant dans le sang et la lymphe afin de se déplacer entre les tissus et organes lymphatiques. On distingue 3 grandes catégories de lymphocytes : les **cellules NK**, les **lymphocytes B (LB)** et **lymphocytes T (LT)**.

Les **cellules « Natural Killer » NK** sont des cellules lymphoïdes qui n'expriment pas de récepteurs spécifiques d'un antigène, à la différence des lymphocytes B et T, et qui font partie de l'immunité innée. Elles ont la capacité de reconnaître des cellules anormales (par exemple des cellules tumorales) par des récepteurs membranaires (NKR) et de les tuer, d'où leur nom « Natural Killer »³⁶. D'autre part, elles expriment à leur surface des récepteurs pour les immunoglobulines qui peuvent fixer des anticorps et ainsi doter la cellule NK d'un module de reconnaissance spécifique d'antigènes. Leur cytoplasme renferme des granules contenant des protéines cytotoxiques qu'elles sécrètent lorsqu'elles sont activées. Les cellules NK contrôlent la réplication des virus en identifiant les cellules infectées et en éliminant les réservoirs viraux en attendant que l'immunité adaptative soit mise en place.

Les **LB** et les **LT** sont les cellules effectrices de l'immunité adaptative. Les LB matures dans la moelle osseuse et les LT dans le thymus et ils portent des récepteurs antigéniques spécifiques à leur surface (BCR et TCR respectivement).

Le BCR exprimé par les LB peut être sécrété sous forme soluble : ce sont les **anticorps**. Le BCR reconnaît des antigènes de différentes natures (protéines, sucres, lipides ou molécules inorganiques), sous forme circulante ou exprimé à la surface des pathogènes. Les anticorps fixent les antigènes pour faciliter leur élimination. Ce sont des molécules hétérodimériques constituées d'une chaîne lourde (H) et d'une chaîne légère (L) qui sont organisées en domaines. Ces deux chaînes sont constituées d'une région amine terminale dite domaine variable (V). L'association VH-VL forme le site d'interaction avec l'antigène qui garantit la reconnaissance de chaque antigène par un anticorps spécifique. Les régions constantes (C) des chaînes L sont de 2 sous-classes (soit κ soit λ) et assurent l'association avec les régions C de la chaîne H partenaire (*Figure I.5*).

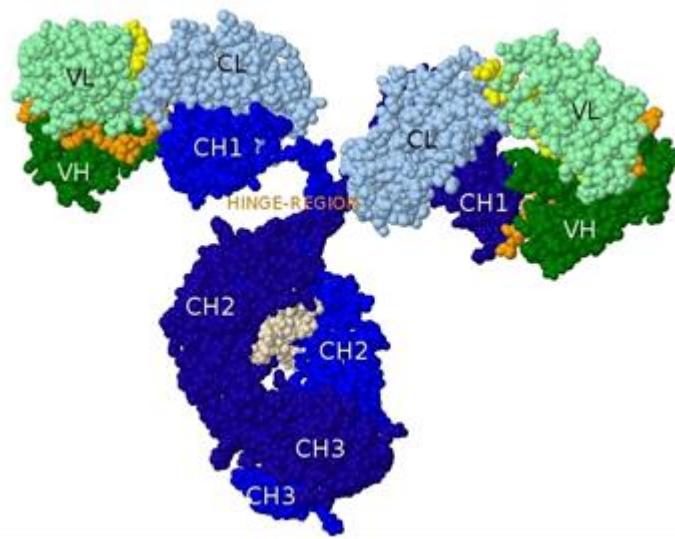


Figure I.5 : Structure globulaire d'une immunoglobuline (IgG).

Les domaines variables (VL et VH) se trouvent à l'extrémité amine des chaînes L et H et forment le site de liaison avec l'antigène. Les domaines constants sont impliqués dans diverses fonctions des anticorps telles que la fixation du complément ou la liaison aux récepteurs membranaires de cellules phagocytaires.

Il existe 5 types de chaînes H, qui sont les différents isotypes ou classes d'anticorps. Les IgM sont les premiers anticorps produits lors d'une infection. Sous forme de pentamère, les IgM ont un grand nombre de sites spécifiques ce qui favorise leur fixation à l'antigène. Les IgG, produits dans un second temps et plus affins, constituent la majorité des anticorps circulants, près de 75 %. Les IgG comprennent plusieurs sous-classes, qui sont chez la souris les IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 et chez les humains IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Les IgA sont principalement présents dans les muqueuses et contribuent à empêcher les pathogènes de se fixer aux cellules épithéliales. Enfin, les IgD et IgE sont beaucoup plus faiblement représentés. Les IgD participent à l'activation des LB tandis que les IgE sont efficaces contre les parasites et sont présents en excès dans le cas d'allergies (Figure I.6). La commutation isotypique permet aux LB la synthèse d'une classe d'anticorps à une autre. Lors du changement de classe, seule la région constante est modifiée. La région variable est conservée, ce qui n'affecte pas la spécificité de l'anticorps à l'antigène. L'anticorps fixera donc toujours le même antigène mais n'interagira pas avec les mêmes cellules³⁰.

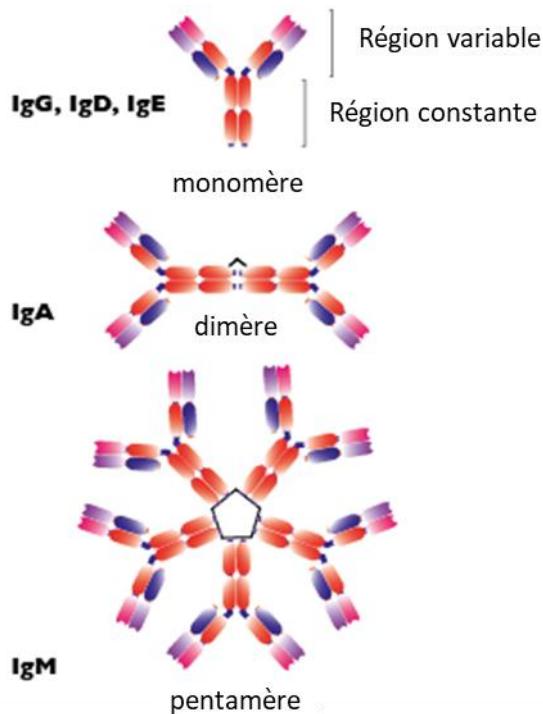


Figure I.6. Représentation des différents isotypes d'anticorps.

Les anticorps sont composés d'une région variable adaptée à la reconnaissance d'un antigène spécifique et d'une région constante définissant son isotype. Les IgG, IgD et IgE sont sous la forme de monomères tandis que les IgA sont sous la forme de dimères et les IgM sous la forme de pentamères.

Les LT expriment à leur surface un TCR qui reconnaît l'antigène lorsqu'il est présenté sous forme de peptides par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)³⁷. En général, les LT sont incapables de se lier à des antigènes solubles et dans leur forme native. Il existe 2 types de TCR composés de l'association de 2 chaînes, soit α et β , soit γ et δ , qui reconnaissent des antigènes de différentes natures. Les LT $\gamma\delta$ reconnaissent essentiellement de petites molécules issues de microorganismes et certains motifs peptidiques. Les LT $\alpha\beta$ sont les effecteurs principaux qui sont spécifiques d'un antigène peptidique présenté par les molécules du CMH. L'expression de molécule accessoire CD8 ou CD4 conditionne l'association du TCR à une molécule CMH de classe I ou de classe II respectivement. Chaque chaîne du TCR est constituée d'une région V et d'une région C qui comporte une partie transmembranaire assurant son expression à la surface du LT.

Le répertoire des lymphocytes B et T

En théorie, les LB et LT produisent des récepteurs pouvant reconnaître un grand nombre de cibles. On définit le répertoire immunitaire comme l'ensemble des récepteurs d'antigènes. Cet immense répertoire de spécificités est le résultat d'un mécanisme génétique unique : la recombinaison VDJ. Celle-ci intervient au cours du développement des LB et LT dans les organes lymphatiques primaires et permet de générer un grand nombre de variations du gène qui code pour le récepteur antigénique³⁸. Ce mécanisme est commun aux LB et LT. Chaque région constante est codée par un gène unique alors qu'il existe un grand nombre de gènes codant pour les régions variables. Dans une cellule non lymphocytaire, l'agencement de ces gènes ne permet pas leur expression. Cependant, au cours de leur différentiation les LB et LT remanient l'agencement des gènes codant pour leur récepteur. En bref, ce réarrangement juxtapose un gène V avec son promoteur, à un segment intermédiaire J qui est associé à un gène C. Le système enzymatique assurant le clivage spécifique et le rabotage des gènes est doté d'une activité exonucléase éliminant ou additionnant de manière aléatoire de 0 à 15 nucléotides. Cette activité crée une grande diversité aux points de réarrangements. Ainsi, un gène fonctionnel est créé et chaque LB ou LT ne produira qu'un récepteur unique. Le nombre de récepteurs antigéniques possibles dépasse largement le nombre total de lymphocytes, ce qui traduit que seule une minorité des possibles récepteurs du répertoire sont effectivement utilisés. Avant d'arriver à maturité, chaque lymphocyte est évalué afin d'éliminer les clones qui reconnaissent nos propres cellules ainsi que ceux qui ne reconnaissent aucun antigène. A la fin de leur développement dans le thymus, les LT se différencient en deux classes qui se distinguent par le marqueur CD4, reconnaissant l'antigène présenté par les molécules du CMH-II, ou le marqueur CD8, reconnaissant l'antigène présenté par les molécules du CMH-I. Les LT auxiliaires expriment le marqueur CD4 et orchestrent la réponse immunitaire, tandis que les LT cytotoxiques portent le marqueur CD8 et sont chargés d'éliminer les cellules infectées par un pathogène intracellulaire.

Immunité	Cellule	Fonctions principales	Lieu de résidence
Innée	Macrophages	Elimination des pathogènes par phagocytose Réponse inflammatoire	Tissus
	Cellules NK	Elimination des pathogènes intracellulaires	Circuit sanguin
Lien entre innée et adaptative	Cellules dendritiques	Présentation de l'antigène	Tissus et circuit lymphatique
Adaptative	Lymphocytes B	Réponse humorale par la production d'anticorps pour éliminer les pathogènes extracellulaires	Circuits sanguin et lymphatique
	Lymphocytes T	Réponse cellulaire par l'élimination des cellules infectées par des pathogènes intracellulaires	Circuits sanguin et lymphatique

Table I.2 : Les principales cellules du système immunitaire et leurs fonctions.

Les cellules de l'immunité innée entrent les premières en action : les macrophages éliminent les pathogènes extracellulaires par phagocytose et les cellules NK détruisent les pathogènes intracellulaires. Les DC alertent les cellules du système immunitaire adaptatif en leur présentant des antigènes issus du pathogène capturé. En réponse, les LT auxiliaires orchestrent la réponse spécifique en stimulant les LB pour la production d'anticorps et les LT cytotoxiques pour l'élimination des cellules infectées.

1.2.3 Les différentes phases de la réponse immunitaire

Une réponse immunitaire efficace comprend quatre phases principales. La première phase d'identification du pathogène est réalisée par le système immunitaire inné et constitue l'initiation de la réponse immunitaire. La seconde phase correspond à la mise en œuvre de différentes actions spécifiques dans le but de contrôler l'infection et d'éliminer le pathogène. Tous les acteurs impliqués dans cette phase effectrice doivent cependant être maintenus sous contrôle afin d'empêcher une activité autodestructive du système immunitaire, ce qui constitue la phase de régulation. Les réactions allergiques et maladies auto-immunes sont des exemples de conséquences d'un système immunitaire mal réglé qui s'emballe. Enfin, la quatrième phase de mémoire immunologique est la garantie d'une action rapide, efficace et spécifique lors d'une deuxième infection par le même pathogène, permettant la neutralisation du pathogène avant même que la maladie ne se déclare.

a. La phase d'identification du pathogène

Cette première phase est réalisée par les acteurs de l'immunité innée, qui agissent de manière non spécifique sur tous les pathogènes par l'intermédiaire de récepteurs.

Les macrophages identifient les pathogènes extracellulaires

Lorsqu'un pathogène pénètre le corps humain, il est rapidement repéré par les macrophages. Ce sont les premières cellules sur le lieu d'une infection qui capturent et éliminent les microorganismes qu'elles rencontrent. Les macrophages sont capables de distinguer un pathogène des éléments du corps humain grâce à des motifs moléculaires présents sur leur membrane (PAMP = pathogen associated molecular pattern). Ces motifs sont communs à un grand nombre de microorganismes et sont particulièrement conservés³³. Ce sont donc d'excellentes cibles pour les cellules immunitaires qui possèdent des récepteurs spécifiques de ces motifs (PRR = pathogen recognition receptor). Une fois le pathogène identifié, sa capture par le macrophage est favorisée par l'action du complément³⁰. Le système du complément est composé de protéines plasmatiques produites principalement par le foie. En présence d'un pathogène, des protéases sont activées et conduisent à une cascade de réactions menant à la fixation des composantes C1q, C3 à la surface de la molécule exogène. La cible est ainsi marquée, dite opsonisée, ce qui facilite leur capture par les cellules phagocytaires (macrophages et DC) par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques des composantes du complément (en particulier CD11b et CD11c). Les vésicules intracellulaires formées (phagosome) s'acidifient puis fusionnent avec un lysosome contenant des enzymes capables de dégrader le pathogène en

peptides³⁹ (Figure I.7). En plus de leur activité phagocytaire, les macrophages induisent une réaction inflammatoire en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-12 et de chimiokines. Ces signaux permettent de recruter et d'activer d'autres cellules immunitaires sur le lieu d'une infection et facilitent leur migration en rendant les vaisseaux proches du lieu de l'infection perméables⁴⁰.

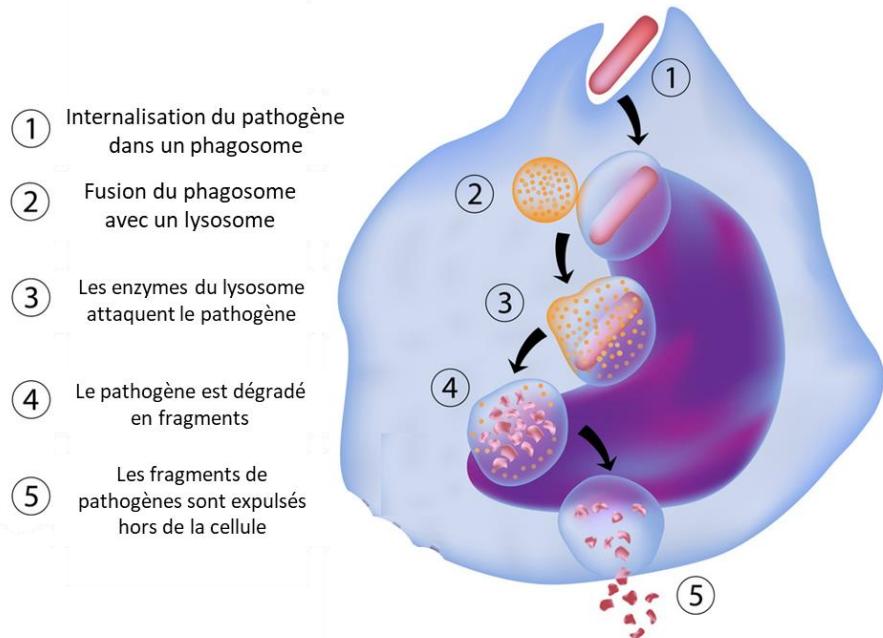


Figure I.7. Schéma représentant les différentes étapes de la phagocytose de pathogènes extracellulaires par les macrophages.

Les cellules NK identifient les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires

Lorsqu'une cellule est infectée par un virus, elle fonctionne anormalement. Bien qu'elle passe inaperçue des macrophages, les cellules NK disposent des récepteurs nécessaires à l'identification de ces cellules infectées. Bien que non spécifiques, les cellules NK sont capables de reconnaître les cellules infectées ou anormales, notamment parce que celles-ci expriment peu ou plus le CMH-I en raison d'une altération par le virus³⁰. De plus, les cellules infectées sécrètent des cytokines, en particulier l'IFN- α et l'IFN- β , qui activent considérablement les cellules NK. Dans certains cas, des anticorps peuvent se fixer à la surface de cellules infectées, que les cellules NK vont mieux reconnaître par l'intermédiaire de la région constante des anticorps. Ce processus est nommé ADCC (pour « antibody-dependant cellular cytotoxicity ») car l'activité cytotoxique des cellules NK repose sur la présence d'anticorps à la surface de cellules cibles³⁰. Les macrophages participent également à l'activation des cellules NK par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et le

TNF- α . Une fois fixées aux cellules infectées, les cellules NK libèrent des granules cytotoxiques contenant des granzymes et perforines qui vont perforer la membrane cellulaire et induire l'apoptose⁴¹. Par leur action, les cellules NK empêchent le virus de se répliquer trop rapidement et stabilisent la charge virale en attendant les acteurs de l'immunité adaptative, en particulier les LT cytotoxiques capables d'éliminer spécifiquement les cellules infectées.

La présentation de l'antigène par les cellules dendritiques

En parallèle de leur activité phagocytaire, les DC assurent une fonction essentielle dans le lien entre l'immunité innée et adaptative : la présentation d'antigènes aux LT naïfs. Les DC circulent dans tout l'organisme par le sang et la lymphé et peuvent résider au sein des tissus. Comme les macrophages, elles capturent continuellement les antigènes endogènes ou exogènes rencontrés⁴². Cependant, les DC doivent recevoir un signal de danger au moment où l'antigène est capturé pour initier la réponse immunitaire adaptative. Ces signaux de danger sont les PAMP qui activent des PRR comme pour les macrophages. Cette activation induit la maturation des DC, dont le phénotype varie selon le pathogène rencontré. De cette manière, les DC pourront orienter la réponse induite par les LT afin qu'elle soit adaptée à la nature du pathogène détecté⁴³. En l'absence de signal de danger, les DC envoient un message de tolérance envers l'antigène capturé.

La maturation des DC implique leur migration dans les ganglions lymphatiques où sont localisés les lymphocytes naïfs, leur circulation étant favorisée par l'inflammation générée par les macrophages ayant pour effet d'augmenter le flux de la lymphé⁴⁴. Les DC subissent également des changements au niveau de leur structure et fonctions. Les DC matures développent notamment des dendrites et perdent leurs propriétés d'adhésion afin d'augmenter leur mobilité³⁰. De plus, les fonctions endocytiques des DC sont réduites en faveur du fonctionnement de l'endosome et du lysosome. Cela se manifeste par une acidification de ces compartiments, nécessaire à la dégradation des antigènes capturés en peptides⁴⁵. Les molécules du CMH-II migrent alors du réticulum endoplasmique vers l'endosome pour être chargé avec un peptide antigénique et aller le présenter sur la membrane cellulaire. Ainsi, les DC matures expriment fortement le CMH-II, de même que les marqueurs de co-stimulation CD80 et CD86. La présentation de l'antigène s'accompagne également de la sécrétion de cytokines spécifiques qui participent à la polarisation de la réponse des LT en fonction de la nature du pathogène capturé⁴⁶. Le CMH-II est exprimé uniquement par les cellules présentatrice d'antigène (CPA), qui comptent les DC, les macrophages et les LB. Ce sont donc les seules cellules capables de présenter un antigène issu de la dégradation d'un pathogène extracellulaire.

A l'inverse du CMH-II, les molécules du CMH-I présentent principalement des peptides issus de protéines endogènes. Il peut s'agir de protéines provenant du cytosol dont la fonction est achevée, ou bien de protéines produites par des gènes viraux utilisant la machinerie de la cellule infectée, ou encore de protéines sécrétées par des pathogènes intracellulaires. Le protéasome dégrade les protéines en peptides qui sont ensuite transportés vers le réticulum endoplasmique pour être chargés sur les molécules du CMH-I avant d'être présenté à la surface de la cellule. Le CMH-I étant exprimé par toutes les cellules, n'importe quelle cellule infectée par un pathogène intracellulaire peut le signaler en présentant un peptide antigénique sur son CMH-I⁴⁵. Cependant, il peut arriver qu'un pathogène capturé par une cellule dendritique soit présenté sur le CMH-I plutôt que le CMH-II, ce que l'on appelle la présentation croisée. Bien que les mécanismes mis en jeu soient encore mal compris, il semblerait que ces antigènes exogènes puissent s'échapper de l'endosome pour atteindre le cytosol et être traités de la même manière que les antigènes endogènes. Cet échappement endosomal pourrait être lié à l'action de transporteurs membranaires⁴⁵. Dans le cas d'antigènes particulaires, leur internalisation dans des phagosomes pourrait retarder le processus d'acidification induisant leur dégradation peptidique et ainsi leur permettre de conserver leur intégrité et fuir vers le cytosol⁴⁷.

Ainsi, la présentation de l'antigène par les DC combinée aux signaux sécrétoires permet d'orienter la réponse immunitaire des LT de manière à induire une défense adaptée à la nature du pathogène et à son mode d'action. Par le mécanisme de présentation croisée, plusieurs voies de l'immunité peuvent alors être activées pour un même pathogène.

b. La phase effectrice

La phase effectrice est résumée schématiquement dans la *Figure I.8*.

Cette phase constitue l'entrée en jeu des acteurs de l'immunité adaptative. Ce sont les DC qui assurent le lien entre l'immunité innée mise en place de manière systématique dès l'intrusion du pathogène, et l'immunité adaptative indispensable à l'élimination spécifique du pathogène. Selon que le pathogène soit présenté sur les molécules du CMH-I ou du CMH-II, différents LT seront sollicités afin de mettre en œuvre des actions adaptées à la nature du pathogène pour le détruire.

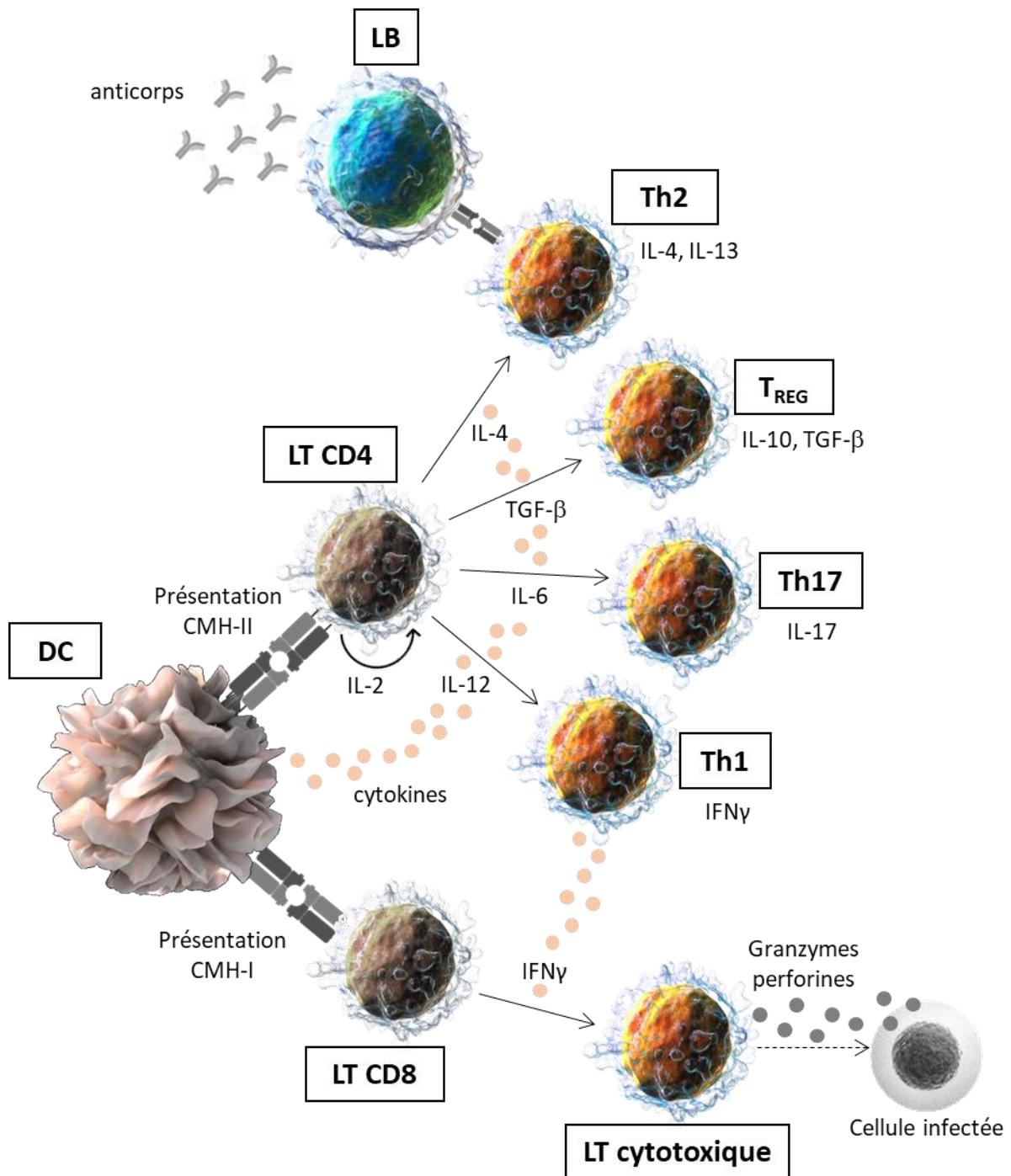


Figure I.8: Schéma représentant la présentation de l'antigène par les DC aux LT et les réponses immunes qui en découlent.

La présentation de l'antigène sur le CMH-II, accompagnée de la sécrétion par les DC d'IL-12, d'IL-6, de TGF- β ou d'IL-4 induit la polarisation des LT CD4 en Th1, Th17, T_{REG} ou Th2 respectivement. Les Th2 stimulent la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'anticorps spécifiques. La présentation de l'antigène sur le CMH-I induit l'activation des LT CD8 dont l'activité cytotoxique envers les cellules infectées est stimulée par les Th1.

L'activation des lymphocytes T auxiliaires : l'orchestration de la réponse immunitaire

Les LT auxiliaires se distinguent par l'expression du marqueur CD4 et jouent un rôle central dans l'immunité adaptative en orchestrant la réponse immunitaire. Les LT auxiliaires matures provenant du thymus sont naïfs tant qu'ils n'ont pas rencontré l'antigène pour lequel ils sont spécifiques. Cet antigène leur est présenté par les DC sur le CMH-II, ce qui induit leur activation. Afin qu'un LT auxiliaire soit correctement activé, un double signal est nécessaire. Le TCR et le marqueur CD4 exprimés par le LT se lient respectivement à l'antigène peptidique et au CMH-II exprimés par la DC⁴⁸. A cela s'ajoute un co-signal entre le marqueur CD28 exprimé sur le LT et le marqueur CD80 ou CD86 exprimé par la DC activée. Après stimulation, le LT auxiliaire sécrète massivement la cytokine IL-2, ce qui lui permet de se multiplier pour générer des clones identiques à lui-même et spécifiques de l'antigène, qui se différencie en une classe de LT effecteurs. Les 3 classes principales sont nommées Th1, Th2 et Th17 (pour T « helper » = auxiliaire en anglais). Ces voies de différenciation orientent la réponse immunitaire selon la nature du pathogène. Le phénotype Th1 est induit par la production d'IL-12 par les DC et favorisé par la sécrétion d'IFN-γ par les cellules T et NK lorsque celles-ci identifient des cellules infectées pathogène intracellulaire. Les cellules Th1 participent à l'immunité cellulaire en sécrétant massivement l'IFN-γ ayant pour effet l'activation des macrophages et la stimulation de l'activité cytolytique des LT cytotoxiques^{49,50}. De même, la différenciation des LT auxiliaires en Th2 est induite par la sécrétion de la cytokine IL-4, majoritairement par les DC. Les cellules Th2 prennent part dans l'immunité humorale en stimulant la prolifération des LB et en induisant la commutation isotypique des anticorps spécifiques de l'antigène, par la sécrétion des cytokines IL-4 et IL-13^{49,50}. Ces anticorps sont nécessaire pour neutraliser les pathogènes extracellulaires. Enfin, le phénotype Th17 est induit par la production majoritairement d'IL-6 par les DC. Les cellules Th17 ont un rôle pro-inflammatoire en faveur de la réponse immunitaire, qui permet de maintenir la barrière mucosale et inhibe l'activité des LT régulateurs, par leur production d'IL-17 et d'IL-23^{49,50}.

L'activation des lymphocytes B : la réponse immunitaire humorale

En parallèle de l'activation des LT auxiliaires par les DC, les LB ont eux aussi la capacité de reconnaître l'antigène par leur BCR. En effet, ce récepteur est une immunoglobuline membranaire qui peut se fixer à l'antigène natif sous sa forme circulante. Celui-ci est alors internalisé puis traité de la même manière que le font les DC pour être finalement présenté sur le CMH-II exprimé à la surface des LB⁵¹. A ce stade, les LB ne sont toujours pas activés car ils requièrent la participation des LT auxiliaires. Pour cela, les LB vont présenter leur antigène aux LT auxiliaires qui ont été préalablement activés et instruits contre le même antigène par les DC. En plus de la reconnaissance de l'antigène, les LT auxiliaires délivrent un signal supplémentaire aux LB en fixant le marqueur de surface CD40 grâce à leur ligand de surface CD154. Ce co-signal de stimulation, couplé à la sécrétion de cytokines, induit la prolifération des LB et leur différenciation en plasmocytes³⁰. Ces cellules sécrètent des anticorps spécifiques de l'antigène, qui sont en fait des versions sécrétoires du BCR ayant reconnu l'antigène. L'activation des LB par les LT auxiliaires induit également la commutation isotypique permettant de sécréter différentes classes d'anticorps : les IgM et IgD produits en premier lieu sont remplacés par des IgG, IgA et IgE, d'une plus grande affinité envers l'antigène. Les cytokines sécrétées par les LT auxiliaires durant la phase d'activation des LB orientent la commutation isotypique. En particulier chez la souris, une cellule Th1 sécrétant de l'IFN-γ privilégie la production d'IgG2a tandis qu'une cellule Th2, par sa sécrétion d'IL4, induit la production d'IgG1 et IgA⁵¹. Les anticorps produits, selon leur classe, agissent de différentes manières sur le pathogène. La neutralisation consiste à fixer le pathogène avec un grand nombre d'anticorps afin de l'empêcher d'entrer en contact avec les cellules. Les pathogènes ainsi recouverts d'anticorps, par le processus d'opsonisation, sont également plus facilement phagocytés ou endocytés par les cellules exprimant des récepteurs spécifiques des régions constantes des immunoglobulines, telles que les macrophages, les DC et les LB. En particulier, certains pathogènes ne portent pas de PAMP et sont donc invisibles des macrophages. Grâce à l'action de ces anticorps spécifiques, les macrophages peuvent identifier ces pathogènes et les détruire. De par leurs multiples modes d'action, les anticorps sont l'arme clé de la réponse humorale, elle-même médiée par les LB.

L'activation des lymphocytes T cytotoxiques : la réponse immunitaire cellulaire

Les anticorps sont certes très efficaces pour éliminer les pathogènes circulants mais leur contribution contre des pathogènes intracellulaires est limitée. L'élimination des pathogènes intracellulaires comme les virus nécessite de détruire les cellules infectées par ces pathogènes car elles constituent des réservoirs viraux et permettent aux virus de se répliquer. Bien que les cellules NK puissent identifier les cellules infectées et les détruire grâce à la fixation des anticorps, cette fonction est limitée par la nécessité que l'antigène reconnu par les anticorps soit exprimé à la surface des cellules cibles. Les lymphocytes T cytotoxiques exprimant la molécule accessoire CD8 ont un spectre de reconnaissance d'antigène plus large constitué de petits peptides (9-10 acides aminés) présentés par les molécules de CMH-I⁵². Dans la plupart des cas, l'activation des LT cytotoxiques est favorisée par la participation des LT auxiliaires activés. Ces derniers, activés par les DC, vont stimuler les DC en retour afin qu'elles surexpriment la protéine 4-IBBL. Ce ligand se fixe sur le marqueur de surface 4-IBB des LT cytotoxiques, co-signal nécessaire à la prolifération des LT cytotoxiques. La sécrétion d'IL-2 par les LT auxiliaires activés amplifie également la différenciation des LT cytotoxiques³⁰. Lorsqu'ils sont activés, les LT cytotoxiques sont capables de reconnaître directement l'antigène peptidique présenté à la surface d'une cellule infectée via son CMH-I, sans co-signal. Pour cela, les LT cytotoxiques activés quittent les ganglions lymphatiques pour rejoindre la circulation sanguine et les tissus, en particulier le lieu d'une infection. Cela est possible grâce à l'inflammation induite par les macrophages, ce qui confère des propriétés adhésives aux cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins localement au niveau du lieu de l'infection. Les lymphocytes se fixent à cet endroit et traversent plus aisément la paroi des vaisseaux sanguins. Puis ils sont guidés jusqu'au lieu exact de l'infection par attraction par les chimiokines sécrétées par les macrophages³⁰. Les LT cytotoxiques vont alors passer en revue les cellules qu'ils rencontrent en se fixant de manière non spécifique à leur surface. Cette liaison est faible jusqu'à ce que le TCR d'un LT cytotoxique reconnaisse spécifiquement l'antigène contre lequel il a été activé. Le lien entre le LT cytotoxique et la cellule cible est alors renforcé, ce qui laisse le temps au LT de relarguer des protéines cytotoxiques (granzymes et perforines) au point de contact entre les deux cellules³⁰. Ce processus rapide permet aux LT cytotoxiques de cibler efficacement les différentes cellules présentes sur le lieu d'une infection afin de détruire les cellules cibles infectées.

Les LT cytotoxiques sont également impliqués dans la réponse anti-tumorale. En effet, les cellules tumorales expriment à leur surface certaines molécules pouvant être identifiées comme antigéniques par les cellules immunitaires, d'où leur nom de « tumor-associated antigens » (TAA). Les TAA chargés sur le CMH-I des cellules tumorales peuvent être directement présentés aux

lymphocytes T CD8. Cependant, l'activation des LT cytotoxiques qui en résulte est en général insuffisante en raison de l'absence de co-signal des LT auxiliaires. Les cellules tumorales expriment en effet peu ou pas le CMH-II. Par conséquent, le mécanisme prédominant dans la réponse anti-tumorale dépend de la présentation croisée des TAA par les CPA⁵³.

c. La phase de régulation : les lymphocytes T régulateurs

Si les LT CD4 décrits précédemment ont pour but d'activer d'autres cellules afin de d'induire une réponse immunitaire spécifique, il en existe d'autres dont la fonction est d'inhiber cette réponse immunitaire. Les LT régulateurs ou T_{REG} contrôlent la réponse immunitaire afin d'éviter qu'elle ne s'emballe, ce qui pourrait causer des maladies auto-immunes. Les T_{REG} sont soit produits directement dans le thymus (T_{REG} naturels), soit différenciés à partir d'un LT auxiliaire naïf (T_{REG} adaptatifs). Ils expriment tous deux le facteur de transcription FoxP3 ainsi que les marqueurs de surface CD4, CD25 et les T_{REG} naturels expriment en plus fortement les marqueurs CD62L et CTLA-4⁵⁴. FoxP3 empêche la production d'IL-2 nécessaire à la prolifération des LT. Même en l'absence d'infection, les DC capturent les antigènes du soi ainsi que les microorganismes commensaux pour les présenter aux LT auxiliaires. Cependant, en l'absence de signal pro-inflammatoire, les DC ne sont pas activées et produisent seulement la cytokine TGF-β. Celle-ci inhibe la prolifération des LT auxiliaires et leur différenciation en Th1, Th2 ou Th17 pour favoriser la différenciation en T_{REG}. Ce processus induit une tolérance envers les antigènes présentés par les DC⁵⁰. En revanche, au début d'une infection les DC sécrètent fortement de l'IL-6, ce qui en l'absence d'IL-4 et IL-12, induit la différenciation des LT auxiliaires en Th17 plutôt que Th1 ou Th2. C'est la balance entre les IL-6 et TGF-β sécrétés qui induit la différenciation des LT auxiliaires en Th17 ou T_{REG}. Dans le cas où des T_{REG} sont générés, ceux-ci sécrètent de l'IL-10 et TGF-β qui auront un rôle immunosuppresseur⁴⁹. En particulier, l'IL-10 peut bloquer la production de cytokines de la part des LT ainsi que l'activité des DC. Quant au TGF-β, il bloque également la prolifération des LT ainsi que leur capacité à détruire leurs cellules cibles. Cependant, ces cytokines n'ont pas toujours un effet immunosuppresseur. En effet, cela dépend des cellules qui les consomment. Certaines cytokines activent des cellules mais en inhibent d'autres. Tout est une question d'équilibre et de balance entre ces différents facteurs. Par exemple, l'IFN-γ induit la différenciation des LT auxiliaires en Th1 mais inhibe la signalisation vers Th2 ou Th17. De même, l'IL-4 favorise la maturation des Th2 tout en inhibant Th17. Pour plus de clarté, l'ensemble des cytokines mentionnées sont regroupées dans la *Table I.3* qui résume leurs caractéristiques principales.

d. La phase de mémoire immunologique

Lorsqu'une infection est sous contrôle et que le pathogène est éliminé, les cellules immunitaires effectrices meurent car leur durée de vie est courte. Seules demeurent des cellules mémoires (environ 5 %), dont la demi-vie peut se compter en année, qui garantissent la protection en cas de réexposition au même pathogène⁵⁵. Ces cellules mémoires sont issues de LB et T effecteurs qui se sont différenciés pendant l'infection. Grâce à ces cellules, une deuxième exposition à un agent infectieux donné génère une réponse immunitaire plus rapide et plus forte. Si le pathogène est réintroduit en faible quantité, les anticorps restants peuvent le neutraliser sans aide supplémentaire. Leur haute affinité leur permet de reconnaître très rapidement et efficacement le pathogène et de le fixer pour permettre aux cellules phagocytaires de l'éliminer. Dans le cas où le pathogène est présent en large quantité, une réponse secondaire des LB est générée. Les LB mémoires (LBm) ont été sélectionnés parmi les LB effecteurs ayant la meilleure affinité avec l'antigène. Cette haute affinité est la conséquence d'hypermutations somatiques ayant lieu dans les centres germinaux des ganglions lymphatiques. Ce phénomène est amplifié par la répétition de l'exposition au pathogène. Ainsi, les LBm capturent efficacement le pathogène pour aller le présenter aux LT auxiliaires. Cette étape est également favorisée par la surexpression du CMH-II et de molécules co-stimulatoires. L'activation qui en résulte conduit à une forte prolifération et différenciation de ces cellules, dont le nombre peut aller jusqu'à 100 fois le niveau basal. De plus, les LBm proviennent de LB effecteurs différenciés ayant déjà subi une commutation isotypique. Ainsi, les BCR de ces LBm sont de type IgG ou IgA et une fois activés, les anticorps sécrétés seront directement d'isotype IgG ou IgA. Ces anticorps, produits en plus grande quantité que lors d'une première infection, seront d'autant plus efficaces pour neutraliser et participer à l'élimination du pathogène. De la même manière, les LT mémoires (LTm) spécifiques de l'antigène persistent après infection en quantités 100 à 1000 fois supérieures au niveau basal avant infection³⁰. Ces LTm sont plus susceptibles d'être restimulés par l'antigène que les LT naïfs. Il existe deux classes principales de LTm. Les LTm effecteurs sont localisés dans les tissus périphériques et sont capables de se différencier rapidement en cellules effectrices pouvant sécréter de larges quantités de cytokines aussitôt après restimulation. Les LT de la mémoire centrale demeurent dans les tissus lymphoïdes et doivent d'abord se différencier en LTm effecteurs avant de devenir des cellules effectrices. En outre, les LTm auxiliaires nécessitent la réexposition de l'antigène par une APC pour acquérir la fonction de cellule effectrice et acquérir les caractéristiques Th1 ou Th2⁵⁶. D'autre part, la production de LTm cytotoxiques semble nécessiter la contribution de LT auxiliaires effecteurs, par la signalisation CD40 et IL-2. Les LT auxiliaires effecteurs semblent également prendre part au maintien du nombre de LTm cytotoxiques. En particulier, les LTm ont une longue durée de vie grâce à l'IL-7 qui augmente leur résistance à l'apoptose et à l'IL-15 qui stimule

leur prolifération dans le but de compenser les cellules qui meurent⁵⁶. Ces cellules mémoires jouent un rôle déterminant lors de la réexposition à un pathogène. Grâce à leur action rapide et hautement efficace, le pathogène est contrôlé avant même l'apparition de symptômes.

Le principe de la vaccination prophylactique repose sur l'existence-même des cellules mémoires induites lors d'une réponse immunitaire. En effet, elle a pour but de simuler une première exposition à un pathogène donné, de manière inoffensive, afin de générer une réponse immunitaire suffisamment importante dont la mémoire sera capable de protéger dans le futur en cas de réelle infection par le pathogène. Lors d'une première exposition à un pathogène, la réponse immunitaire adaptative est induite après plusieurs jours voire semaines avec une intensité modérée. Grâce à la génération de cellules immunitaires mémoires spécifiques, en cas de réexposition au même pathogène, une réponse immunitaire adaptative beaucoup plus intense est mise en place en un temps réduit (quelques heures à quelques jours). Cette réponse adaptative secondaire intervient suffisamment rapidement pour neutraliser le pathogène avant que la maladie ne se déclare et que les premiers symptômes apparaissent (*Figure I.9*). Grâce à la vaccination qui présente une version inoffensive d'un pathogène donné, le patient est protégé en cas d'exposition avec le pathogène réel.

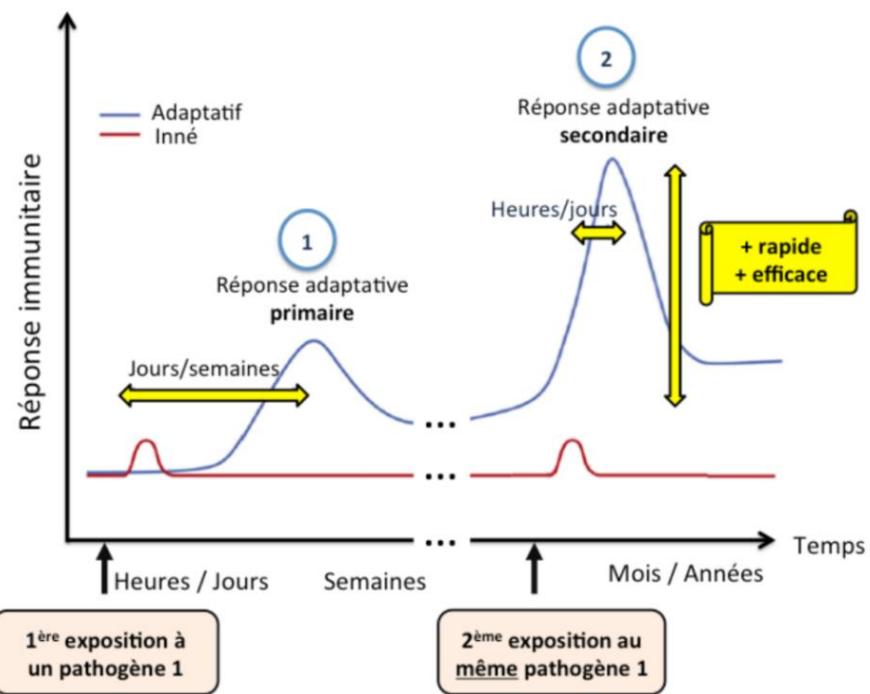


Figure I.9: Evolution de la réponse immunitaire avec le temps après une première ou deuxième exposition à un même pathogène.

Lors de la deuxième exposition, la réponse immunitaire est induite plus rapidement et avec une plus grande amplitude.

Cytokines	Principales cellules productrices	Fonctions principales
IFN- α	DC	Réponse antivirale Augmentation de l'expression du CMH-I
IFN- β	Fibroblastes	Réponse antivirale Augmentation de l'expression du CMH-I
IFN- γ	Th1 LT cytotoxiques Cellules NK	Activation des macrophages Augmentation de l'expression des CMH Commutation isotypique des anticorps Différenciation en Th1 Inhibition de la différenciation en Th2 et Th17
TNF- α	Macrophages Cellules NK LT	Réponse pro-inflammatoire Activation des cellules endothéliales
TGF- β	Lymphocytes DC	Inhibition de la croissance cellulaire Réponse anti-inflammatoire Différenciation en T _{REG}
IL-2	LT auxiliaires	Prolifération et différenciation des LT en cellules effectrices et mémoires
IL-4	LT	Activation des LB Différenciation en Th2 Inhibition de la différenciation en Th17
IL-6	LT DC Macrophages	Prolifération et différenciation des LB et LT Différenciation en Th17
IL-7	DC	Prolifération des LB, LT et cellules NK
IL-10	Monocytes Th2 T _{REG}	Différenciation en Th1 Inhibition de l'activité des DC Stimulation de l'activité des LB
IL-12	Macrophages DC	Activation des cellules NK Différenciation en Th1
IL-13	Th2	Prolifération et différenciation des LB Inhibition de la différenciation en Th1
IL-15	Macrophages DC	Stimulation des LT et cellules NK Survie des LTm cytotoxiques
IL-17	Th17 Cellules NK LT cytotoxiques	Réponse pro-inflammatoire

Table I.3: Les principales cytokines sécrétées par les cellules immunitaires et leurs fonctions.

Chapitre II

Les adjuvants de vaccins

Dans ce chapitre, nous présentons les différentes classes d'adjuvants employés dans les formulations vaccinales modernes dans le but d'amplifier les réponses immunitaires dirigées contre des antigènes peu immunogènes. Nous commençons par introduire le tout premier adjuvant utilisé, l'alum, et expliquons les raisons qui ont conduit au développement de nouveaux candidats. La famille des adjuvants est divisée en deux catégories : les molécules immunostimulantes, dont le but est d'activer les cellules immunitaires, et les vecteurs chargés de délivrer les antigènes auprès des cellules cibles. Les différentes classes d'adjuvants composant ces catégories et leurs caractéristiques sont détaillées avant de présenter les candidats les plus avancés, d'ores et déjà employés dans des formules commerciales ou évalués en clinique.

II.1 L'alum : le premier adjuvant

L'effet immunomodulateur conféré par l'ajout de certaines molécules, appelées adjuvants, dans une formulation de vaccin fût découvert par Ramon au début du XX^{ème} siècle⁵⁷. Ce vétérinaire français remarqua que le taux d'antitoxines téstaniques et diphtériques contenues dans le sérum de chevaux immunisés était plus grand lorsque les animaux développaient un abcès au point d'injection. Il démontra alors que toute substance causant une inflammation locale au point d'injection pouvait induire une augmentation de la production d'antitoxines. Au cours des années suivantes, le caractère immunostimulant des sels d'aluminium fût mis en avant par Glenny, qui ajouta des sels d'aluminium dans son vaccin antidiphtérique pour augmenter son efficacité en 1926⁵⁸. Cette découverte fût accueillie avec enthousiasme, en raison du contexte post-grippe espagnol traumatisant. Par conséquent depuis ce jour et pendant près de 70 ans, l'alum a été le seul adjuvant utilisé dans des vaccins commerciaux, par exemple contre le téstanos, la coqueluche, les hépatites A et B, la poliomyélite ou encore le papillomavirus humain (*Table II.1*).

L'alum est un ensemble de sels d'aluminium, le plus souvent hydroxyde ou phosphate, et se présente sous la forme de nanoparticules cristallines qui s'agrègent et forment une dispersion de quelques micromètres (1-20 µm)^{59,60}. Ces particules chargées permettent l'adsorption de molécules telles que des antigènes. Bien qu'utilisé depuis des décennies, le mécanisme d'action de l'alum demeure débattu et incertain. Un grand nombre de propositions différentes a été publié, avec cependant certains points de convergence. Les propriétés adjuvantes de l'alum ont tout d'abord été attribuées au fait que l'antigène était relargué lentement et longtemps dans l'organisme par les sels d'aluminium, permettant une exposition prolongée au système immunitaire⁶¹. Ce dépôt formé au point d'injection par les sels insolubles serait entre autres responsable du recrutement des cellules

immunitaires. De plus, il a été proposé que l'alum se réorganise par injection en une structure particulière, ce qui favorise sa capture par les cellules présentatrices d'antigène. Outre son rôle de vecteur d'antigène, l'alum semble également avoir des propriétés immunostimulantes intrinsèques inflammatoires dues à l'activation d'un NOD-like récepteur (*NLR*, voir section II.2.2b p.71)^{62,63}. La production de cytokines pro-inflammatoires qui en résulte favorise la polarisation des LT en Th2, induisant une réponse immunitaire humorale avec une importante production d'anticorps⁵⁹.

Malgré les avantages essentiels procurés par l'alum dans les formulations de vaccins, certains inconvénients sont de plus en plus décriés. En effet, les propriétés immunostimulantes de l'alum se limitent à une forte réponse humorale et manquent donc d'une contribution cellulaire associée à une réponse cytotoxique capable d'éliminer des cellules infectées⁶⁴. Par conséquent, bien qu'utilisé dans près de 80 % des vaccins actuels, l'utilisation de l'alum comme adjuvant est inappropriée dans le cas de certains pathogènes tels que le VIH, pour lesquels une réponse cellulaire est indispensable. En outre, l'utilisation d'alum dans les vaccins est aujourd'hui controversée en raison de la suspicion concernant ses potentiels effets secondaires. Malgré la validation de l'innocuité de l'alum au cours d'essais cliniques, certains auteurs ont notamment rapporté des cas de réactions locales au point d'injection⁶⁵. D'autres auteurs incriminent l'alum pour être la cause de pathologies auto-immunes du fait de la persistance des sels d'aluminium au point d'injection pendant des années⁶⁶. Dans un climat de perte de confiance en la vaccination, ces événements ont alimenté la méfiance de la population envers l'utilisation d'adjuvants dans les formulations de vaccin. La nécessité de développer de nouveaux adjuvants sûrs et performants est alors devenue cruciale, dans un contexte où la population ne voit que les inconvénients des vaccins au détriment de leurs bénéfices en termes de protection.

Vaccin	Nom commercial et fournisseur
Diphhtérie – tétanos – coqueluche	Boostrix, Infanrix (GSK Biologicals) Daptacel, Repevax (Sanofi Pasteur)
Diphhtérie – tétanos – coqueluche – poliomyélite – haemophilus influenzae B	Pediacel, Pentacel (Sanofi Pasteur) Pedarix (GSK Biologicals)
Diphhtérie – tétanos – coqueluche – haemophilus influenza B – hépatite B	Quinvaxem (Novartis)
Diphhtérie – tétanos – coqueluche – poliomyélite – haemophilus influenza B – hépatite B	Infanrix hexa (GSK Biologicals)
Hépatite A	Avaxin (Sanofi Pasteur) Havrix (GSK Biologicals) Vaqta (Merck)
Hépatite B	Engerix-B (GSK Biologicals) Recombivax HB (Merck)
HPV types 6/11/16/18	Gardasil (Merck)
Grippe H5N1	Daronrix (GSK Biologicals)
Pneumocoque	Synflorix (GSK Biologicals)

Table II.1. Liste non exhaustive de vaccins formulés avec l'alum comme adjuvant⁶⁷.

II.2 Les immunostimulants inducteurs de signaux de danger

Pour générer une réponse immunitaire adaptative spécifique contre un antigène donné, il est nécessaire d'activer dans un premier temps les acteurs de l'immunité innée. Comme décrit dans le chapitre I (voir section I.2.3a p.43), ce sont les macrophages qui initient cette réponse, en induisant une réaction inflammatoire après avoir capturé le pathogène. Ce dernier est reconnu comme tel par les macrophages grâce à la présence de PAMP (pathogen associated molecular patterns) à sa surface. Dans un vaccin à sous-unités, le pathogène est représenté sous la forme d'un antigène synthétique n'exprimant pas de PAMP. Seul, cet antigène est incapable d'activer les cellules immunitaires car n'est pas reconnu comme pathogénique. Il est donc nécessaire de délivrer à ces cellules des signaux de danger conjointement à l'antigène, tels que des molécules ayant des propriétés immunostimulantes⁶⁸. Ces molécules sont généralement des ligands de récepteurs portés par les cellules immunitaires (PRR pour pathogen recognition receptors). Il existe plusieurs catégories de ces récepteurs, qui peuvent être exprimés à la surface des cellules, en intracellulaire ou bien sous forme sécrétoire⁶⁹. L'activation de ces récepteurs déclenche une cascade de signalisation qui se manifeste par l'expression de molécules pro-inflammatoires. Il existe 4 familles de PRR : les Toll-like récepteurs (TLR), les C-type lectin récepteurs (CLR), les nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like récepteurs (NLR) et les retinoic acid-inducible gene-I (RIG-1)-like récepteurs (RLR)⁷⁰. Chacun de ces récepteurs a une fonction bien particulière, adaptée à un type de pathogène spécifique, de sorte que la contribution collective de ces récepteurs conduit à la génération d'une réponse immunitaire efficace et protectrice envers le pathogène intrusif.

II.2.1 Activation des Toll-like récepteurs (TLR)

Parmi les PRR, les TLR sont à ce jour les plus étudiés et les mieux décrits. Ce sont des protéines transmembranaires composées d'un domaine extracellulaire constitué de motifs riches en leucines (LRR) et d'une queue cytoplasmique portant des récepteurs Toll/IL-1 (TIR)⁶⁸. Les LRR sont impliqués dans la reconnaissance des PAMP tandis que les TIR sont requis pour déclencher la voie de signalisation intracellulaire conduisant à l'activation de la cellule en fonction du PAMP reconnu. Les TLR reconnaissent entre autres PAMP les lipides, lipoprotéines, protéines et dérivés d'acides nucléiques provenant de pathogènes de natures différentes tels que les bactéries, les virus, les parasites et les champignons⁷¹. Il existe 9 TLR communs aux souris et aux humains. Ceux-ci peuvent être classés en deux sous-groupes selon leur lieu d'expression dans la cellule. Les TLR-1, 2, 4, 5 et 6 sont exprimés à la surface de la cellule et sont par conséquent spécialisés dans la reconnaissance de

composés membranaires des pathogènes, comme les lipides, lipoprotéines et protéines. A l'inverse, les TLR-3, 7, 8 et 9 intracellulaires exprimés dans des vésicules telles que le réticulum endoplasmique, l'endosome et le lysosome détectent les dérivés d'acides nucléiques⁷⁰. Les TLR sont principalement exprimés par les cellules présentatrices d'antigène : les DC, les macrophages ainsi que les LB. Chaque TLR est spécialisé dans la reconnaissance d'un motif pathogénique particulier, afin d'induire une réponse adaptée au pathogène détecté en activant des voies de signalisations différentes. Bien que les TLR jouent un rôle crucial dans l'activation de l'immunité innée, une stimulation non mesurée et inappropriée des TLR peut entraîner une réponse inflammatoire aigue chronique et mener à des maladies auto-immunes systémiques⁷².

a. Les TLR-1, TLR-2 et TLR-6 reconnaissent des protéines de surface de pathogènes

Ces trois récepteurs fonctionnent généralement par paires, le TLR-2 formant des hétéromères avec le TLR-1 ou le TLR-6. Le TLR-2 est impliqué dans la détection de protéines exprimées à la surface de pathogènes, telles que l'acide lipotéichoïque (constituant des parois des bactéries à Gram positif), le zymosane (complexe protéique et glucidique extrait de la membrane de levures), les peptidoglycanes (composants de la paroi des bactéries à Gram positif et négatif) et les lipoprotéines bactériennes⁶⁸. Ces lipoprotéines bactériennes (LPB) sont les principaux ligands de TLR-2 étudiés et sont composées d'une chaîne peptidique reliée par l'intermédiaire d'une cystéine à une terminaison thioglycérol acylée (Figure II.1). Selon le type de bactérie dont elles proviennent, les LPB diffèrent par leur degré d'acylation : elles sont diacylées dans les bactéries à Gram positif et triacylées dans celles à Gram négatif.

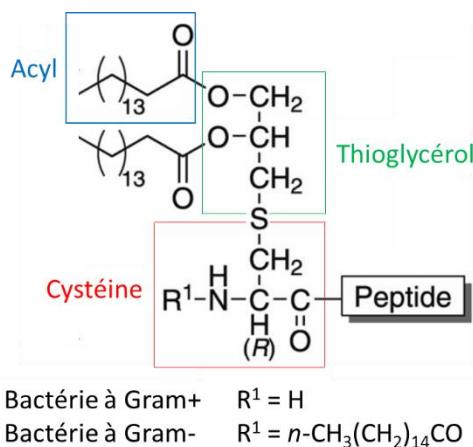


Figure II.1. Structure générale des lipoprotéines bactériennes, ligand de TLR-2.

Le degré d'acylation caractérise la provenance de parois de bactéries à Gram+ ou Gram-.

Lorsque le TLR-2 s'associe au TLR-1, l'hétéromère qui en résulte est activé spécifiquement par les LPB triacylées provenant des bactéries à Gram négatif⁷³, tandis que l'hétéromère TLR-2/TLR-6 reconnaît les LPB diacylées provenant des bactéries à Gram positif⁷⁴. Néanmoins, certaines LPB peuvent activer le TLR-2 indépendamment du TLR-1 ou TLR-6, comme par exemple les lipoprotéines synthétiques Pam₂CSK4 et MALP2-SK4⁷⁵.

Les TLR-1, TLR-2 et TLR-6 sont exprimés à la surface de plusieurs cellules du système immunitaire, majoritairement les macrophages mais également les LB, les cellules NK, les DC et les LT⁷⁶. L'activation du TLR-2, couplé ou non aux TLR-1 et TLR-6, induit principalement la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. L'utilisation de ligands de TLR-2 comme adjuvants de vaccins a été reportée par de nombreux auteurs et permet d'induire des réponses immunitaires variées, notamment la polarisation Th1⁷⁷, Th2⁷⁸ ou Th17⁷⁹, associée à une réponse de type cytotoxique^{80,81} ou humorale^{82,83}, de même qu'une activité anti-tumorale⁸⁴. En outre, les LPB présentent l'avantage de s'associer facilement à des peptides antigéniques par greffage chimique⁸⁵⁻⁸⁸. Enfin, la sûreté de ces adjuvants a été évaluée au cours d'essais cliniques, comme par exemple une étude en phase I/II démontrant l'innocuité et l'efficacité du ligand MALP2 (macrophage activating lipopeptide 2) chez des patients atteints d'un cancer du pancréas⁸⁹.

b. Le TLR-4 reconnaît des sucres de surface de pathogènes

Le TLR-4 se lie spécifiquement aux lipides exprimés à la surface de certains pathogènes, tels que l'endotoxine bactérienne lipopolysaccharide (LPS), qui est un composant majeur de la paroi des bactéries à Gram négatif. Le LPS est une molécule amphiphile comprenant une chaîne latérale spécifique de la souche bactérienne dont il est issu (antigène O), un cœur polysaccharide et une région lipidique constante (lipide A) ancrée dans la partie externe de la membrane bactérienne et responsable de la reconnaissance par le TLR-4⁹⁰.

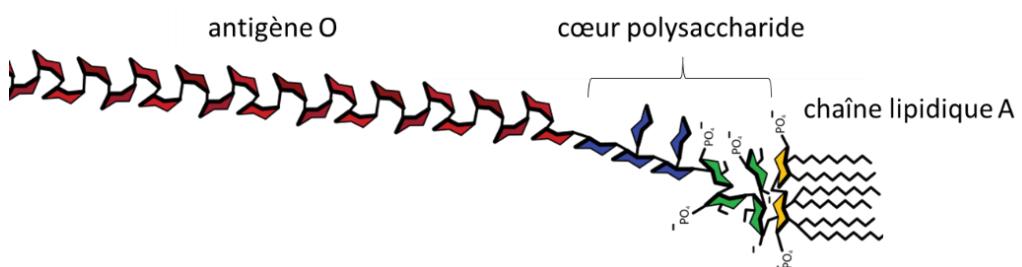


Figure II.2: Structure générale du LPS, ligand de TLR-4.

La chaîne lipidique impliquée dans la reconnaissance par le TLR-4 est la cause de la toxicité du LPS.

Principalement exprimé par les macrophages, les DC ainsi que les cellules épithéliales intestinales⁷⁶, le TLR-4 induit lorsqu'il est activé la production de cytokines pro-inflammatoires permettant de combattre localement l'infection bactérienne. Cependant, à forte dose le LPS peut entraîner une inflammation systémique et un choc septique⁹¹. Les effets secondaires importants associés à la réponse inflammatoire provoquée par le LPS empêchent celui-ci d'être utilisé en clinique sous sa forme native. C'est pourquoi des dérivés synthétiques ont été développés, tel que le MPLA (monophosphoryl lipid A) qui présente une moindre toxicité⁹². Le MPLA est constitué uniquement de la chaîne lipidique A du LPS, nécessaire à la reconnaissance par le TLR-4, incluant certaines modifications permettant de réduire son activité pro-inflammatoire, à savoir un squelette disaccharide couplé à un seul groupe phosphate et six chaînes latérales acylées altérées⁹³ (Figure II.3).

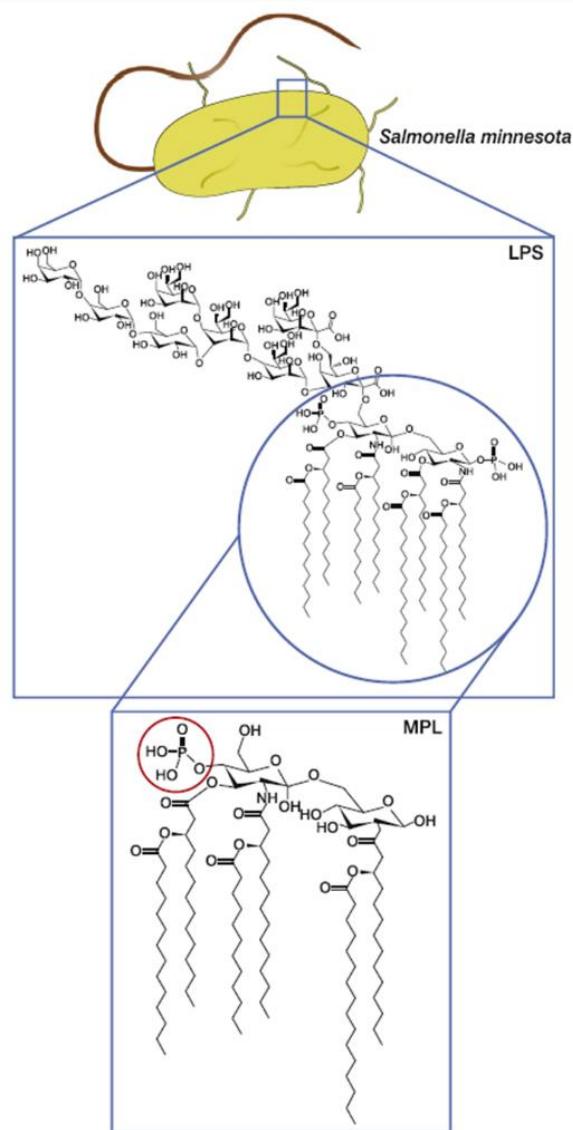


Figure II.3: Structure du MPLA, dérivé synthétique du LPS, dont le retrait d'un groupe phosphate diminue la toxicité.

La considérable diminution de la toxicité du MPLA, principalement attribuée au retrait du deuxième groupe phosphate, n'altère en revanche que très peu ses propriétés immunostimulantes⁹⁴. En effet, le MPLA favorise la polarisation des LT vers Th1^{94,95} et Th2⁹⁶, et est capable d'induire une réponse humorale élevée⁹⁷ ainsi que la prolifération des LT⁹⁸. Par conséquent, le MPLA fût le premier ligand de TLR approuvé chez l'homme et commercialisé en 2005 dans un vaccin contre l'hépatite B (Fendrix, GSK Biologicals)⁹⁷.

c. Le TLR-5 reconnaît des protéines bactériennes

Ce récepteur a été identifié comme étant spécifique d'un épitope conservé parmi les différentes souches de la flagellin, un constituant essentiel des flagelles bactériens⁹⁹⁻¹⁰¹. La flagellin est une protéine repliée sur elle-même et constituée de 4 domaines principaux. Le domaine D0 comprend les terminaisons amine et acide de la protéine, le domaine D1 contient une région hautement conservée de la protéine impliquée dans la reconnaissance du TLR-5, tandis que les domaines D2 et D3 concernent des motifs variables de la protéine (Figure II.4).

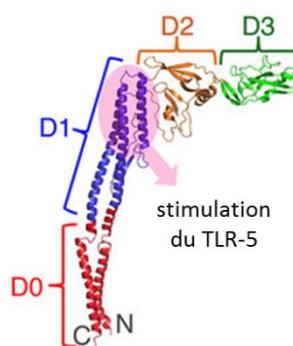


Figure II.4: Structure générale de la flagellin, ligand de TLR-5.

Repliée sur elle-même, la région impliquée dans la reconnaissance par le TLR-5 se situe au centre de la protéine.

Le TLR-5 est exprimé par une grande variété de cellules, incluant les macrophages, les DC, les LB, les LT, les cellules NK ainsi que les cellules épithéliales intestinales¹⁰². En particulier, le TLR-5 est fortement exprimé par une population de DC localisées dans l'intestin, qui en réponse à la flagellin sont spécialisées dans l'orientation de la réponse immunitaire vers Th1 et Th17 et induisent la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'IgA¹⁰³. L'utilisation de flagellin dans les formulations de vaccins s'est avérée propice à la promotion de la réponse inflammatoire¹⁰⁴ et humorale¹⁰⁵. D'autre part, la flagellin est impliquée dans l'activation des DC et cellules NK ainsi que dans le recrutement des LB et T dans les ganglions lymphatiques^{106,107}.

d. Les TLR-3, TLR-7/8 et TLR-9 reconnaissent des acides nucléiques viraux

Les TLR-3, TLR-7, TLR-8 et TLR-9 sont spécialisés dans la détection de pathogènes d'origine virale et sont stratégiquement répartis dans les compartiments intracellulaires des cellules immunitaires présentatrices d'antigène. La stimulation de ces récepteurs par leur ligand spécifique induit leur migration depuis le réticulum endoplasmique vers l'endosome ou le lysosome¹⁰⁸. Il existe plusieurs types de virus : les virus à ARN simple ou double brin et les virus à ADN, chacun d'eux ciblant un récepteur spécifique.

Le TLR-3 est spécialisé dans la reconnaissance de l'ARN viral double brin¹⁰⁹

Lorsqu'un virus à ARN double brin tel qu'un rotavirus infecte une cellule, il est détecté par le TLR-3 exprimé par les DC et les cellules NK^{110,111}. Ce récepteur activé est impliqué dans des réponses immunitaires de type inflammatoire et antivirale avec notamment la production d'IFN α et IFN β , d'où son rôle essentiel dans la prévention des infections virales. En effet, des études ont montré que la déficience en TLR-3 chez la souris ou l'humain augmente la susceptibilité aux infections virales^{112,113}. L'acide polyinosinique-polycytidylique, ou poly(I:C), est un analogue synthétique d'ARN double brin composé d'un brin de poly(acide inosinique) apparié à un brin de poly(acide cytidylique) par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes (*Figure II.5*).

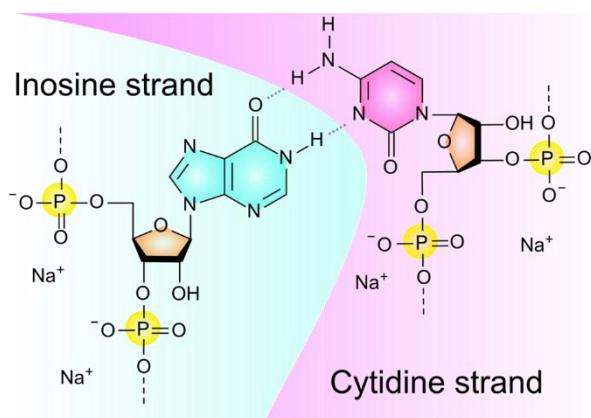


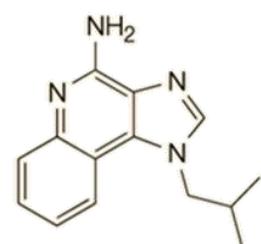
Figure II.5: Structure générale du Poly(I:C), ligand de TLR-3.

Les brins de poly(acide inosinique) et de poly(acide cytidylique) sont appariés par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes.

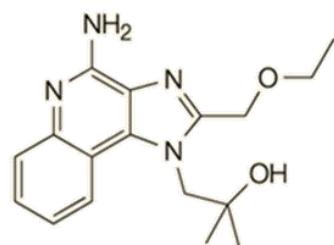
Les propriétés immunostimulantes du poly(I:C) sont adaptées à la neutralisation de pathogènes viraux intracellulaires, et induisent notamment la maturation des DC en faveur de l'activation des LT cytotoxiques par la présentation croisée de l'antigène¹¹⁴⁻¹¹⁶. En particulier, les cellules NK contribuent de manière importante à cette activité cytotoxique par la production d'IFNγ¹¹². Une telle réponse cellulaire s'est montrée bénéfique pour la génération d'une immunité anti-tumorale¹¹⁷. En outre, l'administration intra-nasale de poly(I:C) induisant une forte production d'IgA a été rapportée dans une étude de vaccin contre la grippe sur modèle murin illustrant une protection en cas de stimulation virale létale¹¹⁸. Malgré des résultats très prometteurs chez la souris, certains essais cliniques chez l'homme signalent des effets secondaires importants, incluant un choc toxique, une insuffisance rénale, ou encore une défaillance dans le processus de coagulation¹¹⁹.

Les TLR-7 et TLR-8 détectent l'ARN viral simple brin¹²⁰

Les TLR-7 et TLR-8 ont une structure très similaire et participent tous deux à la détection de l'ARN viral simple brin, excepté chez la souris dont le TLR-8 n'est pas fonctionnel¹²¹. Le TLR-7 se trouve sur les DC et les LB mais n'est pas représenté sur les macrophages⁷⁶. La majorité des cellules exprimant de l'ARN simple brin, l'absence de TLR-7 sur les macrophages leur permet d'éliminer les débris provenant de cellules mortes sans pour autant être activés, ce qui pourrait être associé à des réactions auto-immunes¹²². Les TLR-7/8 sont impliqués dans la réponse inflammatoire^{123,124} et antivirale, ce qui se manifeste par la production d'IFNα et IFNβ¹²⁵. Dans certains cas, le TLR-7 exprimé dans le lysosome de DC peut aussi détecter de l'ARN bactérien et induire la sécrétion d'IFNα participant à la réponse cellulaire¹²⁶. Les ligands de TLR-7 les plus utilisés sont les dérivés synthétiques d'imidazoquinoline imiquimod et resiquimod (*Figure II.6*).



Imiquimod (R-837)



Resiquimod (R-848)

Figure II.6: Structure de l'imiquimod et du resiquimod, ligands de TLR-7/8.

L'utilisation du resiquimod a par exemple été rapportée dans une étude de vaccin anti-VIH évalué sur un modèle de primates et induisant une réponse de type Th1 accompagnée par une augmentation

de la production d'anticorps spécifiques¹²⁷. Cependant, seul l'imiquimod est évalué en clinique¹²⁸ et a été approuvé en délivrance topique pour le traitement de verrues causées par exemple par le papillomavirus humain¹²⁹. Utilisé en tant qu'immunostimulant dans des études pour le traitement de mélanomes, l'imiquimod s'est montré capable d'augmenter la réponse cytotoxique des LT et de stimuler la production d'anticorps spécifiques^{130,131}.

Le TLR-9 est spécifique de l'ADN viral et bactérien

L'ADN viral et bactérien, procaryote, est caractérisé par la présence de motifs dits CpG, qui sont un enchaînement de nucléotides cytosine et guanine non méthylés reliés par un groupement phosphate. A l'inverse, l'ADN des mammifères, eucaryote, est généralement composé de nucléotides méthylés^{132,133}. Ainsi, les motifs CpG non méthylés caractéristiques de l'ADN viral et bactérien sont spécifiquement reconnus par le TLR-9^{134,135}, exprimé par les DC, les macrophages et les LB¹³³ (Figure II.7).

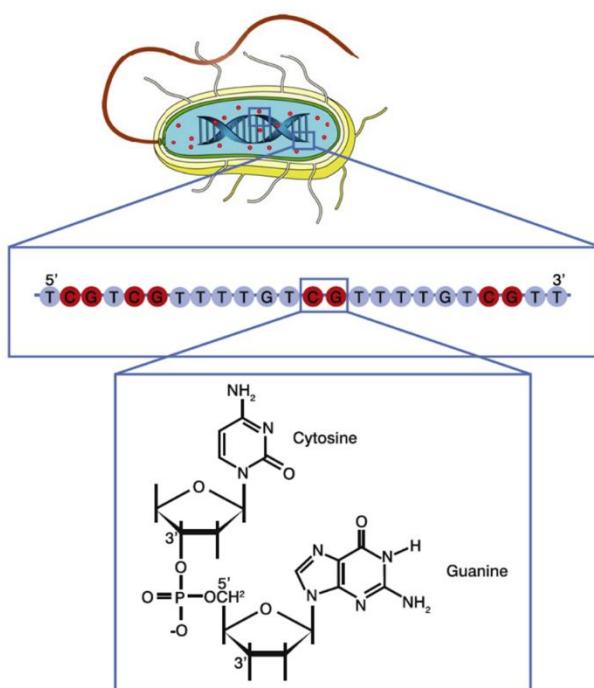


Figure II.7: Structure du CpG, oligonucléotide composé de motifs cytosine-guanine non méthylés reliés par un groupement phosphate.

Le CpG synthétique de type A est connu pour stimuler les DC et induire une production d'IFN α *in vitro*. Cependant, ses performances *in vivo* sont décevantes car il est rapidement dégradé par l'ADNase, une enzyme qui hydrolyse les fonctions phosphodiesters¹³⁶. Afin de remédier à cet

inconvénient, un CpG de type B a été synthétisé en remplaçant les liaisons phosphodiesters par des liaisons thioesters plus stables, ce qui a pour effet d'améliorer l'efficacité *in vivo* de cet immunostimulant¹³⁷. Par l'activation du TLR-9, le CpG participe à la réponse inflammatoire, tout en favorisant la présentation de l'antigène par les DC ainsi que l'activation des LT et cellules NK par l'intermédiaire de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires¹³⁸. En particulier, le CpG est capable de générer des réponses immunitaires à la fois humorales^{139,140} et cellulaires caractérisées par une activité cytotoxique robuste^{141,142} favorisée par une polarisation Th1^{143,144}. De tels résultats ont également été observés sur modèle simien, avec notamment la production élevée d'anticorps neutralisants dans un vaccin contre l'anthrax induisant une protection contre stimulation avec la toxine bactérienne virulente¹⁴⁵. Bénéficiant de résultats si prometteurs, l'innocuité du CpG a été évaluée lors d'essais cliniques avant de poursuivre vers des études d'efficacité. Certaines évaluations cliniques montrent que le CpG est bien toléré et n'induit que des effets secondaires très légers, tels qu'une douleur au point d'injection¹⁴⁶. Dans d'autres études, le CpG sous forme libre induit une activation cellulaire si intense qu'elle peut causer des effets indésirables systémiques comme une splénomégalie ou un choc toxique¹⁴⁷. En outre, les liaisons phosphorothioates entre les nucléotides augmentent la demi-vie du CpG *in vivo*, ce qui favorise les interactions non spécifiques avec les cellules et protéines de l'organisme¹³³. Cependant, ces effets indésirables peuvent être supprimés en délivrant le CpG via des vecteurs particulaires¹⁴⁸. Les études d'efficacité du CpG qui ont suivi ont souligné la capacité du CpG à induire une réponse humorale, par exemple dans le cas d'un vaccin contre l'hépatite B induisant une production d'anticorps atteignant en quelques semaines un niveau de séroprotection¹⁴⁹. De plus, lors d'une autre évaluation clinique d'un vaccin anti-tumoral chez des patients atteints de mélanome, les auteurs ont observé l'induction d'une forte réponse des LT cytotoxiques ainsi qu'une production de cellules mémoires¹⁵⁰. Finalement, le premier candidat CpG vient tout juste d'être approuvé par la FDA, en tant qu'adjuvant dans un vaccin prophylactique contre l'hépatite B sous le nom de HEPLISAV-B par Dynavax Technologies¹⁵¹.

Nos cellules immunitaires sont munies de multiples récepteurs stratégiquement positionnés dans le but de détecter la présence de pathogène de toutes natures (*Figure II.8*). En ciblant ces récepteurs via des ligands spécifiques, il est ainsi possible d'activer les cellules immunitaires. Plus précisément, le choix d'un récepteur précis permet d'orienter la réponse immunitaire vers la polarisation désirée, que ce soit une réponse de type humorale dans le cas de pathogènes extracellulaires ou d'une réponse de type cellulaire adaptée à l'élimination de pathogènes intracellulaires. Les principales caractéristiques des TLR décrits précédemment sont résumées dans la *Table II.2*.

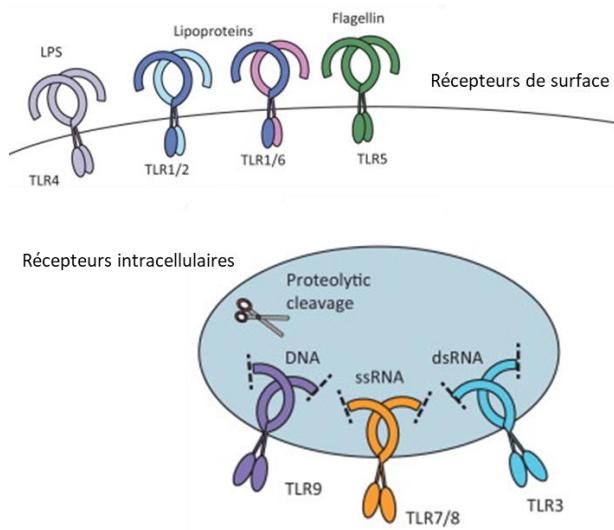


Figure II.8. Répartition des différents TLR à l'échelle de la cellule.

Les récepteurs TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 et TLR6 sont exprimés à la surface des cellules tandis que les récepteurs TLR-3, TLR-7, TLR-8 et TLR-9 sont localisés en intracellulaire.

TLR	Cible	Ligand	Localisation	Expression
TLR-1/2	Bactéries à Gram-	Lipoprotéines	Extracellulaire	Macrophages (TLR-1/2/6) Cellules dendritiques (TLR-1/2/6)
TLR-2/6	Bactéries à Gram+			Lymphocytes B (TLR-1/6) Lymphocytes T (TLR-1) Cellules NK (TLR-1/2/6)
TLR-3	Virus à ARN double brin	Poly(I:C)	Intracellulaire	Cellules dendritiques Cellules NK
TLR-4	Bactéries	LPS MPLA	Extracellulaire	Macrophages Cellules dendritiques Cellules épithéliales
TLR-5	Bactéries	Flagellin	Extracellulaire	Macrophages Cellules dendritiques Lymphocytes T Cellules NK Cellules épithéliales
TLR-7/8	Virus à ARN simple brin	Imiquimod Resiquimod	Intracellulaire	Macrophages (TLR-8) Cellules dendritiques (TLR-7/8) Lymphocytes B (TLR-7)
TLR-9	Virus à ADN	CpG	Intracellulaire	Cellules dendritiques Macrophages Lymphocytes B

Table II.2: Résumé des caractéristiques principales des TLR.

II.2.2 Les autres récepteurs : CLR, NLR et RLR

Les autres PRR ont un rôle complémentaire de celui des TLR. Les CLR sont des récepteurs présents à la surface des cellules immunitaires qui se lient aux pathogènes afin de favoriser leur internalisation dans la cellule. Les NLR et RLR, quant à eux, sont des récepteurs intracellulaires qui détectent les acides nucléiques viraux provenant de virus se répliquant à l'intérieur de la cellule⁷¹.

a. Les C-type lectin récepteurs (CLR)

Les CLR sont des récepteurs membranaires exprimés à la surface des DC et autre cellules présentatrices d'antigène. Ces récepteurs reconnaissent les sucres de type mannose, fucose et glucane exprimés à la surface de mycobactéries, champignons et virus et sont impliqués dans l'internalisation des pathogènes. Les CLR peuvent également participer à la réponse inflammatoire en contribuant à l'activation d'autres PRR¹⁵². De fait, ces récepteurs font l'objet de ciblage via des ligands spécifiques afin d'améliorer la délivrance d'antigènes aux DC. C'est par exemple le cas du récepteur d'endocytose CD-205 (ou DEC-205)¹⁵³, du récepteur CD207 (ou Langerin)¹⁵⁴ et du récepteur DC-SIGN¹⁵⁵. Le récepteur CD-205 a été particulièrement étudié pour son efficacité à transporter l'antigène dans les compartiments cellulaires endosome/lysosome pour une présentation sur le CMH-II¹⁵⁶. Pour le ciblage de ces récepteurs, les dérivés mannosylés sont d'un grand intérêt et ont démontré leur capacité à améliorer la capture cellulaire¹⁵⁷. Les β -glucanes ont également été étudiés pour leurs propriétés immunostimulantes permettant de promouvoir la réponse immunitaire adaptative^{158,159}. De plus, des systèmes particulaires entiers peuvent être préparés à partir de β -glucanes, avec pour résultat une forte stimulation des CLR due au taux élevé d'expression de 1,3- β -glucanes, conduisant à une réponse immunitaire de type Th1 et Th17^{160,161}.

b . Les NOD-like récepteurs (NLR) et (RIG-1)-like récepteurs (RLR)

Lorsqu'un virus infecte une cellule, il se réplique dans son cytoplasme et produit de l'ARN double brin. La présence de ces pathogènes peut être détectée grâce aux RLR et NLR qui sont situés dans le cytoplasme des cellules, même les cellules non immunitaires. De cette manière, la cellule infectée peut signaler l'invasion par le pathogène, même en l'absence de TLR¹⁶². Cette signalisation induit une réponse inflammatoire et antivirale avec notamment la sécrétion d'IFN α et IFN β ¹⁶³⁻¹⁶⁵.

Grâce à l'ensemble des PRR exprimés par les cellules immunitaires et non-immunitaires, les pathogènes sont sous haute surveillance et ne peuvent pas passer inaperçus après avoir franchi

l'entrée du corps humain. Grâce aux CLR exprimés en surface des cellules immunitaires, les pathogènes sont reconnus par ces cellules et efficacement internalisés. Lors du traitement du pathogène par les cellules immunitaires, les TLR entrent en jeu en identifiant la nature du pathogène dans le but d'activer la voie de l'immunité la plus adaptée à l'élimination du pathogène. Dans le cas de pathogènes viraux qui infectent des cellules hôtes, les cellules non-immunitaires disposent d'autres récepteurs tels que les NLR et RLR spécialisés dans la détection de pathogènes infectieux en l'absence de TLR. Les cellules infectées sont donc en mesure d'envoyer des signaux permettant de recruter les cellules immunitaires et de favoriser la réponse inflammatoire. Il est possible de tirer profit de la présence de certains de ces récepteurs afin d'améliorer l'efficacité des vaccins. En employant des molécules cibles adaptées, il est possible d'améliorer la capture de l'antigène par les cellules immunitaires, via des ligands de CLR, mais encore d'activer ces cellules afin d'amplifier la réponse immunitaire induite contre un pathogène donné, via des ligands de TLR. Le choix stratégique du ligand permet en outre d'activer spécifiquement une voie de l'immunité plutôt qu'une autre, afin de renforcer l'immunogénicité d'un antigène synthétique dont les faiblesses sont connues.

II.3 Les vecteurs pour la délivrance d'antigènes

Afin de remédier au manque d'immunogénicité des antigènes synthétiques utilisés dans les vaccins à sous-unités, la première solution est d'ajouter des molécules ayant des propriétés immunostimulantes, ce que nous avons décrit dans la partie précédente. La deuxième stratégie consiste à améliorer la délivrance de l'antigène en utilisant un vecteur capable d'atteindre les cellules immunitaires ciblées tout en protégeant l'antigène transporté. En effet, lorsqu'un antigène synthétique est administré seul *in vivo*, il passe inaperçu et n'induit pas ou peu de réponses immunitaires. La raison à cela est le manque de stabilité de l'antigène *in vivo*, qui a tendance à s'agréger ou précipiter et qui subit des dégradations enzymatiques avant d'être rapidement éliminé de manière non spécifique par l'immunité innée¹⁶⁶. L'utilisation de vecteurs permet de remédier à ces inconvénients, en augmentant la stabilité de l'antigène *in vivo* et en le protégeant. Ces vecteurs augmentent donc les chances qu'une plus grande proportion d'antigène atteigne sa cible dans sa forme active. Dans le cas de certaines pathologies, une immunité mucosale est requise et nécessite la délivrance de l'antigène par voie orale ou intranasale. Ces voies d'administration représentent cependant un défi en raison des barrières biologiques qu'il faut franchir, telles que les muqueuses et l'appareil digestif. La vectorisation de l'antigène par un vecteur approprié permet néanmoins d'envisager une délivrance mucosale de l'antigène en augmentant sa résistance dans les milieux agressifs^{167,168}.

Outre la protection de l'antigène, les vecteurs permettent d'améliorer considérablement la délivrance de l'antigène directement auprès des cellules immunitaires d'intérêt. La nature généralement particulière des vecteurs favorise notamment la capture par les cellules immunitaires. En effet, les vecteurs particulaires ont une structure globale relativement proche de celle des pathogènes, que ce soit par leurs dimensions du même ordre de grandeur, leur forme similaire ou leur surface composée de motifs répétitifs¹⁶⁹. Les cellules immunitaires sont particulièrement sensibles à la structure répétitive des pathogènes¹⁷⁰. Or les vecteurs particulaires sont généralement formés par l'assemblage d'un nombre restreint de molécules, d'où une surface structurée cyclique pouvant être interprétée comme étant pathogénique par les cellules immunitaires¹⁷¹. Par exemple, l'antigène HBsAg issu du virus de l'hépatite B est peu immunogène car sa structure n'est pas répétitive. En revanche, lorsque ce même antigène s'assemble pour former des VLP (virus-like particles), son immunogénicité est en conséquence 1000 fois supérieure²⁴. Enfin, les vecteurs particulaires offrent un panel d'ingénierie permettant d'affiner leurs paramètres physico-chimiques afin d'optimiser la délivrance de l'antigène.

II.3.1 Les propriétés physico-chimiques clés des vecteurs

a. L'effet de la taille des particules

Bien qu'un grand nombre de vecteurs de natures différentes aient été développés, certains paramètres physico-chimiques communs ont un effet bénéfique sur les réponses immunitaires induites. C'est par exemple le cas de la taille des particules. Les premiers vecteurs proposés avaient une taille plutôt micrométrique, ce qui provoquait un dépôt au point d'injection au détriment d'une bonne circulation dans l'organisme. A l'inverse, des particules de taille nanométrique comprise entre 20 et 100 nm ont la capacité de traverser les parois du réseau lymphatique jusqu'à atteindre les ganglions¹⁶⁹. Au-delà de 100-200 nm, les particules ont tendance à demeurer au point d'injection car sont trop grosses pour pénétrer la matrice extracellulaire et circuler dans l'organisme. Par conséquent, de telles particules nécessitent la contribution des DC circulantes pour les capturer au niveau du point d'injection et assurer leur transport jusqu'aux ganglions lymphatiques¹⁷². La cinétique de capture des particules est donc impactée et diffère selon leur taille : des particules de moins de 100 nm se retrouvent dans les ganglions lymphatiques en quelques heures alors que près de 24h sont nécessaires dans le cas de plus grosses particules pour lesquelles les DC assurent l'intermédiaire¹⁷³. A l'inverse, des particules de taille inférieure à 20 nm sont éliminées par les capillaires avant d'avoir eu l'opportunité d'interagir avec les cellules présentatrices d'antigène¹⁷⁴. Un autre avantage pour les particules d'atteindre les ganglions lymphatiques par elles-mêmes est qu'elles peuvent ainsi interagir avec d'autres cellules que les DC, notamment les LB¹⁶⁹. Ceux-ci jouent également le rôle de cellules présentatrices d'antigène et participent activement à l'induction des réponses immunitaires grâce à leur expression de plusieurs PRR. En outre, la zone de résidence des LB et LT au sein des ganglions lymphatiques n'est accessible qu'aux objets de très petite taille, les particules de taille moyenne faisant l'objet d'une rétention à l'entrée des ganglions¹⁷⁵. En particulier, c'est au sein des ganglions lymphatiques que réside une sous-population de DC très spécifique, caractérisée par l'expression du marqueur CD8 et jouant un rôle essentiel dans la présentation croisée de l'antigène¹⁷⁶. Dans le cas d'un vaccin conçu pour défendre contre un pathogène intracellulaire, il est donc d'un grand intérêt d'atteindre les ganglions lymphatiques sans passer par l'intermédiaire des DC circulantes. D'autre part, la taille semble également influencer le type de réponse immunitaire induite, en raison de mécanismes de capture différents. En effet, des particules de taille comprise entre 20 et 200 nm sont préférentiellement capturées par endocytose tandis que des particules de 500 nm à 5 µm sont plutôt capturées par phagocytose¹⁷⁷. Or, il a été démontré que des particules dont les dimensions sont proches de celles d'un virus (20-200 nm) sont plus performantes pour induire une réponse immunitaire cellulaire alors que de plus grosses particules, ayant les dimensions de bactéries (500 nm – 5 µm) induisent une meilleure réponse humorale¹⁷⁸. De

plus, l'effet de taille varie en fonction de la voie d'administration choisie. En particulier par voie orale ou nasale, l'utilisation de particules micrométriques implique une moins bonne circulation à travers les muqueuses et donc une rétention capable de stimuler d'importantes réponses immunes mucosales localisées. A l'inverse, des particules nanométriques sont capables de mieux traverser les muqueuses pour induire une réponse immune systémique^{179,180}. Ainsi, la taille des particules doit être soigneusement ajustée selon le pathogène visé et la voie d'administration choisie, afin de générer les réponses immunitaires les plus adaptées à son élimination.

b. L'effet du revêtement de surface des particules

Le revêtement de surface des vecteurs est un autre paramètre à prendre en compte, qui impacte principalement les interactions avec les autres éléments de l'organisme. En particulier, la charge de surface des particules peut être adaptée selon le mode de vectorisation choisi. Par exemple, un antigène chargé peut être vectorisé par interactions électrostatiques en préparant un vecteur de charge opposée. Or, la charge de surface des particules a un effet sur les interactions avec les cellules. Notamment, les particules cationiques favorisent la capture cellulaire en améliorant la phagocytose¹⁸¹. En effet, les particules cationiques adhèrent plus facilement aux cellules, dont la surface est légèrement négative en raison de la présence de sucres. Cependant, il semble que cet effet concerne surtout les particules ayant un diamètre supérieur à 500 nm¹⁸². Dans le cas de particules de moins de 500 nm, c'est l'effet de la taille qui est prépondérant tandis que la charge de surface n'a que peu d'impact sur la capture cellulaire. En revanche, les particules cationiques ont été à plusieurs reprises rapportées comme stimulant davantage les réponses immunitaires que leurs analogues anioniques^{172,183}, en particulier l'orientation cellulaire de la réponse via la présentation croisée de l'antigène¹⁸⁴. Cependant, la charge de surface des particules, qu'elle soit positive ou négative, est généralement associée à une plus grande toxicité en comparaison à des particules neutres¹⁸⁵. L'un des moyens proposés pour réduire cette toxicité a été l'ajout d'une couche de poly(ethylene glycol) (PEG) à la surface des vecteurs pour masquer les charges, ce qui a pour effet de réduire la toxicité associée à la charge de surface¹⁸⁶. Les PEG présentent l'avantage d'être inertes envers les cellules, et n'ont aucun effet immunomodulatoire¹⁸⁷. De plus, cette couche de polymère confère des propriétés furtives aux particules. En effet, la gêne stérique créée par les longues chaînes de polymères empêche l'adsorption des opsonines et évite l'élimination non spécifique des particules¹⁸⁸. Ce caractère furtif implique une prolongation du temps de circulation des particules dans l'organisme, ce qui augmente la probabilité des interactions avec les cellules immunitaires.

En conclusion, la taille, la charge et le revêtement de surface des vecteurs particulaires sont des éléments clé dont il faut tenir compte lors de l'élaboration de nouvelles particules. La taille semble

être le critère le plus important, de nombreuses études montrant qu'il est préférable de privilégier des particules de petite taille, inférieure à 100 nm. A cette taille, la charge de surface semble avoir un moindre impact sur les interactions cellulaires, bien que des particules cationiques soient généralement mieux capturées par les cellules et induisent de meilleures réponses immunitaires. La cytotoxicité associée à une charge de surface cationique peut de plus être corrigée par l'ajout d'un revêtement polymérique de type PEG. L'effet bouclier procuré par les chaînes de polymère confère également des propriétés furtives aux particules dont le temps de circulation est prolongé et optimise les interactions avec les cellules d'intérêt.

II.3.2 Les différentes classes de vecteurs utilisés en vaccin

a. Les émulsions

Les émulsions ont été considérablement étudiées comme alternative pour le développement de nouveaux adjuvants. Ce sont des systèmes bi-phasiques comprenant une phase hydrophobe et une phase hydrophile en équilibre et stabilisées par des tensioactifs (*Figure II.9*). Les gouttelettes qui en résultent ont une taille pouvant varier de quelques nanomètres à une centaine de micromètres¹⁸⁹. L'antigène étant encapsulé dans la phase interne des gouttelettes, la nature de l'émulsion huile-dans-eau ou eau-dans-huile est adaptée selon les affinités de l'antigène.

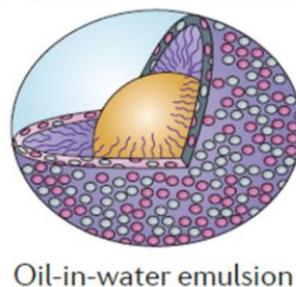


Figure II.9 : Schéma représentant une émulsion huile-dans-eau.

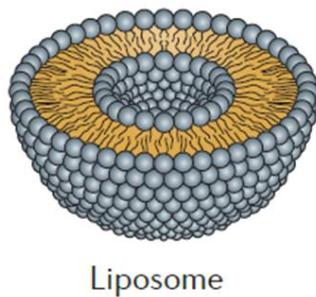
La phase hydrophobe dispersée est séparée de la phase hydrophile continue par des tensioactifs stabilisant les gouttelettes.

Le CFA (Complete Freund Adjuvant) est la première émulsion décrite en tant qu'adjuvant en 1936. Il s'agit d'une émulsion eau-dans-huile composée d'huile minérale et de paraffine, renfermant la bactérie de la tuberculose (bacille de Koch) qui a été séchée afin d'atténuer sa virulence¹⁹⁰. Bien que stimulant de fortes réponses immunitaires à la fois humorale et cellulaire, les nombreux effets secondaires et la présence du bacille de Koch sont jugés inadaptés à une utilisation chez l'homme.

Afin de réduire la toxicité de son adjuvant, Freund proposa l'IFA (Incomplete Freund Adjuvant), dans lequel la bactérie est absente. Bien que moins毒ique, cet adjuvant présente toujours des effets secondaires liés à sa grande réactivité et induit essentiellement une réponse de type humorale¹⁹¹. Le potentiel des émulsions en tant qu'adjuvants de vaccin a alors motivé la recherche d'autres candidats tous aussi performants mais mieux tolérés permettant d'envisager leur approbation chez l'homme. En particulier, les effets secondaires vont être réduits en diminuant la proportion d'huile et en remplaçant l'huile minérale par une huile animale ou végétale bio-assimilable¹⁹². Les émulsions les mieux tolérées sont finalement les émulsions huile-dans-eau car la proportion d'huile est très faible (de l'ordre de 2%). C'est le cas du MF59, une émulsion huile-dans-eau approuvée chez l'homme dans le cadre d'un vaccin contre la grippe en 1997¹⁹³ (*voir section II.4 p.90*). En revanche, ce type d'émulsion ne convient pas à la vectorisation d'antigènes hydrophiles, ce qui réduit le champ d'applications.

b. Les liposomes

Les liposomes ont été décrits pour la première fois par Bangham en 1965¹⁹⁴ et leur utilisation en tant qu'adjuvant reportée en 1974 pour la délivrance de toxine diphtérique¹⁹⁵. Les liposomes sont des vésicules sphériques composées de bicouches de phospholipides enfermant une phase aqueuse¹⁹⁶ (*Figure II.10*). La taille des liposomes varie en général de 50 nm à plusieurs µm. Grâce à leur structure en bicouches lipidiques, les liposomes permettent de vectoriser à la fois des composés hydrophiles dans le compartiment interne aqueux, mais aussi des composés hydrophobes à l'intérieur de la bicouche lipidique. Certaines molécules peuvent également être adsorbées à la surface¹⁹⁷. En outre, les propriétés des liposomes peuvent être facilement adaptées afin d'obtenir une taille, charge et composition appropriés aux molécules à vectoriser. En revanche, les liposomes ont une faible efficacité d'encapsulation et de rétention de l'antigène en raison de l'instabilité des membranes lipidiques¹⁹⁸ et une tendance à s'agréger et fusionner. La stabilité des liposomes peut néanmoins être améliorée grâce à l'ajout de cholestérol ou de lipides chargés¹⁹⁹.



Liposome

Figure II.10: Schéma représentant un liposome.

La bicoche lipidique crée un compartiment central hydrophile ainsi qu'une couronne hydrophobe permettant d'encapsuler des composés de diverses natures.

Les liposomes ont été intensément étudiés en tant qu'adjuvants de vaccins et sont reconnus pour leur capacité à délivrer efficacement l'antigène aux cellules présentatrices ainsi qu'à promouvoir la présentation croisée nécessaire à l'activation des LT cytotoxiques²⁰⁰. La réponse cellulaire est davantage stimulée lorsque les liposomes sont cationiques²⁰¹, car cela élève légèrement le pH du lysosome et diminue la dégradation de l'antigène en faveur de la présentation croisée¹⁸⁴. Korsholm et al ont notamment étudié l'utilisation de liposomes cationiques pour l'adsorption de l'antigène du VIH p24. Les souris recevant cette formulation vaccinale ont généré des réponses cellulaires de type CD4 et CD8 caractérisées par une activité cytotoxique²⁰². De par leur versatilité et leur capacité à stimuler des réponses immunitaires très variées, les liposomes sont des plateformes idéales pour la vaccination mucosale, en particulier l'administration intra-nasale, et ont été largement exploités en ce sens¹⁷⁹. Tada et al ont par exemple utilisé des liposomes cationiques en immunisation intra-nasale sur modèle murin et ont généré des réponses immunitaires à la fois mucosale avec production d'IgA spécifiques, et systémique avec une orientation Th2²⁰³.

Outre la délivrance d'antigènes, les liposomes se sont également montrés très utiles pour la vectorisation de molécules immunostimulantes. Nordly et al ont par exemple incorporé du MPLA, normalement insoluble en milieu aqueux, dans la bicoche lipidique de liposomes cationiques²⁰⁴. Afin de remédier aux faibles capacités d'encapsulation des liposomes, des cubosomes contenant une plus grande proportion de lipides ont été développés. Rizwan et al ont utilisé de telles particules pour la délivrance des immunostimulants MPLA et imiquimod en plus de l'antigène modèle ovalbumine, dont les performances en termes de réponses cellulaires se sont avérées meilleures en comparaison à des liposomes classiques²⁰⁵. Les travaux sur les liposomes ont finalement conduit à l'approbation très récente de l'adjuvant AS01, qui consiste en un liposome transportant les immunostimulants

MPLA et QS21 (saponine) dans le cadre d'un vaccin prophylactique contre le paludisme (voir section II.4 p.90).

c. Les virosomes

Les virosomes ont une structure similaire aux liposomes car ce sont des systèmes vésiculaires constitués de phospholipides, à la différence qu'ils comprennent également des éléments viraux. Les virosomes sont issus de l'assemblage spontané de phospholipides et glycoprotéines virales provenant de l'enveloppe du virus de la grippe. Il en résulte des vésicules dans lesquelles sont ancrées les glycoprotéines hémagglutinine et neuraminidase²⁰⁶ (Figure II.11). L'antigène peut selon sa nature être couplé à la surface du virosome ou bien encapsulé pour une délivrance dans le cytoplasme cellulaire²⁰⁷.

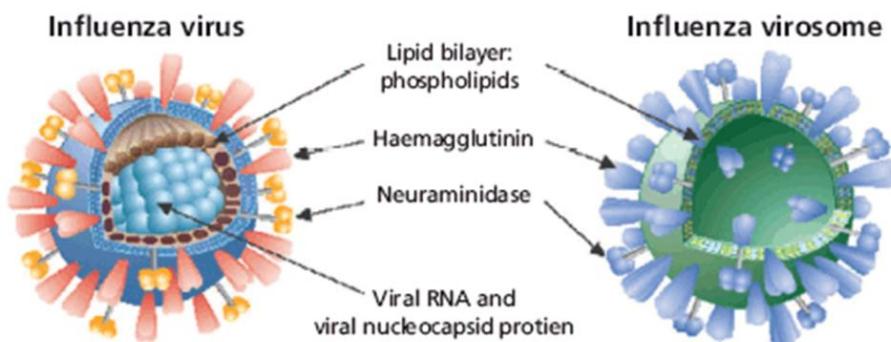


Figure II.11 : Schéma représentant la structure d'un virosome comparé au virus de la grippe.

Le virosome est semblable au virus à la différence qu'il ne contient pas de matériel génétique.

Aucun élément du génome viral n'est présent donc le virosome ne peut pas se répliquer. En revanche, la présence des glycoprotéines virales à la surface des virosomes les rendent très immunogènes²⁰⁷. De plus, ayant la même structure que le virus natif, les virosomes conservent des propriétés fusogènes. En effet, l'hémagglutinine a la capacité de fusionner avec les membranes de l'endosome après endocytose, ce qui facilite l'échappement du virosome qui a la possibilité d'atteindre le cytosol pour une présentation sur le CMH-I²⁰⁸. Les virosomes sont par conséquent des vecteurs très efficaces pour induire des réponses immunitaires à la fois humorales et cellulaires. Formés à partir de l'enveloppe du virus de la grippe, les virosomes ont tout naturellement été intensément étudiés pour la vaccination antigrippale. Soema et al ont notamment utilisé des virosomes pour la délivrance d'un épitope T du virus de la grippe, conduisant à des réponses T

cytotoxiques. Ces réponses immunitaires ont été davantage augmentées en couplant le virosome à l'immunostimulant CpG²⁰⁹. Dans une autre étude, Pedersen et al ont quant à eux développé des virosomes contenant l'hémagglutinine issue d'une souche H5N1 du virus de la grippe afin d'évaluer les réponses immunitaires induites chez la souris. Adjuvantés avec un immunostimulant dérivé de saponine, ces virosomes ont permis de générer des réponses immunitaires humorales et cellulaires suffisantes pour protéger les souris contre un challenge viral²¹⁰. Les virosomes ont également été étudiés pour adjuvanter des formulations vaccinales conçues contre d'autres pathogènes. Bomsel et al ont travaillé sur le cas du VIH en greffant la protéine d'enveloppe gp41 à la surface de virosomes. Des macaques immunisés avec cette formulation vaccinale ont ainsi résisté à une succession de challenges viraux par voie vaginale²¹¹. Des virosomes sont aujourd'hui commercialisés dans des vaccins contre l'hépatite A et la grippe (voir section II.4 p.90).

d. Les virus-like particles (VLP)

Les VLP sont des assemblages de protéines virales recombinantes (Figure II.12). Ces particules conservent les caractéristiques structurales des virus originaux mais ne contiennent pas de matériel génétique donc ne peuvent pas se répliquer²¹². Ces protéines sont obtenues *in vitro* via des systèmes d'expression à base de levures ou de cellules de mammifères. Certains systèmes sont capables de produire plusieurs protéines simultanément, permettant de générer des VLP exprimant plusieurs antigènes. Vieira et al ont par exemple décrit la production de trois protéines structurales du rotavirus grâce à un système d'expression à base de baculovirus, un virus spécifique des insectes²¹³.

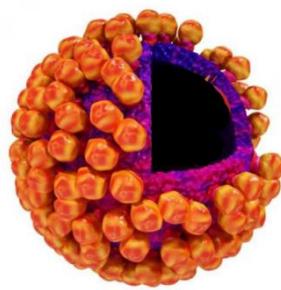


Figure II.12: Schéma représentant une VLP.

Les protéines virales s'assemblent pour former une structure exempte de matériel génétique.

Selon le virus d'origine, les VLP peuvent avoir une structure sphérique, icosaédrale ou en forme de bâtonnet, avec une taille variant de 20 à 100 nm²¹⁴. L'antigène vectorisé peut faire partie des protéines virales constituant la VLP, ou alors celui-ci est encapsulé dans le cœur ou adsorbé à la

surface. En plus de leur fonction de vecteur, les VLP ont des propriétés immunostimulantes intrinsèques en raison de la présence des protéines virales disposées de manière répétitive, à l'origine de réponses immunitaires d'une grande amplitude. Chen et al ont notamment préparé des VLP à partir d'une protéine du virus de la maladie hémorragique du lapin et dans lesquelles un épitope de l'ovalbumine a été inséré, conduisant à l'induction *in vivo* de réponses humorales et cellulaires importantes²¹⁵. Dans un autre exemple, Moffat et al ont produit des VLP à base d'une protéine d'enveloppe du virus de l'hépatite B, renfermant des épitopes de l'OVA restreints au CMH-I ou CMH-II²¹⁶. Grâce à ces particules, la capacité du vecteur à cibler les DC et favoriser la présentation de l'antigène sur les CMH-I et CMH-II a pu être démontrée. Cependant, le principal inconvénient des VLP est lié à leur mode de production, qui manque parfois de fiabilité et exige des étapes de quantifications approfondies des composants réellement incorporés dans les particules finales²¹⁷. Ce mode de production est particulièrement lourd et coûteux, ce qui a motivé le développement de systèmes d'expression protéique à base de plantes, qui permettraient notamment de s'affranchir de certaines étapes de purification et donc de simplifier la production des protéines²¹⁸. Les VLP ont été approuvées dans les premiers vaccins recombinants contre l'hépatite B et le papillomavirus humain (*voir section I.1.2c p.31*). Cependant, les inconvénients liés à leur production freinent pour le moment leur utilisation dans d'autres vaccins, bien qu'ils soient évalués dans des études cliniques notamment contre le papillomavirus humain, le chikungunya, le paludisme ou la grippe (*voir section II.4 p. 90*).

e. Les vecteurs bactériens atténués

Les bactéries ont été dans un premier temps utilisées pour produire des vaccins prophylactiques atténués ou inactivés afin de protéger contre l'infection par ces mêmes bactéries. Depuis peu, les bactéries sont exploitées comme vecteurs pour la délivrance d'antigènes²¹⁹. Certaines souches de bactéries peuvent en effet être génétiquement modifiées dans le but d'exprimer un antigène exogène spécifique et de le délivrer aux APC. Grâce à leur nature microbienne, ces vecteurs ont des propriétés adjuvantes intrinsèques importantes. D'après les récentes études précliniques et cliniques, ces vecteurs bactériens sont très prometteurs dans le domaine des vaccins anti-cancer, grâce à la délivrance de TAA²²⁰. A l'heure actuelle, deux stratégies à base de vecteurs bactériens sont principalement explorées à l'échelle préclinique et clinique : les bactéries ayant un tropisme intracellulaire naturel, telles que *L. monocytogenes* et *Salmonella* ainsi que les systèmes de sécrétion de type III (SST3).

L. monocytogenes est une bactérie à Gram positif responsable de la listériose chez les humains et animaux. Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, cette bactérie est dégradée dans le phagosome mais

une faible proportion parvient à s'échapper pour atteindre le cytosol²¹⁹. Par conséquent, l'antigène exogène exprimé par cette bactérie pourra être présenté sur le CMH-I ou le CMH-II et induire notamment des réponses cellulaires cytotoxiques importantes. *Salmonella* est une bactérie à Gram négatif causant la salmonellose chez les humains et les animaux. A la différence de *L. monocytogenes*, cette bactérie est entièrement dégradée dans le phagosome, conduisant principalement à une présentation de l'antigène exogène sur le CMH-II²²¹. Pour des applications de vaccin anti-tumeur, il est indispensable d'induire des réponses immunitaires cellulaires. C'est pourquoi cette bactérie a été génétiquement modifiée dans le but de favoriser la présentation sur le CMH-I et ainsi améliorer son efficacité.

Les SST3, que l'on trouve dans certaines bactéries à Gram négatif, permettent de sécréter des protéines effectrices (exotoxines) directement à l'intérieur de cellules cibles afin de faciliter l'infection bactérienne²¹⁹. Par une intervention génétique, l'antigène choisi peut être fusionné aux exotoxines afin d'être délivré dans le cytosol des cellules cibles, conduisant par conséquent à une réponse immunitaire de type cellulaire via une présentation sur le CMH-I²²².

De tels vecteurs bactériens ont par leur nature des propriétés adjuvantes évidentes. Cependant, certains traitements sont indispensables afin d'atténuer leur virulence et réduire au maximum les effets secondaires associés. Ceci peut par exemple être réalisé en réduisant la capacité de réplication des bactéries ou en diminuant l'expression de facteurs de virulence²¹⁹.

Plusieurs essais cliniques de phase I et II ont été menés ou sont en cours afin d'évaluer la performance de ces vecteurs bactériens atténués pour traiter les cancers tels que le cancer du col de l'utérus, le cancer du pancréas, le mésothéliome, le cancer du foie ainsi que les tumeurs solides en général. Parmi les principaux acteurs industriels se distinguent Advaxis Inc. et Aduro Biotech Inc., exploitant en particulier *L. monocytogenes* (<http://clinicaltrials.gov>).

f. Les ISCOM

Les ISCOM sont des particules sphériques d'environ 40 nm et chargées négativement, ayant une structure en forme de cage constituée de saponines, cholestérol et phospholipides²²³ (Figure II.13). Un antigène hydrophobe peut ainsi être piégé à l'intérieur de la structure grâce aux interactions hydrophobes qui régissent l'intérieur du complexe²²⁴. Des antigènes hydrophiles peuvent également être vectorisés par interactions électrostatiques avec la surface chargée négativement du vecteur, appelé alors ISCOMATRIX²²³. Outre leur rôle de vecteur, les ISCOM possèdent des propriétés

immunostimulantes intrinsèques dues à la présence des saponines. Ces molécules sont habituellement toxiques sous forme libre mais beaucoup mieux tolérées lorsqu'elles sont complexées à du cholestérol, ce qui a également pour effet d'augmenter leurs propriétés immunostimulantes²²⁵. Les ISCOM présentent une bonne stabilité mais un taux de charge de l'antigène limité. Celui-ci peut néanmoins être amélioré grâce à la préparation de particules cationiques en utilisant un dérivé cationique du cholestérol ou de la saponine^{226,227}. Les ISCOM cationiques sont notamment plus favorables à la complexation de protéines et molécules d'ADN qui sont chargées négativement²²⁸.

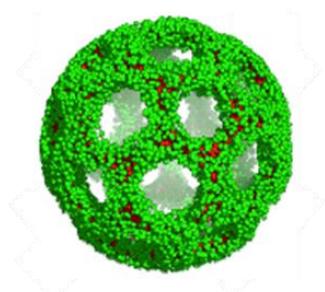


Figure II.13: Schéma représentant la structure en forme de cage d'un ISCOM pouvant piéger des molécules hydrophobes.

Les antigènes hydrophiles sont quant à eux associés à la surface du vecteur.

Les ISCOM utilisés en tant qu'adjuvant sont capables de générer des réponses immunitaires humorales et cellulaires importantes²²⁹. Duewell et al ont notamment rapporté la modification d'ovalbumine afin de l'incorporer efficacement dans des ISCOM. Les particules obtenues stimulent la présentation de l'antigène sur le CMH-I, en faveur de l'activation des lymphocyte T cytotoxiques et d'une activité anti-tumorale²³⁰. Les ISCOM présentent également l'avantage d'être efficaces même à faible dose d'antigène²³¹ et induisent en particulier une immunité mucosale, d'où leur utilisation accrue en délivrance intra-nasale²³². Cependant les ISCOM sont restreints à une application vétérinaire²²⁴ à cause de la toxicité des saponines, associée à des effets indésirables empêchant son utilisation chez l'homme. Pour remédier à la toxicité des ISCOM, Cibulski et al ont récemment préparé de nouveaux candidats à base de saponine quillaja brasiliensis qui remplace la saponine Quil A (quillaja saponaria molina) classiquement utilisée. Leurs particules présentent en effet une toxicité nettement moindre, tout en conservant une capacité à induire des réponses immunitaires importantes²³³.

g. Les vecteurs polymériques

Les polymères, qu'ils soient naturels ou synthétiques, ont été intensément étudiés pour la préparation de nouveaux vecteurs. Les tailles des particules obtenues varient selon la nature du polymère et le mode de préparation, de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs centaines de micromètres. Selon l'antigène choisi, celui-ci peut être vectorisé par encapsulation dans le cœur des particules, ou bien greffé ou adsorbé à leur surface. Les principaux polymères synthétique et naturel étudiés sont respectivement le PLGA (polylactic co glycolic acid) et le chitosane¹⁸⁹, que nous allons décrire plus amplement.

Le PLGA a été énormément étudié depuis 60 ans pour une utilisation dans diverses applications biomédicales comme le vaccin mais surtout la délivrance de médicaments. Approuvé par la FDA depuis 1969, le PLGA est actuellement disponible dans une quinzaine de produits aux Etats-Unis principalement destinés au traitement de cancers²³⁴. Le PLGA est un polyester préparé à partir de l'acide lactique et l'acide glycolique (*Figure II.14*).

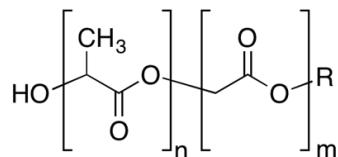


Figure II.14: Structure chimique du PLGA.

Biocompatibles et biodégradables, les particules de PLGA sont les vecteurs polymériques les plus utilisés pour la délivrance d'antigène²³⁵. Ces particules versatiles permettent de transporter des composés à la fois hydrophiles et hydrophobes²³⁶, qui sont relargués progressivement sur une longue période en raison de la lente dégradation du PLGA en milieu aqueux, en faveur de l'induction de réponses immunitaires persistantes²³⁷. Des particules de PLGA vectorisant un antigène du paludisme sur leur surface ainsi que du MPLA dans leur membrane ont par exemple été décrites par Moon et al. Ce système a permis de générer une production durable d'anticorps ayant une affinité élevée et la capacité d'agglutiner les parasites vivants²³⁸. D'autre part, Demento et al ont comparé les performances de particules de PLGA et de liposomes et obtenu des réponses cellulaires plus importantes avec les particules de PLGA. Grâce à la production de cellules T mémoires suite à l'immunisation de souris avec ces particules, un modèle intracellulaire de bactérie a pu être efficacement éliminé²³⁹. Les particules de PLGA peuvent également être complexifiées avec l'ajout de composants qui lui confèrent de nouvelles propriétés. Liu et al ont par exemple décrit des particules

de PLGA rendues cationiques par l'ajout de lipides cationiques DOTAP. Les particules cationiques étant associées à une plus grande toxicité, une couche d'acide hyaluronique a été déposée à la surface des particules de PLGA afin de masquer les charges positives. Ces particules se sont montrées particulièrement efficaces pour la délivrance cytosolique partielle de l'antigène modèle ovalbumine, permettant une présentation de l'antigène sur les CMH-I et CMH-II. Il en résulte de fortes réponses immunitaires en termes d'anticorps produits et d'activation des LT CD4 et CD8 ainsi que la génération de cellules mémoires²⁴⁰. Malgré ces bonnes performances, les PLGA souffrent d'un faible taux de charge associé à des forts coûts de production et des difficultés de mise à l'échelle qui limitent actuellement leur passage en essais cliniques pour des applications vaccins²³⁴.

Le chitosane est un polymère naturel biocompatible et biodégradable obtenu à partir de la chitine, un constituant majoritaire de l'exosquelette des arthropodes, en retirant un groupement acétate²⁴¹. Il est constitué d'unités β -(1,4)-2-acetamido-D-glucose et d'unités β -(1,4)-2-amino-D-glucose, distribuées aléatoirement (Figure II.15). La présence des nombreuses terminaisons amines dans la structure du chitosane lui confère une charge positive importante. Par conséquent, le chitosane peut former des particules par auto-agrégation avec des macromolécules chargées négativement, par exemple des antigènes protéiques²⁴². Cependant, le chitosane étant hydrophile, il ne peut pas s'associer à des antigènes hydrophobes. Les nanoparticules de chitosane sont généralement obtenues avec une taille variant de 1 à 1000 nm.

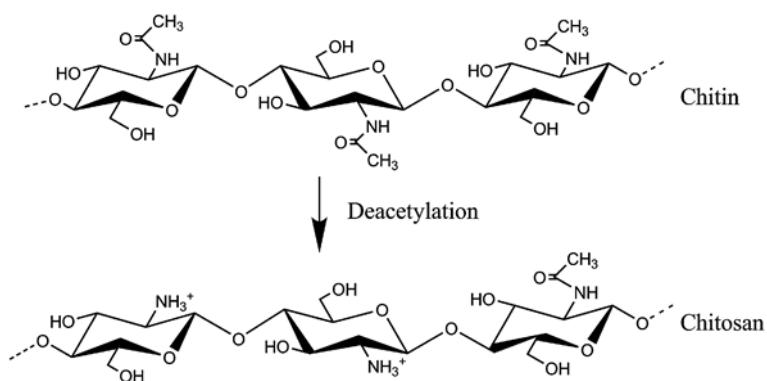


Figure II.15 : Structure chimique du chitosane préparé à partir de la chitine.

Le chitosane possède des propriétés mucoadhésives, ce qui est d'un grand intérêt dans le cas de délivrance par voie intra-nasale ou orale. Bento et al ont par exemple étudié des nanoparticules de chitosane pour une délivrance intranasale d'un antigène du bacille de charbon (anthrax). Leur système a permis de générer une forte production d'anticorps neutralisants associés à une immunité mucosale²⁴³. Slütter et al ont également obtenu de fortes réponses humorales grâce à la conjugaison de l'ovalbumine sur des particules N-triméthyl-chitosane²⁴⁴. En revanche, le chitosane est

relativement inefficace pour induire des réponses immunitaires cellulaires et n'est donc pas adapté contre des pathogènes infectant les cellules.

h. Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) et nanostructurées (NLC)

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) sont des systèmes relativement récents, introduits au tout début des années 1990 comme une alternative aux vecteurs particulaires classiques tels que les émulsions, liposomes et particules polymériques²⁴⁵. Le but était alors de combiner les avantages des principaux autres vecteurs en s'affranchissant de leurs inconvénients respectifs, notamment leur manque de stabilité, leur éventuelle toxicité, leur faibles taux de charge ou leur coût de production élevé. Les SLN sont semblables à des nanoémulsions huile-dans-eau, à la différence qu'elles possèdent un cœur lipidique solide stabilisé par des tensioactifs. Les lipides constituant le cœur sont généralement des triglycérides à longues chaînes alkyles, des cires ou des acides carboxyliques à longues chaînes alkyles²⁴⁶. La taille des SLN peut varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres. Les SLN sont principalement utilisées pour la délivrance de molécules hydrophobes encapsulées dans le cœur lipidique. Néanmoins, certaines molécules amphiphiles peuvent également être incorporées dans la membrane de tensioactifs. Dans le cas de molécules hydrophiles, leur efficacité d'encapsulation étant très limitée, celles-ci doivent être associées à la surface des SLN par adsorption ou greffage covalent. Une autre technique consiste à produire une double émulsion eau-dans-huile-dans-eau permettant d'encapsuler efficacement une molécule hydrophile²⁴⁷. Les SLN sont dites solides car les lipides composant le cœur demeurent solides à la température du corps humain. Par conséquent, ces particules constituent *in vivo* une matrice favorable à la rétention et au relargage contrôlé d'actifs, comme c'est le cas pour les particules polymériques²⁴⁵. Cependant, le taux de charge dans le cœur des SLN est limité à cause de sa composition lipidique. En effet, les SLN sont obtenues par dispersion de la phase lipidique dans la phase aqueuse avant de provoquer la cristallisation du cœur, généralement par refroidissement. Les SLN étant constituées d'un seul type de lipides, la cristallisation du cœur produit une matrice très organisée dans laquelle les chaînes sont parfaitement imbriquées les unes dans les autres. Une telle structure laisse trop peu de place disponible pour les molécules encapsulées et peut provoquer leur expulsion hors des particules²⁴⁶. Afin de remédier à cet inconvénient, les NLC (nanostructured lipid carriers) ont été développées vers la fin des années 1990 avec cette fois-ci un cœur lipidique plus complexe. Il s'agit d'un mélange de lipides de différentes natures, à la fois solides et liquides. Lors de l'étape de refroidissement, les lipides incompatibles forment une phase amorphe ou partiellement cristallisée. Cette structure est ainsi constituée de nombreux espaces non occupés pouvant contenir des biomolécules, ce qui augmente notablement le taux de charge et la rétention durable des molécules encapsulées par

rapport aux analogues SLN²⁴⁸ (Figure II.16). Les NLC sont biocompatibles et biodégradables à une vitesse très lente, ce qui permet une exposition prolongée à l'antigène. De plus, les NLC présentent l'avantage d'être extrêmement bien tolérées. Leur toxicité est par exemple plus de 10 fois inférieure à celle de particules polymériques²⁴⁹. Leur mode de production peut se passer de solvants organiques et est relativement simple, ce qui permet d'envisager le passage à l'échelle industriel. En général, la phase lipidique est chauffée afin de faire fondre les lipides et pouvoir incorporer de manière homogène la molécule à encapsuler. La phase lipidique est ensuite dispersée dans la phase aqueuse par ultrasonication ou homogénéisation à haute pression. La technique de microémulsion nécessite quant à elle l'utilisation de solvants organiques et est basée sur la formation d'une émulsion à chaud qui est ensuite précipitée à froid pour former les SLN²⁵⁰.

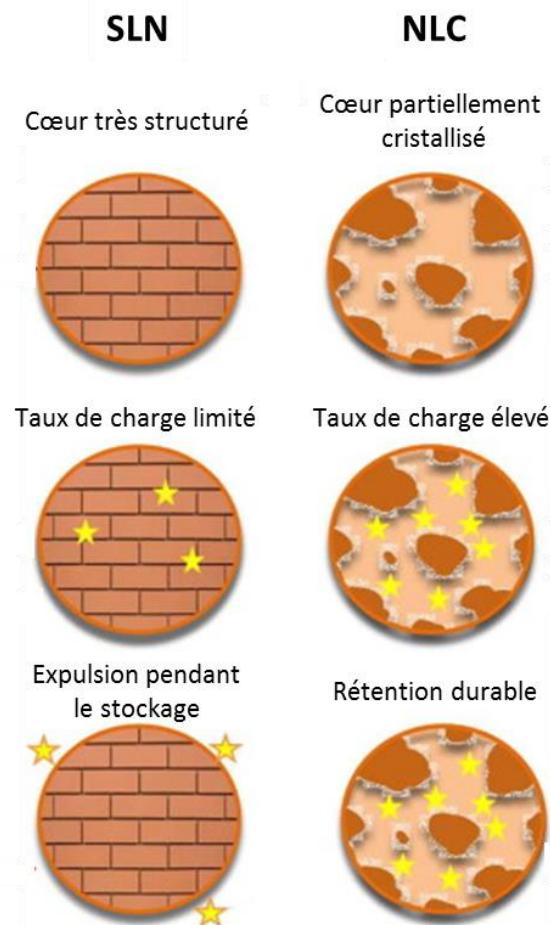


Figure II.16. Schéma comparatif des SLN et NLC.

La structure très organisée du cœur des SLN limite le taux de charge de biomolécules ainsi que leur stabilité. Le cœur partiellement cristallisé des NLC peut accueillir une plus grande quantité de molécules qui sont encapsulées de manière durable.

A ce jour, l'utilisation des SLN/NLC s'est principalement concentrée sur l'encapsulation de drogues hydrophobes. L'utilisation de SLN s'est notamment montrée bénéfique pour l'administration orale de médicaments. Cela est dû au fait que les lipides améliorent l'absorption des molécules, ce qui présente un intérêt pour l'administration orale d'anti-cancéreux²⁵¹. Les SLN ont été également étudiées pour des applications topiques, en particulier en cosmétique. De par leur petite taille, les nanoparticules lipidiques adhèrent à la couche stratum corneum, ce qui est favorable à la délivrance de principes actifs²⁴⁵. En revanche, la délivrance de protéines antigéniques via des SLN/NLC a été très faiblement étudiée. Les auteurs décrivent principalement l'induction de réponses humorales avec une orientation Th1. Doroud a par exemple utilisé des SLN neutres pour encapsuler une protéine recombinante de *Leishmania major*²⁵² ou cationiques pour délivrer des plasmides ADN codant pour la protéine²⁵³. Les auteurs ont rapporté l'induction de réponses immunitaires spécifiques avec une polarisation Th1, accompagnée d'une protection contre stimulation avec le parasite. Dans un autre exemple, des SLN neutres ou cationiques ont été comparées avec des SLN portant des ligands mannosylés pour la vectorisation de l'antigène de surface de l'hépatite B. L'ensemble des SLN testées ont contribué à l'augmentation de la réponse humorale, en termes de production d'anticorps et d'orientation cellulaire de type Th1²⁵⁴. Des SLN ont également été préparées avec de l'huile de ricin par une technique de double émulsion eau-dans-huile-dans-eau dans le but de véhiculer de l'IL-2 en tant qu'immunostimulant. L'administration conjointe de ces particules avec un antigène inactivé du virus de la fièvre aphteuse a augmenté la production d'anticorps spécifiques ainsi que la stimulation des splénocytes en faveur de leur prolifération²⁵⁵.

Les SLN/NLC sont des vecteurs très prometteurs car ils combinent les avantages des principaux autres vecteurs synthétiques tout en contournant leurs inconvénients (*Table II.3*). Néanmoins, ces avantages ont été peu exploités jusqu'à aujourd'hui pour la délivrance d'antigènes et la formulation de vaccins.

Type de vecteur	Avantages	Inconvénients
Emulsions	Facile à produire Coût de production faible	Peu stables Fuite des molécules encapsulées Effets secondaires dus à la proportion d'huile
Liposomes	Non toxiques Biocompatibles Biodégradables Versatiles	Peu stables Faible taux de charge Fuite des molécules encapsulées Coût de production élevé
Particules polymériques	Versatiles Taux de charge élevé Relargage contrôlé	Peu stables Toxicité de certains polymères Coût de production élevé
SLN/NLC	Stables Non toxiques Biocompatibles Biodégradables Relargage contrôlé Taux de charge élevé Facile à produire	

Table II.3. Avantages et inconvénients des principaux vecteurs synthétiques.

Parmi l'ensemble des systèmes particulaires développés, les particules synthétiques sont très attrayantes en leurs qualités de vecteurs d'antigènes. En général peu voire non toxiques, les particules synthétiques sont composées de matériaux connus et leur fabrication est reproductible et maîtrisée. A l'inverse, les vecteurs viraux sont certes très immunogènes, mais reposent sur un procédé de production très contraignant. En conséquence, la fiabilité et la sûreté des vecteurs viraux, directement liés à leur procédé de fabrication, demeurent un challenge. Les SLN/NLC développées ces dernières années présentent de nombreux avantages et sont donc amenées à être de plus en plus utilisées en nanomédecine. La composition plus complexe du cœur lipidique a permis de remédier aux inconvénients de stabilité et de relargage des molécules encapsulées, conduisant à un vecteur beaucoup plus fiable. Les SLN/NLC ont été principalement étudiés pour la délivrance de molécules thérapeutiques et au contraire très peu pour la vectorisation d'antigènes. Il y a donc un intérêt majeur à exploiter le potentiel de ces vecteurs dans ce domaine d'application en plein essor.

II.4 Les adjuvants commercialisés et en essais cliniques

Ces dernières années, l'alum a été remplacé par d'autres adjuvants de nature particulière dans certains vaccins commerciaux, principalement des émulsions. L'adjuvant **AS04** est le premier exemple de la combinaison de plusieurs molécules immunostimulantes, avec du MPLA adsorbé à la surface de sels d'aluminium (aluminium hydroxyde ou aluminium phosphate)⁶⁷. AS04 doit être administré conjointement à l'antigène pour bénéficier de ses propriétés immunostimulantes. La stimulation du TLR-4 grâce au MPLA permet d'activer le système immunitaire inné, ce qui se manifeste par la production de cytokines pro-inflammatoires dont l'action va stimuler le système immunitaire adaptatif. En particulier, une orientation Th1 est favorisée, ce qui se traduit par l'induction de réponses immunitaires humorales et cellulaires. Les sels d'aluminium favorisent la biodisponibilité du MPLA, normalement insoluble en milieu aqueux et ayant tendance à s'agrégé²⁵⁶. De plus, l'alum forme un dépôt au point d'injection et favorise l'action prolongée du MPLA²⁵⁷. AS04 est actuellement utilisé dans deux vaccins commercialisés par GSK Biologicals : Fendrix contre l'hépatite B, autorisé en 2005, et Cervarix contre le papillomavirus humain, autorisé en 2009²⁵⁸. Dans le cas de l'hépatite B, ce vaccin s'adresse à des patients en hémodialyse pour lesquels le vaccin classique à base d'alum est peu efficace⁶⁷. Ces deux vaccins induisent de bien meilleures réponses immunitaires que les vaccins classiques, conduisant à une séroprotection durable.

Le **MF59** est la première émulsion huile dans eau approuvée par les autorités pour l'utilisation chez l'humain dans le cadre d'un vaccin contre la grippe en 1997. Développée par Novartis, cette émulsion est composée de squalène stabilisé dans un tampon citrate par des tensioactifs²⁵⁹. Le squalène est une huile issue de foie de requin et est un composant naturel des membranes cellulaires. Le MF59 est composé de gouttelettes d'environ 160 nm extrêmement stables (plusieurs années dans des conditions réfrigérées). En outre, le MF59 doit son innocuité à la proportion d'huile qui a été considérablement réduite par rapport à l'IFA (de 50% à 2%) et à l'emploi d'une huile bio-assimilable¹⁹². Le mécanisme d'action du MF59 est encore incertain, bien qu'il semble provoquer un dépôt au point d'injection, responsable du recrutement de cellules immunitaires²⁵⁹. Le MF59 est également capable de gagner le circuit lymphatique pour atteindre les ganglions et interagir avec les cellules présentatrices d'antigène²⁶⁰. Le MF59 a été intensément étudié dans différentes combinaisons de vaccins et a été décrit comme permettant d'induire à la fois une importante production d'anticorps²⁶¹, mais aussi de stimuler la réponse immunitaire cellulaire^{262,263} de manière significative en comparaison à d'autres adjuvants. Grâce à l'amélioration des réponses immunitaires induites, les doses d'antigène administrées ont pu être réduites²⁶⁴. Le MF59 a été largement utilisé

en clinique, principalement dans des vaccins contre la grippe²⁶⁵ et a démontré sa capacité à induire une mémoire immunitaire durable et protectrice²⁶⁶. Après avoir été approuvé en clinique, le MF59 a été continuellement évalué concernant sa sécurité. Des cas d'effets secondaires ont été reportés, notamment des inflammations du point d'injection, associés à la forte réactivité induite par l'adjuvant. Néanmoins, l'incidence de ces effets secondaires reste faible et le ratio avec les bénéfices procurés demeure favorable²⁶⁴.

Après le succès du MF59, d'autres émulsions ont été préparées sur le même modèle en associant en plus des immunostimulants afin d'amplifier les réponses immunitaires. **AS03** est une émulsion huile-dans-eau à base de squalène et de tocophérol stabilisés avec le tensioactif Tween 80²⁶⁷, formant des gouttelettes d'environ 150 nm. Le tocophérol contenu dans la vitamine E a des propriétés immunostimulantes intrinsèques. AS03 agit principalement sur les macrophages, provoquant leur stimulation et activité pro-inflammatoire²⁶⁸. Développé par GSK Biologicals, AS03 est utilisé en tant qu'adjuvant dans les vaccins contre les grippes pandémiques (H5N1, H1N1). L'utilisation d'AS03 a notamment permis de réduire la dose d'antigène dans les formulations vaccinales²⁶⁹. En revanche, des effets indésirables tels que des cas de narcolepsie ont été observés en Finlande sur une population d'enfants faisant suite à la campagne de vaccination contre la grippe pandémique de 2009 et dont la cause reste à déterminer²⁷⁰.

Un adjuvant similaire a été développé par Sanofi Pasteur, l'émulsion huile-dans-eau à base de squalène **AF03**. Egalement utilisé dans des formulations vaccinales contre la grippe, cet adjuvant a démontré sa capacité à induire des réponses anticorps spécifiques lors d'études précliniques conduisant à la protection de macaques contre une infection virale²⁷¹. De plus, l'utilisation de l'adjuvant AF03 permettrait de réduire la dose d'antigène nécessaire à la génération de fortes réponses immunitaires²⁷². Les études cliniques qui ont suivi ont permis de confirmer l'intérêt de l'adjuvant AF03, en particulier pour induire une protection contre la grippe pandémique H1N1 chez les très jeunes enfants²⁷³. Ces résultats ont permis à cet adjuvant d'être accepté par les autorités, conduisant à la commercialisation du vaccin contre la grippe pandémique H1N1 Humenza par Sanofi Pasteur.

Plus récemment, GSK a proposé l'adjuvant **AS01**, composé de liposomes délivrant les immunostimulants MPLA et QS21. QS21 est un dérivé de la saponine Quil A extraite de l'écorce de l'arbre Quillaja Saponaria se trouvant en Amérique du Sud. L'utilisation de Quil A en tant qu'adjuvant étant limitée en raison de ses effets toxiques, la fraction purifiée QS21 a été proposée comme alternative. De plus, la formulation de QS21 dans des liposomes diminue grandement les potentiels

effets indésirables tels que son activité hémolytique et améliore sa tolérabilité. QS21 est connu pour améliorer la présentation de l'antigène, en particulier la présentation croisée conduisant à une réponse T cytotoxique²⁷⁴. Ainsi, l'adjuvant AS01 combine les effets du QS21 avec ceux du MPLA, à savoir une activité pro-inflammatoire orientée Th1. Après plusieurs essais cliniques concluants²⁷⁵, AS01 a finalement été récemment accepté et commercialisé sous le nom de Mosquirix pour la prévention du paludisme. AS01 est également en cours d'essais cliniques pour un vaccin contre le VIH.

Ces adjuvants ont passé toutes les étapes de validation nécessaires à une mise sur le marché et sont aujourd'hui autorisés dans différents vaccins commerciaux (*Table II.4*). Certains d'entre eux font l'objet de nouveaux essais cliniques pour des vaccins contre d'autres pathogènes. D'autres adjuvants, vecteurs ou immunostimulants, sont également évalués au cours d'essais cliniques afin de démontrer leur innocuité et efficacité, paramètres indispensables à une autorisation de mise sur le marché (*Table II.5*). La recherche de nouveaux adjuvants est en plein essor et s'attache à répondre à un défi exigeant, à savoir l'élaboration de vaccins performants contre des pathogènes problématiques et hors contrôle tels que le VIH ou le paludisme, dans un souci permanent de sécurité.

Adjuvant	Maladie	Nom commercial	Entreprise
AS04	Papillomavirus humain	Cervarix	GSK
AS04	Hépatite B	Fendrix	GSK
MF59	Grippe	Aflunov	Novartis
MF59	Grippe	Fluad	Novartis
MF59	Grippe	Focetria	Novartis
AS03	Grippe	Arepanrix	GSK
AS03	Grippe	Pandemrix	GSK
AS03	Grippe	Prepandrix	GSK
AF03	Grippe	Humenza	Sanofi Pasteur
AS01	Paludisme	Mosquirix	GSK
MPLA	Hépatite B	Supervax	Dynavax Technologies
Virosome	Hépatite A	Epaxal	Crucell
Virosome	Grippe	Inflexal	Crucell
Virosome	Grippe	Invivac	Solvay

Table II.4: Principaux vaccins commerciaux à base d'adjuvants autres que l'alum.

Adjuvant	Maladie	Statut	Sponsor	ID	date
Montanide	Fièvre jaune	Phase I	NIAID	NCT02743455	En cours
Montanide	Grippe	Phase II	PepTcell Limited	NCT03180801	2016-2017
AS03	Dengue	Phase I/II	USAMRMC	NCT02421367	En cours
AF03	grippe	Phase IV	Sanofi Pasteur	NCT01032980	2009-2011
MF59	VIH	Phase II/III	NIAID	NCT02968849	En cours
MF59	RSV	Phase I	GSK	NCT02298179	2014-2017
AS01/MF59	VIH	Phase I/II	NIAID	NCT03122223	En cours
AS01	Paludisme	Phase I	USAMRMC	NCT02174978	En cours
AS01	Paludisme	Phase I/II	University of Oxford	NCT02927145	En cours
AS01	Paludisme	Phase I	NIAID	NCT02942277	En cours
ISCOMATRIX	Dengue	Phase I	Merck & Co.	NCT01477580	2012-2014
VLP/alum/MPL	Norovirus	Phase II	Takeda	NCT03039790	En cours
VLP	HPV	Phase III	Merck & Co.	NCT02114385	2014-2015
VLP	Chikungunya	Phase I	NIAID	NCT01489358	2011-2013
VLP	Paludisme	Phase I	Fraunhofer, CMB	NCT02013687	2013-2015
VLP	Grippe	Phase II	Novavax	NCT02307851	2014-2015
Poly I:C	rage	Phase II	Yisheng Biopharma	NCT02956421	2016
Poly I:C	grippe	Phase I/II	Hemispherx Biopharma	NCT01591473	2012-2015
Poly I:C	VIH	Phase I	Rockefeller University	NCT01127464	2010-2012
CpG	Paludisme	Phase I	University of Oxford	NCT01351948	2011-2013
CpG	Anthrax	Phase II	Emergent BioSolutions	NCT01770743	2013-2014
Flagellin	Peste	Phase I	NIAID	NCT01381744	2012-2014

Table II.5: Adjuvants en essais cliniques pour le développement de vaccins contre les maladies infectieuses depuis 2010.

NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases. USAMRMC: U.S. Army Medical Research and Materiel Command. Fraunhofer, CMB: Center for Molecular Biotechnology.

Chapitre III

*Innovation technologique au service des
vaccins*

Ce chapitre a pour but de dresser un tableau du contexte actuel des vaccins et des défis que les nouveaux candidats devront relever. Nous nous attardons sur le cas particulier du VIH qui a motivé ce travail de thèse. Nous terminons par une définition des nanoparticules utilisées pendant la thèse ainsi que les objectifs qui la régissent.

III.1 Les enjeux des vaccins du XXI^{ème} siècle

III.1.1 Une couverture vaccinale suffisante

Grâce aux considérables progrès réalisés dans le domaine des vaccins, un grand nombre de maladies causées par des pathogènes infectieux sont aujourd’hui sous contrôle. Dans le meilleur des cas, une vaccination efficace conduit à l’éradication définitive du pathogène, comme par exemple pour la variole déclarée officiellement éradiquée à l’échelle mondiale en 1980, suite au programme d’éradication lancé par l’OMS en 1966²⁷⁶. Un tel résultat nécessite une couverture vaccinale importante (proportion d’individus immunisés dans une population), de 80 à 95% selon le degré de contagion du pathogène. En effet, dans une population naïve non immunisée, la propagation d’une maladie infectieuse est extrêmement rapide, d’un individu à son voisin jusqu’à l’épidémie. Vacciner un nombre restreint d’individus n’a que très peu d’impact sur la progression d’une maladie infectieuse et n’empêche pas l’épidémie puisque seules les personnes immunisées sont protégées. En revanche, lorsqu’une large majorité d’individus sont immunisés, que ce soit par vaccination ou parce qu’ils ont auparavant contracté et survécu au même pathogène, la propagation du pathogène peut être bloquée. En particulier, lorsque la couverture vaccinale est suffisante, on peut observer une immunité de groupe, à savoir que les quelques individus non immunisés sont protégés par le groupe, puisque leur chance d’entrer en contact avec le pathogène devient très faible (*Figure III.1*). Cet effet est particulièrement profitable aux personnes qui ne peuvent pas être vaccinées en raison d’une contre-indication médicale (patients immunodéprimés). En cela, le vaccin a la particularité d’être un traitement médical collectif dont le but premier est de protéger l’homme à l’échelle d’une population et non individuelle.

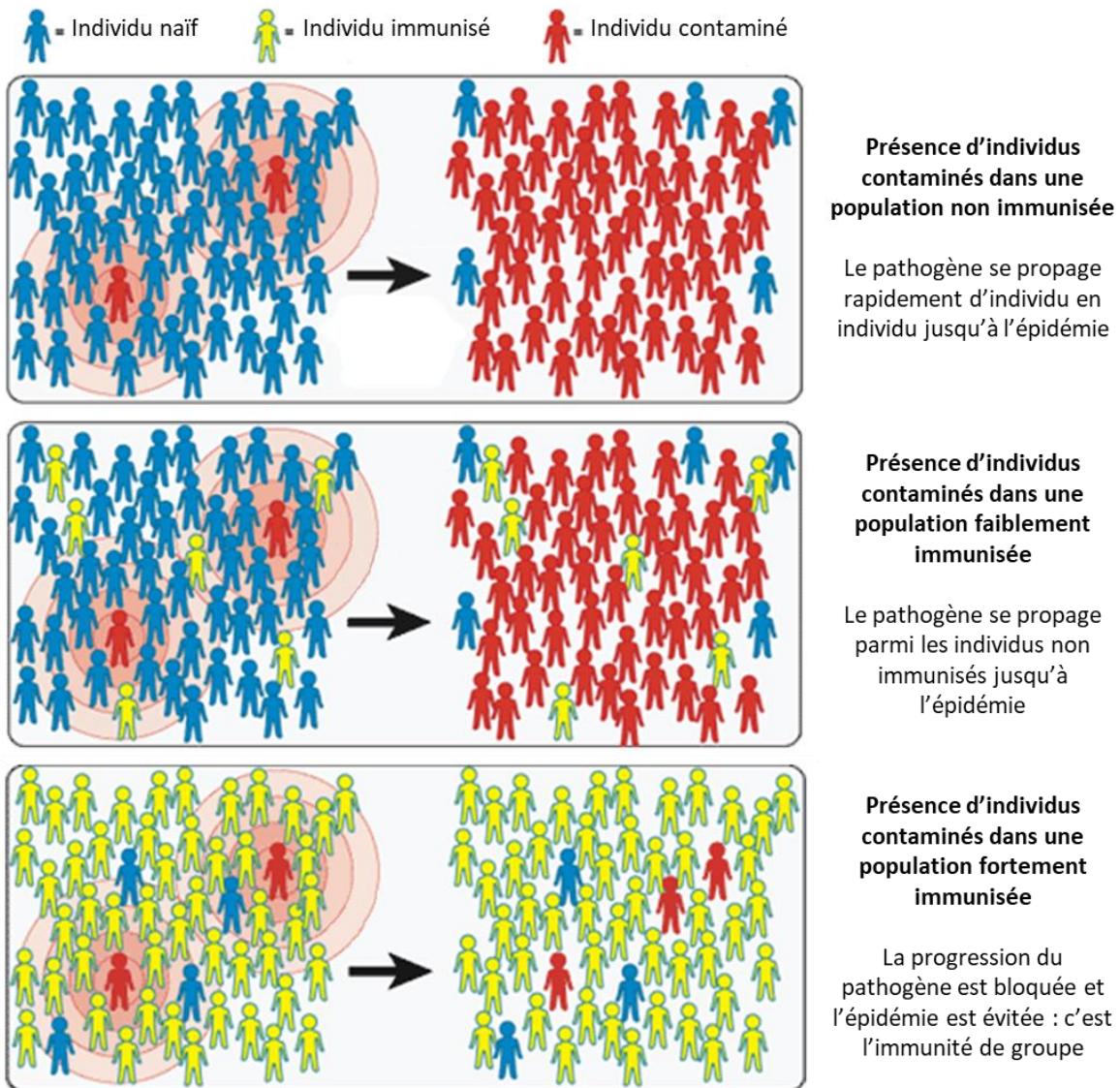


Figure III.1. Schéma représentant l'intérêt d'une couverture vaccinale élevée afin d'empêcher une épidémie. Adapté de Inserm Vaccinations, séminaires Ketty Schwartz 2014.

III.1.2 La perte de confiance envers les vaccins

Cependant, à ce jour seule la variole a été éradiquée malgré la disponibilité de vaccins efficaces contre de nombreuses autres maladies, ce qui traduit une couverture vaccinale insuffisante. Dans les pays en voie de développement, l'accès aux soins médicaux n'est pas optimal et explique que les pathogènes infectieux continuent de se propager. En revanche, il est anormal que ces pathogènes soient encore présents dans les pays développés. Cela est en grande partie la conséquence d'une perte de confiance en la vaccination. En effet, nous vivons aujourd'hui dans des conditions sanitaires bien meilleures qu'à l'époque des grandes épidémies et la population tend à oublier l'intérêt des

vaccins. Dans la grande majorité des cas, les vaccins sont des traitements médicaux prophylactiques visant à protéger contre une infection, donc l'effet de ces vaccins est invisible. Par conséquent, l'attention se détourne de l'intérêt des vaccins et est attirée par leurs défauts, principalement leurs potentiels effets indésirables. L'un des exemples les plus marquants est la polémique autour du vaccin contre l'hépatite B, suspecté de favoriser la sclérose en plaques (SEP), maladie auto-immune. L'hépatite B touchant plusieurs centaines de millions de personnes dans le monde et pouvant conduire à une infection mortelle du foie, la mise au point d'un vaccin préventif dans les années 1980 a été suivie en France d'une massive campagne de vaccination. Dans les années qui suivirent, une augmentation du nombre de cas de SEP fût signalée et rapidement associée au vaccin contre l'hépatite B, si bien que le vaccin fût suspendu en France en 1998²⁷⁷. De nombreuses études ont alors été menées afin de déterminer si le vaccin contre l'hépatite B avait réellement une incidence sur la susceptibilité de contracter une SEP. Certaines de ces études concluent sur la présence d'une corrélation statistique entre l'augmentation du nombre de cas de SEP et la vaccination préalable contre l'hépatite B²⁷⁸. D'autres études rapportent au contraire l'absence de lien de cause à effet en soulignant plutôt le caractère temporel, à savoir que le vaccin contre l'hépatite B était réalisé chez les adolescents, sachant que la SEP se déclare chez les jeunes adultes²⁷⁹. Quoi qu'il en soit, bien qu'aucune conclusion ne soit confirmée, la réputation des vaccins fût sérieusement affectée. En particulier, l'utilisation d'adjuvants dans les formulations vaccinales afin d'augmenter l'immunogénicité des vaccins à sous-unités fût montrée du doigt et décriée. Le manque de recul sur l'ajout de tels adjuvants dans les formulations vaccinales couplé à leurs potentiels effets indésirables a conduit à une baisse de la couverture vaccinale. Non seulement la population ne voit plus l'intérêt des vaccins mais ceux-ci sont même considérés comme dangereux puisque pouvant causer d'autres maladies. Cette baisse de confiance envers les vaccins en général et par conséquent de la couverture vaccinale fût suivie d'une résurgence de certaines maladies. Un premier exemple toucha la Bretagne avant la polémique sur le vaccin contre l'hépatite B, qui connut une épidémie de variole grave en 1955 avec 98 personnes contaminées et 20 décès²⁸⁰. Plus récemment en 2011, une épidémie de rougeole fût la conséquence d'une insuffisance vaccinale, à savoir que les individus ne sont pas vaccinés ou n'ont pas fait leur rappel²⁸¹. La coqueluche est un autre exemple, avec de nombreux cas observés ces dernières années chez les nourrissons, contaminés dans le cercle familial par un parent insuffisamment vacciné et avant que le nourrisson n'ait reçu sa première injection vaccinale²⁸².

III.1.3 Les perspectives des vaccins

Dans le contexte actuel de rejet des vaccins, il est primordial de regagner la confiance de la population afin de recouvrir une couverture vaccinale satisfaisante permettant d'envisager l'éradication d'autres maladies que la variole. La polémique sur les adjuvants souligne le fait que l'amélioration considérable de notre hygiène de vie est automatiquement associée à un refus de la prise de risques. En effet, à l'époque des grandes épidémies le risque de 1 à 2 % de mourir des suites de la variolisation était tout à fait acceptable comparé aux 30 % de mortalité causés par la variole. De nos jours et dans les pays développés, la peur des maladies est bien moindre et par conséquent la polémique sur les effets secondaires des vaccins prends le dessus sur l'intérêt de ceux-ci. C'est pourquoi bien que le risque nul n'existe pas, la recherche sur le vaccin doit proposer à l'avenir des formulations plus sûres et mieux contrôlées, en ayant une meilleure connaissance des mécanismes des adjuvants utilisés. En outre, malgré les progrès dans ce domaine, certaines maladies n'ont toujours pas de vaccin, comme par exemple le VIH ou le paludisme. Ces pathogènes sont en effet très virulents et nécessitent l'induction de réponses immunitaires de type cellulaire, difficiles à obtenir avec les vaccins à sous-unités actuels. Par conséquent, en plus de devenir plus sûrs, les vaccins doivent également devenir plus performant et capables d'induire des réponses immunitaires importantes et à médiation cellulaire. L'augmentation de la performance des vaccins pourra également bénéficier aux pays en voie de développement dans lesquels l'accès aux soins est limité et par conséquent la nécessité de plusieurs injections de rappels pour un même vaccin difficilement réalisable.

Outre ses applications préventives, le vaccin évolue également vers d'autres enjeux. Des vaccins thérapeutiques sont notamment envisagés pour le traitement des cancers par immunothérapie. Le principe est d'éduquer par la vaccination le système immunitaire du patient à se défendre contre les cellules cancéreuses. Cela repose sur le fait que les cellules tumorales expriment des molécules spécifiques, appelées « tumor-associated antigens » (TAA), qui servent donc de cibles pour la vaccination²⁸³. L'enjeu est de parvenir à initier une réponse immunitaire de type cellulaire dirigée contre les antigènes exprimés par les cellules cancéreuses. La recherche dans ce domaine a été stimulée par l'approbation en 2010 par la FDA (Food and Drug Administration) du premier vaccin thérapeutique contre le cancer de la prostate²⁸⁴. Ce vaccin, commercialisé par Dendreon sous le nom de Provenge, s'adresse à des patients touchés par une forme métastatique résistante à la castration du cancer de la prostate. La cible du vaccin est l'enzyme phosphatase acide prostatique (PAP) exprimée par les cellules cancéreuses. Egalement sur un principe d'immunothérapie, les vaccins sont destinés à être utilisés pour soigner les allergies²⁸⁵. Les allergies sont le résultat d'une

hypersensibilité médiée par une production excessive d'anticorps de type IgE, affectant plus de 25 % de la population. La vaccination génère une réponse humorale avec principalement la production d'IgG qui interfèrent avec la réaction allergique provoquée par les IgE. D'autre part, l'utilisation depuis plusieurs années d'antibiotiques a favorisé l'émergence de souches bactériennes résistantes, contre lesquelles des vaccins pourraient être une solution de remplacement. Enfin, la forte mobilité des populations associée au réchauffement climatique voit la migration de maladies tropicales vers des pays naïfs, ce que nous devons anticiper afin de prévenir de graves épidémies. Tous ces exemples sont autant de raisons pour le développement de nouveaux vaccins, plus performants et plus sûrs²⁸⁶. De plus, la mise sur le marché de nouveaux vaccins nécessitant près de 15 ans de contrôles de performances et validations cliniques, il est crucial que les formulations vaccinales soient faciles à produire et peu coûteuses afin de garantir un accès au plus grand nombre.

III.2 Le cas particulier du VIH

Dans cette partie nous nous attardons sur le cas particulier du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), responsable de la pandémie de SIDA (Syndrome de l'Immunodéficience Acquise) contre lequel il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin et considéré comme une urgence par l'OMS. Nous ne faisons pas ici une revue exhaustive du VIH, mais présentons les principaux éléments permettant d'appréhender les enjeux du développement d'un vaccin anti-VIH.

III.2.1 Présentation du VIH

Le SIDA est le cas le plus extrême d'immunosuppression causé par un pathogène, le VIH. L'infection par le VIH conduit à une perte graduelle d'immunocompétence caractérisée par une grande susceptibilité d'infection par des pathogènes opportunistes ou maladies associées à une grave diminution de LT CD4, par exemple la forme agressive du sarcome de Kaposi ou le lymphome. A ce jour, la pandémie mondiale du VIH a causé plus de 35 millions de décès dans le monde et comptabilisé 78 millions de personnes infectées depuis le début de l'épidémie. Les pays les plus touchés sont les pays pauvres tels que l'Afrique et l'inde, où l'accès aux dépistages, traitements et moyens de prévention sont extrêmement limités (*Figure III.2*).

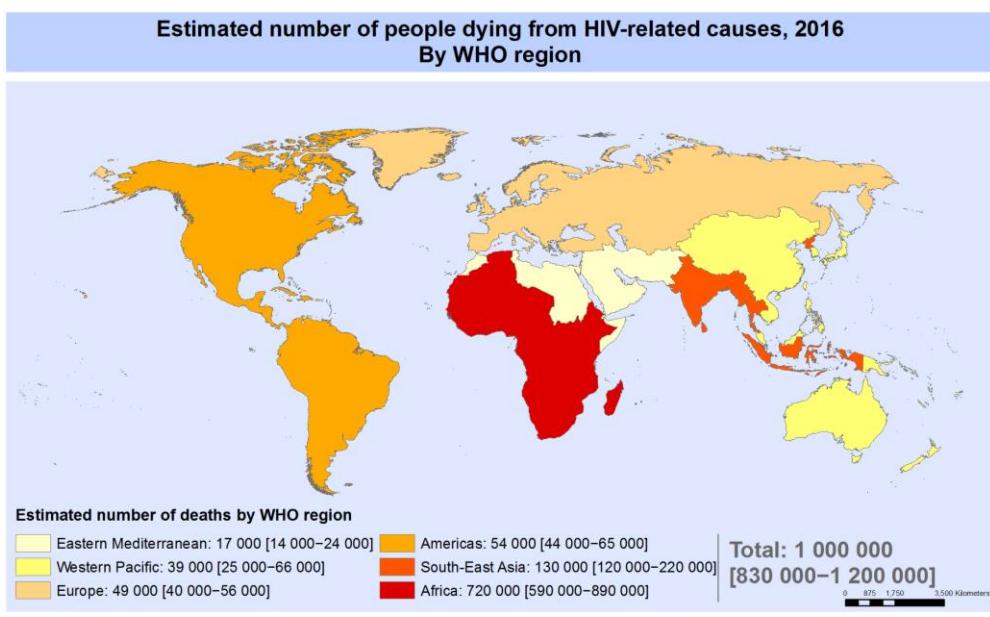


Figure III.2: Répartition de la mortalité causée par le VIH dans le monde.

a. Le VIH et ses sous-groupes

Le premier cas officiellement reporté de SIDA date de 1981 aux Etats-Unis, bien que les traces les plus anciennes du virus aient été détectées dans un échantillon de sérum provenant du Congo et datant de 1959²⁸⁷. C'est en 1983 que le virus fût identifié et isolé par les chercheurs français Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi avec la contribution de l'américain Robert Gallo²⁸⁸. Le virus provient vraisemblablement d'une contamination depuis le singe vers l'homme. Deux types de virus ont été identifiés : HIV-1 et HIV-2. HIV-1 est la forme la plus virulente, la plus répandue dans le monde et celle qui présente la plus grande variabilité génétique. A l'inverse, HIV-2 est endémique seulement dans l'ouest de l'Afrique et se propage progressivement en Inde. HIV-1 est divisé en 3 groupes : M (main), O (outlier) et N (non-M, non-O), issus de contaminations par des singes différents²⁸⁹. Le groupe M est la cause majeure du SIDA dans le monde, il est subdivisé en clades intitulés de A à K. Chaque clade prédomine dans une région différente du monde (*Figure III.3*). Ces clades sont le résultat de mutations du virus au sein de l'espèce humaine après contamination par le singe. Il est estimé que l'ancêtre commun à tous ces clades du groupe M remonte aux années 1930.

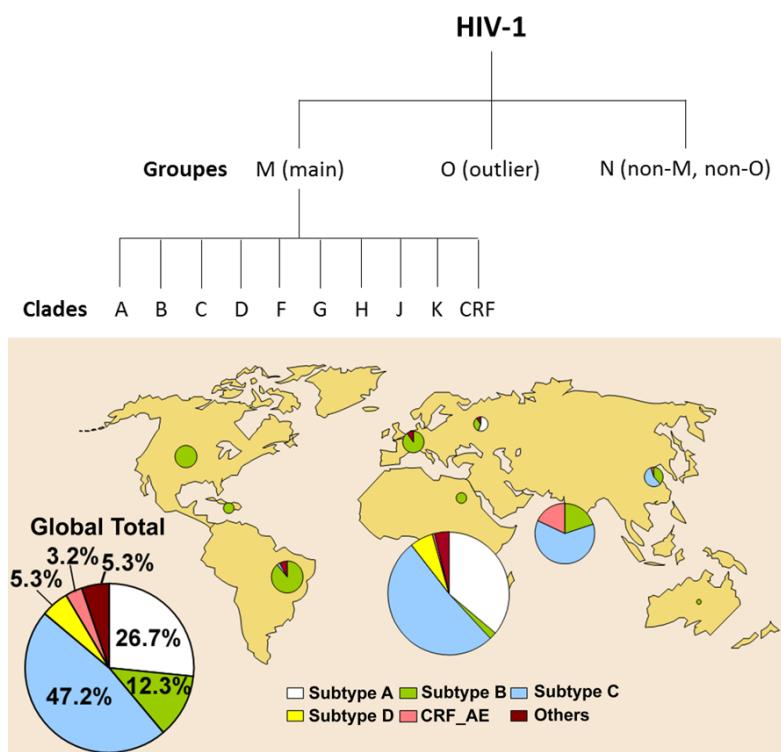


Figure III.3. Organigramme représentant les différents groupes et clades de la forme HIV-1 la plus répandue dans le monde.

Le groupe M est responsable de la majorité des cas de SIDA et sous-divisé en clades caractéristiques d'une région du monde. Le clade B est prépondérant en Europe et en Amérique tandis que le clade C est majoritaire en Afrique et en Asie.

b. Description de la particule virale

Le VIH est un rétrovirus, plus précisément de la catégorie des lentivirus qui se caractérisent par une longue période d'incubation et leur capacité à tuer les cellules infectées. Le virus a une forme sphérique d'environ 100-140 nm de diamètre. Cette particule virale est entourée d'une enveloppe lipidique recouverte de glycoprotéines virales assemblées en trimères. Les trimères de la protéine de surface gp120 sont accrochés aux trimères de la protéine transmembranaire gp41²⁹⁰. Au sein de l'enveloppe, une matrice composée de protéines p17 renferme la capsid du virus, elle-même constituée de protéines p24. Cette capsid contient l'ARN viral ainsi que les enzymes nécessaires à la réplication du virus²⁹¹ (Figure III.4).

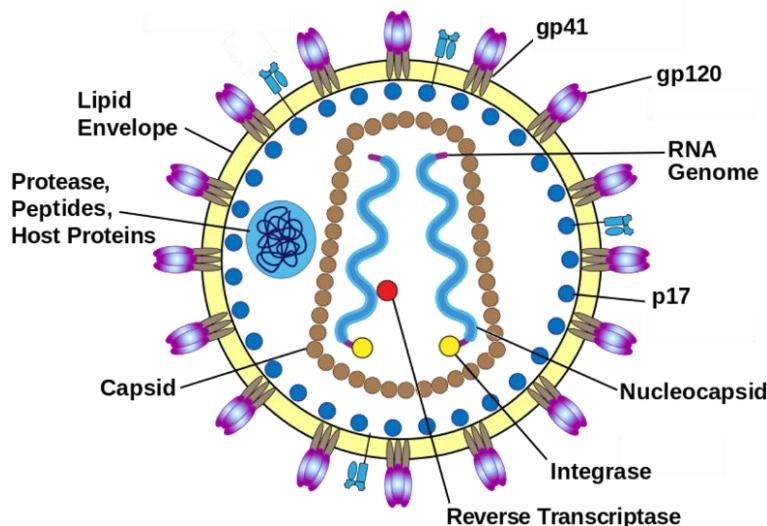


Figure III.4: Schéma représentant la structure moléculaire du VIH.

La gp120 et gp41 constituent l'enveloppe du virus qui renferme une matrice composée de p17 à l'intérieur de laquelle se trouve la capsid virale constituée de p24.

Le génome du VIH comprend 9 gènes, dont les trois principaux sont gag, pol et env. Gag code pour des protéines structurales du noyau viral (p24) et de la matrice (p17), pol code pour des enzymes impliquées dans la réplication virale et l'intégration dans le génome et env code pour des glycoprotéines virales d'enveloppe. Parmi les autres gènes, tat et rev ont des fonctions régulatrices impliquées dans la réplication virale tandis que nef, vif, vpr et vpu interviennent dans la production de particules virales²⁹¹ (Figure III.5).

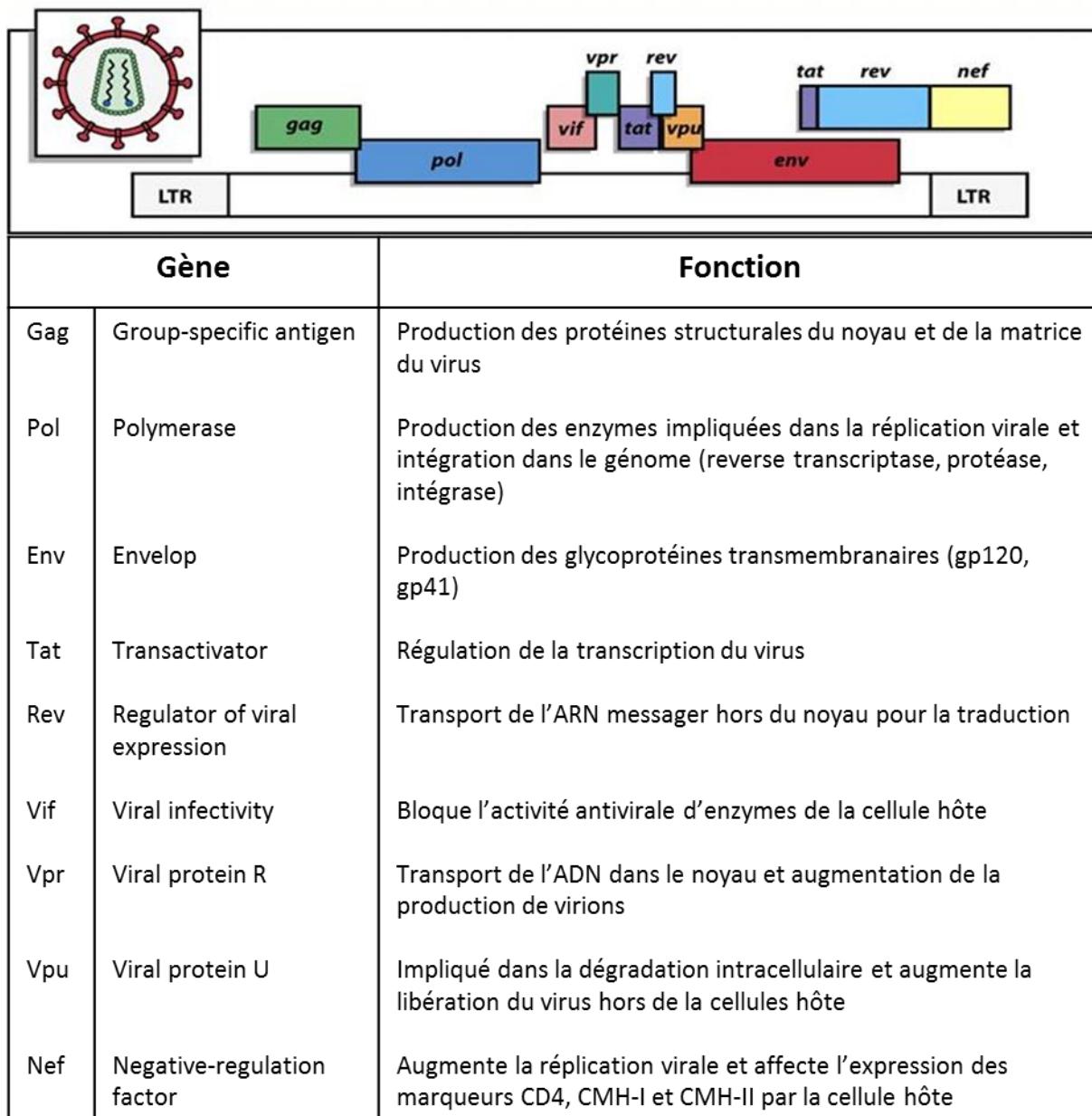


Figure III.5. Rappel des fonctions des 9 gènes du VIH.

Les gènes *gag*, *pol* et *env* produisent les protéines et enzymes qui constituent le virus. Les gènes *tat* et *rev* régulent la réplication du virus tandis que les gènes *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef* contribuent à la production des virions.

III.2.2 Le cycle de vie du VIH

a. La transmission du virus

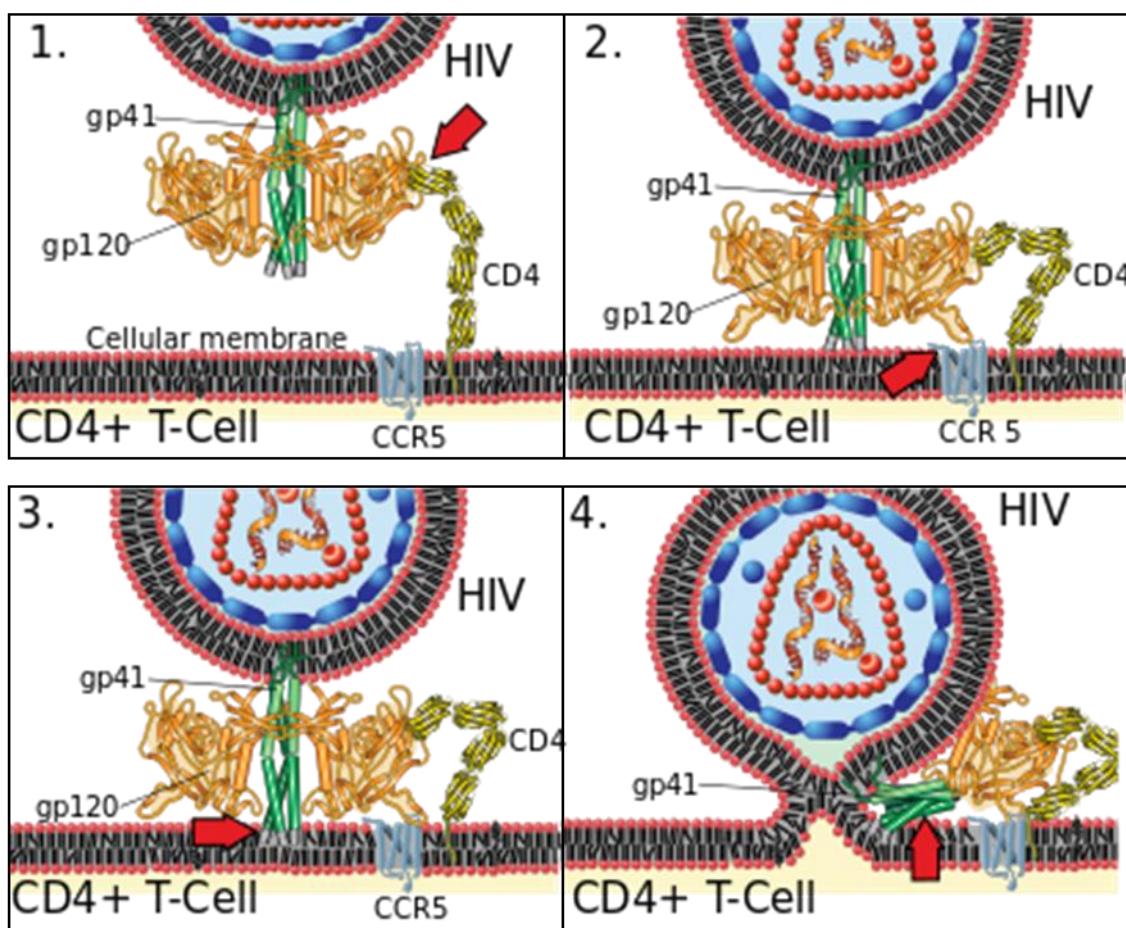
Le VIH est transmis d'un individu infecté à un individu sain via l'échange de fluides corporels (sang, sperme, fluide vaginal, lait maternel). Le principal mode de contamination est le rapport sexuel non protégé, entre individus hétérosexuels ou homosexuels. Le virus peut également être transmis en manipulant du matériel contaminé, telle qu'une seringue lors de prise de drogue en intraveineuse. En 2012 en Europe, les nouveaux cas d'infection par le VIH recensés étaient attribués à des rapports sexuels dans 67 % des cas et la prise de drogues en intraveineuse dans 18 % des cas²⁹¹. Les contaminations dans le milieu médical ont été fortement réduites grâce à une augmentation de la vigilance et des contrôles (transfusions sanguines, etc.). Enfin, une mère infectée peut transmettre le virus à son enfant durant la grossesse, lors de l'accouchement ou par l'allaitement.

b. Le cycle de réplication du virus

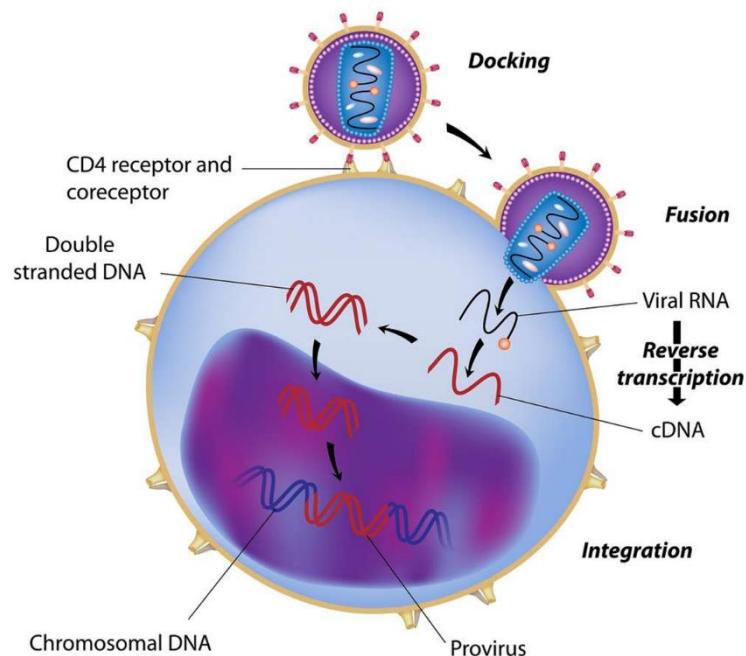
La première étape de l'infection par le VIH repose sur une interaction entre des protéines du virus et des protéines des cellules. Il s'agit d'une interaction spécifique entre la gp120 exprimée à la surface du VIH et le marqueur CD4 de la cellule cible. Par conséquent, toutes les cellules exprimant le CD4 sont des cibles potentielles du virus, principalement les LT auxiliaires. La fixation de la gp120 sur le CD4 induit un premier changement conformationnel de la gp120 rendant disponible un nouveau site de fixation spécifique du corécepteur CCR5 ou CXCR4 exprimé par la cellule cible²⁹². Ce double signal déclenche un deuxième changement conformationnel de la gp120 qui se répercute sur la gp41. La gp41 contient des peptides fusogènes localisés sur sa terminaison amine, initialement enfermés dans le complexe formé par la protéine en raison de leur caractère hydrophobe. Par la stimulation de la gp120, la gp41 va alors présenter ces peptides fusogènes et les insérer dans la membrane de la cellule cible afin de fusionner avec celle-ci²⁹³ (Figure III.6).

Lors de cette fusion, la capsidie virale est capturée par l'endosome et la diminution du pH permet de relarguer son contenu dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'ARN viral est alors traduit en ADN par la transcriptase inverse issue du virus et copié en double brin. Ce nouvel ADN est ensuite transporté dans le noyau et intégré dans le génome de la cellule hôte grâce à l'intégrase provenant du virus²⁹¹ (Figure III.7). La cellule hôte est donc infectée par le virus, qui va se servir de la machinerie cellulaire pour se répliquer. En effet, une fois la cellule activée, des facteurs de transcription vont lire le génome de la cellule pour produire les protéines utiles à la cellule. Par la même occasion, l'ADN viral intégré au génome de la cellule (le provirus) sera lu et des protéines virales seront produites. Les

premières protéines produites sont Tat et Rev, dont la fonction est d'amplifier la transcription du provirus et favoriser le transport de l'ARN viral vers le cytoplasme de la cellule. Les dernières protéines virales produites, gag, pol et env, sont assemblées en particules virales qui s'échappent finalement de la cellule à la recherche d'un nouvel hôte. Lors de la traduction de l'ARN viral en ADN, la transcriptase inverse génère des erreurs, à l'origine de nombreuses mutations du virus. Cela confère un avantage considérable au virus, car selon la nature des mutations, le nouveau mutant pourra échapper au système immunitaire.



a)



b)

- ① Traduction de l'ADN proviral
- ② Synthèse des protéines virales
- ③ Assemblage du virus
- ④ Particules virales libérées

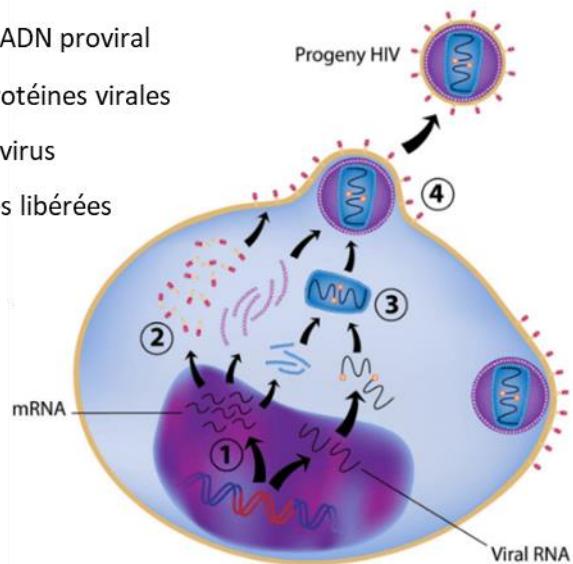


Figure III.7: Schéma représentant le cycle général de réplication du VIH.

a) Après fixation de la particule virale à la surface de la cellule cible, celles-ci fusionnent pour libérer la capsidie virale dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'ARN viral est traduit en ADN par la reverse transcriptase puis intégré dans le génome de la cellule par l'intégrase. b) Ce provirus profite de la machinerie cellulaire pour produire de nouvelles particules virales. L'ADN viral est traduit pour synthétiser les protéines structurales du virus, qui s'assemblent en virions émis par la cellule.

III.2.3 Le traitement du VIH

a. Les symptômes de la maladie

Lorsqu'un individu est infecté par le VIH, on distingue plusieurs phases de la maladie (*Figure III.8*). Dans un premier temps, la phase aigüe de la maladie est généralement caractérisée par un état grippal, associé à une charge virale élevée dans le sang et une importante diminution du taux de LT CD4. Cette disparition des LT CD4 est causée soit directement par l'activité cytotoxique du virus, soit par les cellules du système immunitaire qui combattent l'infection. En outre, il a été observé que le mécanisme de régénération des LT CD4 est défectueux chez les patients infectés par le VIH, ainsi très peu de nouveaux LT CD4 sont produits²⁹⁴. Malheureusement, le diagnostic est rarement établi à ce stade de la maladie car les symptômes sont trop communs pour alerter du danger. Au cours des semaines suivantes, débute la phase asymptomatique. La réponse adaptative mise en place a permis de réduire la charge virale et de rétablir un taux acceptable de LT CD4. Le virus semble sous contrôle, mais il est seulement en latence. Les meilleurs mutants sélectionnés continuent de se répliquer, ce qui cause une diminution très lente et progressive du taux de LT CD4. Cette phase peut s'étendre de quelques mois à plusieurs années. Lorsque le taux de LT CD4 se retrouve en-dessous d'un seuil critique, le patient entre dans la phase symptomatique. La faiblesse et le manque de réaction de la part du système immunitaire se traduisent par le développement de maladies opportunistes. Le SIDA est alors déclaré et suivi en peu de temps par la mort du patient immunodéprimé.

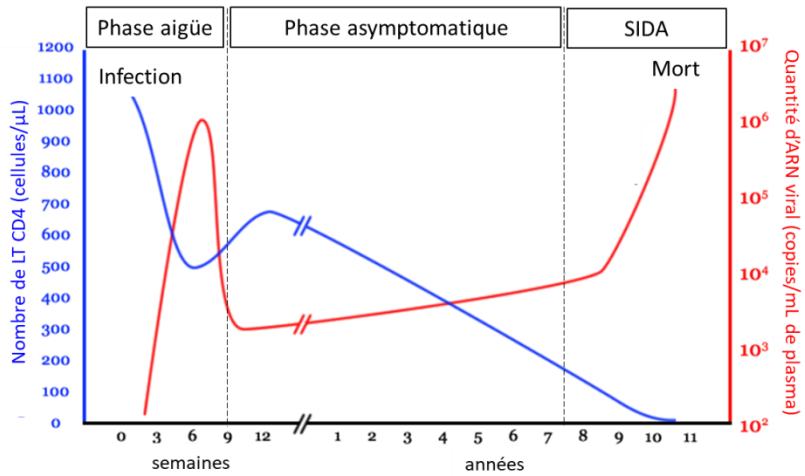


Figure III.8 : Représentation des différentes phases de l'infection par le VIH.

La phase aigüe est caractérisée par une chute du taux de LT CD4 liée à la croissance de la charge virale. Lorsque le système immunitaire parvient à mettre en place des réponses, la charge virale diminue et l'on rentre dans la longue phase asymptomatique. Le virus en dormance sélectionne les mutants qui échappent au système immunitaire pour les faire progressivement proliférer jusqu'à la phase de SIDA déclarée lorsque le taux de LT CD4 passe en dessous d'un seuil critique. Les maladies opportunistes profitent de l'immunodépression du patient et entraînent la mort.

b. La thérapie antirétrovirale

A ce jour, il n'existe pas de solution permettant d'éliminer définitivement le virus. Le seul traitement disponible est la thérapie antirétrovirale, qui est basée sur l'inhibition fonctionnelle des enzymes virales permettant au virus de se répliquer²⁹⁵. Cependant, le taux élevé de mutations du virus est à l'origine d'un grand nombre de mutants résistant au traitement^{296,297}. Le traitement initial a donc été renforcé en combinant plusieurs antirétroviraux afin d'être actif sur le plus grand nombre de mutants possible, ce que l'on appelle HAART (highly active antiretroviral therapy)²⁹⁸⁻³⁰¹. Grâce à ce traitement, la mortalité observée chez les patients infectés par le VIH a été considérablement réduite et leurs conditions de vie ont été améliorées. En effet, HAART réduit rapidement et drastiquement la charge virale, jusqu'à la limite de détection de l'ARN viral (50 copies/mL de plasma)³⁰². Malgré cela, cette thérapie est incapable d'éradiquer définitivement le virus. Cela implique que le traitement est permanent, et qu'un arrêt entraîne immédiatement la reprise de la réplication virale. Ceci est dû à la présence de réservoirs viraux, notamment au sein des LT CD4 mémoires³⁰³⁻³⁰⁸. D'autre part, la prise de ce médicament en continue cause des effets secondaires importants chez une proportion significative de patients, tels que des maladies cardiovasculaires, des pathologies rénales et hépatiques et des cas de diabète^{309,310}. A cela s'ajoute le coût colossal attribué à la thérapie, estimé

aux Etats-Unis à en moyenne 30 000 \$ par an par patient³¹¹. En conséquence, HAART n'est pas accessible à l'ensemble des patients, comme le démontrent les statistiques d'UNAIDS de 2015 estimant que seulement 46 % des individus infectés par le VIH ont eu accès à un traitement. Bien que HAART ait transformé le VIH en une maladie chronique avec laquelle il est possible de vivre pendant plusieurs années, d'autres moyens permettant d'éradiquer définitivement le virus sont attendus.

III.2.4 Les attentes d'un vaccin anti-VIH

A l'heure actuelle, la solution la plus prometteuse pour contrôler la propagation du VIH dans le monde est le développement d'un vaccin prophylactique³¹². Jusqu'à présent, seul 3 candidats prophylactiques sont parvenus en phase clinique IIb et III afin d'évaluer leur efficacité à prévenir l'infection par le VIH. Cependant, les résultats de ces différents essais cliniques ont été majoritairement décevants. Le premier candidat, AIDSVAX (VaxGen), était basé sur la combinaison de la protéine d'enveloppe gp120 avec de l'alum comme adjuvant. Testé en Thaïlande au début des années 2000, aucune protection contre l'infection du VIH ne fût observée chez les populations à risque étudiées en comparaison au groupe placebo, malgré les taux élevés d'anticorps neutralisants spécifiques de la gp120 mesurés³¹³. L'essai clinique suivant STEP/PHAMBILI (Merck) débute en 2005 avec pour objectif d'évaluer l'efficacité de 3 injections d'une formulation comprenant un vecteur viral délivrant des antigènes du VIH gag, pol et nef. L'essai dû être stoppé prématurément en 2007 suite aux conclusions que le vaccin augmentait le risque d'acquisition du virus. Cet effet serait dû à une immunité dirigée contre le vecteur viral préexistante chez les patients³¹⁴⁻³¹⁶. Finalement, AIDSVAX fût combiné avec ALVAC (Sanofi Pasteur), un vecteur viral contenant les antigènes env, gag et pol, pour être de nouveau testé en Thaïlande dans les années 2000, conduisant à une baisse de 31 % du risque de contamination par le VIH³¹⁷. Ce résultat est à ce jour le meilleur obtenu en essai clinique mais reste insuffisant pour impacter la pandémie de VIH.

L'ensemble de ces essais cliniques ont tout de même permis d'identifier les pistes à suivre pour le développement d'un vaccin efficace anti-VIH. En particulier, un tel vaccin doit être capable de générer des anticorps neutralisants à large spectre, efficaces contre plusieurs cibles exprimées par différentes souches du virus³¹⁸. De tels anticorps ont été observés chez de rares individus ayant développé une immunité contre le VIH. Leurs anticorps ont en fait muté pour s'adapter aux variations du virus, jusqu'à accumuler suffisamment de mutations pour neutraliser le VIH sous toutes ses formes. D'autre part, l'induction d'une réponse immunitaire de type cellulaire est requise pour l'élimination des cellules infectées par le virus et qui constituent des réservoirs viraux permettant au virus de persister pendant des années dans l'organisme³¹⁹.

III.3 Définition du matériel et des objectifs de la thèse

Cette thèse a pour objectif de proposer une nouvelle plateforme pour la délivrance d'antigènes, dans le but d'induire des réponses immunitaires de grande amplitude à médiation humorale et cellulaire. L'objet servant de base à ce travail est intitulé Lipidot® et a été développé par le CEA depuis une dizaine d'années.

III.3.1 Définition des Lipidot®

Les Lipidots, notées LNP (pour lipid nanoparticles), sont des nanoparticules de type NLC composées d'un cœur lipidique semi-cristallin stabilisé par une couronne de tensioactifs. Le cœur des LNP est constitué d'un mélange de lipides solides (cire) et de lipides liquides (huile), tandis que la couronne de tensioactifs comprend des phospholipides et des chaînes de polymère PEG (poly(éthylène glycol)) (Figure III.9).

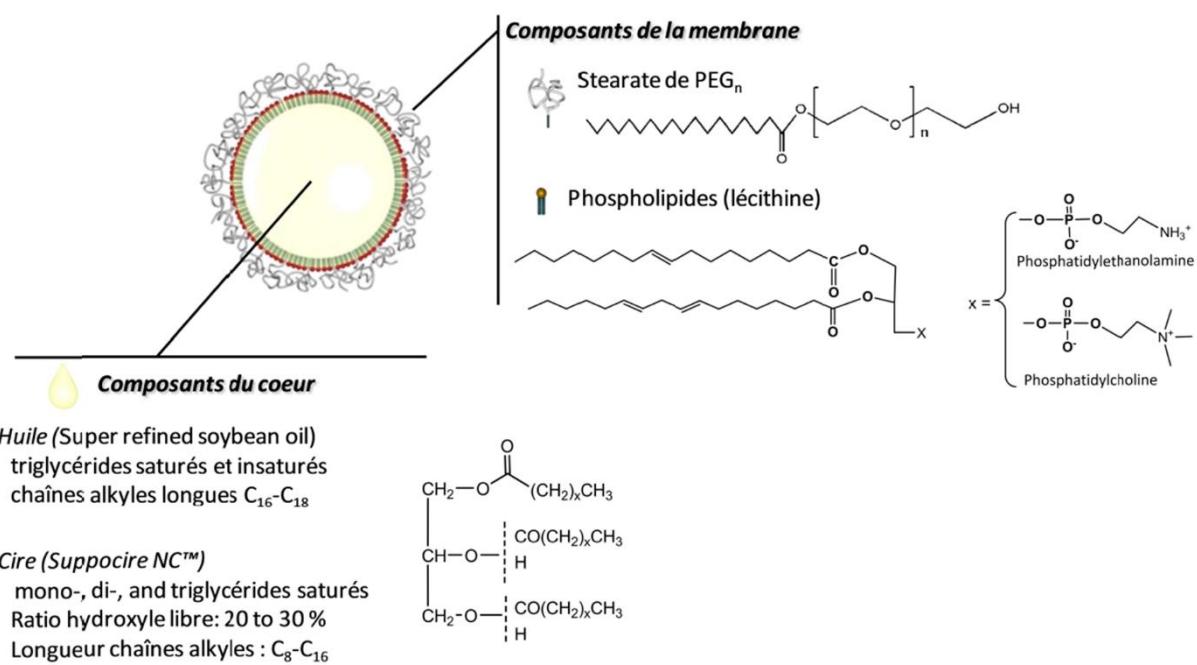


Figure III.9. Schéma représentant les Lupidots (LNP) et leur composition.

Le cœur lipidique est un mélange d'huile et de cire conduisant à une cristallisation imparfaite autorisant l'encapsulation de biomolécules. Ce cœur lipidique est stabilisé par une couche de tensioactifs incluant des phospholipides et des PEG.

La composition des LNP a été optimisée afin d'obtenir des particules d'une grande stabilité avec la possibilité d'ajuster leur taille de 30 à 150 nm en adaptant les ratios des différents ingrédients^{320,321}. Les différents composants utilisés pour préparer les LNP sont de grade pharmaceutique et approuvés pour utilisation chez l'homme par la FDA. Par conséquent, les LNP sont biocompatibles et utilisables pour des applications *in vivo*³²². De plus, la couche de PEG qui recouvre la surface des LNP leur confère un caractère furtif qui permet de prolonger leur temps de circulation dans l'organisme³²³.

Les LNP ont à l'origine été développées pour des applications dans l'imagerie de fluorescence. En effet, ces vecteurs sont capables d'encapsuler des fluorophores lipophiles et d'améliorer leurs propriétés optiques telles que leur rendement quantique et demi-vie³²⁴⁻³²⁷. L'injection de LNP fluorescentes dans des souris a notamment permis d'étudier leur biodistribution dans l'organisme. Les LNP s'accumulent naturellement dans le foie, les reins, les intestins, les ganglions, la rate, le pancréas et les poumons, après injection intraveineuse^{326,328}. De plus, les LNP ont tendance à s'accumuler de manière passive dans des tumeurs sous-cutanées en raison de l'augmentation de la perméabilité et de la rétention dans ces tissus. Par conséquent les LNP sont très utiles pour la détection de tumeurs par des techniques d'imagerie de fluorescence^{322,329,330}. Par ce ciblage des tumeurs, les LNP ont pu notamment être utilisées pour délivrer un photosensibilisateur dans les tissus tumoraux dans un contexte de thérapie photodynamique³³¹.

Grâce à leurs avantages en termes de stabilité, d'innocuité et leur comportement *in vivo*, les LNP constituent un outil idéal pour la délivrance d'antigène et la conception de formulations vaccinales performantes. De plus, le vecteurs de type NLC ont été très peu décrits pour des applications de vaccin, ce qui laisse la voie libre pour de nouveaux candidats.

III.3.2 Enoncé des objectifs de la thèse

Le but de cette thèse est de proposer un nouveau système de délivrance d'antigènes capable d'induire des réponses immunitaires élevées à médiation humorale et cellulaire. Pour répondre à cet objectif, nous avons défini plusieurs axes de travail.

- Il s'agit dans un premier temps de réaliser la preuve de concept de la délivrance d'antigènes par les LNP. Nous avons pour cela sélectionné l'antigène modèle ovalbumine, afin de réaliser le greffage covalent d'antigènes à la surface des LNP. Les formulations antigéniques doivent être caractérisées *in vitro* afin de comprendre les mécanismes cellulaires mis en jeu dans l'induction de réponses immunitaires. La performance des formulations antigéniques sera évaluée *in vivo* sur un modèle de souris afin d'étudier la qualité des réponses immunitaires induites en fonction des paramètres étudiés.
- Les formulations antigéniques pourront ensuite être optimisées par la vectorisation supplémentaire d'immunostimulants, cela dans le but d'amplifier les réponses immunitaires. L'objectif sera de tester et comparer plusieurs formulations immunostimulantes afin d'identifier la configuration idéale.
- Enfin, les méthodes développées seront appliquées au cas concret du VIH. L'enjeu sera de développer une formulation capable d'induire des réponses immunitaires spécifiques contre la p24 d'une grande amplitude, à médiation humorale et cellulaire.

RESULTATS

Chapitre IV

Vectorisation d'un antigène par les LNP :

*Preuve de concept avec le modèle
ovalbumine*

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité de travaux antérieurs de notre groupe visant à poser les bases de la vectorisation d'antigènes par les LNP. Au cours de ces travaux, la vectorisation par greffage covalent de l'OVA sur les LNP a été mise au point et plusieurs candidats ont été préparés. En particulier, la taille du vecteur (80 nm versus 120 nm) et sa charge de surface (neutre versus cationique) ont été étudiés. Les différentes particules ont été évaluées *in vivo* en termes d'immunogénicité, sur la base des réponses humorales et cellulaires induites pour une dose d'OVA de 50 µg adjuvantée par du LPS. Les résultats obtenus ont identifié les particules neutres de 80 nm comme étant significativement plus performantes³³². Ce candidat a donc été retenu pour servir de base dans ce travail de thèse. La première étape a été de confirmer les résultats de l'étude préliminaire en s'orientant vers une configuration plus rationnelle, avec une dose de 10 µg d'OVA au lieu de 50 µg et des immunostimulants plus pertinents que le LPS (au regard de sa toxicité), tels que le MPLA et le CpG. Nous avons également poursuivi la démarche de recherche de la taille optimale du vecteur, sur la base de la littérature en faveur de particules encore plus petites, de 50 nm. Les différentes formulations comparées ont fait l'objet d'une caractérisation plus poussée des interactions entre les particules et les cellules, dans le but de mieux comprendre les implications sur les réponses immunitaires *in vivo*. Enfin, des paramètres expérimentaux tels que la dose d'antigène et la voie d'administration ont été étudiés afin d'explorer la versatilité des LNP.

IV.1 Démonstration de l'intérêt de la vectorisation de l'OVA par les LNP

IV.1.1 Préparation des formulations antigéniques

a. Formulation des LNP

Les LNP sont des nanoémulsions lipidiques préparées en mélangeant une phase organique, contenant de la cire, de l'huile et un tensio-actif, avec une phase aqueuse contenant un tensio-actif PEGylé solubilisé dans du PBS (*voir masses exactes partie expérimentale section VII.1.1 p.236*). Afin d'obtenir une phase organique homogène, les composés sont solubilisés dans du dichlorométhane, qui est ensuite complètement éliminé du milieu par évaporation à 50°C sous un flux d'argon. La formation des nanoparticules a lieu par sonication du mélange des phases aqueuse et organique³²¹. La taille des particules finales dépend du ratio entre les composants de la phase organique et de la phase aqueuse³²⁰. Nous avons choisi de réaliser notre étude sur des particules de 80 nm afin de satisfaire la théorie sur l'exclusion stérique du drainage lymphatique, dont la limite se trouve aux alentours de 100 nm¹⁶⁹. Pour les expériences qui le nécessitent, il est possible de rendre les particules fluorescentes en incorporant un fluorophore dans le cœur des LNP³²⁴. Pour cela, du DiD ou DiO est ajouté à la phase organique avant l'élimination du solvant. Après formulation, les particules

sont purifiées par dialyse afin d'éliminer les composés non incorporés puis sont stérilisées par filtration sur 0.22 µm sous un PSM à flux laminaire (poste de sécurité microbiologique). Les particules finales sont stockées à 4°C. Le nombre total de particules contenues dans un lot de LNP est estimé à 2.70×10^{15} (voir calcul partie expérimentale section VII.1.1 p.236).

Le diamètre hydrodynamique (D_h) et le potentiel zêta des particules préparées sont systématiquement contrôlés par DLS (dynamic light scattering) et ELS (electrostatic light scattering) respectivement (voir partie expérimentale section VII.2.1 p.242). Le PDI (index de polydispersité) indique la dispersion de taille des particules constituant un même lot. Plus le PDI se rapproche de 0, plus la population de particules est monodisperse, à savoir de taille homogène. Les valeurs moyennes de diamètre hydrodynamique, de PDI et de potentiel zêta des LNP ont été calculées sur plusieurs lots représentatifs et indiquées dans la *Table IV.1*. Les LNP ont une taille moyenne de 73 ± 3 nm pour un PDI relativement faible, inférieur à 0.15, ce qui indique une population de particules plutôt homogène en taille. Ces LNP ont une charge de surface légèrement anionique, aux alentours de -5 mV. Les écarts-types calculés sur ces paramètres démontrent la reproductibilité de la méthode de préparation, la variation d'un lot à l'autre étant très faible.

Formulation	Nb de lots	Taille (nm)	PDI	Zêta à pH 7.0 (mV)
F80	28	73 ± 3	0.14 ± 0.02	-5.0 ± 1.0

Table IV.1. Valeurs moyennes et écarts-types de la taille, du PDI et du potentiel zêta des LNP.

La stabilité colloïdale des particules a été évaluée en mesurant le diamètre hydrodynamique des particules après plusieurs semaines de stockage et en comparant le profil obtenu à la mesure originale de taille (*Figure IV.1*). Dans cet exemple, après 9 semaines de stockage le profil de taille des LNP est quasiment superposable au profil de taille effectué le jour de la formulation et aucune population d'agrégats n'est détectée. Ce test démontre la stabilité des LNP, qui peuvent être aisément conservées pendant plusieurs semaines.

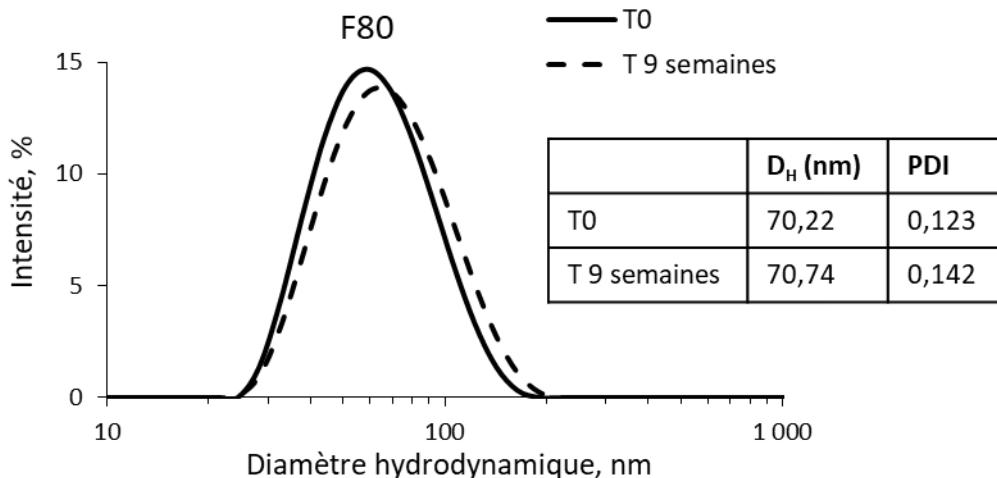


Figure IV.1. Stabilité colloïdale des LNP.

Superposition des profils de taille de F80 mesurés par DLS le jour de la formulation et 9 semaines après conservation à 4°C.

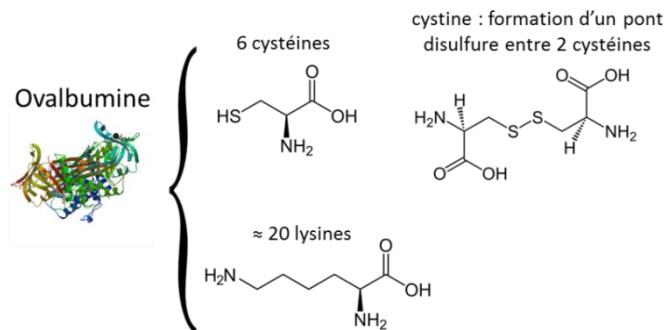
b. Greffage de l'antigène modèle ovalbumine sur les LNP

L'ovalbumine est un antigène modèle qui a été largement utilisé pour étudier la délivrance de protéines via des vecteurs particulaires^{205,333,334}. Nous avons employé ce modèle pour réaliser la preuve de concept de la vectorisation d'antigène par les LNP. L'ovalbumine étant une protéine hydrophile, elle ne peut être encapsulée dans le cœur lipidique des LNP. Elle doit donc être associée à la surface des LNP. Nous avons opté pour un lien chimique covalent afin d'assurer à terme la délivrance de l'antigène vers les cellules d'intérêt en évitant un relargage prématûr en milieu biologique. Le greffage de l'ovalbumine à la surface des LNP est basé sur la réaction de bioconjugaison thiol-maléimide. En effet, le groupement maléimide réagit spécifiquement avec le groupement thiol à pH neutre 6.5-7.5. Il en résulte une liaison thioéther stable et irréversible, donc non clivable.

Fonctionnalisation de l'ovalbumine : OVA-mal

L'ovalbumine ne présente pas de fonctions maléimides mais contient des acides aminés cystéines portant un groupement thiol généralement sous la forme d'un pont disulfure reliant deux cystéines entre elles. Par crainte d'altérer la conformation spatiale de la protéine et son antigénicité en coupant ce pont disulfure, nous avons choisi d'introduire les fonctions réactives d'une autre manière. L'ovalbumine contient une vingtaine d'acides aminés lysines, dont une dizaine sont accessibles, qui possèdent une terminaison amine primaire qu'il est aisément de transformer en terminaison maléimide.

Pour cela, nous utilisons le sulfo-SMCC (sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate), qui comprend la terminaison maléimide désirée ainsi qu'un groupement sulfo-NHS ester réactif vis-à-vis des amines primaires à pH 7.0-9.0 (Figure IV.2). Afin d'éviter qu'une ovalbumine soit greffée à plusieurs LNP en raison de la présence d'un trop grand nombre de fonctions réactives, le ratio ovalbumine/sulfo-SMCC a été optimisé de sorte de n'insérer qu'un seul groupement réactif maléimide. De cette manière, l'ovalbumine ne subit qu'un minimum de modifications chimiques et conserve son intégrité. Dans le but de quantifier le nombre d'OVA greffées à la surface des LNP, deux réactions de greffages sont réalisées en parallèle, l'une d'entre elles comprenant de l'ovalbumine marquée en fluorescence. Pour cela, de la NHS-fluorescéine est ajoutée à l'OVA-mal afin de fonctionnaliser les terminaisons amines restantes. L'excès de sulfo-SMCC, NHS-fluorescéine et les produits secondaires de réaction sont éliminés par filtration sur gel d'exclusion stérique. Après cette étape de purification, l'OVA-mal diluée est reconcentrée par ultracentrifugation.



Fonctionnalisation de l'ovalbumine

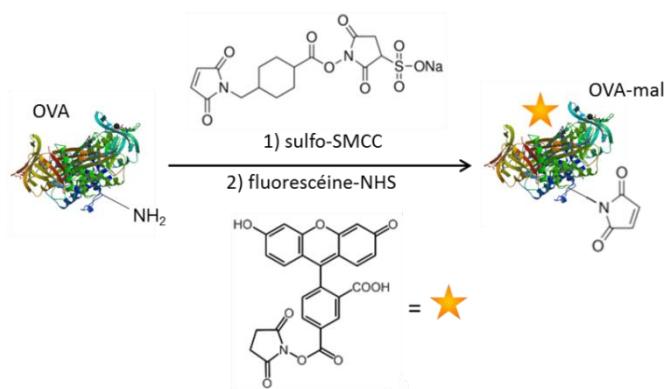


Figure IV.2. Fonctionnalisation de l'ovalbumine.

L'OVA est composée d'acides aminés cystéines et lysines. Deux cystéines peuvent être engagées dans un pont disulfure pour former une cystine. Les terminaisons amines des lysines sont transformées en terminaisons maléimides par réaction avec le sulfo-SMCC. L'OVA est marquée en fluorescence par traitement avec la fluorescéine-NHS.

Fonctionnalisation des LNP : LNP-SH

Afin que les LNP puissent réagir avec l’OVA-mal, nous devons introduire des terminaisons réactives thiols à leur surface. Pour cela, du stéarate-PEG-DTP (DTP : dithiopyridine) est ajouté lors de la formulation des LNP. Cette terminaison DTP consiste en un groupement thiol protégé par un groupement pyridine, qui peut être libéré par réaction avec un agent réducteur tel que le TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) (Figure IV.3). L’avantage d’utiliser le TCEP par rapport à d’autres agents réducteurs est qu’il ne produit pas de thiols libres pouvant entrer en compétition avec les LNP-SH lors de la réaction de greffage.

Fonctionnalisation des LNP

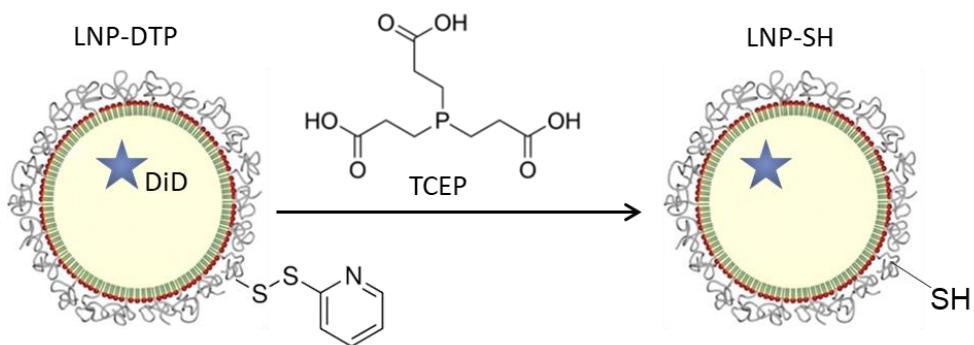


Figure IV.3. Fonctionnalisation des LNP.

Du PEG-DTP est introduit dans la formulation de LNP et la terminaison thiol est déprotégée par réaction avec le TCEP.

L’expérience nous a montré que la réactivité des thiols portés par les LNP-SH diminue progressivement avec le temps (plusieurs semaines). Par conséquent, une solution fraîche de LNP-SH est systématiquement préparée pour chaque couplage avec OVA-mal.

Greffage de l’ovalbumine sur les LNP : LNP-OVA

Les LNP-SH et OVA-mal préalablement préparées sont mélangées par ajout goutte à goutte des LNP-SH dans la solution d’OVA-mal placée dans un bain d’eau glacée et sous agitation magnétique. En effet, l’expérience nous a montré qu’à basse température, la réaction plus lente permet d’obtenir une population plus homogène de particules. La réaction se poursuit encore 1h à température ambiante sous agitation avant la phase de purification (Figure IV.4).

Couplage peptidique LNP-SH + OVA-mal

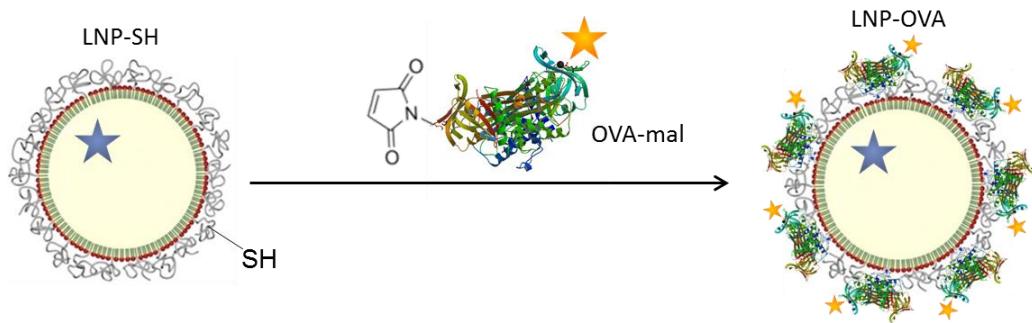


Figure IV.4. Greffage de l’OVA sur les LNP.

La réaction a lieu entre les thiols portés par les LNP et les maléimides portés par l’OVA.

Les LNP-OVA obtenues sont séparées de l’excès d’OVA par chromatographie d’exclusion stérique. Les fractions récoltées sont analysées en fluorescence pour déterminer la répartition des LNP et de l’OVA et vérifier la présence d’une corrélation entre les deux. En l’absence de fonctionnalisation, les deux entités sont parfaitement séparées, comme le montre la purification du mélange LNP + OVA (Figure IV.5 a). Nous obtenons deux pics distincts : les LNP, plus grosses, sont éluées en premier (fractions 1 à 13) puis c’est le tour de l’OVA, plus petite (fractions 17 à 30). En revanche, la purification du mélange LNP-SH + OVA-mal montre que la population d’OVA est répartie en deux pics, l’un deux étant corrélé avec le pic de LNP et l’autre avec le pic d’OVA libre (Figure IV.5 b). Ce résultat confirme que l’OVA est bien greffée à la surface des LNP, la corrélation des deux pics n’étant pas due à une adsorption non spécifique que l’on aurait alors également observée dans le cas de LNP et OVA non fonctionnalisées.

Grâce au profil d’exclusion stérique obtenu, nous pouvons rassembler les fractions contenant les LNP-OVA : dans cet exemple les fractions 1 à 13. De plus, nous pouvons déterminer le rendement de la réaction de greffage ainsi que le nombre d’OVA par particule (voir *calcul partie expérimentale section VII.2.3 p.244*). Dans cet exemple, pour 1.2 mg d’OVA et 38 mg de LNP introduits, nous obtenons un rendement d’OVA de 50 % et un rendement de LNP de 93 % soit un taux de charge de 1.69 % massique et 65 OVA/LNP.

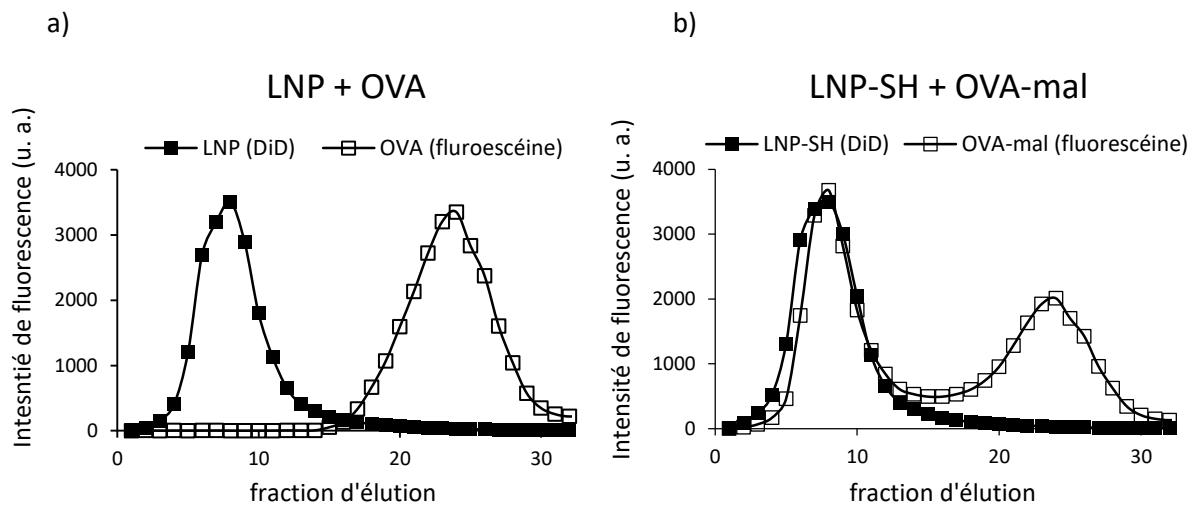


Figure IV.5. Purification des LNP-OVA par chromatographie d'exclusion stérique

a) Les entités non fonctionnalisées restent séparées. b) un lien covalent a été créé entre les LNP et l'OVA fonctionnalisés, visible par la corrélation entre le pic de LNP(DiD) et l'un des pics d'OVA(fluorescéine).

Nous avons également caractérisé ces particules greffées en taille et charge de surface, afin de les comparer aux LNP nues (Table IV.2). Le greffage d'OVA à la surface des LNP augmente en moyenne le diamètre hydrodynamique de 13 nm et abaisse la charge de surface d'environ 3 mV. Ces variations sont cohérentes avec l'ajout d'une couche d'OVA à la surface des LNP. En effet, l'OVA est greffée aux LNP par l'intermédiaire de PEG fonctionnalisés dont la chaîne est plus longue que la couche de PEG stabilisant les LNP. En raison de ce décalage, auquel s'ajoute la taille de l'OVA de quelques nanomètres, il est attendu que les LNP-OVA soient légèrement plus grosses que les LNP nues. Nous observons également une augmentation du PDI de 0.14 ± 0.02 à 0.20 ± 0.02 , ce qui traduit une diminution de l'homogénéité de la suspension colloïdale. Cette variation peut être due à un manque d'homogénéité de la densité d'OVA à la surface des LNP, certaines LNP portant plus de protéines que d'autres. D'autre part, le point isoélectrique de l'OVA est en moyenne de 4,5 ce qui implique qu'à pH neutre la protéine est chargée négativement. Cela explique la diminution de potentiel zéta observée lors du greffage d'OVA à la surface des LNP.

Formulation	Nb de lots	D_h (nm)	PDI	Zéta à pH 7.0 (mV)
F80	28	73 ± 3	0.14 ± 0.02	-5.0 ± 1.0
F80-OVA	15	86 ± 6	0.20 ± 0.03	-8.1 ± 1.3

Table IV.2. Diamètre hydrodynamique et potentiel zéta moyens des LNP-OVA et LNP de base.

c. Etude de la stabilité du greffage

Après avoir préparé ces LNP greffées avec l’OVA, nous avons contrôlé la stabilité colloïdale des particules obtenues, afin de vérifier que celle-ci n'est pas affectée par le greffage. Nous avons donc évalué la taille des LNP-OVA par DLS après 16 semaines de stockage et comparé le profil obtenu à celui réalisé immédiatement après le greffage (*Figure IV.6*). La superposition des profils de taille montre que les LNP-OVA sont stables et ne s’agrègent pas dans le laps de temps étudié.

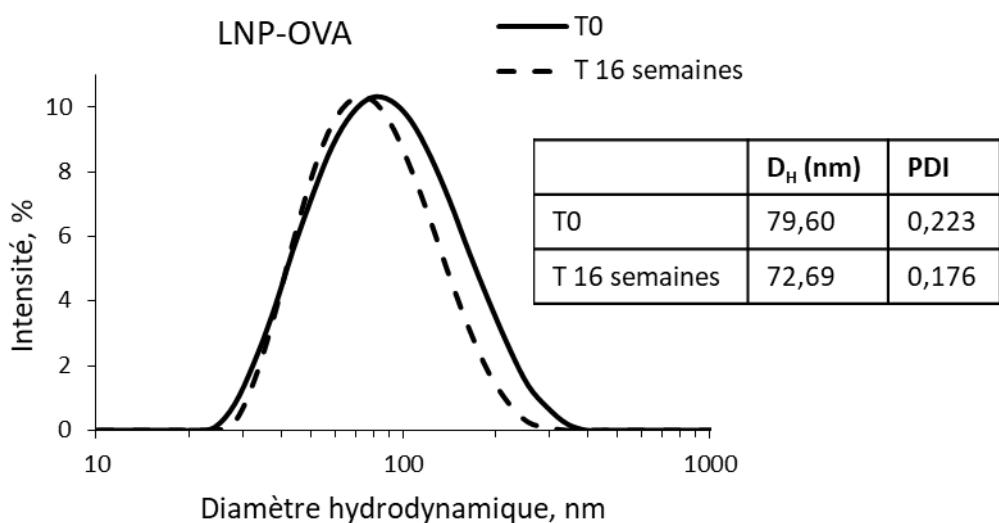


Figure IV.6. Stabilité colloïdale des LNP-OVA.

Superposition des profils de taille de LNP-OVA mesurés par DLS le jour de la formulation et 16 semaines après conservation à 4°C.

La stabilité des LNP-OVA préparées concerne également le lien entre les LNP et l’OVA. Bien qu'il s'agisse d'un lien chimique covalent, nous avons vérifié que les LNP ne relarguent pas l’OVA prématurément au cours du stockage. Ce point a été contrôlé en filtrant de nouveau les LNP-OVA par chromatographie d'exclusion stérique après plusieurs semaines de stockage (*Figure IV.7*). Dans cet exemple, nous avons superposé les profils d'exclusion stérique obtenus lors de la purification du greffage de l’OVA sur les LNP et 9 semaines après ce greffage. Lors du greffage (carrés noirs), les fractions 1 à 12 contenant les LNP-OVA ont été rassemblées. Lors de la deuxième purification de ces fractions (carrés blancs), nous n’observons pas le pic caractéristique de l’OVA libre (entre les fractions 20 à 30), ce qui confirme la stabilité du greffage de l’OVA sur les LNP.

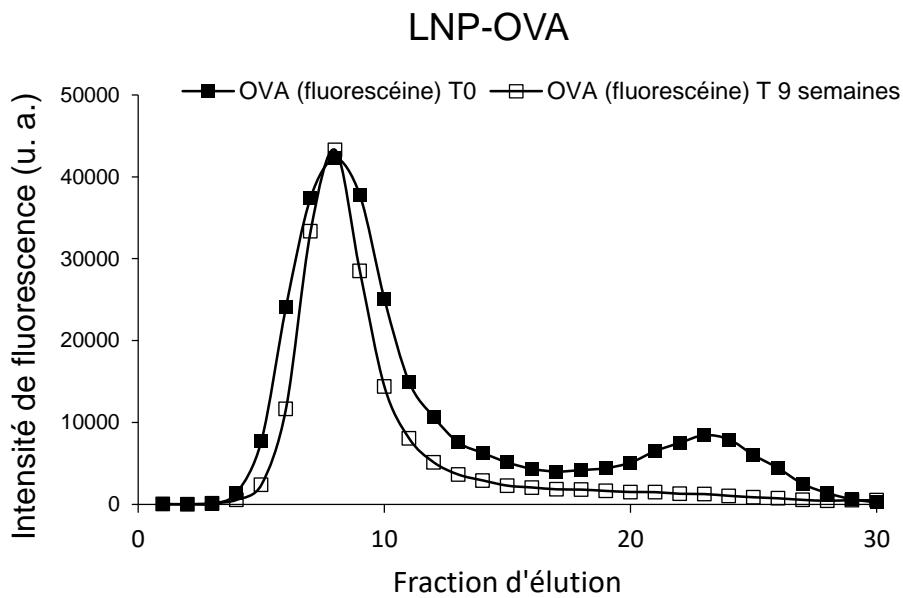


Figure IV.7. Stabilité du greffage de l’OVA.

Superposition des profils de LNP-OVA mesurés par chromatographie d’exclusion le jour du greffage et 9 semaines après conservation à 4°C.

La formulation de LNP pour le greffage d’OVA est une manipulation maîtrisée et réalisée en routine au laboratoire. Les lots obtenus sont bien caractérisés en taille et charge de surface et font montre d’une grande stabilité, d’un point de vue colloïdal et concernant le lien entre LNP et OVA. Les LNP-OVA sont donc prêtes pour être testées en biologie cellulaire.

IV.1.2 Etude de l’impact des LNP sur des cellules

a. Evaluation de la toxicité des formulations préparées

Dans un premier temps, nous avons contrôlé la cytotoxicité des formulations de LNP préparées *in vitro*. Nous avons pour cela choisi une lignée de fibroblastes (NIH/3T3), qui sont un standard pour des expériences de cytotoxicité. En effet, les fibroblastes sont répartis dans la majorité des tissus de l’organisme et ne sont pas particulièrement résistantes, comme le sont les cellules immunitaires par exemple. Les cellules ont été exposées à une large gamme de concentrations de LNP, variant de 100 µg/mL jusqu’à 1.5 mg/mL, pendant 24h. Nous avons ensuite mesuré l’apoptose et la nécrose des cellules induites par les LNP. L’apoptose est la mort programmée de la cellule et permet en général de maintenir un équilibre avec la prolifération cellulaire, nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. L’apoptose peut aussi parfois être provoquée par un stimulus externe qui perturbe le fonctionnement de la cellule. Lors de l’apoptose, la membrane cellulaire demeure intacte. La

phosphatidylsérine est un constituant de la membrane cellulaire, normalement orienté vers l'intérieur de la cellule. Lorsque celle-ci rentre en apoptose, la phosphatidylsérine bascule vers l'extérieur de la cellule. Nous pouvons donc détecter l'état apoptotique d'une cellule en mesurant la présence de phosphatidylsérine à sa surface. Pour cela, nous utilisons la protéine annexine V, couplée au fluorophore FITC (fluorescein Isothiocyanate), qui a une grande affinité pour la phosphatidylsérine. A l'inverse de l'apoptose, la nécrose de la cellule est caractérisée par une perte de l'intégrité membranaire. Nous pouvons donc l'évaluer en utilisant l'iodure de propidium, qui est un agent intercalant de l'ADN fluorescent.

Dans cette expérience, nous avons représenté la proportion de cellules viables, en apoptose et en nécrose (*Figure IV.8*). Sur toute la gamme de concentration étudiée, la proportion de cellules viables demeure majoritaire par rapport aux cellules mortes. A la concentration de LNP la plus élevée (1.5 mg/mL), 72 % des cellules sont saines, par rapport à 89 % lorsque les cellules ne sont pas exposées aux LNP. La légère diminution de la proportion de cellules viables correspond à une augmentation de la proportion de cellules en apoptose, de 10 % à 27 %. En revanche, le nombre de cellules nécrosées est constant tout au long de l'étude (1 %). Ces résultats montrent que les LNP sont très bien tolérées par les fibroblastes.

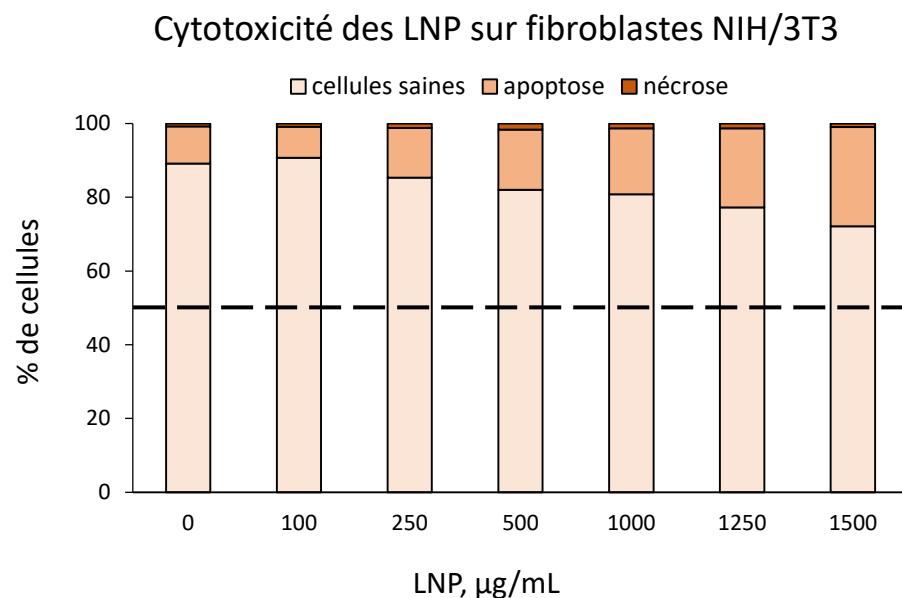


Figure IV.8. Cytotoxicité des LNP sur des fibroblastes NIH/3T3 après une exposition de 24h.

b. Evaluation de la présentation de l'antigène par les DC

Les LNP ont été conçues pour délivrer l'OVA aux cellules présentatrices d'antigène et initier la réponse immunitaire. L'étape clé qui conditionne l'induction des réponses immunitaires est la présentation de l'antigène par les DC aux LT. Une structure particulière est généralement admise comme étant un prérequis pour qu'un antigène synthétique soit efficacement capturé et présenté par les cellules professionnelles¹⁸⁹. Nous avons donc étudié l'avantage conféré par les LNP sur la présentation de l'antigène à l'aide d'une expérience modèle *in vitro*.

Lorsqu'un antigène synthétique est capturé par une cellule dendritique, le processus « classique » conduit à une présentation de peptides antigéniques sur le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). Cette présentation est adressée aux LT CD4, dits auxiliaires, qui orchestrent la réponse immunitaire en fonction de l'antigène qui leur a été présenté (*voir introduction section I.2.3a p.43*). Nous réalisons cette expérience à l'aide de souris transgéniques OT-II, dont les LT CD4 reconnaissent spécifiquement l'OVA présentée sur le CMH-II³³⁵. Ces souris constituent de fait un outil idéal pour des expériences de présentation d'antigène car leur spécificité pour l'OVA augmente la sensibilité du test et permet de comparer plusieurs formulations différentes³³⁶. Pour cette expérience, nous utilisons des DC primaires, et non de lignée, prélevées de la moelle osseuse de souris C57/BL6 et cultivées pendant 10 jours pour arriver à maturité (*voir partie expérimentale section VII.3.1b p.248*). Une fois que les DC sont prêtes, elles sont exposées à différentes formulations d'OVA, libre ou vectorisée, co-administrées avec un immunostimulant, pendant 6h. Pendant ce temps, les LT CD4 sont purifiés à partir de splénocytes issus de la rate d'une souris OT-II (*voir partie expérimentale section VII.3.1c p.249*). Les LT sont ensuite ajoutés aux DC stimulées et co-cultivés pendant 4 jours. Voici ce qui est supposé se passer : les DC sont activées par l'immunostimulant et capturent l'OVA. L'antigène est alors traité par les DC comme un danger et dégradé en peptides antigéniques dans les vésicules de l'endosome pour être ensuite présenté sur le CMH-II. Les LT CD4 destinataires de ce signal se lient à l'antigène via leur TCR, ainsi qu'au CMH-II via leur récepteur CD4 et au marqueur d'activation CD80 ou CD86 via leur marqueur CD28. Ce co-signal induit l'activation des LT, qui en retour sécrètent des cytokines. Après la fin de la co-culture des DC et LT, nous collectons les surnageants dans lesquels se trouvent les cytokines sécrétées, que nous pouvons mesurer par un dosage ELISA.

Nous avons profité de cette expérience pour affiner le protocole expérimental en comparant deux méthodes. Dans le premier cas, les LT sont ajoutés directement aux DC stimulées par les formulations d'OVA. Dans le deuxième cas, les DC stimulées sont lavées au PBS avant d'être co-

cultivées avec les LT, afin de retirer les composés immunogènes résiduels (antigène, LNP, immunostimulant). Les protocoles trouvés dans la littérature privilégient la première technique (DC + LNP + LT), mais nous souhaitons aussi tester la deuxième technique (DC + LNP puis DC + LT) dans laquelle les LT ne sont jamais directement en contact avec les formulations d'OVA. Nous avons choisi de doser la sécrétion d'IFN γ par les LT qui traduit leur différenciation en Th1. Trois doses d'OVA, libre ou vectorisée, ont été testées (0.1, 0.5 et 2.5 μ g/mL) en co-administration avec 2 μ g de LPS comme signal de danger (Figure IV.9).

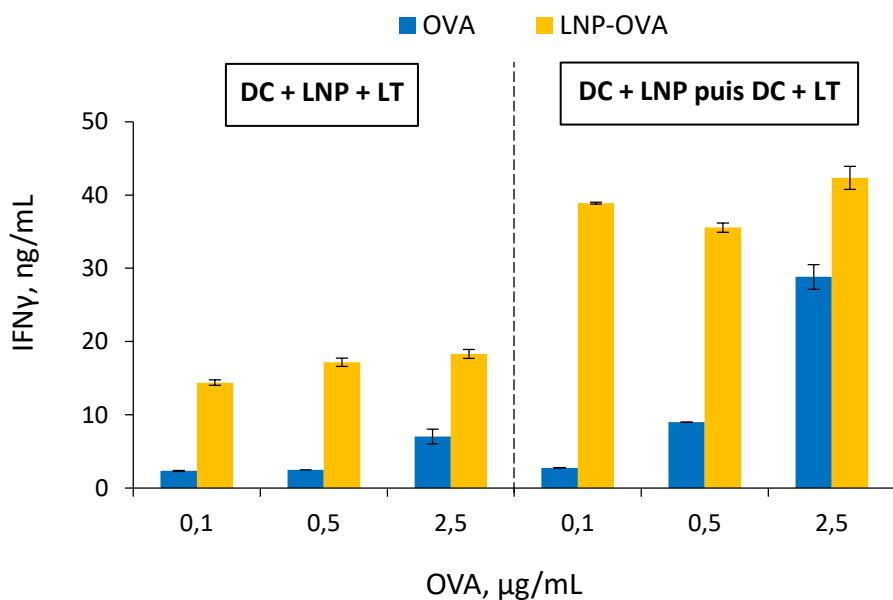


Figure IV.9. Présentation de l'antigène par les DC aux LT issus d'OT-II.

Production d'IFN γ en réponse à la présentation de l'OVA par les DC aux LT. Comparaison de la méthode et de la formulation antigénique.

Les résultats montrent tout d'abord une différence nette dans l'amplitude de la réponse en raison de la méthode choisie. La deuxième technique, selon laquelle les DC sont lavées avant d'être cultivées avec les LT, produit une réponse en moyenne 3 fois supérieure à la première technique qui consiste à ajouter les LT directement aux DC. Ce résultat surprenant n'est pas lié aux LNP car il est également visible dans les échantillons stimulés avec l'OVA libre. Cette observation semble indiquer un effet inhibiteur de la formulation antigénique sur les LT. Malgré cette différence d'amplitude, les tendances et ratios entre les différents échantillons sont conservés. L'OVA est bien mieux présentée par les DC aux LT lorsqu'elle est vectorisée par les LNP. La sécrétion d'IFN γ atteint un plateau maximum aux 3 doses testées, malgré la concentration croissante de LNP-OVA. A l'inverse, la sécrétion d'IFN γ en réponse à la présentation de l'OVA libre augmente avec la concentration d'OVA.

Cette expérience démontre l'utilité de vectoriser l'OVA via les LNP pour améliorer la présentation de l'antigène. En effet, avec la deuxième méthode (DC + LNP puis DC + LT) et à la plus faible dose d'OVA (0.1 µg/mL), la production d'IFNy est augmentée d'un facteur 13 grâce à la vectorisation de l'OVA par les LNP. Lors de nos futures expériences, la deuxième méthode (DC + LNP puis DC + LT) sera systématiquement employée.

Ces résultats préliminaires *in vitro* très prometteurs quant à l'impact des LNP sur l'immunogénicité de l'OVA justifient l'étude *in vivo* des réponses immunitaires induites par les formulations de LNP.

IV.1.3 Evaluation des réponses immunitaires *in vivo*

Nous avons ensuite évalué *in vivo* le potentiel des LNP-OVA à induire des réponses immunitaires spécifiques. Nous avons pour cela choisi le modèle murin, fréquemment utilisé comme premier modèle animal dans les études de formulations vaccinales.

Nous avons déterminé l'immunogénicité de nos différentes formulations de LNP en réalisant des campagnes d'immunisation sur des groupes de souris. Le planning comprend deux injections intra-péritonéales à 3 semaines d'intervalle (*Figure IV.10*). Les formulations sont administrées avec des doses constantes de 10 µg d'OVA et 10 µg d'immunostimulant par injection. Entre 7 et 10 jours après la deuxième injection (boost), les souris sont euthanasiées pour prélever le sang et doser par ELISA les anticorps sécrétés dans le sérum.

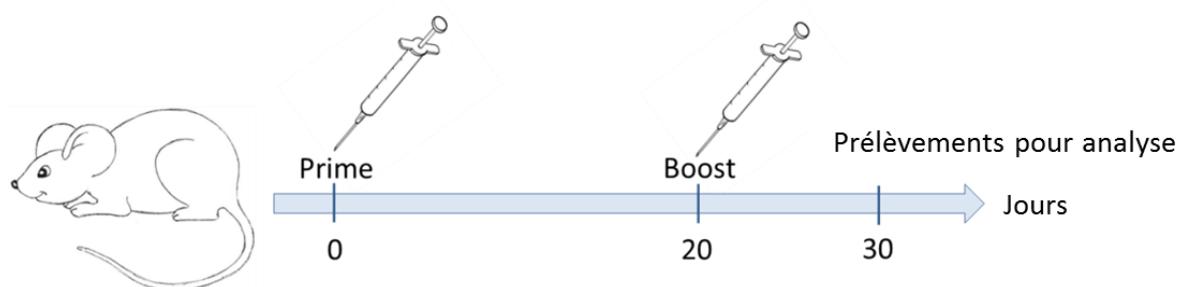


Figure IV.10. Schéma représentant le planning d'immunisation des souris.

L'utilisation de souris pour nos expériences a fait l'objet d'une demande officielle auprès du ministère (*voir partie expérimentale section VII.5.1 p.253*). L'ensemble des expériences a été réalisé dans le respect de la règle des 3 R : « Replace, Reduce, Refine ». Les groupes de souris ont été

réfléchis afin de prévoir un nombre rationnel d'animaux, permettant de réaliser des comparaisons statistiques entre les groupes avec un nombre minimal d'animaux.

L'enjeu est de confirmer *in vivo* l'intérêt de vectoriser un antigène par les LNP. Nous avons réalisé une campagne d'immunisation composée de 9 groupes de 3 à 6 souris. Parmi ces 9 groupes, on décompte :

- 3 groupes contrôles comprenant les différentes combinaisons possibles d'OVA et de LNP
- les 3 mêmes groupes adjuvantés avec du MPLA
- 3 groupes adjuvantés avec du LPS comparant 2 taux de charge d'OVA sur les LNP.

La production d'anticorps spécifiques de l'OVA en réponse aux immunisations des souris avec ces différentes formulations d'OVA a été dosée dans le sérum des souris par ELISA en comparaison avec une gamme étalon réalisée avec un anticorps standard (*voir partie expérimentale section VII.5.3 p.254*).

Pour plus de clarté, nous avons représenté séparément sur plusieurs graphes les groupes comparés. Le premier point étudié est l'effet de la vectorisation de l'OVA par les LNP, sans immunostimulant tout d'abord puis en co-administration avec l'immunostimulant MPLA ensuite (*Figure IV.11*).

En l'absence d'immunostimulant, la vectorisation de l'OVA sur les LNP favorise la production d'anticorps spécifiques dans 2 souris sur 5, mais cette différence n'est pas significative. Ce résultat nous indique que LNP n'ont pas de propriétés immunostimulantes intrinsèques. Or, un signal de danger est indispensable à l'induction de réponses immunitaires. Lorsque l'on ajoute l'immunostimulant MPLA aux formulations, la production d'anticorps est fortement augmentée et l'écart entre les groupes contenant l'OVA libre et l'OVA vectorisée se creuse de manière significative avec une augmentation d'un facteur 11.5 en moyenne (*LNP-OVA + MPLA : 449 ± 77 µg/mL, p<0.001 par rapport aux groupes OVA + MPLA : 37 ± 16 µg/mL et LNP + OVA + MPLA : 41 ± 17 µg/mL*). L'effet observé est exclusivement dû à la délivrance de l'OVA par les LNP, et non à la simple présence des LNP dans la formulation, puisqu'aucune différence n'est observée entre les 2 groupes contenant l'OVA libre (OVA + MPLA vs LNP + OVA + MPLA). La comparaison de ces groupes nous permet de conclure sur l'utilité de vectoriser l'OVA par les LNP ainsi que la nécessité d'ajouter un immunostimulant dans la formulation vaccinale.

Effet de la vectorisation

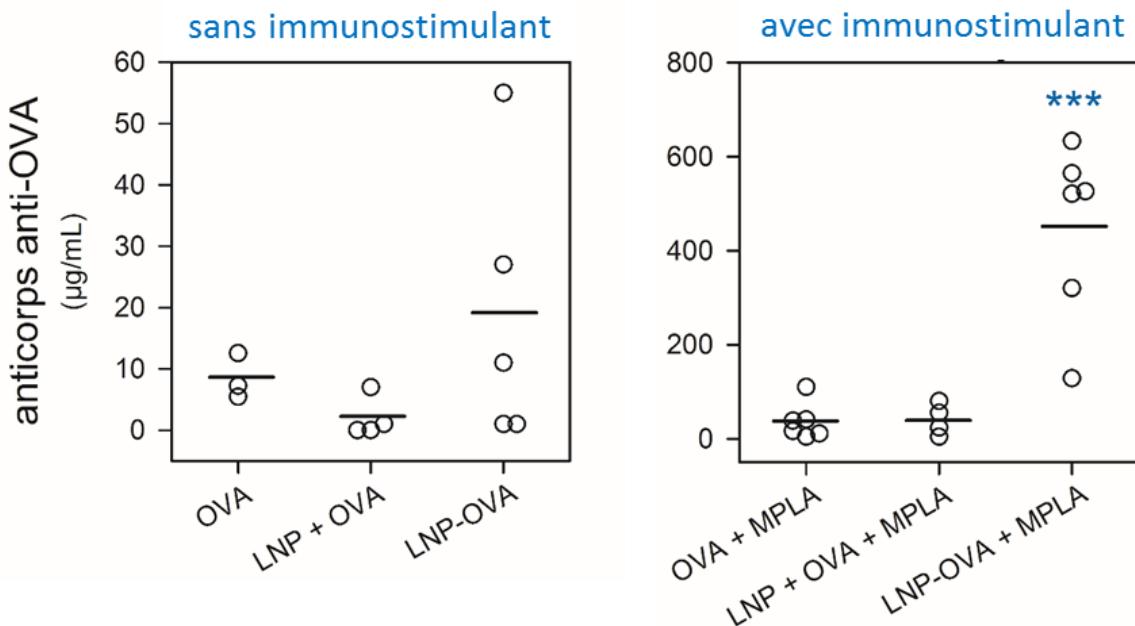


Figure IV.11. Analyse de la réponse humorale anti-OVA et intérêt de la vectorisation de l’OVA.

Production d’anticorps spécifiques de l’OVA en réponse à des immunisations de souris avec des formulations comprenant l’OVA sous forme libre ou vectorisée, co-administrée ou non avec l’immunostimulant MPLA. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe. Analyse statistique ANOVA-1 suivie du test de Fisher. *** $p < 0.001$.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé la combinaison de l’OVA avec les immunostimulants MPLA ou LPS, ainsi que le taux de charge de l’OVA sur les LNP. Le MPLA et le LPS sont tous deux des ligands du TLR-4 exprimé entre autres par les cellules présentatrices d’antigène. Le LPS nous sert ici de référence car très immunogène, peu coûteux et facile à manipuler. Le MPLA est un dérivé synthétique du LPS, modifié pour réduire sa toxicité et permettre son utilisation chez l’homme (*voir introduction section II.2.1b p.63*). En revanche, le MPLA est plus délicat à manipuler en raison de sa faible solubilité en milieu aqueux. La comparaison de ces deux immunostimulants fournit des résultats très similaires, avec une production d’anticorps du même ordre de grandeur (*Figure IV.12 a*). L’utilité de vectoriser l’OVA sur les LNP est de nouveau confirmée avec l’immunostimulant LPS, bien que l’écart entre les groupes soit moindre (*LNP-OVA + LPS : 413 ± 68, p = 0.004 par rapport au groupe LNP + OVA + LPS : 98 ± 40 µg/mL*).

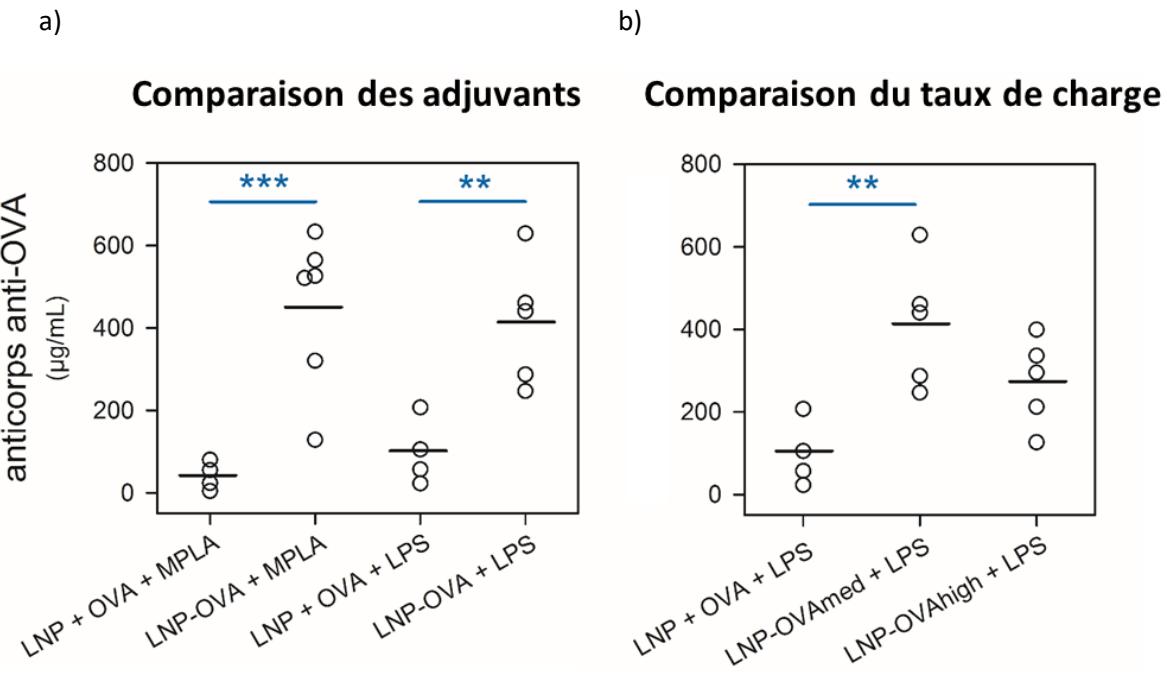


Figure IV.12. Analyse de la réponse humorale anti-OVA et comparaison des immunostimulants.

Production d'anticorps spécifiques de l'OVA en réponse à des immunisations de souris avec des formulations comprenant a) l'OVA sous forme libre ou vectorisée co-administrée avec l'immunostimulant MPLA ou LPS et b) avec différents taux de charge d'OVA. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe. Analyse statistique ANOVA-1 suivie du test de Fisher. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

Pour la comparaison du taux de charge de l'OVA sur les LNP, nous avons préparé deux formulations de LNP-OVA : l'une avec un taux de charge de 48 OVA/LNP et l'autre avec un taux de charge de 88 OVA/LNP (Table IV.3). Les LNP-OVA obtenues ont été administrées aux souris avec du LPS (Figure IV.12 b) en comparaison au groupe référence avec l'OVA libre. Bien que la différence entre les deux groupes de LNP-OVA soit non significative, la réponse anticorps obtenue avec le taux de charge moyen est augmentée d'un facteur 1.5 par rapport au taux de charge élevé. De plus, seul le groupe contenant les LNP-OVAméd améliore significativement la production d'anticorps par rapport au groupe contrôle. Ce résultat est compréhensible, car nous administrons aux souris une dose constante d'OVA. Or, les LNP-OVA étant préparées avec différents taux de charge, la quantité de LNP administrée n'est donc pas la même. Concrètement, les LNP-OVAméd sont des particules plus faiblement chargées en OVA que les LNP-OVAhig donc il est nécessaire d'administrer un plus grand nombre de LNP-OVAméd que de LNP-OVAhig pour atteindre la même dose d'OVA. En injectant un plus grand nombre de LNP, l'OVA est délivrée en plus petite quantité à un plus grand nombre de cellules, donc d'une certaine manière un plus grand nombre de cellules seraient activées (Table IV.3).

Ce raisonnement est a priori valable jusqu'à une certaine limite. En effet, nous pourrions penser qu'il suffit de diminuer autant que possible le taux de charge d'OVA à la surface des LNP afin de délivrer l'antigène à un maximum de cellules. Cependant, nous ne connaissons pas la dose minimale d'OVA qu'il est nécessaire d'administrer à une même cellule pour qu'elle soit correctement activée. Pour les expériences suivantes, nous conserverons donc un taux de charge moyen d'environ 50 OVA/LNP.

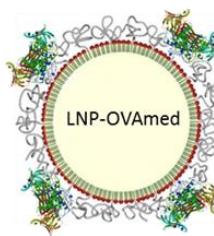
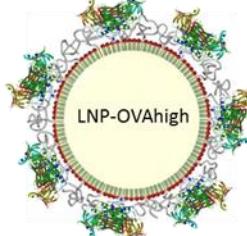
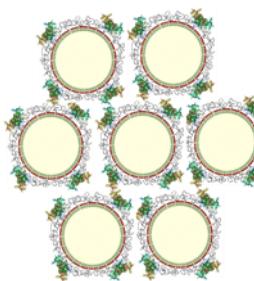
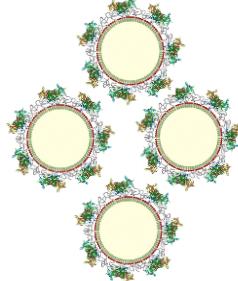
	LNP-OVAméd	LNP-OVAhig
Taux de charge (nombre d'OVA/LNP)	48	88
Taux de charge (% massique)	1.26	2.30
Représentation d'une LNP-OVA		
Représentation d'une solution de 10 µg de LNP-OVA		

Table IV.3. Taux de charge des LNP-OVAméd et LNP-OVAhig.

Grâce à l'ensemble de ces résultats, nous avons pu confirmer l'intérêt de délivrer l'OVA aux cellules immunitaires via les LNP. Ces LNP jouent uniquement le rôle de vecteur et n'ont pas de propriétés immunostimulantes en elles-mêmes. Il est donc nécessaire de les associer à un immunostimulant afin de délivrer le signal de danger nécessaire à l'activation des cellules présentatrices d'antigène. En effet, lorsqu'elles sont combinées à un immunostimulant tel que le MPLA, les LNP-OVA induisent une production d'anticorps spécifique plus de 10 fois supérieure à celle obtenue avec de l'OVA libre. Le MPLA s'est montré au moins aussi efficace, si ce n'est plus, que le LPS à induire ce signal de danger. Enfin, le taux de charge de l'OVA sur les LNP semble avoir un effet sur la réponse humorale, un taux de charge plus faible permettant de délivrer l'antigène à un plus grand nombre de cellules immunitaires.

IV.2 Etude de l'effet de la taille du vecteur sur l'immunogénicité de l'OVA

A présent que nous avons confirmé l'intérêt de vectoriser l'OVA par les LNP, nous pouvons étudier plus en détail certains paramètres des formulations. La taille des LNP est le premier paramètre étudié car cet élément essentiel a souvent été décrit comme jouant un rôle important dans l'induction des réponses immunitaires^{173,174,177,337}. En particulier, la littérature décrit souvent que la taille idéale de vecteurs pour la délivrance d'antigène est inférieure à 50 nm^{169,173,337}. Nous avons donc choisi de poursuivre notre recherche de la taille optimale des LNP en testant des particules de 50 nm et en conservant les particules de 80 et 120 nm comme contrôles. Cette étude de différentes tailles de LNP a été l'objet du stage de M2 de José Manuel Garcia de la Fuente sous ma supervision.

IV.2.1 Formulation de LNP de tailles différentes

Des LNP de tailles différentes sont obtenues en ajustant le ratio entre les différents composants des particules³²⁰. En effet, plus la proportion de composés organiques augmente par rapport à la proportion de composés aqueux, plus la taille des particules est grande. Les particules préparées de 50 nm, 80 nm et 120 nm sont notées respectivement F50, F80 et F120 (*voir masses exacte partie expérimentale section VII.1.1 p.236*). La taille et le potentiel zéta des particules ainsi que le nombre total de particules contenues dans un lot selon la taille sont résumés dans la *Table IV.4*. Le PDI des différentes formulations reste relativement faible, entre 0.10 ± 0.03 et 0.14 ± 0.02 , ce qui montre l'homogénéité des suspensions de particules. Le potentiel zéta varie très peu et reste aux alentours de -5 à -6 mV.

Formulation	Nb LNP / lot	Nb de lots	Taille (nm)	PDI	Potentiel Zéta à pH 7.0 (mV)
F50	1.09×10^{16}	4	52 ± 1	0.11 ± 0.03	-6.5 ± 0.7
F80	2.70×10^{15}	28	73 ± 3	0.14 ± 0.02	-5.0 ± 1.0
F120	9.05×10^{14}	5	117 ± 4	0.10 ± 0.03	-6.2 ± 0.5

Table IV.4. Valeurs moyennes et écarts-types de la taille, le PDI et le potentiel zéta des différentes particules étudiées.

Le greffage de l'OVA sur les LNP de différentes tailles se déroule exactement selon le même mode opératoire (*voir partie expérimentale section VII.1.3 p.239*). Les 3 lots de LNP-OVA ont été préparés avec un taux de charge massique équivalent aux alentours de 0.9 % (*Table IV.5*), afin de pouvoir

comparer les performances des particules entre elles. Ce taux de charge correspond à un nombre d’OVA par LNP différent selon la taille de LNP. Ainsi, les F50-OVA portent 10 OVA/LNP, les F80-OVA portent 35 OVA/LNP et les F120-OVA portent 100 OVA/LNP.

	F50-OVA	F80-OVA	F120-OVA
Taux de charge (% massique)	0.97	0.85	0.83
Taux de charge (nombre d’OVA/LNP)	10	35	100
Nombre de LNP pour 10 µg d’OVA	1.50×10^{13}	3.84×10^{12}	1.29×10^{12}

Table IV.5. Taux de charge des LNP-OVA préparées en fonction de leur taille.

IV.2.2 Evaluation des interactions LNP/cellules

Nous avons profité de ces nouvelles formulations de LNP variant par leur taille pour caractériser plus finement les interactions des LNP avec les cellules *in vitro* et *in vivo*. L’objectif est de retracer le cheminement qui mène à l’induction des réponses immunitaires et en décomposer les étapes principales. Nous avons ainsi contrôlé la cytotoxicité de ces nouvelles particules puis évalué l’impact de leur taille sur la capture cellulaire. Nous avons également analysé par imagerie de fluorescence le devenir des LNP *in vivo*, puis quantifié leur capture par les DC issues des ganglions lymphatiques. Enfin, nous avons comparé les différentes tailles de LNP lors de la présentation de l’antigène sur le CMH-II ou le CMH-I.

a. Evaluation *in vitro* de la cytotoxicité des LNP

Dans cette étude nous évaluons la cytotoxicité des LNP-OVA de différentes tailles ainsi que celle de leurs analogues non greffées. Pour cela, nous avons sélectionné les cellules avec lesquelles nous allons réaliser la majeure partie des expériences *in vitro*, à savoir les DC (JAWSII) et les macrophages (J774). Nous avons cette fois-ci mesuré la mort cellulaire globale en utilisant le marqueur 7-AAD, qui est également un intercalant de l’ADN fluorescent et fonctionne donc sur le même principe que l’iodure de propidium.

La cytotoxicité des LNP nues a été évaluée sur une gamme de concentration variant de 0.1 jusqu’à 5 mg/mL. Les résultats montrent que la taille des LNP a très peu d’effet sur leur cytotoxicité, qui demeure très similaire pour les F50, F80 et F120, sur les DC comme sur les macrophages

(Figure IV.13). D'après nos résultats, la concentration de particules qui induit la mort de 50 % des cellules (IC50), est atteinte aux alentours de 2 mg/mL de LNP ou plus. Nous retenons cette concentration maximale pour l'étude de cytotoxicité des LNP-OVA. Le greffage de l'OVA sur les LNP, quelle que soit leur taille, n'affecte pas leur cytotoxicité, qui conserve le même profil en fonction de la concentration des LNP. L'IC50 se trouve également aux alentours de 2 mg/mL de LNP. Pour nos autres expériences *in vitro*, les LNP sont généralement utilisées à une concentration inférieure à 500 µg/mL. Or à cette concentration, plus de 80 % des cellules sont viables. L'ensemble de ces résultats confirme donc l'innocuité des LNP et LNP-OVA, quelle que soit leur taille.

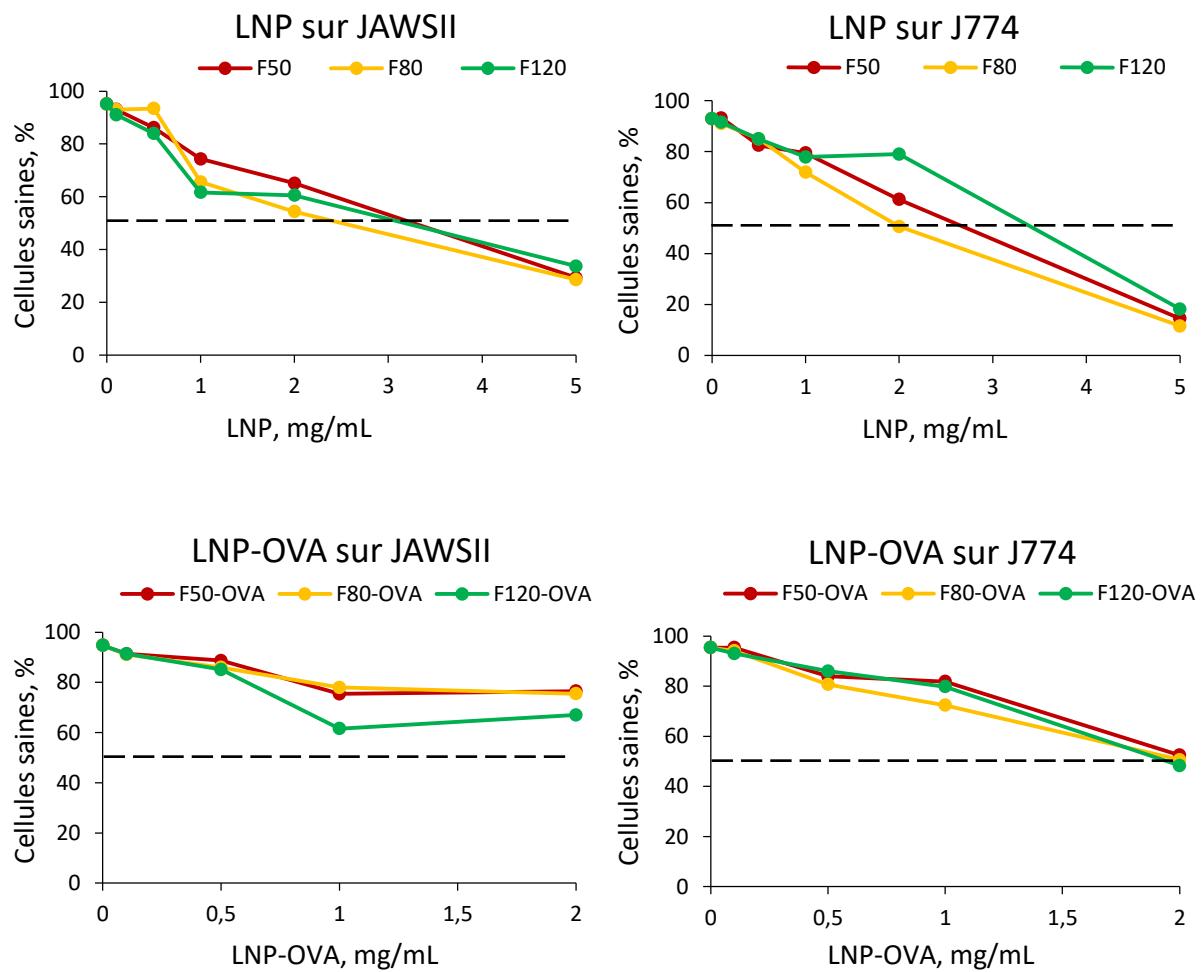


Figure IV.13. Cytotoxicité des LNP et LNP-OVA en fonction de leur taille.

Cytotoxicité mesurée sur des DC JAWSII et macrophages J774 après une exposition de 24h.

b. Evaluation *in vitro* de l'activation des DC par les LNP

De par leur composition, les LNP n'ont pas de propriétés immunostimulantes, ce que nous avons observé *in vivo* lors de la première campagne d'immunisation. Nous avons voulu confirmer ce point *in vitro* en vérifiant que la taille des LNP n'influe pas sur l'activation des DC. Les DC (JAWSII) ont pour cela été exposées aux différentes formulations de LNP et LNP-OVA pendant 24h et sur une gamme de concentration variant de 100 µg/mL à 5 mg/mL. Le dernier point à 5 mg/mL n'a pas été réalisé pour les LNP-OVA car elles sont en moyenne 5 fois moins concentrées que les LNP et cela impliquerait une dilution trop importante des cellules. Nous avons quantifié l'activation des DC par leur expression du marqueur CD86 en cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps fluorescent (*Figure IV.14*).

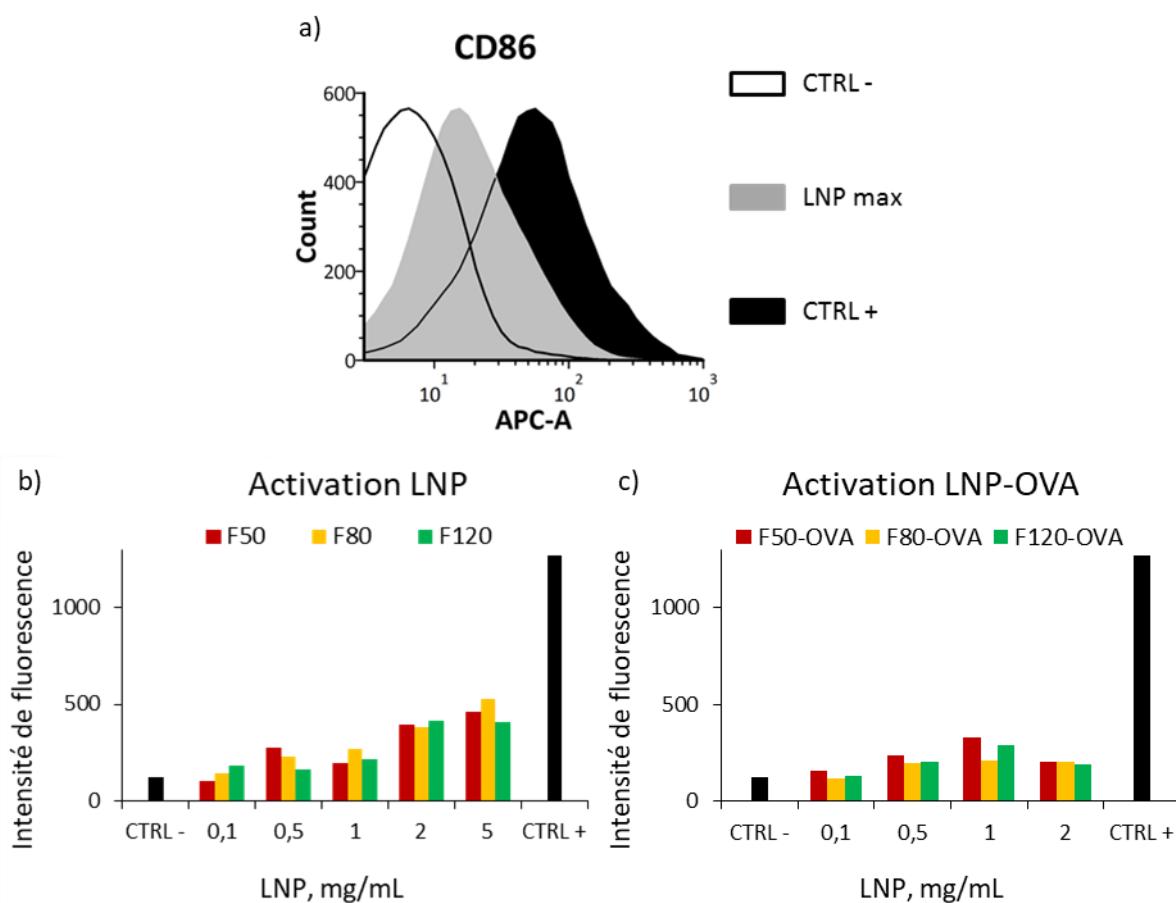


Figure IV.14. Activation des DC par les LNP.

a) Intensité de fluorescence du marquage CD86 sur les DC JAWSII après une exposition de 24h à 5 mg/mL de F80. Le contrôle positif a été réalisé avec 2 µg/mL de LPS et le contrôle négatif correspond aux cellules non traitées. Intensité de fluorescence du marquage CD86 sur les DC après une exposition de 24h à différentes doses de b) LNP ou c) LNP-OVA.

Les résultats montrent que l'activation des DC par les LNP est relativement limitée. L'expression du marqueur d'activation CD86 augmente progressivement avec la concentration des LNP. A la concentration maximale de 5 mg/mL de LNP, les DC sont 2 fois moins activées que le contrôle positif réalisé avec 2 µg/mL de LPS. En revanche, l'activation des DC progresse moins rapidement pour les LNP-OVA que pour les LNP, ce qui indique que la couche d'OVA à la surface des LNP atténue peut-être cet effet activateur. A la concentration de travail, inférieure à 500 µg/mL de LNP, l'activation des DC demeure faible, 5 fois inférieure au contrôle positif. Nous n'observons de plus aucune différence entre les différentes tailles de LNP et LNP-OVA. Ces résultats confirment que les LNP n'ont pas de propriétés immunostimulantes et qu'elles ont un comportement inerte vis-à-vis des DC.

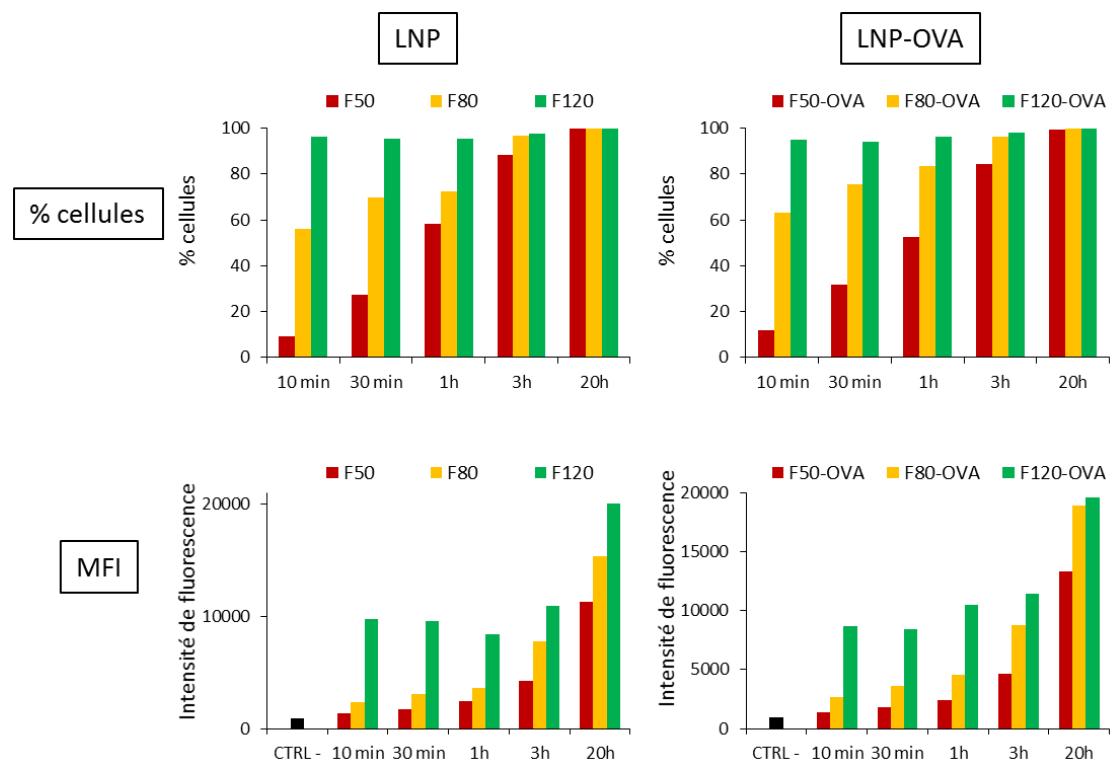
c. Evaluation *in vitro* de la cinétique de capture des LNP par les DC

Le rôle des LNP est de délivrer l'antigène qu'elles transportent aux cellules présentatrices d'antigène afin d'initier une réponse immunitaire spécifique contre l'antigène en question. L'antigène étant greffé à la surface des LNP avec un lien covalent, sa délivrance nécessite que les LNP soient capturées et internalisées par les cellules présentatrices d'antigène. Nous nous sommes donc intéressés à la cinétique de capture *in vitro* des LNP et LNP-OVA de différentes tailles par des DC. Les cellules (JAWSII) ont donc été exposées à une dose de 100 µg/mL de LNP et LNP-OVA fluorescentes pendant des durées variant de 10 min à 20h. Les suspensions cellulaires ont ensuite été analysées en cytométrie de flux afin de quantifier la présence de LNP fluorescentes à l'intérieur des DC.

Les résultats sont exprimés de deux manières : en termes de pourcentage de cellules émettant la fluorescence du DiO (fluorophore encapsulé dans les LNP), ainsi qu'en termes d'intensité de fluorescence du DiO émise par les cellules. Concrètement, cela traduit d'une part la quantité de cellules qui ont capturé des LNP et d'autre part la quantité de LNP capturées par les cellules (*Figure IV.15*). Les résultats montrent une grande différence de cinétique de capture selon la taille des LNP à des temps courts. En effet, en 10 min près de 95 % des cellules ont capturé des F120, alors que ce n'est en moyenne que 60 % pour des F80 et 10 % pour des F50. Dans tous les cas, en 3h plus de 80 % des cellules ont capturé des LNP quelle que soit leur taille et en 20h plus de 99%. Ce résultat montre que la cinétique de capture des LNP est proportionnelle à la taille des LNP : les F120 sont capturées beaucoup plus vite que les F80, elles-mêmes capturées plus rapidement que les F50. Il est intéressant de noter que nous n'observons pas de différence entre les LNP et LNP-OVA de mêmes tailles, ce qui indique que la couche d'OVA à la surface des LNP n'affecte pas la capture par les DC. De plus, durant la première heure d'exposition l'intensité de fluorescence du DiO émise par les DC ne varie que très peu. Cela signifie que les cellules capturent dans un premier temps une petite quantité

de LNP, jusqu'à ce qu'une majorité des cellules soit positive (intensité de fluorescence constante jusqu'à 1h), puis dans un deuxième temps les cellules capturent de plus en plus de particules (intensité de fluorescence croissante de 1h à 20h).

a)



b)

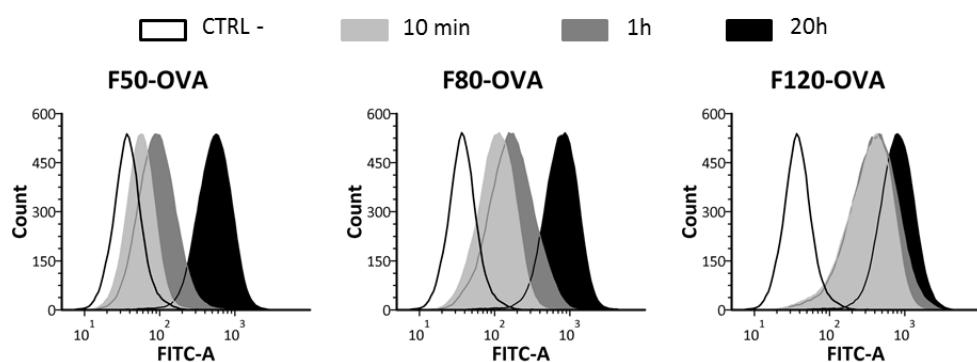


Figure IV.15. Capture des LNP par les DC.

a) Cinétique de capture des LNP et LNP-OVA par les DC JAWSII sur une échelle de temps variant de 10 min à 20h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules émettant la fluorescence du DiO encapsulé dans les LNP ainsi qu'en intensité de fluorescence du DiO émise par les DC. b) Comparaison de l'intensité de fluorescence du DiO aux temps 10 min, 1h et 20 pour chaque taille de LNP-OVA.

La différence d'intensité de fluorescence observée selon la taille des LNP n'est ici pas significative. Les lots de LNP sont préparés avec la même quantité de fluorophore (10 mM), répartie uniformément dans les particules. Or, un lot de F50 comporte un plus grand nombre de particules (1.09×10^{16}) qu'un lot de F80 (2.70×10^{15}) ou de F120 (9.05×10^{14}). Concrètement, cela signifie qu'une particule de F120 contient une plus grande quantité de fluorophore qu'une particule de F50. C'est pourquoi durant la première heure d'exposition, si les cellules capturent un nombre équivalent de F120, F80 et F50, la quantité totale de fluorophore capturée est différente et par conséquent l'intensité de fluorescence émise par les cellules aussi. Nous ne pouvons donc pas réellement conclure si les F120 sont capturées en plus grandes quantités par les DC, comme les résultats d'intensité de fluorescence le suggèrent. Bien que la cinétique de capture soit différente selon la taille des LNP, en près de 3h cette différence n'est plus visible puisque la quasi-totalité des cellules ont capturé des LNP. Cette différence sur un temps si court n'aura vraisemblablement pas d'impact sur la délivrance de l'antigène aux DC *in vivo*, l'ensemble des LNP étant finalement toutes très bien capturées par ces cellules.

d. Evaluation *in vivo* de la capture des LNP par les cellules présentatrices d'antigène

Nous l'avons vu précédemment, toutes les LNP sont rapidement capturées *in vitro* par les DC. Néanmoins, la capture cellulaire étudiée dans un puits peut être très différente de la réalité dans un organisme vivant. En particulier, une taille de 100 nm est souvent décrite comme la limite qui permet à des particules de pénétrer dans le circuit lymphatique et d'atteindre efficacement les ganglions lymphatiques, siège des cellules immunitaires^{169,173,338,339}. Nous avons par conséquent orienté notre prochaine étude de sorte à comparer spécifiquement les F80-OVA et F120-OVA, car leurs tailles encadrent la limite théorique de 100 nm pour pénétrer le réseau lymphatique.

Circulation des LNP dans le réseau lymphatique

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés au devenir des LNP une fois injectées dans un organisme vivant. Plus précisément, nous avons voulu comparer la capacité de particules de tailles différentes à atteindre les ganglions lymphatiques par drainage lymphatique. Pour cela, nous avons injecté les LNP, chargées avec du DiD, en sous-cutané dans chaque patte arrière d'une souris. La fluorescence du DiD a ensuite été mesurée, afin de visualiser l'éventuelle accumulation des LNP dans le ganglion le plus proche, à savoir le ganglion du poplité localisé au niveau de l'articulation de la patte (*Figure IV.16*).

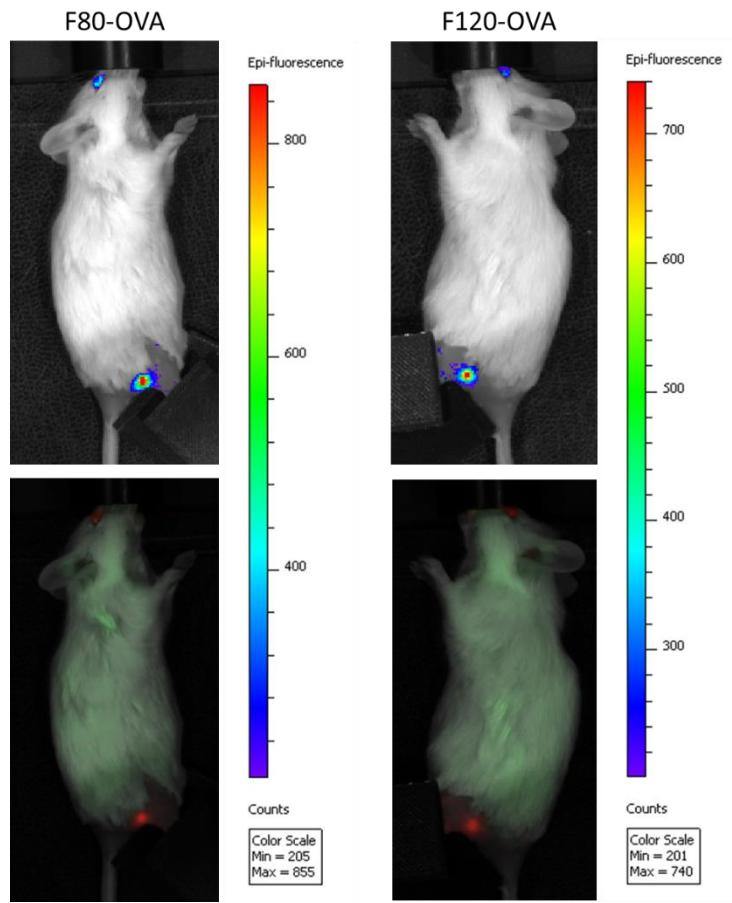


Figure IV.16. Drainage lymphatique des LNP.

Visualisation du ganglion du poplité par imagerie de fluorescence après injection de LNP-OVA chargées en DiD en sous-cutané dans chaque patte arrière d'une souris.

Les images obtenues montrent que seulement 20 min après injection, la fluorescence des LNP est concentrée au niveau du ganglion du poplité, dans le cas des deux tailles de particules. Dans un laps de temps si court, ce signal est dû à la circulation des LNP par elles-mêmes au sein du circuit lymphatique. En effet, environ 24h sont nécessaires pour que des particules plus grosses atteignent les ganglions par l'intermédiaire des DC¹⁷³. Ce résultat démontre que les LNP, au moins jusqu'à une taille de 120 nm, sont suffisamment petites pour traverser les parois du réseau lymphatique et être transportées jusqu'aux ganglions.

Capture *in vivo* des LNP par les cellules présentatrices d'antigène

Nous savons désormais que les LNP sont capables de s'accumuler dans les ganglions lymphatiques. Cependant, cela ne garantit pas qu'elles interagissent avec les cellules immunitaires. Nous avons donc étudié la capture des LNP *in vivo* par les DC issues des ganglions lymphatiques. Pour cette

expérience, nous avons choisi de nous placer dans des conditions expérimentales proches de celles utilisées pour des immunisations de souris par voie intrapéritonéale. Afin de pouvoir comparer la capture cellulaire des F80-OVA et F120-OVA dans les mêmes conditions, ces particules ont été préparées avec un fluorophore différent (F80(DiD)-OVA et F120(DiO)-OVA), pour pouvoir être administrées en intrapéritonéal dans la même souris. Après 24h, les ganglions les plus proches, à savoir les ganglions mésentériques localisés sur la chaîne intestinale, ont été prélevés afin d'en extraire les cellules. Les DC ont été marquées à l'aide d'un anticorps fluorescent avant d'être analysées en cytométrie de flux. Ce marquage a permis d'isoler la population de DC, parmi lesquelles nous avons déterminé la proportion de cellules ayant capturé des LNP, à savoir celles qui émettent la fluorescence du DiD ou du DiO. La suspension cellulaire provenant de la souris à laquelle les LNP ont été administrée est comparée à un échantillon de référence réalisé à l'aide d'une souris recevant le même volume de PBS (Figure IV.17).

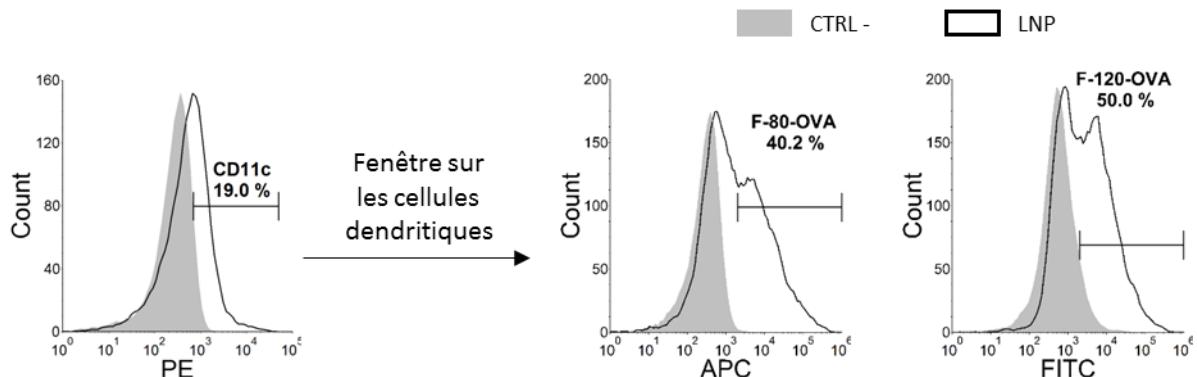


Figure IV.17. Capture cellulaire *in vivo* des LNP.

Capture cellulaire des LNP-OVA par les DC issues des ganglions mésentériques après injection intrapéritonéale de particules fluorescentes. La population de DC est sélectionnée pour pouvoir exprimer l'intensité de fluorescence du DiD et DiO encapsulés dans les F80-OVA et F120-OVA respectivement.

Sur l'ensemble de la suspension cellulaire, 19 % des cellules expriment le marqueur CD11c caractéristique des DC. Parmi ces cellules, celles qui ont capturé des LNP-OVA représentent 40 % à 50 %. Cette expérience révèle que la différence de taille étudiée n'a que peu d'impact sur la capture des LNP par les DC *in vivo*. De plus, cela confirme que les LNP-OVA de 80 et 120 nm sont capables, après injection dans l'organisme, de circuler dans le réseau lymphatique jusqu'à atteindre les ganglions, au sein desquels les particules sont capturées par les DC.

e. Evaluation des LNP à promouvoir la présentation de l'antigène

Nous avons déjà démontré dans la première partie que les F80-OVA favorisent la présentation de l'antigène par les DC aux LT par rapport à l'OVA non vectorisée. Nous souhaitons désormais étudié l'impact de la taille des LNP sur cette étape de présentation. Nous avons donc comparé les 3 formulations de LNP-OVA, en gardant l'OVA non vectorisée comme contrôle, sur une gamme de concentrations variant de 1 à 1000 ng/mL (Figure IV.18).

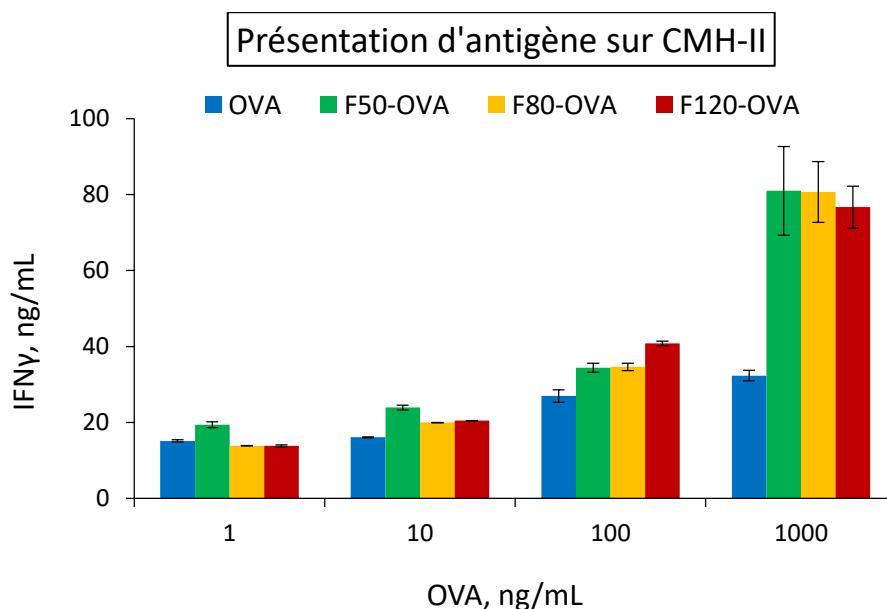


Figure IV.18. Présentation de l'antigène par les DC aux LT issus d'OT-II.

Production d'IFNy en réponse à la présentation de l'OVA par les DC aux LT en fonction de la taille des LNP et en comparaison avec l'OVA non greffée.

Les résultats de ce deuxième test confirment que l'OVA vectorisée est mieux présentée par les DC aux LT, sans pour autant de différence entre les tailles de particules. A partir de 10 ng/mL d'OVA, l'effet des LNP commence à se dessiner avec une légère amélioration de 30 % de la présentation d'antigène, jusqu'à une augmentation d'un facteur 2.5 à 1000 ng/mL d'OVA. Toutes les tailles de particules délivrent l'antigène avec la même efficacité puisqu'elles conduisent à une présentation de l'antigène d'une efficacité comparable. Lors de cette expérience, les DC sont exposées aux LNP-OVA pendant 6h. Or, lors de nos précédentes expériences de capture cellulaire, nous avons évalué les temps 3h et 20h. Pour rappel, à 3h les F120-OVA étaient mieux captées que les autres tailles de particules. En revanche, à 20h plus aucune différence n'était visible. Avec ce nouveau résultat, nous sommes tentés de supposer qu'au temps intermédiaire de 6h, les LNP de tailles différentes sont

toutes captées dans les mêmes proportions, de sorte que l'impact sur la présentation de l'antigène est similaire pour toutes les particules. En conclusion, les LNP jouent un rôle important dans la délivrance de l'antigène aux DC, conduisant à une nette amélioration de la présentation de cet antigène aux LT. A ce stade, les trois tailles de particules F50, F80 et F120 ont démontré une efficacité similaire.

f. Présentation croisée de l'antigène sur le CMH-I

La présentation de l'antigène est une étape clé durant l'induction d'une réponse immunitaire, car elle permet d'activer les LT qui agiront différemment en conséquence du signal reçu et de manière adaptée à la nature du pathogène. Typiquement, la présentation de l'antigène sur le CMH-II favorise l'activation des LB et la production d'anticorps nécessaires pour la neutralisation de pathogènes extracellulaires. En revanche, dans le cas de virus l'activation des LT cytotoxiques est essentielle afin d'éliminer les cellules infectées (*voir introduction section 1.2.3b p.46*). Cela requiert que l'antigène soit cette fois-ci présenté sur le CMH-I, ce qui est aussi appelé présentation croisée de l'antigène lorsque celui-ci parvient à s'échapper des vésicules de l'endosome. Dans la conception d'un vaccin, généralement destiné à protéger contre une infection virale, l'induction d'une réponse cytotoxique est un point important. Nous avons vu que les LNP étaient capable d'améliorer considérablement la présentation de l'antigène sur le CMH-II et nous nous demandons désormais si elles peuvent également favoriser la présentation croisée nécessaire à l'activation des LT cytotoxiques.

Nous avons tenté de réaliser les mêmes expériences de présentation d'antigène que celles précédemment décrites, avec cette fois-ci des LT CD8 issus de souris transgéniques OT-I. Cependant, l'élevage des souris OT-I a été infructueux et nous n'avons pas pu effectuer ces expériences. Nous nous sommes alors tournés vers une autre méthode pour évaluer la présentation croisée de l'antigène. Nous avons pour cela utilisé un anticorps fluorescent capable de se fixer spécifiquement sur le peptide de l'OVA SIINFEKL lorsque celui-ci est présenté sur le CMH-I. Concrètement, les DC primaires matures sont exposées aux formulations d'OVA pendant plusieurs heures. Puis, la suspension cellulaire est incubée avec l'anticorps fluorescent afin de marquer les cellules qui présentent l'OVA sur leur CMH-I. La suspension cellulaire est finalement analysée en cytométrie de flux afin de dénombrer les cellules sujettes à la présentation croisée.

Lors du premier essai, nous avons exposé les DC aux formulations d'OVA pendant 6h, sur le modèle de l'expérience de présentation d'antigène sur CMH-II. De plus, nous avons testé la même gamme de concentration d'OVA, variant de 1 à 1000 ng/mL. Cependant, nous n'avons mesuré aucune expression de peptides de l'OVA sur le CMH-I des DC. Le mécanisme de présentation croisée de

l'antigène étant probablement plus long qu'une simple présentation sur le CMH-II, nous avons donc prolongé le temps d'exposition des DC aux formulations d'OVA jusqu'à 24h. De plus, nous avons testé une gamme de concentration d'OVA plus large, avec des doses d'OVA plus élevées, jusqu'à 5 $\mu\text{g/mL}$. Cette fois-ci, nous avons pu observer la présentation croisée de l'OVA, uniquement dans le cas des F50 et pour des doses importantes d'OVA (Figure IV.19 ; 2 et 5 $\mu\text{g/mL}$). Alors que l'expression du peptide de l'OVA sur le CMH-I demeure à un niveau basal pour l'OVA et les formulations F80-OVA et F120-OVA, on observe une augmentation pour les F50-OVA d'un facteur 5 à 2 $\mu\text{g/mL}$ et d'un facteur 9 à 5 $\mu\text{g/mL}$. Ce résultat semble montrer un effet de la taille des LNP sur la présentation croisée de l'antigène, les particules F50 étant les seules à favoriser la présentation croisée de l'OVA.

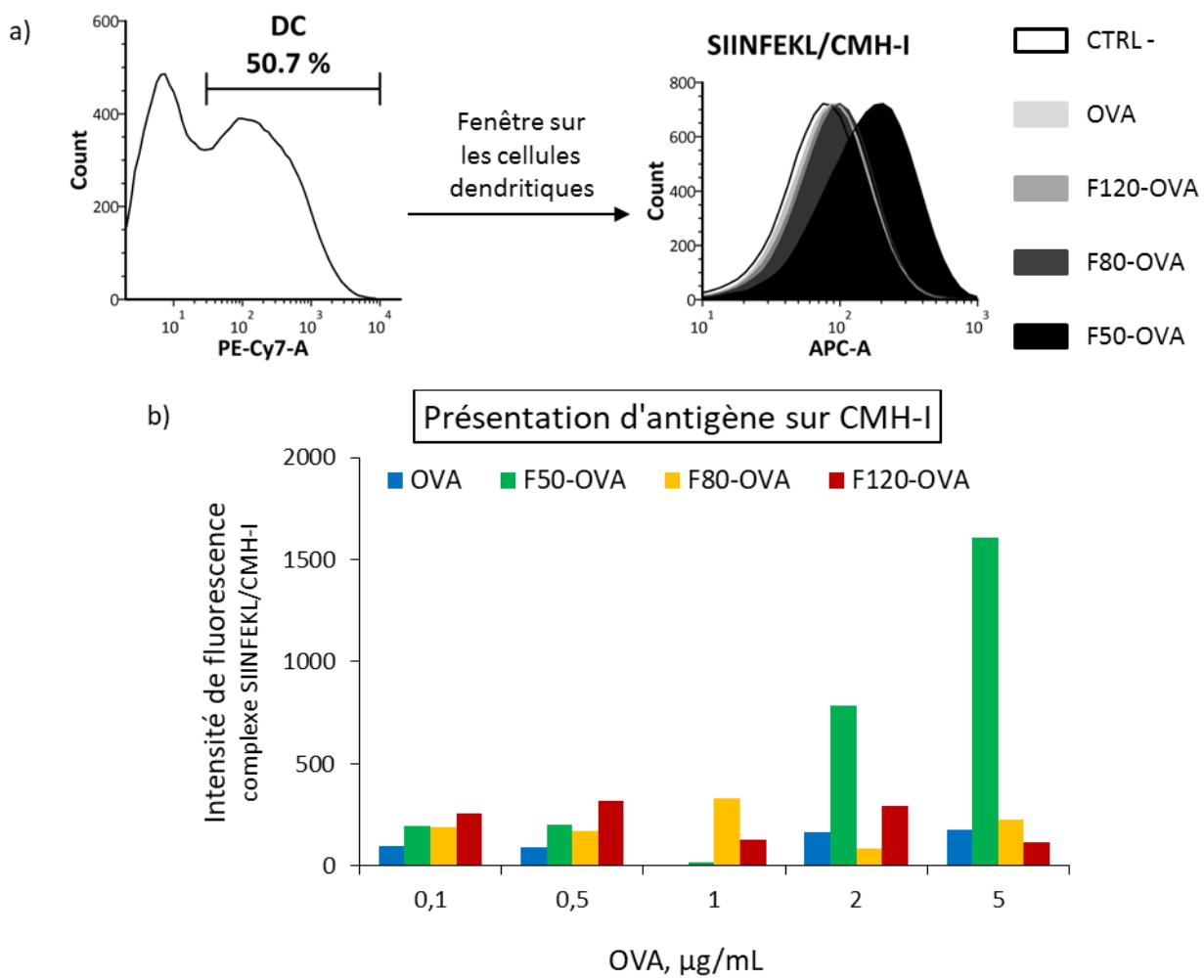


Figure IV.19. Présentation croisée de l'OVA sur le CMH-I de DC primaires.

a) La population de DC est sélectionnée pour pouvoir exprimer l'intensité de fluorescence du complexe SIINFEKL/CMH-I après stimulation avec 5 $\mu\text{g/mL}$ de formulations d'OVA pendant 24h. b) Intensité de fluorescence du complexe SIINFEKL/CMH-I après stimulation avec des doses croissantes de formulations d'OVA.

Grâce à l'ensemble de ces résultats, nous avons une meilleure connaissance de l'action des LNP sur les cellules immunitaires. Ces particules sont très bien tolérées par les DC et ne les stimulent que très peu. Nous avons vu que les LNP étaient capables de circuler aisément à travers le réseau lymphatique, jusqu'à atteindre les ganglions lymphatiques où résident un grand nombre de cellules immunitaires. Au sein des ganglions lymphatiques, les LNP sont captées par les cellules présentatrices d'antigène telles que les DC dans une large proportion. Enfin, la présentation de l'OVA par les DC et l'activation des LT CD4 qui en résulte est nettement supérieure lorsque l'OVA est délivrée par les LNP. Sur l'ensemble de ces expériences, nous n'avons pas observé de différences significatives causées par la variation de la taille des LNP. En revanche, les F50-OVA se sont distinguées lors de l'étude de la présentation croisée de l'OVA. Ces particules ont été les seules à présenter l'OVA sur le CMH-I, ce qui est requis pour activer les LT CD8. La prochaine étape consiste à comparer la capacité des différentes tailles de LNP à induire des réponses immunitaires *in vivo*.

IV.2.3 Evaluation de l'effet de la taille des LNP *in vivo*

Nous avons évalué lors d'une nouvelle campagne d'immunisation sur souris l'impact de la taille des LNP sur l'induction de réponses immunitaires *in vivo*. Nous avons pour cela comparé les 3 tailles de LNP-OVA avec un contrôle réalisé avec l'OVA non vectorisée. Cette campagne a également été l'occasion de tester un nouvel immunostimulant : le ligand de TLR-9 CpG. Contrairement au TLR-4 exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène (entre autres), le TLR-9 est présent à l'intérieur des DC. Ces différentes formulations ont été réparties en 4 groupes de 5 souris. Les souris reçoivent 2 injections intrapéritonéales à 3 semaines d'intervalle, contenant une dose de 10 µg d'OVA et 10 µg de CpG. Pour rappel, les 3 lots de LNP-OVA ont été préparés avec un taux de charge massique similaire d'environ 0.9 % (*voir Table IV.5 section IV.2.1 p.135*). Ce paramètre a été fixé ainsi afin de mieux comparer les groupes entre eux. En effet, si les cellules capturent la même masse de LNP, elles auront accès à la même masse d'OVA quelle que soit la taille des LNP. Ce taux de charge fixe correspond à 10 OVA par F50, 35 OVA par F80 et 100 OVA par F120.

Aux vues des résultats *in vitro*, qui mettent en avant la capacité des F50-OVA à induire la présentation croisée de l'antigène, nous prévoyons d'analyser la réponse cellulaire en plus de la réponse humorale. Pour cela, nous avons récolté les rates des souris immunisées et extrait les cellules. Les splénocytes ont ensuite été stimulés pendant 3 jours avec l'antigène OVA, ce qui a été suivi du dosage des cytokines produites par les cellules activées. Notamment, la sécrétion d'IFN γ traduit l'activation des LT en réponse à la stimulation par l'antigène, qui est reconnu suite à la présentation préalable par les DC lors des immunisations. Malheureusement, le dosage des cytokines

n'a donné aucun résultat, même dans les contrôles positifs que nous avons réalisés en stimulant les LT avec des billes d'activation CD3/CD28. Bien que nous n'en connaissons pas la nature, une erreur a dû se produire lors de la restimulation des splénocytes, compromettant cette expérience.

Nous avons néanmoins pu analyser la réponse humorale par la production d'anticorps spécifiques dans le sérum des souris immunisées (*Figure IV.20*). L'analyse des résultats montre que les 3 tailles de LNP-OVA favorisent la réponse humorale en augmentant significativement la production d'anticorps spécifiques par rapport au groupe de référence avec l'OVA libre ($p<0.05$). Le caractère immunostimulant du CpG est donc confirmé puisqu'il joue correctement son rôle de signal de danger. En revanche, les réponses obtenues sont très hétérogènes dans les groupes comprenant les F50-OVA et F120-OVA. En effet, la majorité des souris ont un taux d'anticorps mesuré aux alentours de 100 à 200 $\mu\text{g/mL}$ (au même niveau que le groupe F80-OVA très homogène), avec 1 ou 2 individus produisant une quantité bien supérieure d'anticorps ($> 500 \mu\text{g/mL}$). Néanmoins, bien que la production moyenne d'anticorps varie d'un groupe à l'autre en fonction de la taille des LNP, cette différence n'est pas significative d'un point de vue statistique.

Comparaison des tailles de LNP

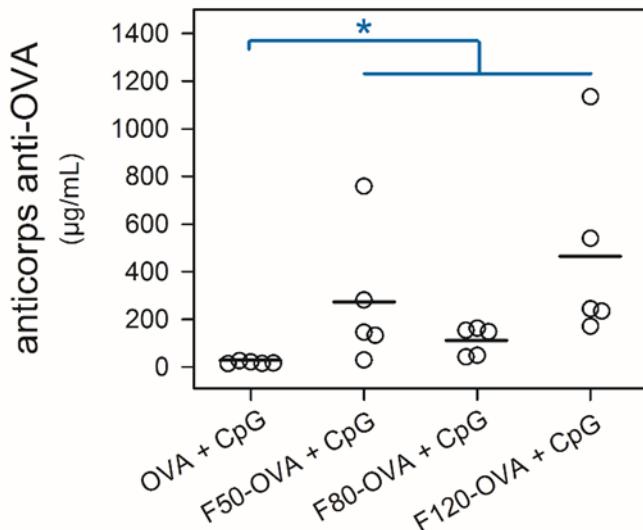


Figure IV.20. Analyse de la réponse humorale anti-OVA et étude de la taille du vecteur.

Production d'anticorps spécifiques de l'OVA en réponse à des immunisations de souris avec des formulations de LNP-OVA de tailles différentes co-administrées avec l'immunostimulant CpG. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe.

Même s'il n'y a pas de différence significative entre les groupes de LNP-OVA de tailles différentes, la tendance observée semble indiquer que les F120-OVA sont plus performantes que les F50-OVA, elles-mêmes meilleures que les F80-OVA pour induire une réponse humorale spécifique. Cette tendance est pour le moins surprenante car contraire à l'étude préliminaire à ce travail de thèse ainsi qu'à ce qui est référencé dans la littérature, d'ordinaire en faveur des particules de plus petite taille^{173,340,341}. Nous nous proposons de discuter ici ce point pour tenter de le comprendre.

Nous suspectons que l'effet de la taille des LNP soit ici biaisé par un autre élément à prendre en compte : la densité d'OVA à la surface des LNP. En effet, les LNP ont été préparées avec un taux de charge massique d'OVA constant (environ 0.9 % massique), impliquant une différence importante de densité d'OVA par LNP selon leur taille : 10 OVA/LNP pour les F50, 35 OVA/LNP pour les F80 et 100 OVA/LNP pour les F120. Or la densité d'antigène à la surface des particules a déjà été citée comme étant un paramètre non négligeable dans la préparation de formulations vaccinales¹⁸⁵. En particulier, une disposition répétitive de l'antigène avec un espacement de 5 à 10 nm entre les antigènes semble idéale pour l'activation des cellules immunitaires. De plus, nous avons découvert que la densité d'OVA par LNP influe sur la magnitude de la réponse humorale. Lorsque nous avons comparé dans la première partie (*voir section IV.1.3 p.130*) des LNP-OVA de même taille mais avec des densités différentes d'OVA (48 et 88 OVA/LNP), nous nous sommes aperçus que les particules les moins chargées (48 OVA/LNP) étaient les plus performantes en termes de production d'anticorps. La raison à cela est que lorsque les LNP portent une quantité plus faible d'OVA à leur surface il est par conséquent nécessaire d'injecter une plus grande quantité de LNP pour maintenir une dose d'OVA constante. Cela implique qu'un plus grand nombre de cellules immunitaires sont potentiellement ciblées. Ce raisonnement est en accord avec les résultats de l'étude préliminaire à ce travail de thèse, puisque les F80 portaient 60 OVA/LNP et les F120 en portaient 373³³². En revanche, les résultats de la campagne actuellement discuté comparant les F50 aux F80 et F120 vont à l'encontre de ce raisonnement, puisque les F120-OVA qui semblent être les plus performantes sont celles qui présentent la densité antigénique la plus élevée (100 OVA/LNP). La différence est que les densités d'OVA sur les F50 et F80 sont dans ce cas beaucoup plus faibles, avec seulement 10 OVA/LNP pour les F50 et 35 OVA/LNP pour les F80. Ces densités sont peut-être tout simplement insuffisantes pour activer efficacement les cellules immunitaires. En effet, il est attendu que les cellules reçoivent une certaine quantité minimale d'antigènes indispensable à leur activation. Dans notre cas, les LNP sont si peu chargées en OVA que les cellules doivent en capturer un grand nombre pour recevoir une dose d'OVA conséquente. De plus, à une telle densité antigénique il est possible que l'espacement entre les antigènes soit trop grand pour mimer une structure répétitive. Finalement, ces résultats ne nous permettent pas de conclure sur la configuration optimale des LNP pour la délivrance d'OVA

concernant les paramètres de taille et de densité d'antigènes. Pour répondre de manière définitive à cette question, il nous faudrait comparer plusieurs densités d'OVA pour chaque taille de particules afin d'identifier la densité optimale d'antigène en fonction de la taille de LNP et comparer ensuite les tailles entre elles. Une telle étude serait très lourde au regard du gain potentiel, puisque les 3 tailles de LNP favorisent la réponse humorale par rapport à l'OVA libre, les différences observées entre les 3 tailles étant non significatives. Les F50-OVA sont à notre avis les particules ayant le plus de potentiel, car nos résultats *in vitro* ont montré que ce sont les seules à promouvoir la présentation croisée de l'antigène. Bien que cette étude sur la comparaison des 3 tailles de particules apparaisse au début de ce manuscrit dans un souci de cohérence, elle s'est déroulée en fin de thèse. Nous n'avons par conséquent pas eu le temps de répéter l'expérience visant à évaluer les réponses immunitaires cellulaires générées par les F50-OVA. C'est aussi la raison pour laquelle, dans la suite de ce manuscrit, les particules utilisées sont des F80-OVA et non des F50-OVA, puisqu'il s'agit d'expériences antérieures à celle-ci.

IV.3 Ciblage actif des cellules présentatrices d'antigène

Nous avons vu dans la partie précédente que de par leur petite taille, les LNP sont capables de traverser les parois du réseau lymphatique afin de rejoindre les ganglions lymphatiques, siège des cellules immunitaires. Du fait que les LNP « subissent » ce drainage lymphatique, nous parlons de ciblage passif des cellules immunitaires au sein des ganglions. Certaines études décrites dans la littérature ont montré qu'il est possible de cibler de manière active un type cellulaire en particulier par ajout de ligands à la surface des vecteurs³⁴²⁻³⁴⁴. Nous nous proposons donc d'évaluer l'intérêt d'un ciblage actif des DC par l'intégration à la surface des LNP d'un ligand spécifique aux DC.

IV.3.1 Intégration de ligands de ciblage à la surface des LNP

Notre intérêt est de cibler les cellules présentatrices d'antigènes. Les macrophages et DC sont notamment caractérisées par l'expression du marqueur de surface CD206, qui a été décrit comme favorisant l'endocytose de l'antigène³⁴⁵. Ce récepteur reconnaît spécifiquement les glycoprotéines telles que les résidus mannose présents à la surface de pathogènes (levures, virus, bactéries). Nous avons ainsi sélectionné deux ligands mannosylés : un monosaccharide de 250 Da et un trisaccharide de 575 Da, notés monoMAN et triMAN, dans le but de les intégrer à la surface des LNP et d'évaluer leur impact sur la capture cellulaire (*Figure IV.21*).

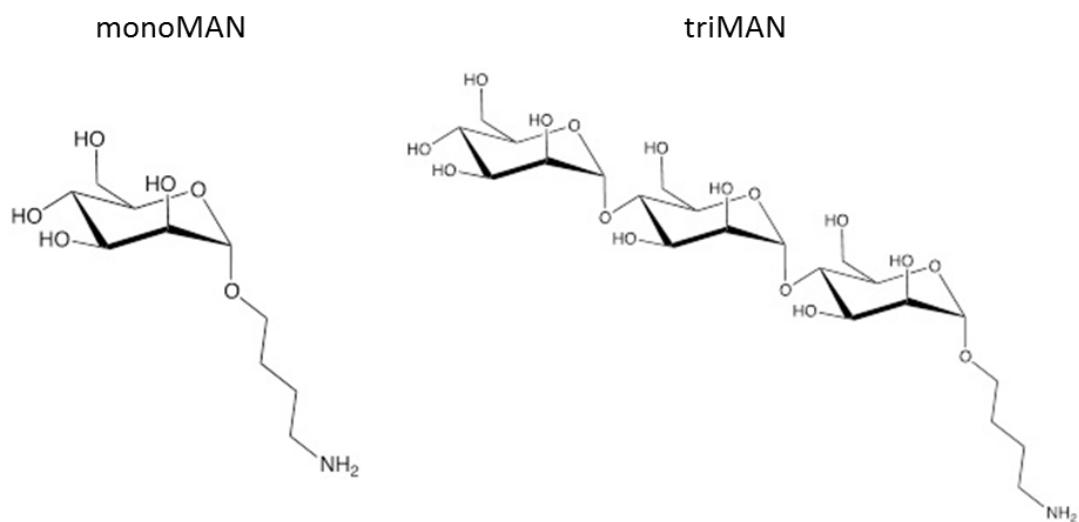


Figure IV.21. Structure des composés mannosylés utilisés pour le ciblage des cellules présentatrice d'antigène.

Ces ligands mannosylés possèdent une terminaison amine primaire que nous utilisons pour les greffer à la surface des LNP. Pour cela, nous nous sommes orientés vers un couplage amine/acide carboxylique en présence des composés EDC (1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide) / NHS (N-hydroxysuccinimide)³⁴⁶. Cette réaction de couplage met en jeu un acide carboxylique, qui en présence d'EDC forme un intermédiaire o-acyl urée réactif vis-à-vis des amines primaires (Figure IV.22). Cependant, cet intermédiaire est trop instable et s'hydrolyse avant d'avoir pu réagir avec les amines primaires (voie violette). L'ajout du composé NHS conduit à un intermédiaire stable et dont la réaction avec une amine primaire est plus favorable (voie rouge). La fonction réactive COOH doit donc être portée par les LNP. Nous utilisons pour cela des PEG fonctionnalisés (PEG-COOH) afin de greffer directement les ligands mannosylés. Les PEG-MAN produits pourront ensuite être incorporés dans la formulation des LNP. Les réactifs monoMAN ou triMAN sont ajoutés à une solution de PEG-COOH en présence d'EDC/NHS dans un tampon basique pH 10 afin de renforcer le caractère nucléophile des amines primaires. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant plusieurs heures puis purifié sur gel d'exclusion stérique pour éliminer les réactifs en excès.

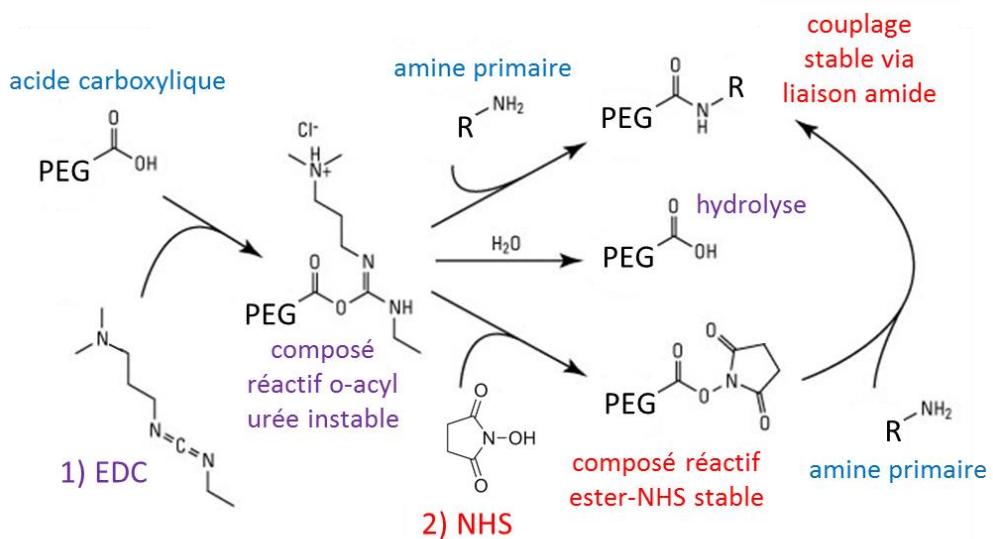


Figure IV.22. Schéma de la réaction de couplage PEG-COOH/MAN-NH₂ en présence d'EDC/NHS.

La présence des ligands mannosylés à la surface des PEG peut être caractérisée de manière quantitative par un dosage colorimétrique au résorcinol³⁴⁷. En effet, en présence de sucres tels que le mannose et d'acide sulfurique concentré à chaud, le résorcinol se transforme en un composé de coloration rouge. La quantité de ce produit est directement proportionnelle à la quantité de mannose présente dans le milieu. Ainsi, en comparant la coloration rouge obtenue pour les

échantillons de PEG-MAN précédemment préparés à une gamme étalon réalisée avec des quantités connues de monoMAN et triMAN par une mesure d'absorbance, il est possible de déterminer la quantité exacte de mannose greffée aux PEG (Figure IV.23). Dans l'exemple cité ici, 300 nmol de monoMAN (75 µg) et triMAN (170 µg), ont été introduits dans la réaction avec 1.3 mg de PEG. Le dosage au résorcinol a permis de déterminer que PEG-monoMAN contient 159 nmol de monoMAN (40 µg) et PEG-triMAN contient 190 nmol de triMAN (109 µg), soit un rendement de 53 % et 63 % respectivement (Table IV.6).

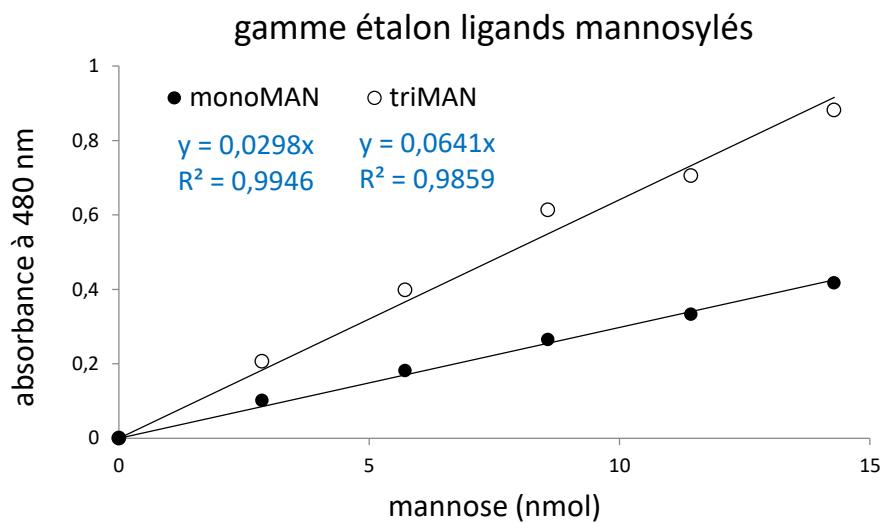


Figure IV.23. Gamme étalon réalisée à partir de quantités connues de ligands mannosylés.

	monoMAN	triMAN
n(introduite), nmol	300	300
n(calculée), nmol	159	190
rendement, %	53	63

Table IV.6. Quantité de ligands mannosylés greffés sur les PEG.

Les PEG-MAN préparés peuvent ensuite être incorporés dans une formulation de LNP. Le greffage des ligands mannosylés a été réalisé sur 1.3 mg de PEG pour économiser les réactifs dont nous disposions en quantités très limitées. Si l'on incorpore la totalité de ces PEG dans une formulation classique de F80, ils représenteront moins de 1 % de la surface des LNP. Nous réalisons donc une formulation diluée de F80 de sorte que les PEG-MAN constituent 1.66 % de la quantité totale de PEG (voir *masses exactes partie expérimentale section VII.1.2 p.238*). Après formulation des LNP-MAN, nous pouvons estimer le taux de charge de ligands mannosylés sur les LNP, en faisant

l'hypothèse d'une incorporation totale des PEG-MAN dans la formulation. Ainsi, dans une formulation comprenant 200 mg de LNP et en incorporant la totalité des PEG-MAN (soit 1.3 mg de PEG-COOH initial), cela correspond à 40 µg de monoMAN et 109 µg de triMAN, soit 135 monoMAN/LNP et 160 triMAN/LNP (*Table IV.7*).

	monoMAN	triMAN
Masse totale LNP (mg)		200
Nombre total LNP		7.11×10^{14}
Masse MAN greffée (µg)	40	109
Nombre MAN greffé	9.575×10^{16}	1.144×10^{17}
taux de charge (% massique)	0.020	0.055
taux de charge (nombre)	135	160

Table IV.7. Taux de charge de ligands mannosylés greffés sur les LNP.

Les LNP-MAN obtenues sont caractérisées par DLS afin de déterminer leur diamètre hydrodynamique. Ces particules présentent une taille moyenne de 72 à 73 nm pour un PDI moyen de 0.15 à 0.16, ce qui est en accord avec les formulations de F80 classiques (*Table IV.8*).

Formulation	D _H (nm)	PDI
F80	73 ± 3	0.14 ± 0.02
LNP-monoMAN	72	0.16
LNP-triMAN	73	0.15

Table IV.8. Mesure du diamètre hydrodynamique des LNP-MAN par DLS.

Ces formulations de LNP-MAN sont donc acceptables au regard de l'homogénéité de la suspension colloïdale et sont prêtes pour évaluer leur intérêt en biologie.

IV.3.2 Etude de l'effet du ligand de ciblage sur la capture cellulaire in vitro

Afin de déterminer l'intérêt d'incorporer un ligand de ciblage des cellules présentatrices d'antigènes à la surface des LNP, nous avons comparé la cinétique de capture des LNP-MAN par des DC par rapport aux LNP-COOH sans ligands qui servent de contrôles. Pour cela, les DC (JAWSII) ont été exposées aux différentes formulations de LNP sur des temps variant de 15 min à 3h, puisque nous savons qu'à partir de 3h la quasi-totalité des DC ont capturé les LNP (voir Figure IV.15 section IV.2.2c p.139). Les résultats sont exprimés en termes de pourcentage de cellules émettant la fluorescence du DiD (fluorophore encapsulé dans les LNP), ainsi qu'en termes d'intensité de fluorescence du DiD émise par les cellules (Figure IV.24).

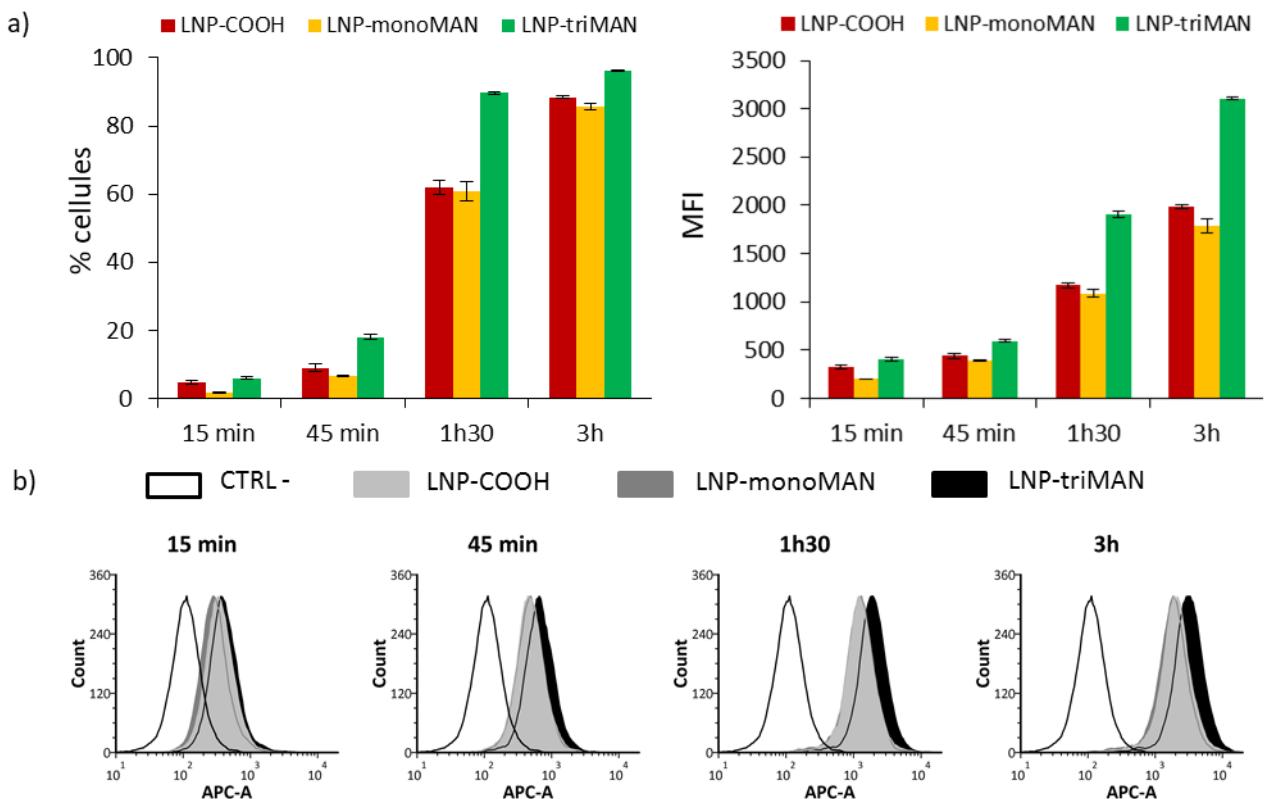


Figure IV.24. Capture des LNP-MAN par les DC.

a) Cinétique de capture des LNP-MAN par les DC JAWSII sur une échelle de temps variant de 15 min à 3h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules émettant la fluorescence du DiD encapsulé dans les LNP ainsi qu'en intensité de fluorescence du DiD émise par les DC. b) Comparaison de l'intensité de fluorescence du DiD émise par les DC exposées aux différentes LNP-MAN à chaque temps.

Les résultats montrent que les seules LNP-MAN qui se distinguent des autres sont les LNP-triMAN. En effet, les LNP-monoMAN se comportent exactement comme les LNP-COOH de référence. La présence du triMAN à la surface des LNP permet d'améliorer la cinétique de capture par les DC, avec notamment une augmentation du pourcentage de cellules positives de 50 % après 1h30 par rapport aux LNP de référence. La quantité de LNP capturées par les DC est également augmentée, par exemple de 56 % après 3h. Dans cette expérience, nous pouvons comparer les intensités de fluorescence puisque les LNP-MAN sont de même taille (80 nm) et ont été préparées avec la même quantité de DiD. Néanmoins, l'effet du triMAN sur le ciblage des DC demeure limité, au regard de la cinétique de capture déjà élevée des LNP classiques. Ces résultats ne sont pas assez significatifs pour justifier une étude plus poussée chez l'animal.

IV.4 Etude des paramètres d'immunisation

Lors des premières campagnes d'immunisation, nous avons fixé arbitrairement certains paramètres tels que la voie d'administration des formulations vaccinales et la dose d'antigène. Nous avons choisi d'injecter les formulations antigéniques aux souris par voie intrapéritonéale (IP) car cela nous donne une flexibilité confortable en termes de volume d'injection (jusqu'à 500 µL) et que l'injection est relativement facile à réaliser, sans anesthésie des animaux. Cependant, une injection intrapéritonéale est assez éloignée de la réalité de la vaccination chez l'humain et nous avons souhaité tester en comparaison une administration par voie sous-cutanée (SC). De plus, la dose d'OVA de 10 µg par injection et par souris a été déterminée d'après la littérature^{348,349}. Cette dose n'est probablement pas optimale et mérite d'être évaluée afin de déterminer si nos formulations antigéniques sont toujours aussi performantes à de plus faibles doses d'antigène.

Dans ce but, nous avons réalisé une nouvelle campagne d'immunisation comprenant 8 groupes de 5 à 7 souris, sur le modèle de la formulation LNP-OVA + CpG et faisant varier :

- la dose d'antigène (1, 3 et 10 µg)
- la voie d'administration (IP et SC)

Nous avons rajouté des groupes contrôles LNP + OVA + CpG pour la voie sous-cutanée afin de confirmer l'intérêt du greffage de l'OVA sur les LNP avec cette nouvelle voie d'administration. La performance de ces formulations a été évaluée par le dosage des anticorps spécifiques dans le sérum des souris.

Les résultats obtenus ont été étudiés séparément afin d'évaluer individuellement l'effet de chaque paramètre. Dans un premier temps, nous avons comparé les groupes de souris immunisées par voie sous-cutanée (*Figure IV.25*). L'analyse de la production d'anticorps spécifiques montre tout d'abord que l'amélioration due au greffage de l'OVA sur les LNP est toujours valable par voie sous-cutanée, avec une augmentation significative aux deux doses testées de 1 et 10 µg d'OVA (*LNP-OVA + CpG vs LNP + OVA + CpG, 1 µg : p = 0.013 ; 10 µg : p = 0.027*). Cependant, nous n'observons aucune différence entre ces deux doses sur la production d'anticorps spécifiques : les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur. En revanche, à la dose intermédiaire de 3 µg d'OVA, les LNP-OVA produisent une quantité significativement plus importante d'anticorps spécifiques, augmentée d'un facteur 2 par rapport aux dose d'OVA de 1 et 10 µg (*LNP-OVA + CpG, 3 µg vs 1 µg : p = 0.006 ; 3 µg vs 10 µg : p = 0.009*). Ces résultats nous montrent que les formulations de LNP-OVA sont capables

d'induire une réponse immunitaire humorale chez la souris lorsqu'elles sont injectées par voie sous-cutanée, avec une dose optimale de 3 µg d'OVA.

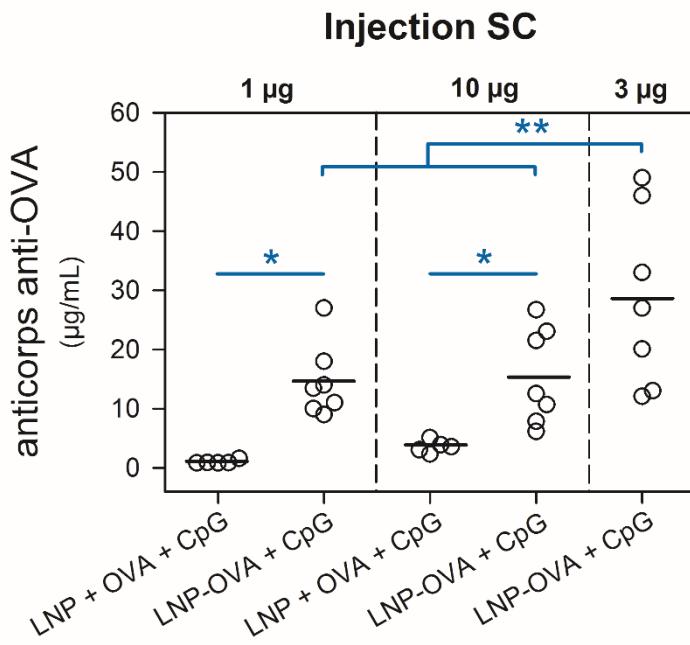


Figure IV.25. Analyse de la réponse humorale anti-OVA et étude de la dose d'OVA en SC.

Production d'anticorps spécifiques de l'OVA en réponse à des immunisations sous-cutanées de souris avec des formulations contenant différentes doses d'OVA. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe.

Dans un deuxième temps, l'impact de la dose d'OVA sur la production d'anticorps a été déterminé en comparant les groupes de souris immunisées par voie intrapéritonéale (*Figure IV.26 a*). Aux trois doses testées de 1, 3 et 10 µg d'OVA, aucune différence significative n'est répercutée sur la production d'anticorps spécifiques. La moyenne du groupe immunisé avec 10 µg d'OVA est plus élevée à cause d'une unique souris ayant très fortement répondu (point encadré en pointillés rouges). Hormis ce point, toutes les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur, ce qui démontre ici que la dose d'OVA n'influe aucunement sur la réponse humorale générée.

Lorsque nous comparons les deux voies d'administration testées, à savoir les injections intrapéritonéale et sous-cutanée, nous observons des résultats très similaires, quelle que soit la dose d'OVA utilisée (*Figure IV.26 b*). Ici encore, hormis le point très élevé dans le groupe de souris immunisées en intrapéritonéal avec une dose de 10 µg d'OVA, toutes les souris répondent avec une intensité du même ordre de grandeur en termes de production d'anticorps spécifiques.

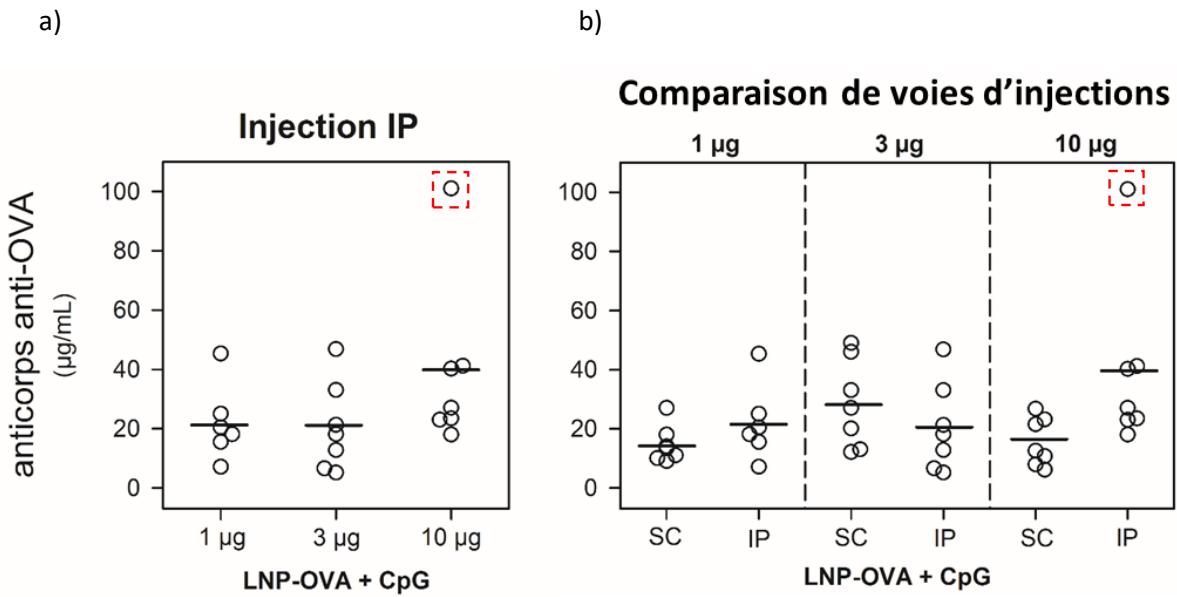


Figure IV.26. Analyse de la réponse humorale et étude de la dose d’OVA en IP.

Production d’anticorps spécifiques de l’OVA en réponse à des immunisations de souris avec des formulations de LNP-OVA a) par voie intraperitoneale en comparant plusieurs doses d’OVA, b) en comparant les administrations par voie intraperitoneale et sous-cutanée à différentes doses d’OVA. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe.

L’ensemble de ces résultats nous permet donc de conclure qu’immuniser des souris avec les formulations de LNP-OVA induit une réponse humorale aussi performante que ce soit par voie intraperitoneale ou sous-cutanée.

Si le choix se porte sur une immunisation sous-cutanée, la dose optimale d’OVA est de 3 µg, ce qui permet d’augmenter la réponse humorale d’un facteur 2 par rapport aux doses de 1 et 10 µg d’OVA. En revanche, dans le cas d’une immunisation intraperitoneale les trois doses testées sont toutes aussi performantes. Ce résultat nous indique que nous pouvons réduire la dose d’antigène injectée tout en maintenant une réponse immunitaire efficace en termes d’anticorps spécifiques produits.

Discussion du chapitre IV

Dans ce chapitre, nous avons abordé la préparation de nanoparticules lipidiques (LNP) dans le but de vectoriser un antigène synthétique afin d'augmenter son immunogénicité *in vivo*. Les particules décrites ici sont de type NLC (nanostructured lipid carriers) et présentent par conséquent les nombreux avantages associés à ce type de particules, tels qu'une grande stabilité colloïdale et biocompatibilité obtenus par un procédé de fabrication simple et reproductible avec une possibilité de mise à l'échelle²⁴⁵. Comme nous l'avons vu dans l'état de l'art, les NLC ont été principalement utilisées pour l'encapsulation de drogues hydrophobes mais très peu pour la délivrance d'antigènes. Les LNP faisant l'objet de ce travail ont été tout d'abord décrites par notre groupe comme vecteurs d'agents de contraste ou de biomolécules pour des applications en imagerie et délivrance de médicaments^{322,323,350}. Ces précédents travaux ont mis en lumière les avantages associés à la biodistribution des LNP dans l'organisme, qui les désignent comme un outil idéal pour la délivrance d'antigènes.

Nous avons choisi de réaliser la preuve de concept avec la délivrance de l'antigène modèle ovalbumine (OVA), que nous avons greffé avec succès à la surface des LNP via un lien covalent. Nous avons opté pour un greffage chimique de l'antigène sur les LNP par rapport à d'autres techniques de vectorisation car celle-ci présente l'avantage d'un moindre risque de relargage incontrôlé de l'antigène. En effet, un tel relargage prématuré de l'antigène peut avoir lieu lorsque celui-ci est encapsulé dans le cœur des SLN (Solid Lipid Nanoparticles), comme cela a été rapporté par Mishra et al durant la phase de stockage de leurs particules²⁵⁴. De plus, Fifis et al ont démontré que le couplage covalent d'antigènes à des particules de polystyrène était plus efficace pour l'induction de réponses immunitaires que la simple adsorption des antigènes sur la surface des particules³³⁷. Parmi les nombreuses réactions de bioconjugaison possibles, nous avons fait le choix d'une addition de Michael thiol-maléimide qui a été récemment décrite comme l'une des méthodes les plus adaptées pour limiter la production d'anticorps dirigés contre la liaison entre particules et antigènes³⁵¹. En outre, cette technique de bioconjugaison a été employée à de multiples reprises³⁵²⁻³⁵⁵ avec pour avantages de bon rendements à pH physiologique et l'absence de réactions secondaires. Afin de garantir l'accessibilité des fonctions thiols portées par les LNP, nous utilisons des chaînes de PEG plus longues (5 kDa) que celles constituant la couronne de tensioactifs (2 kDa). Sans cela, les fonctions réactives seraient masquées par la couche de PEG et le rendement de couplage s'en trouverait diminué³⁵⁶. Nous avons également veillé à fonctionnaliser l'OVA avec seulement une fonction réactive maléimide, de sorte d'éviter les réactions multiples d'une molécule d'OVA avec plusieurs

particules tout en conservant l'intégrité et l'immunogénicité de l'antigène. Nous avons ainsi obtenu des LNP-OVA avec des taux de charge en OVA variant entre 1 et 2 % massiques, la production de particules étant reproductible d'un lot à l'autre (pour des F80-OVA : 86 ± 6 nm avec un PDI de 0.20 ± 0.03). Les particules sont d'une grande stabilité colloïdale, contrôlée après plusieurs mois à 4°C (mesure de taille réalisée 16 semaines après greffage). La qualité des LNP-OVA se mesure également par la stabilité du lien entre l'OVA et les LNP, garantissant que l'OVA ne soit pas relarguée prématurément pendant le stockage. Dans notre cas, 9 semaines après greffage, la totalité de l'OVA est toujours greffée aux LNP. De par le choix de composants biocompatibles et biodégradables, les LNP-OVA ont l'avantage d'être non toxiques et par conséquent très bien tolérées par plusieurs types cellulaires : fibroblastes, DC et macrophages, avec un IC₅₀ supérieur à 1.5 mg/mL.

L'intérêt de vectoriser l'OVA sur les LNP a été démontré lors de campagnes d'immunisations sur modèle murin. Nous avons en effet observé une augmentation de la production d'anticorps spécifiques d'un facteur 11.5 en comparant l'OVA sous forme libre ou vectorisée, co-administrée avec un immunostimulant. Cette amplification de la réponse humorale est liée à la capacité des LNP à circuler aisément dans le circuit lymphatique et interagir avec les cellules immunitaires. En effet, la densité de la couche de PEG entourant les LNP leur confère des propriétés furtives³²⁸ et augmente leur temps de circulation dans l'organisme, ce qui a été observé par notre groupe au cours de précédents travaux impliquant des techniques d'imagerie *in vivo*^{322,323,357}. Cette dense couche de PEG empêche l'élimination rapide des LNP par les macrophages au point d'injection et favorise leur circulation en direction des ganglions lymphatiques drainants³⁵⁸.

Nous avons en effet démontré que les LNP-OVA sont détectables dans le ganglion lymphatique du poplité seulement 20 minutes après injection en sous-cutané dans la patte arrière d'une souris. De par leur taille nanométrique, les LNP sont capables de traverser les parois du réseau lymphatique qui les conduit directement dans les ganglions où résident les cellules immunitaires. Une fois dans les ganglions lymphatiques, les LNP-OVA sont capturées par une large proportion de DC. Nous avons montré que 24h après injection de LNP-OVA dans le péritoine d'une souris, près de 40-50 % des DC provenant des ganglions mésentériques contenaient des LNP. Cette caractéristique des LNP à cibler de manière passive les ganglions lymphatiques, et donc par conséquent les cellules présentatrices d'antigène, supprime alors la nécessité d'ajouter des ligands de ciblage des DC aux particules. Lors de nos études de capture cellulaire *in vitro*, nous avons en effet observé que la présence de ligands mannosylés à la surface des LNP avait un impact uniquement sur des temps courts (moins de 3h), puisqu'au-delà les LNP-MAN étaient capturées par les DC dans les mêmes proportions que les LNP contrôles. En améliorant la délivrance de l'OVA aux DC, les LNP impactent également la présentation de l'antigène aux LT. En utilisant des souris transgéniques OT-II dont les LT sont spécifiques de l'OVA,

nous avons pu modéliser l'étape de présentation de l'OVA par les DC aux LT. Nos résultats montrent que l'activation des LT CD4 en réponse à la présentation de l'OVA sur le CMH-II des DC est 2.5 fois plus importante dans le cas où l'OVA est délivrée par les LNP. Grâce à l'ensemble de ces expériences, nous avons pu retracer le parcours des LNP-OVA après administration *in vivo* et ainsi apprécier l'impact des LNP à chacune des étapes participant à l'induction des réponses immunitaires spécifiques.

La réponse humorale générée par des souris ayant reçu des LNP-OVA est exclusivement due à la vectorisation de l'OVA par les LNP. Les LNP n'ont en effet aucunes propriétés immunostimulantes en elles-mêmes. Lorsque les LNP nues sont ajoutées à une solution d'OVA et de MPLA (sans lien entre l'OVA et les LNP), la production d'anticorps spécifique demeure au niveau basal défini par le groupe contrôle réalisé avec l'OVA libre adjuvantée avec le MPLA. Nous avions préalablement vérifié ce point *in vitro*, en montrant que les LNP n'activent pas, ou très peu, les DC. A une dose de 1 mg/mL de LNP, l'activation des DC étaient 2 fois plus importante que le contrôle négatif (cellules seules) et 5 fois moins importante que le contrôle positif (2 µg/mL LPS). Ce caractère inerte des LNP les opposent de fait aux émulsions adjuvantes contenant du squalène (MF59, AS03) et qui ont par conséquent des propriétés immunostimulantes intrinsèques^{192,267,359}. Cela implique aussi que les LNP-OVA doivent être associées avec un immunostimulant afin de délivrer un signal de danger en même temps que l'antigène. Lors de nos campagnes d'immunisation, nous avons testé 3 immunostimulants : le LPS, le MPLA et le CpG, qui co-administrés avec les LNP-OVA ont tous été capables de stimuler la réponse humorale. Le LPS et le MPLA sont tous deux des ligands de TLR-4 exprimé entre autres à la surface des cellules présentatrices d'antigène. A cause de sa toxicité, le LPS sert uniquement de référence, tandis que le MPLA, conçu pour ne conserver que la région immunostimulante du LPS en s'affranchissant de la région responsable de sa toxicité, est approuvé en clinique⁹⁷. Le MPLA s'est montré aussi performant que le LPS pour stimuler les réponses immunitaires avec une production d'anticorps spécifiques du même ordre de grandeur pour les deux adjuvants. Le CpG est quant à lui un ligand de TLR-9 exprimé à l'intérieur des DC. Comme ce récepteur n'est activé qu'une fois les cellules ayant capturé l'adjuvant, nous sommes donc certains d'activer spécifiquement les DC. A l'inverse, le TLR-4 est exprimé non seulement à la surface des cellules présentatrices d'antigène, mais également à la surface d'autres cellules telles que les cellules épithéliales qu'il est inutile d'activer⁷⁶.

Finalement, nous avons fait varier les conditions expérimentales d'immunisation afin de comparer plusieurs voies d'administrations des formulations vaccinales et tester plusieurs doses d'antigène. Les premières campagnes d'immunisation ont en effet été réalisées avec des injections intrapéritonéales, relativement faciles à pratiquer et autorisant une plus grande flexibilité en termes

de volumes d'injection. Cependant, d'autres voies d'immunisation, telles que l'injection par voie sous-cutanée, sont plus appropriées et proches de la réalité de la vaccination chez l'humain. La comparaison de ces deux voies d'administration des LNP-OVA chez la souris nous a fourni des résultats très similaires avec une production d'anticorps spécifiques du même ordre de grandeur. Ce résultat est très prometteur quant à la versatilité des LNP, qui sont capables de promouvoir la réponse immunitaire par plusieurs voies d'administration. En effet, certaines études ont comparé les voies d'injection sous-cutanée et intrapéritonéale pour la délivrance de vaccin et rapporté une réponse humorale diminuée par voie sous-cutanée^{360,361}. Cette versatilité des LNP nous permet alors d'envisager d'autres voies d'administration, comme par exemple les voies orale ou intranasale. L'avantage de ces voies de délivrance est que les muqueuses sont riches en cellules immunitaires et donc une cible pertinente pour l'antigène³⁶². Néanmoins, l'induction de réponses immunitaires par la voie intranasale est délicate en raison d'une capture inefficace de l'antigène³⁶³. Il serait donc intéressant d'étudier la performance des LNP pour délivrer l'antigène dans ce contexte difficile.

Nous avons en parallèle testé plusieurs doses d'OVA pour chacune de ces voies d'administration : 1, 3 et 10 µg. Par voie intrapéritonéale, la dose d'antigène impacte relativement peu la production d'anticorps spécifiques puisqu'aucune différence significative n'est observée. En revanche, par voie sous-cutanée la dose intermédiaire de 3 µg d'OVA s'est montrée la plus efficace à induire une production significativement plus élevée d'anticorps. Dans les deux cas, ce résultat implique que la dose d'antigène peut être réduite d'un facteur 3 ou 10 tout en conservant le même niveau d'efficacité en termes de production d'anticorps. Ce point est d'un grand intérêt lorsque l'on travaille avec des antigènes très couteux, difficiles à produire ou dont les stocks sont limités.

Finalement, nous avons démontré dans ce chapitre que nous sommes capables de produire des lots de LNP transportant un antigène modèle OVA d'une grande stabilité et robustesse qui sont très bien tolérées par les cellules. Ces particules, lorsqu'elles sont administrées *in vivo* dans des petits mammifères tels que des souris, ciblent les ganglions par drainage lymphatique et sont rapidement capturées par les DC. Celles-ci activent en retour les LT qui orchestrent une réponse immunitaire adaptée et spécifique à l'antigène. Il en résulte une production importante d'anticorps spécifiques de l'OVA, maintenue malgré la réduction de la dose d'antigène administrée.

Chapitre V

*Augmentation de l'immunogénicité de
l'ovalbumine par la vectorisation
d'immunostimulants*

Dans la suite de ce travail, nous avons mis en place une nouvelle stratégie visant à améliorer l'immunogénicité de l'OVA. Nous avons conclu le chapitre IV sur l'intérêt de délivrer l'OVA par les LNP et supposons désormais que l'immunostimulant associé peut lui aussi être délivré dans le but d'induire des réponses immunitaires spécifiques de plus grande amplitude. Le signal de danger généré par l'immunostimulant étant indispensable à la cellule présentant l'antigène pour s'activer, il est généralement établi que l'immunostimulant doit être délivré en même temps que l'antigène afin de garantir le ciblage des mêmes cellules. Nous avons donc comparé deux techniques de délivrance : d'une part la co-vectorisation de l'OVA et d'un immunostimulant par les mêmes LNP et d'autre part la vectorisation de l'un et l'autre par des LNP distinctes, sur le modèle des immunostimulants MPLA et Imiquimod. La meilleure stratégie de délivrance a ensuite été appliquée au CpG et les réponses immunitaires induites ont été évaluées chez la souris en termes de production d'anticorps et d'activation des LT spécifiques. L'analyse détaillée de ces réponses immunitaires nous a conduits à identifier une formulation particulièrement performante que nous avons ensuite évaluée dans une expérience de protection. Cette étude s'est déroulée sur le modèle de cellules tumorales exprimant l'OVA, ce qui nous a permis de mesurer l'efficacité des réponses immunitaires cellulaires générées.

V.1 Stratégie de vectorisation de l'immunostimulant sur le modèle du MPLA et de l'Imiquimod

Le MPLA, ligand du TLR-4 exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène, a été souvent décrit en tant qu'adjvant de vaccin, sous sa forme libre⁹⁶ ou bien vectorisé par des particules³⁶⁴. Ayant déjà utilisé cet immunostimulant sous sa forme libre en co-administration avec des formulations de LNP-OVA, nous allons cette fois-ci tenter de le vectoriser par les LNP. L'Imiquimod a également été choisi, en tant que ligand de TLR-7 exprimé à l'intérieur des DC, pour être délivré par les LNP. La plupart des études sur la délivrance d'immunostimulants décrivent un vecteur unique transportant à la fois l'antigène et l'immunostimulant^{364,365}, avec pour objectif de les délivrer aux mêmes cellules immunitaires. Néanmoins, une récente étude démontre que la co-vectorisation des deux éléments n'est pas requise dans le cas où les vecteurs sont sujets au drainage lymphatique car ils sont automatiquement dirigés vers les mêmes ganglions dans lesquels ils sont capturés par les mêmes cellules immunitaires¹³³. Nous allons donc explorer ces deux stratégies de vectorisation, en préparant des LNP vectorisant seulement l'immunostimulant et d'autres LNP vectorisant à la fois l'OVA et l'immunostimulant, afin de comparer leur efficacité en termes de réponses immunitaires.

V.1.1 Préparation des LNP immunostimulantes

a. Incorporation du MPLA dans la couronne des LNP

Le MPLA étant une molécule amphiphile (*Figure V.1 a*), il peut s'insérer dans la membrane des LNP, à l'interface entre la phase lipidique et la phase aqueuse. Pour cela, lors de la formulation des LNP, nous procédons en solubilisant le MPLA dans du chloroforme et ajoutons ensuite cette solution à la phase organique de LNP (F80) avant d'évaporer le solvant. Les autres étapes de la formulation des LNP sont identiques au protocole classique (*voir partie expérimentale section VII.1.1 p.236*). Grâce à l'expérience de notre groupe, nous savons qu'en introduisant 0.5 % massique de MPLA par rapport aux LNP, l'incorporation dans la membrane des LNP est totale. Nous avons donc suivi cette indication et il en résulte une émulsion homogène, notée LNP(MPLA).

Le MPLA étant dérivé du LPS, il peut être dosé par son activité d'endotoxine. C'est de cette manière que nous avons mesuré la quantité de MPLA réellement incorporée dans les LNP. L'échantillon de LNP(MPLA) est comparé à une gamme étalon réalisée avec des concentrations connues de MPLA (*Figure V.1 b*). La gamme étalon obtenue est linéaire sur un intervalle très restreint de concentrations de MPLA mais nous permet tout de même d'estimer la quantité de MPLA incorporée dans les LNP. Un contrôle négatif réalisé avec des LNP nues confirme que les LNP n'ont pas d'activité d'endotoxines en elles-mêmes. La concentration de MPLA calculée par cette méthode (702 µg/mL) est très proche de la concentration théorique de MPLA (691 µg/mL) introduit dans la formulation, avec une erreur de seulement 2 % (*Table V.1*). Cette analyse confirme l'incorporation totale du MPLA dans les LNP, conduisant à un taux de charge de 0.50 % massique.

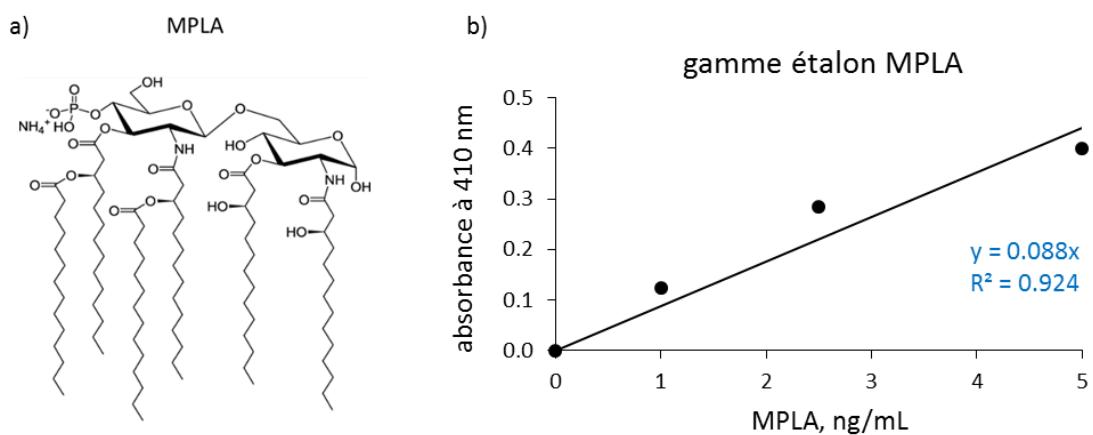


Figure V.1. Dosage du MPLA incorporé dans les LNP par activité d'endotoxine.

a) Structure du MPLA. b) Gamme étalon réalisée à partir de concentrations connues de MPLA.

MPLA théorique, µg/mL	MPLA mesurée, µg/mL	Erreur, %	Taux de charge, % massique
691	702	2	0.50

Table V.1. Calcul de la quantité de MPLA incorporée dans les LNP.

b. Encapsulation de l’Imiquimod dans le cœur des LNP

La localisation intracellulaire du TLR-7, dont l’Imiquimod est le ligand, nécessite que celui-ci soit efficacement délivré à l’intérieur des DC. L’Imiquimod étant une molécule hydrophobe (Figure V.2 a), nous envisageons de l’encapsuler dans le cœur lipidique des LNP. La vectorisation de l’Imiquimod a été réalisée exclusivement avec des particules F80.

Afin d’être encapsulé dans le cœur des LNP, l’Imiquimod est ajouté directement dans la phase organique, après avoir été préalablement dissout dans du dichlorométhane à environ 70°C. Les autres étapes de la préparation des LNP sont inchangées : on obtient alors des particules notées LNP(imi). Après sonication, la solution obtenue n’est pas homogène et l’Imiquimod est visible sous la forme de grains blancs insolubles, ce qui traduit une mauvaise encapsulation. De plus, la mesure de taille des LNP par DLS montre que la présence de l’Imiquimod déstabilise le système avec pour conséquence la formation de particules beaucoup plus grosses qu’attendu (170 nm au lieu de 80 nm). La quantité d’Imiquimod introduite dans la formulation n’est probablement pas adaptée et doit être optimisée. Pour ce premier essai nous avons introduit 8 mg d’Imiquimod soit 1% massique. Les essais suivants nous permettent de tester d’autres ratios plus faibles : 0.5, 0.2 et 0.1 % massiques d’Imiquimod. Les particules obtenues apparaissent cette fois-ci homogènes à l’œil nu et leur taille est cohérente avec une formulation F80 (environ 70 nm).

Le dosage de l’Imiquimod encapsulé dans le cœur des LNP est réalisé par spectroscopie de fluorescence, l’Imiquimod ayant naturellement des propriétés de fluorescence (excitation 280 nm, émission 360 nm). Dans le cas où les LNP sont chargées avec du DiD, cela n’interfère pas avec la fluorescence de l’Imiquimod puisque le DiD est excité à 644 nm et émet à 665 nm. Pour cette analyse, nous réalisons une gamme étalon avec des quantités connues d’Imiquimod afin de pouvoir comparer la valeur de fluorescence obtenue pour l’échantillon de LNP(imi) et remonter à la quantité d’Imiquimod encapsulé (Figure V.2). Nous vérifions que les LNP n’altèrent pas le test en réalisant un tube contrôle contenant des LNP sans Imiquimod. L’analyse des formulations préparées montre que l’encapsulation de l’Imiquimod dans les LNP est extrêmement faible, voire indétectable pour les formulations LNP(imi_0.1) et LNP(imi_0.2). Finalement, seule la formulation LNP(imi_0.5) est

acceptable, selon des critères d'homogénéité et d'Imiquimod encapsulé, avec un taux de charge de 0.024 % massique d'Imiquimod (*Table V.2*).

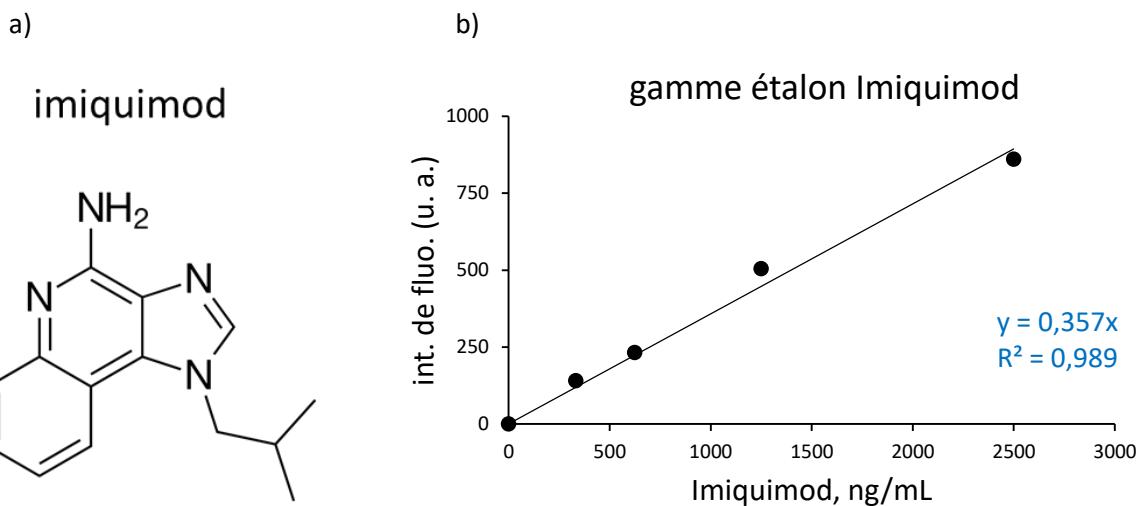


Figure V.2. Dosage de l'Imiquimod encapsulé dans les LNP par spectroscopie de fluorescence.

a) Structure de l'Imiquimod. b) Gamme étalon réalisée avec des quantités connues d'Imiquimod.

Formulation	LNP(imi_1)	LNP(imi_0.5)	LNP(imi_0.2)	LNP(imi_0.1)
Ratio massique d'Imiquimod introduit	1 %	0.5 %	0.2 %	0.1 %
Aspect de la formulation à l'œil nu	Non homogène	homogène	homogène	homogène
Taille de LNP(imi)	170 nm	68 nm	72 nm	73 nm
PDI	0.23	0.14	0.16	0.15
Dosage d'Imiquimod en fluorescence	-	180 µg soit 0.024 %	indéetectable	indéetectable

Table V.2. Comparaison des formulations de LNP(imi) en fonction du ration massique d'Imiquimod introduit.

L'encapsulation peu efficace de l'Imiquimod dans les LNP peut être due à un manque de compatibilité avec les lipides qui constituent le cœur. Une possibilité pour améliorer le taux de charge d'Imiquimod dans les LNP serait d'adapter la composition du cœur, en faisant par exemple varier le ratio cire/huile.

c. Double délivrance de l'antigène et de l'immunostimulant par une LNP unique

Nous avons préparé avec succès des particules vectorisant du MPLA ou de l'Imiquimod. Nous avons désormais la possibilité de greffer l'OVA sur ces LNP ou sur des LNP distinctes. Les groupes qui étudient la délivrance d'immunostimulants et d'antigènes décrivent dans la majorité des cas une co-délivrance dans les mêmes vecteurs dans le but de délivrer les deux éléments exactement aux mêmes cellules immunitaires afin d'optimiser leur activation spécifique contre l'antigène^{364,365}. Cependant, Mohsen et al ont récemment rapporté que cette co-vectorisation n'est justement pas indispensable pour cibler les mêmes cellules immunitaires et par conséquent induire des réponses immunitaires de grande amplitude¹³³. Les auteurs ont en effet démontré par imagerie et cytométrie de flux qu'un antigène (peptide p33 du virus de la chorioméningite lymphocytaire) et un immunostimulant (CpG) délivrés dans des VLP différentes mais injectés ensemble, étaient capables d'atteindre les mêmes ganglions lymphatiques et d'être capturés par les mêmes cellules présentatrices d'antigènes (DC et macrophages). Nos LNP étant sujettes au drainage lymphatique, nous allons donc explorer ces deux stratégies de vectorisation afin d'identifier la configuration la plus performante.

Nous avons donc réalisé le greffage de l'OVA sur des LNP(MPLA) et LNP(imi) selon la méthode décrite dans le chapitre IV. Les LNP ont été préparées en incorporant le MPLA ou l'Imiquimod dans la phase lipidique ainsi que des PEG fonctionnalisés dans la phase aqueuse. Après sonication, des solutions homogènes de LNP sont obtenues sur lesquelles l'OVA peut être greffée via la réaction de bioconjugaison thiol-maléimide. Il en résulte des particules LNP(MPLA)-OVA et LNP(imi)-OVA dont les taux de charge en antigène et en immunostimulant ont été quantifiés par les techniques décrites précédemment : chromatographie d'exclusion stérique et fluorescence pour l'OVA (*Figure V.3*) ; dosage de l'activité d'endotoxines du MPLA ; dosage de la fluorescence de l'Imiquimod. Les taux de charge mesurés sont résumés dans la *Table V.3*.

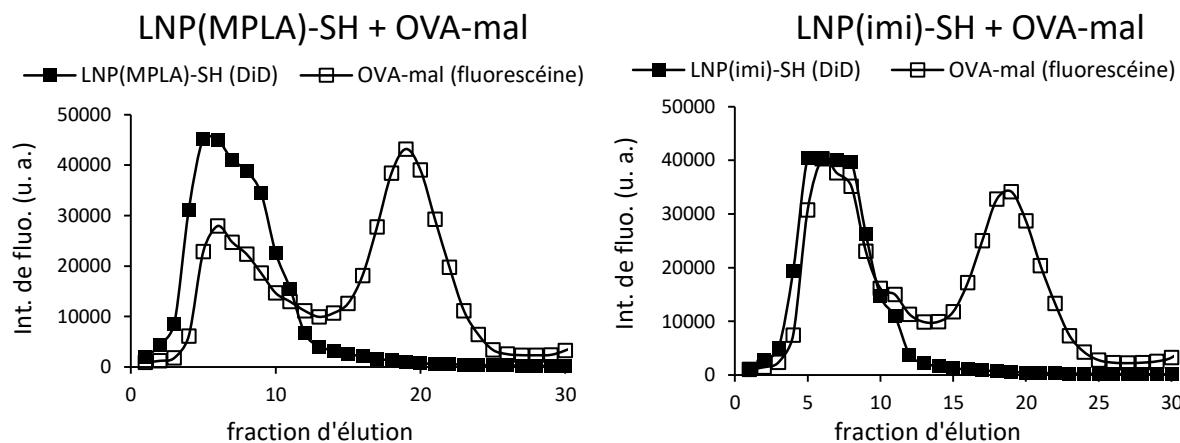


Figure V.3. Purification des LNP-OVA par chromatographie d'exclusion stérique.

Profils d'exclusion stérique des LNP(MPLA)-OVA et LNP(imid)-OVA, permettant de déterminer le taux de charge en OVA.

Taux de charge % massique	LNP(MPLA)-OVA	LNP(MPLA)	LNP(imid)-OVA	LNP(imid)	LNP-OVA
OVA	0.41	0	0.52	0	0.68
immunostimulant	0.50	0.50	0.019	0.024	0

Table V.3. Quantification du taux de charge des LNP doublement chargées en antigène et immunostimulant.

Afin de pouvoir comparer équitablement les deux stratégies de vectorisation de l'antigène et l'immunostimulant, les lots de particules ont été préparés exactement dans les mêmes conditions. Les taux de charge en MPLA et Imiquimod sont relativement constants : 0.50 % massique pour le MPLA et en moyenne 0.022 % massique pour l'Imiquimod. En revanche, le taux de charge en OVA varie selon la présence ou non d'un immunostimulant : de 0.41 % massique pour les LNP(MPLA)-OVA à 0.52 % massique pour les LNP(imid)-MPLA et 0.68 % massique pour les LNP-OVA. Ceci est dû à une diminution du rendement de greffage de l'OVA lorsque les LNP sont chargées avec un immunostimulant, ce qui est d'autant plus accentué dans le cas du MPLA. En effet, le rendement de greffage de l'OVA varie de 65 % pour les LNP-OVA à 50 % pour les LNP(imid)-OVA et 37 % pour les LNP(MPLA)-OVA, soit une diminution de 23 % en présence d'Imiquimod et de 43 % en présence de MPLA. Ces données montrent que la présence d'immunostimulant dans les LNP perturbe le greffage de l'OVA à leur surface, en particulier dans le cas du MPLA incorporé dans la couronne de tensioactifs. Nous supposons que cet effet est dû à la présence d'immunostimulant dans les LNP qui

modifie légèrement la structure globale des LNP. Dans le cas du MPLA, comme celui-ci s'incorpore complètement dans la membrane des LNP, il est possible qu'il prenne la place des PEG et que par conséquent moins de PEG fonctionnalisés soient finalement disponibles pour le greffage de l'OVA. Dans le cas de l'Imiquimod, la diminution du rendement de greffage de l'OVA est moindre mais néanmoins significative, ce qui implique que l'encapsulation de l'Imiquimod dans le cœur des LNP impacte également la configuration de la membrane lipidique, que ce soit par une moins bonne incorporation des PEG fonctionnalisés ou leur moindre disponibilité pour le greffage de l'OVA.

V.1.2 Etude d'immunogénicité des LNP immunostimulantes chez la souris

Une fois les différentes formulations de LNP vectorisant les immunostimulants MPLA ou Imiquimod et l'antigène OVA préparées, leur immunogénicité a été comparée dans une campagne d'immunisation de souris. Les animaux ont été immunisés par injection intra-péritonéale à deux reprises à 3 semaines d'intervalle. Compte-tenu du taux de charge en antigène et immunostimulant, les doses administrées ont dû être adaptées. L'OVA et le MPLA sont chargées de manière relativement homogène sur les LNP (respectivement 0.41 et 0.50 % massique). Ainsi, pour une dose d'OVA de 8 µg, la dose de MPLA correspondante est de 10 µg (*Table V.4*). En revanche, dans le cas des LNP vectorisant l'OVA et l'Imiquimod, le taux de charge en Imiquimod est beaucoup plus faible que celui de l'OVA (respectivement 0.019 et 0.52 % massique). Concrètement, cela signifie qu'en choisissant la dose habituelle d'OVA de 10 µg, la dose d'Imiquimod revient à 0.37 µg. Nous craignons que cette dose d'immunostimulant soit trop faible pour délivrer efficacement le signal de danger et décidons de l'augmenter à 1 µg, ce qui implique une dose de 27 µg d'OVA (*Table V.4*).

groupe	Dose OVA (µg)	Dose immunostimulant (µg)
LNP-OVA + LNP(MPLA) LNP(MPLA)-OVA	8	10
LNP-OVA + LNP(imi) LNP(imi)-OVA	27	1

Table V.4. Doses d'antigène et d'immunostimulant administrées aux souris.

La comparaison des deux techniques de vectorisation de l'antigène et de l'immunostimulant s'est portée sur la production d'anticorps spécifiques en réponse aux immunisations des souris (Figure V.4).

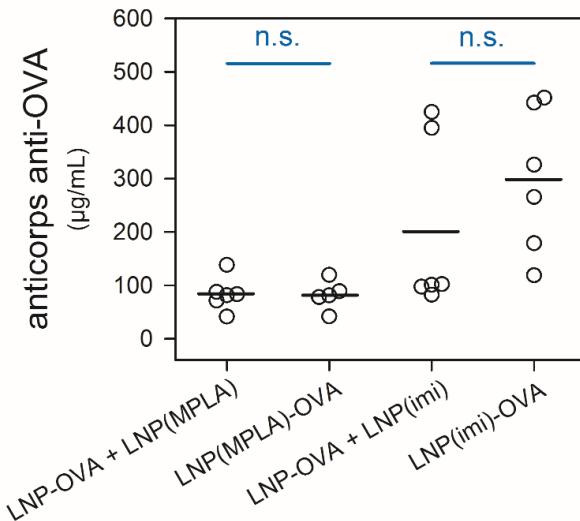


Figure V.4. Analyse de la réponse humorale anti-OVA et étude de la délivrance d'immunostimulants. Production d'anticorps spécifiques de l'OVA en réponse à des immunisations de souris avec des formulations de LNP-OVA adjuvées avec des formulations de MPLA ou d'Imiquimod. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe.

L'analyse des résultats montre que l'ensemble des configurations testées permet d'induire une réponse humorale, avec une production moyenne d'anticorps variant de 100 à 300 µg/mL. En revanche, la comparaison des deux techniques de vectorisation ne montre pas de différence significative. Dans le cas du MPLA, les deux groupes répondent de manière très homogène et avec la même amplitude. En revanche, dans le cas de l'Imiquimod les réponses sont beaucoup plus hétérogènes, avec des points variant de 100 à 450 µg/mL. Nous supposons que cette observation est la conséquence de la grande variation entre la dose d'antigène et la dose d'Imiquimod administrés. En effet, il est possible que la dose d'Imiquimod injectée de 1 µg soit à la limite de ce qui est requis pour activer efficacement les cellules immunitaires. En particulier, dans le groupe LNP-OVA + LNP(imi), quatre points répondent à hauteur de 100 µg/mL d'anticorps et deux points à hauteur de 400 µg/mL. Dans le cas des deux souris qui ont le mieux répondu, il est probable que les cellules présentatrices d'antigènes aient mieux capturé l'Imiquimod, ce qui induit une forte réponse humorale étant donné la dose très élevée d'OVA. Pour les 4 souris ayant moins bien répondu, la quantité d'Imiquimod finalement capturée par les cellules présentatrices d'antigènes était

probablement insuffisante pour induire une réponse aussi forte que chez les 2 autres souris. Cette différence d'une souris à l'autre au sein d'un même groupe peut s'expliquer d'une part par la variabilité individuelle, et d'autre part par la précision des injections lors des immunisations de souris. En effet, les volumes administrés étant de l'ordre de 100 à 200 µL, il est délicat de garantir sur des volumes si faibles que chaque souris reçoive exactement la même dose. Pour le groupe LNP(imi)-OVA, l'antigène et l'immunostimulant étant délivrés ensemble, cela diminue l'effet « binaire » de la réponse, sans pour autant influer sur la disparité des réponses.

Cette expérience nous montre donc sur l'exemple de deux immunostimulants que la co-vectorisation de l'antigène et de l'immunostimulant sur une même particule n'est pas indispensable pour l'induction de réponses immunitaires spécifiques. En outre, à immunogénicité égale, la stratégie qui consiste à vectoriser l'antigène et l'immunostimulant sur deux particules distinctes présente plusieurs avantages. Tout d'abord, le greffage de l'OVA est plus aisé et reproductible sur une LNP nue. D'autre part, cela procure une grande liberté sur l'ajustement des doses. En effet, lorsque les deux éléments sont portés par une même particule, les doses administrées dépendent de la cohérence des taux de charge des deux éléments. Typiquement, la différence entre la faible encapsulation de l'Imiquimod et le fort taux de charge en OVA ne laisse pas la possibilité de délivrer une dose optimale de chacun.

Enfin, nous avons remarqué que les formulations immunostimulantes préparées, qu'elles soient chargées ou non d'OVA, étaient moins stables que les formulations classiques d'OVA. En effet, celles-ci se sont déstabilisées après quelques mois de stockage à 4°C, ce que nous avons observé par un dépôt solide au fond des tubes dû à un relargage de cire ou d'immunostimulant, affectant l'intégrité des LNP. Pour la suite de notre étude, nous nous sommes donc orientés vers la vectorisation d'autres immunostimulants par une méthode autre que l'encapsulation.

V.2 Conception d'une formulation immunostimulante à base de CpG

V.2.1 Préparation de LNP cationiques pour la délivrance du CpG

Le CpG est un acide nucléique dont les propriétés immunostimulantes résultent de l'activation du récepteur TLR-9, exprimé notamment à l'intérieur des DC. L'activation des DC est donc conditionnée par l'accès du CpG au compartiment intracellulaire où ce récepteur est exprimé. De fait, l'utilisation d'outils permettant d'améliorer la délivrance du CpG aux DC est d'un grand intérêt. Le CpG étant un acide nucléique, il est chargé négativement de par la présence de groupements phosphates reliant les nucléotides entre eux. Une stratégie pour le vectoriser est donc d'utiliser un vecteur cationique, sur lequel l'acide nucléique chargé négativement sera fixé par interactions électrostatiques.

Notre groupe a récemment développé une formulation cationique de LNP pour la délivrance de siRNA (small interfering RNA). Nous avons tout naturellement utilisé ce candidat pour évaluer sa capacité à délivrer l'immunostimulant CpG. Cette particule cationique, notée LNP^+ , est obtenue en incorporant des lipides cationiques et fusogènes dans la formulation, tels que le DOTAP et le DOPE (*voir masses exactes partie expérimentale section VII.1.1 p.236*). Ces composés confèrent à la particule une charge de surface cationique, de l'ordre de +15 mV pour une taille d'environ 56 nm (*Table V.5*). Une formulation de LNP^+ contient en moyenne 4.80×10^{15} particules (*voir calcul partie expérimentale section VII.1.1 p.236*).

Formulation	Nb de lots	Taille (nm)	PDI	Charge à pH 7.0 (mV)
F50	4	52 ± 1	0.11 ± 0.03	-6.5 ± 0.7
LNP^+	10	56 ± 3	0.20 ± 0.04	$+15.1 \pm 2.4$

Table V.5. Taille et charge de surface moyennes des LNP^+ en comparaison avec leur équivalent neutre.

Tout comme les autres formulations de LNP, les LNP^+ ont une grande stabilité colloïdale, que nous avons mesurée par DLS jusqu'à 45 semaine après formulation (*Figure V.5*).

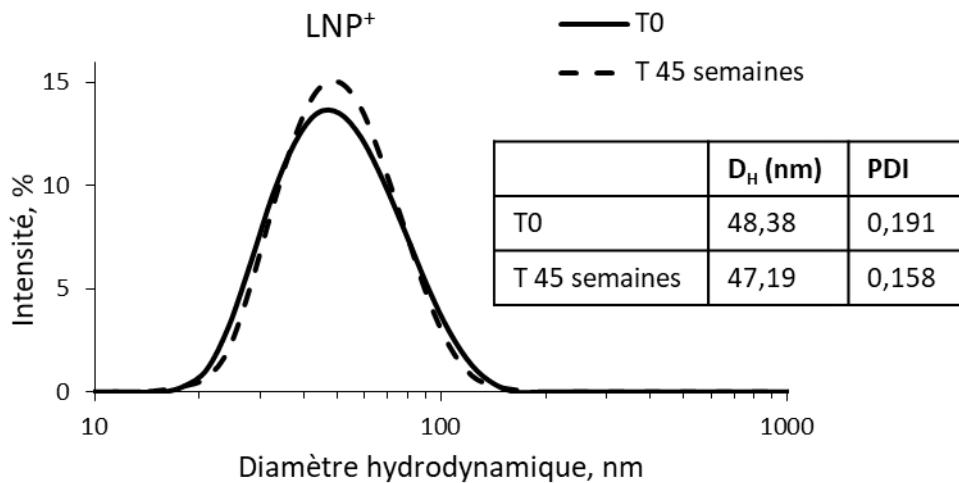


Figure V.5. Stabilité des LNP^+ .

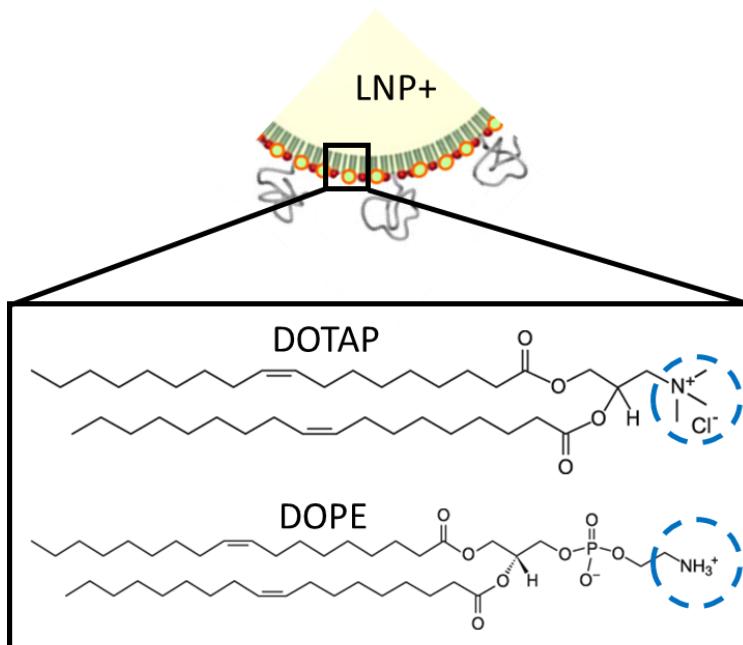
Superposition des profils de taille de LNP^+ mesurés par DLS le jour de la formulation et 45 semaines après conservation à 4°C.

La complexation d'acides nucléiques à la surface des LNP^+ est régie par l'équilibre entre les charges positives, portées par les fonctions amines des lipides cationiques (N pour amine) et les charges négatives, portées par les fonctions phosphates des liaisons entre les nucléotides du CpG (P pour phosphate). Nous définissons alors le taux de charge de CpG sur les LNP par le ratio N/P (*Figure V.6*). D'après l'expérience de notre groupe, il a été identifié qu'un ratio N/P égal à 48 (charges positives sur les LNP^+ en large excès par rapport aux charges négatives du CpG) était requis pour obtenir une particule finale satisfaisante, par sa stabilité et la complexation totale de l'acide nucléique en surface des LNP. Dans notre cas, un taux de charge de CpG sur les LNP à hauteur de N/P=48 correspond à un nombre de CpG par LNP égal à 22. Les masses de LNP^+ et de CpG à mélanger pour satisfaire un ratio N/P de 48 ainsi que les taux de charge résultant de cette complexation sont résumés dans la *Table V.6* (voir *calcul partie expérimentale section VII.1.7 p.241*). Le complexe obtenu est noté LNP^+/CpG .

Ratio N/P = 48	CpG
Masse de LNP^+	10 mg
Masse d'acide nucléique	34 μ g
Taux de charge (nombre)	22
Taux de charge (% massique)	0.34 %

Table V.6. Taux de charge du complexe formé entre les LNP^+ et le CpG.

$$N/P = \frac{nb\ de\ charges + (amines\ dans\ LNP^+)}{nb\ de\ charges - (phosphates\ dans\ acides\ nucléiques)}$$



CpG = cytosine-phosphate-guanine

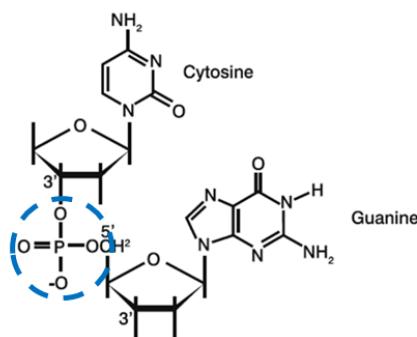


Figure V.6. Définition du rapport N/P.

Les charges positives sont portées par les amines des lipides cationiques DOTAP et DOPE constituant les LNP^+ , tandis que les charges négatives sont apportées par les groupements phosphates reliant les nucléotides des acides nucléiques CpG et poly(IC).

Au ratio choisi de N/P = 48, la complexation est totale entre les LNP^+ et le CpG, ce que nous avons confirmé par EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Le complexe LNP^+/CpG (canal 4) est comparé à une échelle de tailles (canal 1) et aux contrôles CpG (canal 2) et LNP^+ (canal 3) (Figure V.7). Le CpG libre migre par électrophorèse pour former une bande caractéristique, tandis que les LNP^+ , beaucoup plus grosses, restent dans le puits de dépôt et sont donc invisibles. Si la complexation entre les LNP^+ et le CpG n'était pas totale, une bande serait visible à la même hauteur que celle provenant du contrôle CpG. Or, dans le canal de LNP^+/CpG , aucune bande n'est apparue ce qui confirme que tout le CpG est complexé à la surface des LNP^+ qui sont restées dans le puits de dépôt.

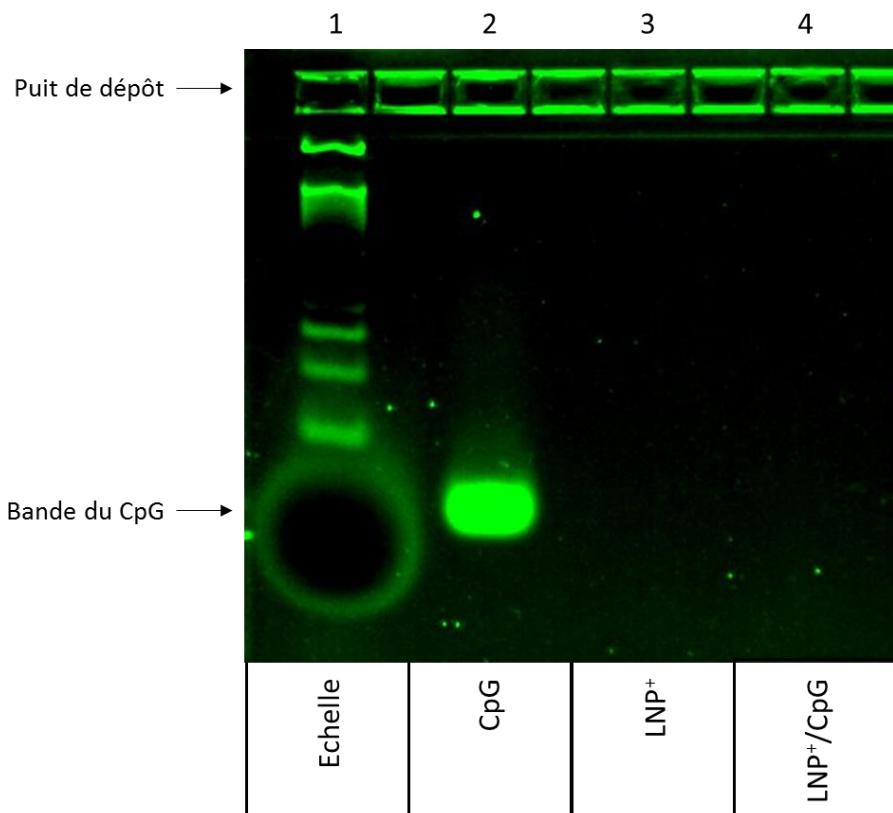


Figure V.7. Analyse de la complexation du CpG sur les LNP^+ par électrophorèse sur gel.

Le complexe LNP^+/CpG ne produit pas de bande caractéristique du CpG libre, ce qui confirme que la complexation est totale. Cette expérience n'étant pas destinée à une analyse quantitative, l'image a été retravaillée sur ImageJ dans le but d'améliorer sa médiocre qualité (coloriage vert, augmentation du contraste).

V.2.2 Comportement des LNP⁺ en milieu cellulaire

a. Evaluation de la cytotoxicité des LNP⁺

La composition de ces nouvelles LNP étant différente des LNP classiques, leur cytotoxicité sur des fibroblastes NIH/3T3 a été contrôlée. Les cellules ont été exposées pendant 24h à une gamme de concentrations de LNP variant de 200 µg/mL à 3 mg/mL afin de déterminer la concentration maximale à laquelle nous pouvons travailler sans altérer les cellules (Figure V.8).

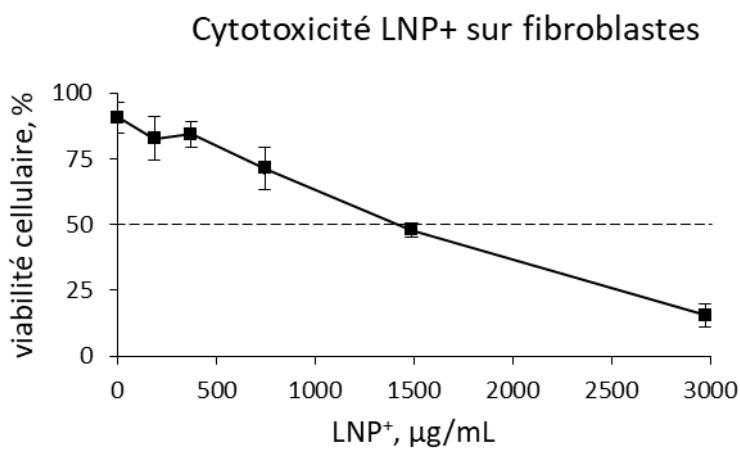


Figure V.8. Evaluation de la cytotoxicité des LNP⁺.

Cytotoxicité mesurée sur des fibroblastes NIH/3T3 après une exposition de 24h. Cette expérience a été réalisée par Mathieu Repellin.

L'analyse des résultats montre que tout comme leurs analogues neutres, les LNP⁺ sont très bien tolérées par les cellules, puisque la limite de 50 % de mortalité (IC50) est atteinte à une concentration de 1500 µg/mL de LNP⁺. La valeur de cet indicateur est comparable à celle obtenue pour les LNP neutres, qui se trouvait aux alentours de 2000 µg/mL. Nous confirmons ainsi que les LNP⁺ préparées sont adaptées à une utilisation biologique.

b. Evaluation de la délivrance intracellulaire du CpG par les LNP⁺

Les LNP⁺ ont pour rôle de délivrer le CpG qu'elles portent à l'intérieur des DC, où est localisé le TLR-9 ciblé. Nous avons contrôlé l'efficacité de cette délivrance par microscopie confocale. Des DC ont été exposées pendant 1h au complexe LNP⁺/CpG doublement marqué en fluorescence (DiD pour les LNP⁺ et FITC pour le CpG). Les cellules ont ensuite été fixées sur lamelles et la membrane cellulaire marquée en fluorescence (cholera-toxin-PE). L'analyse des lames au microscope confocal nous

permet de déterminer la position des éléments constituant la formulation de CpG au niveau des cellules (Figure V.9). Les images montrent clairement que les LNP⁺ (première image en rouge) et le CpG (deuxième image en vert) sont internalisés par les DC après 1h d'exposition, car ils sont visibles à l'intérieur de la membrane cellulaire (orange). La troisième image représente la superposition des fluorescences émises par les LNP⁺ et le CpG. La co-localisation des deux éléments est visible par une coloration jaune vif (superposition du rouge et du vert). Cette image semble montrer que les LNP⁺ et le CpG sont toujours complexés après avoir été internalisés par les DC. Il est donc vraisemblable que les LNP⁺ et le CpG soient capturés par les DC sous forme de complexe, ce qui confirme que les LNP⁺ délivrent le CpG efficacement à l'intérieur des DC.

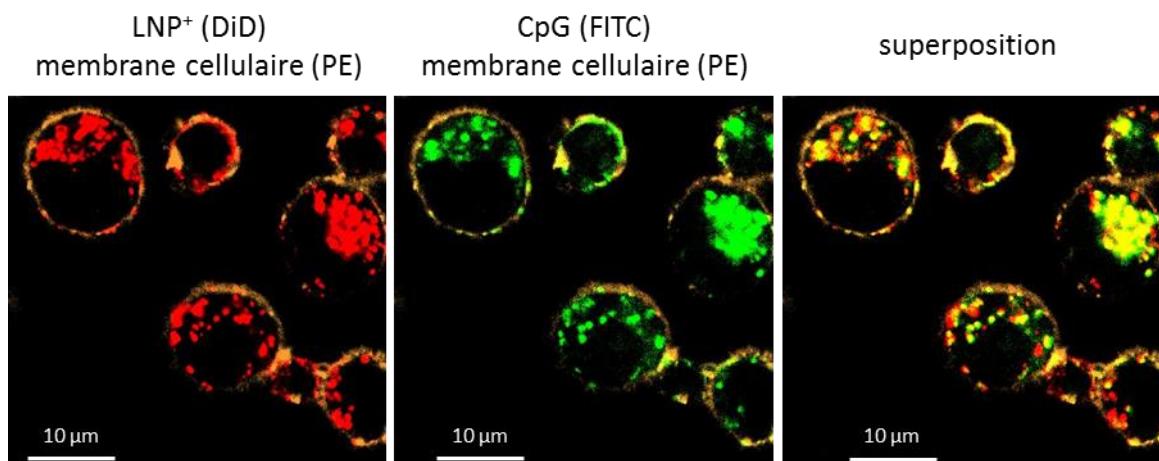


Figure V.9. Localisation des LNP⁺/CpG après 1h d'exposition aux DC.

Les LNP⁺ sont chargées avec du DiD (coloration rouge), le CpG est marqué FITC (coloration verte) et la membrane cellulaire est colorée PE (coloration orange). La coloration jaune vif est due à la superposition des LNP⁺ (rouge) et du CpG (vert).

c. Evaluation de l'activation des DC par les formulations de CpG

La délivrance du CpG à l'intérieur des DC grâce aux LNP⁺ peut en conséquence impacter l'activation de ces cellules. De plus, afin de modifier la charge de surface des LNP, des lipides cationiques tels que le DOTAP ont été incorporés dans la formulation. Or, le DOTAP a été décrit comme ayant des propriétés immunostimulantes intrinsèques, notamment l'activation des DC par l'expression des marqueurs CD80 et CD86³⁶⁶. Nous avons donc évalué l'activation des DC par le complexe LNP⁺/CpG, en comparant avec les LNP⁺ et CpG seuls dans le but de déterminer la contribution de chacun des deux éléments. Les DC ont été exposées à 3 doses de CpG (1, 2 et 5 µg/mL) et l'équivalent de LNP⁺ et LNP⁺/CpG pendant 24h, puis leur activation a été mesurée en cytométrie de flux. Nous avons pour

cela sélectionné le récepteur TNF CD40, les molécules CD80 et CD86 délivrant le signal de co-stimulation, ainsi que les molécules de CMH-II dont l'expression a été mesurée à l'aide d'anticorps fluorescents.

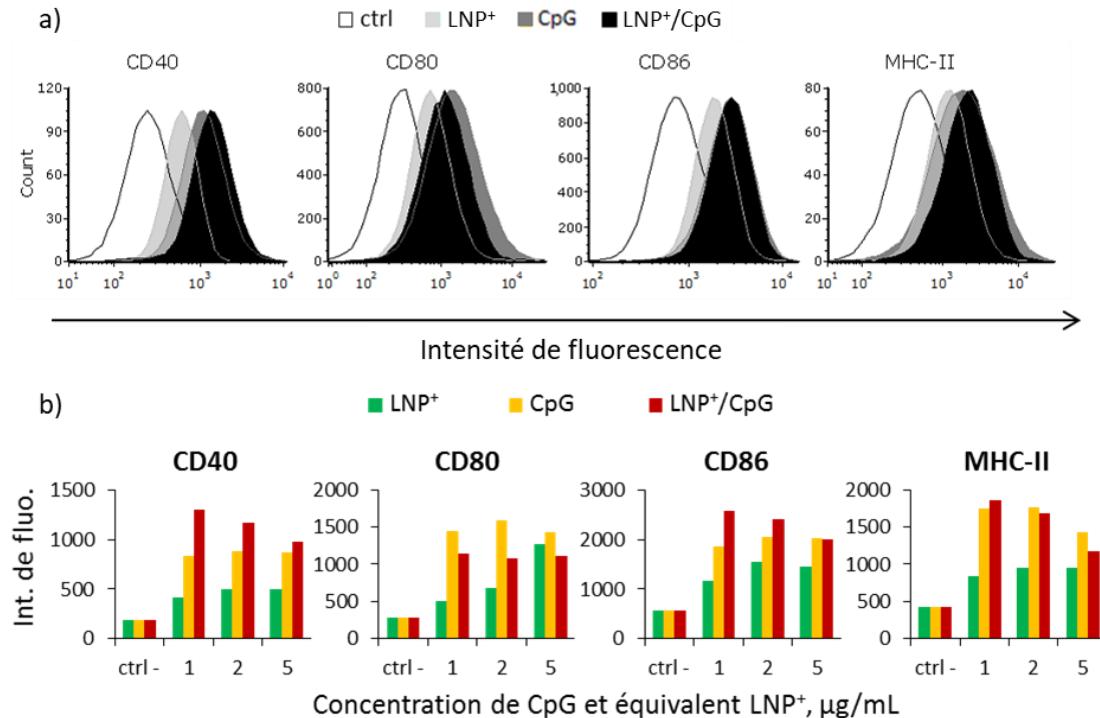


Figure V.10. Activation des DC par les formulations de CpG.

Activation des DC par les formulations de CpG traduite par l'expression des marqueurs CD40, CD80, CD86 et CMH-II après une exposition de 24h à une dose de a) 2 $\mu\text{g/mL}$ de CpG ou l'équivalent de LNP⁺ ou b) 1, 2, 5 $\mu\text{g/mL}$ de CpG ou l'équivalent de LNP⁺.

Les résultats montrent que toutes les formulations sont capables d'activer les DC qui surexpriment les 4 marqueurs étudiés (Figure V.10 a). La comparaison des différents éléments nous permet de constater que les LNP⁺ seules activent les DC avec une moindre intensité que le CpG libre. En conséquence, la combinaison des LNP⁺ et de CpG favorise l'activation des DC par rapport aux éléments seuls, en particulier l'expression des marqueurs CD40 et CD86 selon la concentration de CpG, tandis que l'expression des marqueurs CD80 et CMH-II est peu affectée. La comparaison des 3 doses d'immunostimulants montre un effet croissant ou décroissant sur l'activation cellulaire, selon la formulation utilisée et le marqueur observé (Figure V.10 b). En conséquence, nous avons sélectionné la dose intermédiaire de 2 $\mu\text{g/mL}$ pour les futures expériences *in vitro* impliquant ces immunostimulants. Cette expérience souligne le bénéfice de la vectorisation du CpG par les LNP⁺ sur l'activation des DC, nécessaire à l'induction de réponses immunitaires.

d. Impact de la combinaison immunostimulante sur la présentation de l'antigène

Nous avons déjà observé dans le chapitre IV que la vectorisation de l'OVA améliore considérablement la présentation de l'antigène par les DC aux LT. Lors de cette première expérience, nous n'avions étudié que la formulation de l'OVA (libre ou vectorisée), l'immunostimulant LPS étant maintenu constant. Nous nous interrogeons désormais sur l'influence de la formulation immunostimulante sur la présentation de l'antigène par les DC aux LT.

Pour cela, nous avons comparé toutes les combinaisons possibles d'OVA et de CpG, qu'ils soient vectorisés ou sous forme libre, dans notre expérience modèle de présentation d'antigène à l'aide de LT purifiés à partir de souris OT-II, donc spécifiques de l'OVA. Après avoir exposé les DC primaires aux formulations de LNP et co-cultivé ces cellules avec les LT pendant 4 jours, nous avons dosé la sécrétion de cytokines dans les surnageants. L'IL-13 a été sélectionné comme marqueur de la polarisation des LT vers Th2 et l'IFNy pour la polarisation Th1 (*Figure V.11*). Les résultats montrent tout d'abord que la sécrétion de ces 2 cytokines est augmentée de manière importante grâce à la seule vectorisation de l'OVA, d'un facteur 15 pour l'IL-13 et d'un facteur 8 pour l'IFNy dans le meilleur des cas (LNP-OVA + immunostimulant vs OVA + immunostimulant). Ensuite, le choix de l'immunostimulant impacte cette augmentation de manière différente selon la cytokine mesurée. La production d'IL-13, est favorisée par l'emploi du complexe LNP⁺/CpG, tandis que le CpG sous forme libre stimule fortement la production d'IFNy. En revanche, les LNP⁺ seules sont moins performantes, ce qui est cohérent avec leur moindre capacité d'activation. D'après cette expérience, il semblerait que le choix de la formulation immunostimulante, CpG libre ou complexe LNP⁺/CpG impacte la polarisation Th1 ou Th2 de la réponse immunitaire, à savoir l'activation des LT cytotoxiques ou des LB pour la production d'anticorps, respectivement.

Présentation d'antigène sur CMH-II

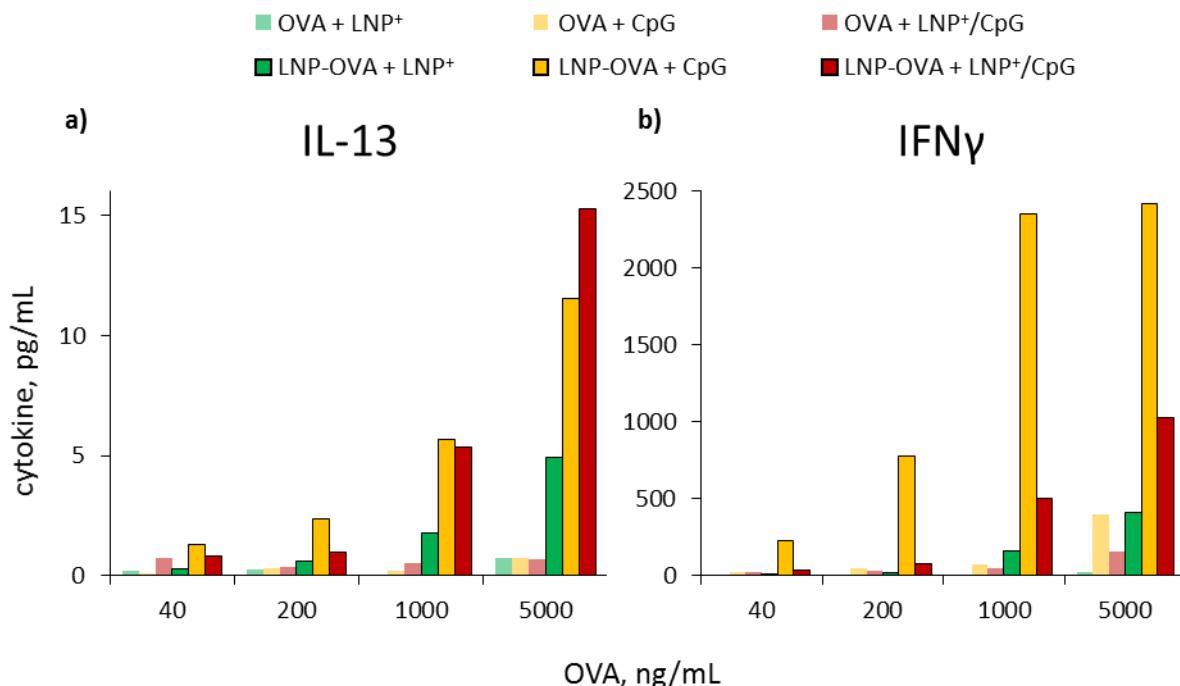


Figure V.11. Présentation de l'antigène par les DC aux LT issus d'OT-II.

Production d'IL-13 et d'IFN γ en réponse à la présentation de l'OVA par les DC aux LT. Comparaison de formulations d'OVA et de CpG.

V.2.3 Etude d'immunogénicité des formulations de CpG chez la souris

Suite aux expériences *in vitro* permettant de caractériser les nouvelles formulations d'OVA et de CpG, leur immunogénicité a été évaluée *in vivo* lors de campagnes d'immunisations sur souris. Nous avons dans un premier temps sélectionné les 3 groupes suivants afin d'étudier l'impact de la vectorisation de l'OVA d'une part et du CpG d'autre part sur la réponse humorale mais aussi cellulaire :

- LNP-OVA + LNP⁺/CpG
- LNP-OVA + CpG
- OVA + CpG

Pour cela, lors de l'euthanasie des souris pour collecter leur sang et doser les anticorps, nous avons également prélevé leurs rates afin d'en extraire les cellules immunitaires. Les splénocytes ont été restimulés avec l'antigène OVA pendant 3 jours, ce qui est suivi du dosage de cytokines produites par les cellules. La sécrétion d'IFN γ traduit l'activité des LT en réponse à la stimulation par l'antigène, qui est reconnu suite à la présentation préalable par les DC lors des immunisations.

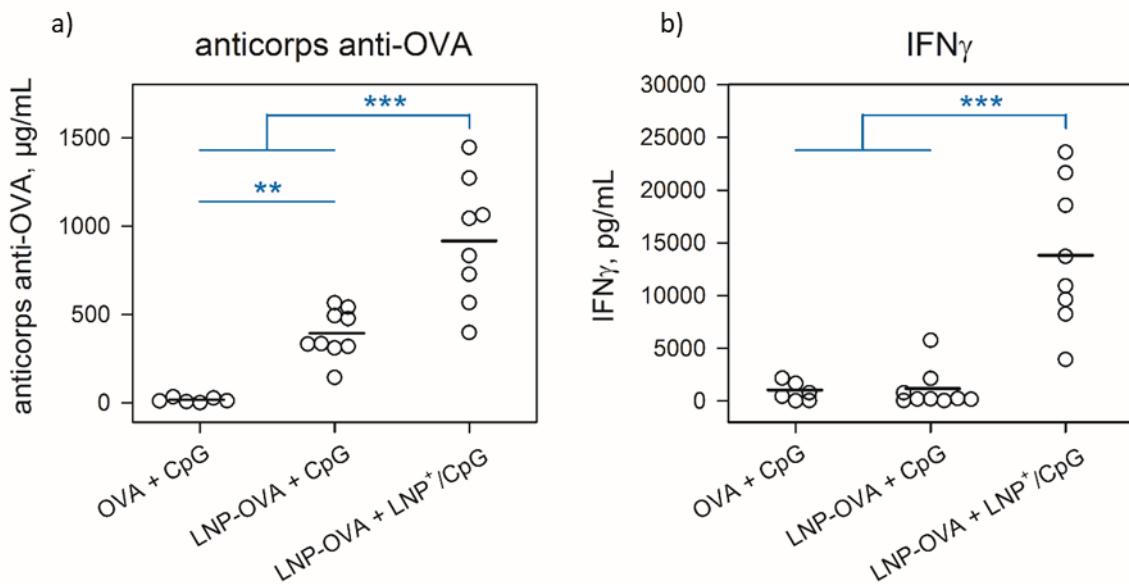


Figure V.12. Analyse de la réponse humorale et cellulaire anti-OVA sur les groupes avec le CpG.

Réponses immunitaires évaluées chez des souris immunisées avec différentes formulations d’OVA et de CpG par a) la production d’anticorps spécifiques et b) la production d’IFN γ par les splénocytes stimulés avec l’antigène. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe. Analyse statistique ANOVA-1 suivie du test de Fisher.

*** $p<0.001$; ** $p<0.01$; * $p<0.05$.

L’analyse des réponses immunitaires obtenues montre que la vectorisation du CpG en plus de la vectorisation de l’OVA permet d’augmenter de manière significative la production d’anticorps spécifiques (LNP-OVA + LNP⁺/CpG : 918 ± 125 µg/mL vs LNP-OVA + CpG µg/mL : 390 ± 46 ; $p<0.001$) (Figure V.12 a). L’évaluation de la réponse cellulaire en IFN γ souligne de plus l’importance de délivrer le CpG via les LNP⁺, car la double vectorisation de l’OVA et du CpG est la seule configuration permettant d’induire une activation cellulaire importante et significative (LNP-OVA + LNP⁺/CpG : 13776 ± 2441 pg/mL ; $p<0.001$ par rapport aux autres groupes) (Figure V.12 b). Cependant, la seule vectorisation de l’OVA induit une sécrétion d’IFN γ du même niveau que dans le groupe contrôle OVA + CpG, réponse assez hétérogène (OVA + CpG : 855 ± 363 pg/mL vs LNP-OVA + CpG : 1063 ± 629 pg/mL).

Si l’on s’attarde sur le groupe contrôle OVA + CpG, on remarque qu’il ne produit pas du tout d’anticorps, par contre les souris répondent en IFN γ . Cette remarque est en accord avec les propriétés immunostimulantes connues du CpG qui favorise la polarisation Th1^{143,144}, ce que nous avons d’ailleurs confirmé sur la présentation *in vitro* de l’antigène. En revanche, la très forte réponse

IFN γ obtenue avec les LNP $^+$ /CpG n'était pas nécessairement attendue car nous avions observé un phénotype Th2 lors de l'analyse de la présentation *in vitro* de l'antigène. Ce résultat nous suggère donc que la réponse cellulaire observée est le fait de la présentation croisée de l'antigène en conséquence de la vectorisation du CpG par les LNP $^+$, ce que nous n'avons pas déterminé *in vitro*.

Nous nous sommes alors interrogés sur la contribution des seules LNP $^+$ /CpG dans l'induction de tels niveaux de réponses. Pour répondre à cette question, nous avons lancé une seconde campagne d'immunisation dans le but de confirmer les premiers résultats obtenus et en rajoutant le groupe OVA + LNP $^+$ /CpG (Figure V.13).

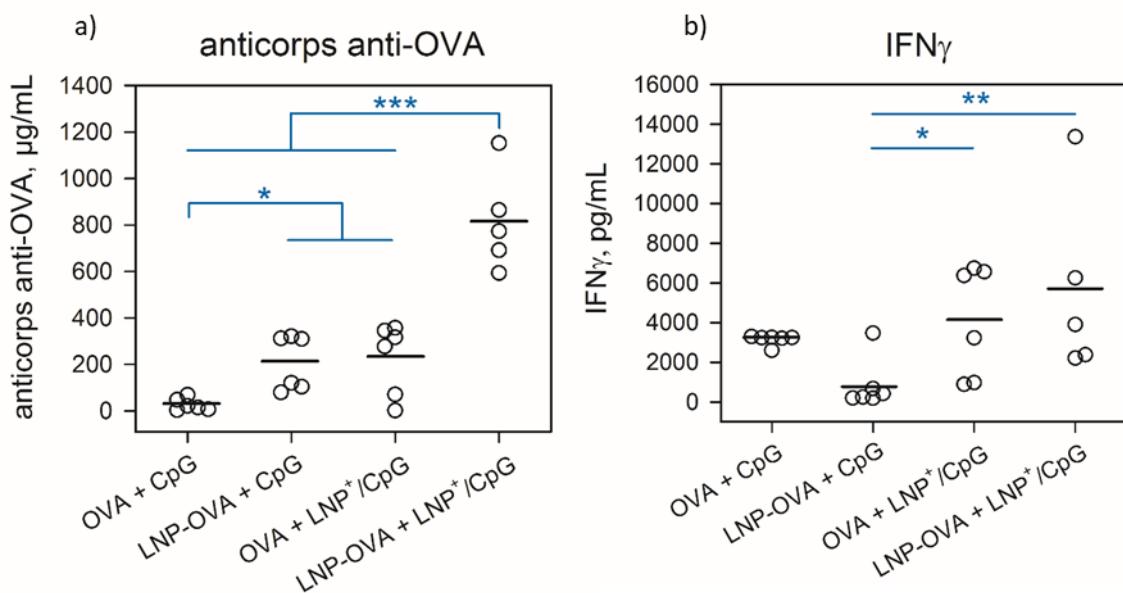


Figure V.13. Analyse de la réponse humorale et cellulaire anti-OVA et effet des LNP $^+$.

Deuxième campagne évaluant les réponses immunitaires de souris immunisées avec les formulations d'OVA et de CpG, par a) la production d'anticorps spécifiques et b) la production d'IFN γ par les splénocytes stimulés avec l'antigène. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe. Analyse statistique ANOVA-1 suivie du test de Fisher.

*** $p<0.001$; ** $p<0.01$; * $p<0.05$.

Les résultats obtenus lors de cette deuxième campagne n'ont pas la même amplitude que dans la précédente, mais les tendances entre les groupes sont conservées dans la majorité des cas. L'analyse de la réponse humorale confirme l'intérêt de la double vectorisation de l'OVA et du CpG, qui permet d'augmenter de manière significative la production d'anticorps spécifique par rapport à tous les autres groupes (Figure V.13 ; $815 \pm 96 \mu\text{g/mL}$, $p<0.001$). Ce résultat est la somme des améliorations

apportées d'une part avec la simple vectorisation de l'OVA, qui permet de multiplier par 8 le taux d'anticorps (LNP-OVA + CpG : $207 \pm 48 \mu\text{g/mL}$ vs OVA + CpG : $27 \pm 11 \mu\text{g/mL}$; $p=0.038$) et d'autre part avec la simple vectorisation du CpG qui augmente également le taux d'anticorps d'un facteur 8 (OVA + LNP⁺/CpG : $228 \pm 62 \mu\text{g/mL}$ vs OVA + CpG : $27 \pm 11 \mu\text{g/mL}$; $p=0.022$).

Cependant, l'analyse de la production d'IFNy par les splénocytes montre une tendance différente que celle obtenue lors de la campagne préliminaire. En effet, le groupe contrôle OVA + CpG produit une réponse surprenante car très importante et homogène ($3137 \pm 110 \text{ pg/mL}$), tandis que le groupe immunisé avec l'OVA vectorisée produit une réponse bien plus faible ($864 \pm 526 \text{ pg/mL}$). De plus, nous observons que la simple vectorisation du CpG génère une production d'IFNy légèrement supérieure au groupe contrôle mais plus hétérogène ($4125 \pm 1141 \text{ pg/mL}$). Finalement, la combinaison des deux vectorisations de l'OVA et du CpG permet d'induire une réponse cellulaire plus importante mais toujours très hétérogène ($5619 \pm 2067 \text{ pg/mL}$). Ces données supplémentaires nous indiquent que la seule vectorisation du CpG influe fortement sur les réponses immunitaires, puisqu'elle est à l'origine d'une production d'anticorps de même amplitude que dans le cas de la simple vectorisation de l'OVA. De plus, la réponse IFNy est aussi stimulée de manière importante par la vectorisation du CpG. Cependant, le résultat surprenant observé sur le groupe contrôle nous conduit à nous interroger sur l'origine de l'IFNy sécrété. Nous nous proposons par conséquent de déterminer sur une dernière campagne la nature des cellules productrices de l'IFNy, en bloquant la sécrétion des cytokines par traitement à la brefeldin A, afin que l'IFNy soit conservé à l'intérieur des cellules (inhibiteur du transport de protéines depuis le réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi). Nous avons ensuite réalisé des marquages fluorescents pour pouvoir distinguer les LT CD4 et CD8. Après fixation et perméabilisation des cellules, nous avons marqué en fluorescence la présence d'IFNy à l'intérieur des cellules, pour une analyse en cytométrie de flux. Enfin, puisque des nouvelles souris doivent être immunisées, nous en profitons également pour réaliser un isotypage des anticorps produits afin d'en apprendre plus sur la qualité de la réponse humorale.

La production intracellulaire d'IFNy est exprimée en termes de pourcentages de LT CD4 ou CD8 positifs à l'IFNy par rapport au nombre total de LT CD4 ou CD8. L'analyse des LT producteurs d'IFNy montre des effets distincts de la vectorisation de l'OVA et du CpG (*Figure V.14*). En particulier, la vectorisation de l'OVA favorise exclusivement l'activation des LT CD8, tandis que la vectorisation du CpG induit l'activation des 2 sous-classes de LT, CD4 et CD8. Cette expérience est un exemple de plus qui montre que la double vectorisation de l'OVA et du CpG permet d'ajouter ces avantages afin de stimuler de manière significative les LT CD4 ($p<0.01$ par rapport à OVA + CpG et LNP-OVA + CpG) et CD8 ($p<0.001$ par rapport à OVA + CpG). Curieusement, le groupe contrôle OVA + CpG qui était à

l'origine d'une sécrétion importante d'IFNy par les splénocytes (Figure V.13) ne stimule que très peu les LT dans cette expérience. Si l'on compare l'ensemble de ces données avec la première campagne réalisée sur ces groupes (Figure V.12), il apparaît que la réponse IFNy obtenue dans le groupe OVA + CpG est très variable d'une campagne sur l'autre. Certes, nous avons souvent observé des variations d'amplitude de la réponse entre différentes campagnes d'immunisation, mais les tendances entre les groupes étaient constantes. Dans ce cas particulier, le groupe OVA + CpG est capable d'induire une réponse aussi bien médiocre qu'excellente, alors que les autres groupes testés restent constants, ce qu'il nous est difficile d'expliquer.

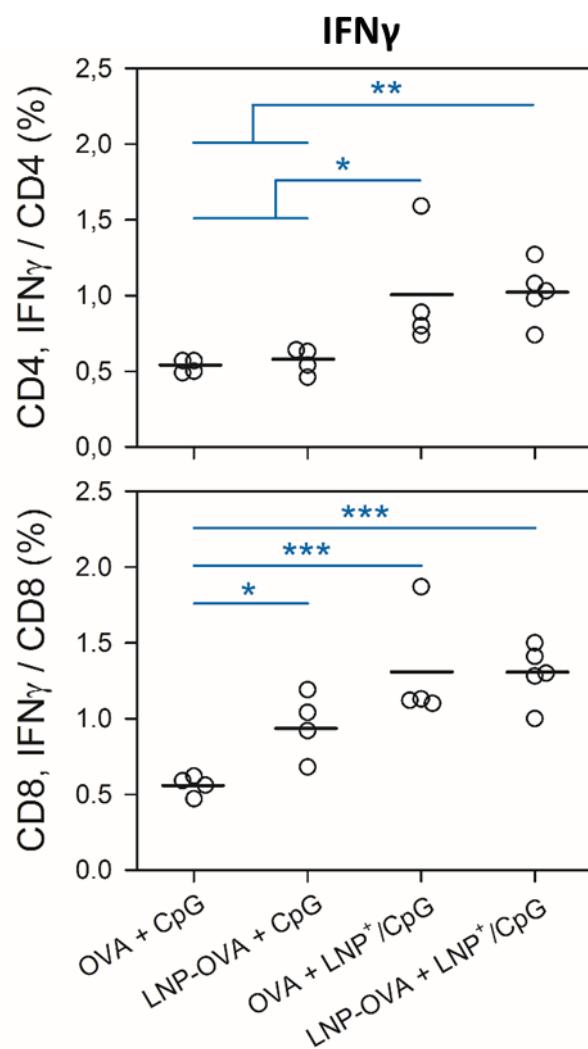


Figure V.14. Analyse des cellules impliquées dans la réponse cellulaire anti-OVA.

Production intracellulaire d'IFNy par les LT CD4 et CD8 issus de souris immunisées avec des formulations d'OVA et de CpG et restimulés avec l'antigène. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe. Analyse statistique ANOVA-1 suivie du test de Fisher.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

L'analyse de l'isotypage des anticorps produits nous a permis de quantifier la production d'IgG1, IgG2a et IgA, qui sont des marqueurs respectifs de la polarisation Th2, Th1 et de l'immunité mucosale (*Figure V.15*). Les résultats obtenus montrent que la vectorisation de l'OVA favorise exclusivement la production d'IgG1 (LNP-OVA + CpG vs OVA + CpG : $p=0.028$). D'autre part, la seule vectorisation du CpG stimule principalement la production d'IgG2a, bien que la différence par rapport au CpG libre ne soit pas significative. En conséquence, le groupe de souris immunisées avec la double vectorisation de l'OVA et du CpG combine les effets individuels de chaque élément pour générer une production significativement plus importante d'IgG1 et d'IgG2a. De plus, la formulation LNP-OVA + LNP⁺/CpG est la seule capable d'induire une production significative d'IgA ($p<0.01$ par rapport aux autres groupes). Cette analyse de l'isotypage souligne cette fois-ci que les LNP⁺/CpG favorisent la polarisation Th1 de la réponse, ce qui diffère des conclusions déduites de l'analyse de la présentation *in vitro* de l'antigène, qui suggérait plutôt un phénotype Th2.

Malgré certaines variations observées entre nos différentes expériences, notamment le cas du groupe contrôle OVA + CpG capable de générer une réponse cellulaire faible ou très élevée, ou encore concernant la polarisation Th1 ou Th2 induite par l'immunostimulant CpG sous forme libre ou vectorisé, l'ensemble de ces résultats s'accorde sur la conclusion que la combinaison LNP-OVA + LNP⁺/CpG est la plus performante. Dans l'ensemble de nos analyses, nous avons observé que cette formulation combine les avantages procurés par la vectorisation de l'OVA d'une part et du CpG d'autre part. Il en résulte une formulation capable d'induire une production élevée d'anticorps de phénotype variés, IgG1, IgG2a et IgA, accompagnée d'une forte réponse cellulaire impliquant l'activation des LT CD4 et CD8.

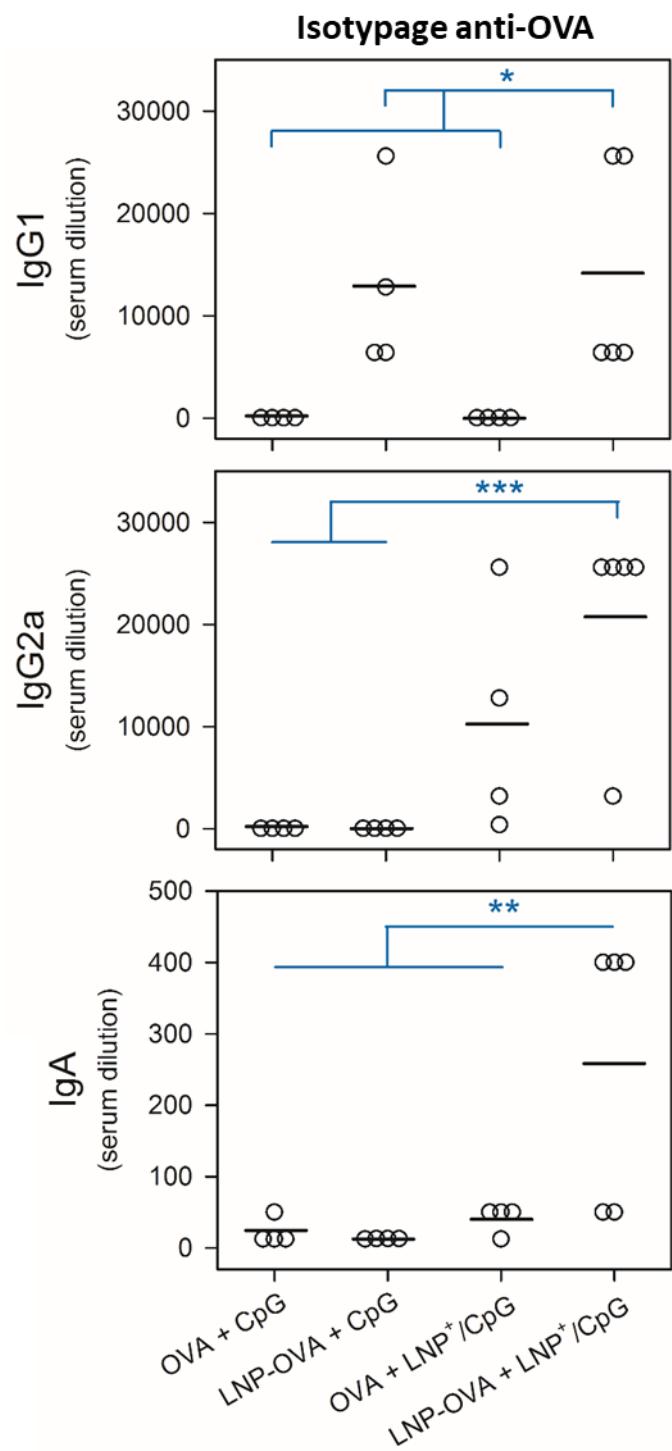


Figure V.15. Analyse des isotypes d'anticorps anti-OVA produits.

Production d'anticorps spécifiques de l'OVA d'isotypes IgG1, IgG2a et IgA en réponse à des immunisations de souris avec des formulations comprenant l'OVA et le CpG sous forme libre ou vectorisée. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe.

Analyse statistique ANOVA-1 suivie du test de Fisher. *** $p<0.001$; ** $p<0.01$; * $p<0.05$.

V.3 Etude de protection chez la souris à l'aide d'un modèle de tumeur exprimant l'OVA

Jusqu'à présent, nous nous sommes contentés d'évaluer les réponses immunitaires induites lors d'immunisations de souris avec les formulations d'OVA, en quantifiant la production d'anticorps et l'activation des LT. La prochaine étape est de quantifier les réponses cellulaires effectrices, notamment cytotoxiques. Dans cet objectif, nous avons réalisé une expérience de protection contre la croissance tumorale grâce à un modèle de cellules tumorales exprimant l'antigène OVA.

V.3.1 Protocole de l'étude

Les cellules tumorales dont nous disposons sont des mélanocytes B16 qui ont été transfectés de sorte d'exprimer l'OVA dans le cytoplasme de manière stable et durable (B16-OVA)³⁶⁷. Ainsi, l'OVA est réduite en peptides par le protéasome qui sont ensuite chargés sur des molécules de CMH-I pour être présentés à la surface des cellules. Dans le but d'étudier la protection conférée par les formulations d'OVA, des souris sont préalablement immunisées selon le modèle habituel, à savoir 2 injections intrapéritonéales à 3 semaines d'intervalle constituées de l'équivalent de 10 µg d'OVA et 10 µg de CpG. Une semaine après la 2^{ème} injection, les cellules tumorales B16-OVA sont implantées dans les souris par une injection sous-cutanée au niveau du bas droit du dos (10^5 cellules dans 100 µL de PBS). La zone autour du point d'injection est rasée afin d'observer la croissance tumorale. Les cellules B16 ont été dérivées de souris C57BL/6, par conséquent nous réalisons cette étude sur des souris C57BL/6 et non BALB/c comme lors de nos campagnes d'immunisations. Les souris ont fait l'objet d'un suivi régulier, tous les 2-3 jours (voire tous les jours lorsque la tumeur est grosse) pour mesurer précisément la taille des tumeurs à l'aide d'un pied à coulisso. Trois dimensions sont mesurées : la petite largeur, la grande largeur et la hauteur de la tumeur qui se présente généralement sous forme plus ou moins sphérique. Le volume tumoral est estimé en multipliant ces 3 dimensions.

La tumeur n'est pas sensée provoquer de gêne ou douleur chez la souris. Cependant, les souris sont surveillées de manière approfondie afin de détecter les éventuels signaux de souffrance causés par les tumeurs. Nous accordons une attention particulière aux signaux de détresse suivants regroupés dans la Table V.7.

Gravité	Catégorie 1	Catégorie 2	Catégorie 3
Signaux de détresse	Soin du pelage Ouverture des yeux Position des moustaches Position des oreilles	Position prostrée Isolement mobilité	Capacité à se déplacer

Table V.7 : Signaux de détresses à surveiller au cours de l'étude et leur degré de gravité.

Nous avons ainsi défini des points limites nous permettant de jauger le niveau de détresse de l'animal dans le but de prendre une décision adaptée, à savoir l'exclusion de l'expérience et l'euthanasie. Les premiers signaux d'alerte sont un pelage mal entretenu, des yeux plissés ou des moustaches et oreilles tombantes, indiquant une souffrance légère à modérée si l'ensemble de ces signaux sont observés. Si l'animal adopte une position prostrée, isolée et/ou immobile, cela traduit une souffrance modérée à grave dans le cas où l'ensemble de ces observations sont faites. Enfin, une incapacité à se déplacer implique une incapacité à se nourrir ou s'abreuver et constitue un signe de souffrance grave. Lorsque l'analyse des signaux mène à la conclusion qu'une souris se trouve en état de souffrance grave, elle est automatiquement retirée de l'étude et euthanasiée sans attendre. Outre ces observations sur l'état général des souris, la taille de la tumeur ne doit pas dépasser 1000 mm³, ce qui constitue le dernier point limite impliquant l'euthanasie de la souris. La tumeur se développant relativement vite et de manière exponentielle, nous estimons qu'une tumeur ayant atteint une taille d'au moins 800 mm³ doit conduire à l'euthanasie de la souris, au risque de dépasser le point limite le jour suivant. Lorsqu'une souris atteint le point limite final, l'euthanasie est suivie d'une dissection afin de récupérer la tumeur qui sera ensuite fixée en paraffine pour d'éventuelles analyses ultérieures.

V.3.2 Test préliminaire de validation

Nous avons dans un premier temps tenté de caractériser les cellules afin de confirmer la présence de l'OVA dans le cytoplasme. Pour cela, nous avons procédé par immunocytochimie, en fixant les cellules sur les lamelles et en réalisant des marquages à l'aide d'anticorps spécifiques de l'OVA. Cependant, nous avons eu de grandes difficultés lors de ces expériences au niveau du marquage, si bien qu'aucune ne fût concluante. Nous nous sommes donc proposés de réaliser un test préliminaire sur 2 souris, nous permettant en même temps de valider le protocole expérimental.

Pour cela, 2 souris sont immunisées avec la formulation la plus performante LNP-OVA + LNP⁺/CpG (LNP_1 et LNP_2) et comparées à 2 souris contrôles injectées avec du PBS (CTRL 1 et CTRL 2). Une tumeur commence à être visible dès 8 jours sur les 2 souris CTRL et à 12 jours sur la souris LNP_2 (Figure V.16). L'autre souris immunisée LNP_1 ne développe pas de tumeur. La différence observée entre les souris immunisées et les souris contrôles nous confirme tout d'abord que les cellules B16 expriment bien l'OVA, mais aussi que les immunisations avec les formulations de LNP ont un impact sur la croissance tumorale. Bien qu'un léger retard d'environ 4 jours soit observé sur la croissance tumorale sur la souris immunisée par rapport aux 2 souris contrôle, la cinétique de croissance semble identique. L'immunisation semble donc avoir un effet retard sur la croissance tumorale, voire l'empêche de se développer, mais n'a plus d'effet à compter du moment où la tumeur a commencé à pousser. Nous avons donc réalisé un test supplémentaire, afin d'étudier l'éventuel effet curatif de l'immunisation. La souris CTRL 2, n'ayant été immunisée qu'avec du PBS, a reçu une injection de LNP-OVA + LNP⁺/CpG (jour 22), lorsque sa tumeur mesurait 490 mm³. Cela a pour effet de ralentir la croissance tumorale de plusieurs jours (losanges noirs), puisque la souris LNP_2 finit par développer une tumeur de même taille (jour 27). Cependant, cette immunisation n'est pas suffisante pour faire régresser la tumeur.

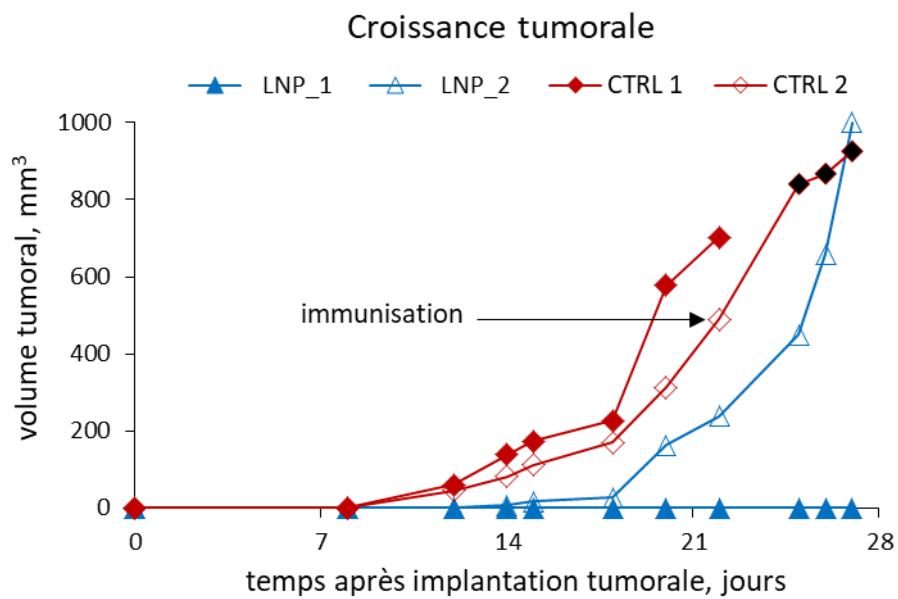


Figure V.16. Analyse de la croissance tumorale.

Evolution de la taille des tumeurs sur des souris immunisées avec la formulation LNP-OVA + LNP⁺/CpG (vaccin) ou du PBS (CTRL). La souris CTRL 2 reçoit une nouvelle immunisation de LNP-OVA + LNP⁺/CpG au jour 22. La souris CTRL1 est décédée à J21 des suites de l'anesthésie à l'isoflurane.

Grâce à ce test préliminaire, nous avons pu observer un effet retard ou inhibiteur de l'immunisation avec la formulation LNP-OVA + LNP⁺/CpG sur la croissance tumorale, ce qui justifie le lancement d'une campagne complète. De plus, les 3 souris sur 4 ayant développé une tumeur l'ont supportée sans signaux de détresse particuliers jusqu'au point limite final.

V.3.3 Campagne de challenge tumoral sur souris

Nous avons cette fois-ci mené une étude sur un plus grand nombre de souris, afin de tester plusieurs formulations de LNP:

- Groupe 1 : LNP-OVA + LNP⁺/CpG N = 6
- Groupe 2 : LNP-OVA + CpG N = 6
- Groupe 3 : OVA + CpG N = 6
- Groupe 4 : PBS N = 6

Afin de différencier les souris d'un même groupe étant hébergée dans la même cage, des marques distinctes sont réalisées à la tondeuse :

- Souris 1 = pas de marque
- Souris 2 = tondue au niveau bas gauche du dos
- Souris 3 = tondue au niveau milieu gauche du dos
- Souris 4 = tondue au niveau haut gauche du dos
- Souris 5 = tondue au niveau haut droit du dos
- Souris 6 = tondue au niveau bas gauche et haut gauche du dos

Dans cette étude, 3 souris ont dû être écartées avant la fin de l'expérience en raison d'une irritation aigüe au niveau du point d'injection des cellules tumorales, conduisant les souris à se gratter frénétiquement. Il en résulte une plaie importante pouvant gêner la mobilité des souris, associée au risque qu'une partie des cellules tumorales ait été retirée. Cela compromet l'expérience en plaçant ces souris dans des conditions différentes des autres.

L'ensemble des mesures de la taille des tumeurs au cours du temps est regroupé dans la table V.8. L'absence de tumeur apparaît en vert, tandis que les souris ayant atteint le point limite final apparaissent en bleu. Les tumeurs commencent à être visibles à partir du jour 12 pour les groupes LNP-OVA + CpG et OVA + CpG ainsi que le groupe contrôle PBS, tandis qu'elles n'apparaissent qu'à partir du jour 19 dans le groupe LNP-OVA + LNP⁺/CpG, soit un retard de 7 jours. Les résultats sont

relativement hétérogènes, avec un début de croissance tumorale très variable d'une souris à l'autre au sein d'un même groupe.

TAUILL DES TUMEURS		TEMPS APRES IMPLANTATION TUMORAL, JOURS																	
groupe	Souris n°	0	5	9	12	14	16	19	21	23	26	27	29	30	33	35	37	42	45
LNP-OVA + LNP ⁺ /CpG	1	0	0	0	0	0	0	27	108	205	403	730	950	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	2	0	0	0	0	0	0	0	21	138	176	216	407	655	984	1000	1000	1000	1000
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	182	546	950
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49	227	439	523	934	1000	1000	1000
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	20	104	258	686	935	1000	1000	1000	1000	1000
	6	0	0	0	0	0	0	119	366	621	904	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
LNP-OVA + CpG	1	0	0	0	0	0	0	61	122	237	378	950	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	2	0	0	0	0	0	0	67	216	469	787	980	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	3	0	0	0	0	0	0	55	228	842	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	76	69	195	215	941	1000	1000
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38	94	241	440	428	661	910	1000	1000
	6	0	0	0	0	0	0	56	210	237	457	698	999	1000	1000	1000	1000	1000	1000
OVA + CpG	1	0	0	0	0	0	0	30	88	136	349	376	900	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	2	0	0	0	0	0	0	22	46	148	476	692	900	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	3	0	0	0	0	0	0	0	29	116	208	315	695	931	1000	1000	1000	1000	1000
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	111	172	309	533	849	1000	1000
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	187	445	669	972	1000	1000	1000	1000
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS	1	0	0	0	40	93	136	430	806	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	2	0	0	0	0	33	93	386	907	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	3	0	0	0	0	0	0	25	102	209	376	533	981	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	4	0	0	0	76	309	950	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Table V.8. Analyse de la croissance tumorale.

Survi de la taille des tumeurs au cours du temps, mesurée régulièrement sur les souris immunisées avec des formulations d'OVA et de CpG, en comparaison avec un groupe contrôle réalisé avec des souris immunisées au PBS.

La taille moyenne des tumeurs par groupe de souris est représentée en *Figure V.17*. Ce graphe montre une cinétique de croissance relativement similaire pour tous les groupes, hormis un léger décrochement observable pour le groupe LNP-OVA + CpG entre les jours 26 et 30. Ceci est dû à 2/6 souris dont la tumeur est apparue plus tardivement et avec une croissance plus lente, ce qui abaisse la moyenne du groupe (*Table V.8*). Le retard de croissance tumorale observé dans le groupe LNP-OVA + LNP⁺/CpG est visible tout au long de l'étude, avec une taille significativement plus faible par rapport au groupe contrôle PBS entre les jours 19 et 29. En revanche, les tumeurs se développent en moyenne plus lentement dans le groupe OVA + CpG par rapport au groupe LNP-OVA + CpG, ce qui traduit que la vectorisation de l'OVA par les LNP ne confère apparemment pas d'avantage de protection.

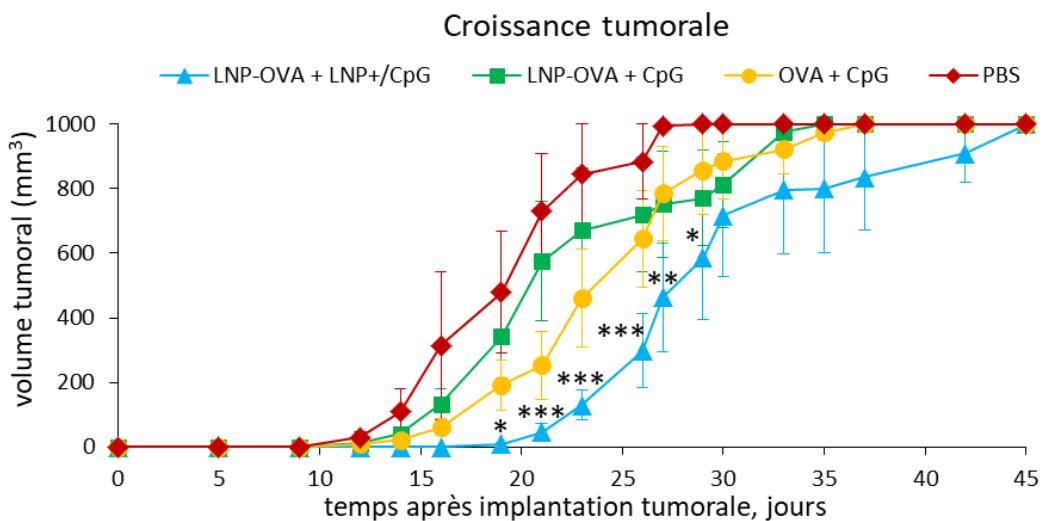


Figure. V.17. Analyse de la croissance tumorale.

*Evolution de la taille des tumeurs sur des souris immunisées avec les différentes formulations d'OVA et de CpG en comparaison à un groupe contrôle immunisé avec du PBS. Analyse statistique ANOVA-2 suivie du test de Holmack-Sidak. *** p<0.001 ; ** p<0.01 ; * p<0.05 entre les groupes LNP-OVA + LNP⁺/CpG et PBS.*

Nous avons également représenté le taux de survie des souris par groupe en *Figure V.18*. La première mort est recensée au jour 16 dans le groupe contrôle PBS, au jour 19 dans le groupe LNP-OVA + CpG, au jour 23 dans le groupe OVA + CpG et enfin au jour 27 dans le groupe LNP-OVA + LNP⁺/CpG. En outre, la mort de l'ensemble des souris d'un même groupe est notée au jour 27 dans le groupe contrôle PBS, au jour 33 dans le groupe LNP-OVA + CpG, au jour 35 dans le groupe OVA + CpG et finalement au jour 45 dans le groupe LNP-OVA + LNP⁺/CpG. Dans les deux cas, on observe un retard de 11-12 jours entre le groupe LNP-OVA + LNP⁺/CpG et le groupe contrôle PBS, différence qui est

significative entre les jours 21 et 29. D'après la Table V.8, les tumeurs mettent en moyenne 9 ± 2 jours à se développer et atteindre le point limite final.

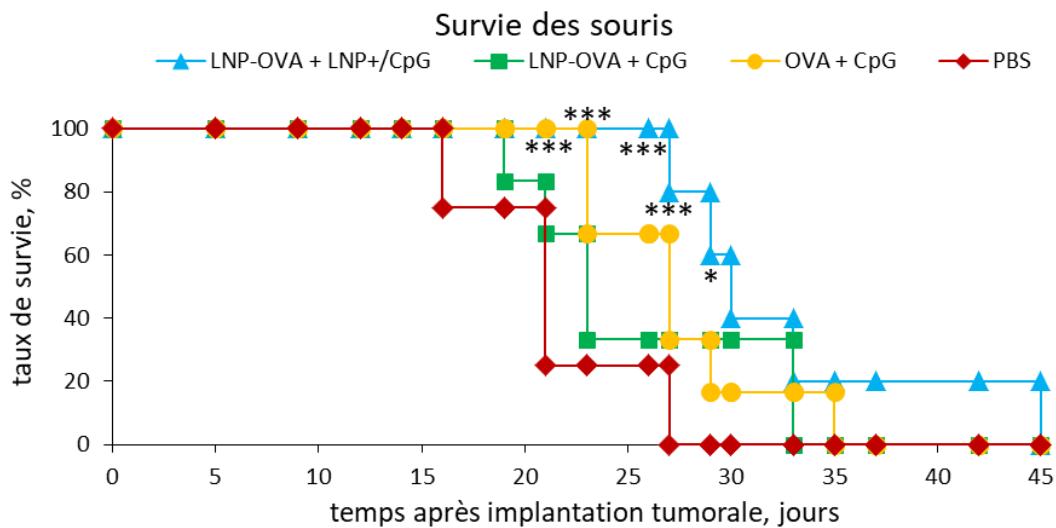


Figure. V.18. Analyse de la survie des animaux.

Evolution du taux de survie des souris immunisées avec les différentes formulations d'OVA et de CpG en comparaison à un groupe contrôle immunisé avec du PBS. Analyse statistique ANOVA-2 suivie du test de Holm-Sidak. *** $p<0.001$; ** $p<0.01$; * $p<0.05$ entre les groupes LNP-OVA + LNP⁺/CpG et PBS.

D'après l'ensemble de ces résultats, seule la formulation LNP-OVA + LNP⁺/CpG semble avoir un effet retard sur la croissance des tumeurs, d'en moyenne 7 jours au début du développement des tumeurs jusqu'à 11-12 lorsque les tumeurs atteignent le point limite. Malgré cet avantage, toutes les souris développent une tumeur, qui croît à vitesse constante pour atteindre le point limite de 1000 mm^3 après en moyenne 9 jours. Dans cette étude seule la réponse immunitaire cellulaire est impliquée et permet d'éliminer les cellules tumorales. En effet, les cellules tumorales exprimant l'OVA sur leur CMH-I peuvent être la cible des LT cytotoxiques activés par les immunisations. L'effet retard sur la croissance tumorale que nous observons dans le groupe LNP-OVA + LNP⁺/CpG témoigne donc de l'induction d'une réponse cellulaire, qui permet vraisemblablement d'éliminer des cellules tumorales, tant que leur nombre demeure réduit. Cependant, la croissance des cellules B16 est rapide, ce qui présente l'avantage d'un modèle sur un temps court, mais l'inconvénient de surpasser les LT par leur trop grand nombre. Par conséquent, la réponse immunitaire cellulaire cytotoxique induite par les immunisations avec la formulation LNP-OVA + LNP⁺/CpG est insuffisante à l'élimination de la totalité des cellules tumorales, ce qui conduit malgré tout au développement d'une tumeur atteignant une taille critique de 1000 mm^3 pour l'ensemble des souris de l'étude.

Discussion du chapitre V

Dans ce chapitre, nous nous sommes employés à améliorer les réponses immunitaires induites chez la souris par la simple vectorisation de l'antigène modèle OVA. Sur la base de nos résultats explicités dans le chapitre IV rapportant l'intérêt de greffer l'OVA sur les LNP pour promouvoir la réponse humorale, nous avons poursuivi cette démarche de délivrance en nous intéressant également à l'immunostimulant associé à l'antigène dans une formulation vaccinale. Nous avons fait l'hypothèse que la vectorisation de l'immunostimulant pourrait améliorer sa délivrance aux CPA et ainsi favoriser l'induction de réponses immunitaires dirigées contre cet antigène. Dans ce cas d'une double vectorisation de l'antigène et de l'immunostimulant dans une même formulation vaccinale, il est généralement admis que les deux éléments doivent être délivrés ensemble par le même vecteur pour garantir l'accès aux mêmes cellules^{334,368-373}. Il faut en effet qu'une CPA capturant l'antigène reçoive également le signal de danger apporté par l'immunostimulant pour induire une réponse spécifique dirigée contre l'antigène. Cependant, Mohsen et al ont récemment démontré que la co-vectorisation du peptide p33 du virus de la chorioméningite lymphocytaire et du CpG dans une même VLP n'est pas indispensable pour générer des réponses immunitaires cellulaires spécifiques¹³³. En effet, les auteurs ont observé par imagerie de fluorescence que des VLP distinctes, certaines chargées en antigène et d'autres chargées en immunostimulant, atteignent les mêmes CPA au sein du ganglion lymphatique du poplité, après injection sous-cutanée dans la patte d'une souris. De plus, leur analyse des cellules issues de ce ganglion montre que les différents sous-types de CPA ayant capturé les VLP porteuses d'antigène et celles porteuses d'immunostimulant sont en conséquence activées et sécrètent efficacement des cytokines pro-inflammatoires induisant l'activation des autres CPA n'ayant pas capturé les VLP. Cette activation des CPA conduit *in vivo* à la stimulation spécifique des LT CD8 du même ordre de grandeur que dans le cas où l'antigène et l'immunostimulant sont portés par les mêmes VLP. Cet exemple remet donc en question la nécessité d'un lien physique maintenant l'antigène et l'immunostimulant associés dans le but d'induire une réponse immunitaire d'amplitude maximale. Nous nous sommes donc appliqués à comparer les deux stratégies de vectorisation de l'antigène et de l'immunostimulant afin de déterminer si nos LNP sont également capables d'induire des réponses immunitaires de grande amplitude sans que l'antigène et l'immunostimulant soient directement associés.

Nous avons pour cela choisi de réaliser cette expérience comparative sur le modèle des immunostimulants MPLA et Imiquimod. Le MPLA étant amphiphile, il peut s'insérer dans la couronne de tensioactifs des LNP, tandis que l'Imiquimod hydrophobe peut être encapsulé dans le cœur

lipidique des LNP. Nous sommes ainsi parvenus à préparer des particules immunostimulantes, dont la caractérisation montre un taux de charge bien plus efficace pour le MPLA que pour l'Imiquimod, qui s'encapsule dans une très faible proportion à l'intérieur des LNP. En ajoutant des PEG fonctionnalisés dans la formulation et en suivant le protocole de bioconjugaison décrit dans le chapitre IV, nous avons su greffer l'OVA à la surface de ces LNP immunostimulantes. Nous avons remarqué que la présence d'immunostimulant dans les LNP impacte le greffage de l'OVA, notamment le rendement qui diminue de 23 % lorsque les LNP sont chargées en Imiquimod et de 43 % lorsque les LNP sont chargées en MPLA. Il est vraisemblable que la présence de ces molécules dans les LNP provoque une reconfiguration de la couronne de PEG, en prenant par exemple la place d'une certaine proportion de PEG fonctionnalisés qui seraient donc exclus de la formulation. Finalement, lorsque nous avons comparé *in vivo* les deux stratégies de délivrance de l'OVA et de l'immunostimulant, nous n'avons observé aucune différence significative concernant la production d'anticorps spécifiques, que ce soit dans le cas de l'Imiquimod ou du MPLA. D'après ce résultat, la délivrance de l'OVA et de l'immunostimulant sur la même LNP ne confère aucun avantage en termes d'immunogénicité, ce que nous avons observé sur 2 exemples d'immunostimulants. Comme nous l'avions supposé, les LNP étant très sensibles au drainage lymphatique *in vivo*, les LNP-antigène et LNP-immunostimulant prennent la même direction et se retrouvent donc dans le même ganglion lymphatique. A ce stade, les DC vont capturer les LNP. Si l'on part du principe que toutes les LNP arrivent en même temps dans le ganglion, aux vues de leurs propriétés identiques, certaines DC vont alors probablement capturer des LNP-antigène en même temps que des LNP-immunostimulant. Si la quantité d'antigène et d'immunostimulant absorbés est suffisante alors la DC est activée. Cette activation se manifeste par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ayant pour effet d'activer les autres DC se trouvant dans un environnement très proche. Il s'agit en quelque sorte d'une réaction en chaîne, et on peut ainsi imaginer qu'une DC n'ayant capturé que des LNP-antigène soit tout de même activée par d'autres DC activées environnantes. Le résultat est que les DC des ganglions lymphatiques sont activées dans la même mesure que si l'antigène et l'immunostimulant avaient été distribués conjointement par les mêmes LNP. Or, à immunogénicité équivalente il est beaucoup plus pratique de produire séparément les particules vectorisant l'antigène et celles vectorisant l'immunostimulant. En effet, le greffage de l'antigène n'est pas perturbé par la présence de l'immunostimulant, donc le procédé est plus reproductible. De plus, cela permet d'envisager un ajustement personnalisé des doses d'antigène et d'immunostimulant selon le patient, dans un souci de médecine personnalisée et adaptée aux besoins de chacun. En revanche, la vectorisation de l'Imiquimod et du MPLA s'est montrée peu satisfaisante, en raison de la faible encapsulation de l'Imiquimod dans le cœur des LNP ainsi que du manque de stabilité sur le long terme des formulations LNP(imi) et LNP(MPLA) préparées. Nous nous sommes donc orientés vers la

vectorisation d'autres immunostimulants pouvant s'associer à la surface des LNP plutôt que dans le cœur lipidique, en conservant désormais la stratégie de délivrance de l'antigène et de l'immunostimulant sur des LNP distinctes.

Nous avons déjà employé le CpG en tant qu'immunostimulant sous sa forme libre dans le chapitre IV, ce qui a contribué à augmenter la réponse humorale. Le CpG est en effet connu pour améliorer la présentation de l'antigène par les DC en privilégiant une polarisation Th1^{143,144}, ainsi que l'activation des LT^{141,142} et cellules NK¹³⁸. Le CpG étant un acide nucléique chargé négativement, nous avons conçu une LNP cationique (LNP⁺) permettant de le complexer à sa surface par interactions électrostatiques. La préparation du complexe LNP⁺/CpG est extrêmement simple, puisqu'il suffit de mélanger les deux éléments pendant une dizaine de minutes pour que la complexation soit totale. De cette manière, nous évitons les pertes de réactifs et nous affranchissons d'une étape de purification et dosage du CpG vectorisé. De plus, la complexation du CpG sur les LNP⁺ peut tout à fait être réalisée extemporanément, ce qui supprime les contraintes de stabilité des LNP⁺/CpG pendant le stockage, les LNP⁺ étant très stables sur le long terme. Grâce à la délivrance du CpG via les LNP⁺, nous avons observé une forte induction de réponses immunitaires *in vivo* chez la souris. Ce bénéfice est le résultat du transport efficace du CpG à l'intérieur des cellules présentatrices d'antigène, comme nous l'avons démontré en imagerie confocale sur l'exemple de DC. Cet accès au compartiment intracellulaire des DC permet au CpG de stimuler efficacement le TLR-9 situé dans l'endosome, ce qui déclenche l'activation de la cellule. Nous avons en effet montré que les LNP⁺/CpG favorisent l'expression des marqueurs d'activation CD40 et CD86 à la surface des DC. En outre, nous avons observé que le CpG impacte la présentation de l'antigène par les DC selon qu'il soit sous forme libre ou vectorisée, en jouant sur la polarisation de la réponse immunitaire. En effet, la vectorisation du CpG par les LNP⁺ favorise la production d'IL-13 par les LT issus d'OT-II indiquant une orientation Th2, tandis que le CpG libre stimule leur production d'IFNy indicatrice d'une orientation Th1.

La performance des LNP⁺/CpG a été évaluée au cours de plusieurs campagnes d'immunisations de souris. L'ensemble des résultats obtenus distinguent la formulation LNP-OVA + LNP⁺/CpG comme étant la plus immunogène et capable d'induire des réponses immunitaires de grande amplitude, à la fois humorales et cellulaires. Ce résultat est la somme des avantages conférés séparément par la vectorisation de l'OVA et la vectorisation du CpG. Nous avons en effet identifié des effets différents attribués à chacun de ces éléments. La vectorisation de l'OVA favorise la réponse humorale globale, avec une polarisation Th2 des LT CD4 déterminée par la production d'IgG1. Les LNP-OVA stimulent également la production d'IFNy par les LT CD8, ce qui traduit une présentation croisée de l'antigène. D'autre part, la vectorisation du CpG induit à la fois une réponse humorale et cellulaire. La

production d'IgG2a indique une polarisation Th1 des LT CD4, ce qui est confirmé par la sécrétion d'IFNy par les LT CD4. De plus, les LNP⁺/CpG stimulent plus intensément la sécrétion d'IFNy par les LT CD8, ce qui indique une présentation croisée de l'antigène. Par conséquent, la réunion des LNP-OVA et LNP⁺/CpG dans une même formulation combine l'ensemble de ces effets permettant de générer des réponses immunitaires de grande amplitude et qualité. Nous remarquons que ces résultats sur la polarisation des LT CD4 diffèrent des prévisions obtenues lors de l'expérience *in vitro* de présentation de l'antigène. Ce fait souligne l'importance de prendre du recul sur les modèles *in vitro*, qui sont certes très utiles pour tester en amont plusieurs candidats, mais qui ne peuvent garantir la concordance avec l'*in vivo*. Dans le chapitre IV, nous avons souligné l'importance du taux de charge de l'OVA sur les LNP et l'existence probable d'une configuration optimale visant à activer les cellules immunitaires avec un taux de charge minimal d'OVA répartie sur un plus grand nombre de LNP. Il est possible que ce paramètre joue également un rôle dans le cas de la vectorisation du CpG, d'où l'intérêt d'étudier dans le futur plusieurs taux de charge du CpG sur les LNP⁺. En outre, une seule dose de CpG a été évaluée au cours de nos expériences et peut donc également être optimisée.

Grâce à l'évaluation des réponses immunitaires *in vivo* chez la souris en réponse à des immunisations avec les formulations d'OVA et de CpG, nous avons pu identifier la formulation LNP-OVA + LNP⁺/CpG comme étant le plus performante et capable de générer des réponses immunitaires humorales et cellulaires d'une grande amplitude. Nous nous sommes alors demandés si de telles réponses immunitaires étaient suffisantes pour induire une protection efficace. Nous avons utilisé des cellules tumorales de type mélanome ayant été transfectées de sorte d'exprimer l'OVA dans leur cytoplasme. Ce modèle est particulièrement pertinent pour des applications de vaccins anti-cancers, où les cellules cancéreuses expriment des antigènes de surface spécifiques (TAA pour tumor-associated antigens), contre lesquels il faut diriger les réponses immunitaires cellulaires. Ces cellules expriment l'OVA sur leur CMH-I en conséquence de leur transfection stable, et sont par conséquent un outil idéal pour évaluer les réponses cellulaires cytotoxiques des formulations de LNP. Les cellules tumorales ont été implantées dans des souris préalablement immunisées afin d'étudier l'effet protecteur des formulations vaccinales. En suivant l'évolution de la croissance tumorale au cours du temps en fonction des groupes de souris immunisées avec différentes formulations (LNP-OVA + LNP⁺/CpG comparé à LNP-OVA + CpG et OVA + CpG), nous avons observé un retard significatif d'une dizaine de jours en moyenne sur le développement des tumeurs lorsque les souris étaient immunisées avec la formulation LNP-OVA + LNP⁺/CpG. Ce délai témoigne d'une activité cellulaire générée par les immunisations, ce qui permet vraisemblablement d'éliminer une certaine proportion des cellules tumorales. Cependant, les immunisations se sont montrées insuffisantes et n'ont pas permis d'éliminer la totalité des cellules tumorales, puisque l'ensemble des souris ont développé une

tumeur atteignant le point limite final de taille. Les cellules tumorales B16 sont en effet très virulentes et un faible nombre de cellules résiduelles suffit à produire une tumeur^{349,367}. La croissance tumorale observée dans le groupe de souris immunisées avec la formulation LNP-OVA + LNP⁺/CpG peut être due à une réponse cellulaire insuffisante au regard de la rapidité de la croissance cellulaire des B16. Une autre hypothèse serait que ces cellules aient parvenu résister à la réponse cellulaire générée en perdant le transgène. Les tumeurs ayant été récoltées et figées dans la paraffine, il serait intéressant de vérifier en histologie si les cellules tumorales expriment toujours l'OVA.

Finalement, nous avons montré dans ce chapitre que les réponses immunitaires induites par la vectorisation de l'OVA pouvaient être encore améliorées grâce à la délivrance du CpG. Cette co-délivrance est à l'origine de la production de réponses immunitaires humorales et cellulaires de grande qualité, impliquant la production d'anticorps de type IgG1, IgG2a et IgA et l'activation des LT CD4 et CD8. Ceci est la conséquence de la combinaison des avantages conférés par la vectorisation de l'OVA d'une part et du CpG d'autre part. Nous avons démontré que de telles réponses immunitaires ne requièrent pas que l'antigène et l'immunostimulant soient associés dans le même vecteur, ce qui offre une grande liberté de formulation et d'adaptation des doses. Une première étude de protection *in vivo* réalisée avec des cellules tumorales exprimant l'OVA nous a permis d'observer l'impact des réponses immunitaires cellulaires, notamment avec un retard de la croissance tumorale.

Chapitre VI

Application à un antigène du VIH : la p24

Après avoir exploré le panel de configurations possibles offert par les LNP pour induire des réponses immunitaires spécifiques sur le modèle de l'OVA, nous nous sommes attelés au cas concret et d'actualité du VIH. Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction, le développement d'un vaccin anti-VIH, prophylactique ou thérapeutique, est hautement attendu pour parvenir à contrôler la pandémie de VIH. L'expérience acquise à ce jour sur la base des leçons tirées des différents essais cliniques sur des candidats vaccins anti-VIH nous permet de définir des axes de recherches pertinents. En particulier, il est admis qu'un vaccin efficace contre le VIH doit être capable de générer des anticorps neutralisants à large spectre ainsi qu'une réponse immunitaire cellulaire cytotoxique de grande magnitude^{318,319}. Les anticorps neutralisants ont pour but d'agglutiner les particules virales, afin de les empêcher de contaminer de nouvelles cellules et mieux les signaler au système immunitaire, tandis que la réponse immunitaire cellulaire est indispensable à l'élimination des cellules infectées qui constituent un réservoir viral. Nous avons choisi comme premier axe de recherche d'explorer ce deuxième point, en sélectionnant l'antigène p24 issue de la capsid du virus. Cet antigène constitue un modèle dont la structure a été largement étudiée et qui possède l'avantage d'être relativement conservée malgré les mutations virales^{374,375}. En outre, plusieurs études ont montré sur des modèles de primates ou des patients atteints du VIH et non traités que la présence de LT cytotoxiques spécifiques de Gag, en particulier la p24, était associée à une diminution de la charge virale³⁷⁶⁻³⁷⁸. Enfin, cette protéine a été étudiée à plusieurs reprises chez le primate non-humain (NHP)³⁷⁹⁻³⁸⁴, qui constitue à l'heure actuelle le modèle animal le plus pertinent pour évaluer l'efficacité de formulations vaccinales contre le VIH en raison des similitudes de son système immunitaire avec l'humain³⁸⁵. Sur la base de nos travaux réalisés sur l'OVA, nous avons adapté notre protocole de greffage sur les LNP afin de l'appliquer à la p24. Sur le même schéma que l'OVA, nous avons étudié l'intérêt de la vectorisation de la p24 pour induire des réponses immunitaires et testé plusieurs paramètres tels que la dose d'antigène, la voie d'administration et la combinaison immunostimulante. Pour terminer, les formulations les plus performantes sur modèle murin ont été sélectionnées pour une étude longitudinale d'immunogénicité sur modèle NHP.

VI.1 Préparation de particules vectorisant la p24

VI.1.1 Choix de la technique de greffage

Précédemment dans notre groupe, plusieurs essais de greffage de la p24 sur les LNP ont été réalisés. Dans un premier temps, le même protocole de greffage que celui utilisé pour greffer l'OVA, à savoir un couplage thiol-maléimide, a été appliqué à la p24, les thiols étant portés par les LNP et les maléimides portés par la p24. Tout comme l'OVA, la p24 contient des acides aminés lysines donc des terminaisons NH_2 fonctionnalisables en maléimides par réaction avec le sulfo-SMCC. Cependant, le greffage de la p24 s'est avéré beaucoup plus compliqué que celui de l'OVA, en raison de la tendance de la p24 à s'agréger en présence des LNP. En effet, lorsqu'elle est mélangée aux LNP, la p24 forme spontanément des agrégats de taille similaire aux LNP donc difficilement séparables par chromatographie d'exclusion stérique. La cause de ces agrégats est que la p24 s'auto-assemble spontanément pour former la capsid du VIH³⁸⁶, ce qui est probablement favorisé par la présence des lipides des LNP (*Figure VI.1*). Outre la formation d'agrégats de p24, le rendement de p24 greffée selon cette méthode est extrêmement faible (moins de 5 %) et doit être optimisé. Une autre chimie de bioconjugaison a alors été testée : un couplage amine-acide carboxylique via les linkers EDC/NHS (carbodiimide/N-hydroxysuccinimide), en fonctionnant les LNP avec des PEG-COOH (terminaison acide carboxylique) et en utilisant les amines primaires des lysines de la p24. Cependant, cette stratégie a été totalement inefficace, avec un rendement de réaction nul. La stratégie choisie a donc été de conserver la chimie thiol-maléimide initiale, en s'employant à réduire la formation des agrégats de manière à favoriser la réaction de greffage. Deux nouvelles réactions ont été testées, les fonctions maléimides étant cette fois-ci portées par les LNP (par incorporation de PEG-maléimide) et les terminaisons thiols portées par la p24. Dans le premier cas, les thiols sont produits par ouverture des ponts disulfures reliant les deux cystéines de la p24, en utilisant l'agent réducteur DTT (dithiothréitol). Dans le deuxième cas, les thiols sont introduits par réaction de la p24 avec le 2-iminothiolane (réactif de Traut), réactif vis-à-vis des amines primaires portés par les lysines. Ces deux méthodes ont été plus fructueuses, avec une plus grande proportion de p24 greffée malgré la persistance des agrégats de p24. Néanmoins, l'ouverture du pont disulfure reliant les cystéines de la p24 peut avoir altéré la conformation spatiale de la protéine et donc son antigénicité. Les caractéristiques de ces différentes stratégies de greffage sont résumées dans la *Table VI.1*. La dernière stratégie (LNP-mal + p24-SH via réactif de Traut) semble la plus prometteuse et est celle retenue en vue d'optimiser les conditions de greffage de la p24.

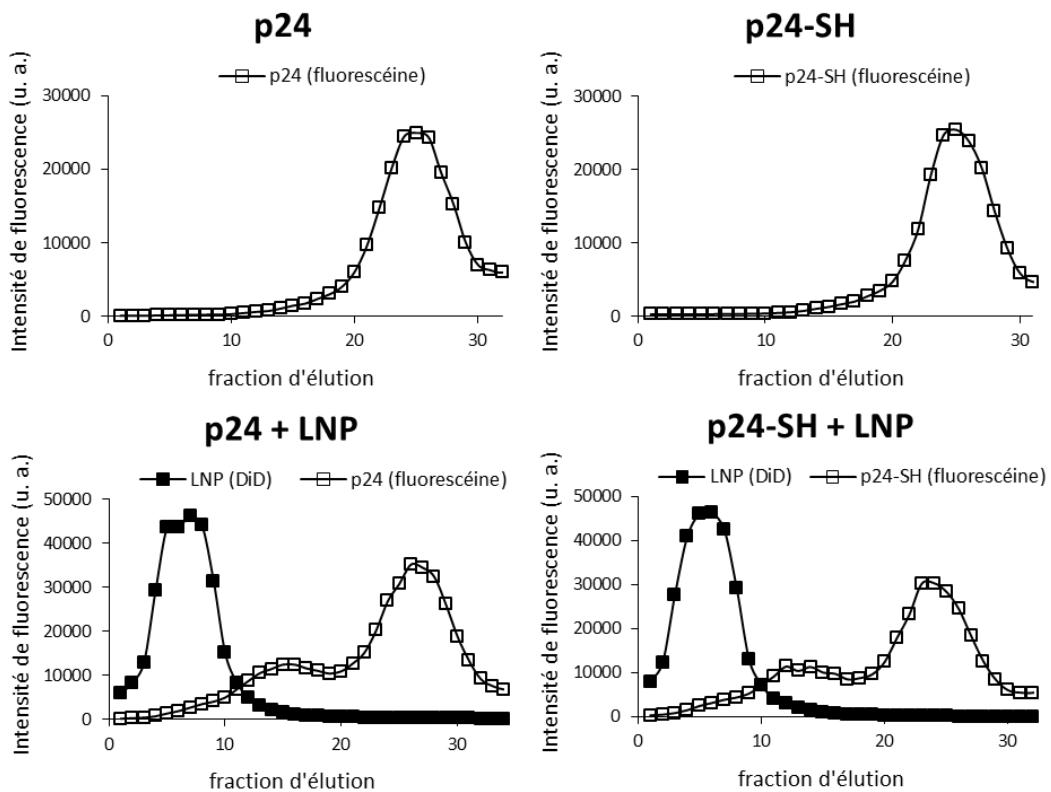


Figure VI.1. Formation d'agrégats de p24 en présence des LNP (fractions 10 à 20) après 2h d'exposition.

La p24 seule ne s'agrège pas, même en étant fonctionnalisée avec des thiols. En revanche, en présence des LNP, la p24 forme des agrégats.

Stratégie de greffage	Fonctionnalisation de la p24	Acides aminés mis en jeu	Rendement de p24 greffée	Inconvénients
LNP-SH + p24-mal	Sulfo-SMCC	Lysines (10)	< 5 %	Rendement insuffisant + agrégats de p24
LNP-COOH + p24-NH ₂	EDC/NHS	Lysines (10)	0 %	Greffage inefficace
LNP-mal + p24-SH	DTT	Cystéines (2 en pont disulfure)	≈ 15 %	Risque d'altération de l'antigénicité de la p24 + agrégats de p24
LNP-mal + p24-SH	Réactif de Traut	Lysines (10)	≈ 10 %	Agrégats de p24

Table VI.1. Caractéristiques principales des différentes stratégies préalablement testées pour le greffage de la p24 sur les LNP.

VI.1.2 Optimisation du greffage de la p24

Le réactif de Traut est un composé cyclique qui réagit spontanément avec les amines primaires à pH 7-9 et introduit une terminaison thiol par ouverture du cycle (Figure VI.2). Le fournisseur (ThermoFisher Scientific) recommande d'utiliser 2 à 20 équivalents molaires de 2-iminothiolane par protéine, selon la taille de la protéine et le niveau de thiolation recherché. La réaction étant très efficace, une heure suffit pour que la thiolation des amines soit complète. Comme nous souhaitons introduire un nombre limité de fonctions thiols dans la p24, de manière à éviter la formation d'agrégats, et la p24 étant une protéine de taille moyenne (27 kDa), nous avons testé 2 et 10 équivalents molaires de 2-iminothiolane par p24, le temps de réaction étant fixé à 1h. Le ratio molaire de p24 par fonction maléimide exprimée par les LNP a également été étudié : 0.5, 1 ou 2 équivalents molaires, pour un temps de réaction de 2h ou 20h. Le mélange réactionnel a été effectué à froid, en ajoutant goutte à goutte les LNP dans la solution de p24 reconcentrée par ultracentrifugation.

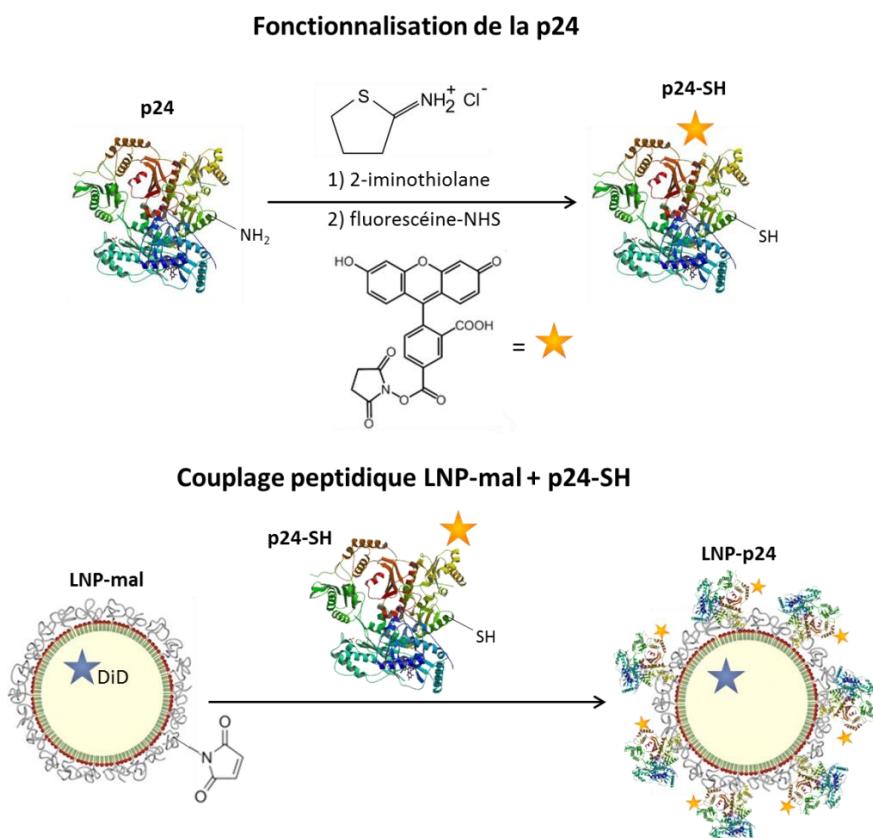


Figure VI.2. Greffage de p24 à la surface des LNP-mal.

La p24 est fonctionnalisée par réaction avec le 2-iminothiolane (réactif de Traut), afin de transformer les terminaisons amines en terminaisons thiols. La p24 est marquée en fluorescence par traitement avec la fluorescéine-NHS.

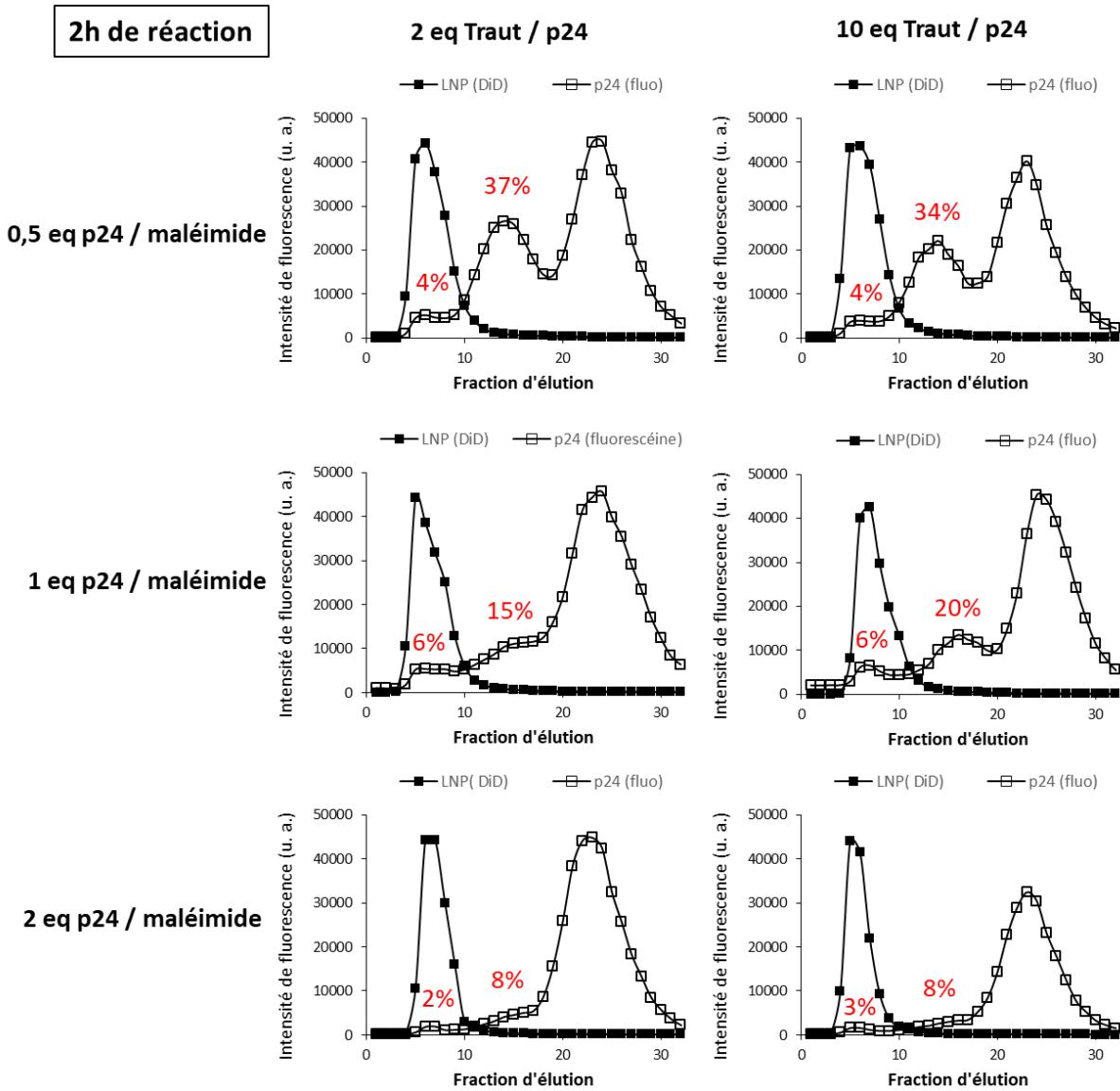


Figure VI.3. Comparaison des paramètres de greffage de la p24 à la surface des LNP.

Le temps de réaction est fixé à 2h. Les paramètres étudiés sont le ratio réactif de Traut / p24 (2 ou 10 équivalents) et le ratio p24 / thiol (0,5, 1 ou 2 équivalents). Les proportions de p24 greffée et agrégée sont indiquées en rouge au-dessus des pics correspondants.

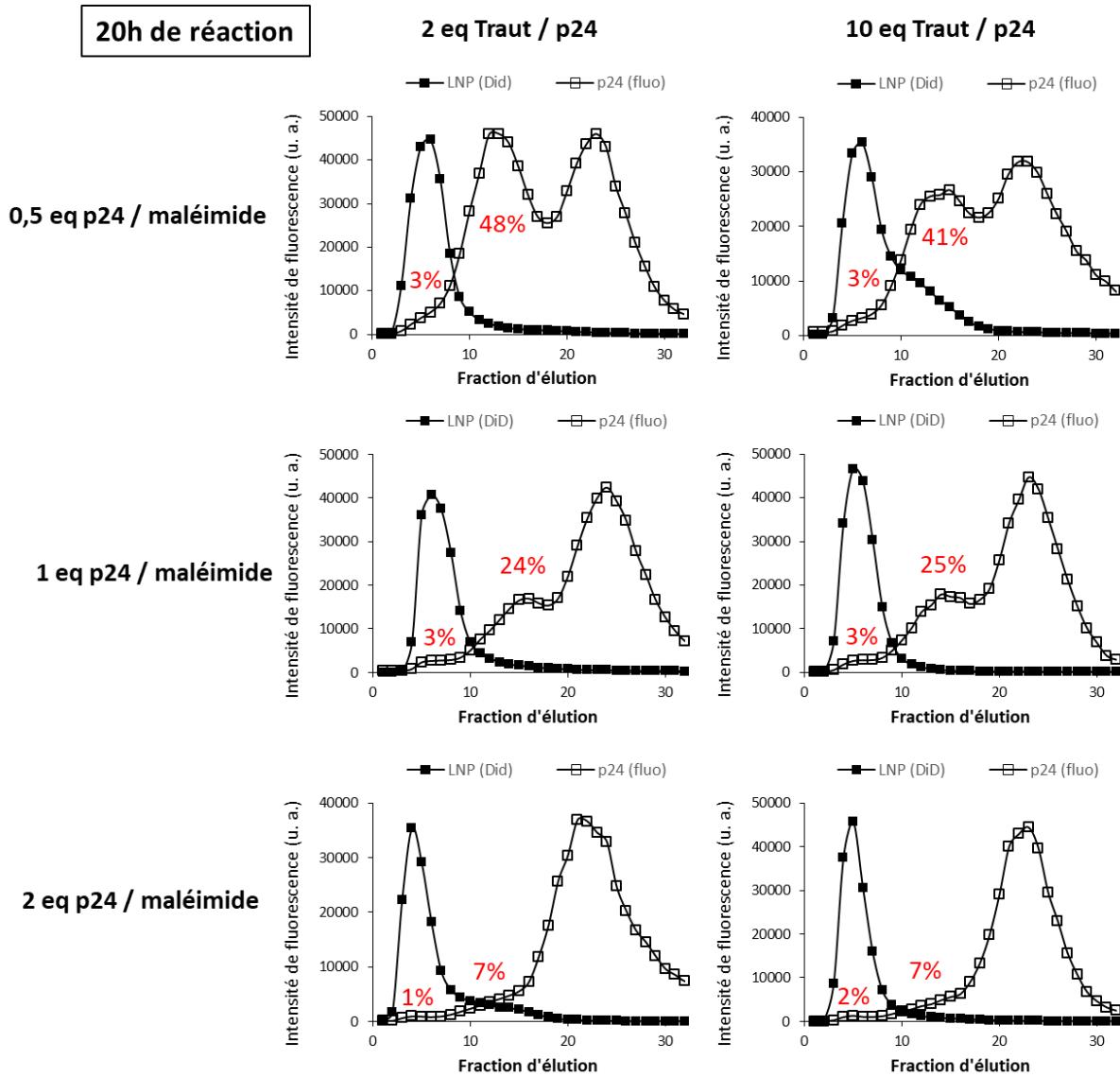


Figure VI.4. Comparaison des paramètres de greffage de la p24 à la surface des LNP.

Le temps de réaction est fixé à 20h. Les paramètres étudiés sont le ratio réactif de Traut / p24 (2 ou 10 équivalents) et le ratio p24 / thiol (0,5, 1 ou 2 équivalents). Les proportions de p24 greffée et agrégée sont indiquées en rouge au-dessus des pics correspondants.

Les formulations de LNP-p24 ont été purifiées par chromatographie d'exclusion stérique (Figures VI.3 et VI.4). Les fractions récoltées ont été analysées en fluorescence pour détecter la répartition des LNP(DiD) et de la p24(fluorescéine). L'ensemble des graphes obtenus montre 3 populations de p24. La première population (pics 2 à 10) correspond à la p24 greffée sur les LNP. La deuxième population (pics 10 à 18) correspond aux agrégats de p24 qui ont lieu en présence des LNP. Enfin la troisième population (pics 20 à 30) correspond à l'excès de p24 libre non agrégée. La proportion de p24 greffée et agrégée est indiquée en rouge au-dessus des pics correspondants. Analysons dans un premier

temps les graphes obtenus pour 2h de réaction (*Figure VI.3*). Nous observons que la proportion d'agrégats augmente avec le ratio de p24/LNP diminue, autrement dit quand la proportion de LNP augmente. Ce résultat est logique puisque les agrégats sont provoqués par la présence des LNP. En particulier pour un ratio de 2 équivalents de p24 / LNP, la proportion d'agrégats est très faible (8 %). Cependant, la proportion de p24 greffée est également très faible (2 à 3 %). La condition à 1 équivalent de p24 / LNP est celle qui fournit le meilleur compromis entre la proportion de p24 greffée (6 %) et d'agrégats de p24 (entre 15 et 20 %). De plus, le ratio réactif de Traut / p24 n'impacte pas le greffage de la p24. Ensuite, lorsque l'on analyse les graphes obtenus pour 20h de réaction (*Figure VI.4*), nous observons que la proportion de p24 greffée a diminuée et que celle d'agrégats de p24 a augmenté. Finalement, la meilleure configuration des paramètres de greffage est la suivante :

- 2 équivalents de réactif de Traut / p24
- 1 équivalent de p24 / maléimide
- 2h de réaction p24 + LNP.

Le greffage de p24 à la surface des LNP augmente leur taille d'en moyenne 7 nm, en maintenant une valeur de PDI aux alentours de 0.15 et leur charge de surface est très légèrement diminuée d'environ 2 mV (*Table VI.2*).

Formulation	Nb de lots	Taille (nm)	PDI	Charge à pH 7.0 (mV)
F80	28	73 ± 3	0.14 ± 0.02	- 5.0 ± 1.0
F80-p24	7	80 ± 3	0.17 ± 0.01	- 6.8 ± 2.7

Table VI.2. Taille et charge de surface moyennes des LNP-p24 et LNP de base.

VI.1.3 Quantification de la p24 greffée sur les LNP

Afin de vérifier que notre méthode de calcul nous donne une approximation correcte de la quantité de protéine greffée, nous avons réalisé un dosage quantitatif de protéine grâce au réactif CBQCA (3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde). Cette molécule est associée à un fluorophore qui n'est actif que lorsque le CBQCA réagit avec une amine primaire en présence de cyanure. L'avantage de cette analyse est que le CBQCA est peu sensible aux lipides, qui sont connus pour interférer avec la plupart des méthodes de quantification de protéines. Pour cette analyse, nous réalisons deux gammes étalons à partir de quantités connues de p24 et de LNP (*Figure VI.5*). Même si les lipides ne

sont pas censés altérer le test, nous prévoyons tout de même une gamme étalon de LNP dans le but de corriger le calcul si besoin. Un échantillon de 100 ng de LNP-p24 (quantité de p24 « théorique » calculée par fluorescence d'après le profil d'exclusion stérique) a ensuite été dosé et comparé aux gammes étalons réalisées. A cette quantité théorique de p24 correspond une quantité théorique de LNP de 10 640 ng. La quantité de p24 dosée est égale à 91 ng et donc relativement proche de celle calculée par la méthode classique, bien qu'une erreur de 9% soit observée (*Figure VI.5*). Ce peut être dû au fait que le test est directement lié au nombre d'amines primaires disponibles. Or, la p24 est greffée aux LNP par l'intermédiaire de ses lysines porteuses d'amines primaires. La p24 greffée ayant donc moins d'amines primaires disponibles pour le dosage, sa quantité est donc nécessairement sous-estimée par rapport à la p24 originale utilisée pour réaliser la gamme étalon. Néanmoins, cette expérience nous a permis de confirmer que la quantité p24 déterminée par comparaison des intensités de fluorescence est très proche de la réalité.

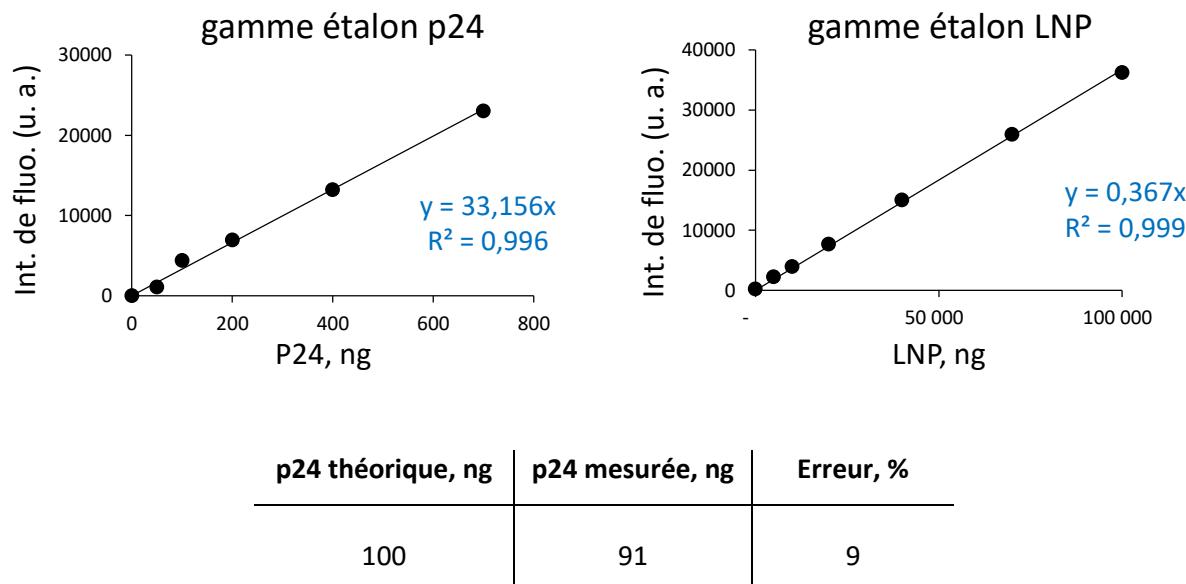


Figure VI.5. Dosage de p24 dans les fractions rassemblées de LNP-p24 par réaction avec le CBQCA. La mesure quantitative nécessite la réalisation de gammes étalons de p24 et de LNP.

VI.1.4 Contrôle de la cytotoxicité des LNP-p24

Comme pour chaque nouvelle formulation préparée, nous devons vérifier que les traitements réalisés sur les particules n'affectent pas leur innocuité et qu'elles sont toujours tolérées par les cellules. Nous avons donc réalisé une expérience de cytotoxicité des LNP-p24 sur des fibroblastes NIH/3T3 pendant 24h et sur une gamme de concentration en LNP variant de 100 µg/mL à 1.5 mg/mL, en comparant avec les LNP de base. Les résultats obtenus confirment que les LNP-p24 préparées sont hautement tolérées par les fibroblastes, avec plus de 75 % de viabilité cellulaire après une exposition de 24h à la plus forte dose de 1.5 mg/mL (*Figure VI.6*). Les formulations de LNP-p24 préparées sont donc adaptées à des expériences *in vivo* sur animaux.

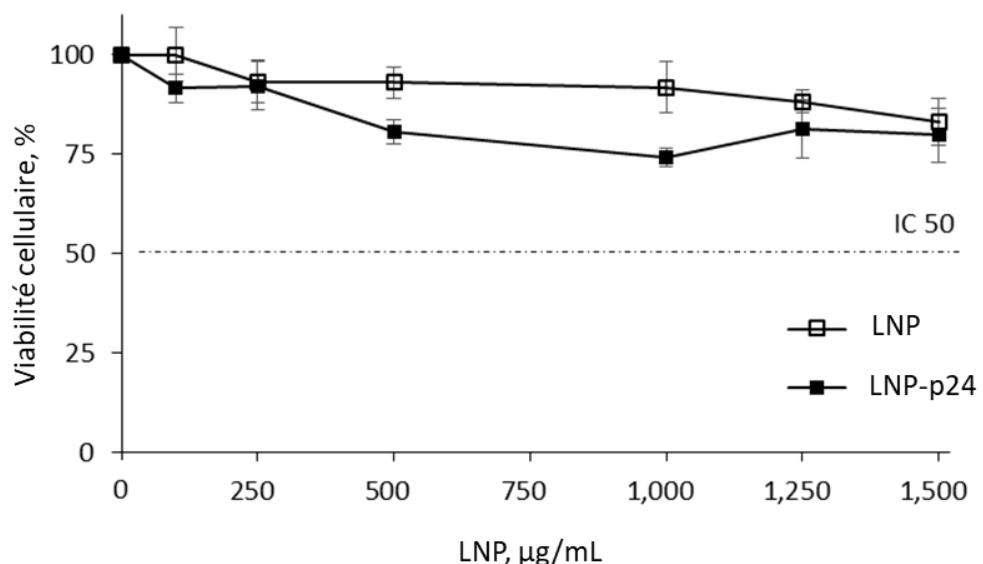


Figure VI.6. Cytotoxicité des LNP-p24 sur des fibroblastes NIH/3T3 après une exposition de 24h.

VI.2 Etude d'immunogénicité des formulations de p24 chez la souris

Dans les faits, les évaluations d'immunogénicité des formulations de p24 ont été réalisées en parallèle de celles avec l'OVA. Concrètement, les mêmes animaux ont été immunisés avec les LNP-OVA, les LNP-p24 et une seule dose d'immunostimulant pour les deux antigènes. En procédant ainsi, l'OVA sert de contrôle vis-à-vis de la p24 dont nous savons qu'elle est très peu immunogène.

VI.2.1 Intérêt de la vectorisation de la p24

L'intérêt de vectoriser un antigène par les LNP a été dans un premier temps démontré dans le chapitre IV sur le modèle de l'OVA, et nous devons désormais le confirmer dans le cas concret du VIH avec l'antigène p24, connu pour être très peu immunogène³⁸⁴. Nous avons donc évalué la réponse humorale induite chez des souris immunisées avec des formulations contenant l'équivalent de 5 µg de p24 vectorisée ou libre, adjuvantée ou non avec 10 µg de MPLA (Figure VI.7).

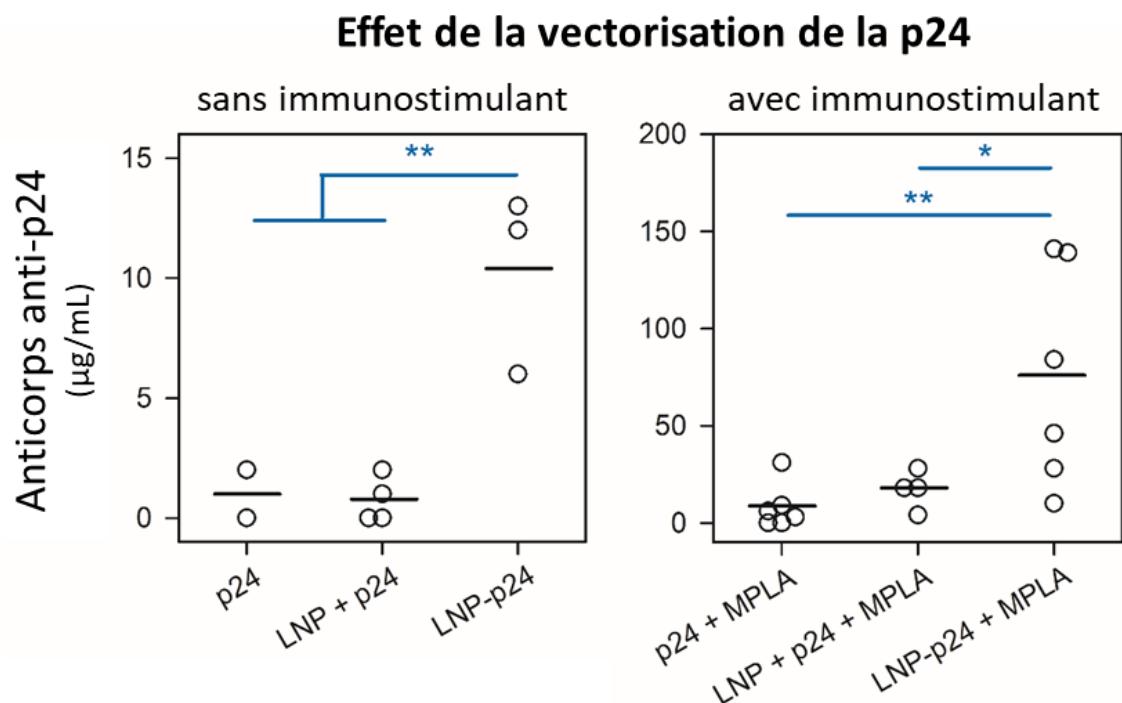


Figure VI.7. Analyse de la réponse humorale anti-p24 et intérêt de la vectorisation de la p24.

Production d'anticorps spécifiques de l'OVA en réponse à des immunisations de souris avec des formulations de p24 et de MPLA. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe. Analyse statistique ANOVA-1 suivie du test de Fisher.

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Dans les deux cas, avec ou sans adjuvant, les LNP-p24 génèrent une production d'anticorps significative, augmentée en moyenne d'un facteur 10 (LNP-p24 : 10 ± 2 vs p24 : 1 ± 1 ; $p=0.005$ et LNP-p24 + MPLA : 75 ± 23 vs p24 + MPLA : 8 ± 5 ; $p=0.007$). En revanche, le simple ajout de LNP nues à la p24 n'a aucun effet puisqu'elles ne jouent que le rôle de vecteur et n'ont pas de propriétés immunostimulantes intrinsèques. En outre, la présence d'un immunostimulant tel que le MPLA est indispensable à l'induction d'une réponse humorale de haute magnitude. Ces résultats sont totalement en accord avec ceux obtenus dans le cadre de la preuve de concept avec l'OVA.

VI.2.2 Comparaison des voies d'administration et doses d'antigène

Comme nous l'avons fait précédemment avec l'OVA comme modèle, nous avons souhaité vérifier que les formulations de p24 sont performantes par une autre voie d'immunisation que l'injection intrapéritonéale et à plusieurs dose de p24. Pour cela, nous avons réalisé une campagne d'immunisation de souris afin de comparer l'injection classique par voie intrapéritonéale avec l'administration sous-cutanée, cela à des doses décroissantes de p24 de 5, 1.5 et 0.5 µg. Ces paramètres ont été évalués sur la base de la formulation LNP-p24 + CpG, en rajoutant la formulation LNP + p24 + CpG comme contrôle pour l'administration sous-cutanée aux doses de p24 de 0.5 et 5 µg. L'immunogénicité de la p24 a été déterminée par dosage de la réponse humorale induite chez les souris. Les résultats sont représentés dans leur globalité en *Figure VI.8*.

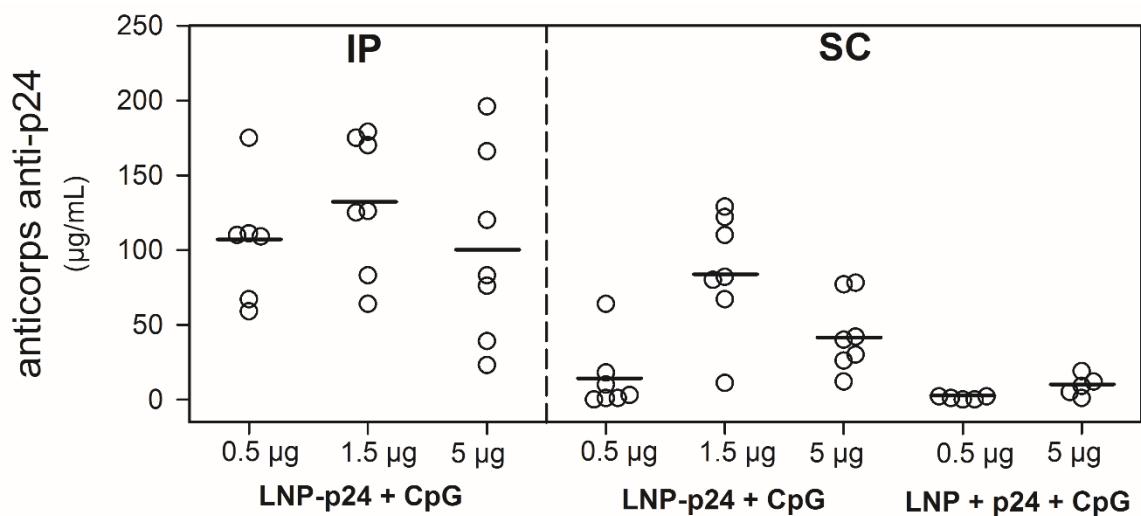


Figure VI.8. Analyse de la réponse humorale et étude de la voie d'injection et de la dose de p24.

Production d'anticorps spécifiques de la p24 en réponse à des immunisations de souris avec des formulations contenant différentes doses de p24 et selon deux voies d'administration. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe.

Afin de mieux comparer les différents groupes entre eux, nous les avons représentés séparément. Nous avons tout d'abord analysé la réponse humorale induite par des immunisations sous-cutanées avec différentes doses de p24 (Figure VI.9). Les résultats montrent que les LNP sont capables d'augmenter l'immunogénicité de la p24 en administration sous-cutanée sous réserve que la dose de p24 soit suffisante. Une dose de 0.5 µg de p24 est trop faible pour que la vectorisation de la p24 par les LNP impacte significativement la réponse humorale (LNP-p24 + CpG [0.5] : 14 ± 9 vs LNP + p24 + CpG [0.5] : 1 ± 0). En revanche, à une dose de p24 de 5 µg la vectorisation de la p24 par les LNP permet d'augmenter la production d'anticorps d'un facteur 5 (LNP-p24 + CpG [5] : 44 ± 10 vs LNP + p24 + CpG [5] : 9 ± 3 ; $p=0.030$). De plus, parmi les 3 doses testées, la dose intermédiaire de 1.5 µg de p24 semble être la plus performante et se distingue significativement des 2 autres doses testées (LNP-p24 + CpG [1.5] : 86 ± 15 ; $p<0.001$ par rapport à LNP-p24 + CpG [0.5] et $p=0.005$ par rapport à LNP-p24 + CpG [5]). Ces observations sont cohérentes avec celles réalisées sur le modèle de l'OVA dans le chapitre IV, puisque la dose intermédiaire de 3 µg d'OVA conduisait également à la production d'anticorps spécifique la plus élevée.

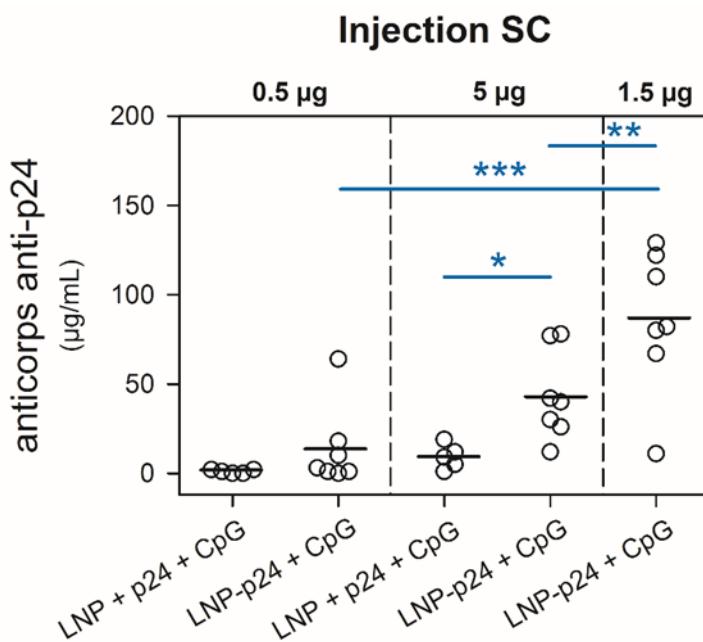


Figure VI.9. Analyse de la réponse humorale anti-p24 et étude de la dose de p24.

Production d'anticorps spécifiques de la p24 en réponse à des immunisations sous-cutanées de souris avec des formulations contenant différentes doses de p24. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe. Analyse statistique ANOVA-1 suivie du test de Fisher. *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'effet de la dose de p24 en administration intrapéritonéale et finalement comparé ces 2 techniques d'administration. A l'inverse de l'administration sous-cutanée, la dose de p24 n'influe pas la réponse humorale en administration intrapéritonéale, ce que nous avions déjà remarqué avec l'OVA (Figure VI.10). En revanche, la p24 se comporte différemment de l'OVA dans le sens où la réponse humorale est significativement plus intense suite à une administration intrapéritonéale par rapport à une administration sous-cutanée (LNP-p24 + CpG [SC] vs LNP-p24 + CpG [IP] : $p<0.001$ pour 0.5 μ g de p24 ; $p=0.050$ pour 1.5 μ g de p24 ; $p=0.016$ pour 5 μ g de p24).

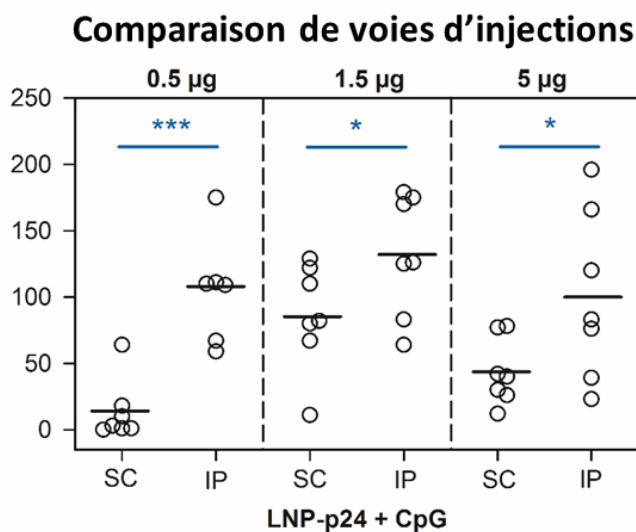


Figure VI.10. Analyse de la réponse humorale anti-p24 et étude de la voie d'injection.

Production d'anticorps spécifiques de la p24 en réponse à des immunisations sous-cutanées de souris avec des formulations contenant différentes doses de p24. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe. Analyse statistique ANOVA-1 suivie du test de Fisher. *** $p<0.001$, * $p<0.05$.

Ces résultats démontrent que nous sommes capables d'augmenter l'immunogénicité de la p24 en la délivrant via les LNP, ce qui se vérifie par une augmentation de la production d'anticorps spécifiques en réponse à des immunisations par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée. La réponse humorale est plus intense dans le cas d'une immunisation intrapéritonéale et est indépendante de la dose de p24 injectée, ce qui autorise de réduire la dose d'antigène d'un facteur 10. En revanche, l'effet de la dose de p24 est visible en immunisation sous-cutanée, la plus faible dose de 0.5 μ g de p24 étant inefficace tandis que la dose intermédiaire de 1.5 μ g se montrant plus performante que la dose maximale de 5 μ g.

VI.2.3 Intérêt de la double vectorisation de la p24 et du CpG

D'après les études préliminaires réalisées avec le modèle OVA, nous avons identifié le CpG comme étant un immunostimulant particulièrement efficace, en particulier lorsque celui-ci est vectorisé par une LNP⁺. Nous l'avons donc appliqué à l'exemple de la p24 et avons comparé les différentes combinaisons de p24 et de CpG vectorisés ou non, dans une campagne d'immunisation dont le but est d'évaluer les réponses immunitaires en termes de production d'anticorps spécifiques et d'activation des LT, dirigées spécifiquement contre la p24.

L'analyse de la réponse humorale (*Figure VI.11 a*) montre que la vectorisation de la p24 par les LNP augmente la production d'anticorps spécifiques d'un facteur 30 (*p24 + CpG: 3 ± 3 µg/mL; LNP-p24 + CpG: 94 ± 23 µg/mL; p=0.042*). De la même manière, la délivrance du CpG par les LNP⁺ améliore également le taux d'anticorps d'un facteur 30 (*p24 + LNP⁺/CpG: 99 ± 35 µg/mL; p=0.038 par rapport à p24 + CpG*). En conséquence, la co-délivrance de la p24 et du CpG sur des vecteurs distincts accentue davantage la réponse humorale de manière significative par rapport à l'ensemble des autres combinaisons (*LNP-p24 + LNP⁺/CpG: 285 ± 51 µg/mL; p<0.001 par rapport à tous les autres groupes*). De plus, l'étude de la réponse cellulaire souligne spécifiquement le bénéfice procuré par les LNP⁺ vectorisant le CpG, car leur utilisation est indispensable à l'activation des LT (*Figure VI.11 b*). En effet, la simple vectorisation de la p24 est insuffisante pour générer une production d'IFNy par les splénocytes stimulés. Par ailleurs, la meilleure configuration permettant d'induire une importante activation des splénocytes est la double vectorisation de la p24 et du CpG, qui se distingue des autres groupes de manière significative (*P24 + CpG: 0 ± 0 pg/mL; LNP-p24 + CpG: 32 ± 11 pg/mL; p24 + LNP⁺/CpG: 1696 ± 1037 pg/mL; LNP-p24 + LNP⁺/CpG: 6220 ± 1403 pg/mL, p<0.001 par rapport à tous les groupes*).

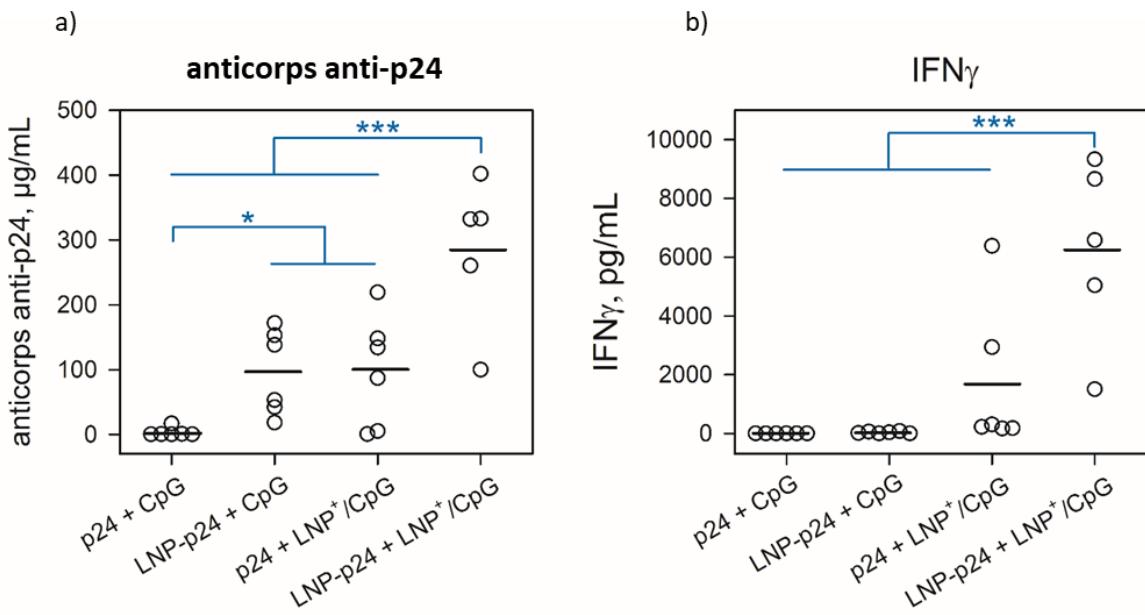


Figure VI.11. Analyse de la réponse humorale et cellulaire anti-p24 et étude des combinaisons de CpG. Réponses immunitaires évaluées chez des souris immunisées avec différentes formulations de p24 et de CpG, par a) la production d'anticorps spécifiques et b) la production d'IFN γ par les splénocytes stimulés avec l'antigène. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe. Analyse statistique ANOVA-1 suivie du test de Fisher.

*** $p<0.001$; ** $p<0.01$; * $p<0.05$.

Nous avons également analysé l'isotypage des anticorps ainsi que les acteurs de la production d'IFN γ (Figure VI.12). Les résultats révèlent que l'utilisation des LNP pour la délivrance de la p24 stimule principalement la production d'anticorps IgG1, tandis que l'emploi des LNP⁺ pour la vectorisation du CpG augmente la production d'IgG1 et d'IgA, ainsi que celle d'IgG2a dans une moindre mesure. La combinaison des deux LNP pour la co-délivrance de la p24 et du CpG apparaît comme étant la plus performante et améliore de manière significative la production de tous les isotypes étudiés ($p24 + CpG$ vs $LNP-p24 + LNP^+/CpG$; IgG1 $p=0.003$; IgG2a $p<0.001$; IgA $p=0.008$).

L'analyse des résultats de dosage intracellulaire de l'IFN γ montre que la vectorisation de la p24 par les LNP stimule particulièrement l'activation des LT CD8 ($p24 + CpG: 0.55 \pm 0.03\%$; $LNP-p24 + CpG: 0.88 \pm 0.09\%$; $p=0.022$), tandis que les LNP⁺ employées pour délivrer le CpG activent à la fois les LT CD4 ($p24 + CpG: 0.50 \pm 0.03\%$; $p24 + LNP^+/CpG: 0.82 \pm 0.11\%$; $p=0.048$) et les LT CD8 ($p24 + CpG: 0.55 \pm 0.03\%$; $p24 + LNP^+/CpG: 1.03 \pm 0.11\%$; $p=0.002$). Sans surprise, la combinaison des LNP-p24 et LNP⁺/CpG additionne les avantages procurées par chaque élément, permettant d'activer significativement les LT CD4 ($LNP-p24 + LNP^+/CpG: 1.10 \pm 0.14\%$; $p<0.001$ par rapport à $p24 + CpG$).

et CD8 ($LNP\text{-}p24 + LNP^+/\text{CpG}$: $1.21 \pm 0.09\%$; $p < 0.001$ par rapport à $p24 + \text{CpG}$). Ces résultats suggèrent que l'immunisation de souris avec la p24 et le CpG tous deux vectorisés par des LNP distinctes induit non seulement l'activation de LT auxiliaires (CD4), qui orchestrent la réponse immunitaire, mais également l'activation de LT CD8, requis pour l'élimination des cellules infectées.

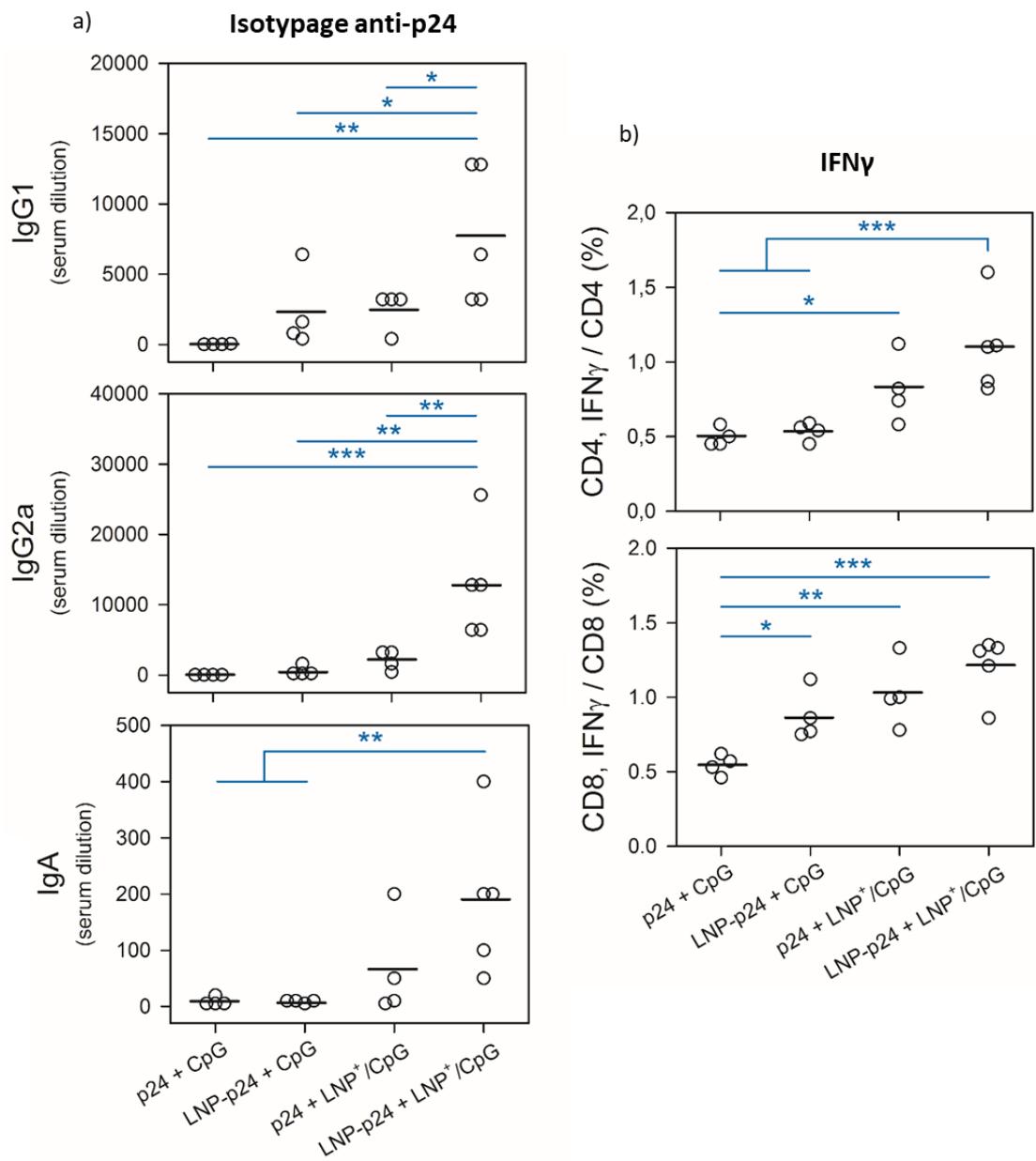


Figure VI.12. Analyse des isotypes d'anticorps et des cellules impliquées dans la réponse cellulaire.

a) Production d'anticorps spécifiques de la p24 d'isotypes IgG1, IgG2a et IgA et b) production intracellulaire d'IFNy par les LT CD4 et CD8 issus de souris immunisées avec des formulations d'OVA et de CpG. Chaque cercle représente une souris et les barres représentent la moyenne du groupe. Analyse statistique ANOVA-1 suivie du test de Fisher.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec l’OVA comme antigène (chapitre V), ce qui supporte la versatilité des LNP qui sont capables d'accroître la réponse humorale spécifique dirigée contre deux antigènes différents, dont la p24 réputée pour sa faible immunogénicité. L'importance de l'association des deux LNP vectorisant d'une part la p24 et d'autre part le CpG est à nouveau mise en avant par l'amplitude et la qualité de la réponse immunitaire générée.

VI.3 Etude d'immunogénicité des formulations de p24 chez le macaque

Les études d'immunogénicité menées chez la souris ont indubitablement démontré l'intérêt des LNP en tant que vecteurs d'antigènes et d'immunostimulants. Afin de poursuivre notre investigation, la performance des formulations de p24 a également été testée sur un modèle de primates non humains, qui est le modèle animal le plus pertinent dans le cadre de la recherche contre le VIH en raison des similitudes avec le système immunitaire humain. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire IDMIT de Roger Le Grand.

VI.3.1 Conception de l'étude et préparation des formulations

L'étude compte 12 macaques cynomolgus répartis en 3 groupes de 4, chacun comprenant 2 mâles et 2 femelles. Les formulations vaccinales testées sont les suivantes :

- LNP-p24 + LNP⁺/CpG
- LNP-p24 + CpG
- p24 + CpG

La campagne prévoit 3 immunisations intradermiques à 6 semaines d'intervalle, suivies d'une injection supplémentaire retardée à 13 semaines après la précédente injection. Les animaux reçoivent à chaque immunisation une dose de 64 µg de p24 et 253 µg de CpG. Toutes les deux semaines, un prélèvement de sang est effectué afin de réaliser un suivi de la réponse immunitaire au fur et à mesure des immunisations (*Figure VI.13*).

Pour mener à bien cette étude, nous avons dû préparer une quantité importante de LNP-p24. En effet, dans un souci de constance nous avons préféré préparer un lot unique de particules pour réaliser la totalité des immunisations. Ayant l'habitude de réaliser le greffage de la p24 à l'échelle du laboratoire et en petites quantités (de l'ordre de 1 mg), nous sommes incapables de prédire le comportement de cette réaction lorsque les quantités de réactifs sont multipliées par 20. Nous avons donc choisi de rester dans les conditions connues, en réalisant le greffage de la p24 dans vingt tubes en parallèle contenant tous la même quantité de réactifs et traités dans les mêmes conditions. Cette fois-ci, au lieu de mélanger les LNP et la p24 dans un bain de glace, nous restons à température ambiante afin de favoriser la réaction de greffage par rapport à la formation des agrégats de p24. En raison du nombre d'échantillons à traiter, nous sommes contraints de réaliser la réaction de greffage un premier jour et de laisser la réaction se prolonger jusqu'au lendemain, jour de purification.

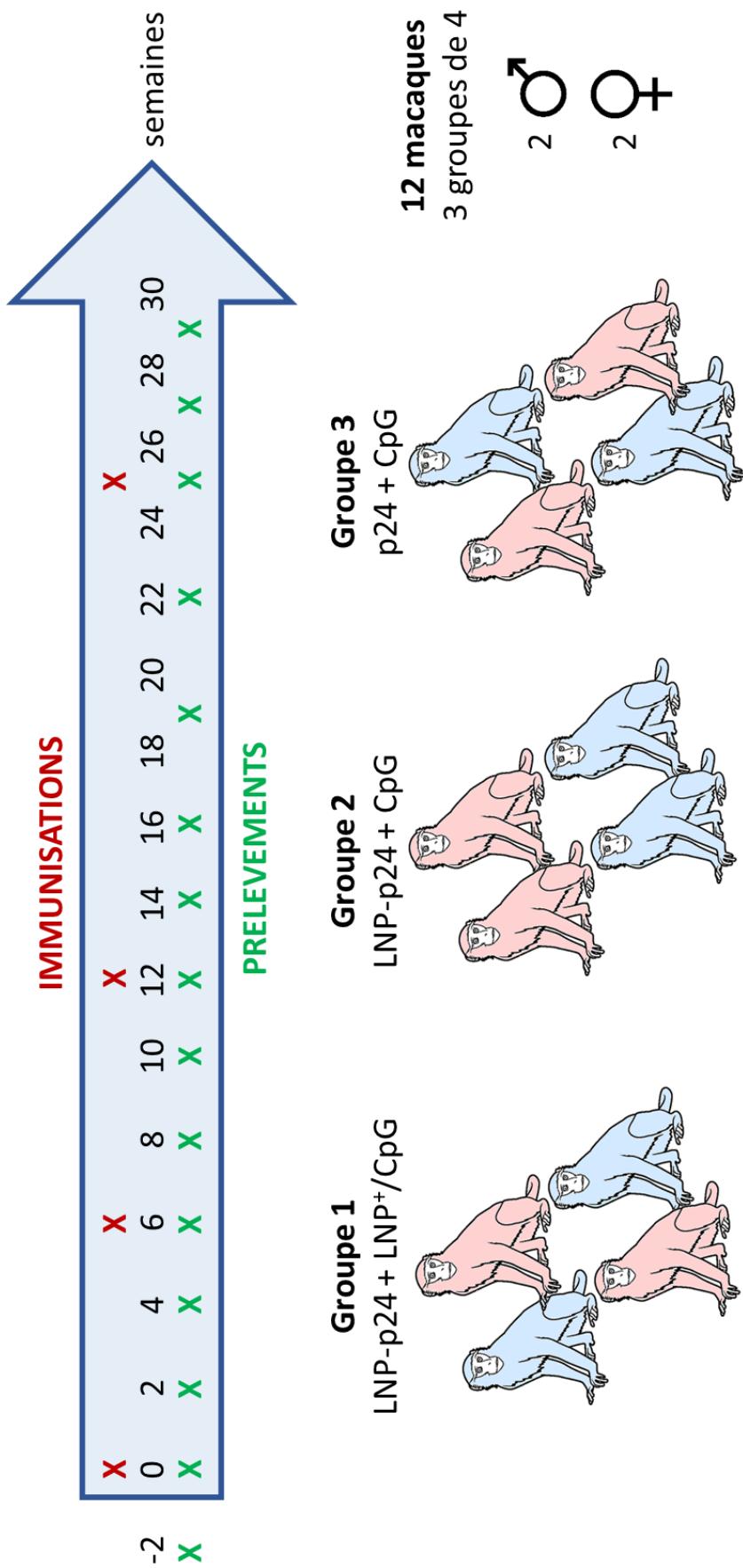


Figure VI.13. Planning d'expérience de la campagne d'immunisation sur macaques.
L'étude comprend 4 immunisations intradermiques et 15 prélèvements sanguins permettant de doser les anticorps spécifiques et les cellules productrices d'IFN γ .

Pour cette étude, les LNP contiennent du DiD mais la p24 n'est pas marquée en fluorescence. Seul un tube témoin est réalisé avec de la p24 marquée à la fluorescéine pour servir de modèle lors de la purification par chromatographie d'exclusion stérique. Tous les tubes sont purifiés dans les mêmes conditions et le profil de fluorescence obtenu pour le tube témoin indique les fractions contenant les LNP-p24 à réunir pour l'ensemble des tubes. De plus, un contrôle est réalisé avec de la p24 fluorescente seule, traitée dans les mêmes conditions de greffage hormis l'ajout de LNP. Cela nous permet de contrôler le comportement de la p24 en conditions expérimentales, en particulier l'apparition d'agrégats.

La purification du contrôle p24 montre deux pics : le pic A2 correspond à la population de p24 libre sous forme monomérique (*Figure VI. 14*). Le pic A1 correspond donc à une population plus grosse composée d'agrégats de p24, qui s'est vraisemblablement formée en raison du temps de réaction prolongé. En effet, la p24 ayant été traitée avec du 2-iminothiolane, les fonctions thiols introduites n'étant pas engagées dans une réaction de bioconjugaison finissent par réagir entre elles pour former des ponts disulfures. La purification du témoin LNP-p24 est décomposée en deux parties : la contribution LNP-mal (signal DiD) et la contribution p24-SH (signal fluorescéine). La contribution LNP-mal donne un pic unique B1, qui correspond donc à la population de LNP. A ce stade, on voit que le pic B1 (LNP) sort dans les mêmes fractions que le pic A1 (p24 agrégée). Lorsque l'on étudie la contribution p24, on observe alors trois pics. Le pic C3 est en accord avec le pic A2 correspondant à la p24 sous forme monomérique. En revanche, le pic intermédiaire C2 n'est cohérent avec aucun pic du contrôle. Enfin, le pic C1 est superposable à la fois au pic B1 (LNP) et au pic A1 (p24 agrégée). Ce pic C1 est donc constitué soit de p24 greffée aux LNP, soit de p24 agrégée. Le pic C1 étant directement corrélé avec le pic B1, cela confirme la présence de LNP. Cependant, cela ne garantit pas que ces LNP portent de la p24, le signal de p24 pouvant être dû à de la p24 agrégée, mélangée aux LNP nues. Nous savons que la p24 forme spontanément des agrégats en solution, préférentiellement des dimères³⁸⁷, d'autant plus en présence de lipides. Or, le contrôle p24 a été réalisé en l'absence de LNP. Par conséquent le pic d'agrégats observé dans le contrôle peut être de nature différente que celui observé dans le témoin. En effet, la formation d'agrégats dans le tube contrôle provient vraisemblablement de la formation de ponts disulfures entre plusieurs protéines fonctionnalisées, tandis que dans le cas du tube de LNP-p24 les fonctions thiols introduites dans la p24 vont réagir avec les fonctions maléimides exprimées par les LNP. Cela défavorise la formation de ponts disulfures entre deux protéines et la formation d'agrégats de p24 est principalement liée à un phénomène de dimérisation encouragé par la présence des lipides des LNP. Nous supposons donc que les agrégats de p24 constituent le pic C2 et que le pic C1 correspond à la p24 greffée aux LNP.

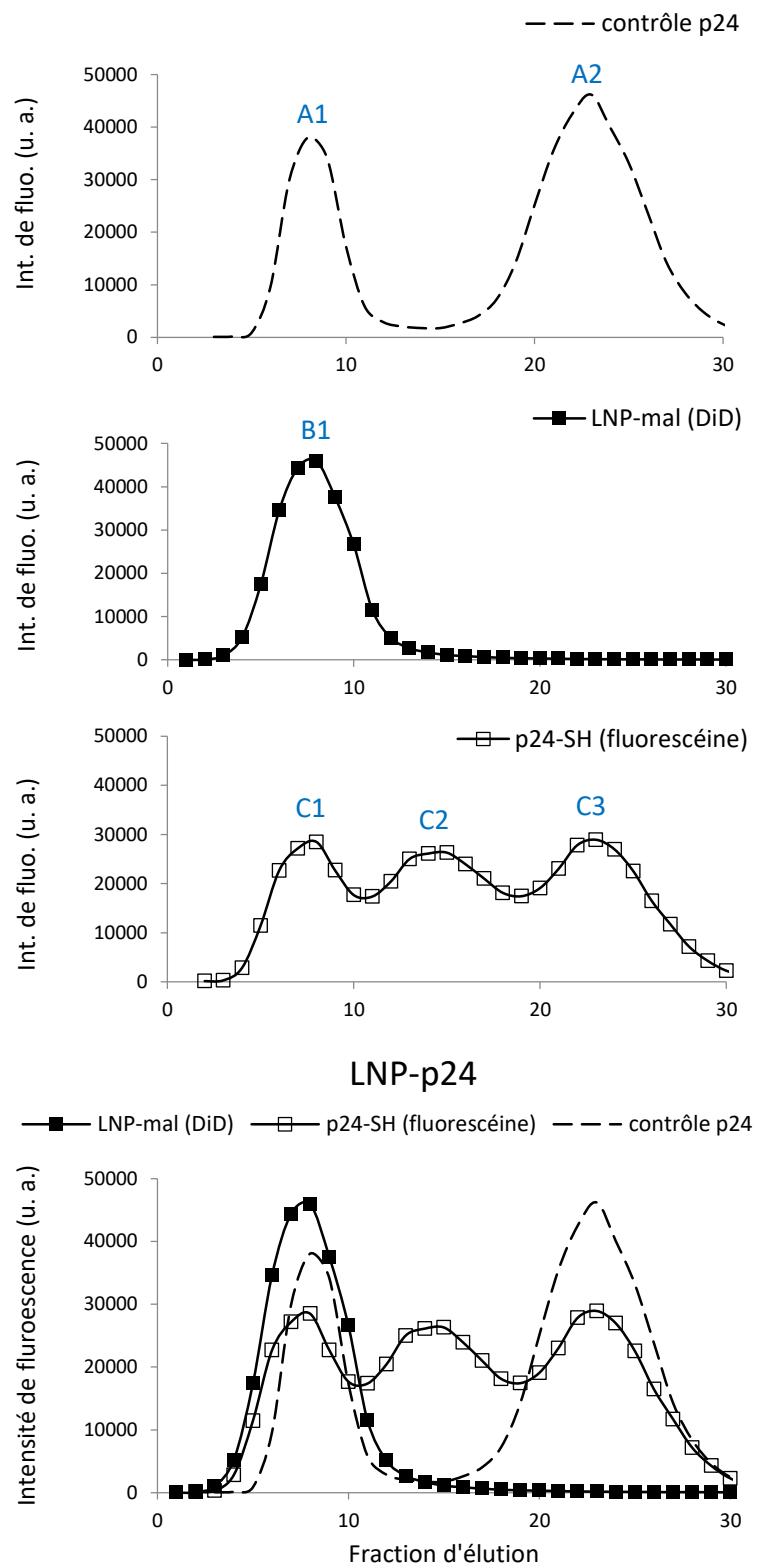


Figure VI.14. Purification des LNP-p24 témoin et contrôle p24 par chromatographie d'exclusion stérique.

Graphes individuels puis superposition.

Afin de vérifier notre supposition, nous avons réalisé un immunoassay. Les fractions 4 à 10 correspondant au pic C1 ont été rassemblées. Nous avons la certitude que ces fractions contiennent les LNP et nous voulons vérifier que la p24 est bien greffée sur les LNP. Pour cela, nous réalisons un coating avec un anticorps standard anti-p24 dans une plaque 96 puits, et nous déposons ensuite un échantillon des fractions rassemblées du pic C1. Après plusieurs lavages, nous mesurons l'émission de fluorescence du DiD contenu dans les LNP. En effet, si la p24 présente dans le pic C1 est bien greffée aux LNP, elle se fixe à l'anticorps tout en restant accrochée aux LNP. A l'inverse, si la p24 est sous forme d'agrégats et non fixée aux LNP alors les LNP nues n'ont aucune raison de se fixer à l'anticorps anti-p24 au fond du puits. Pour vérifier la spécificité de la fixation, des contrôles sont réalisés avec un coating de BSA et des échantillons de PBS et de LNP nues. Une émission de fluorescence du DiD est observée dans le seul cas de l'échantillon du pic C1 déposé sur un coating d'anticorps anti-p24 (Figure VI.15). Cette expérience confirme que la p24 est bel et bien greffée à la surface des LNP. Cependant, les pics C1 et C2 sont relativement rapprochés et la séparation entre ces deux pics est imparfaite. Par conséquent, en rassemblant les fractions 4 à 10, nous récupérons forcément une petite proportion d'agrégats de p24.

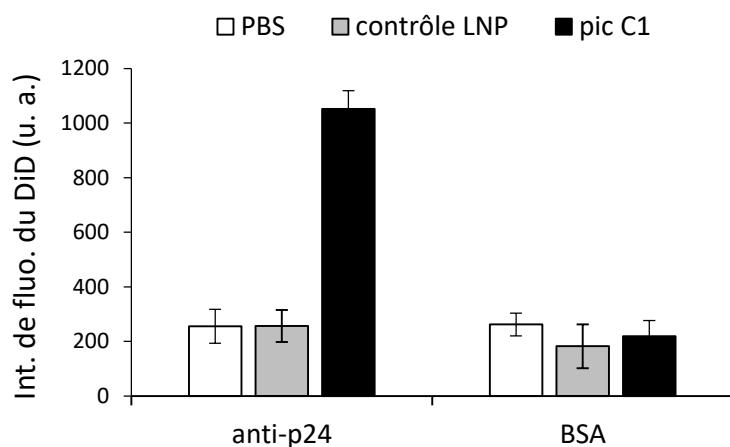


Figure VI.15. Contrôle du greffage de la p24 sur les LNP par immunoassay.

La quantité de p24 greffée est calculée de la même manière que pour l'OVA (voir *calcul partie expérimentale section VII.2.3 p.244*). Selon ce calcul, pour un total de 38 mg de p24 et 1.17 g de LNP introduits, nous obtenons un rendement de p24 de 26 % et un rendement de LNP de 89 % soit un taux de charge de 0.94 % massique et 59 p24/LNP.

L'étude d'immunogénicité chez le primate se déroulant sur plusieurs mois, le lot de LNP-p24 préparé dans ce but a été suivi tout au long de l'étude et après celle-ci. Les LNP-p24 ont fait montre d'une grande stabilité sur le très long terme. La taille des particules a été mesurée par DLS jusqu'à 15 mois après formulation, démontrant un profil de taille superposable au profil initial et l'absence d'agrégats de particules (Figure VI.16).

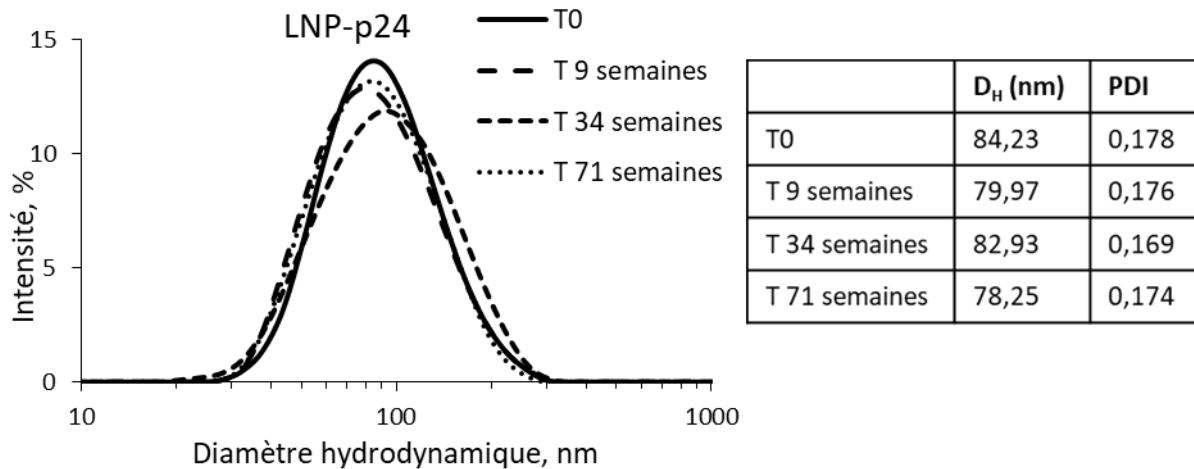


Figure VI.16. Stabilité des LNP-p24.

Superposition des profils de taille de LNP-p24 mesurés par DLS le jour du greffage ainsi que 9 semaines, 34 semaines et 71 semaines après conservation à 4°C.

VI.3.2 Evaluation des réponses immunitaires chez le macaque

L'immunogénicité des formulations de p24 et CpG administrées aux macaques a été évaluée par la production d'anticorps spécifiques, dosés dans le sérum des macaques, ainsi que par la quantification des cellules productrices d'IFN γ par ELISPOT, au fur et à mesure de l'étude (Figure VI.17).

Le dosage des anticorps spécifiques de la p24 révèle que le groupe de macaques immunisé avec la formulation LNP-p24 + LNP $^+$ /CpG se distingue des autres en termes de taux significatifs d'anticorps, à hauteur de 1975 μ g/mL en moyenne et 4198 μ g/mL chez l'individu le plus réactif ($p<0.001$ par rapport à tous les groupes). La production d'anticorps commence dès la première immunisation (semaine 2) pour 2/4 individus du groupe LNP-p24 + LNP $^+$ /CpG et s'élève pour 4/4 individus dès la deuxième injection (semaine 8) en étant maintenue jusqu'à la fin de l'étude (semaine 29). Les injections supplémentaires sont suivies d'un pic de production d'anticorps, augmentée d'un facteur 3

(semaine 14) à 6 (semaine 27), tandis que le taux d'anticorps est en moyenne 50 fois plus élevé que dans le groupe contrôle p24 + CpG. Dans le meilleur des cas, une augmentation de la réponse humorale d'un facteur 95 est mesurée aux semaines 10, 12 et 19 par rapport au groupe contrôle. Dans les autres groupes, LNP-p24 + CpG et p24 + CpG, la réponse humorale est pratiquement inexistante tout au long de l'étude, malgré les multiples immunisations.

En parallèle de la réponse humorale, la réponse spécifique des LT a été mesurée par dosage des cellules productrices d'IFNy. La tendance obtenue au cours du temps concorde avec les résultats observés pour la production d'anticorps. La principale différence est que l'ensemble des groupes produit une réponse, avec des magnitudes différentes. A partir de la 2^{ème} immunisation (semaine 8), le groupe LNP-p24 + LNP⁺/CpG est significativement plus efficace à promouvoir la réponse des LT par rapport aux 2 autres groupes ($p<0.05$ par rapport aux autres groupes). Les immunisations suivantes provoquent une élévation supplémentaire du nombre de cellules productrices d'IFNy, en particulier dans le groupe LNP-p24 + LNP⁺/CpG, avec une augmentation d'un facteur 2 (semaine 14) à 4 (semaine 27) jusqu'à un maximum de 293 SFC/ 10^6 PBMC en moyenne et 475 SFC/ 10^6 PBMC chez l'individu le plus réactif (*p<0.001 par rapport aux autres groupes*). Aux semaines 14, 27 et 29, nous avons noté une amélioration d'un facteur 20 de la réponse cellulaire dans le groupe LNP-p24 + LNP⁺/CpG par rapport au groupe contrôle p24 + CpG.

L'ensemble de ces résultats supporte les avantages conférés par les LNP pour la délivrance de la p24 et du CpG. En particulier, les LNP⁺ vectorisant le CpG se sont montrées indispensables à l'induction de réponses immunitaires humorales et cellulaires de forte magnitude chez le macaque. En effet, la simple vectorisation de la p24 s'est montrée insuffisante pour stimuler la réponse cellulaire comme c'est le cas chez la souris, mais également la réponse humorale, bien qu'une réponse soit observée chez la souris. Le bénéfice des LNP a été une fois de plus démontré par leur capacité à augmenter considérablement l'immunogénicité de la p24, que nous avons quantifiée chez la souris ainsi que chez le macaque.

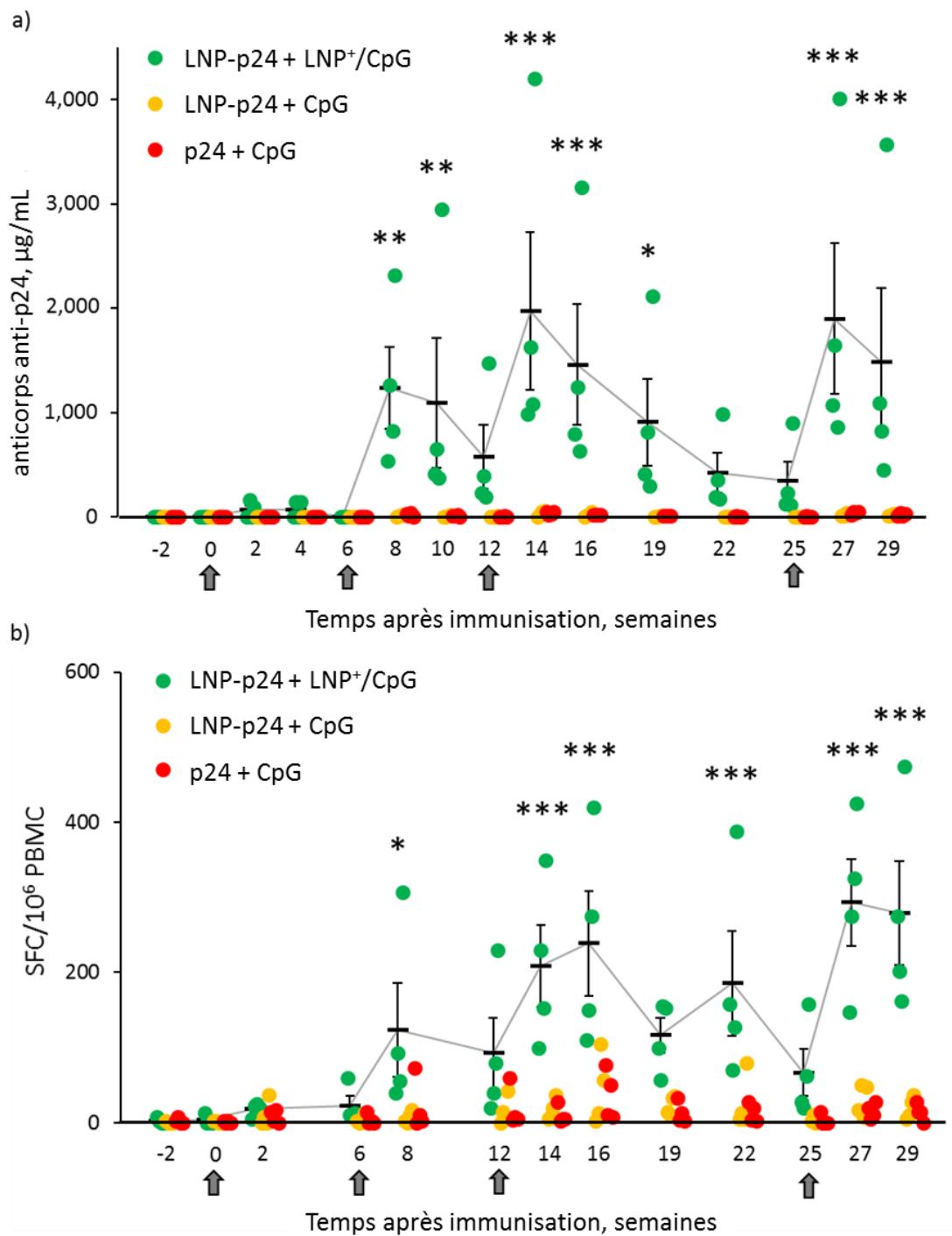


Figure VI.17. Analyse de la réponse humorale et cellulaire anti-p24 sur NHP.

Réponses immunitaires produites chez des macaques cynomolgus immunisés par voie intradermique avec des formulations de p24 et de CpG évaluées pendant 29 semaines en termes de a) production d'anticorps spécifiques et b) cellules activées productrices d'IFNy. Chaque cercle représente un macaque et les barres représentent les moyennes \pm erreur standard dans le groupe LNP-p24 + LNP⁺/CpG. Les flèches désignent les dates d'immunisation. Analyse statistique ANOVA-2 suivie du test de Holm-Sidak. *** $p<0.001$; ** $p<0.01$; * $p<0.05$.

Discussion du chapitre VI

Dans ce chapitre, nous avons décrit l'emploi des LNP pour la délivrance de la p24 comme étant un antigène modèle stratégique du VIH et pour faire suite à la preuve de concept réussie avec l'OVA. Nous nous sommes employés à greffer la p24 à la surface des LNP selon la même stratégie mise au point avec l'OVA. Cependant, ce protocole s'est montré insatisfaisant dans le cas de la p24 en raison du très faible rendement obtenu (moins de 5 % de p24 greffée). L'une des raisons à cet échec est la tendance de la p24 à s'auto-assembler spontanément en solution pour former des dimères, en particulier en présence des lipides des LNP. Ces agrégats de p24 sont de taille relativement proche de celle des LNP, ce qui peut les rendre difficilement séparables par exclusion stérique. Parmi les différentes stratégies de bioconjugaison testées de manière préliminaire, nous avons identifié l'addition de Michael thiol-maléimide avec la fonction maléimide portée par les LNP et la fonction thiol portée par la p24, comme étant la plus prometteuse. Grâce à l'optimisation des conditions opératoires, nous sommes parvenus à améliorer le rendement de réaction jusqu'à 25 % de p24 greffée, avec une population de LNP-p24 distincte de la population résiduelle d'agrégats de p24. Les particules obtenues sont remarquablement stables dans le temps, ce que nous avons démontré par DLS jusqu'à 15 mois après formulation. Ces améliorations nous ont permis de produire des lots de LNP-p24 en quantités suffisantes pour des expériences en biologie et acceptables d'après les études de cytotoxicité démontrant leur innocuité. Cependant, ce protocole demeure perfectible quant au rendement de réaction. Ladavière et al ont par exemple rapporté l'ajout d'un résidu comportant 6 lysines dans la structure de la p24, permettant d'augmenter de 30 % à 90 % le rendement de la réaction avec un polymère fonctionnalisé avec des terminaisons anhydrides³⁸⁸. En outre, les auteurs ont inhibé la dimérisation de la p24 par ajout de sodium dodecyl sulfate dans le milieu réactionnel. Dans notre cas, il nous faudrait vérifier que ces traitements et modifications de la protéine n'altèrent pas l'immunogénicité de la p24.

La p24 a été choisie comme antigène modèle de notre étude pour plusieurs raisons. Sa faible immunogénicité³⁸⁴ et les difficultés liées à son utilisation (agrégation)³⁸⁶ représentent pour nous l'occasion de tester la performance des LNP dans un cas concret et plus problématique que l'OVA, qui constitue à l'inverse un modèle de laboratoire très pratique. La pertinence de la p24 est également associée à sa faible susceptibilité aux mutations du VIH, ce qui en fait une protéine relativement bien conservée du virus et donc une cible stratégique^{374,375}. De plus, la p24 a fait l'objet de plusieurs études chez le primate non-humain (NHP)³⁸⁰⁻³⁸², en particulier par l'équipe de notre partenaire Roger Le Grand^{379,383,384}. Le modèle NHP constitue à l'heure actuelle le modèle animal de

référence pour l'évaluation préclinique de formulations vaccinales contre le VIH, dans le but de prédire leur immunogénicité et efficacité chez l'homme. En effet, les NHP présentent de grandes similitudes avec les humains sur le plan génétique et au regard de leur système immunitaire^{385,389,390}. A l'inverse, le modèle murin est moins approprié pour l'étude de vaccins humains car le système immunitaire de ces deux espèces présente des différences majeures^{391,392}, à l'origine du manque de fiabilité des prédictions réalisées chez la souris malgré la disponibilité de modèles transgéniques humanisés³⁹³. En outre, il existerait une corrélation entre la présence de LT cytotoxiques dirigés spécifiquement contre la p24 et le contrôle voire la diminution de la charge virale, comme rapporté dans diverses études sur NHP ou patients atteints du VIH³⁷⁶⁻³⁷⁸.

Nous avons dans un premier temps démontré que la vectorisation de la p24 par les LNP permettait de générer une réponse humorale significative chez des souris, en particulier en présence d'un immunostimulant tel que le MPLA. En effet, le taux d'anticorps spécifiques est multiplié par 10 lorsque la p24 est portée par les LNP. Le choix du CpG comme immunostimulant est encore plus avantageux puisque la réponse humorale est augmentée d'un facteur 30 par la délivrance de la p24 par les LNP. En revanche, cette combinaison ne parvient pas à stimuler la voie cellulaire de l'immunité, ce qui souligne davantage le rôle de l'immunostimulant et l'intérêt de le vectoriser également. De fait, la complexation du CpG sur les LNP⁺ s'est révélée être une condition nécessaire à l'activation des LT. La sécrétion d'IFNy par les LT spécifiques s'est ainsi élevée jusqu'à 6220 ± 1403 pg/mL, ce qui est 194 fois plus que la formulation avec le CpG sous forme libre et la production d'anticorps a été augmentée d'un facteur 3 supplémentaire (285 ± 51 µg/mL). D'autres études ont également rapporté des observations similaires en vectorisant un immunostimulant en plus de l'antigène, principalement sur le modèle de l'OVA. Zhang et al ont par exemple amélioré leur taux d'anticorps d'un facteur 5 en co-délivrant l'OVA et l'imiquimod dans des particules de PLGA et leur production d'IFNy a été augmentée jusqu'à 200 pg/mL en moyenne³⁹⁴. Des liposomes cationiques ont également été décrits par Bal et al pour la co-délivrance d'OVA et de CpG, avec pour effet de stimuler particulièrement la production d'anticorps de type IgG2a et d'induire une sécrétion d'IFNy de 1000 pg/mL en moyenne³⁹⁵. Dans un autre exemple, Ilyinskii et al ont conçu des particules polymériques pour transporter l'OVA avec du résiquimod ou du CpG, dans une même particule ou plusieurs, induisant des réponses immunitaires plus fortes avec les deux stratégies de délivrance³⁷⁰. A notre connaissance, nous décrivons pour la première fois une étude d'immunogénicité impliquant des nanoparticules délivrant la p24 et un immunostimulant avec de tels niveaux de réponses des LT. Nous avons de plus noté une certaine qualité dans la réponse immune générée, d'après le dosage des isotypes IgG1, IgG2a et IgA dans le sérum des souris. La vectorisation de la p24 stimule préférentiellement la production d'IgG1 tandis que les LNP⁺ utilisées pour délivrer le CpG provoquent

une commutation isotypique vers des IgG2a et IgA. Ce phénomène traduit une polarisation Th1 de la réponse immune, impliquée dans la promotion de l'activité cytotoxique des LT. Quant aux IgA, ils jouent un rôle central dans l'immunité mucosale, ce qui est d'une grande importance afin de bloquer les pathogènes aux points d'entrée de l'organisme. En particulier, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses ont été identifiés comme des lieux de résidence de réservoirs viraux³⁹⁶⁻³⁹⁸. Ces réservoirs sont des LT CD4 infectés par le VIH mais en état de dormance et donc non activés. Par conséquent, ces cellules ne produisent que très peu de virions et sont difficiles à détecter et éliminer, permettant au virus de persister dans l'organisme³⁹⁹. L'utilisation des LNP s'est d'autant plus montrée avantageuse par la production d'IFNy par les sous-types de LT spécifiques. Nous avons à nouveau observé des contributions distinctes de la part des LNP selon qu'elles soient employées à délivrer la p24 ou bien le CpG. Les LT CD4 ont été principalement stimulés par la délivrance du CpG via les LNP⁺ alors que les deux LNP délivrant la p24 et le CpG ont contribué à activer les LT CD8. Par cette double stimulation, les LNP contribuent à favoriser l'orchestration de la réponse immune par les LT auxiliaires ainsi que l'élimination des potentielles cellules infectées par les LT cytotoxiques.

Afin de compléter notre étude d'immunogénicité de la p24 de manière pertinente, nous nous sommes tournés vers le modèle animal le plus adapté : les NHP. Nous avons ainsi mené une étude de 7 mois comprenant 4 immunisations intradermiques réalisées sur 12 macaques répartis en 3 groupes identiques. L'immunogénicité comparative des formulations de p24 et CpG a été évaluée au cours d'un suivi longitudinal bimensuel sur la base de la production d'anticorps spécifiques et de cellules sécrétrice d'IFNy. L'analyse de la réponse humorale a clairement identifié la formulation LNP-p24 + LNP⁺/CpG comme étant la seule à induire la production d'anticorps spécifiques. Les anticorps sont apparus dès les 2 premières semaines suivant la première immunisation pour 2/4 animaux et les 4 macaques du groupe ont répondu dès la 2^{ème} immunisation. Chaque injection supplémentaire a été suivie d'une élévation de la réponse humorale, atteignant des taux d'anticorps de 1975 µg/mL en moyenne et 4198 µg/mL chez le sujet le plus réactif. Concernant l'analyse de la réponse cellulaire, bien que tous les groupes aient produit une réponse, celle mesurée dans le groupe LNP-p24 + LNP⁺/CpG s'est distinguée d'un facteur 20 dès la 2^{ème} injection. Des taux maximaux de cellules productrices d'IFNy de 293 SFC/10⁶ PBMC en moyenne et 475 SFC/10⁶ PBMC chez le sujet le plus réactif ont été mesurés. L'ensemble de ces réponses immunitaires a persisté pendant 13 semaines sans stimulation supplémentaire et a de nouveau été relancé par la dernière immunisation. A notre connaissance, la description de réponses immunitaires spécifiquement dirigées contre la p24 sur un modèle de primates non humains d'une telle magnitude a rarement été rapportée avec des vecteurs synthétiques. Nous décrivons justement ici un vecteur synthétique capable d'induire des réponses immunitaires d'intensité comparable aux vecteurs viraux^{381,400,401}. En revanche, à immunogénicité

égal notre système présente des avantages pertinents par rapport aux vecteurs viraux : les LNP sont non toxiques et produites par un procédé simple et reproductible. Seules de rares études ont été conduites sur des primates pour l'évaluation de l'immunogénicité de la p24 en utilisant des vecteurs synthétiques. Parmi celles-ci, Ataman-Önal et al ont décrit des particules de PLA anioniques de 500 nm avec la p24 adsorbée en surface³⁷⁹. Les études d'immunogénicité ont été réalisées sur 2 macaques qui ont reçu une dose élevée de 500 µg de p24, conduisant à une augmentation de la production d'anticorps (dilution maximale de sérum 1 000 000) et du taux de cellules productrices d'IFNγ (700 spots/10⁶ PBMC) pour 1/2 macaque réactif. Dans un autre exemple, l'immunogénicité de la p24 a été renforcée par la fusion avec un anticorps ciblant le récepteur DEC-205 (DEC-p24) présent sur les DC, connu pour favoriser la présentation croisée de l'antigène³⁸⁰. En combinaison avec une forte dose de 1 mg de poly(IC), les immunisations de DEC-p24 (60 µg de p24) ont été suivies par une réponse cellulaire très élevée de 1300 SFC/10⁶ PBMC en moyenne. Une stratégie similaire a également été décrite par Flamar et al, qui ont fusionné la p24 avec un anticorps ciblant un autre récepteur des DC³⁸³. L'immunogénicité de la p24 à une dose de 60 µg a été évaluée avec ou sans adjuvant (250 µg de poly(IC)) et une augmentation maximale de la production d'anticorps d'un facteur 6 a été mesurée. Bien que la comparaison de l'ensemble de ces études soit rendue difficile par la variation des protocoles employés (nombre d'immunisations, voie d'injection, doses d'antigène et d'immunostimulant ...), nos résultats témoignent de niveaux de réponses immunitaires de haute magnitude en utilisant des doses rationnelles de 64 µg de p24 et 253 µg de CpG. De plus, nous nous sommes appliqués à la réalisation d'un suivi méthodique et régulier des marqueurs immunologiques des animaux toutes les 2 à 3 semaines pendant 7 mois, démontrant l'intensité et la persistance des réponses immunitaires dirigées contre l'antigène du VIH p24.

Ces travaux sur la p24 constituent un jalon robuste vers la conception d'un vaccin anti-VIH. Afin de compléter cette étude sur l'induction de réponses immunitaires cellulaires dirigées contre la p24, nous devons à l'avenir caractériser l'activité cytotoxique des LT CD8 activés. En effet, à ce stade nous avons montré que les LT CD8 spécifiques de la p24 étaient effectivement activés par les immunisations, en témoigne leur sécrétion d'IFNγ, mais nous n'avons pas eu l'opportunité d'évaluer leur capacité à lyser des cellules infectées exprimant des peptides de la p24 sur leur CMH-I. Une telle réponse cytotoxique est indispensable à l'élimination des cellules infectées par le VIH et qui constituent des réservoirs viraux. En revanche, les anticorps spécifiques de la p24 que nous produisons ne sont pas adaptés à la neutralisation des virions, puisque la p24 est exprimée dans la capsid du virus et non à sa surface. Pour adresser ce point, nous projetons d'employer les LNP pour la délivrance d'autres antigènes du VIH, cette fois-ci des glycoprotéines de l'enveloppe virale, comme par exemple la gp120 ou gp41. L'enjeu sera alors d'induire la production d'anticorps spécifiques et

neutralisants à large spectre, à savoir que ces anticorps pourront identifier un grand nombre de mutants du virus. A terme, l'objectif est de proposer une formulation contenant plusieurs antigènes, voire également plusieurs immunostimulants, afin de combiner les effets et bénéfices de chacun dans le but d'induire des réponses immunitaires de grande amplitude et capables d'une part de neutraliser les particules virales circulantes ainsi que d'éliminer les cellules infectées et réservoirs vitaux.

PARTIE EXPERIMENTALE

VII.1 Préparation des LNP

VII.1.1 Formulation des LNP

Les LNP neutres sont formulées en préparant séparément une phase organique et une phase aqueuse. La phase organique est obtenue en ajoutant de la suppocire NC (mono-, di- et triglycérides saturés, Gattefossé), de la super refined Soybean oil (triglycérides saturés et insaturés, Croda) et du tensio-actif Lipoid S75 (phosphatidylethanolamine et phosphatidylcoline, Lipoid) dans un vial en verre de 4 mL. Ces composés sont solubilisés dans du dichlorométhane (environ 2 mL) en vortexant. Si besoin, un fluorophore (le plus souvent du DiD) est ajouté au mélange à 10 mM (aliquots préalablement préparés ; poudre solubilisée dans quelques gouttes de dichlorométhane. Une fois les différents composants de la phase organique parfaitement solubilisés, le solvant est complètement évaporé dans un bain marie à 50°C sous un flux d'argon (une dizaine de minutes). Pendant ce temps, la phase aqueuse est préparée en solubilisant le tensio-actif PEGylé Myrj S40 (Croda) dans du PBS dans un deuxième vial en verre de 4 mL. La phase aqueuse est placée dans le bain marie quelques minutes pour atteindre une température similaire à celle de la phase organique avant le mélange des deux phases. Lorsque le dichlorométhane a été complètement éliminé, une phase très visqueuse est obtenue, dans laquelle est ajoutée la phase aqueuse. Le mélange est émulsifié par sonication avec un VCX750 Ultrasonic processor (Sonics). Pour cela, une sonde conique de 3 mm de diamètre est plongée dans le mélange et ajusté à mi-hauteur en veillant à ne pas toucher les bords du vial. Le protocole de sonication comprend des cycles de 10 secondes d'ultrasons à une puissance de 25 % (soit 115 watts) espacés de cycles de 30 secondes de repos.

Des particules de 50 nm, 80 nm et 120 nm, notées respectivement F50, F80 et F120, ont été étudiées et obtenues en ajustant le ratio des composés organiques par rapport aux composés aqueux. Les masses des différents composants utilisés pour la préparation des particules selon leur taille sont indiquées dans la *Table VII.1*. La majorité du travail de thèse ayant été réalisé avec des F80, le terme LNP renvoie implicitement à des particules de 80 nm, sauf indication contraire.

Les LNP cationiques (LNP^+) sont préparées selon le protocole décrit précédemment, en modifiant la composition de la phase organique. Des phospholipides cationiques (DOTAP et DOPE ; Avanti Polar Lipids) sont ajoutés dans la phase organique et le tensioactif Lipoid S75 est remplacé par du Lipoid S75-3 (Lipoid).

Masses en mg	F50	F80 (alias LNP)	F120	LNP ⁺
suppocire	255	307.5	450	60
Huile de soja	85	102.5	150	20
Lipoid S75 ou S75-3	65	50	45	11.5
DOTAP	-	-	-	100
DOPE	-	-	-	12
PEG Myrj S40	345	300	215	126
PBS (phase aqueuse)	1250	1240	1140	1900
PBS (après dialyse)	1750	1800	2300	0
Taille théorique en nm	50	80	120	45

Table VII.1 : Masses des ingrédients entrant dans la composition des LNP de tailles et charges différentes.

Après sonication, du PBS est ajouté à la formulation de LNP pour les diluer. Les éventuels composants non incorporés dans les LNP sont éliminés par dialyse, en réalisant au moins 3 cycles dans un volume de 1 L de PBS (membrane de dialyse 12-14 kDa ; ZelluTrans). Les LNP sont finalement stérilisées par filtration sur membrane de cellulose de 0.22 µm (Millipore) sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) à flux laminaire.

Calcul du nombre de LNP par formulation

Le nombre de LNP contenues dans une formulation peut être estimé grâce au calcul suivant, valable pour toutes les formulations étudiées, neutres, cationiques et de différentes tailles.

$$\text{volume d'une LNP} = \frac{4}{3}\pi \times R^3, \text{ en considérant une particule sphérique de rayon R}$$

$$\text{volume total de phase dispersée} = \frac{\text{masse totale de phase dispersée}}{\text{densité totale de phase dispersée}}$$

La phase dispersée comprend de la cire, de l'huile, un tensioactif et des PEG, dont la densité finale est de 1.05 g/cm³.

$$\text{nombre total de LNP} = \frac{\text{volume total de phase dispersée}}{\text{volume d'une LNP}}$$

VII.1.2 Intégration de ligands de ciblage des cellules dendritiques

Les ligands d'intérêt sont des composés mannosylées présentant une terminaison amine (Omicron Biologicals). Cette fonction amine peut réagir avec une fonction acide carboxylique en présence des composés EDC (1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide) / NHS (N-hydroxysuccinimide). Pour cela, nous utilisons des stéarate-PEG-COOH (Eras Labo) qui pourront être incorporés dans la formulation des LNP. Afin de faciliter les étapes de caractérisation des ligands greffés (interférence avec les lipides), la réaction de greffage est réalisée directement sur les stéarate-PEG-COOH pour former des stéarate-PEG-MAN qui seront ensuite incorporés dans la formulation des LNP. Dans une solution tampon à pH 10, 1.3 mg de stéarate-PEG-COOH sont mélangés avec 170 µg d'EDC, 100 µg de NHS et 75 µg de monoMAN ou 170 µg de triMAN, soit 3 équivalents molaires d'EDC/NHS par stéarate-PEG-COOH et ligand MAN. La solution tampon est préparée avec 9 mL de soude 0.1 M, 25 mL de borax 0.025 M ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) et 16 mL d'eau. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à 40°C pendant 2h puis pendant la nuit à température ambiante. Les stéarate-PEG-MAN obtenus sont purifiés sur gel d'exclusion stérique ayant une limite d'exclusion de 700 Da (colonne PD MidiTrap G-10 / gel Sephadex G10, GE Healthcare). L'échantillon de PEG (1 mL) est déposé sur la colonne puis 700 µL de PBS sont ajoutés afin d'éliminer les résiduels EDC (192 Da), NHS (115 Da) et ligands (250 et 575 Da) dans les premières fractions d'élutions (1.7 mL au total). Le stéarate-PEG-MAN purifié (5 kDa en moyenne), est récolté dans un deuxième temps par élution de 1.2 mL de PBS.

Les PEG-MAN préparés sont incorporés dans des formulations diluées de F80 afin d'économiser les réactifs disponibles en quantités limitées (*Table VII.2*).

Masses en mg	F80-MAN
suppocire	81
Huile de soja	27
Lipoid S75	13
PEG MYRJ	78
PEG-MAN	1.3
glycérol	1000

Table VII.2. Formulation de PEG-MAN.

Les taux de charge de ligands mannosylés greffés sur les LNP peuvent être déterminés selon le calcul suivant.

$$\text{taux de charge MAN/LNP (\% massique)} = \frac{\text{masse(MAN)finale}}{\text{masse(LNP)finale}} \times 100$$

$$\text{taux de charge MAN/LNP (nombre)} = \frac{\text{nombre(MAN)final}}{\text{nombre(LNP)final}}$$

Une formulation de F80 diluée contient 200 mg de LNP soit 7.11×10^{14} particules.

VII.1.3 Greffage de l'OVA sur les LNP

L'antigène modèle OVA (Bio Basic Inc.) est greffé chimiquement à la surface des LNP via une bioconjugaison basée sur la réaction thiol-maléimide. Le procédé a été développé et optimisé par Thomas Courant lors de son Post-Doc en 2012-2013. Son protocole a été repris à la lettre, excepté la concentration d'OVA de départ (1 mg/ml au lieu de 10 mg/mL).

Lors de la préparation des LNP, 5 mg de PEG Myrj S40 sont remplacés par du stéarate-PEG-DTP. Après sonication, 5 μ L de TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine ; Thermo Fisher Scientific) sont ajoutés à la solution qui est maintenue sous agitation pendant 1h afin de réduire la terminaison dithiopyridine en thiol réactif. La formulation de LNP est ensuite purifiée par dialyse : on obtient des LNP-SH. Une solution de 1 mg d'OVA solubilisée dans 1 mL de PBS est mélangée pendant 1h sous agitation avec 200 μ g de sulfo-SMCC (sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate; Thermo Fisher) solubilisé dans de l'eau, soit 20 équivalents molaires de sulfo-SMCC par OVA. Si besoin, l'OVA peut être marquée en fluorescence par ajout de NHS-fluorescéine (Thermo Fisher Scientific) solubilisée dans quelques microlitres de DMSO pendant 30 min. L'excès d'agent de couplage et éventuellement de fluorophore est retiré par filtration sur gel d'exclusion stérique ayant une limite d'exclusion de 5 kDa (colonne PD10 / gel Sephadex G25, GE Healthcare). L'échantillon de protéine (1.2 mL) est déposé sur la colonne puis 1.3 mL de PBS sont ajoutés, ce qui permet d'éliminer le sulfo-SMCC (436 Da) et éventuellement la NHS-fluorescéine (473 Da) en excès dans les premières fractions d'élution (2.5 mL total). La protéine purifiée (44 kDa) est finalement récupérée dans un deuxième temps par élution de 3.5 mL de PBS. Après cette étape, la protéine est diluée et soit être reconcentrée. Pour ce faire, nous opérons par ultracentrifugation à l'aide d'une membrane de 10 kDa (Amicon Ultra, Merck Millipore ; 15 min à 4500 rpm) afin d'obtenir une solution d'OVA d'environ 500 μ L. Ensuite, la solution de protéine est placée dans un bain d'eau glacée sous agitation

magnétique dans laquelle les LNP fonctionnalisées fraîchement préparées sont ajoutées goutte à goutte, à raison de 0.5 équivalent molaire d’OVA par fonction thiol. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 1h à froid puis déplacé sur un agitateur à température ambiante pendant 1h supplémentaire. Les particules greffées obtenues (LNP-OVA) sont finalement purifiées par chromatographie d’exclusion stérique sur gel Sephadex 200 (GE Healthcare Life Sciences).

VII.1.4 Greffage de la p24 sur les LNP

La p24 est synthétisé par PX’Therapeutics et greffée chimiquement à la surface des LNP par bioconjugaison basée sur la réaction thiol-maléimide. Lors de la préparation des LNP, 5 mg de PEG Myrj S40 sont remplacés par du stéarate-PEG-(N-maleimidomethyl)cyclohexane. La formulation de LNP est ensuite purifiée par dialyse : on obtient des LNP-mal. Les fonctions thiols sont introduites dans la p24 (p24-SH) par traitement de 1 mg de p24 avec 10 µg de 2-iminothiolane (réactif de Traut, Thermo Scientific) pendant 1h sous agitation. Au besoin, la p24 peut être marquée en fluorescence par ajout de NHS-fluorescéine (Thermo Fisher Scientific) solubilisée dans quelques microlitres de DMSO pendant 30 min. L’excès d’agent de couplage et éventuellement de fluorophore est retiré par filtration sur gel d’exclusion stérique ayant une limite d’exclusion de 5 kDa (colonne PD10 / gel Sephadex G25, GE Healthcare). L’échantillon de protéine (1 mL) est déposé sur la colonne puis 1.5 mL de PBS sont ajoutés, ce qui permet d’éliminer le 2-iminothiolane (138 Da) et éventuellement la NHS-fluorescéine (473 Da) en excès dans les premières fractions d’élution (2.5 mL total). La p24 purifiée (27 kDa) est finalement récupérée dans un deuxième temps par élution de 3.5 mL de PBS. La protéine diluée est ensuite reconcentrée par ultracentrifugation à l’aide d’une membrane de 10 kDa (Amicon Ultra, Merck Millipore ; 15 min à 4500 rpm) afin d’obtenir environ 500 µL de p24. La solution de p24 est placée dans un bain d’eau glacée sous agitation magnétique dans laquelle les LNP fonctionnalisées fraîchement préparées sont ajoutées goutte à goutte. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 1h à froid puis déplacé sur un agitateur à température ambiante pendant 1h supplémentaire. Les particules greffées obtenues (LNP-p24) sont finalement purifiées par chromatographie d’exclusion stérique sur gel Sephadex 200 (GE Healthcare Life Sciences).

VII.1.5 Incorporation de MPLA dans les LNP

Le MPLA est une molécule amphiphile comprenant une tête hydrophile et une queue hydrophobe et peut donc s'insérer dans la couronne des LNP. Pour cela, 3.8 mg de MPLA sont solubilisés dans du chloroforme et incorporés à la phase lipidique d'une formulation de F80 (soit 0.5% massique de MPLA par LNP). Le solvant est évaporé de la même manière que pour la préparation de LNP classiques et les étapes suivantes sont inchangées. Les particules obtenues sont purifiées par dialyse, filtrées sur membrane de cellulose 0.22 µm et notées LNP(MPLA).

VII.1.6 Encapsulation d'imiquimod dans les LNP

L'imiquimod étant une molécule hydrophobe, il est encapsulé dans le cœur lipidique des LNP. Pour cela, 3.8 mg d'imiquimod sont solubilisés dans du dichlorométhane à 70°C et ajouté à la phase lipidique lors de la préparation des LNP. Les étapes suivantes de la formulation des LNP sont inchangées. Les particules obtenues sont purifiées par dialyse, filtrées sur membrane de cellulose 0.22 µm et notées LNP(imi).

VII.1.7 Complexation du CpG sur les LNP⁺

L'acide nucléique CpG est couplé aux LNP⁺ par interactions électrostatiques. Un acide nucléique étant chargé négativement, il est mélangé pendant 20 minutes avec des particules cationiques selon un ratio N/P égal à 48. Pour une masse donnée de LNP⁺, la masse de CpG à ajouter pour respecter le ratio N/P de 48 est déterminée selon le calcul suivant.

$$nb\ de\ charges\ + = \left(\frac{masse(DOTAP)}{masse\ molaire(DOTAP)} + \frac{masse(DOPE)}{masse\ molaire(DOPE)} \right) \times nb\ d'Avogadro$$

Une molécule de DOTAP ou DOPE contient une charge positive. Les masses molaires du DOTAP et DOPE sont respectivement 699 Da et 744 Da. Le nombre d'Avogadro correspond au nombre de molécules dans une mole et est égal à 6.022×10^{23} .

$$nb\ de\ charges\ - = \frac{nb\ de\ charges\ +}{48}$$

$$masse(CpG) = \frac{nb\ de\ charges\ -}{19} \times masse\ molaire\ (CpG)$$

Le CpG que nous utilisons est un ADN simple brin constitué de 20 nucléotides reliés par des groupements phosphates porteurs d'une charge négative chacun : un brin de CpG comporte donc 19 charges négatives. La masse molaire du CpG est de 6.4 kDa.

Après avoir mélangé les éléments selon le ratio N/P de 48, le taux de charge de CpG par LNP⁺ peut également être calculé, considérant qu'à ce ratio N/P la complexation est totale.

$$\text{taux de charge CpG/LNP}^+ (\% \text{ massique}) = \frac{\text{masse(CpG)} \times 100}{\text{masse(LNP}^+ \text{)}}$$

$$\text{taux de charge CpG/LNP}^+ (\text{nombre}) = \frac{\text{nombre(CpG)}}{\text{nombre(LNP}^+ \text{)}}$$

Une formulation de LNP⁺ contient en moyenne 4.80×10^{15} particules.

Le complexe obtenu est noté LNP⁺/CpG.

VII.2 Caractérisation physico-chimique des LNP

VII.2.1 Mesure de taille par DLS et charge de surface par ELS

La diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering) est une technique couramment employée pour caractériser la taille de particules. Cette technique repose sur le mouvement Brownien des particules. Lorsqu'elles sont en suspension, des particules suffisamment petites sont soumises à des mouvements aléatoires causés par la rencontre avec les molécules de solvant. Ces mouvements sont d'autant plus rapides que les particules sont petites. Lorsqu'un rayon lumineux traverse une solution colloïdale et rencontre une particule, il est diffusé selon un coefficient de diffusion qui est lié au mouvement Brownien de la particule et donc à sa taille. En mesurant à plusieurs reprises la lumière diffusée sur des intervalles de temps très courts, il est possible de déterminer la vitesse du mouvement Brownien et donc de remonter au coefficient de diffusion des particules. Ce coefficient de diffusion (D) est ensuite relié au diamètre hydrodynamique (D_H) des particules par la relation de Stockes-Einstein suivante.

$$D_H = 2 \frac{K_B T}{6\pi\eta_s D} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} K_B : \text{constante de Boltzmann} \\ T : \text{température} \\ \eta_s : \text{viscosité} \end{cases}$$

Une particule chargée en suspension est entourée de contre-ions provenant du milieu, qui la stabilisent (Figure VII.1). La mesure du potentiel zêta tient compte de ces couches ioniques entourant une particule. Lorsqu'un champ électrique est appliqué à la suspension de particules, celles-ci se déplacent vers l'anode ou la cathode selon leur potentiel zêta. L'instrument mesure alors leur mobilité électrophorétique μ_e , qui est reliée au potentiel zêta ζ par la formule de Smoluchowski.

$$\zeta = \frac{4\pi\mu_e\eta}{\varepsilon} \quad \text{avec } \begin{cases} \eta : \text{viscosité} \\ \varepsilon : \text{constante diélectrique} \end{cases}$$

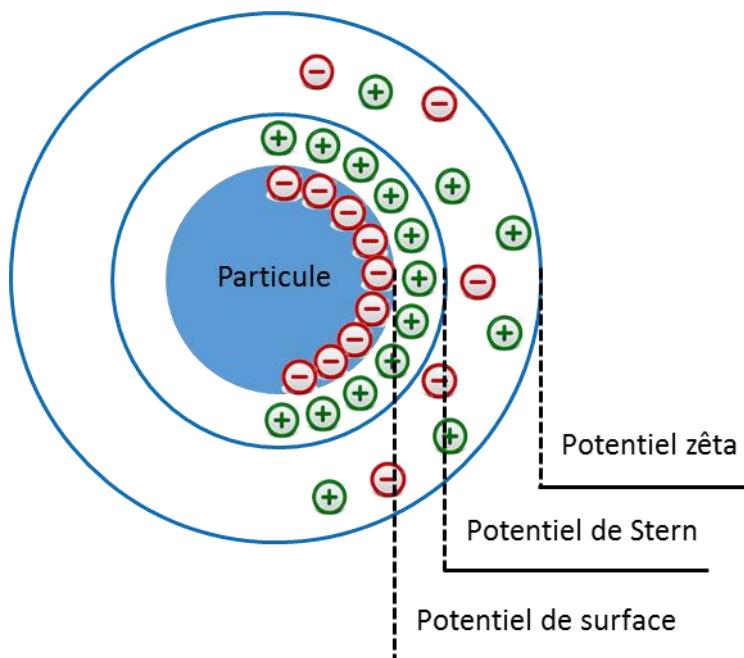


Figure VII.1. Représentation du potentiel zêta d'une particule.

La taille et le potentiel zêta sont mesurés à l'aide d'un ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments). Pour la mesure de taille, une solution de LNP à 1 mg/mL dans du PBS est préparée tandis que pour la mesure de potentiel zêta, la solution de LNP est ajustée à 10 mM NaCl. Les mesures sont réalisées à un angle fixe de 173° à l'aide d'un laser 633 nm. Chaque analyse est effectuée en triplicat en mode automatique (> 20 séquences de mesure de 10 s).

VII.2.2 Quantification des ligands mannosylés

Un dosage quantitatif des ligands mannosylés à la surface des LNP est réalisé grâce à un test colorimétrique à base de résorcinol. A haute température et en présence de sucres et d'acide sulfurique, le résorcinol conduit à un composé rouge. Cette méthode convient à des échantillons contenant entre 1 et 100 nmol de mannose. Le mélange réactionnel est composé de 200 µL d'échantillon mannosylé (PEG-MAN), de 200 µL de résorcinol à 6 mg/mL et de 1 mL d'acide sulfurique 75 % (v/v), et chauffé à 90°C pendant 30 min. Après apparition d'une coloration rouge, 200 µL de chaque tube sont prélevés et déposés dans une plaque 96 puits. L'absorbance de chaque échantillons est mesurée à 480 nm grâce à un Infinite® M1000 PRO (Tecan) et comparée à une gamme étalon réalisée avec des quantités connues de mannose comprises entre 10 et 100 nmol. Un contrôle négatif est réalisé avec du PEG-COOH afin de vérifier que les PEG n'interfèrent pas avec le test.

VII.2.3 Quantification de l'antigène greffé sur les LNP

Pour chaque réaction de greffage, deux lots sont préparés en parallèle dans les mêmes conditions, l'un servant à la quantification de l'antigène greffé sur les LNP. Dans les deux lots, les LNP sont chargées avec du DiD et dans le lot de quantification, la protéine OVA ou p24 est marquée avec de la fluorescéine. Les formulations sont purifiées par chromatographie d'exclusion stérique sur gel Sephadex 200 (GE Healthcare Life Sciences). Le volume réactionnel (moins de 2 mL pour une bonne séparation) est chargé sur la colonne, élué avec du PBS et récolté par fractions de 500 µL dans des tubes ependorf de 1.5 ou 2 mL. Sur chaque fraction de 500 µL, 200 µL sont prélevés et déposés dans une plaque 96 puits. La fluorescence du DiD (excitation 644nm ; émission 665nm) et de la fluorescéine (excitation 498nm ; émission 521nm) est mesurée dans chaque fraction à l'aide d'un Infinite® M1000 PRO (Tecan). Les fractions émettant le double signal DiD (LNP) et fluorescéine (antigène) sont rassemblées.

A l'aide des profils de fluorescence obtenus, nous pouvons déterminer le rendement de réactifs OVA ou p24 et LNP greffés ainsi que le nombre d'antigène par particule, selon le calcul suivant.

ANTIGENE

$$rdt(\text{antigène}), \% = \frac{\text{somme int. de fluo. (fluorescéine) des fractions rassemblées} \times 100}{\text{somme totale int. de fluo. (fluorescéine)}}$$

$$\text{masse(antigène)finale} = \text{masse(antigène)introduite} \times \text{rendement(antigène)}$$

$$\text{nombre(antigène)final} = \frac{\text{masse(antigène)finale} \times \text{nombre d'Avogadro}}{\text{masse molaire(antigène)}}$$

Le nombre d'Avogadro étant le nombre de molécules contenues dans une mole : 6.022×10^{23} et la masse molaire d'OVA et de p24 égales respectivement à 44 kDa et 24 kDa.

LNP

$$rdt(LNP), \% = \frac{\text{somme int. de fluo (DiD)des fractions rassemblées} \times 100}{\text{somme totale int. de fluo. (DiD)}}$$

$$\text{masse(LNP)finale} = \text{masse(LNP)introduite} \times \text{rendement(LNP)}$$

$$\text{nombre(LNP)final} = \frac{\text{masse(LNP)finale} \times \text{nombre(LNP)total dans une formulation}}{\text{masse(LNP)totale dans une formulation}}$$

Une formulation de F50 contient 1.09×10^{16} particules, une formulation de F80 en contient 2.70×10^{15} particules et une formulation de F120 en contient 9.05×10^{14} .

$$\text{taux de charge antigène/LNP (% massique)} = \frac{\text{masse(antigène)finale}}{\text{masse(LNP)finale}} \times 100$$

$$\text{taux de charge antigène/LNP(nombre)} = \frac{\text{nombre(antigène)final}}{\text{nombre(LNP)final}}$$

VII.2.4 Quantification du MPLA incorporé dans les LNP

La quantité de MPLA incorporée dans la couronne des LNP est déterminée par son activité d'endotoxines (Endpoint Chromogenic LAL Assay, Lonza). Comme indiqué par le fournisseur, chaque échantillon est incubé à 37°C avec le réactif LAL (Limulus Amebocyte Lysate) pendant 10 min. Un substrat chromogène est ensuite ajouté pour une incubation de 6 min à 37°C avant de stopper la réaction avec une solution d'acide acétique 25%. L'absorbance à 410 nm est mesurée à l'aide d'un Infinite® M1000 PRO (Tecan) et comparée à une gamme étalon réalisée à l'aide de concentrations connues de MPLA.

VII.2.5 Quantification de l'imiquimod encapsulé dans les LNP

La quantification de l'encapsulation de l'imiquimod au cœur des LNP est déterminée par mesure de fluorescence de l'imiquimod (excitation 280 nm ; émission 360 nm) sur un spectromètre à luminescence LS50B (Perkin Elmer). L'échantillon LNP(imi) est préalablement dilué dans du PBS jusqu'à ce que son absorbance soit inférieure à 0.1, de sorte de se positionner dans la zone de linéarité de la relation entre l'intensité de fluorescence et la concentration d'imiquimod. La mesure de fluorescence est réalisée en triplicat et comparée à une gamme étalon de l'imiquimod dans le dichlorométhane. Des contrôles négatifs avec les LNP nues sont réalisés afin de soustraire la contribution fluorescente due aux particules.

VII.2.6 Quantification des acides nucléiques complexés aux LNP⁺

La complexation de l'acide nucléique CpG sur les LNP⁺ est quantifiée par EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) sur gel d'agarose 4% (Invitrogen). Le complexe LNP⁺/CpG est migré sur gel grâce à un E-gel Imager (Invitrogen) et comparé à une échelle de tailles. Des contrôles sont réalisés avec les deux éléments indépendants LNP⁺ et CpG. Les images obtenues sont ensuite traitées avec le logiciel ImageJ.

VII.3 Caractérisation biologique des LNP *in vitro*

VII.3.1 Culture cellulaire

a. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées proviennent d'ATCC et sont cultivées dans des flasques de 75 cm² contenant 10 mL de milieu complet, dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂.

Les **JAWSII** sont des cellules dendritiques immatures issues de moelle osseuse de souris C57BL/6. Elles sont cultivées dans 80 % de milieu MEMα-glutaMAX (alpha minimum essential medium ; ThermoFisher) avec ribonucléosides, deoxyribonucléosides, L-alanyl-L-glutamine (forme stabilisée de glutamine) et 20 % de SVF (sérum de veau fœtal), complémenté avec 1 mM de sodium pyruvate, 1 % de pénicilline streptomycine et 5 ng/ml de GM-CSF murin (granulocyte macrophage colony-stimulating factor). Les JAWSII sont des cellules flottantes et adhérentes. Le milieu est renouvelé toutes les 48h et les cellules sont passées dans une nouvelle flasque lorsqu'elles arrivent à confluence (environ 15 millions de cellules). Les cellules adhérentes sont détachées par grattage doux à l'aide d'un grattoir puis la suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 min à 500 g. Les cellules sont ensemencées dans une nouvelle flasque avec 1-2 millions de cellules totales.

Les **NIH/3T3** sont des fibroblastes issus d'embryons de souris NIH/Swiss. Elles sont cultivées dans 90 % de milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; ThermoFisher) et 10 % de BCS (bovine calf serum) complémenté avec 1 % de pénicilline streptomycine. Les fibroblastes sont des cellules adhérentes. Le milieu est renouvelé toutes les 48h et les cellules sont passées dans une nouvelle flasque lorsqu'elles arrivent à environ 60 % de confluence (environ 5 millions de cellules). Après rinçage avec du PBS, les cellules sont détachées par traitement avec 1 mL de trypsine/EDTA (ThermoFisher) pendant 5 min. La suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 min à 500 g puis les cellules sont ensemencées dans une nouvelle flasque avec 0.3-0.6 millions de cellules totales.

Les **J774** sont des macrophages issus de souris BALB/c. Elles sont cultivées dans 90 % de milieu DMEM et 10 % de FBS (fetal bovine serum) complémenté avec 1 % de pénicilline streptomycine. Les macrophages sont des cellules adhérentes. Le milieu est renouvelé toutes les 48h et les cellules sont passées dans une nouvelle flasque lorsqu'elles arrivent à confluence (environ 10 millions de cellules). Après rinçage avec du PBS, les cellules sont détachées par traitement avec 1 mL de trypsine/EDTA pendant 5 min. La suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 min à 500 g puis les cellules sont ensemencées dans une nouvelle flasque avec 0.5-1 million de cellules totales.

b. Extraction et culture de cellules dendritiques primaires

Les cellules dendritiques primaires sont obtenues à partir de moelle osseuse de souris C57BL/6 âgées de 6 à 9 semaines (Charles River). Deux souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. Les fémurs sont prélevés en coupant au-delà du de l'articulation du genou et de la tête fémorale afin de conserver la stérilité. Les fémurs sont transportés sous un PSM et leurs extrémités coupées nettes avec des ciseaux. Les cellules sont extraites en faisant couler du milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) à l'intérieur des fémurs au moyen d'une seringue branchée sur une aiguille 26G (5 mL par fémur). Les agrégats de cellules sont cassés en faisant passer la suspension cellulaire plusieurs fois au travers d'une aiguille 20 G. Les cellules sont centrifugées (5 min à 1400 rpm) et reprises dans 5 mL de milieu IMDM complémenté avec 10 % de SVF, 1 % d'acides aminés non essentiels et 1 % de sodium pyruvate pour les compter. Les cellules érythroïdes et myéloïdes sont éliminées par sélection magnétique négative à l'aide d'anticorps biotinylés (TER-119-Biotin ; Ly-6G/Ly-6C-Biotin) et du kit Dynabeads™ Biotin Binder (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. La suspension cellulaire obtenue est ajustée à 5×10^5 cellules/mL dans du milieu IMDM complet. Les facteurs de croissance GM-CSF, FLT-3L et IL-6 (Invitrogen) sont ajoutés à la suspension cellulaire à des concentrations différente selon le stade de croissance des cellules (*Table VII.3*). Les cellules progénitrices sont ainsi cultivées pendant 10 jours en boîte de pétri 100 mm à 37°C avec des doses différentes de facteurs de croissance afin de devenir des cellules dendritiques (DC) matures. Le phénotype des DC est contrôlé par analyse de l'expression des marqueurs de différenciation CD11c et MHC-II en cytométrie de flux. Pour cela, les DC sont incubées avec les anticorps fluorescents correspondants pendant 30 min à 4°C (IAb-PE et CD11c-APC, BD Biosciences). L'acquisition des données est réalisée à l'aide d'un cytomètre de flux LSR II (BD Biosciences).

Jour de culture	Facteur de croissance	Concentration
0	IL-6	5 ng/mL
	FLT-3L	50 ng/mL
	GM-CSF	5 ng/mL
3	IL-6	2.5 ng/mL
	FLT-3L	40 ng/mL
	GM-CSF	5 ng/mL
5	IL-6	2.5 ng/mL
	FLT-3L	30 ng/mL
	GM-CSF	5 ng/mL
7 et 10	FLT-3L	25 ng/mL
	GM-CSF	5 ng/mL

Table VII.3. Concentration des facteurs de croissance à ajouter au milieu de culture des DC primaires.

c. Extraction de lymphocytes T primaires

Les lymphocytes T primaires sont obtenus à partir de la rate d'une souris transgénique OT-II. La souris est euthanasiée par dislocation cervicale puis la souris est disséquée afin de prélevée la rate. Celle-ci est délicatement broyée sur un tamis cellulaire de 100 µm à l'aide du piston en silicium d'une seringue de 1 ou 2 mL dans une boîte de pétri contenant 2 mL de milieu RPMI. Le tamis est rincé avec 1 mL supplémentaire de milieu RPMI. La suspension cellulaire obtenue est homogénéisée par pipetage et centrifugée pendant 5 min à 1400 rpm. Le culot cellulaire est traité avec 1 mL de tampon de lyse RBC pendant 1 min afin d'éliminer les érythrocytes. La réaction est stoppée avec 10 mL de milieu RPMI puis la suspension cellulaire est de nouveau centrifugée pendant 5 min à 1400 rpm. Les lymphocytes T sont isolés par sélection magnétique négative à l'aide du kit Dynabeads® Untouched™ Mouse T cells (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Pour cela, les cellules sont comptées afin de préparer une suspension cellulaire à 100 millions de cellules / mL dans un tampon à base de PBS contenant 1 % de BSA et 2 mM d'EDTA (isolation buffer). Pour 500 µL de cellules on ajoute 100 µL de SVF et 100 µL du mélange d'anticorps issu du kit, que l'on incube pendant 20 min à 4°C. Pendant ce temps, les billes magnétiques sont lavées dans l'isolation buffer en utilisant un aimant. Les cellules marquées sont lavées avec 10 mL d'isolation buffer et centrifugées pendant 8 min à 350 g. Les cellules sont reprises dans 4 mL d'isolation buffer auquel on ajoute 1 mL de billes magnétiques lavées. Ce mélange est incubé pendant 15 min à température ambiante sous légère agitation. On

ajoute ensuite 5 mL d'isolation buffer puis on utilise l'aimant afin de récolter le surnageant contenant les lymphocytes T purifiés.

VII.3.2 Analyse de cytotoxicité

La cytotoxicité des LNP a été évaluée sur les lignées cellulaires NIH/3T3 (fibroblastes), JAWSII (DC) et J774 (Mφ).

Les cellules sont ensemencées et incubées une nuit à 37°C (**fibroblastes** : plaque 12 puits, 10^5 cellules/mL, 1 mL/puits ; **DC, Mφ** : plaque 24 puits, 10^6 cellules/mL, 500 μ L/puits). Les LNP sont ajoutées dans les puits aux concentrations choisies durant 24h à 37°C. Un contrôle négatif est réalisé avec des cellules naïves et un contrôle positif avec 10 μ g/mL d'actinomycine D (**fibroblastes**) ou 1 % de saponine (**DC, Mφ**). Après lavage des cellules au PBS, la mortalité cellulaire est mesurée. Les **fibroblastes** sont analysés avec le kit Dead Cell Apoptosis (ThermoFisher), permettant de dissocier les cellules en apoptose (marquage annexinV-FITC) des cellules nécrosées (marquage iodure de propidium), selon les indications du fournisseur. Les **DC, Mφ** sont marquées au 7-AAD (7-amino actinomycine D ; 10 μ L dans 100 μ L de PBS + 1 % BSA pendant 30 min à 4°C). Les cellules sont lavées au PBS et reprises dans 500 μ L de PBS + 1 % BSA.

L'acquisition des données est réalisée à l'aide d'un cytomètre de flux LSR II (BD Biosciences). Dans le cas où plusieurs fluorophores sont utilisés, des tubes contrôles marqués avec chaque fluorophore individuellement doivent être prévus afin de régler les paramètres de compensation du cytomètre de flux. L'analyse des contrôles négatif et positif permet de délimiter la fenêtre contenant les cellules mortes.

VII.3.3 Analyse de capture cellulaire

La capture cellulaire des LNP a été déterminée sur les cellules dendritiques JAWSII. Les LNP utilisées sont préparées avec un fluorophore (DiO) encapsulé dans le cœur lipidique. Les cellules sont ensemencées en plaques 24 puits à 10^6 cellules/mL et 500 μ L/puits et incubées une nuit à 37°C. Les LNP sont ajoutées dans les puits à une dose 100 μ g/mL et laissées pendant la durée voulue (de 10 min à 20h) à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS et analysées en cytométrie de flux (LSR II, BD Biosciences) afin de dénombrer les cellules qui expriment le fluorophore encapsulé dans les LNP.

VII.3.4 Imagerie confocale

Les cellules JAWS II sont préalablement exposées à des LNP fluorescentes (marquées au DiD). Elles sont ensuite déposées sur des lamelles fonctionnalisées avec de la poly-L-lysine et incubées pendant 1h à température ambiante. Les cellules sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 10 min à température ambiante puis lavées trois fois dans du PBS. La membrane des cellules est marquée grâce à une incubation avec de la cholera toxin-biotin puis streptavidin-PE, chacune pendant 30 min à température ambiante. Après lavage dans du PBS, les lamelles sont montées sur lame de microscope au moyen d'une goutte de milieu de montage (Dako) de sorte que les cellules soient positionnées entre la lamelle et la lame de microscope. Les lames sont stockées dans le noir pendant la nuit afin de permettre la réaction de polymérisation. L'acquisition des images est réalisée grâce à un microscope ConfoCor 2 (Zeiss) et le logiciel LSM 510. Les lames sont finalement stockées sur le long terme à -20°C.

VII.3.5 Analyse d'activation cellulaire

Le caractère immunostimulant des LNP et de formulations immunostimulantes a été évalué sur des cellules dendritiques JAWSII. Les cellules sont ensemencées en plaques 24 trous à 10^6 cellules/mL et 500 μ L/trou pendant une nuit à 37°C. Les LNP sont ajoutées dans les trous aux concentrations voulues puis les cellules sont incubées pendant 24h à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS et incubées avec des anticorps fluorescent afin de mettre en évidence l'expression de marqueurs d'activation des cellules dendritiques. Dans le cas des LNP on utilise le marqueur CD86 (CD86-FITC, BD Biosciences) et pour les formulations immunostimulantes on regarde en plus les marqueurs CMH-II, CD80 et CD40 (IA^b-PE, CD80-PE, CD40-FITC ; BD Biosciences). Le marquage est réalisé pendant 30 min à 4°C dans du PBS + 1% BSA. Dans le cas où les 4 marqueurs sont analysés simultanément, deux tubes sont préparés pour chaque échantillon afin de séparer les anticorps de même couleur (FITC et PE). L'acquisition des données est réalisée à l'aide d'un cytomètre de flux LSR II (BD Biosciences). Un tube pour chaque anticorps individuel est prévu afin de régler les paramètres de compensations entre les différents fluorophores.

VII.3.6 Analyse de la présentation de l'antigène

a. Présentation de l'OVA aux lymphocytes T OT-II

Les cellules dendritiques primaires sont ensemencées en plaques 24 trous à 2×10^5 cellules/mL et 500 µL/trou pendant une nuit à 37°C. Les LNP-OVA sont ajoutées dans les trous à des concentrations variant de 1 ng/mL à 2.5 µg/mL d'OVA, avec 2 µg/mL de LPS. Après 6h d'incubation à 37°C, les cellules sont centrifugées 5 min à 1400 rpm afin d'éliminer l'excès de LNP non consommées et les lymphocytes T primaires extraits d'OT-II sont ajoutés à 4×10^5 cellules/mL et 1 mL/trou. Un contrôle positif est réalisé à l'aide de billes d'activation CD3/CD28 (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Après 4 jours de co-culture, les surnageants sont prélevés en vue du dosage ultérieur de cytokines (stockage à -20°C).

b. Présentation croisée de l'OVA

Les cellules dendritiques primaires sont ensemencées en plaques 24 trous à 10^6 cellules/mL et 500 µL/trou pendant une nuit à 37°C. Les LNP-OVA (non marquées au DID) sont ajoutées dans les trous à des concentrations variant de 0.1 à 5 µg/mL d'OVA. Après 24h d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées avec du PBS et marquées avec un anticorps fluorescent afin de mettre en évidence l'expression du peptide de l'OVA SIINFEKL sur le CMH-I (APC anti-mouse H-2K^b bound to SIINFEKL ; Biolegend). Ce marquage est réalisé pendant 2h à 4°C dans du PBS + 1% BSA. Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie de flux (LSR II, BD Biosciences).

VII.4 Caractérisation biologique des LNP *in vivo*

VII.4.1 Imagerie *in vivo* des ganglions lymphatiques

Les souris utilisées dans cette étude sont des femelles BALB/c provenant de Janvier. La souris est préalablement rasée au niveau de la zone observée à l'image (pattes arrières et bassin) afin d'éviter de polluer l'analyse à cause de l'auto-fluorescence du pelage. La souris est placée dans une chambre à induction et anesthésiée par inhalation d'isoflurane (dose 4% ; débit oxygène 1 L/min). L'anesthésie est maintenue pendant l'injection des LNP ainsi que l'acquisition des images (dose 1.5 % ; débit oxygène 1 L/min). Lorsque la souris est profondément endormie (rythme cardiaque ralenti), elle est déplacée sur une plaque chauffante pour l'injection d'un volume maximum de 10 µL contenant les LNP fluorescentes, en sous-cutané dans la patte arrière. Puis la souris est transférée dans l'appareil d'imagerie IVIS system (Xenogen) pour l'acquisition des images à l'aide du logiciel LivingImage. Le

point d'injection des LNP est masqué à l'aide d'une baguette en plastique noir. Les images sont acquises à plusieurs longueurs d'onde d'excitation (570 nm, 605 nm, 640 nm) et en utilisant deux filtres (DsRed, Cy5.5) centrés sur l'émission du DiD. A la fin de l'analyse, la souris est replacée dans sa cage pour être réveillée. Les images réalisées sont ensuite analysées à l'aide de l'option *spectral unmixing* permettant notamment de soustraire la fluorescence non spécifique émanant de l'animal afin de mieux visualiser le signal dû à la fluorescence des LNP.

VII.4.2 Analyse de capture *in vivo* des LNP

Les souris utilisées dans cette étude sont des femelles BALB/c fournies par Janvier. La première souris reçoit une injection intrapéritonéale de 200 µl contenant 10^{12} F80(DiD)-OVA et 10^{12} F120(DiO)-OVA, soit 1.1 mg de F80-OVA et 3.8 mg de F120-OVA, avec 10 µg de LPS. La souris contrôle est immunisée en intrapéritonéal avec une solution de 200 µL de PBS et 10 µg de LPS. Après 24h, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale et disséquées afin de prélever les ganglions mésentériques situés le long de la chaîne intestinale. Repérer les ganglions lymphatiques n'est pas aisés, les illustrations de l'article de Van den Broeck et al ont donc été d'une grande aide⁴⁰². Les cellules sont extraites des ganglions par broyage mécanique sur un filtre cellulaire de 70 µm. Les cellules dendritiques sont marquées à l'aide d'un anticorps fluorescence spécifique du récepteur CD11c (CD11c-PE, Biolegend ; dilution 1/100 dans PBS + 1% BSA ; 30 min à 4°C). La suspension cellulaire est lavée dans du PBS puis analysée en cytométrie de flux (LSR II, BD Biosciences). La population de cellules dendritiques est isolée afin de déterminer la proportion de ces cellules ayant internalisé les LNP, c'est-à-dire celles qui sont positives au fluorophore encapsulé dans les LNP (DiD ou DiO). Les données sont traitées à l'aide du logiciel FCexpress6 (DeNovo).

VII.5 Campagnes d'immunisation

VII.5.1 Animaux

Les souris femelles BALB/c et C57BL/6 ont été fournies par Janvier. Elles ont été hébergées dans l'animalerie de l'IAB (Grenoble, France) et réparties avec un maximum de 6 souris par cage. Le protocole d'expérimentation animale a été approuvé par le comité d'éthique (référence 2015062612254918).

Les 12 macaques cynomolgus adultes (*Macaca fascicularis*) ont été importés de Mauritanie et hébergés dans l'animalerie d'IDMIT (Fontenay-aux-Roses, France). Les macaques ont été répartis en

3 groupes de 4 comprenant autant de mâles que de femelles. Les expérimentations sur ces primates non-humains ont été réalisées dans le respect de la réglementation nationale française sous la supervision d'inspecteurs vétérinaires (permis CEA n° A 92-032-02) et en accord avec les recommandations de la directive européenne (2010/63, recommandation N°9). Le protocole d'expérimentation animale a été approuvé par le comité d'éthique (référence A15-085). Les animaux ont été hébergés par pairs dans des modules permettant les interactions sociales dans des conditions d'humidité, de température et de lumière contrôlées. Les animaux ont eu accès à de l'eau de manière illimité et nourris 1 à 2 fois par jour. L'environnement des macaques a été enrichi avec des jouets, de nouveaux aliments et de la musique. Les procédures expérimentales ont été conduites après anesthésie des animaux avec de la kétamine chlorhydrate (Rhône-Mérieux, Lyon, France, 10 mg/kg).

VII.5.2 Immunisations et prélèvements

Les solutions de LNP sont injectées aux souris par voie intra-péritonéale (IP) ou sous-cutanée (SC) au niveau du dos ou de l'arrière de la tête. Pour une injection IP, une aiguille de 23G est utilisée afin d'administrer un volume maximal de 500 µL tandis qu'une injection SC nécessite une aiguille de 27G pour l'administration d'un volume maximal de 100 µL. Les souris reçoivent une première injection suivie d'un rappel 3 semaines plus tard.

Les macaques sont immunisés par voie intradermique avec 64 µg de p24 et 253 µg de CpG. Des prélèvements de sang sont réalisés avant et après chaque immunisation pour les analyses d'anticorps et de réponses cellulaires. Ces manipulations ont été réalisées par nos partenaires d'IDMIT.

VII.5.3 Dosage des anticorps

Lors de la dissection des souris, le sang est rapidement prélevé par ponction dans la veine cave⁴⁰³. Une incubation de 24h à 4°C est nécessaire pour laisser le sang coaguler. Après centrifugation pendant 10 min à 12 000 rpm, le sérum est prélevé et stocké à -20°C pour analyses ultérieures. Les anticorps spécifiques sont dosés par ELISA en plaque 96 puits. Un coating est réalisé avec une solution d'antigène (OVA ou P24) à 1 µg/mL en PBS (100 µL/puits ; une nuit à 4°C). Les puits sont vidés puis bloqués avec une solution de PBS + 1% BSA afin d'éviter les adsorptions non spécifiques (300 µL/puits ; 2h à température ambiante). Les puits sont lavés 2 fois avec une solution de PBS + 0.05% Tween 20 à l'aide d'un laveur de plaque ELx50 (BioTek Instruments). Les sera de souris dilués sont ensuite ajoutés aux puits (100 µL/puits ; 2h à température ambiante). Plusieurs dilutions des

sera sont réalisées, entre 1/1000 et 1/100 000 selon la quantité d'anticorps attendue. Une gamme étalon de 0 à 500 ng/mL est réalisée avec des anticorps standards anti-OVA (Enzo Life Sciences) ou anti-P24 (abcam). Les puits sont de nouveau lavés 2 fois comme indiqué précédemment. Puis, l'anticorps secondaire anti-souris conjugué à l'enzyme HRP (Horseradish peroxydase ; Sigma Aldrich) est déposé dans les puits (100 µL/puits ; 1h à température ambiante). Finalement, après 5 lavages le substrat TMB est rapidement déposé dans les puits (100 µL/puits ; quelques minutes) et une coloration bleue apparaît dans les puits contenant des anticorps. Lorsqu'une coloration d'intensité satisfaisante est obtenue, la réaction est stoppée par ajout de 50 µL d'acide sulfurique, ce qui conduit à une coloration jaune. L'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaques VICTOR (Perkin Elmer). Les concentrations d'anticorps présents dans les sérum sont calculées en comparant l'absorbance mesurée à la gamme étalon. Les isotypes IgG1, IgG2a et IgA sont déterminés en utilisant les anticorps de détection anti-souris IgG1-HRP et anti-souris IgG2a-HRP (ThermoFisher) ainsi que anti-souris IgA (Novus Biologicals). En l'absence de standard pour réaliser des gammes étalons, les sérum sont dilués en série afin de déterminer la plus haute dilution donnant un signal d'absorbance supérieur à 3 fois le blanc.

Le même protocole a été utilisé pour mesurer les anticorps de macaques, à l'aide d'un anticorps anti-humain-HRP (MyBiosource) pour la détection et d'un anticorps monoclonal humain anti-p24 (MyBiosource) pour la réalisation d'une gamme étalon.

VII.5.4 Analyse de la réponse cellulaire

Une semaine après avoir été immunisées, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale et disséquées afin de prélever leur rate. Les splénocytes sont extraits par broyage mécanique sur un filtre cellulaire 100 µm et récoltés dans du milieu RPMI. La suspension cellulaire est centrifugée 5 min à 1400 rpm puis les érythrocytes sont éliminés en reprenant le culot cellulaire dans 1 mL de tampon de lyse RBC. Les cellules sont lavées par centrifugation dans 10 mL de milieu RPMI (5 min à 1400 rpm) et reprises dans 10 mL de milieu RPMI complémenté avec 10% de SVF, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% de pénicilline streptomycine et 1% de sodium pyruvate. Les cellules sont ensuite ensemencées à 10^6 cellules/mL en plaques 24 puits (500 µL/puits) et stimulées avec 50 µg d'OVA ou 10 µg de P24. Pour chaque échantillon, un contrôle négatif est réalisé avec les cellules non stimulées et un contrôle positif est préparé à l'aide de billes d'activation CD3/CD28 (Invitrogen). Après 3 jours d'incubation à 37°C, les plaques sont centrifugées pendant 5 min à 1400 rpm afin de récolter les surnageants (400 µL) qui sont stockés à -20°C. Les cytokines sécrétées sont dosées ultérieurement par ELISA selon les recommandations du fournisseur (kit Invitrogen).

Les réponses spécifiques des lymphocytes T de macaques ont été analysées par ELISPOT (Monkey IFN γ ELISpot PRO kit; Mabtech). Les cellules sanguines mononucléées périphériques (PBMC) sont isolées du sang total en utilisant des tubes CPT sodium heparin Vacutainer (BD Biosciences). Les cellules sont stimulées pendant 18h avec un ensemble de peptides couvrant la séquence entière de p24. Les spots sont comptés avec un ELISpot Reader ELR08IFL (Autoimmun Diagnostika GmbH). Ces manipulations ont été réalisées par nos partenaires d'IDMIT.

VII.5.5 Marquage intracellulaire de cytokines

Les splénocytes sont ensemencés à 2.5×10^6 cellules/mL en plaques 12 puits et stimulés pendant 24h avec 50 μ g/mL d'OVA ou 10 μ g/mL de p24. La sécrétion de cytokines est bloquée par traitement à la brefeldin A (GolgiPlug, BD Biosciences) pendant 17h puis les cellules sont fixées et perméabilisées à l'aide du kit GolgiStop (BD Biosciences). Les cellules sont marquées en utilisant les anticorps CD3-PECy7, CD4-APCCy7, CD8-APC and IFN γ -PE antibodies (Biolegend) pendant 1h à 4°C dans du PBS + 1% BSA. L'expression intracellulaire de l'IFN γ est déterminée par cytométrie de flux (LSR II, BD Biosciences).

VII.5.6 Challenge tumoral

Les cellules tumorales B16 exprimant l'OVA ont été généreusement fournies par Bertrand Huard. Les souris ont été préalablement rasées au niveau de la zone prévue pour l'injection de la tumeur afin de visualiser aisément la croissance tumorale. Une suspension cellulaire à 10^6 cellules/mL est préparée dans du PBS. Les cellules tumorales sont implantées par voie sous-cutanée au niveau du bas droit du dos à raison de 10^5 cellules (soit 100 μ L) par souris. Pour faciliter l'injection, les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane.

VII.5.7 Suivi de la croissance tumorale

Les souris font l'objet d'un suivi rigoureux tous les 2-3 jours. La croissance tumorale est quantifiée en mesurant plusieurs dimensions de la tumeur permettant d'évaluer son volume (longueur x largeur x hauteur). Le volume tumoral ne doit pas dépasser le point limite défini à 1000 mm^3 , donc à partir de 800 mm^3 , la souris est euthanasiée. En-dessous de ce volume, le développement de la tumeur n'induit a priori pas de souffrance à la souris. Cependant, le suivi régulier des animaux est indispensable afin de détecter d'éventuels signaux traduisant une souffrance. Les signaux principaux

sont l'isolement, la prostration, les yeux clos, les oreilles et/ou moustaches tombantes, la perte de poids, des difficultés à se déplacer.

VII.5.8 Prélèvement des tumeurs

Une souris atteignant le point limite est euthanasiée par dislocation cervicale. La souris est ensuite disséquée afin de récolter la tumeur, normalement logée entre la peau et le péritoine. La tumeur est d'abord fixée dans un bain de formalin solution (formaldéhyde 4% ; Sigma Aldrich) pendant 24h avant d'être progressivement déshydratée dans des bains d'1h30 de concentration croissante en éthanol (70%, 80%, 90%, 95%, 100%). Un dernier bain de 12h dans du xylène est réalisé avant de figer la tumeur en paraffine.

VII.5.9 Analyse statistique

Les données sont exprimées par la moyenne \pm erreur standard. Les résultats *in vivo* sont comparés parmi les groupes en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA). Pour les études sur souris avec un seul paramètre, nous utilisons une ANOVA-1 suivie du test de Fisher. Pour les études de challenge tumoral et sur les macaques incluant plusieurs paramètres (temps), nous utilisons une ANOVA-2 suivie du test de Holm-Sidak.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif global de ce travail de thèse était de développer une plateforme de délivrance d'antigènes de type NLC capable d'induire des réponses immunitaires d'une grande amplitude, à médiation humorale et cellulaire. Pour répondre à cet objectif, nous avions définis plusieurs axes de recherche que nous nous sommes employés à suivre.

Le premier jalon était de réaliser la preuve de concept de la délivrance d'antigènes par les LNP sur le modèle de l'ovalbumine. Nous avons décrit le greffage chimique covalent de l'OVA à la surface des LNP permettant de produire des formulations antigéniques stables et robustes (LNP-OVA). Celles-ci peuvent être conservées plusieurs mois à 4°C sans que leur stabilité colloïdale ni l'intégrité du lien avec l'antigène ne soient affectés. L'innocuité de ces formulations antigéniques a été démontrée sur plusieurs types cellulaires, autorisant leur utilisation jusqu'à de très hautes concentrations ($IC50 > 2 \text{ mg/mL LNP}$). Les LNP-OVA sont rapidement capturées par les cellules présentatrices d'antigènes *in vitro*, ce que nous avons également démontré *in vivo*. La petite taille des LNP implique que ces particules sont sujettes au drainage lymphatique par leur capacité à traverser les parois du réseau lymphatique et atteindre les ganglions lymphatiques en quelques minutes après injection. Une fois localisées dans les ganglions, les LNP sont largement capturées par les cellules dendritiques, qui sont les principales CPA. Cette capture est suivie de la présentation de l'antigène par les DC aux lymphocytes T, qui sont en conséquence activés avec une amplitude 10 fois supérieure grâce à la délivrance de l'OVA par les LNP. Il en résulte que les LNP-OVA sont capables d'induire une forte réponse humorale sur modèle murin. En particulier, la production d'anticorps spécifiques de l'OVA est plus de 10 fois supérieure lorsque l'antigène est vectorisé par les LNP. Ces particules jouent néanmoins uniquement un rôle de vecteur et n'ont pas de propriétés immunostimulantes intrinsèques, ce qui implique que les LNP-OVA doivent être associées à un immunostimulant. Un grand nombre de formulations a pu être testé, soulignant la versatilité des LNP. En effet, ces particules sont capables de promouvoir la réponse humorale spécifiquement dirigée contre l'OVA en combinaison avec différents immunostimulants tels que le LPS, le MPLA et le CpG. La taille des LNP variant entre 50 et 120 nm n'affecte que légèrement l'immunogénicité de l'OVA, ce qui semble dépendre grandement de la densité antigénique à la surface des LNP. En effet, il existe un optimum qui consiste à délivrer une dose suffisante d'antigène par LNP tout en ciblant le plus grand nombre de cellules immunitaires. Nous avons pris la décision de ne pas nous attarder sur ce point qui pourra éventuellement être approfondi à l'avenir. En outre, les particules de 50 nm ont été les seules à favoriser *in vitro* la présentation croisée de l'antigène, ce que nous ne sommes pas

parvenus à confirmer *in vivo* et mérite d'être abordé dans une prochaine étude. L'avantage des LNP à promouvoir la réponse humorale s'est vérifié sur plusieurs doses d'antigènes, variant de 1 à 10 µg par injection, et selon différentes voies d'administration. En effet, l'amplitude de la production d'anticorps spécifique est maintenue malgré une diminution de la dose d'antigène d'un facteur 3 à 10 selon que la formulation soit administrée par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée. En outre, ces deux voies d'administration produisent une réponse humorale équivalente aux trois doses d'antigènes testées. Cet avantage est d'un grand intérêt dans le cas d'antigènes coûteux ou en stocks limités, car la dose d'antigène peut être réduite en maintenant un niveau élevé de réponse. Enfin, le fait d'obtenir des réponses immunitaires équivalentes selon plusieurs modes d'administration de la formulation antigénique nous permet d'envisager à l'avenir le ciblage de l'immunité mucosale par une délivrance intranasale par exemple. **Par l'ensemble de ces expériences et des résultats qui en découlent, nous avons rempli ce premier objectif en soulignant la versatilité des LNP, ce qui nous a ouvert d'autres perspectives exploitées dans la suite des résultats.**

Le deuxième jalon était d'exploiter la versatilité des LNP pour l'appliquer à l'immunostimulant et le vectoriser au même titre que l'antigène. Nous avons ainsi rapporté la préparation de formulations immunostimulantes véhiculant le MPLA ou l'imiquimod. La stratégie de double vectorisation de l'antigène et de l'immunostimulant sur un même vecteur a été comparée à celle visant à délivrer l'antigène et l'immunostimulant séparément vectorisés par des vecteurs distincts. La réponse humorale obtenue est du même ordre de grandeur selon les deux stratégies de délivrance, ce qui suggère que l'excellente capacité des LNP à circuler dans l'organisme par drainage lymphatique supprime la nécessité de délivrer les deux éléments conjointement afin d'assurer leur capture par les mêmes cellules. Ce point confère aux LNP un avantage pratique considérable, permettant d'envisager une préparation sur mesure des formulations vaccinales, en ajustant au besoin les éléments séparés. Cela ouvre notamment la perspective d'un « cocktail vaccinal » comprenant plusieurs antigènes stratégiques d'un même pathogène, associés à plusieurs immunostimulants dans le but de cibler différents récepteurs et d'activer simultanément différentes voies de l'immunité. La double vectorisation de l'antigène et de l'immunostimulant a été appliquée avec succès au CpG, dont la délivrance est assurée par une LNP cationique (LNP⁺). La combinaison immunostimulante qui en résulte (LNP-OVA + LNP⁺/CpG) s'est distinguée par sa performance en sa capacité à induire des réponses cellulaires de grande magnitude chez la souris. L'analyse détaillée de cette formulation a mis en lumière les contributions individuelles de chacun des vecteurs. La vectorisation de l'OVA est caractérisée par une nette amélioration de la réponse humorale, amplifiée par le phénotype Th2 des LT auxiliaires. D'autre part, la vectorisation du CpG stimule non seulement la réponse humorale mais également la réponse cellulaire. Ceci est le résultat d'une polarisation mixte Th2 et Th1 des

LT auxiliaires, accompagnée d'une intense activation des LT CD8. Cette réponse cellulaire a été étudiée dans une expérience d'immunisation anti-tumorale, dont le but était d'évaluer la capacité de la formulation à freiner voire inhiber la croissance tumorale par une immunisation prophylactique. Le retard observé sur la croissance tumorale indique que la réponse cellulaire induite comprend une activité cytotoxique qui contribue à éliminer une partie des cellules tumorales, mais qui demeure insuffisante à contrôler la croissance tumorale. Ce résultat préliminaire nous encourage à approfondir à l'avenir la caractérisation de cette réponse cytotoxique. La formulation immunostimulante pourra alors également être optimisée. Nous avons en effet démontré que la densité antigénique à la surface des LNP avait un impact sur la réponse immunitaire et il est probable que la densité de CpG sur les LNP⁺ influe sur la magnitude de la réponse immunitaire. **Ces résultats supplémentaires nous ont permis de remplir le deuxième objectif en identifiant la formulation LNP-OVA + LNP⁺/CpG comme étant la plus performante en termes de réponses immunitaires induites à médiation humorale et cellulaire.**

Enfin, le troisième jalon de ce travail était de transférer la technologie développée sur l'antigène modèle OVA au cas concret du VIH, l'enjeu étant d'induire des réponses immunitaires mixtes et de grande magnitude contre l'antigène p24 peu immunogène. La méthode de greffage de l'antigène sur les LNP a dû être optimisée afin de convenir à cette protéine récalcitrante. Bien que nous soyons parvenus à vectoriser la p24 sur les LNP, le rendement de greffage de la p24 est encore insuffisant et devra à l'avenir être amélioré. La vectorisation de la p24 a notamment permis d'améliorer significativement la réponse immunitaire humorale mesurée chez la souris en moyenne d'un facteur 10. Néanmoins, ce n'est pas suffisant pour générer une réponse cellulaire, que nous avons observée uniquement dans le cas où le CpG était vectorisé par les LNP⁺. Comme dans le cas de l'OVA, la réponse immunitaire importante générée par la double vectorisation de la p24 et du CpG s'est révélée être la somme des avantages conférés par chacun des deux éléments. Nous avons confirmé que la vectorisation de l'antigène oriente vers la polarisation Th2 des LT auxiliaires en faveur de la réponse humorale, tandis que la vectorisation du CpG favorise la présentation croisée de l'antigène qui résulte en l'activation des LT CD8. La vectorisation du CpG est également à l'origine d'une production d'IgA traduisant une immunité mucosale, ce qui présente un grand intérêt dans le cas du VIH où les muqueuses sont l'une des voies principales d'entrée du virus et le lieu de résidence de certains réservoirs vitaux. Ces résultats très prometteurs chez la souris ont autorisé la poursuite de l'évaluation de l'immunogénicité de ces formulations sur le modèle animal le plus pertinent dans le cadre du VIH, à savoir le primate non-humain (NHP). L'étude s'est déroulée sur 7 mois, comprenant 4 immunisations intradermiques étalementes dans le temps et un suivi longitudinal de la réponse immunitaire par le dosage des anticorps et des cellules productrices d'IFN γ toutes les 2 semaines. La

formulation LNP-p24 + LNP⁺/CpG s'est une fois de plus distinguée dans cette étude en étant la seule à générer une réponse immunitaire à médiation humorale et cellulaire. Cette réponse était significative dès la 2^{ème} immunisation et s'est manifestée par des pics de réponse immédiatement après chaque immunisation, suivis par une diminution lente persistant jusqu'à 13 semaines. L'induction d'une telle réponse cellulaire contre la p24 chez le NHP est d'un grand intérêt dans la recherche d'un vaccin anti-VIH. Le prochain enjeu de ce projet sera de combiner cette formulation immunostimulante avec des glycoprotéines d'enveloppe vectorisées par les LNP dans le but de générer la production d'anticorps neutralisants à large spectre (bnab). Le développement d'une formulation capable de produire d'une part des bnab spécifiques des glycoprotéines d'enveloppe, et d'autre part une réponse cellulaire dirigée contre la p24 pourra alors faire l'objet d'une étude de challenge viral sur modèle NHP. Dans l'idéal, les bnab neutraliseront les particules virales en se fixant aux glycoprotéines d'enveloppe, pendant que les LT cytotoxiques élimineront les cellules infectées exprimant les peptides de la p24 sur leur CMH-I. **Avec ces derniers résultats, nous avons finalement rempli le dernier objectif visant à proposer une plateforme de délivrance de la p24 capable d'augmenter son immunogénicité en générant des réponses immunitaires importantes à médiation humorale et cellulaire, que nous avons validée sur modèle murin et NHP.**

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse mettent en lumière la versatilité des LNP, que nous avons utilisées pour délivrer différents antigènes (OVA, p24) ainsi que plusieurs immunostimulants (MPLA, imiquimod, CpG) selon des modes d'administration variés (intrapéritonéale, sous-cutanée, intradermique) et sur deux modèles animaux (souris, NHP). L'ensemble des résultats *in vivo* chez la souris ont été résumés dans la *Table VIII.1*. De tels avantages nous conduisent à envisager l'éventuelle industrialisation des LNP pour la délivrance d'antigènes. Une méthode d'homogénéisation à haute pression a notamment été développée dans notre groupe afin de produire des lots de LNP à l'échelle pilote. Cependant, à l'heure actuelle le greffage chimique de l'antigène que nous proposons n'est pas transférable en industrie. Il faudra donc réfléchir à une méthode de vectorisation simple, comme par exemple la post-insertion dans les LNP ou l'adsorption en surface. Les LNP⁺ pourraient être une voie à explorer, car la complexation du CpG est d'une grande simplicité et pourrait être appliquée à une protéine antigénique.

Objectif	Formulation	Voie d'inj.	OVA			p24	
			dose	anticorps	IFN γ	dose	anticorps
Effet de la vectorisation de l'antigène	Ag			0			0
	Ag + LNP			0			0
	LNP-Ag			+			+
	Ag + MPLA			+			+
	LNP + Ag + MPLA			+			+
	LNP-Ag + MPLA			++			++
	LNP + Ag + LPS			+			
Effet de la taille des LNP	LNP-Ag + LPS			++			
	Ag + CpG		0				
	F50-Ag + CpG			++			
	F80-Ag + CpG		10 μ g	++			
	F120-Ag + CpG			++			
	LNP-Ag + CpG						
	LNP-Ag + CpG						
Effet de la voie et dose d'injection	LNP-Ag + CpG		1 μ g	++		0,5 μ g	++
	LNP + Ag + CpG		3 μ g	++		1,5 μ g	++
	LNP + Ag + CpG		10 μ g	++		5 μ g	++
	LNP-Ag + CpG						
	LNP + Ag + CpG						
	LNP + Ag + CpG						
	LNP-Ag + CpG						
Stratégie de double vectorisation	LNP-Ag + LNP(MPLA)			++			
	LNP(MPLA)-Ag		8 μ g	++			
	LNP-Ag + LNP(imi)						
	LNP(imi)-Ag						
	Ag + CpG						
	LNP-Ag + CpG						
	Ag + LNP ⁺ /CpG						
Double vectorisation avec le CpG	LNP-Ag + LNP ⁺ /CpG						
	Ag + CpG		0	+		0	0
	LNP-Ag + CpG		++ / IgG1	+		++ / IgG1	+
	Ag + LNP ⁺ /CpG		++ / IgG2a	+		++ / IgG1, IgA	++ / CD4, CD8
	LNP-Ag + LNP ⁺ /CpG		+++ / IgG1, IgG2a, IgA	++ / CD4, CD8		+++ / IgG1, IgG2a, IgA	+++ / CD4, CD8
	Ag + LNP ⁺ /CpG						
	LNP-Ag + LNP ⁺ /CpG						

Table VIII.1. Résumé des résultats d'analyse des réponses immunitaires *in vivo* chez la souris.

0 : pas de réponse ; + : réponse faible ; ++ : réponse importante ; +++ : réponse très importante

ANNEXE : VALORISATION

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été valorisés de différentes manières, lors de communications orales ou écrites, par le dépôt de brevets et la publication d'articles.

Dans un premier temps, les résultats obtenus sur la double vectorisation d'un antigène et d'un immunostimulant sur deux LNP distinctes plutôt que sur un même vecteur ont conduit au dépôt d'un brevet intitulé « Composition immunogène sous forme d'émulsion comprenant deux phases dispersées, l'une comprenant un antigène et l'autre comprenant un agent immunostimulant » et délivré le 26 mai 2017 (WO2017085248).

Par la suite, nous avons publié un premier article (en tant que deuxième auteur) dans le journal Biomaterials en mai 2017, qui retrace l'étude préliminaire de l'utilisation des LNP comme vecteurs d'antigènes avec le modèle ovalbumine. D'autre part, le travail réalisé sur l'application au cas du VIH avec la p24 a fait l'objet de la rédaction d'un second article (en tant que premier auteur), qui est en cours de révision dans le journal npj Vaccines (nature partner journals).

Enfin, tout au long de cette thèse, les résultats ont été présentés lors de congrès nationaux et internationaux :

- Journée de la Recherche Médicale 2015, Grenoble (oral et poster)
- SFnano 2015, Grenoble (poster)
- Nanotech 2016, Washington (oral)
- Journée de la Recherche Médicale 2016, Grenoble (poster)
- Société Française d'Immunologie 2016, Paris (poster)
- SFnano 2016, Paris (oral)
- SFI club de vaccinologie 2017, Lyon (poster)
- SFnano 2017, Bordeaux (prix du meilleur oral - session flash présentation)

REFERENCES

1. Thucydides. The plague in Athens. The history of the Peloponnesian War. Translated by Thomas Hobbes. *N. C. Med. J.* **41**, 230–232 (1980).
2. Littman, R. J. & Littman, M. L. Galen and the Antonine plague. *Am. J. Philol.* **94**, 243–255 (1973).
3. Frith, J. The history of plague - part 1: The three great pandemics. *J. Mil. Veterans Health* **20**, 11 (2012).
4. De Gregorio, E. & Rappuoli, R. From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 505–514 (2014).
5. Fenner, F. *et al.* Smallpox and its eradication. (1988).
6. Riedel, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.* **18**, 21 (2005).
7. Jenner, E. & London School of Hygiene and Tropical Medicine. *An inquiry into the causes and effects of the variolæ vaccinæ, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox.* (London : Printed for the author, by Sampson Low ... and sold by Law ... and Murray and Highley, 1798).
8. Pasteur, L. De l'atténuation du virus du choléra des poules. *Comptes Rendus Séances Académie Sci. C. R. T.* **91**, 673–680 (1880).
9. Pasteur, L. Méthode pour prévenir la rage après morsure. *Comptes Rendus Séances Académie Sci. C. R. T.* **101**, 765–772 (1885).
10. Calmette, A. & Guérin, C. Contribution à l'étude de l'immunité antituberculeuse chez bovidés. *Ann Inst Pasteur* **28**, 329–337 (1914).
11. Roux, E. & Yersin, A. Contribution à l'étude de la diphtérie 2e mémoire. *Ann. Inst. Pasteur* **3**, 273–288 (1889).
12. SIMON, J. Emil Behring's Medical Culture: From Disinfection to Serotherapy. *Med. Hist.* **51**, 201–218 (2007).
13. Glenny, A. T. & Hopkins, B. E. Diphtheria Toxoid as an Immunising Agent. *Br. J. Exp. Pathol.* **4**, 283–288 (1923).
14. Hannoun, C. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 1085–1094 (2013).
15. Salk, J. E. *et al.* Formaldehyde Treatment and Safety Testing of Experimental Poliomyelitis Vaccines. *Am. J. Public Health Nations Health* **44**, 563–570 (1954).
16. Katz, S. L. *et al.* Studies on an Attenuated Measles-Virus Vaccine: VIII. General Summary and Evaluation of the Results of Vaccination. *Am. J. Dis. Child.* **100**, 942–946 (1960).

17. Hilleman, M. R., Weibel, R. E., Buynak, E. B., Stokes, J. & Whitman, J. E. Live attenuated mumps-virus vaccine. IV. Protective efficacy as measured in a field evaluation. *N. Engl. J. Med.* **276**, 252–258 (1967).
18. Plotkin, S. A., Farquhar, J. D., Katz, M. & Buser, F. Attenuation of RA 27/3 Rubella Virus in WI-38 Human Diploid Cells. *Am. J. Dis. Child.* **118**, 178–185 (1969).
19. Hanley, K. A. The Double-Edged Sword: How Evolution Can Make or Break a Live-Attenuated Virus Vaccine. *Evol. Educ. Outreach* **4**, 635–643 (2011).
20. Kew, O. M., Sutter, R. W., de Gourville, E. M., Dowdle, W. R. & Pallansch, M. A. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol* **59**, 587–635 (2005).
21. Kapikian, A. Z., MITCHELL, R. H., CHANOCK, R. M., SHVEDOFF, R. A. & STEWART, C. E. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **89**, 405–421 (1969).
22. Liljeqvist, S. & Stahl, S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J. Biotechnol.* **73**, 1–33 (1999).
23. Nascimento, I. P. & Leite, L. C. C. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **45**, 1102–1111 (2012).
24. Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W. J., Ammerer, G. & Hall, B. D. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* **298**, 298347a0 (1982).
25. Siddiqui, M. A. A. & Perry, C. M. Human papillomavirus quadrivalent (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine (Gardasil®). *Drugs* **66**, 1263–1271 (2006).
26. Monie, A., Hung, C.-F., Roden, R. & Wu, T. C. Cervarix™: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biol. Targets Ther.* **2**, 107 (2008).
27. Patarroyo, M. E. *et al.* A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **332**, 158–161 (1988).
28. Moyle, P. M. & Toth, I. Self-Adjuvanting Lipopeptide Vaccines. *Curr. Med. Chem.* **15**, 506–516 (2008).
29. Pulendran, B. & Ahmed, R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* **131**, 509–517 (2011).
30. Murphy, K. *Janeway's Immunobiology*. (2012).
31. Moser, M. & Leo, O. Key concepts in immunology. *Vaccine* **28**, C2–C13 (2010).
32. Rothenberg, E. V., Moore, J. E. & Yui, M. A. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 9–21 (2008).

33. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723–737 (2011).
34. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).
35. Geissmann, F. *et al.* Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* **327**, 656–661 (2010).
36. Waldhauer, I. & Steinle, A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* **27**, 5932–5943 (2008).
37. Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. The discovery of MHC restriction. *Immunol. Today* **18**, 14–17 (1997).
38. Nemazee, D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 728–740 (2006).
39. Aderem, A. & Underhill, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593–623 (1999).
40. Arango Duque, G. & Descoteaux, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
41. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
42. Kubach, J. *et al.* Dendritic Cells: Sentinels of Immunity and Tolerance. *Int. J. Hematol.* **81**, 197–203 (2005).
43. Ueno, H. *et al.* Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* **219**, 118–142 (2007).
44. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621–667 (2002).
45. Trombetta, E. S. & Mellman, I. CELL BIOLOGY OF ANTIGEN PROCESSING IN VITRO AND IN VIVO. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 975–1028 (2005).
46. Blanco, P., Palucka, A., Pascual, V. & Banchereau, J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 41–52 (2008).
47. Burgdorf, S. & Kurts, C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 89–95 (2008).
48. Davis, S. J. *et al.* The nature of molecular recognition by T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 217–224 (2003).
49. Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. How Diverse--CD4 Effector T Cells and their Functions. *J. Mol. Cell Biol.* **1**, 20–36 (2009).
50. Zhu, J. & Paul, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**, 1557–1569 (2008).
51. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S3–S23 (2010).
52. Andersen, M. H., Schrama, D., thor Straten, P. & Becker, J. C. Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 32–41 (2006).

53. Zimmermann, V. S., Benigni, F. & Mondino, A. Immune surveillance and anti-tumor immune responses: an anatomical perspective. *Immunol. Lett.* **98**, 1–8 (2005).
54. Curotto de Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* **30**, 626–635 (2009).
55. Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R. & Heath, W. R. Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 137–161 (2013).
56. Farber, D. L., Yudanin, N. A. & Restifo, N. P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 24–35 (2013).
57. Pasquale, A. D., Preiss, S., Silva, F. T. D. & Garçon, N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines* **3**, 320–343 (2015).
58. Glenny, A. T., Pope, C. G., Waddington, H. & Wallace, U. Immunological notes. xvii–xxiv. *J. Pathol.* **29**, 31–40 (1926).
59. Reed, S. G., Orr, M. T. & Fox, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat. Med.* **19**, 1597–1608 (2013).
60. Li, X., Aldayel, A. M. & Cui, Z. Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. *J. Controlled Release* **173**, 148–157 (2014).
61. Marrack, P., McKee, A. S. & Munks, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, (2009).
62. De Gregorio, E., Tritto, E. & Rappuoli, R. Alum adjuvanticity: Unraveling a century old mystery. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2068–2071 (2008).
63. Oleszycka, E. & Lavelle, E. C. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. *Curr. Opin. Immunol.* **28**, 1–5 (2014).
64. Brewer, J. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol. Lett.* **102**, 10–15 (2006).
65. Vogelbruch, M. *et al.* Aluminium-induced granulomas after inaccurate intradermal hyposensitization injections of aluminium-adsorbed depot preparations. *Allergy* **55**, 883–887 (2000).
66. Israeli, E., Agmon-Levin, N., Blank, M. & Shoenfeld, Y. Macrophagic Myofaciitis a Vaccine (alum) Autoimmune-Related Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **41**, 163–168 (2011).
67. Garçon, N., Leroux-Roels, G. & Cheng, W.-F. Vaccine adjuvants. *Perspect. Vaccinol.* **1**, 89–113 (2011).
68. Olive, C. Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. *Expert Rev. Vaccines* **11**, 237–256 (2012).
69. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol.* **30**, 16–34 (2011).

70. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* **34**, 637–650 (2011).
71. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
72. Kawasaki, T., Kawai, T. & Akira, S. Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunol. Rev.* **243**, 61–73 (2011).
73. Takeuchi, O. *et al.* Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. *J. Immunol.* **169**, 10–14 (2002).
74. Kang, J. Y. *et al.* Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity* **31**, 873–884 (2009).
75. Buwitt-Beckmann, U. *et al.* TLR1- and TLR6-independent Recognition of Bacterial Lipopeptides. *J. Biol. Chem.* **281**, 9049–9057 (2006).
76. Hornung, V. *et al.* Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **168**, 4531–4537 (2002).
77. Imanishi, T. *et al.* Cutting Edge: TLR2 Directly Triggers Th1 Effector Functions. *J. Immunol.* **178**, 6715–6719 (2007).
78. Redecke, V. *et al.* Cutting Edge: Activation of Toll-Like Receptor 2 Induces a Th2 Immune Response and Promotes Experimental Asthma. *J. Immunol.* **172**, 2739–2743 (2004).
79. Reynolds, J. M. *et al.* Toll-like Receptor 2 Signaling in CD4+ T Lymphocytes Promotes T Helper 17 Responses and Regulates the Pathogenesis of Autoimmune Disease. *Immunity* **32**, 692–702 (2010).
80. Lau, Y. F. *et al.* Lipid-containing mimetics of natural triggers of innate immunity as CTL-inducing influenza vaccines. *Int. Immunol.* **18**, 1801–1813 (2006).
81. Sekiya, T. *et al.* PEGylation of a TLR2-agonist-based vaccine delivery system improves antigen trafficking and the magnitude of ensuing antibody and CD8 + T cell responses. *Biomaterials* **137**, 61–72 (2017).
82. Basto, A. P. *et al.* Immune response profile elicited by the model antigen ovalbumin expressed in fusion with the bacterial Oprl lipoprotein. *Mol. Immunol.* **64**, 36–45 (2015).
83. Zeng, W. *et al.* A totally synthetic lipopeptide-based self-adjuvanting vaccine induces neutralizing antibodies against heat-stable enterotoxin from enterotoxigenic Escherichia coli. *Vaccine* **30**, 4800–4806 (2012).
84. Thomann, J.-S. *et al.* Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting. *Biomaterials* **32**, 4574–4583 (2011).

85. Deliyannis, G. *et al.* Intranasal lipopeptide primes lung-resident memory CD8+ T cells for long-term pulmonary protection against influenza. *Eur. J. Immunol.* **36**, 770–778 (2006).
86. Moyle, P. M. *et al.* Method for the Synthesis of Multi-Epitopic *Streptococcus pyogenes* Lipopeptide Vaccines Using Native Chemical Ligation. *J. Org. Chem.* **71**, 6846–6850 (2006).
87. Zeng, W., Tan, A. C. L., Horrocks, K. & Jackson, D. C. A lipidated form of the extracellular domain of influenza M2 protein as a self-adjuvanting vaccine candidate. *Vaccine* **33**, 3526–3532 (2015).
88. Zom, G. G. *et al.* TLR2 ligand-synthetic long peptide conjugates effectively stimulate tumor-draining lymph node T cells of cervical cancer patients. *Oncotarget* **7**, 67087 (2016).
89. Schmidt, J. *et al.* Intratumoural injection of the toll-like receptor-2/6 agonist ‘macrophage-activating lipopeptide-2’ in patients with pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. *Br. J. Cancer* **97**, 598–604 (2007).
90. Alexander, C. & Rietschel, E. T. Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.* **7**, 167–202 (2001).
91. Moyle, P. M. & Toth, I. Modern Subunit Vaccines: Development, Components, and Research Opportunities. *ChemMedChem* **8**, 360–376 (2013).
92. Baldridge, J. R. *et al.* Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin. Biol. Ther.* **4**, 1129–1138 (2004).
93. Bentala, H. *et al.* Removal of Phosphate from Lipid A as a Strategy to Detoxify Lipopolysaccharide. *Shock* **18**, 561–566 (2002).
94. Bohannon, J. K., Hernandez, A., Enkhbaatar, P., Adams, W. L. & Sherwood, E. R. The Immunobiology of Toll-Like Receptor 4 Agonists: From Endotoxin Tolerance to Immunoadjuvants. *Shock* **40**, 451–462 (2013).
95. Drachenberg, K. J., Wheeler, A. W., Stuebner, P. & Horak, F. A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **56**, 498–505 (2001).
96. Johansen, K., Schröder, U. & Svensson, L. Immunogenicity and protective efficacy of a formalin-inactivated rotavirus vaccine combined with lipid adjuvants. *Vaccine* **21**, 368–375 (2003).
97. Alving, C. R., Peachman, K. K., Rao, M. & Reed, S. G. Adjuvants for human vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 310–315 (2012).
98. Evans, J. T. *et al.* Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev. Vaccines* **2**, 219–229 (2003).
99. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R. & others. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099 (2001).
100. Smith, K. D. *et al.* Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* **4**, 1247–1253 (2003).

101. Murthy, K. G. K., Deb, A., Goonesekera, S., Szabó, C. & Salzman, A. L. Identification of Conserved Domains in *Salmonella muenchen* Flagellin That Are Essential for Its Ability to Activate TLR5 and to Induce an Inflammatory Response *in Vitro*. *J. Biol. Chem.* **279**, 5667–5675 (2004).
102. Honko, A. N. & Mizel, S. B. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunol. Res.* **33**, 83–101 (2005).
103. Uematsu, S. *et al.* Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat. Immunol.* **9**, 769–776 (2008).
104. Honko, A. N. & Mizel, S. B. Mucosal Administration of Flagellin Induces Innate Immunity in the Mouse Lung. *Infect. Immun.* **72**, 6676–6679 (2004).
105. Mizel, S. B. & Bates, J. T. Flagellin as an Adjuvant: Cellular Mechanisms and Potential. *J. Immunol.* **185**, 5677–5682 (2010).
106. Tsujimoto, H. *et al.* Flagellin enhances NK cell proliferation and activation directly and through dendritic cell-NK cell interactions. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 888–897 (2005).
107. Didierlaurent, A. *et al.* Flagellin Promotes Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Development of Th2-Type Response. *J. Immunol.* **172**, 6922–6930 (2004).
108. Kim, Y.-M., Brinkmann, M. M., Paquet, M.-E. & Ploegh, H. L. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* **452**, nature06726 (2008).
109. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732 (2001).
110. Schmidt, K. N. *et al.* APC-Independent Activation of NK Cells by the Toll-Like Receptor 3 Agonist Double-Stranded RNA. *J. Immunol.* **172**, 138–143 (2004).
111. Muzio, M. *et al.* Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells. *J. Immunol.* **164**, 5998–6004 (2000).
112. Tabeta, K. *et al.* Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3516–3521 (2004).
113. Zhang, S., Jouanguy, E., Ugolini, S. & Casanova, J.-L. TLR3 Deficiency in Patients with Herpes Simplex Encephalitis. *Science* **317**, 1522–1527 (2007).
114. Wischke, C. *et al.* Poly(I:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation. *Int. J. Pharm.* **365**, 61–68 (2009).
115. Heffernan, M. J., Kasturi, S. P., Yang, S. C., Pulendran, B. & Murthy, N. The stimulation of CD8+ T cells by dendritic cells pulsed with polyketal microparticles containing ion-paired protein antigen and poly(inosinic acid)–poly(cytidylic acid). *Biomaterials* **30**, 910–918 (2009).
116. Schulz, O., Diebold, S. & Chen, M. Toll-like receptor 3 promotes crosspriming to virus-infected cells. *Nature* **433**, 887–892 (2005).

117. Salem, M. L., Kadima, A. N., Cole, D. J. & Gillanders, W. E. Defining the antigen-specific T-cell response to vaccination and poly (I: C)/TLR3 signaling: evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity. *J. Immunother.* **28**, 220–228 (2005).
118. Ichinohe, T. *et al.* Synthetic Double-Stranded RNA Poly(I:C) Combined with Mucosal Vaccine Protects against Influenza Virus Infection. *J. Virol.* **79**, 2910–2919 (2005).
119. Robinson, R. A. *et al.* A Phase I-II Trial of Multiple-Dose Polyriboinosinic-Polyribocytidylic Acid in Patients With Leukemia or Solid Tumors. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **57**, 599–602 (1976).
120. Kawai, T. & Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* **7**, 131–137 (2006).
121. Alexopoulou, L., Desnues, B. & Demaria, O. [Toll-like receptor 8: the awkward TLR]. *Med. Sci. MS* **28**, 96–102 (2012).
122. Krieg, A. M. The Toll of Too Much TLR7. *Immunity* **27**, 695–697 (2007).
123. Ohto, U., Tanji, H. & Shimizu, T. Structure and function of toll-like receptor 8. *Microbes Infect.* **16**, 273–282 (2014).
124. Vasilakos, J. P. & Tomai, M. A. The use of Toll-like receptor 7/8 agonists as vaccine adjuvants. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 809–819 (2013).
125. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
126. Mancuso, G. *et al.* Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat. Immunol.* **10**, 587–594 (2009).
127. Wille-Reece, U. *et al.* HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15190–15194 (2005).
128. Pachman, D. R. *et al.* Randomized Clinical Trial of Imiquimod: An Adjunct to Treating Cervical Dysplasia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **206**, 42.e1-42.e7 (2012).
129. Bubna, A. K. Imiquimod - Its role in the treatment of cutaneous malignancies. *Indian J. Pharmacol.* **47**, 354–359 (2015).
130. Adams, S. *et al.* Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 776–784 (2008).
131. Shackleton, M. *et al.* The impact of imiquimod, a Toll-like receptor-7 ligand (TLR7L), on the immunogenicity of melanoma peptide vaccination with adjuvant Flt3 ligand. *Cancer Immun.* **4**, 9 (2004).
132. Krieg, A. M. *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546–549 (1995).

133. Mohsen, M. O. *et al.* Delivering adjuvants and antigens in separate nanoparticles eliminates the need of physical linkage for effective vaccination. *J. Controlled Release* **251**, 92–100 (2017).
134. Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–745 (2000).
135. Kumagai, Y., Takeuchi, O. & Akira, S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA☆. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 795–804 (2008).
136. Kerkemann, M. *et al.* Activation with CpG-A and CpG-B Oligonucleotides Reveals Two Distinct Regulatory Pathways of Type I IFN Synthesis in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Immunol.* **170**, 4465–4474 (2003).
137. Klinman, D. M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 249–259 (2004).
138. Hartmann, G., Weiner, G. J. & Krieg, A. M. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9305–9310 (1999).
139. Barnier-Quer, C., Elsharkawy, A., Romeijn, S., Kros, A. & Jiskoot, W. Adjuvant Effect of Cationic Liposomes for Subunit Influenza Vaccine: Influence of Antigen Loading Method, Cholesterol and Immune Modulators. *Pharmaceutics* **5**, 392–410 (2013).
140. Demento, S. L. *et al.* TLR9-Targeted Biodegradable Nanoparticles as Immunization Vectors Protect against West Nile Encephalitis. *J. Immunol.* **185**, 2989–2997 (2010).
141. Fischer, S. *et al.* Concomitant delivery of a CTL-restricted peptide antigen and CpG ODN by PLGA microparticles induces cellular immune response. *J. Drug Target.* **17**, 652–661 (2009).
142. Zupančič, E. *et al.* Rational design of nanoparticles towards targeting antigen-presenting cells and improved T cell priming. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **258**, 182–195 (2017).
143. Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T. & Klinman, D. M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines* **10**, 499–511 (2011).
144. Borges, O. *et al.* Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**, 405–416 (2008).
145. Kachura, M. A. *et al.* A CpG-Ficoll Nanoparticle Adjuvant for Anthrax Protective Antigen Enhances Immunogenicity and Provides Single-Immunization Protection against Inhaled Anthrax in Monkeys. *J. Immunol.* **196**, 284–297 (2016).
146. Sagara, I. *et al.* A randomized and controlled Phase 1 study of the safety and immunogenicity of the AMA1-C1/Alhydrogel®+CPG 7909 vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria in semi-immune Malian adults. *Vaccine* **27**, 7292–7298 (2009).
147. Sparwasser, T. *et al.* Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 2368–2374 (1999).

148. Storni, T. *et al.* Nonmethylated CG Motifs Packaged into Virus-Like Particles Induce Protective Cytotoxic T Cell Responses in the Absence of Systemic Side Effects. *J. Immunol.* **172**, 1777–1785 (2004).
149. Halperin, S. A. *et al.* A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine* **21**, 2461–2467 (2003).
150. Speiser, D. E. *et al.* Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J. Clin. Invest.* **115**, 739–746 (2005).
151. Research, C. for B. E. and. Approved Products - HEPLISAV-B. Available at: <https://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/vaccines/approvedproducts/ucm584752.htm>. (Accessed: 22nd November 2017)
152. Geijtenbeek, T. B. H. & Gringhuis, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 465–479 (2009).
153. Bozzacco, L. *et al.* DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1289–1294 (2007).
154. Cheong, C. *et al.* Production of monoclonal antibodies that recognize the extracellular domain of mouse Langerin/CD207. *J. Immunol. Methods* **324**, 48–62 (2007).
155. Singh, S. K. *et al.* Targeting glycan modified OVA to murine DC-SIGN transgenic dendritic cells enhances MHC class I and II presentation. *Mol. Immunol.* **47**, 164–174 (2009).
156. Bonifaz, L. C. *et al.* In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination. *J. Exp. Med.* **199**, 815–824 (2004).
157. Irache, J. M., Salman, H. H., Gamazo, C. & Espuelas, S. Mannose-targeted systems for the delivery of therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* **5**, 703–724 (2008).
158. Goodridge, H. S., Wolf, A. J. & Underhill, D. M. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol. Rev.* **230**, 38–50 (2009).
159. Boks, M. A., Ambrosini, M. & Bruijns, S. C. MPLA incorporation into DC-targeting glycoliposomes favours anti-tumour T cell responses. *J. Controlled Release* **216**, 37–46 (2015).
160. Berner, V. K., Sura, M. E. & Hunter, K. W. Conjugation of protein antigen to microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: a new adjuvant for intradermal and oral immunizations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 1053–1061 (2008).
161. Huang, H., Ostroff, G. R., Lee, C. K., Specht, C. A. & Levitz, S. M. Robust Stimulation of Humoral and Cellular Immune Responses following Vaccination with Antigen-Loaded -Glucan Particles. *mBio* **1**, e00164-10-e00164-16 (2010).

162. Kawai, T. & Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* **21**, 317–337 (2009).
163. Kato, H. *et al.* Cell Type-Specific Involvement of RIG-I in Antiviral Response. *Immunity* **23**, 19–28 (2005).
164. Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 229–265 (2009).
165. Franchi, L., Warner, N., Viani, K. & Nuñez, G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.* **227**, 106–128 (2009).
166. Manning, M. C., Chou, D. K., Murphy, B. M., Payne, R. W. & Katayama, D. S. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. *Pharm. Res.* **27**, 544–575 (2010).
167. Yuki, Y. & Kiyono, H. Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery. *Expert Rev. Vaccines* **8**, 1083–1097 (2009).
168. Neutra, M. R. & Kozlowski, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 148–158 (2006).
169. Bachmann, M. F. & Jennings, G. T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 787–796 (2010).
170. Baschong, W., Hasler, L., Häner, M., Kistler, J. & Aebi, U. Repetitive versus monomeric antigen presentation: direct visualization of antibody affinity and specificity. *J. Struct. Biol.* **143**, 258–262 (2003).
171. Correia-Pinto, J. F., Csaba, N. & Alonso, M. J. Vaccine delivery carriers: Insights and future perspectives. *Int. J. Pharm.* **440**, 27–38 (2013).
172. De Temmerman, M.-L. *et al.* Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discov. Today* **16**, 569–582 (2011).
173. Reddy, S. T. *et al.* Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1159–1164 (2007).
174. Manolova, V. *et al.* Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1404–1413 (2008).
175. Irvine, D. J., Swartz, M. A. & Szeto, G. L. Engineering synthetic vaccines using cues from natural immunity. *Nat. Mater.* **12**, 978–990 (2013).
176. Shortman, K. & Heath, W. R. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* **234**, 18–31 (2010).
177. Oyewumi, M. O., Kumar, A. & Cui, Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev. Vaccines* **9**, 1095–1107 (2010).
178. Xiang, S. D. *et al.* Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods* **40**, 1–9 (2006).

179. Heurtault, B., Frisch, B. & Pons, F. Liposomes as delivery systems for nasal vaccination: strategies and outcomes. *Expert Opin. Drug Deliv.* **7**, 829–844 (2010).
180. Patel, G. B., Zhou, H., Ponce, A. & Chen, W. Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using archaeal lipid-adjuvanted vaccines. *Vaccine* **25**, 8622–8636 (2007).
181. Foged, C. *et al.* Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: effect of bilayer composition. *Vaccine* **22**, 1903–1913 (2004).
182. Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S. & Sundblad, A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int. J. Pharm.* **298**, 315–322 (2005).
183. Fromen, C. A. *et al.* Controlled analysis of nanoparticle charge on mucosal and systemic antibody responses following pulmonary immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 488–493 (2015).
184. Gao, J., Ochyl, L. J., Yang, E. & Moon, J. J. Cationic liposomes promote antigen cross-presentation in dendritic cells by alkalinizing the lysosomal pH and limiting the degradation of antigens. *International Journal of Nanomedicine* (2017). doi:10.2147/IJN.S125866
185. van Riet, E., Ainai, A., Suzuki, T., Kersten, G. & Hasegawa, H. Combatting infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **74**, 28–34 (2014).
186. Fan, Y., Sahdev, P., Ochyl, L. J., J., A. & Moon, J. J. Cationic liposome-hyaluronic acid hybrid nanoparticles for intranasal vaccination with subunit antigens. *J. Controlled Release* **208**, 121–129 (2015).
187. Farace, C. *et al.* Immune cell impact of three differently coated lipid nanocapsules: pluronic, chitosan and polyethylene glycol. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
188. Howard, M. D., Jay, M., Dziubla, T. D. & Lu, X. PEGylation of Nanocarrier Drug Delivery Systems: State of the Art. *J. Biomed. Nanotechnol.* **4**, 133–148 (2008).
189. Bobbala, S. & Hook, S. Is There an Optimal Formulation and Delivery Strategy for Subunit Vaccines? *Pharm. Res.* **33**, 2078–2097 (2016).
190. Aguilar, J. C. & Petrovsky, N. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol. Cell Biol.* (2004).
191. Karch, C. P. & Burkhard, P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochem. Pharmacol.* **120**, 1–14 (2016).
192. Fox, C. B. & Haensler, J. An update on safety and immunogenicity of vaccines containing emulsion-based adjuvants. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 747–758 (2013).
193. O'Hagan, D. T. MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection. *Expert Rev. Vaccines* **6**, 699–710 (2007).
194. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238-27 (1965).

195. Allison, A. C. & Gregoriadis, G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* **252**, 252 (1974).
196. Zasadzinski, J. A., Wong, B., Forbes, N., Braun, G. & Wu, G. Novel methods of enhanced retention in and rapid, targeted release from liposomes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **16**, 203–214 (2011).
197. Henriksen-Lacey, M., Korsholm, K. S., Andersen, P., Perrie, Y. & Christensen, D. Liposomal vaccine delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **8**, 505–519 (2011).
198. Gordon, S. *et al.* Chitosan hydrogels containing liposomes and cubosomes as particulate sustained release vaccine delivery systems. *J. Liposome Res.* **22**, 193–204 (2012).
199. Bozzuto, G. & Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* **975** (2015). doi:10.2147/IJN.S68861
200. Watson, D. S., Endsley, A. N. & Huang, L. Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine* **30**, 2256–2272 (2012).
201. Varypataki, E. M., 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.* **17**, 216–226 (2015).
202. Korsholm, K. S. *et al.* Broadening of the T-Cell Repertoire to HIV-1 Gag p24 by Vaccination of HLA-A2/DR Transgenic Mice with Overlapping Peptides in the CAF05 Adjuvant. *PLOS ONE* **8**, e63575 (2013).
203. Tada, R. *et al.* Intranasal Immunization with DOTAP Cationic Liposomes Combined with DC-Cholesterol Induces Potent Antigen-Specific Mucosal and Systemic Immune Responses in Mice. *PLOS ONE* **10**, e0139785 (2015).
204. Nordly, P., Agger, E. M., Andersen, P., Nielsen, H. M. & Foged, C. Incorporation of the TLR4 Agonist Monophosphoryl Lipid A Into the Bilayer of DDA/TDB Liposomes: Physico-Chemical Characterization and Induction of CD8+ T-Cell Responses In Vivo. *Pharm. Res.* **28**, 553–562 (2011).
205. Rizwan, S. B. *et al.* Cubosomes containing the adjuvants imiquimod and monophosphoryl lipid A stimulate robust cellular and humoral immune responses. *J. Controlled Release* **165**, 16–21 (2013).
206. Principi, N. & Esposito, S. Adjuvanted influenza vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* **8**, 59–66 (2012).
207. Moser, C., Müller, M., Kaeser, M. D., Weydemann, U. & Amacker, M. Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 779–791 (2013).
208. Huckriede, A. *et al.* The virosome concept for influenza vaccines. *Vaccine* **23**, S26–S38 (2005).

209. Soema, P. C. *et al.* Influenza T-cell Epitope-Loaded Virosomes Adjuvanted with CpG as a Potential Influenza Vaccine. *Pharm. Res.* **32**, 1505–1515 (2015).
210. Pedersen, G. *et al.* Matrix-M adjuvanted virosomal H5N1 vaccine confers protection against lethal viral challenge in a murine model. *Influenza Other Respir. Viruses* **5**, 426–437 (2011).
211. Bomsel, M. *et al.* Immunization with HIV-1 gp41 Subunit Virosomes Induces Mucosal Antibodies Protecting Nonhuman Primates against Vaginal SHIV Challenges. *Immunity* **34**, 269–280 (2011).
212. Kushnir, N., Streatfield, S. J. & Yusibov, V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* **31**, 58–83 (2012).
213. Vieira, H. L. A. *et al.* Triple layered rotavirus VLP production: Kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *J. Biotechnol.* **120**, 72–82 (2005).
214. Lua, L. H. *et al.* Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 425–440 (2014).
215. Chen, M. *et al.* Immunogenicity of different recombinant rabbit hemorrhagic disease virus-like particles carrying CD8+ T cell epitope from chicken ovalbumin (OVA). *Virus Res.* **183**, 15–22 (2014).
216. Moffat, J. M., Cheong, W.-S., Villadangos, J. A., Mintern, J. D. & Netter, H. J. Hepatitis B virus-like particles access major histocompatibility class I and II antigen presentation pathways in primary dendritic cells. *Vaccine* **31**, 2310–2316 (2013).
217. Thompson, C. M. *et al.* Critical assessment of influenza VLP production in Sf9 and HEK293 expression systems. *BMC Biotechnol.* **15**, (2015).
218. Santi, L. *et al.* An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine* **26**, 1846–1854 (2008).
219. Toussaint, B., Chauchet, X., Wang, Y., Polack, B. & Gouëlec, A. L. Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 1139–1154 (2013).
220. Lin, I. Y. C., Van, T. T. H. & Smooker, P. M. Live-Attenuated Bacterial Vectors: Tools for Vaccine and Therapeutic Agent Delivery. *Vaccines* **3**, 940–972 (2015).
221. da Silva, A. J., Zangirolami, T. C., Novo-Mansur, M. T. M., Giordano, R. de C. & Martins, E. A. L. Live bacterial vaccine vectors: An overview. *Braz. J. Microbiol.* **45**, 1117–1129 (2015).
222. Epaulard, O. *et al.* Anti-tumor Immunotherapy via Antigen Delivery from a Live Attenuated Genetically Engineered *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System-Based Vector. *Mol. Ther.* **14**, 656–661 (2006).
223. Pearse, M. & Drane, D. ISCOMATRIX \blacklozenge adjuvant for antigen delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 465–474 (2005).

224. Morein, B., Hu, K.-F. & Abusugra, I. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1367–1382 (2004).
225. Skene, C. D. & Sutton, P. Saponin-adjuvanted particulate vaccines for clinical use. *Methods* **40**, 53–59 (2006).
226. Lendemans, D. G., Myschik, J., Hook, S. & Rades, T. Cationic cage-like complexes formed by DC-cholesterol, Quil-A, and phospholipid. *J. Pharm. Sci.* **94**, 1794–1807 (2005).
227. Pham, H. L., Ross, B. P., McGahey, R. P., Shaw, P. N. & Davies, N. M. Synthesis of cationic derivatives of Quil A and the preparation of cationic immune-stimulating complexes (ISCOMs). *Int. J. Pharm.* **376**, 123–133 (2009).
228. McBurney, W. T. *et al.* In vivo activity of cationic immune stimulating complexes (PLUSCOMs). *Vaccine* **26**, 4549–4556 (2008).
229. Sjölander, A. *et al.* Immune responses to ISCOM® formulations in animal and primate models. *Vaccine* **19**, 2661–2665 (2001).
230. Duewell, P. *et al.* ISCOMATRIX Adjuvant Combines Immune Activation with Antigen Delivery to Dendritic Cells In Vivo Leading to Effective Cross-Priming of CD8+ T Cells. *J. Immunol.* **187**, 55–63 (2011).
231. Sanders, M. T., Brown, L. E., Deliyannis, G. & Pearse, M. J. ISCOMTM-based vaccines: The second decade. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 119–128 (2005).
232. Hu, K.-F., Lövgren-Bengtsson, K. & Morein, B. Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **51**, 149–159 (2001).
233. Cibulski, S. P. *et al.* Novel ISCOMs from Quillaja brasiliensis saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine* **34**, 1162–1171 (2016).
234. Danhier, F. *et al.* PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Controlled Release* **161**, 505–522 (2012).
235. Makadia, H. K. & Siegel, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* **3**, 1377–1397 (2011).
236. Allahyari, M. & Mohit, E. Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. *Hum. Vaccines Immunother.* **12**, 806–828 (2016).
237. Silva, A. L., Soema, P. C., Slütter, B., Ossendorp, F. & Jiskoot, W. PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking particle properties to immunogenicity. *Hum. Vaccines Immunother.* **12**, 1056–1069 (2016).
238. Moon, J. J. *et al.* Antigen-Displaying Lipid-Enveloped PLGA Nanoparticles as Delivery Agents for a *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine. *PLoS ONE* **7**, e31472 (2012).

239. Demento, S. L. *et al.* Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype. *Biomaterials* **33**, 4957–4964 (2012).
240. Liu, L. *et al.* Hyaluronic Acid-Modified Cationic Lipid-PLGA Hybrid Nanoparticles as a Nanovaccine Induce Robust Humoral and Cellular Immune Responses. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 11969–11979 (2016).
241. Cheung, R., Ng, T., Wong, J. & Chan, W. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar. Drugs* **13**, 5156–5186 (2015).
242. Wang, J. J., Zeng, Z. W. & Wang, shu. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int. J. Nanomedicine* **7** 65 (2011). doi:10.2147/IJN.S17296
243. Bento, D., Staats, H. F., Gonçalves, T. & Borges, O. Development of a novel adjuvanted nasal vaccine: C48/80 associated with chitosan nanoparticles as a path to enhance mucosal immunity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **93**, 149–164 (2015).
244. Slütter, B. *et al.* Conjugation of ovalbumin to trimethyl chitosan improves immunogenicity of the antigen. *J. Controlled Release* **143**, 207–214 (2010).
245. H Muller, R., Shegokar, R. & M Keck, C. 20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): present state of development & industrial applications. *Curr. Drug Discov. Technol.* **8**, 207–227 (2011).
246. Mehnert, W. & Mäder, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 165–196 (2001).
247. García-Fuentes, M., Torres, D. & Alonso, M. J. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **27**, 159–168 (2003).
248. Jenning & Gohla. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J. Microencapsul.* **18**, 149–158 (2001).
249. Müller, R. H., Maaßen, S., Weyhers, H., Specht, F. & Lucks, J. S. Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **138**, 85–94 (1996).
250. Wissing, S. ., Kayser, O. & Müller, R. . Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1257–1272 (2004).
251. Niu, Z., Conejos-Sánchez, I., Griffin, B. T., O'Driscoll, C. M. & Alonso, M. J. Lipid-based nanocarriers for oral peptide delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **106**, 337–354 (2016).
252. Doroud, D., Zahedifard, F., Vatanara, A., Najafabadi, A. R. & Rafati, S. Cysteine proteinase type I, encapsulated in solid lipid nanoparticles induces substantial protection against *Leishmania* major infection in C57BL/6 mice. *Parasite Immunol.* **33**, 335–348 (2011).
253. Doroud, D. *et al.* Delivery of a cocktail DNA vaccine encoding cysteine proteinases type I, II and III with solid lipid nanoparticles potentiate protective immunity against *Leishmania* major infection. *J. Controlled Release* **153**, 154–162 (2011).

254. Mishra, D. *et al.* Evaluation of solid lipid nanoparticles as carriers for delivery of hepatitis B surface antigen for vaccination using subcutaneous route. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **13**, 495–509 (2010).
255. Chen, G. *et al.* Adjuvant effect enhancement of porcine interleukin-2 packaged into solid lipid nanoparticles. *Res. Vet. Sci.* **96**, 62–68 (2014).
256. Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N. & Friede, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* **30**, 23–32 (2009).
257. Didierlaurent, A. M. *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.* **183**, 6186–6197 (2009).
258. Descamps, D. *et al.* Safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine for cervical cancer prevention: A pooled analysis of 11 clinical trials. *Hum. Vaccin.* **5**, 332–340 (2009).
259. O'Hagan, D. T., Ott, G. S., De Gregorio, E. & Seubert, A. The mechanism of action of MF59 – An innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine* **30**, 4341–4348 (2012).
260. Schultze, V. *et al.* Safety of MF59TM adjuvant. *Vaccine* **26**, 3209–3222 (2008).
261. Singh, M. *et al.* A preliminary evaluation of alternative adjuvants to alum using a range of established and new generation vaccine antigens. *Vaccine* **24**, 1680–1686 (2006).
262. Wack, A. *et al.* Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine* **26**, 552–561 (2008).
263. Heinemann, L., Woodfield, L., Amer, M. & Hibma, M. Effective Induction of Type 1 Helper IgG_{2a} and Cytotoxic T-Cell Responses in Mice Following Immunization with Human Papillomavirus Type 16 E2 in MF59. *Viral Immunol.* **21**, 225–234 (2008).
264. Smith, D. M., Simon, J. K. & Baker, J. R. Applications of nanotechnology for immunology. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 592–605 (2013).
265. Del Giudice, G. & Rappuoli, R. Inactivated and adjuvanted influenza vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **386**, 151–180 (2015).
266. Galli, G. *et al.* Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 7962–7967 (2009).
267. Fox, C. B. Squalene Emulsions for Parenteral Vaccine and Drug Delivery. *Molecules* **14**, 3286–3312 (2009).
268. Morel, S. *et al.* Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* **29**, 2461–2473 (2011).

269. Leroux-Roels, I. *et al.* Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **370**, 580–589 (2007).
270. Nohynek, H. *et al.* AS03 Adjuvanted AH1N1 Vaccine Associated with an Abrupt Increase in the Incidence of Childhood Narcolepsy in Finland. *PLoS ONE* **7**, e33536 (2012).
271. Vogel, F. R., Caillet, C., Kusters, I. C. & Haensler, J. Emulsion-based adjuvants for influenza vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **8**, 483–492 (2009).
272. Caillet, C. *et al.* AF03-adjuvanted and non-adjuvanted pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccines induce strong antibody responses in seasonal influenza vaccine-primed and unprimed mice. *Vaccine* **28**, 3076–3079 (2010).
273. Vesikari, T., Pepin, S., Kusters, I., Hoffenbach, A. & Denis, M. Assessment of squalene adjuvanted and non-adjuvanted vaccines against pandemic H1N1 influenza in children 6 months to 17 years of age. *Hum. Vaccines Immunother.* **8**, 1283–1292 (2012).
274. Didierlaurent, A. M. *et al.* Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **16**, 55–63 (2017).
275. Moncunill, G. *et al.* RTS,S/AS01E Malaria Vaccine Induces Memory and Polyfunctional T Cell Responses in a Pediatric African Phase III Trial. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
276. Zupp, F. Principles of vaccine design?Lessons from nature. *Vaccine* **28**, C14–C24 (2010).
277. Ascherio, A. *et al.* Hepatitis B vaccination and the risk of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **344**, 327–332 (2001).
278. Le Houézec, D. Evolution of multiple sclerosis in France since the beginning of hepatitis B vaccination. *Immunol. Res.* **60**, 219–225 (2014).
279. DeStefano, F., Verstraeten, T. & Chen, R. T. Hepatitis B vaccine and risk of multiple sclerosis. *Expert Rev. Vaccines* **1**, 461–466 (2002).
280. Goursolas, F. 1954-1955: Smallpox epidemic in Brittany. *Hist. Sci. Médicales* **38**, 99–108 (2004).
281. Antona, D. *et al.* Measles Elimination Efforts and 2008?2011 Outbreak, France. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 357–364 (2013).
282. Baron, S., Haeghebaert, S., Lévy-Bruhl, D., Laurent, E. & Guiso, N. Epidemiology of pertussis in France. *Med. Mal. Infect.* **31**, 12–19 (2001).
283. Guo, C. *et al.* Therapeutic Cancer Vaccines. in *Advances in Cancer Research* **119**, 421–475 (Elsevier, 2013).
284. Cheever, M. A. & Higano, C. S. PROVENGE (Sipuleucel-T) in Prostate Cancer: The First FDA-Approved Therapeutic Cancer Vaccine. *Clin. Cancer Res.* **17**, 3520–3526 (2011).
285. Linhart, B. & Valenta, R. Vaccines for allergy. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 354–360 (2012).

286. Rappuoli, R., Mandl, C. W., Black, S. & De Gregorio, E. Vaccines for the twenty-first century society. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 865–872 (2011).
287. Zhu, T. *et al.* An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**, 594–597 (1998).
288. Gallo, R. C. & Montagnier, L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2283–2285 (2003).
289. Buonaguro, L., Tornesello, M. L. & Buonaguro, F. M. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J. Virol.* **81**, 10209–10219 (2007).
290. Gelderblom, H. R. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS Lond. Engl.* **5**, 617–637 (1991).
291. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus. Med. Hemotherapy* **43**, 203–222 (2016).
292. Blumenthal, R., Durell, S. & Viard, M. HIV Entry and Envelope Glycoprotein-mediated Fusion. *J. Biol. Chem.* **287**, 40841–40849 (2012).
293. Doms, R. W. & Moore, J. P. HIV-1 Membrane Fusion. *J. Cell Biol.* **151**, f9–f14 (2000).
294. Fleury, S. *et al.* Limited CD4+ T-cell renewal in early HIV-1 infection: Effect of highly active antiretroviral therapy. *Nat. Med.* **4**, 794 (1998).
295. Broder, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res.* **85**, 1–18 (2010).
296. Adamson, C. S. & Freed, E. O. Recent progress in antiretrovirals--lessons from resistance. *Drug Discov. Today* **13**, 424–432 (2008).
297. Onafuwa-Nuga, A. & Teleshnitsky, A. The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **73**, 451–480, Table of Contents (2009).
298. Burgoyne, R. W. & Tan, D. H. S. Prolongation and quality of life for HIV-infected adults treated with highly active antiretroviral therapy (HAART): a balancing act. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 469–473 (2008).
299. Granich, R. *et al.* Highly active antiretroviral treatment as prevention of HIV transmission: review of scientific evidence and update. *Curr. Opin. HIV AIDS* **5**, 298–304 (2010).
300. Gupta, R., Hill, A., Sawyer, A. W. & Pillay, D. Emergence of drug resistance in HIV type 1-infected patients after receipt of first-line highly active antiretroviral therapy: a systematic review of clinical trials. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **47**, 712–722 (2008).
301. Shafer, R. W. & Schapiro, J. M. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev.* **10**, 67–84 (2008).

302. Sension, M. G. Long-Term Suppression of HIV Infection: Benefits and Limitations of Current Treatment Options. *J. Assoc. Nurses AIDS Care* **18**, S2–S10 (2007).
303. Alexaki, A., Liu, Y. & Wigdahl, B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr. HIV Res.* **6**, 388–400 (2008).
304. Coiras, M., López-Huertas, M. R., Pérez-Olmeda, M. & Alcamí, J. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 798–812 (2009).
305. Dahl, V., Josefsson, L. & Palmer, S. HIV reservoirs, latency, and reactivation: prospects for eradication. *Antiviral Res.* **85**, 286–294 (2010).
306. Geeraert, L., Kraus, G. & Pomerantz, R. J. Hide-and-Seek: The Challenge of Viral Persistence in HIV-1 Infection. *Annu. Rev. Med.* **59**, 487–501 (2008).
307. Richman, D. D. *et al.* The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* **323**, 1304–1307 (2009).
308. Trono, D. *et al.* HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals. *Science* **329**, 174–180 (2010).
309. Hawkins, T. Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. *Antiviral Res.* **85**, 201–209 (2010).
310. Mills, E. J. *et al.* Adherence to HAART: a systematic review of developed and developing nation patient-reported barriers and facilitators. *PLoS Med.* **3**, e438 (2006).
311. Demberg, T. & Robert-Guroff, M. Controlling the HIV/AIDS epidemic: current status and global challenges. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
312. Kawalekar, O. U., Shedlock, D. J. & Weiner, D. B. Current strategies and limitations of HIV vaccines. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* **2000** **11**, 192–202 (2010).
313. Gilbert, P. B. *et al.* Correlation between Immunologic Responses to a Recombinant Glycoprotein 120 Vaccine and Incidence of HIV-1 Infection in a Phase 3 HIV-1 Preventive Vaccine Trial. *J. Infect. Dis.* **191**, 666–677 (2005).
314. Buchbinder, S. P. *et al.* Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *The Lancet* **372**, 1881–1893 (2008).
315. McElrath, M. J. *et al.* HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *The Lancet* **372**, 1894–1905 (2008).
316. Moodie, Z. *et al.* Continued Follow-Up of Phambili Phase 2b Randomized HIV-1 Vaccine Trial Participants Supports Increased HIV-1 Acquisition among Vaccinated Men. *PLoS ONE* **10**, (2015).
317. Rerks-Ngarm, S. *et al.* Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2209–2220 (2009).

318. Kim, J. H., Rerks-Ngarm, S., Excler, J.-L. & Michael, N. L. HIV Vaccines - Lessons learned and the way forward. *Curr. Opin. HIV AIDS* **5**, 428–434 (2010).
319. McMichael, A. J. & Haynes, B. F. Lessons learned from HIV-1 vaccine trials: new priorities and directions. *Nat. Immunol.* **13**, 423–427 (2012).
320. Delmas, T. *et al.* Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity. *J. Colloid Interface Sci.* **360**, 471–481 (2011).
321. Delmas, T., Piraux, H. & Couffin, A.-C. How To Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions. *Langmuir* **27**, 1683–1692 (2011).
322. Navarro, F. P. *et al.* Lipid Nanoparticle Vectorization of IndoCyanine Green Improves Fluorescence Imaging for Tumor Diagnosis and Lymph Node Resection. *J. Biomed. Nanotechnol.* **8**, 730–741 (2012).
323. Lainé, A.-L. *et al.* Conventional versus stealth lipid nanoparticles: Formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring. *J. Controlled Release* **188**, 1–8 (2014).
324. Texier, I. *et al.* Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* **14**, 054005 (2009).
325. Gravier, J. *et al.* Lipidots: competitive organic alternative to quantum dots for in vivo fluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* **16**, 096013–096013 (2011).
326. Mérian, J. *et al.* Comparative biodistribution in mice of cyanine dyes loaded in lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **93**, 1–10 (2015).
327. Jacquart, A. *et al.* LipImageTM 815: novel dye-loaded lipid nanoparticles for long-term and sensitive in vivo near-infrared fluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* **18**, 101311–101311 (2013).
328. Hirsjärvi, S. *et al.* Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **9**, 375–387 (2013).
329. Fortin, P.-Y. *et al.* Detection of brain tumors using fluorescence diffuse optical tomography and nanoparticles as contrast agents. *J. Biomed. Opt.* **17**, 126004–126004 (2012).
330. Goutayer, M. *et al.* Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: Assessment by in vivo fluorescence imaging. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **75**, 137–147 (2010).
331. Navarro, F. P. *et al.* Preparation and characterization of mTHPC-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* **130**, 161–169 (2014).
332. Courant, T. *et al.* Tailoring nanostructured lipid carriers for the delivery of protein antigens: Physicochemical properties versus immunogenicity studies. *Biomaterials* **136**, 29–42 (2017).
333. Jain, A. *et al.* Tresyl-based conjugation of protein antigen to lipid nanoparticles increases antigen immunogenicity. *Int. J. Pharm.* **401**, 87–92 (2010).

334. Luo, Z. *et al.* Nanovaccine loaded with poly I:C and STAT3 siRNA robustly elicits anti-tumor immune responses through modulating tumor-associated dendritic cells *in vivo*. *Biomaterials* **38**, 50–60 (2015).
335. Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R. & Carbone, F. R. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based α - and β -chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* **76**, 34–40 (1998).
336. Hirosue, S., Kourtis, I. C. & van der Vlies, A. J. Antigen delivery to dendritic cells by poly(propylene sulfide) nanoparticles with disulfide conjugated peptides: Cross-presentation and T cell activation. *Vaccine* **28**, 7897–7906 (2010).
337. Fifis, T. *et al.* Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *J. Immunol.* **173**, 3148–3154 (2004).
338. Reddy, S. T., Rehor, A., Schmoekel, H. G., Hubbell, J. A. & Swartz, M. A. In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles. *J. Controlled Release* **112**, 26–34 (2006).
339. Swartz, M. A. The physiology of the lymphatic system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **50**, 3–20 (2001).
340. Benne, N., van Duijn, J., Kuiper, J., Jiskoot, W. & Slüter, B. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *J. Controlled Release* **234**, 124–134 (2016).
341. Iyer, V. *et al.* Impact of formulation and particle size on stability and immunogenicity of oil-in-water emulsion adjuvants. *Hum. Vaccines Immunother.* **11**, 1853–1864 (2015).
342. Owen, J. L., Sahay, B. & Mohamadzadeh, M. New generation of oral mucosal vaccines targeting dendritic cells. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, (2013).
343. Foged, C., Sundblad, A. & Hovgaard, L. Targeting Vaccines to Dendritic Cells. *Pharm. Res.* **19**, 229–238 (2002).
344. Sehgal, K., Dhodapkar, K. M. & Dhodapkar, M. V. Targeting human dendritic cells *in situ* to improve vaccines. *Immunol. Lett.* **162**, 59–67 (2014).
345. Apostolopoulos, V., Thalhammer, T., Tzakos, A. G. & Stojanovska, L. Targeting Antigens to Dendritic Cell Receptors for Vaccine Development. *Journal of Drug Delivery* (2013).
doi:10.1155/2013/869718
346. Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*. (Academic Press, 2013).
347. Monsigny, M., Petit, C. & Roche, A.-C. Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Anal. Biochem.* **175**, 525–530 (1988).
348. Jeanbart, L. *et al.* Enhancing Efficacy of Anticancer Vaccines by Targeted Delivery to Tumor-Draining Lymph Nodes. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 436–447 (2014).

349. de Titta, A. *et al.* Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 19902–19907 (2013).
350. Hinger, D. *et al.* Photoinduced effects of m-tetrahydroxyphenylchlorin loaded lipid nanoemulsions on multicellular tumor spheroids. *J. Nanobiotechnology* **14**, (2016).
351. Nilo, A. *et al.* Exploring the Effect of Conjugation Site and Chemistry on the Immunogenicity of an anti-Group B Streptococcus Glycoconjugate Vaccine Based on GBS67 Pilus Protein and Type V Polysaccharide. *Bioconjug. Chem.* **26**, 1839–1849 (2015).
352. Heurtault, B. *et al.* Liposome-based Systems for Anti-tumor Vaccination: Influence of Lipopeptide Adjuvants. *J. Liposome Res.* **16**, 205–213 (2006).
353. Said Hassane, F. *et al.* Rational design and immunogenicity of liposome-based diepitope constructs: Application to synthetic oligosaccharides mimicking the *Shigella flexneri* 2a O-antigen. *Vaccine* **27**, 5419–5426 (2009).
354. Sloat, B. R., Sandoval, M. A., Hau, A. M., He, Y. & Cui, Z. Strong antibody responses induced by protein antigens conjugated onto the surface of lecithin-based nanoparticles. *J. Controlled Release* **141**, 93–100 (2010).
355. Hirsjärvi, S., Belloche, C., Hindré, F., Garcion, E. & Benoit, J.-P. Tumour targeting of lipid nanocapsules grafted with cRGD peptides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **87**, 152–159 (2014).
356. Béduneau, A. *et al.* Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. *Biomaterials* **28**, 4978–4990 (2007).
357. Merian, J. *et al.* Synthetic Lipid Nanoparticles Targeting Steroid Organs. *J. Nucl. Med.* **54**, 1996–2003 (2013).
358. Kaur, R., Bramwell, V. W., Kirby, D. J. & Perrie, Y. Manipulation of the surface pegylation in combination with reduced vesicle size of cationic liposomal adjuvants modifies their clearance kinetics from the injection site, and the rate and type of T cell response. *J. Controlled Release* **164**, 331–337 (2012).
359. Garçon, N., Vaughn, D. W. & Didierlaurent, A. M. Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Rev. Vaccines* **11**, 349–366 (2012).
360. Wunderli, P. S., Dreesen, D. W., Miller, T. J. & Baer, G. M. Effects of vaccine route and dosage on protection from rabies after intracerebral challenge in mice. *Am. J. Vet. Res.* **64**, 491–498 (2003).
361. Bremer, P. T., Schlosburg, J. E., Lively, J. M. & Janda, K. D. Injection Route and TLR9 Agonist Addition Significantly Impact Heroin Vaccine Efficacy. *Mol. Pharm.* **11**, 1075–1080 (2014).
362. Birkhoff, M., Leitz, M. & Marx, D. Advantages of Intranasal Vaccination and Considerations on Device Selection. *Indian J. Pharm. Sci.* **71**, 729–731 (2009).

363. Marasini, N., Skwarczynski, M. & Toth, I. Intranasal delivery of nanoparticle-based vaccines. *Ther. Deliv.* **8**, 151–167 (2017).
364. Chong, C. S. W. *et al.* Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. *J. Controlled Release* **102**, 85–99 (2005).
365. Elamanchili, P., Lutsiak, C. M., Hamdy, S., Diwan, M. & Samuel, J. “Pathogen-mimicking” nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *J. Immunother.* **30**, 378–395 (2007).
366. Cui, Z., Han, S.-J., Vangasseri, D. P. & Huang, L. Immunostimulation Mechanism of LPD Nanoparticle as a Vaccine Carrier. *Mol. Pharm.* **2**, 22–28 (2005).
367. Preynat-Seauve, O. *et al.* Extralymphatic Tumors Prepare Draining Lymph Nodes to Invasion via a T-Cell Cross-Tolerance Process. *Cancer Res.* **67**, 5009–5016 (2007).
368. Zhang, W. *et al.* Immunopotentiator-Loaded Polymeric Microparticles as Robust Adjuvant to Improve Vaccine Efficacy. *Pharm. Res.* **32**, 2837–2850 (2015).
369. Zom, G. G. *et al.* Two in one: improving synthetic long peptide vaccines by combining antigen and adjuvant in one molecule. *Oncolmmunology* **3**, e947892 (2014).
370. Ilyinskii, P. O. *et al.* Adjuvant-carrying synthetic vaccine particles augment the immune response to encapsulated antigen and exhibit strong local immune activation without inducing systemic cytokine release. *Vaccine* **32**, 2882–2895 (2014).
371. Scott, E. A. *et al.* Dendritic cell activation and T cell priming with adjuvant- and antigen-loaded oxidation-sensitive polymersomes. *Biomaterials* **33**, 6211–6219 (2012).
372. Thomann, J.-S. *et al.* Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting. *Biomaterials* **32**, 4574–4583 (2011).
373. Coffman, R. L., Sher, A. & Seder, R. A. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity* **33**, 492–503 (2010).
374. Rolland, M., Nickle, D. C. & Mullins, J. I. HIV-1 Group M Conserved Elements Vaccine. *PLoS Pathog.* **3**, e157 (2007).
375. Kulkarni, V. *et al.* HIV-1 p24gag Derived Conserved Element DNA Vaccine Increases the Breadth of Immune Response in Mice. *PLoS ONE* **8**, e60245 (2013).
376. Buseyne, F. *et al.* Inverse Correlation between Memory Gag-Specific Cytotoxic T Lymphocytes and Viral Replication in Human Immunodeficiency Virus-Infected Children. *J. Infect. Dis.* **186**, 1589–1596 (2002).
377. Zuniga, R. *et al.* Relative Dominance of Gag p24-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Is Associated with Human Immunodeficiency Virus Control. *J. Virol.* **80**, 3122–3125 (2006).

378. Sacha, J. B. *et al.* Gag-specific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. *J. Immunol.* **178**, 2746–2754 (2007).
379. Ataman-Önal, Y. *et al.* Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J. Controlled Release* **112**, 175–185 (2006).
380. Flynn, B. J. *et al.* Immunization with HIV Gag targeted to dendritic cells followed by recombinant New York vaccinia virus induces robust T-cell immunity in nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 7131–7136 (2011).
381. Li, C. *et al.* Protection against SHIV-KB9 Infection by Combining rDNA and rFPV Vaccines Based on HIV Multiepitope and p24 Protein in Chinese Rhesus Macaques. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1–9 (2012).
382. Kulkarni, V. *et al.* HIV-1 Conserved Elements p24CE DNA Vaccine Induces Humoral Immune Responses with Broad Epitope Recognition in Macaques. *PLoS ONE* **9**, (2014).
383. Flamar, A.-L. *et al.* Delivering HIV Gagp24 to DCIR Induces Strong Antibody Responses In Vivo. *PLOS ONE* **10**, (2015).
384. Salabert, N. *et al.* Intradermal injection of an anti-Langerin-HIVGag fusion vaccine targets epidermal Langerhans cells in nonhuman primates and can be tracked in vivo. *Eur. J. Immunol.* **46**, 689–700 (2016).
385. Van Rompay, K. K. A. Tackling HIV and AIDS: contributions by non-human primate models. *Lab Anim.* **46**, 259–270 (2017).
386. Gelderblom, H. R., Hausmann, E. H., Ozel, M., Pauli, G. & Koch, M. A. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**, 171–176 (1987).
387. Rosé, S. *et al.* Characterization of HIV-1 p24 self-association using analytical affinity chromatography. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **13**, 112–119 (1992).
388. Ladavière, C. *et al.* Covalent immobilization of proteins onto (Maleic anhydride-alt-methyl vinyl ether) copolymers: enhanced immobilization of recombinant proteins. *Bioconjug. Chem.* **9**, 655–661 (1998).
389. Heeney, J. L. Preclinical primate studies of HIV-1-envelope-based vaccines: towards human clinical trials. *Curr. Opin. HIV AIDS* **1**, 336 (2006).
390. Graham, B. S. Advances in antiviral vaccine development. *Immunol. Rev.* **255**, 230–242 (2013).
391. Seok, J. *et al.* Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 3507–3512 (2013).

392. van der Worp, H. B. *et al.* Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med.* **7**, e1000245 (2010).
393. Shortman, K., Lahoud, M. H. & Caminschi, I. Improving vaccines by targeting antigens to dendritic cells. *Exp. Mol. Med.* **41**, 61–66 (2009).
394. Zhang, W. *et al.* Immunopotentiator-Loaded Polymeric Microparticles as Robust Adjuvant to Improve Vaccine Efficacy. *Pharm. Res.* **32**, 2837–2850 (2015).
395. Bal, S. M., Hortensius, S., Ding, Z., Jiskoot, W. & Bouwstra, J. A. Co-encapsulation of antigen and Toll-like receptor ligand in cationic liposomes affects the quality of the immune response in mice after intradermal vaccination. *Vaccine* **29**, 1045–1052 (2011).
396. Zuckerman, R. A. *et al.* Higher concentration of HIV RNA in rectal mucosa secretions than in blood and seminal plasma, among men who have sex with men, independent of antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* **190**, 156–161 (2004).
397. Tuomala, R. E. *et al.* Cell-Associated Genital Tract Virus and Vertical Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Antiretroviral-Experienced Women. *J. Infect. Dis.* **187**, 375–384 (2003).
398. Veazey, R. S. *et al.* Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* **280**, 427–431 (1998).
399. Pomerantz, R. J. Reservoirs of Human Immunodeficiency Virus Type 1: The Main Obstacles to Viral Eradication. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 91–97 (2002).
400. Dereuddre-Bosquet, N. *et al.* HIV specific responses induced in nonhuman primates with ANRS HIV-Lipo-5 vaccine combined with rMVA-HIV prime or boost immunizations. *Vaccine* **33**, 2354–2359 (2015).
401. Nanda, A. *et al.* Immunogenicity of Recombinant Fiber-Chimeric Adenovirus Serotype 35 Vector-Based Vaccines in Mice and Rhesus Monkeys. *J. Virol.* **79**, 14161–14168 (2005).
402. Van den Broeck, W., Derore, A. & Simoens, P. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice. *J. Immunol. Methods* **312**, 12–19 (2006).
403. Parasuraman, S., Raveendran, R. & Kesavan, R. Blood sample collection in small laboratory animals. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **1**, 87–93 (2010).

RESUME

Les vaccins représentent l'un des progrès majeurs de l'Histoire pour la santé publique, concrétisant notamment l'éradication de la variole en 1980. Les vaccins historiques, à base de pathogènes entiers atténués ou inactivés et donc très immunogènes ont été progressivement remplacés par des vaccins à sous-unités, beaucoup plus sûrs mais en contrepartie moins immunogènes. Des adjuvants tels que des vecteurs et des molécules immunostimulantes ont donc été incorporés dans les formulations vaccinales dans le but de générer des réponses immunitaires de grande amplitude. Cependant, les principaux adjuvants actuellement autorisés chez l'homme induisent exclusivement une réponse immunitaire humorale, à savoir la production d'anticorps permettant de neutraliser les pathogènes extracellulaires. Or, certains pathogènes comme le VIH requièrent une immunité cellulaire, indispensable à l'élimination du virus persistant dans les cellules infectées. Dans ce contexte, les adjuvants de vaccin sont en plein essor dans le but d'identifier de nouveaux candidats plus performants et sûrs. Nous décrivons ici la démarche suivie afin de proposer un vecteur lipidique nanoparticulaire (LNP), dont la stabilité, l'innocuité et la versatilité en font un outil idéal pour la délivrance d'antigènes. Nous avons dans un premier temps réalisé la preuve de concept sur la base de l'antigène modèle ovalbumine, dont la délivrance aux cellules immunitaires a permis d'augmenter significativement la réponse humorale *in vivo* chez la souris. D'autre part, l'induction d'une réponse cellulaire a été observée par la double délivrance de l'antigène et d'un immunostimulant. Plusieurs combinaisons et stratégies de vectorisations ont été évaluées, dans le but d'identifier la formulation la plus performante en vue d'une étude de protection anti-tumorale. Finalement, nous avons appliqué ces technologies au cas concret du VIH avec l'antigène de capsid p24, ce qui s'est conclu par une étude d'immunogénicité chez le primate non-humain. L'ensemble de ces résultats met en lumière la versatilité des LNP et leur capacité à induire des réponses immunitaires de grande magnitude, à médiation humorale et cellulaire.

ABSTRACT

The development of vaccines was one of the major health advances of the last century, with the success of smallpox eradication in 1980. Historical vaccines, based on attenuated or killed pathogens thus strongly immunogenic were finally replaced by subunit candidates, much safer but also poorly immunogenic. Therefore, adjuvants such as vectors and immunostimulants were incorporated in vaccine formulations in order to generate immune responses of high magnitude. However, actual adjuvants authorized in human vaccines only trigger humoral immune responses, with the production of antibodies which neutralize extracellular pathogens. Yet, some pathogens such as HIV require the induction of a cell-mediated immunity, necessary to eliminate viral reservoirs in infected cells. In this context, new adjuvant systems are being developed in order to identify the most efficient and safe candidates. Here we describe the approach followed to prepare a stable, safe and versatile vector consisting in lipid nanoparticles (LNP), for the delivery of antigens. We first report the proof of concept of antigen delivery based on the model ovalbumin, leading to the significant enhancement of humoral responses *in vivo* in mice. Thereafter, we focused on the induction of cell-mediated immune responses through the vectorization of both antigens and immunostimulants. Several combinations and vectorization strategies were assessed in the aim to identify the best prototype for a study of protection against tumor challenge. Finally, we applied these systems to HIV and its capsid antigen p24, which allowed us to conduct an immunogenicity study on a non-human primate model. Altogether, these results highlight the versatility of LNP and their ability to induce potent humoral and cell-mediated immune responses.