

**THESE DE DOCTORAT**

**Soutenue publiquement le 9 Décembre 2022  
Par M<sup>r</sup> BRINKHUIZEN Clément**

**En vue de l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

**Disciplines : Physiologie, Physiopathologie et Biologie systémique médicale**

---

**Optimisation de nanoparticules de maltodextrine  
lipidées à visée vaccinale**

---

**Membres du jury :**

**Rapporteurs :**

Monsieur le Professeur Hervé HILLAIREAU  
Madame le Professeur Isabelle DIMIER-POISSON

**Examineur :**

Monsieur le Docteur Ludovic GALAS

**Directeur de thèse :**

Monsieur le Docteur Laurent DUBUQUOY

**Co-encadrant :**

Monsieur le Docteur Rodolphe CARPENTIER



**THESE DE DOCTORAT**

**Soutenue publiquement le 9 Décembre 2022  
Par M<sup>r</sup> BRINKHUIZEN Clément**

**En vue de l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

**Disciplines : Physiologie, Physiopathologie et Biologie systémique médicale**

---

**Optimisation de nanoparticules de maltodextrine  
lipidées à visée vaccinale**

---

**Membres du jury :**

**Rapporteurs :**

Monsieur le Professeur Hervé HILLAIREAU  
Madame le Professeur Isabelle DIMIER-POISSON

**Examineur :**

Monsieur le Docteur Ludovic GALAS

**Directeur de thèse :**

Monsieur le Docteur Laurent DUBUQUOY

**Co-encadrant :**

Monsieur le Docteur Rodolphe CARPENTIER



# REMERCIEMENTS

## **A Monsieur le Professeur Hervé HILLAIREAU,**

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse, dernière étape importante de ma vie étudiante. Soyez assuré de mon plus profond respect.

## **A Madame le Professeur Isabelle DIMIER-POISSON,**

Je vous exprime toute ma gratitude pour avoir accepté de juger mon travail. Je vous souhaite d'obtenir à l'avenir des résultats aussi prometteurs que ceux acquis dans le cadre des projets portant sur la toxoplasmose. J'espère sincèrement que votre travail permettra à terme de protéger des populations laissées pour compte à l'heure actuelle.

## **A Monsieur le Docteur Ludovic GALAS,**

Votre expertise a permis de rendre notre travail plus intéressant et d'une qualité bien supérieure. Nos échanges durant ce projet ont toujours soulevé des interrogations constructives venant aiguïser mon sens critique envers ce travail. Pour toutes ces raisons, je vous remercie chaleureusement.

## **A Monsieur le Docteur Laurent DUBUQUOY,**

Mes sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein de cette unité il y a maintenant plus de quatre ans afin de découvrir le monde de la recherche. Vous m'avez permis de boucler cette thèse dans de bonnes conditions alors que nous naviguions en eaux troubles. Merci pour cette marque de confiance.

## **A Monsieur le Docteur Rodolphe CARPENTIER,**

Ca y est, nous y sommes. J'ai débuté en étant interne en pharmacie qui ne connaissait que très peu de choses au monde de la recherche et je termine aujourd'hui pharmacien titulaire d'un doctorat en Sciences (enfin je croise les doigts ^^). Je souhaite à tous les futurs doctorants d'avoir un encadrant comme tu l'as été : rigoureux mais à l'écoute de mes suggestions, me laissant en autonomie mais sans jamais me laisser tomber, formateur mais jamais à faire les choses à ma place. Ta bonne humeur et tes questions pertinentes ont jalonné ce parcours et m'ont permis d'entrevoir le bout du tunnel. Pour toutes ces raisons, un immense MERCI !!!!

Un jour, tu m'as conseillé d'écrire un roman devant les multiples péripéties que nous avons vécues ; je t'ai écouté et voici une liste non exhaustive pour que tout le monde puisse comprendre que cette thèse n'était pas comme les autres :

- Un changement de directeur de thèse au bout d'un an ce qui nous a occasionné pas mal de tracas administratifs (même si au final, ce ne fut que du positif).
- Des cellules qui ne voulaient bizarrement pas se multiplier qui sous l'action du saint esprit sont revenues à la normale (après avoir décongelé 6 ampoules du même lot, changé 2 fois de lots les sérums, les antibiotiques, la glutamine et le milieu).
- Un déménagement des plus désagréables tel un autodafé où nous nous sommes vus dépossédés de tout en se questionnant sur ce que nous pourrions bien faire avec 3 pauvres cartons de consommables.
- L'incendie du laboratoire en plein milieu de ma thèse, parce qu'il fallait bien que nous ayons des histoires à raconter aux copains.
- Deux confinements durant la pandémie entamant notre planning d'expériences de presque 6 mois. Car en tant qu'IPR la prolongation de thèse n'existe pas, cela n'aurait de toute façon été que trop simple !
- Un projet de microscopie incapable d'être mené à bien car nos fournisseurs étaient incapables de contrôler leurs lots d'anticorps et de baculovirus. En même temps, c'est tellement plus simple que le doctorant fasse le contrôle qualité pendant 4 semaines pour chaque lot en faisant varier tous les paramètres de son protocole d'immunofluorescence. Je le confesse j'avais des envies de meurtres envers ces sociétés !
- Quelle ne fut pas notre surprise quand un Lundi matin de Décembre 2021 alors que nous avons enfin trois marqueurs vésiculaires exploitables, le frigo décida de nous lâcher nous collant simultanément une dernière baffe et réduisant notre travail sur ce projet à néant.
- Les deux pannes du microscope confocal alors que nous en avons besoin pour planifier nos expériences des semaines à venir.
- La panne du cymomètre (devant la machine donc avec les échantillons sinon ce ne serait pas drôle) occasionnant un retard d'un mois et demi sur ce volet de travail.
- L'absence de reproductibilité de certaines expériences qui devait très certainement être liée au calendrier lunaire associée à l'ascendance de Vénus par rapport à Serena. Ou peut-être parce que nous n'avons pas assez de midichloriens ce jour-là. Au passage, je pense que si l'on comptait sur la force, nous n'aurions jamais gagné notre guerre des étoiles ^^
- Et pour terminer : les nombreux, TRES nombreux, TROP NOMBREUX retards de commande. Nous nous souviendrons de ces H292 qui ont mis 8 mois à traverser l'océan atlantique car la Covid-19 devait sans doute avoir gelé les eaux et cloué les avions au sol !

**A Clément HERKT,**

Merci pour ton support lors de la synthèse des nanoparticules de mannose. Ton expertise sur ce domaine nous a permis d'essayer une voie différente.

**A Meryem TARDIVEL, Antonino BONGIOVANNI et Nathalie JOUY,**

Merci pour votre aide constante lors de mes différents projets de microscopie confocale et de cytométrie. Bien qu'ils n'aient pas pu tous aboutir, votre appui m'a toujours permis d'obtenir des résultats éthiques suivant ma ligne de conduite.

**A l'équipe d'imagerie du PRIMACEN : Magalie BENARD, Damien SCHAPMAN, Alexis LEBON,**

Un immense merci pour le temps passé sur mon projet, votre travail fut extrêmement précieux pour la publication de cet article !

**A toute l'équipe de l'IMPECS,**

Merci de m'avoir soutenu en partageant vos ressources et expertises, me faisant gagner un temps considérable lors des derniers rushs de cette année.

**A Ségolène PLET, Norhane SALAH, François FASQUELLE, Amélie DEGRAEVE et Hafssa JADDI,**

Vous avez jalonné mon parcours durant ces quatre années et m'avez initié aux joies mais aussi aux déconvenues du travail de paillasse (décidément je ne suis vraiment pas fait pour cela ^^). Pour votre aide mais aussi pour tous ces moments partagés accompagnés pour certains de bons gâteaux, je vous remercie énormément.

### **A ma petite Raiponce,**

Et voilà la dernière étape de notre vie étudiante franchie à deux et quelle étape ! Nous (oui je dis bien « nous » car sans tes coups de pieds aux fesses réguliers, je ne suis pas sûr que ce manuscrit serait terminé dans le timing imparti) y sommes arrivés.

Un immense merci tout d'abord pour le temps colossal octroyé aux nombreuses relectures de ce document afin d'éviter les écueils, les fautes d'orthographe, les oublis de citation et j'en passe... Ta rigueur légendaire détectant le moindre double espace dans ce manuscrit ^^

Depuis bientôt sept ans tu me pousses à donner le meilleur de moi-même tout en étant une aide constante dans ma vie à la fois dans les épreuves mais aussi dans les prises de décision. Je ne pourrai jamais assez te remercier pour toutes ces raisons et suis très fier que tu sois ma femme depuis maintenant plus d'un an. Un avenir radieux s'offre à nous et je suis persuadé que nous accomplirons de grandes choses ensemble ! Tu es une personne attentive aux autres et consciencieuse ; cela transparaît dans ta vie quotidienne et professionnelle de pharmacienne. Tu arrives toujours à trouver des excuses à tes patients même durant cette période de pandémie où tu fus souvent malmenée témoignant de ton grand cœur.

Pour tout cela, JE T'AIME FOLLEMENT ! 😊

### **A mes Parents,**

Maman, Papa, voilà c'est fini. Votre grand premier a terminé ces années étudiantes après plus d'une décennie (même moi je commence à trouver cela long). Je suis très heureux de vous présenter aujourd'hui mon travail, fruit de ces années d'études. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apporté, d'avoir toujours fait attention à vos 3 enfants et de nous avoir inculqués nos qualités en nous élevant dans l'amour et la bienfaisance. Vous êtes des parents exemplaires, toujours attentifs à nos besoins et à nos vies. Force est de constater que ce monde tournerait bien mieux si nous appliquions tous ces valeurs d'entraide si chères à votre cœur. Je vous aime !

### **A Loulou et Toto, mes deux petits frères adorés,**

Merci d'être présents pour tous les événements importants. Merci pour tous ces souvenirs qui nous font encore beaucoup rire lors des réunions de famille. Merci pour les moments passés ensemble, ils sont toujours une source de bonheur. J'espère que cette cohésion que nous avons tous les trois restera toute notre vie car mine de rien vous feriez des parrains formidables ;-)

### **A ma Grand-mère, mamie Christiane,**

Chose promise, chose due Mamie ! Je t'ai donné rendez-vous il y a 9 mois après l'obtention du Diplôme de Pharmacien pour te dire que cette année sera la fin de ma vie étudiante entamée chez toi il y a 12 ans. Encore un immense merci pour tous les sacrifices que tu as fait pour moi. Ce fut long mais c'est fini !

**A toute ma famille et ma belle-famille,**

Merci d'avoir été présents durant toutes ces années.

**A mes amis pharma : Elodie, Marine, Claire, Elise, Caroline et William,**

Un immense merci pour nos moments partagés passés et ceux à venir. Notre cohésion nous a permis de garder le sourire et d'avancer ensemble dans l'adversité de nos études.

**Aux amis d'enfance : Clément, Arnaud, Timothée et Estelle,**

Merci de m'avoir accompagné depuis plus de 20 ans pour certains. Votre amitié m'a toujours été très précieuse et m'a fait grandir dans la joie et la bonne humeur.



# SOMMAIRE

## LISTE DES ABREVIATIONS.....4

## 1<sup>ERE</sup> PARTIE : INTRODUCTION GENERALE.....7

I. La vaccination .....	7
1. Historique de la vaccination : de l'antiquité au XXI <sup>ème</sup> siècle .....	7
1. Vaccins vivants atténués.....	10
2. Vaccins inactivés.....	11
3. Vaccins sous unitaires .....	11
2. Les vaccins à acides nucléiques .....	13
1. Vecteurs viraux .....	14
2. Vaccins à ARN.....	15
3. L'apport des adjuvants .....	17
1. Les sels d'aluminium .....	18
2. Les sels de calcium.....	19
3. Les émulsions lipidiques .....	19
4. Les oligodésoxynucléotides .....	20
II. L'essor des nanotechnologies vaccinales .....	22
1. Définition .....	22
2. La classification des nanoparticules par voie intraveineuse .....	25
1. Les NPs conventionnelles.....	26
2. Les NPs furtives.....	26
3. Les NPs ciblées .....	28
4. Les NPs multifonctionnelles .....	28
3. Différences de classification des voies alternatives .....	29
4. Les différents types de nanoparticules en vaccination .....	30
1. Les liposomes .....	30
2. Les vecteurs viraux .....	32
3. Les nanoparticules polymériques.....	35
III. Le système immunitaire et la réponse vaccinale .....	37
1. L'immunité innée .....	37
1. L'inflammasome .....	39
2. L'immunité innée comme déclencheur de la réponse adaptative .....	40
2. L'immunité adaptative .....	41
1. La présentation antigénique via le CMH des CPAg .....	41
2. La réponse cellulaire .....	43
3. La réponse humorale .....	45
3. Développement d'une mémoire immunitaire .....	50
1. Les Lymphocytes T.....	50
2. Les Lymphocytes B.....	52

3.	<i>La persistance de la mémoire suite à la vaccination</i> .....	53
4.	Le cas particulier de l'immunité des muqueuses .....	53
1.	<i>Les barrières physiques de protection</i> .....	54
2.	<i>Le système immunitaire des muqueuses</i> .....	55
IV.	Les nanoparticules en vaccination par voie muqueuse .....	60
1.	Méthodologie de recherche .....	60
2.	Articles sélectionnés .....	61
3.	Analyse des articles .....	81
1.	<i>Les nanoparticules</i> .....	81
2.	<i>Les antigènes</i> .....	85
3.	<i>Le schéma vaccinal</i> .....	86
4.	<i>Les adjuvants</i> .....	86
5.	<i>Critique des réponses enregistrées</i> .....	88
4.	Conclusion .....	90
V.	Les NP de maltodextrine en vaccination muqueuse .....	91
1.	Les NP+ .....	91
2.	Les NPL .....	92
3.	Intérêts des nanoparticules de maltodextrine .....	93
4.	La réponse immunologique des NPL .....	94
1.	<i>Toxoplasma gondii</i> .....	94
2.	<i>Leishmania donovani</i> .....	96
3.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	97
4.	<i>Virus Influenzae</i> .....	98
5.	<i>Conclusion</i> .....	99
VI.	But de la thèse .....	101

## **2<sup>NDE</sup> PARTIE : SUBSTITUTION DE LA MATRICE GLUCIDIQUE DES NPL .....103**

I.	Introduction .....	103
II.	Matériel et méthodes .....	103
1.	Synthèse et caractérisation des nanoparticules .....	103
2.	Association de protéines aux nanoparticules .....	104
III.	Résultats .....	105
1.	Caractérisation des nanoparticules .....	105
2.	Association de protéines aux nanoparticules .....	106
IV.	Discussion .....	108
V.	Conclusion .....	109

## **3<sup>EME</sup> PARTIE : SUBSTITUTION DU COEUR LIPIDIQUE ....111**

I.	Abstract .....	113
II.	Introduction .....	113

III. Material and methods.....	115
1. Synthesis, labeling and lipidation of nanoparticles .....	115
2. Characterization of nanoparticles .....	115
3. Cell culture .....	116
4. Efferocytosis assay .....	116
5. Confocal microscopy .....	116
6. TIRF microscopy .....	117
7. Determination of nanoparticles cell entry by flow cytometry .....	117
8. DPPS-core accessibility .....	117
9. Association of proteins to nanoparticles .....	118
10. Intracellular delivery of proteins.....	118
11. Intracellular degradation of proteins .....	118
12. Statistics.....	119
IV. Results.....	120
1. Characterization of the cationic maltodextrin nanoparticles and macrophage-like THP-1 cells .....	120
2. Effect of nanoparticle-lipid core composition on cell entry efficacy .....	121
3. Mechanism of nanoparticle cell entry .....	123
4. Study of protein delivery by nanoparticles.....	125
5. Characterization of nanoparticle intracellular routes and protein processing 127	
V. Discussion .....	130
VI. Conclusion .....	132
<b>4<sup>EME</sup> PARTIE : DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>133</b>
I. La vaccination par voie muqueuse.....	133
II. Le recours aux nanoparticules dans les vaccins .....	134
III. La NPL dans la vaccination par voie muqueuse.....	135
IV. L'optimisation de la NPL .....	138
1. Modification du polysaccharide .....	138
2. Modification du cœur lipidique.....	139
<b>5<sup>EME</sup> PARTIE : CONCLUSION.....</b>	<b>143</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>145</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>146</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>147</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

**Ac** : Anticorps  
**ADCC** : Antibody Dependant Cellular Citotoxicity  
**ADN** : Acide DésoxyRiboNucléiques  
**AID** : Activation Induced cytidine Deaminase  
**AINS** : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien  
**AIS** : Anti-Inflammatoire Stéroïdien  
**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché  
**ANSM** : Agence Nationale de Sécurité du Médicament  
**AOTF** : Acoustic Optical Tunable Filter  
**ARE** : Asparagus racemosus extract  
**ARN** : Acide RiboNucléiques  
**ASC** : Apoptosis-related Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain  
**BAFF** : B-cell Activating Factor  
**BCG** : Bacille de Calmette et Guérin  
**BCR** : B-Cell Receptor  
**BMDC** : Bone Marrow Derived Dendritic Cell  
**BSA** : Bovine Serum Albumine  
**CAR** : Coxsackievirus and Adenovirus Receptor  
**CCR** : Chemokine Receptors  
**CDM** : Cross-linked Dextran Microspheres  
**CFSE** : CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester  
**CFTR** : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator  
**CLIP** : CLass II associated Invariant chain Peptide  
**CLR** : C-type Lectin Receptors  
**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
**CPAg** : Cellule Présentatrice d'Antigène  
**CpG** : Cytosine phospho Guanine  
**CPH** : 1,6-bis(pCarboxyPhenoxy) Hexane  
**CPPS** : Cell Penetrating Proteins and Peptides  
**CPTEG** : 1,8-bis(p-CarboxyPhenoxy)-3,6-dioxatane  
**CT** : Toxine Cholérique  
**DAMP** : Damage Associated Molecular Pattern  
**DC** : Dendritic Cell  
**DDA MPL** : DimethylDioctadecyl-Ammonium bromide MonoPhosphoryl Lipid A  
**DOPC** : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine  
**DPPG** : 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol  
**DPPE** : 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-PS  
**DSPE** : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine  
**EGF** : Epidermal Growth Factor  
**EPR** : Enhanced Permeability and Retention  
**FAB** : Fragment Antigen Binding  
**Fc** : Fragment cristallin

**FDA** : Food and Drug Administration  
**FITC** : Fluorescein IsoThioCyanate  
**FSC** : Forward SCatter  
**GALT** : Gut Associated Lymphoid Tissue  
**GFP** : Green Fluorescent Protein  
**GRGDS** : Glycine-Arginine-Glycine-Aspartic acid-Serine  
**GTMA** : Glycidyl Trimethyl Ammonium  
**HBHA** : Heparin-Binding Haemagglutinin  
**HLA** : Human Leukocyte Antigen  
**HPV** : Human Papilloma Virus  
**HTLV-1** : Human T lymphotropic virus type 1  
**ICAM** : InterCellular Adhesion Molecule  
**IFN** : InterFéroN  
**Ig** : Immunoglobuline  
**IL** : InterLeukine  
**IM** : IntraMusculaire  
**IN** : IntraNasale  
**ITAM** : Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif  
**ITK** : Inhibiteur de Tyrosine Kinase  
**LB** : Lymphocytes B  
**LDL** : Low Density Lipoprotein  
**LF** : Limite de Flocculation  
**LFA** : Lymphocyte Function associated Antigen  
**LPS** : LipoPolySaccharide  
**LT** : Lymphocytes T  
**LTA** : Lotus Tetragonolobus  
**LUV** : Large Unilamellar Vesicle  
**MADCAM** : Mucosal vascular ADdressin Cell Adhesion Molecule  
**MALP-2** : Mycoplasma Associated LipoPeptide-2  
**MALT** : Mucosal Associated Lymphoid Tissue  
**MeSH** : Medical Subject Headings  
**MICI** : Maladies Inflammatoires Chronique de l'Intestin  
**MLV** : Multilamellar Vesicle  
**MO** : Moelle Osseuse  
**MPLA** : MonoPhosphoryl Lipid A  
**MVV** : Multivesicular Vesicle  
**NALT** : Nasal Associated Lymphoid Tissue  
**NFκB** : Nuclear Factor-Kappa B  
**NK** : Natural Killer  
**NLR** : Nod-Like Receptors  
**NOD-2** : Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2  
**NP** : NanoParticules  
**NP+** : NanoParticule de maltodextrine  
**NPL** : NanoParticule de maltodextrine lipidée au DPPG  
**NPML** : NanoParticule de Mannose à cœur Lipidique

**NPPS** : NanoParticule de maltodextrine lipidée au DPPS  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**PAMPs** : Pathogen Associated Molecular Patterns  
**PBCA** : Poly(n-ButylCyanoAcrylate)  
**PCL** : Polycaprolactone  
**PGA** : PolyGlutamic Acid  
**PiGR** : Polymeric Immunoglobuline Receptor  
**PLA** : Acide Poly-Lactique  
**PLGA** : Acide Poly-Lactique-co-Glycolique  
**PN** : PolyNucléaires  
**PNE** : PolyNucléaires Eosinophiles  
**PNN** : PolyNucléaires Neutrophiles  
**PPRSV** : Porcine reProductive and Respiratory Syndrome Virus  
**PRR** : Pattern Recognition Receptor  
**PS** : Phosphatidyl Serine  
**PVA** : Poly(Vinyl Alcohol)  
**PVM/MA** : Methyl Vinyl ether / Maleic Anhydride  
**QS** : Quillaja Saponin  
**RABV** : RhABdoViridae  
**RAG** : Recombinase Activating Gene  
**RLR** : RIG-1 Like Receptors  
**ROR** : Rougeole Oreillons Rubéole  
**SARS-CoV2** : Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2  
**SC** : Sous-Cutanée  
**sCMOS** : scientific Complementary Metal Oxide Semiconductor  
**SMBV** : SupraMolecular Biovector  
**SSC** : Side SCatter  
**SUV** : Small Unilamellar Vesicle  
**TAD** : Topologically Associated Domains  
**TAP** : Transporter associated with Antigen Processing  
**TCR** : T-Cell Receptor  
**TGF** : Transforming Growth Factor  
**TIRF** : Total Internal Reflection Fluorescence  
**TLR** : Toll Like Receptor  
**TMC** : TriMéthyl-Chitosan  
**TNF** : Tumor Necrosis Factor  
**UEA-1** : Ulex europaceous agglutinin 1  
**UV** : UltraViolet  
**VCAM** : Vascular Cell Adhesion Molecule  
**VCG** : Vibrio Cholerae Ghosts  
**VLDL** : Very Low Density Lipoproteins  
**VLP** : Virus Like Particle

# 1<sup>ERE</sup> PARTIE : INTRODUCTION GENERALE

## I. La vaccination

Avec plus de 560 millions de patients touchés par le SARS-CoV2 et 6,3 millions de décès enregistrés par l'OMS (1), la pandémie de Covid-19 traversée depuis 3 ans est un enjeu crucial de santé public.

Mobilisant des moyens financiers et humains sans précédent, de nombreuses études mondiales ont été menées afin de solutionner l'absence de thérapeutique. Au niveau national, les AIS (Dexaméthasone) (2) et AINS (Naproxène) (3), l'Hydroxychloroquine, les macrolides (Azithromycine), les Ac monoclonaux (Tocilizumab) (4), les ITK (Ruxolitinib) (5), les antiviraux (Remdesivir) (6) ont été testés. Malheureusement, aucune n'a abouti dès lors que les premiers signes de la maladie sont dépassés et que l'état clinique des patients se dégrade.

Face à ce challenge, de nombreuses institutions se sont lancées dans la course à l'immunité collective octroyée par la vaccination ; seule alternative viable à ce jour. Plusieurs vaccins sont actuellement commercialisés employant des technologies variées ; des plus anciennes comme le virus SARS-CoV2 inactivé (COVAXIN<sup>®</sup>, SINOVAC<sup>®</sup>) ou les protéines recombinantes de SARS-CoV2 (SOBERANA<sup>®</sup>) aux plus récentes telles que les vecteurs viraux non réplicatifs exprimant la protéine Spike (SPOUTNIK V<sup>®</sup>, VAXZEVRIA<sup>®</sup>) et acides nucléiques codant cette protéine vectorisée par des liposomes (COMINARTY<sup>®</sup>, SPIKEVAX<sup>®</sup>).

Certes très récents, les vaccins à ARN messenger englobés par des nanoparticules ont fortement imprégné l'avenir des anti-infectieux. Si bien que l'industrie pharmaceutique oriente maintenant ses recherches vers ces vaccins de dernière génération : adaptables plus facilement aux pathogènes, rapides à produire et d'une efficacité qui n'est plus à prouver.

Cependant, l'acte vaccinal tel que nous le connaissons est le fruit du perfectionnement des technologies employées au cours des siècles passés nous octroyant un arsenal conséquent contre bactéries et virus.

### 1. Historique de la vaccination : de l'antiquité au XXI<sup>ème</sup> siècle

Bien que la vaccination moderne ne débuta qu'avec les expériences d'Edward JENNER à la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle, de multiples observations antérieures telles que le phénomène de « mithridation » (désensibilisation d'un sujet vis-à-vis d'une substance nocive par ingestion de celle-ci à des doses infimes progressivement croissantes) nous démontre que cette recherche de l'immunité n'est pas une démarche récente.

Ainsi, les observations de l'historien Thucydide sur la grande peste d'Athènes en 400 avant JC relatent que les citoyens ayant survécu à une première infection s'approchaient sans risque des actuels malades car ils savaient qu'ils ne pourraient être terrassés. Analyses renouvelées au XIV<sup>ème</sup> siècle lors de la pandémie de peste noire sévissant en Europe tuant plus de 25 millions de personnes. Avant-gardiste, ces

écrits historiques ne seront confirmés que par la découverte 2 000 ans plus tard de *Yersinia pestis*, bactérie responsable de cette maladie.

Les prémices de la vaccination moderne proviennent des observations effectuées sur la variole communément appelée « petite vérole » (7). Première cause de mortalité en Europe, cette maladie toucha 60 millions de personnes et tua 15% des individus touchés contre 1,2% pour l'actuelle Covid-19. Les rescapés de cette maladie étaient souvent défigurés à vie mais l'on constatait alors une absence de récurrence chez ces sujets lors d'un second contact avec le virus. De ces observations naquit le concept de « variolisation » consistant en l'inoculation de lymphes prélevées dans les pustules d'un malade à un sujet sain par scarification. En dépit d'une efficacité apparente et de son extension à travers le continent, cette méthode n'était pas dépourvue de risques (surinfections des blessures, signes cliniques importants chez les sujets) nécessitant la sécurisation du procédé.

Devant faire face à ces problématiques, la variolisation s'efface peu à peu au profit de l'inoculation de la vaccine, aboutissement des travaux d'Edward JENNER (8). Lors de ces études, ce médecin anglais constate que les fermières touchées par la vaccine ou « cowpox » sont immunisées à la variole. Le tableau clinique étant caractérisé par des pustules palmaires de gravité moindre, il eut l'idée d'injecter le pus prélevé sur ces lésions à des individus sains. L'épisode souvent relaté étant l'inoculation en 1796 de pus de malade chez un enfant de 8 ans qui présenta alors les signes cliniques similaires au tableau de la vaccine et un rétablissement complet au bout de 10 jours. Lors du challenge de cet enfant avec la variole, celui-ci n'eut aucun symptôme caractéristique de la maladie, le concept de la vaccination était né.

Diffusé à travers le monde durant le siècle suivant, celui-ci permit de diminuer la mortalité à 1%. Cependant, les chaînes de vaccinations complexes n'étaient pas sans risque. La vaccination de bras à bras adoptée permettait certes de protéger un grand nombre de patients rapidement sans recourir à des procédés de cultures cellulaires contraignants mais induisait simultanément des problèmes de contaminations inter individuelles. Pour contrecarrer ce danger, la culture de la vaccine sur peau de génisse en milieu aseptique fut adoptée sécurisant ainsi le matériel biologique. La vaccination associée à son rappel devint obligatoire en 1902 en France permettant l'éradication du pathogène en 1980 (9).

Reconnu comme étant le père de la vaccination moderne, Louis PASTEUR perfectionne les idées de JENNER en créant le concept d'atténuation à l'origine de l'arsenal thérapeutique disponible aujourd'hui. Contrairement à son prédécesseur qui utilisait un virus différent du pathogène, PASTEUR tenta de protéger les patients vis-à-vis de la rage en injectant le virus atténué. Ce procédé était obtenu en cultivant le *Rhabdoviridae* (RABV), non identifié à cette époque, sur de la moelle osseuse d'animaux en atmosphère sèche et en présence de soude.

Le temps d'incubation de la maladie étant de 4 semaines, ce délai permettait au chercheur d'utiliser son vaccin à visée curative plutôt que préventive. Suite à des essais concluants chez les animaux, Joseph MEISTER subit le premier vaccin curatif antirabique post-exposition en Juillet 1985 démontrant les potentielles efficacité et

innocuité du vaccin. En effet, toute morsure n'est pas synonyme de transmission. De plus, les tests de vaccinations qui suivirent ne démontrèrent pas une efficacité systématique. Malgré ces remarques, ce traitement a été amélioré sous la forme de vaccin inactivé produit sur culture cellulaire de lignée continue Vero utilisant la souche *Wistar Pitman Moore L503 3M* et commercialisé sous le nom de Vaccin rabique Pasteur®.

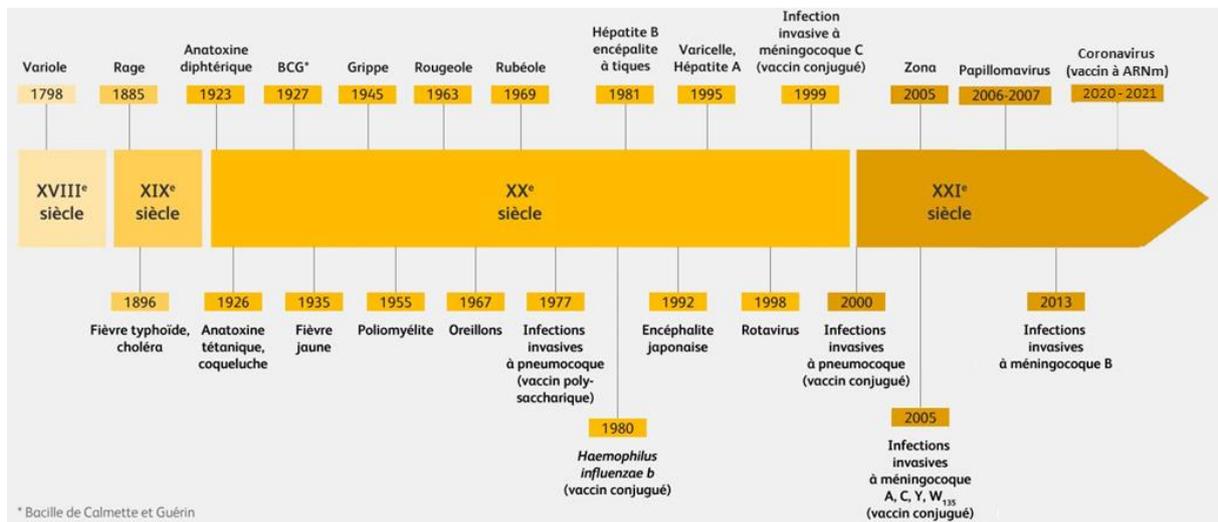
Enjeu de santé publique durant la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, la tuberculose est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1964 en France. Nous constatons depuis les années 70 une nette diminution des cas répertoriés avec une stagnation ces 10 dernières années. Cependant, les signes pathognomoniques d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis* étant bien différents de celui de la rage, une vaccination curative post-exposition n'était pas envisageable. De plus, la transmission par les gouttelettes de pflügge émises par le malade augmentait fortement la contagiosité.

Perfectionnée par Albert CALMETTE et Camille GUERIN, la technique de PASTEUR rendit possible la vaccination par le BCG. Issu du germe virulent atténué après 230 passages (de 1908 à 1921) sur milieu contenant de la pomme de terre, ce médicament démontre une protection après 30 jours. Les premières vaccinations chez l'Homme eurent lieu en 1921, divisant la mortalité alors constatée par 20. Dès lors de nombreux patients eurent recours à ce vaccin jusqu'à sa recommandation au congrès de la société des nations en 1928 et l'obligation vaccinale dès 1950 en France. Toutefois, devant l'amointrissement des cas dans notre pays et la protection imparfaite du vaccin, très efficace sur les formes miliaires mais de moindre action sur les formes modérées ; cette obligation fut abrogée en 2007.

Ainsi les vaccins vivants atténués furent les origines de la vaccination que nous connaissons. L'essor de cette technologie continua durant le siècle dernier (**Figure 1**) avec au regard de la définition de l'ANSM (10) de nombreuses alternatives que sont les :

- Vaccins vivants atténués.
- Vaccins inactivés.
- Vaccins sous unitaires.
- Vecteurs viraux.
- Vaccins à acides nucléiques.

Ces différentes technologies sont brièvement décrites ci-dessous et critiquées sur leurs avantages et inconvénients. Le **tableau I**, rassemble par catégorie les différents vaccins connus à ce jour.



**Figure 1.** Frise chronologique du développement des différents vaccins (11).

### 1. Vaccins vivants atténués

Les vaccins vivants atténués comme le BCG, contiennent des agents pathogènes vivants dont la virulence a été nettement atténuée grâce à la mise en culture. Cette diminution de l'infectiosité sera obtenue par passages successifs sur un organisme différent de l'hôte naturel, par traitements physiques tels que les rayons UV, la chaleur ou encore par génie génétique afin de supprimer les gènes responsables codant les facteurs de virulence.

L'immunogénicité de ces vaccins est importante stimulant à la fois les immunités innée et adaptative car lors de son administration, le pathogène se multiplie et présente ses antigènes aux différents acteurs du système immunitaire. De plus, étant donné que ces souches vaccinales sont répliquatives, la protection conférée est très similaire à celle obtenue lors d'une infection naturelle offrant une immunité de longue durée après seulement le prime-boost, voire uniquement une seule injection.

Toutefois, le risque infectieux existe avec cette technologie et la réplication du pathogène est plus pourvoyeuse d'effets indésirables ; le tableau clinique constaté étant alors assez ressemblant à celui de l'infection naturelle. Le délai entre l'inoculation et le contrôle total de la souche vaccinale par le système immunitaire de l'hôte rend contagieux le patient vis-à-vis de son entourage.

Pour exemple, le vaccin constitué d'entérovirus atténués induit l'excrétion de ce virus durant les jours suivant son administration. La réversion de celui-ci est alors possible par recombinaison avec le milieu extérieur pouvant provoquer la survenue de cas de poliomyélite chez les sujets non vaccinés (12).

En outre, une méta-analyse (13) menée depuis 2009 affirme que les enfants traités par anti-TNF $\alpha$  présentaient non seulement une faible chance de séroprotection vis-à-vis des virus *Influenzae* mais développaient aussi un surrisque de myalgie et d'arthrite secondaires à l'administration. C'est pourquoi, cette typologie de vaccins est théoriquement contre indiquée chez les femmes enceintes et les sujets immunodéprimés (14) bien que leurs administrations soient à l'appréciation médicale.

Par ailleurs, l'atténuation du micro-organisme n'est pas toujours possible sans dépléter totalement son immunogénicité. Cette technologie ne peut donc pas être exploitée pour tous les agents infectieux. Les scientifiques ont alors recours aux vaccins inactivés.

## 2. *Vaccins inactivés*

Les vaccins inactivés sont composés de virus ou bactéries entières cultivés puis tués par des procédés physico-chimiques (rayonnement UV, dessiccation, application de formol). Non répliquative, cette technologie est dépourvue de pouvoir infectieux mais nécessite des doses d'antigènes plus importantes responsables d'effets indésirables (rougeurs, gonflements et douleurs au point d'injection ainsi que myalgie et hyperthermie).

L'avantage principal de cette technologie est l'absence de contre-indication chez les sujets immunodéprimés car il n'entraîne aucune complication infectieuse. En revanche, l'immunogénicité de ces vaccins est moindre nécessitant souvent l'adjonction d'adjuvants afin d'accroître ce paramètre (15). Dès lors, force est de constater que cette technologie conduit à la genèse d'une réponse humorale souvent persistante mais la réponse cellulaire reste quasi inexistante imposant de nombreux rappels au cours de la vie de l'individu (16).

## 3. *Vaccins sous unitaires*

Dans le but de limiter l'apparition des effets allergiques, de contourner les contre-indications aux immunodéprimés, de nombreux essais cliniques se sont intéressés à la modification de la structure antigénique des vaccins en les couplant avec un polymère naturel (17) ou synthétique (18) mais aussi en le dénaturant (19). L'évolution de conception déboucha donc vers les vaccins sous unitaires.

Préparés à base de fragments d'antigènes purifiés, choisis scrupuleusement afin de provoquer la reconnaissance du germe entier par le système immunitaire du patient. Ces sous-unités permettent une stimulation ciblée vers l'épitope adopté et sont mieux tolérés lors de l'administration. Elles peuvent être de trois composés différents : toxines, peptidiques ou polyosidiques.

Bien que leurs fabrications soient plus complexes avec souvent le recours à des techniques de biologie moléculaire, le problème majeur reste l'immunogénicité constatée lors des essais. Cette technologie ne présente en effet pas de risque infectieux chez les patients vaccinés mais exige l'absorption des sous unités sur des dérivés aluminium afin de contrebalancer ce défaut. De la même façon que pour les vivants inactivés, des rappels réguliers sont nécessaires (16).

### *a) Les vaccins employant les anatoxines*

Les vaccins à base d'« anatoxines » sont obtenus par récupération de toxines sécrétées par des bactéries sélectionnées en culture. Ce composé est ensuite purifié puis détoxifié par adjonction de formaldéhyde sous 40°C pendant 1 mois afin de le rendre inoffensif.

Cette typologie de vaccins a l'avantage de réagir à la fois sur le pathogène mais aussi de neutraliser les toxines circulantes lors de l'infection.

### *b) Les vaccins peptidiques recombinants*

Les vaccins peptidiques sont préparés à partir d'une ou plusieurs protéines du germe. La finalité de cette approche est d'obtenir une reproduction fidèle d'une fraction du pathogène. Ce résultat étant fortement lié à sa conformation, il est donc nécessaire de synthétiser ces antigènes au sein d'un organisme capable d'effectuer à la fois la traduction du génome mais aussi les modifications post traductionnelles comme la glycosylation. Pour ce faire, la technique de recombinaison génétique est utilisée afin de transférer un fragment de gène codant pour l'antigène d'intérêt à l'aide d'un plasmide dans une cellule cultivable (levures ou cellules rénales embryonnaires humaines). Cette région nouvellement insérée dans le génome de la cellule est contrôlée par un promoteur qui une fois stimulé par une substance active telle que le Méthotrexate ou des antibiotiques (céphalosporines, cyclines) initiera sa synthèse. Par la suite, ces protéines sont isolées puis purifiées avant administration pour limiter tout risque de contamination (20).

L'enjeu de cette technique est de choisir un peptide unique contenant des épitopes partagés entre les différents virus ou bactérie de la même famille. Ce faisant la réponse immunitaire s'effectue contre plusieurs sérotypes sans pour autant multiplier les antigènes contenus dans le vaccin. Bien qu'aucun vaccin recombinant commercialisé actuellement en France ne permette d'induire cette immunité, plusieurs recherches tendent à développer cette protection (21) voir de façon intéressante une immunité croisée avec d'autres microorganismes (22).

Ce postulat a été l'axe guidant les recherches contre le papillomavirus humain et l'arrivée sur le marché Européen en 2006 du GARDASIL®. Les peptides alors sélectionnés provenaient des sérotypes 6, 11, 16 et 18 à risque de haut grade pour les cancers du col de l'utérus. Malheureusement la protection de classe escomptée fut surestimée et la formulation incrémentée des protéines 31, 33, 45, 52, 58 en 2017 pour contrecarrer cette complication. Cet exemple est à nuancer car comparativement aux vaccins dirigés contre l'hépatite B dont la construction est rigoureusement celle expliquée ci-dessus, le GARDASIL® forme une classe à part entière : les VLP (23). Ces particules formées de protéines immunogènes ont la capacité de s'auto-assembler en structures ressemblant à des virus (24), renforçant la capacité de présentation aux cellules présentatrices d'antigènes ; propriété qui sera mise à profit dans la vaccination assistée par nanoparticules.

### c) Les vaccins polyosidiques

Les vaccins polyosidiques sont formés des sucres présents dans les capsules bactériennes pour contrecarrer la protection octroyée au microorganisme. Ces constituants sont très bien supportés lors de l'administration en raison de leur grande innocuité. Leur stabilité facilite la purification et une réponse immunitaire est obtenue après une seule injection sous-cutanée ou intramusculaire. Et pour cause, la virulence de *Streptococcus pneumoniae* et *Neisseria meningitidis* est fortement liée à la nature polyosidique de la capsule bactérienne.

Néanmoins, ces microorganismes mettent à profit l'immaturation du système immunitaire des mammifères durant les premiers mois de vie en provoquant une réponse thymo indépendante. Les antigènes ne peuvent alors se fixer sur les récepteurs des lymphocytes B matures entraînant uniquement la synthèse d'Ig M et l'absence de coopération entre les lymphocytes B et T interdisant toute élaboration de mémoire vis-à-vis du pathogène. Pour exemple, le PNEUMO 23® (vaccin polyosidique contenant 23 sérotypes de pneumocoque) ne permettait pas d'engager une réponse persistante (25).

De façon à contrecarrer cet obstacle, les chercheurs ont alors couplé par liaisons covalentes ces antigènes polyosidiques avec des protéines porteuses (26). A savoir qu'avant l'âge de 18-24 mois, seuls les antigènes protéiques sont capables de stimuler les lymphocytes T et d'entraîner la coopération entre les sous populations lymphocytaires nécessaire à la création d'une mémoire. La formation de cette liaison transforme ce polysaccharide en un peptide immunogène rendant ces vaccins aussi efficaces chez les nourrissons que chez les adultes. D'où le schéma vaccinal particulier chez les très jeunes enfants dans notre pays débutant par le vaccin conjugué PREVENAR® contenant 13 valences de pneumocoques durant les 2 premières années de vie suivi d'une injection de PNEUMOVAX®.

## 2. Les vaccins à acides nucléiques

L'évolution des technologies vaccinales discutée préalablement nous a octroyé un arsenal préventif conséquent contre bon nombre de micro-organismes. Néanmoins, une stagnation de la couverture vaccinale et la survenue croissante de controverses anti-vaccination grandement relayées par les médias obligent les organismes de santé nationaux à faire face à une perte de confiance grandissante envers cet acte de soin (27). Selon l'OMS, une meilleure couverture vaccinale mondiale entrainerait une réduction de 1,5 millions de décès annuels.

L'apparition d'effets indésirables locaux (douleur, inflammation, cicatrice persistante) ou systémiques (hyperthermie, fatigue, courbatures, manifestations allergiques de gravité variable) (28,29) sont fréquemment relatés par les associations de patients et restent les principaux arguments opposés à la vaccination (30,31). En tête de liste de ces critiques, les adjuvants, qui selon leurs détracteurs, seraient à l'origine de ces maux. Toutefois, ces constituants sont inextricablement liés à

l'efficacité des vaccins sous unitaires et ne peuvent être supprimés de ces médicaments.

Pour contrecarrer cet argumentaire et s'affranchir des adjuvants, deux nouvelles plateformes ont été imaginées depuis une trentaine d'années : les vecteurs viraux et les vaccins à acides nucléiques.

Développée et testée principalement en Afrique Subsaharienne pour combattre le virus Ebola jusqu'en 2020 (32), cette technique n'était alors que peu répandue à travers le globe. Toutefois, la pandémie de Covid-19 a largement démontré l'utilité de ces vaccins de dernière génération. Des études cliniques (33–35) furent menées rendant possible la commercialisation de ceux-ci une année après le début de l'épidémie.

### 1. Vecteurs viraux

En mimant le mode d'infection virale qui utilise les organites de la cellule hôte infectée pour se multiplier et accroître ainsi sa virulence, les chercheurs ont développé les vecteurs viraux de taille et de composition semblables aux virus, les virosomes.

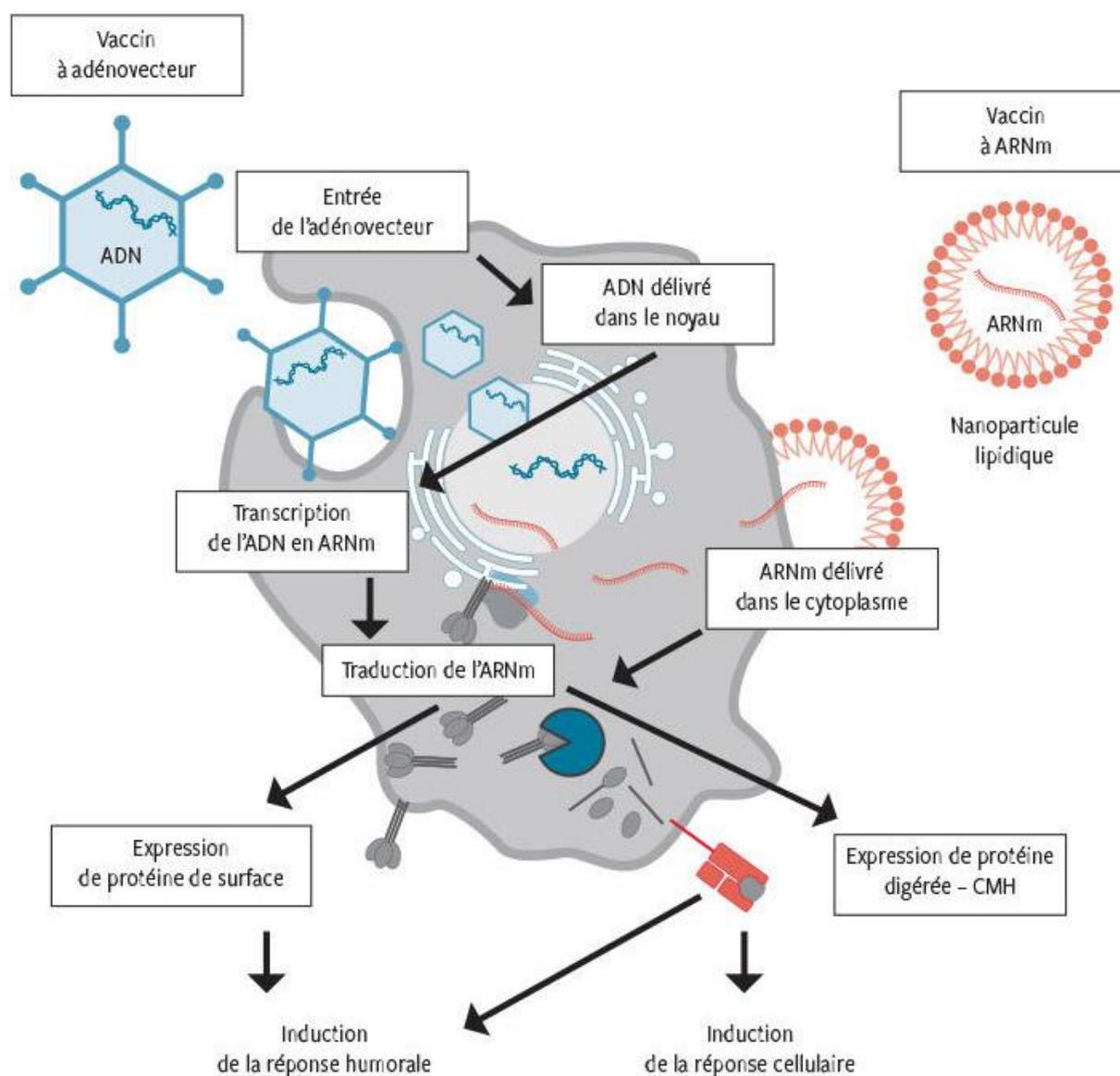
Des acides nucléiques codant pour les protéines immunogènes sont insérés dans leurs génomes en remplacement des gènes responsables de la pathogénicité du virus. Ce faisant, le virus devient incompetent pour se répliquer dans l'organisme de la personne infectée mais reste capable d'infecter nos cellules et d'y délivrer son contenu. Les acides nucléiques infiltrés sont alors traduits par les ribosomes exprimant de ce fait l'épitope souhaité. Pris en charge par la machinerie cellulaire, ces antigènes sont présentés via les CMH des cellules hôtes initiant la réponse vaccinale (**Figure 2**) (36).

De nombreuses espèces telles que les Cytomégalovirus, Herpesvirus et Rétrovirus ont été testées pour former des virosomes mais la technologie rencontrant le plus fort succès reste sans conteste les dérivés des Adénovirus. Pour exemple, le vaccin VAXZEVRIA® à l'encontre du SARS-CoV-2 d'Astra Zeneca ou celui de Johnson&Johnson détournent des adénovirus.

Les Adénovirus sont des microorganismes infectant diverses cellules (épithéliales, endothéliales, myocytes), sans tropisme particulier. Présentés initialement comme outil de thérapie génique en 1992 afin de traiter le déficit en  $\alpha$ 1-antitrypsine (37) et la cystique fibrosante (38), leurs propriétés leur permettaient de délivrer efficacement le matériel génétique dans la cellule déficiente. Cependant, les protéines virales au sein de son enveloppe peuvent promouvoir une réponse immunitaire à son encontre, ce qui diminue sa performance lors de l'usage chronique de tels médicaments (39).

Bien que cette problématique soit limitante dans cette indication, la capacité adjuvante de cette particule reste un atout dans le domaine de la vaccination (40). Contrairement aux vaccins vivants atténués ou sous unitaires, cette propriété intrinsèque aux virosomes ne nécessite pas l'ajout d'autres composés simplifiant la synthèse du médicament.

Pour finir, à l'image des vaccins à ARN, la polyvalence des virosomes, la rapidité de conception et de production à large échelle en font des armes très utiles contre l'émergence de nouveaux pathogènes comme Ebola (41).



**Figure 2.** Modes d'action des vecteurs viraux et des vaccins à ARN (42).

## 2. Vaccins à ARN

### a) L'ARNm pour concevoir une protéine immunogène

Cette catégorie de vaccin possède un mode d'action similaire aux vecteurs viraux afin de produire transitoirement une protéine immunogène par les cellules de l'hôte vacciné (**Figure 2**). Les principaux avantages sont d'être facilement adaptés aux

pathogènes ciblés et très rapides à produire. En effet, l'absence de culture de germes potentiellement dangereux n'implique pas d'étapes de purification longues et coûteuses. De plus, la conception de l'ARN véhiculé est précise au codon prêt permettant de moduler la protéine antigénique finale en la rendant potentiellement plus immunogène que la native. Ils sont non infectieux, non intégratifs et sont dégradés rapidement par les cellules immunitaires diminuant ainsi l'occurrence des effets indésirables sur le long terme.

Cependant, cette technologie n'est pas parfaite car étant thermo sensible, elle obligeait initialement les opérateurs à conserver les doses vaccinales à -80°C sur toutes les chaînes logistiques. Grâce aux tests de dégradations forcées, cette contrainte fut ramenée à 4°C, facilitant le stockage pour une durée limitée au sein des établissements de santé.

Par ailleurs, un système de délivrance est nécessaire à la fois pour protéger le matériel génétique jusqu'au site d'intérêt mais aussi pour pénétrer la membrane plasmique des cellules.

### *b) Les nanoparticules lipidiques comme principal vecteur d'ARNm*

De nombreux vecteurs lipidiques ont été testés (43) et les liposomes (nanoparticules lipidiques composées d'au moins une bicouche de phospholipides) cationiques sont à ce jour la meilleure alternative existante. Ces nanoparticules ont une capacité d'association élevée due aux forces électrostatiques mises en jeu entre la bicouche lipidique cationique et l'acide nucléique négatif (44). Solution intéressante, les liposomes peuvent encapsuler différents ARNm provoquant une réponse contre plusieurs sérotypes en une seule injection (45).

Etant plus efficaces sous forme vectorisée (46), les industriels ont associé ces ARNm avec ces nanoparticules lipidiques d'environ 100 nm afin de les stabiliser leur conférant ainsi les caractéristiques des VLDL (lipoprotéines de très faibles densités), ce qui facilite leur endocytose par les cellules équipées d'un récepteur scavenger (macrophages, cellules épithéliales, fibroblastes).

L'intérêt premier de ce vecteur reste les potentielles modulations de sa structure composée classiquement de cholestérol et des phospholipides. Pour exemple, le vaccin à ARNm dirigé contre le SARS-CoV-2 commercialisé par Pfizer contient des nanoparticules de 40 nm composées de cholestérol, saponine et phospholipides (46).

En modifiant ces paramètres ou en greffant des ligands protéiques ou polysaccharidiques, il est possible de conférer au liposome des propriétés de ciblage passives accroissant l'endocytose. Ainsi, en choisissant des phospholipides cationiques, les interactions avec les membranes anioniques des cellules sont décuplées facilitant la délivrance d'ARN (47). De plus, le profil de tolérance s'améliore et une diminution des effets indésirables est observée lorsque l'on recourt à ces phospholipides biodégradables. Ceux-ci permettent une clairance rapide (48), ce qui induit une inflammation transitoire au site d'injection.

Administrées en intramusculaire, les nanoparticules sont rapidement endocytées par les myocytes et les cellules immunitaires présentes au site d'injection. Le rôle des myocytes n'est que peu décrit dans la littérature et semble mineur puisque ces derniers n'expriment pas le CMH II comparativement aux CPAg infiltrées ou circulantes à travers la dense vascularisation musculaire (49,50). Les ARN peuvent alors soit être traduits en protéines dans le cytoplasme puis pris en charge par les CMH pour provoquer une réponse cellulaire ou humorale, soit être considérés comme des PAMPs (51) qui, libérés dans les endosomes et le cytosol, interagiront avec les récepteurs de l'immunité innée, ce qui induira un profil TH1 provoquant la maturation des CPAg nécessaire à l'obtention de réponses T et B efficaces.

Ces formulations sont non seulement intéressantes pour envisager des vaccinations prophylactiques avec des performances similaires aux vecteurs viraux utilisés chez le rongeur (52), mais elles peuvent être remarquables dans d'autres domaines : en oncologie, deux formulations vaccinales ont été développées par BioNTech et sont actuellement en essais cliniques dans le traitement du mélanome (53) et du cancer du sein (54).

### 3. L'apport des adjuvants

Comme décrit dans le paragraphe précédent, l'évolution de la technologie vaccinale atténua progressivement la virulence de l'antigène pour ne cultiver *in fine* qu'un fragment du pathogène s'accompagnant parallèlement d'une décroissance de l'immunogénicité. Pour contrecarrer cela, l'antigène est accompagné d'adjuvants permettant d'amplifier la réponse mémoire (55) y compris chez les sujets âgés et immunodéprimés leur octroyant une défense inatteignable sans ce principe actif.

Cette notion est apparue lors des découvertes du vaccin diphtérique. L'anatoxine n'était alors pas reconnue par l'organisme du patient ; or, lorsque celle-ci est accompagnée de substances pro-inflammatoires, les titres d'anticorps enregistrés étaient beaucoup plus élevés. Depuis, de nombreuses études ont été menées et l'arsenal des adjuvants s'est étoffé. Ils répondent cependant à une définition commune qui pourrait être celle-ci : substance inerte, non immunogène mais immunostimulante capable d'accroître la réponse immunitaire vis-à-vis de l'antigène injecté conjointement *in situ*. Par son action, il permet de diminuer la quantité d'antigène administrée au patient et de réduire la fréquence des rappels.

Plus précisément, les adjuvants sont des particules provoquant une réponse inflammatoire locale accompagnée d'une formation de granulome au site d'inoculation. Cette organisation augmente l'immunogénicité du principe actif qui par la même favorise la phagocytose et son apprêtement par les CPAg. L'adjuvant permet de plus un retard d'élimination de l'antigène qui stagne alors dans les organes lymphoïdes secondaires. Pour finir, l'activation des molécules de co-stimulation dans la synapse immunologique et la sécrétion de cytokines par les cellules de l'immunité innée secondaire au contact avec l'adjuvant renforcent la coopération entre les populations lymphocytaires.

En outre, les adjuvants ont aussi un rôle d'épargne dans la production vaccinale car en réduisant la quantité d'antigènes par dose, le nombre de médicaments disponibles se voit augmenter, ce qui accroît la proportion d'individus vaccinés. Bien que cet avantage soit économique, il permet aussi d'assurer un approvisionnement suffisant des collectivités à l'échelle mondiale. Pari intenable si l'apport des adjuvants était négligé.

Des sels minéraux, aux polymères en passant par des formulations lipidiques, de nombreux composés ont été testés et ont été classés en deux catégories (56).

Les « immunostimulants » comme les dérivés de cytokines activent directement le système immunitaire inné alors que les composants polysidiques bactériens éveillent l'entièreté du système immunitaire par l'intermédiaire des PRR.

Dans l'autre versant, les « véhicules » sont issus d'une technologie plus moderne et ont été utilisés dans les vaccins contre la Covid-19. Ils n'ont pas d'activité propre sur le système immunitaire mais vectorisent l'antigène, guidant leur internalisation dans les CPAg pour favoriser leur présentation aux CMH.

### 1. Les sels d'aluminium

Les immunostimulants les plus représentés sont les sels d'aluminium découverts en 1926 par Alexander GLENNY lors de ses travaux sur l'anatoxine de *Corynebacterium*. Employés sous forme d'hydroxyde ( $Al(OH)_3$ ) ou de phosphate d'aluminium ( $AlPO_4$ ) depuis presque un siècle sur plusieurs milliards de sujets, leur efficacité et leurs données de sécurité ne sont plus à prouver bien qu'ils soient décriés depuis ces 30 dernières années. Ces sels minéraux sont capables d'absorber à leur surface des protéines ou virus, ce qui en fait un excellent choix pour de nombreux vaccins : Diphtérie, Tétanos, Poliomyélite, Coqueluche, Hépatites A et B, Méningocoques, Papillomavirus, *Haemophilus influenzae* ont été d'excellents candidats à cette combinaison.

Malgré une efficacité flagrante sur l'immunité humorale, démontrant une présentation améliorée par les CPAg *in vitro* (57,58) et une activité accrue de l'inflammasome, leurs mécanismes restent à ce jour encore partiellement inconnus. Les hypothèses retenues sont :

- L'augmentation du temps de résidence de l'antigène grâce à un relargage progressif au sein du granulome formé.
- Le recrutement des cellules immunitaires *in situ* par induction d'un environnement inflammatoire avec sécrétion importante d'IL-1.
- La polarisation des lymphocytes T CD4+ vers un profil TH2.

Grâce à ce processus, l'alun provoque une induction immunitaire déséquilibrée en faveur d'une forte réponse humorale avec une production importante d'anticorps au détriment de l'immunité à médiation cellulaire.

De plus, ces adjuvants ne sont pas exempts de défauts car aucune amélioration n'a été décelée avec les peptides de faible masse moléculaire ainsi que pour la vaccination antigrippale. D'autre part, les sels d'aluminium peuvent conduire à

des manifestations immuno-allergiques de gravité fluctuante entraînées par la production d'Ig E.

## *2. Les sels de calcium*

Entre les années 60 et 80, l'institut Pasteur a initié des recherches sur le phosphate de calcium en alternative aux dérivés aluminiques. Ces tests cessèrent car la réponse immunitaire enregistrée fut trop faible pour espérer une utilisation chez l'Homme. Cependant, devant les nombreuses polémiques récentes, ces expériences reprirent afin d'améliorer le procédé.

L'hypothèse émise serait que la formulation de sels sous forme de nanoparticules permettrait d'accroître son pouvoir immunogène. Cette idée est d'autant plus intéressante que ce constituant est mieux toléré et résorbé que les sels d'aluminium (59).

## *3. Les émulsions lipidiques*

Si le paysage vaccinal est largement marqué par les dérivés de l'aluminium, les émulsions lipidiques plus récentes sont aussi fréquemment exploitées. Historiquement, l'adjuvant complet de Jules FREUND est le premier à voir le jour. Non administrable chez l'Homme à cause de sa toxicité importante, cette substance pose toutefois les bases des adjuvants « huile dans l'eau » qui seront imaginés par la suite. Lors du contact d'un lipide avec une surface, les têtes polaires du composé vont s'assembler spontanément sous la forme de micelles créant ainsi une émulsion. Les antigènes présents dans la solution vont alors se diriger dans les poches hydrophobes se liant aux micelles, limitant le catabolisme de ces premiers.

Les dérivés du squalène tels que le MF59 sont des exemples parfaits et les plus connus de cette catégorie. Stabilisées par le duo Span 85 (trioléate de sorbitan) et Tween 80 (polysorbate 80), ces particules de 160 nm sont actuellement introduites dans le vaccin de la grippe saisonnière FLUAD TETRA®. Caractérisé par une importante réponse TH1, il est néanmoins bien supérieur à l'alun dans cette vaccination : le MF59 produit 2 à 5 fois plus d'anticorps (60) et cela même chez les populations âgées (61) et les jeunes enfants (62) tout en octroyant une protection plus durable.

Plus récemment, le système adjuvant 04 (AS04) a été commercialisé par GlaxoSmithKline combiné dans leur vaccin anti HPV (CERVARIX®). Ce produit est une association de sels d'aluminium et d'un agoniste au TLR4, le lipide A monophosphorylé, boostant de façon synergique la réponse de l'alun. Cet agoniste prolonge la durée de relargage des cytokines au site d'injection par une action agoniste sur la protéine NFκB (63). Les réponses immunitaires de MF59 et AS04 ne semblent toutefois pas différentes à distance de la vaccination.

#### 4. Les oligodésoxynucléotides

Les oligodésoxynucléotides sont la dernière classe d'adjuvants autorisés en France construits comme de courtes chaînes d'acides nucléiques majoritairement élaborées à partir de motifs répétés riches en guanine. Extrêmement conservés dans l'évolution, ces segments répétitifs rencontrés dans les bactéries sont des agonistes du TLR 9.

La stimulation de ce récepteur exprimé sur de nombreuses cellules (monocytes, macrophages, PNN, lymphocytes, DC, lymphocytes NK) provoque une réponse à la fois innée et adaptative. Plus précisément, l'action de ces molécules induit la surexpression de molécules de co-stimulation (CMH de classe II, CD80, CD86) (64), augmente la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL6) et d'IFN de type I par les DC (65). Secondairement, les lymphocytes touchés prolifèrent et se différencient à la fois en cellules plasmocytaires et en lymphocytes B mémoires (66).

La crainte des chercheurs lors des premières administrations chez l'Homme fut le risque de survenue de choc toxique déploré lors d'une administration répétée de lipopolysaccharides induisant la sécrétion de TNF $\alpha$ . Par analogie de mécanisme ces signes cliniques ont été observés dans les études murines lors d'une injection concomitante de CPG avec le LPS (67) mais non retrouvés lorsque le CPG est administré seul à la concentration vaccinale de l'ENGERIX® (68). Ces données ont ensuite été confirmées par les essais cliniques (69).

**Tableau I.** Liste des différents types de vaccins.

Types de vaccins		Avantages	Inconvénients	Exemple de Maladies ou pathogènes
Vivants atténués	Immunogénicité importante		Contre-indications aux immunodéprimés Non applicables à tous les pathogènes Réversion possible Possibles effets immuno allergiques	Rougeole / Oreillons / Rubéole Varicelle / Zona Fièvre Jaune Rotavirus / BCG
Vivants inactivés	Recours possible chez les immunodéprimés Diminution des effets indésirables		Réponse immunitaire plus faible que les vivants atténués Adjonction d'un adjuvant Administration de rappels récurrents	Hépatite A Rage / Choléra Encéphalite à tiques Encéphalite Japonaise Grippe / Leptospirose Poliomyélite
Anatoxines	Reconnaissance des toxines bactériennes			Diphtérie / Tétanos Coqueluche <i>Haemophilus influenzae</i>
Protéiques / Polyosidiques	Bonne tolérance lors de l'injection Protection contre plusieurs sérotypes Protection des jeunes enfants possible		Réponse immunitaire plus faible que les vivants atténués Adjonction d'un adjuvant Polyosides seuls non utilisables chez les enfants	Hépatite B <b>Pneumocoque</b> <b>Méningocoque</b> <i>Salmonella typhi</i> HPV
Vecteurs viraux	Immunogénicité intrinsèque Absence d'adjuvant		Production plus lente que les acides nucléiques	Ebola SARS-CoV2
Acides Nucléiques	Absence d'adjuvant Adaptables aux pathogènes émergents Production rapide de masse		Nécessité d'une encapsulation Conservation complexe Administration de rappels récurrents	SARS-CoV2

Rouge : existence d'un vaccin conjugué

## II. L'essor des nanotechnologies vaccinales

Bien que les premiers médicaments sous forme de nanoparticules telles que nous allons le définir ci-dessous ne fussent commercialisés qu'à la fin des années 80 en grande partie dû à des limitations techniques, la diversité des applications et les nombreuses possibilités sont telles que maintes recherches fondamentales sont menées dans ce secteur.

Qu'ils s'agissent de la modification des paramètres pharmacocinétiques ayant guidé le développement de l'Aprépitant (EMEND®) ou du Sirolimus (RAPAMUNE®) ou encore la recherche d'une délivrance sélective à un tissu voire une population cellulaire particulière, la nanotechnologie intéresse bon nombre d'industriels. Toutefois, avant l'arrivée du SARS-CoV2, aucun médicament commercialisé sous forme nanoparticulaire n'appartenait à la classe des vaccins.

Depuis cet événement, les recherches sur les vaccins à acides nucléiques se sont intensifiées et propulsent la vectorisation sur le devant de la scène internationale.

L'un des exemples les plus prometteurs porte sur 6 essais vaccinaux à l'encontre du virus Zika (70) pour lequel aucun médicament n'est actuellement commercialisé. Dans ces expériences, différents acides nucléiques codant pour des protéines « prM-E » responsables des fusions de membranes nécessaires à l'endocytose et à l'excrétion des nouvelles particules produites par les cellules infectées. La fragilité de ce matériel génétique oblige à nouveau le recours aux liposomes pour introduire le génome dans les cellules de l'immunité.

### 1. Définition

La première définition de la nanotechnologie formulée fut relativement simple : « Science qui étudie les matériaux à l'échelle du nanomètre ». Néanmoins, classifier les nanoparticules n'est pas aisé et l'on peut tenter de les organiser selon leur taille, forme, composition ou origine puis en intégrant leurs caractéristiques physico-chimiques.

Plusieurs définitions ont par conséquent été éditées selon les organismes officiels (**Tableau II**) avec plus ou moins de précision. De plus, il est important de considérer que l'objet d'étude est à mi-chemin entre les objets du quotidien soumis aux lois de la mécanique classique et les atomes soumis à la mécanique quantique complexifiant fortement la compréhension des phénomènes rapportés.

Pour illustrer cette difficulté, prenons pour exemple les nanotubes de carbone composés de graphène replié sur lui-même dont le diamètre varie entre 0,4 et 100 nm. Bien que ce matériau soit 6 fois plus léger que l'acier, il est 100 fois plus résistant que ce dernier (71). De même, les nanoparticules d'or de plus de 20 nm de diamètre ont une température de fusion 2 fois supérieure à celle de 5 nm (72).

Ce changement de propriétés est dû en partie à l'augmentation du rapport surface / volume total observé lors de l'amoindrissement de la taille (**Tableau III** et

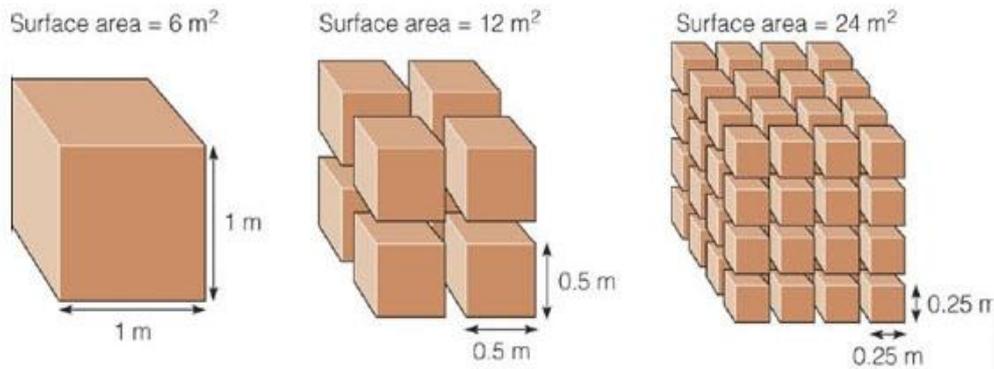
**Figure 3).** En prenant pour exemple un cube d'1 cm de côté ayant donc un volume d'1 cm<sup>3</sup> et une surface de 6 cm<sup>2</sup>, on obtient une surface 10<sup>7</sup> fois plus importante pour 10<sup>21</sup> cubes de 1 nm de côté représentant toujours un volume identique. Cela augmente indéniablement l'activité de surface et donc l'impact sur les cellules rencontrées dans le cadre médical.

**Tableau II.** Définitions des Nanoparticules.

<b>Normes</b>	<b>Définitions</b>
<b>ISO</b> (International Organisation for Standardisation)	Une particule de taille de 1 à 100nm en diamètre
<b>ASTM</b> (American Society of Testing and Materials)	Une particule ultrafine dont la longueur à 2 ou 3 endroits est de 1 à 100nm
<b>NIOSH</b> (National Institute of Occupational Safety and Health)	Une particule de diamètre entre 1 et 100nm, ou une fibre de taille entre 1 à 100nm
<b>SCCP</b> (Scientific Committee On Consumer Products)	Au moins une dimension est de l'ordre du nanomètre
<b>BAuA</b> (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin)	Toutes les dimensions ou diamètres sont de l'ordre du nanomètre

**Tableau III.** Comparaison des surfaces selon la taille des particules examinées.

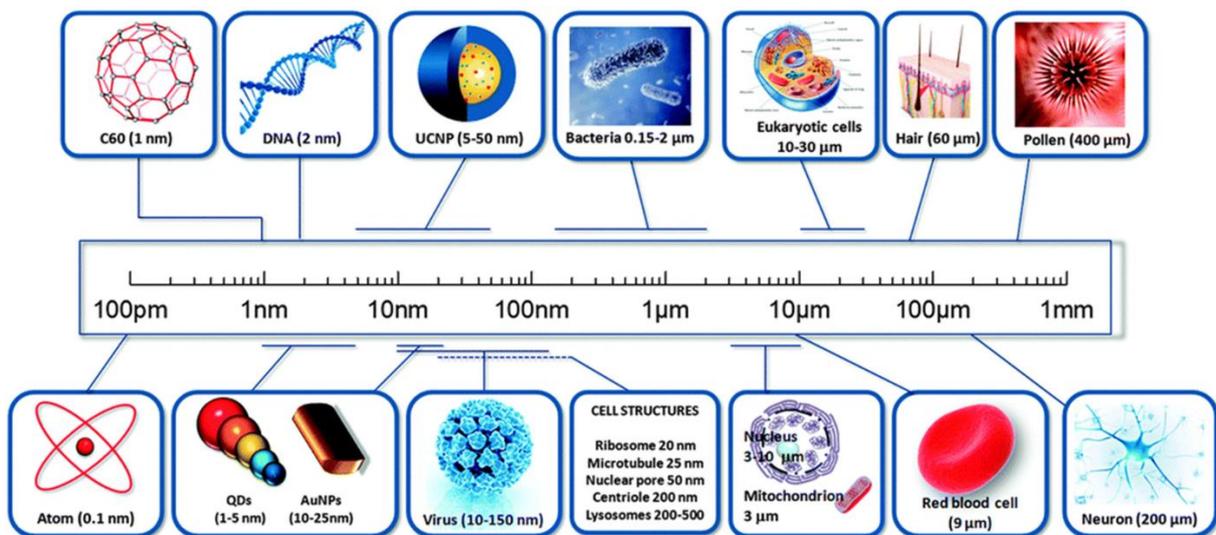
<b>Taille</b>	<b>Nombre</b>	<b>Aire Totale</b>
1 cm	1	6 cm <sup>2</sup>
1 mm	1 000	60 cm <sup>2</sup>
1 µm	10 <sup>12</sup>	6 000 cm <sup>2</sup>
1 nm	10 <sup>21</sup>	6 .10 <sup>7</sup> cm <sup>2</sup>



**Figure 3.** Corrélation entre taille des particules et surface totale (73).

Cette propriété certes fortement mise à profit lors de la délivrance de principes actifs conventionnels présente aussi un intérêt lors de la vaccination. En effet, l'injection de la dose usuelle de COMINARTY® contient à elle seule un nombre extrêmement important de liposomes, ce qui permet à ces particules d'être endocytées par de nombreuses cellules présentes au niveau musculaire. Ces liposomes toucheront certes majoritairement les myocytes mais de nombreuses cellules dendritiques, lymphocytes NK et monocytes infiltrés dans ces territoires pourront également être touchés par ces nanoparticules.

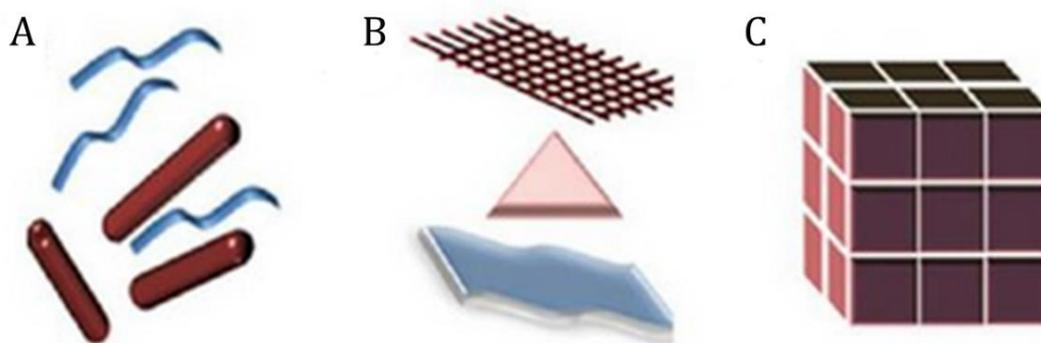
De plus, il est possible d'imaginer dans le futur, un potentiel ciblage des organites cellulaires impliqués dans la présentation antigénique. En effet, ces vecteurs pris isolément possèdent une taille subcellulaire (74) (**Figure 4**) leur octroyant cette possibilité. Sous couvert de données de sécurité, il pourrait être envisagé une pénétration de ces particules à travers les jonctions serrées des épithéliums et de la lame basale dans le but d'atteindre des tissus plus profonds voire même directement les ganglions périphériques, sièges de la mémoire immunitaire.



**Figure 4.** Echelle de taille des structures biologiques et des nanoparticules (75).

En complément des études de tailles des particules, il est important de considérer d'autres paramètres : l'hydrophobicité et la charge électrique de surface aussi appelée potentiel zêta, qui définissent les propriétés d'interactions des nanoparticules avec les surfaces rencontrées. Une attention particulière sera portée lors de la conception des nanoparticules en biologie car les membranes cellulaires sont majoritairement composées de phospholipides et de protéines transmembranaires anioniques sur leur versant extracellulaire. Il est donc logique de constater une adhésion plus importante des nanoparticules cationiques aux cellules (76).

La configuration tri dimensionnelle de l'objet peut aussi agir sur ces propriétés. Classiquement, les nanoparticules sont visibles en 3 dimensions de formes plus ou moins aléatoires, les plaques sont observables en 2 dimensions alors que les nano fibres n'ont qu'une seule dimension considérée (**Figure 5**). De plus, l'observation sous forme unitaire alors appelée « primaire » ou d'agglomérats « secondaires » modifient les caractéristiques physicochimiques des nano objets.

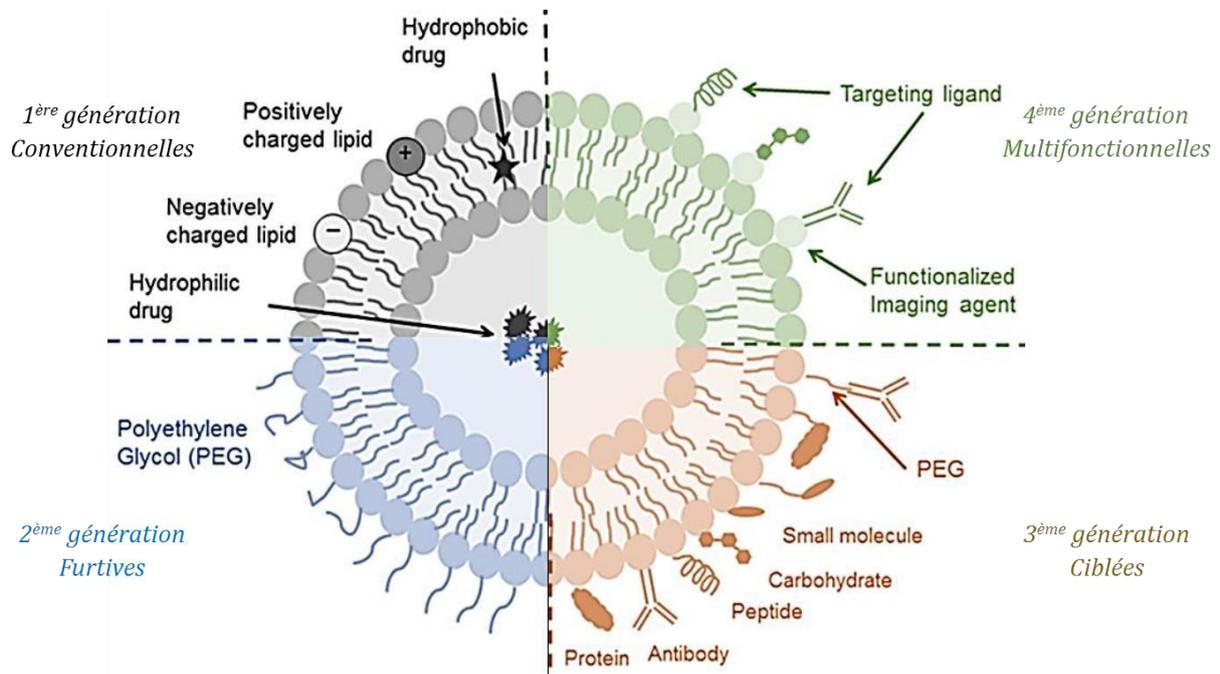


**Figure 5.** Classification des nano objets selon leurs dimensions. Fibres à 1 dimension (A), Plaques en 2 dimensions (B) et Particules en 3 dimensions (C).

Enfin, il est important de considérer dans ce classement les matériaux composant ces nanoparticules car ceux-ci influenceront grandement les attributs de chaque nanoparticule. Dans le domaine vaccinal, les nanoparticules à l'étude ou commercialisées font partie des catégories suivantes : lipidiques, virales et polymériques.

## 2. La classification des nanoparticules par voie intraveineuse

La notion de sélectivité pour un tissu voire une cellule particulière est souvent abordée dans la littérature relative aux nanoparticules, on parle alors de ciblage. Communément classées en 4 générations, le design des nanoparticules des plus simples aux plus complexes permet de fonctionnaliser ces vecteurs et d'optimiser la délivrance de principe actif au site souhaité (**Figure 6**).



**Figure 6.** Générations de nanoparticules (77).

### 1. Les NPs conventionnelles

La première génération de nanoparticules, dites « conventionnelles », procède à un ciblage passif. La taille, la charge de surface et la forme sont prévues dès la conception de celles-ci et vont influencer sur leurs comportements.

Néanmoins, la demi-vie de ces nanoparticules lors du passage dans le compartiment plasmatique soit après administration parentérale, soit par passage à travers les muqueuses est très courte. Formant rapidement des agrégats puis reconnues par le système immunitaire après opsonisation (78), celles-ci sont éliminées en quelques heures.

### 2. Les NPs furtives

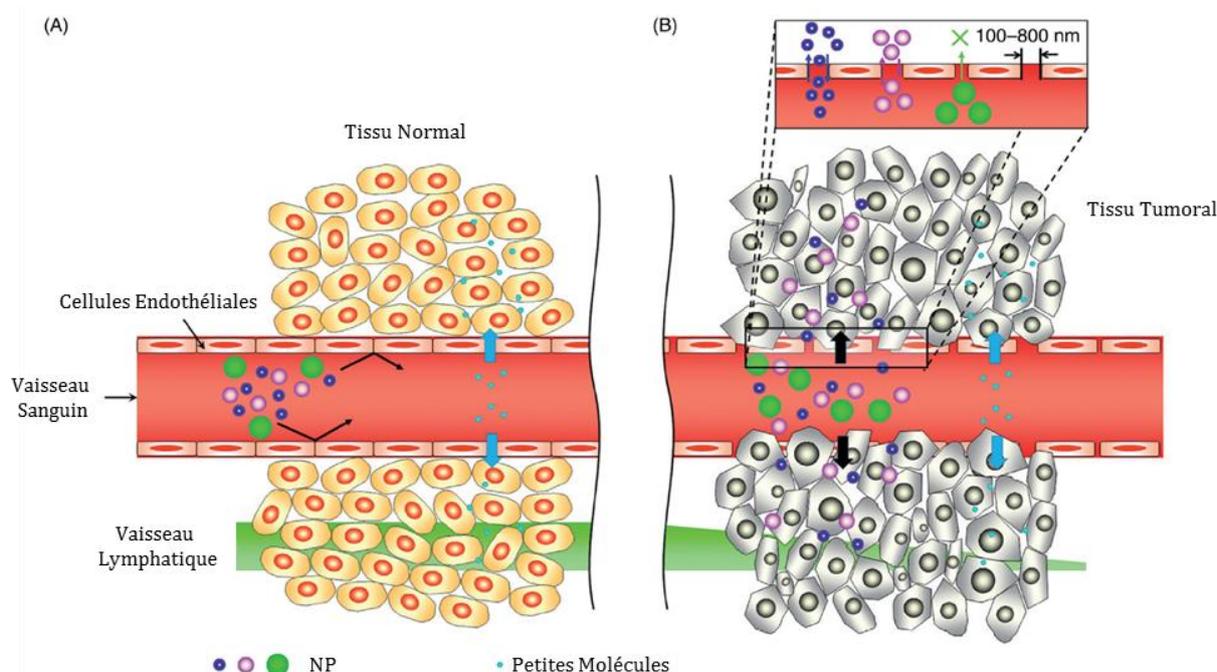
Ayant pour but d'outrepasser cette reconnaissance par le système immunitaire, l'évolution de conception aboutit aux nanoparticules de seconde génération dites « furtives ».

Dans un premier temps, les paramètres précédemment cités furent scrupuleusement ajustés : pour exemple, une nanoparticule inférieure à 100nm permet de traverser les jonctions communicantes de l'endothélium vasculaire des cellules tumorales. En effet, la taille de ces jonctions variant de 100 à 800nm leur octroie cette capacité tout en limitant leur capture par les macrophages hépatiques.

Puis, l'ajout de polymères hydrophiles par greffage à la surface des nanoparticules tels que le polyéthylène glycol permet de limiter les phénomènes d'opsonisation (79) et de clairance par le système immunitaire (80). En conséquence, cette furtivité allongea la demi-vie plasmatique des médicaments vectorisés permettant même un effet rémanent bien longtemps après son administration.

De plus, ce design fut mis à profit pour atteindre des zones biologiques habituellement inatteignables devenant accessibles suite à un remodelage pathologique. C'est le cas lors d'une inflammation locale exacerbée conduisant à une modification tissulaire ou lors de la survenue d'un processus tumoral modifiant par induction de l'angiogenèse le microenvironnement de cet espace. Ce phénomène appelé « Effet de Perméabilité et de Rétention renforcées » (EPR) augmente la perméabilité vasculaire des régions touchées et permet l'accumulation de nanoparticules dans les tissus malades (**Figure 7**) (81).

Malgré de nombreuses recherches menées sur cet effet durant ces dernières années, la délivrance de principe actif grâce à l'effet EPR n'est pas encore totalement élucidée. Voilà pourquoi certains articles ont récemment émis l'hypothèse que les mécanismes mis en jeu lors de cette délivrance au sein des tumeurs ne pouvaient s'affranchir de phénomènes actifs et ce indépendamment de la perméabilité endothéliale (82).



**Figure 7.** Effet de perméabilité et de rétention renforcées (83).

Cette accumulation au sein des tumeurs est aussi visible avec des nanoparticules construites à partir de matériaux sensibles au pH. Les cellules cancéreuses ont en effet une croissance anarchique rapide nécessitant d'importants apports nutritifs. Pour se diviser, elles pratiquent une glycolyse inépuisable générant un environnement plus acide que le milieu physiologique. Ainsi, en utilisant des nano sphères stables en pH neutre mais se dégradant au contact d'un milieu acide, on procéderait à une délivrance uniquement près de la tumeur.

### 3. Les NPs ciblées

Toutefois, cette vectorisation passive n'est pas des plus efficaces et les nanomédicaments ne touchent bien souvent que la périphérie de la tumeur limitant leur efficacité. C'est pourquoi le greffage en surface de différentes molécules pouvant reconnaître spécifiquement un récepteur ou un antigène a été tenté afin d'obtenir des nanoparticules de troisième génération « ciblées » permettant une délivrance contrôlée du principe actif.

Développées initialement pour l'oncologie en greffant des anticorps dirigés contre des récepteurs à l'EGF ou à la transferrine surexprimés dans de nombreuses tumeurs (84) ; cette technologie est aussi envisagée pour cibler les tissus sains à l'aide de fragments Fc reconnaissant les entérocytes. Ce faisant, le passage entéral des médicaments habituellement hydrolysés dans le tube digestif sera facilité. Cette alternative permettrait à terme d'envisager le remplacement de certaines administrations parentérales par du *per os* moins contraignant pour le patient.

Ces applications pourraient être aussi mises à profit dans le domaine vaccinal dans le but de renforcer la réponse induite. Il faudrait alors conjuguer la furtivité du polyéthylène glycol permettant aux nanoparticules d'atteindre la circulation lymphatique avec les agonistes naturels aux TLR (le LPS pour le TLR 4 (85), la flagelline pour le TLR 5 (86)) ou clusters de différenciation mis en jeu dans la genèse d'une mémoire immunitaire .

Grâce à ces modifications, le temps de résidence de ces nanoparticules autour de ces cellules est augmenté et l'on dépose ainsi spécifiquement leur fraction antigénique au cœur même des cellules initiateuses de l'immunité adaptative.

Pour parfaire cet effet, une action immunomodulatrice est aussi envisageable en sélectionnant certains lipides (79). Lors du contact avec les CPAg, les nanoparticules sont endocytées, dégradées dans les endosomes acides, puis le peptide cible est classiquement associé au complexe majeur d'histocompatibilité de type II pour être présenté aux lymphocytes T puis induire la réponse B mémoire. Suivant ce concept, l'EPAXAL (virus de l'hépatite A inactivé par la formaline) a été accepté par la FDA et présente 90% de séroprotection 2 semaines après une injection (80).

### 4. Les NPs multifonctionnelles

Pour finir, les nanoparticules « multifonctionnelles » sont la finalité de cette technologie. En couplant les nanoparticules avec des agents de ciblage, il serait alors possible que ces vecteurs s'accumulent dans des organes altérés tout en épargnant les cellules saines. La seconde étape serait alors d'adjoindre à la fois une fraction visualisable en imagerie (radioactivité, agent de contraste) afin de suivre l'action de ces nanoparticules et un principe actif qui serait alors spécifiquement délivré aux cellules endocytant ces nanoparticules.

Ces propriétés sont d'ores et déjà utilisées en radiopharmacie. Citons pour exemple, les examens de scintigraphie osseuse requérant des biphosphonates

marqués au Technétium 99m ou encore la recherche de foyers infectieux utilisant les leucocytes de patients radiomarqués au Gallium 67. Toutefois, ces technologies sont sensibles mais présentent une spécificité variable limitant leur usage uniquement au diagnostic. L'emploi de nanoparticules de 4<sup>ème</sup> génération dans certaines de ces techniques permettrait dans le futur d'accroître les possibilités theranostiques de ces applications (87,88).

Il est donc possible de conférer cette faculté aux nanoparticules en leur greffant à la surface entre autres des protéines CPPS (Cell Penetrating Proteins and Peptides). De natures diverses, certaines sont étudiées depuis de nombreuses années telles que les TAT peptides composés de 11 acides aminés riches en arginine correspondant à un domaine d'une protéine de transduction (89). Il a ainsi été démontré que l'ajout de cette protéine TAT à la surface de liposomes permettait une internalisation de ceux-ci après contact avec la surface cellulaire (90). De façon intéressante, ces nanoparticules s'accumulaient préférentiellement dans des cellules tumorales (91).

L'endocytose étant la principale source d'internalisation des constituants extérieurs à la cellule et les mécanismes mis en jeu dans ce processus étant très variés, il est donc extrêmement difficile de prévoir le comportement qu'adoptera chaque vecteur. De plus, les mécanismes mis en jeu conduisent à des compartiments intracellulaires différents, ce qui augmente d'autant plus la difficulté de compréhension de ces phénomènes.

### 3. Différences de classification des voies alternatives

Il est intéressant de préciser les distinctions entre la classification ci-dessus et les 25 nanomédicaments commercialisés actuellement dans notre pays (92). Parmi eux, seulement onze répondent aux critères de celle-ci dont trois d'entre eux recourant à des formes de seconde génération (AMBISOME®, CAELYX®, ONIVYDE®) et aucune technologie n'est plus aboutie.

Les administrations entérales concernent sept médicaments contenant majoritairement des nanocristaux s'apparentant aux nanoparticules de première génération et utilisés pour s'affranchir en premier lieu des problématiques d'hydrophobicité. Recourir à cette forme modifie aussi les propriétés pharmacocinétiques intrinsèques aux principes actifs et facilite le passage à travers les entérocytes, principale barrière d'absorption de cette voie, pour rejoindre le compartiment plasmatique. L'exemple du Méthylphénidate illustre à lui seul l'avantage des nanocristaux permettant d'espacer l'administration de ce médicament et limite l'impact social d'une mauvaise observance surtout chez les jeunes enfants.

Les sept derniers médicaments sont administrés par voie parentérale soit en intramusculaire, soit en intra-vitréen et quatre d'entre eux sont sous formes pegylée. Bien que l'ajout de polyéthylène glycol soit la principale modification différenciant les nanoparticules conventionnelles des furtives, elle n'a pas le même but que celui décrit

précédemment. En effet, la pegylation prolonge les phases de distributions des principes actifs en séquestrant celui-ci au niveau des fibres musculaires permettant d'espacer fortement les administrations et limitant l'impact du passage à travers le système porte de l'intraveineuse (93). Ainsi, l'injection de Palipéridone toutes les 6 semaines remplace aisément la prise journalière d'antipsychotiques. De plus, cette forme diminue l'impact des autres médicaments interagissant avec les cytochromes P450, principales sources physiologiques d'altération de son métabolisme.

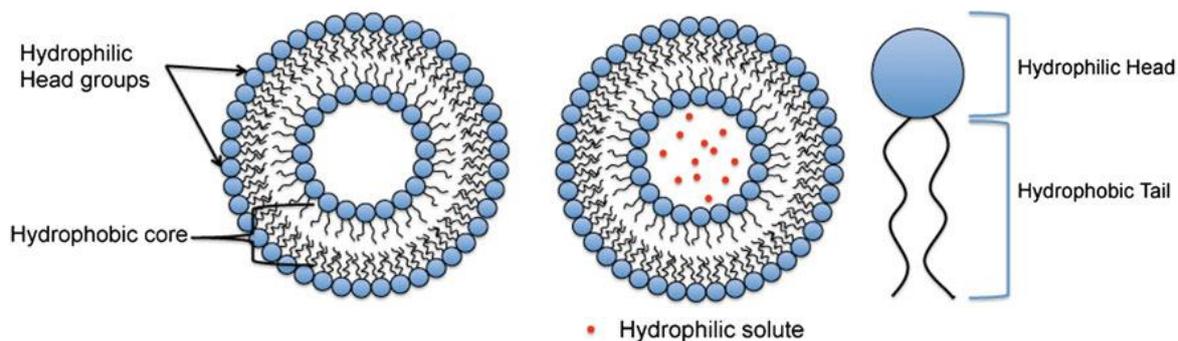
Les vaccins à ARNm actuellement employés contre le SARS-CoV2 recourant à des liposomes sont les derniers médicaments de cette catégorie. Ceux-ci peuvent s'apparenter aux nanoparticules conventionnelles présentées initialement. Pour autant cette classification diverge avec les propriétés souhaitées pour ces vecteurs. En effet, la finalité de cette forme n'est pas ici de provoquer un ciblage mais bien dans un premier temps de protéger l'ARNm. Par la suite, la composition lipidique influencera directement l'efficacité du vaccin puisqu'elle conditionnera son endocytose et l'échappement endosomal (Figure 2) dans les cellules environnantes du site d'administration, puis des chaînes ganglionnaires satellites voire à distance (94). Cette capacité est inextricablement liée à l'ionisation des phospholipides déterminée majoritairement par le pKa (95).

#### 4. Les différents types de nanoparticules en vaccination

Dans cette discipline de la nano médecine, nous avons expliqué principalement que 3 types de particules sont actuellement employés : les particules lipidiques avec comme chefs de file les liposomes, les vecteurs viraux et les particules polymériques.

##### 1. Les liposomes

Lors de ses observations des phospholipides présents dans la lécithine d'œuf, Alec Douglas BANGHAM (96) découvre ces particules en 1965. Ses études décrivent la formation spontanée d'une bicouche lipidique visible uniquement avec les liposomes. Cette caractéristique est due à l'orientation des parties hydrophobes vers l'intérieur des membranes devenant inaccessibles pour l'eau et des têtes polaires vers le solvant (**Figure 8**). Il remarquera par la suite que ces vésicules sont capables d'inclure dans leur compartiment aqueux divers principes actifs.

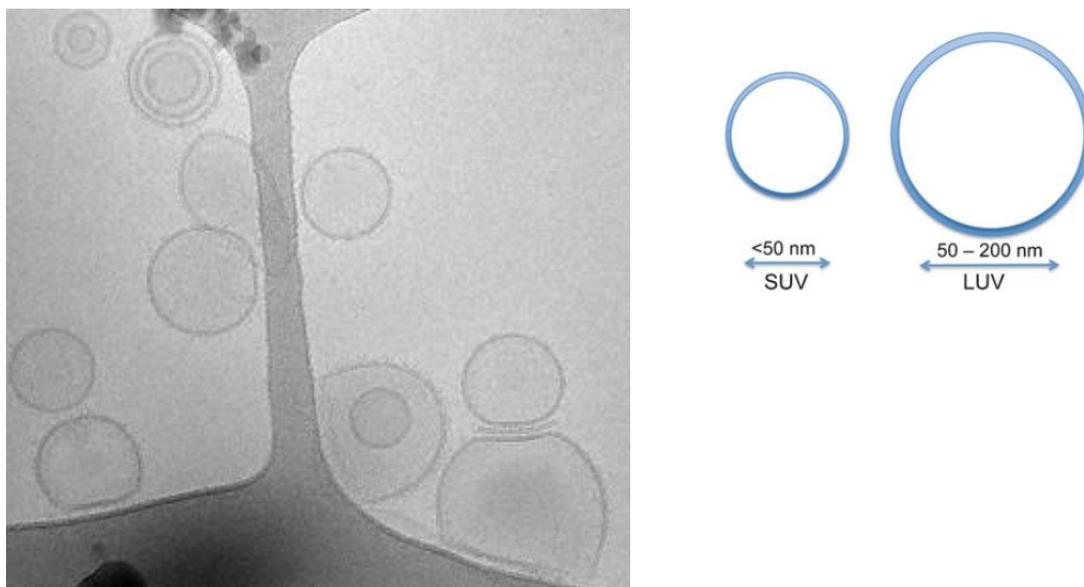


**Figure 8.** Représentation schématique de liposomes (97).

Décrites comme des particules de formes irrégulières (sphériques, tubulaires ou ovoïdes) et de tailles variables allant de **100 nm à 10 µm**, celles-ci diffèrent des micelles (monocouche de phospholipides) de bas poids moléculaire de par la formation d'une vésicule fermée composée d'une bicouche phospholipidique entre 2 compartiments aqueux.

Les différents types de liposomes sont caractérisés par la structure de leurs membranes : une seule bicouche pour les SUV (Small Unilamellar Vesicle) et les LUV (Large Unilamellar Vesicle) ou plusieurs bicouches consécutives soit ordonnées pour les MLV (Multilamellar Vesicle) soit désordonnées avec les MVV (Multivesicular Vesicle) (**Figure 9**).

Cette structure particulière constitue un excellent vecteur médical (98) que le principe actif soit hydrophile ou hydrophobe. En effet, le compartiment aqueux au centre des vésicules ou la bicouche phospholipidique en périphérie rend possible la vectorisation quelles que soient les propriétés chimiques des médicaments.



**Figure 9.** Observation en cryomicroscopie électronique et représentation schématique des différents types de liposomes (97).

Historiquement composés de phospholipide tel que la phosphatidylcholine provenant de l'œuf ou du soja, cette technologie évolua en optimisant au fur et à mesure leur composition. La substitution par des lipides semi-synthétiques utilisés dans le domaine médical comme le 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), le 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC), ou encore le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) fut testée en premier lieu.

A ces phospholipides peut être intercalé entre les chaînes hydrophobes du cholestérol afin de stabiliser la membrane lors du contact avec le compartiment plasmatique. De plus, ce dernier optimise les facultés d'encapsulation de principes actifs (98). Il existe toutefois des liposomes élaborés sans cholestérol donnant de bons résultats (99).

Pour finir, beaucoup de liposomes en cours de développement ou sur les marchés ne peuvent être resuspendus après lyophilisation. L'ajout de poly(éthylène-glycol) ou de lipides pegylés limite l'agrégation des liposomes (100) et présente donc un intérêt certain concernant la logistique de ces médicaments.

Les phospholipides employés font partie de la famille des phosphoglycérides et contiennent une queue apolaire ainsi qu'une tête polaire. La queue hydrophobe est composée d'un squelette de glycérol invariable et de deux acides gras de longueur variable allant majoritairement de 14 à 18 carbones non nécessairement identiques en position 1 et 2 du glycérol. On retrouve en position 3 la tête hydrophile constituée d'un phosphate estérifié par des groupements polaires divers telles que la choline, l'éthanolamine, la sérine, le glycérol ou encore l'inositol.

Lors de la synthèse du liposome, il sera accordé un soin particulier au choix du phospholipide majoritaire. Sa composition chimique, la longueur des chaînes des acides gras et le nombre d'insaturations influenceront fortement la température de transition de phase ce qui modifiera les conditions de synthèse.

De plus, ce choix façonnera les propriétés finales de la particule, notamment le potentiel zêta de surface des liposomes, paramètre non négligeable lors des interactions cellulaires. Les alternatives proposées permettront d'envisager le ciblage de certaines populations cellulaires ou auront un usage plus propice à certaines applications.

## 2. Les vecteurs viraux

### a) Structure virale

La majeure partie des recherches portant sur les vecteurs viraux se concentre actuellement sur les *Adenoviridae* découverts en 1953 par Wallace Prescott ROWE (101).

Cette grande famille de virus contient 5 sous classes correspondant aux espèces infectées : Aviadenovirus, Siadenovirus, Ictadenovirus, Atadenovirus et la famille infectante pour l'homme, les Mastadenovirus. Composée de presque 100 sérotypes différents, cette classification est divisée en 7 groupes. Toutefois, le groupe

« C » est majoritairement étudié puisqu'il contient les Adénovirus 2 et 5, vecteurs les plus employés dans le domaine vaccinal.

Plus généralement, le diamètre moyen des adénovirus est inférieur à 100 nm répondant ainsi aux normes ISO 9001 décrites précédemment. Toutefois le procédé de fabrication diffère entre les nanoparticules lipidiques, polymériques et les vecteurs viraux. Les premiers font uniquement appels à des réactions physico-chimiques alors que l'emploi de virus nécessite des techniques de biologie moléculaire pour modifier le vecteur et ainsi s'assurer de la sécurité microbiologique.

Leur génome non enveloppé à base d'ADN double brin linéaire d'environ 40 kb est aisé à modifier. Celui-ci est solidarisé avec les protéines Mu, V, VII formant le *core*. Il comporte 2 types de gènes : un gène unique traduit tardivement générant les transcrits L1 à L5 et des gènes précoces (E1a, E1b, E2, E3, E4) exprimés avant la réplication de l'ADN.

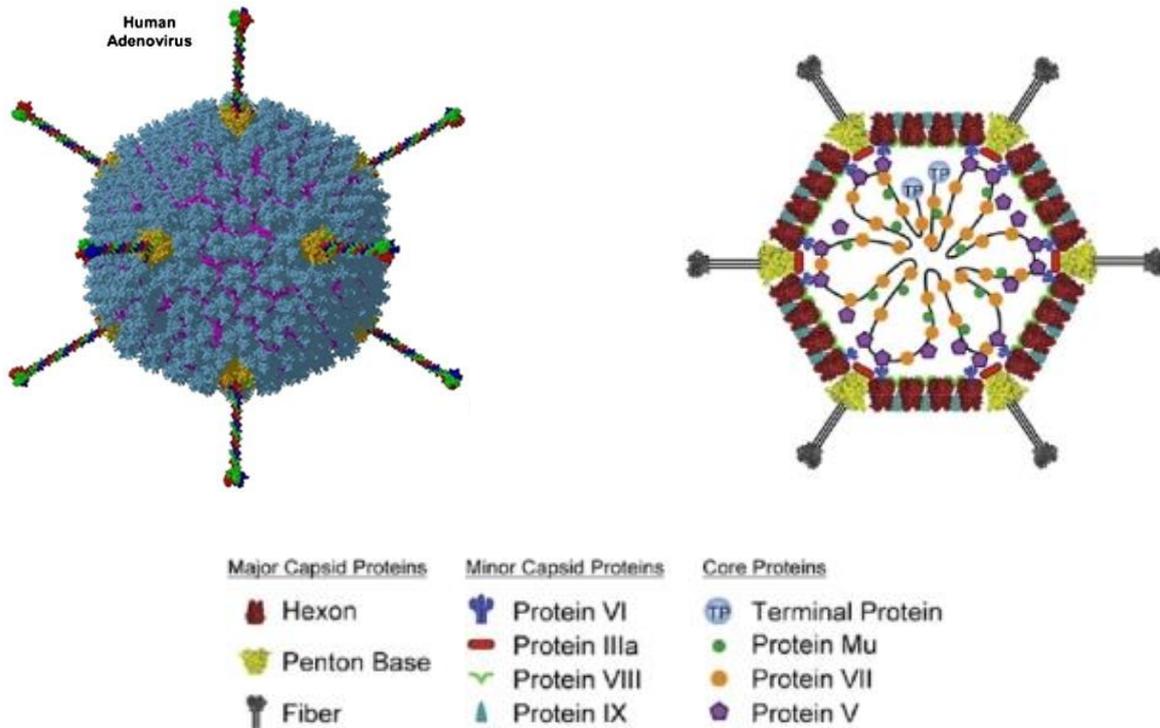
Cette structure particulière est contenue dans une capsidie icosaédrique composée de 3 protéines majeures : la fibre, l'hexon et la base du penton consolidées par les protéines IIIa, VI, VIII, IX (**Figure 10**) (102).

### *b) Le cycle d'infection naturel*

Comme tout virus, le cycle infectieux des Adénovirus est divisé en 3 parties : l'attachement à la membrane et son internalisation, l'adressage au noyau avec transcription de son génome et enfin la libération des particules virales néo formées.

L'attachement à la membrane cellulaire varie selon le sérotype du virus, c'est pourquoi seul le mode d'infection de l'Ad5 sera détaillé. Pour débiter, la fibre entre en contact avec le récepteur CAR non spécifique de tissu et fortement exprimé dans les jonctions serrées des épithéliums. Cette interaction est renforcée par la suite par accollement du penton aux intégrines ce qui provoque l'endocytose virale (103).

Bien que l'endocytose des particules virales emprunte très certainement différentes voies, il est admis que la majeure partie utilise la voie des clathrines pour entrer dans le cytosol. Pour ce faire, la vésicule préalablement formée recouverte de clathrines est perforée par la protéine VI qui se dissocie des capsomères (104) libérant le génome viral qui peut alors rejoindre le noyau cellulaire afin d'initier la phase de transcription.



**Figure 10.** Structure externe (A) et interne (B) d'un Mastadénovirus (105).

Dans un premier temps, la région E1a est prise en charge par les polymérases puis traduites par les ribosomes cytosoliques. Cofacteur essentiel à la traduction des autres protéines E, celle-ci est réintégrée dans le noyau afin d'amorcer cette nouvelle étape.

Cette étape de traduction se conclut par la transcription du gène unique tardif qui après modifications post traductionnelles donne les ARNm L1 à L5 codant pour les protéines structurales des virions nouvellement formés.

Pour finir, le génome viral s'assemble avec ces protéines au niveau nucléaire puis la lyse cellulaire provoque la libération de virions dans l'environnement extra cellulaire.

### *c) La conception des vecteurs viraux*

Le premier obstacle à franchir fut de rendre ces virus non répliquatifs en modifiant spécifiquement certaines régions du génome viral.

Ainsi, lors du développement initial de ces nanoparticules, la partie codante pour la protéine E1 fut retirée afin d'empêcher toute répllication virale limitant l'infection aux deux premières phases. De plus, la région E3 du génome étant reconnue comme ayant des propriétés immuno modulatrices, la séquence codante pour l'antigène est insérée dans cette région pour optimiser l'immunogénicité du vaccin (106).

Ces étapes ont un double intérêt : non seulement la virulence de ces vecteurs est atténuée mais le retrait de ces deux régions génomiques permet d'introduire des séquences de transgènes plus longues.

Toutefois, il existe un échappement à ces mécanismes dû au maintien des domaines E2 et E4 chez ces vecteurs viraux de 1<sup>ère</sup> génération. En effet, des protéines virales issues de ces promoteurs se retrouvent traduites à moindre échelle puis présentées par la cellule via leur CMH induisant une réponse cytotoxique à l'encontre des cellules infectées (107). Ce faisant, la clairance de ces cellules est initiée, l'expression de transgène ciblé est alors trop brève pour espérer une réponse vaccinale efficace.

La dernière génération est ainsi défective à la fois pour ces régions mais également pour toutes régions mineures incriminées dans la réplication virale. Les avantages majeurs de cette technologie sont en premier lieu l'absence d'expression de protéines virales par les cellules transduites, mais surtout un potentiel de transport de transgènes avoisinant le poids moléculaire du génome viral (40 kDa) (108).

### *3. Les nanoparticules polymériques*

L'alternative plus récente concerne les biopolymères possédant de fortes capacités d'association et de délivrance d'antigènes. Issus de polymères synthétiques ou naturels inertes assemblés sous forme de nanosphères pleines ou de nanocapsules poreuses, leurs diamètres s'étalent du micromètre à quelques dizaines de nanomètres pour les plus petites nanoparticules.

A l'image des liposomes, la plupart de ces vecteurs sont hydrophobes avec des charges électriques de surface variables par ajout de différents groupements fonctionnels. De même, la multiplicité des greffages possibles à la surface de ces vecteurs en fait de bons candidats pour adresser spécifiquement le médicament intégré vers le site actif d'intérêt.

Cette conception basée sur ces biopolymères est intéressante pour leur capacité à être dégradés lentement en libérant graduellement l'antigène qu'elle véhicule, contrairement aux vaccins traditionnels qui les déposent massivement au site d'injection. Cette faculté est d'autant plus intéressante que des études démontrent que la cinétique de relargage de protéines immunogènes influe sur la réponse immunologique (109).

#### *a) Les polymères synthétiques*

Historiquement, les dérivés de l'acide poly-lactique-co-glycolique (PLGA) furent les premiers approuvés par la FDA pour des applications médicales. Hydrolysés par l'organisme, ces polymères sont naturellement éliminés tout en limitant l'accumulation tissulaire au site d'administration (110). Dans le but d'influencer cette dégradation, l'assemblage de différents polymères de poids moléculaires inégaux peut être testé. Pour exemple, une proportion de 85/15 de lactate / glycolate démontre un ralentissement du relargage de principe actif encapsulé comparativement à une proportion égale (50/50) (111).

En dépit de résultats prometteurs dans le domaine de la vaccination, l'instabilité du polymère en solution reste un frein considérable à leur déploiement. De

surcroit, leur faible solubilité oblige le recours aux solvants organiques lors de la synthèse des nanoparticules ce qui peut dégrader le principe actif si l'association se produit simultanément lors de la formation de la nanoparticule (112). Pour finir, une potentielle toxicité peut survenir lors de l'administration si des résidus de solvants voire de tensio-actifs employés pour contrecarrer les problématiques de stabilité colloïdale sont administrés conjointement.

Moins représentés, d'autres polymères synthétiques sont à l'étude comme le polystyrène montrant de bons résultats dans le domaine vaccinal qu'il s'agisse de protéine témoin comme l'ovalbumine (113) ou des antigènes malariques (114). Dans ces études ces nanoparticules ont montré leur supériorité à induire une réponse persistante chez les lymphocytes CD4+ et CD8+ comparativement aux sels d'aluminium ou aux émulsions lipidiques.

### *b) Les dérivés polyosidiques naturels*

Sous-classe des particules polymériques, de nombreux polysaccharides sont utilisables. Source inépuisable dans le vivant (amidon ou inuline dans les végétaux,  $\beta$ -glucane chez les bactéries), ces polymères sont constitués d'un ou plusieurs sucres, linéaires ou branchés pouvant être assimilés à des PAMPs. Faculté intéressante car cela facilite la reconnaissance par le système immunitaire donnant aux nanoparticules un ciblage passif vis-à-vis des CPAg. De plus, la biocompatibilité et l'absence de toxicité de ces polysaccharides renforcent l'intérêt de l'usage de ces nanoparticules dans le domaine vaccinal.

Les nanoparticules polysaccharidiques, notamment à base de glucose, sont simples à produire, nécessitent peu de solvants lors des étapes de synthèse et peuvent être facilement manufacturées à large échelle. L'association de telles nanoparticules avec des antigènes se fait souvent par simple mélange, ce qui limite les problématiques de stabilité de l'antigène lors de la synthèse et du stockage du médicament.

L'exemple le plus documenté reste le chitosan, matériel peu coûteux, non toxique et biocompatible issu de la désacétylation de la chitine (polysaccharide présent dans la carapace des crustacés). Naturellement cationique (115), le chitosan encapsule aisément les protéines, ADN et ARN anioniques par liaison électrostatique faisant de ce type de polymère un candidat de choix pour une application vaccinale.

Toutefois, du fait de son insolubilité à pH physiologique (116), rares sont les nanoparticules composées de chitosan pure et l'on préfère associer ce polymère avec d'autres. Et pour cause ce matériau inséré en faible proportion dans une nanoparticule confère à celle-ci d'une part une muco adhésion intéressante (117) lorsque cette voie d'administration est envisagée et d'autre part une interaction facilitée avec les phospholipides membranaires anioniques des cellules (118).

### III. Le système immunitaire et la réponse vaccinale

En discriminant le « soi » du « non soi », le système immunitaire a pour principale fonction de prévenir les infections et d'éradiquer celles déclarées. Ce système complexe est divisé en 2 catégories à appréhender comme un continuum : tout d'abord l'immunité innée, première défense vis-à-vis des pathogènes capable de réagir dès les premiers signes d'une agression. Celle-ci s'accompagne dans un second temps de l'immunité adaptative, de déploiement plus tardif, mais ayant une efficacité accrue (119).

Il arrive, toutefois, que l'immunité soit dépassée par les mécanismes physiopathologiques des micro-organismes, la réponse alors inefficace n'endigant plus la propagation du pathogène pouvant provoquer des maladies parfois mortelles. Pour les contrecarrer et prévenir leurs émergences, l'arsenal vaccinal décrit préalablement a été mis en place.

Dans la partie ci-dessous, les grands principes des immunités innée, adaptative et de la genèse d'une réponse mémoire seront expliqués. Pour terminer, la réponse immunitaire au sein des muqueuses et celle induite par la vaccination assistée par les NPL seront décrites.

#### 1. L'immunité innée

Cette immunité « native » est fortement conservée dans l'évolution, elle est retrouvée à travers de nombreuses familles phylogénétiques présentes à la fois chez les vertébrés et les invertébrés. Ce versant de l'immunité, efficace dès les premières heures de l'infection se dirige à la fois contre les micro-organismes mais aussi contre les cellules de l'hôte endommagées. De plus, les signaux de danger émis par l'immunité innée seront captés par les cellules de l'immunité adaptative et renforceront le recrutement et l'action de ces dernières (120).

La but de cette défense est de reconnaître des motifs microbiens particuliers appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) grâce à des récepteurs codés dans la lignée germinale absents uniquement des hématies. De ce fait, nulle recombinaison génétique n'est opérée rendant ces récepteurs identiques sur toutes les cellules de la même lignée.

Plusieurs familles de récepteurs existent tels que les CLR membranaires (C-type Lectin Receptors), les NLR (Nod-Like Receptors) et RLR (RIG-1 Like Receptors) intracellulaires ou encore les TLR (Toll Like Receptors) transmembranaires ou vésiculaires dans les endosomes ou lysosomes (121). Au nombre de 10 chez l'homme, ces derniers sont majoritairement exprimés sur les phagocytes, cellules dendritiques, cellules endothéliales et épithéliales et reconnaissent des motifs particuliers (**Tableau IV**).

Véritable éclaireur de l'immunité, la reconnaissance par l'un de ces récepteurs au niveau des cellules épithéliales provoque la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF (Tumor Necrosis Factor) ou les IL-1 et 12 (InterLeukine).

Associée à la sécrétion de chimiokines et de molécules d'adhérence comme la sélectine E, cette étape permet d'activer les nombreuses composantes de l'immunité innée qui recruteront in fine les déclencheurs d'une réponse adaptative.

**Tableau IV.** Caractéristiques des TLR (122,123).

<b>TLR</b>	<b>Localisation</b>	<b>Cellules</b>	<b>Ligands</b>	<b>Pathogènes</b>
1	Membranaire	Ubiquitaire	Lipopeptides	Bactéries
2	Membranaire	Cerveau, Cœur, Poumons, Rate Macrophages, DC, PN	Lipopeptides Peptidoglycanes Résidus Mannose	Bactéries
3	Endosomal	Placenta, Pancréas DC, LT, NK	ARN double brin	Virus
4	Membranaire Endosomal	Rate DC, LB, LT, PN Monocytes, Macrophages	LPS Résidus Mannose	Bacilles Gram – Virus
5	Membranaire	Ovaire, Prostate Leucocytes circulants	Flagelline	Bactéries
6	Membranaire	Thymus, Rate, Poumons Monocytes, LB	Acide lipotechoïque	Bactéries
7	Endosomal	Poumons, Placenta, Rate Ganglions lymphatiques Monocytes, LB, DC	ARN	Bactéries Virus
8	Endosomal	Poumons, Placenta, Rate, MO Ganglions lymphatiques Leucocytes circulants Cellules endothéliales	ARN	Bactéries Virus
9	Endosomal	Rate, MO Ganglions lymphatiques Leucocytes circulants LB, DC	Oligonucléotides riches en CpG	Bactéries Virus Parasites protozoaires
10	Membranaire	Rate, Thymus, LB Ganglions lymphatiques	LPS Lipopeptides	Bactéries Virus

**DC** : Dendritic Cell / **LB** : Lymphocytes B / **LT** : Lymphocytes T / **NK** : Natural Killer  
**PN** : PolyNucléaire / **MO** : Moelle Osseuse / **LPS** : LipoPolySaccharide

Dès sa découverte, ce système avait été décrit comme non éduqué : par définition l'immunité innée répondrait donc de façon identique à chaque nouvelle rencontre avec le pathogène. Cependant, ces dernières années, des affirmations contraires ont été formulées devant certaines preuves contredisant ce dogme.

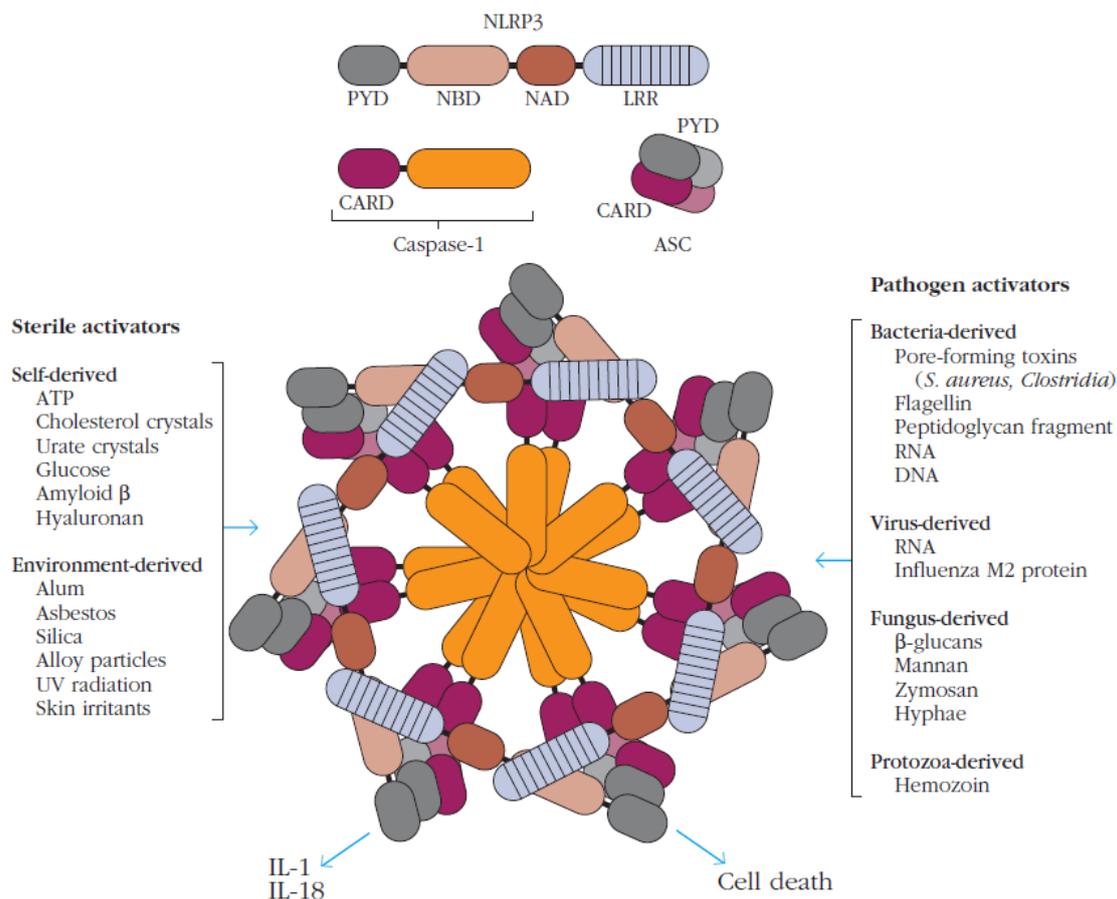
Pour exemple, la protection octroyée par une injection d'IL-1 trois jours avant challenge permettait d'accroître la survie des souris vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* (124). Ce constat s'étendait à d'autres pathogènes comme *Candida albicans* puisqu'il a été démontré que l'entraînement du système immunitaire par des souches de ce champignon privées de capacité germinative permettait de protéger les souris vis-à-vis des souches virulentes (125). Cette immunité était même décrite chez des souris sans thymus et déficientes en gène Rag-1 incapables de réarrangement du BCR prouvant que ce mécanisme était indépendant des lymphocytes (125,126). Les infections virales sont aussi concernées par ces observations puisque des souris infectées par le cytomégalo virus murin développaient un répertoire mémoire de cellules Natural Killer indépendant des lymphocytes T et B. Suite à un nouveau challenge, ces cellules se multipliaient à nouveau pour défendre l'hôte (127) et recrutaient les monocytes localisés dans la moelle osseuse (128).

Ces constats chez l'animal furent étayés par les observations faites chez les individus protégés par le BCG. Ce vaccin induisait une immunité à la fois contre la tuberculose mais aussi à l'encontre de plusieurs agents infectieux à l'initiative des monocytes circulants et des cellules souches hématopoïétiques (129). Bien que les mécanismes moléculaires à la base de cet entraînement du système inné ne soit encore que partiellement connu, plusieurs arguments mettent en évidence l'impact des modifications épigénétiques telles que l'organisation de la chromatine au niveau des domaines TADs (Topologically Associated Domains), la méthylation de l'ADN et la longueur des chaînes non codantes des ARN (130).

### 1. *L'inflammasome*

Lors d'une infection, le gène codant pour l'IL-1 est activé conduisant à la traduction de cette interleukine. Toutefois, l'obtention de cette cytokine sous forme active nécessitait l'action d'une enzyme capable de cliver la pro-IL-1 : la caspase-1. Le mode d'action de cette enzyme transcrite dans la plupart des cellules sous forme inactive n'a pu être élucidé que lors de la découverte en 2002 par le Dr Jurg TSCHOPP de l'inflammasome (131). Cette structure multiprotéique composée de la caspase-1, d'une protéine NLR et de l'adaptateur ASC (Apoptosis-related Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain) permet le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  et de la pro-IL-18 reconnues comme des puissants inducteurs de l'inflammation (Figure 11) (119).

L'inflammasome NLRP3 est à ce jour le complexe le mieux décrit exprimé par les cellules de l'immunité innée (monocytes, macrophages, PNN) mais aussi celles de l'immunité adaptative (DC, lymphocytes) ou encore par les cellules épithéliales. Son activation se produit lors de sa stimulation par des composants provenant des bactéries, champignons et virus mais aussi des DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) libérés par les tissus endommagés.



**Figure 11.** Représentation schématique de l'inflammasome

Depuis sa découverte, de nombreux signaux activateurs des différents inflammasomes ont été répertoriés. Citons les PAMPs tels que la toxine excrétée par *Bacillus anthracis* pour NLRP1 (132), les lipopeptides bactériens pour NLRP7 (133) ou les DAMPS tels que les protéines  $\beta$ -amyloïdes (134), les fibres d'amiante (135) ou encore les sels d'aluminium (136) pour NLRP3. Cette activation de l'inflammasome démontre l'intérêt de considérer l'immunité innée comme initiatrice d'une réponse vaccinale puisqu'il a été démontré in vivo que des souris déficientes en NLRP-3, en caspase-1 ou en protéine ASC ne développaient pas d'immunoglobulines vis-à-vis d'une ovalbumine administrée avec de l'alun (137,138).

## 2. L'immunité innée comme déclencheur de la réponse adaptative

L'inflammasome est donc une plateforme importante de la réponse innée permettant l'activation des interleukines nécessaires au développement de la réponse immune. L'IL-1 est ainsi un déclencheur de la lymphopoïèse et la myélopoïèse conduisant à une hyperleucocytose nécessaire pour éradiquer secondairement l'infection. Par action directe sur les cellules endothéliales et épithéliales, cette cytokine augmente le recrutement des cellules de l'immunité innée et l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  ou IL-6) selon une boucle d'amplification (139).

Bien qu'apparentée à l'IL-1, l'IL-18 est exprimée constitutivement et ne requiert donc pas de signal d'induction. Suite à son activation, cette interleukine facilitera le recrutement des PNN et des macrophages tout en favorisant le versant TH1 de l'immunité adaptative en augmentant la prolifération des cellules NK, des LT CD8+ et la sécrétion d'IFN $\gamma$ . A l'image de l'IL-1, cette cytokine contribue à maintenir un micro-environnement inflammatoire en augmentant la sécrétion de TNF $\alpha$  et d'IL-8 (140).

Les phagocytes sont des cellules circulantes sanguines sentinelles de l'immunité innée (PNN, Monocytes) qui par chimiotactisme, vont être recrutées au niveau du site infectieux afin de détruire les micro-organismes (141). Lors de cet enrôlement, les PNN très efficaces s'infiltrent rapidement au niveau tissulaire puis sont supplantés progressivement par les monocytes de durée de vie plus longue qui se différencient lentement en macrophages.

Le principal objectif de ces cellules est la phagocytose du microbe. Ces cellules enrobent alors le pathogène dans leurs membranes créant une vésicule, le phagosome. La fusion du lysosome avec cet endosome initie la lyse de celui-ci grâce à l'action des radicaux libres et anions super oxydes fruits des oxydases présentes dans cette vésicule.

Toutefois, les phagocytes ont aussi un rôle important de CPAg initiant la réponse adaptative développée dans les parties suivantes. Cette propriété permet à la fois la stimulation des LT (lymphocytes T) amplifiant l'immunité adaptative mais facilite aussi la lyse des microbes grâce à cette coopération (142).

## 2. L'immunité adaptative

### 1. La présentation antigénique via le CMH des CPAg

Les cellules dendritiques (DC) sont les cellules présentatrices d'antigènes pivots entre les deux versants du système immunitaire. Considérées comme des cellules professionnelles dans la présentation antigénique via leur CMH, elles ont pour finalité de déclencher la réponse adaptative spécifique selon le pathogène rencontré (143).

Immatures dans les épithéliums, les DC sont incapables de stimuler les LT car celles-ci doivent préalablement être activées par reconnaissance des microbes sur l'un de ses TLR. Cette sensibilisation associée à l'environnement cytokinique riche en TNF et IL-1 provoque un changement phénotypique des DC qui perdent leurs récepteurs d'adhérence remplacés par les CCR7. Ce récepteur spécifique des chimiokines produites dans la zone restreinte aux cellules T des ganglions lymphatiques autorise la migration vers cette destination. Durant cette étape, les DC vont commencer à exprimer les molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des LT. De plus, selon le motif reconnu par le TLR, la sécrétion cytokinique sera orientée vers un sous type particulier (TH1, TH2 ou TH17).

Les CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) aussi appelés complexe HLA (Human Leukocyte Antigen) chez l'Homme jouent un rôle prépondérant dans la

genèse de la réponse adaptative. Ces deux complexes protéiques membranaires sont uniques et propres à chaque individu, en effet les allèles codant pour le CMH hérités des deux parents sont exprimés de façon codominante. Coopérant avec des sous populations de LT différentes, l'intérêt premier de cette présentation est de dissocier les pathogènes intracellulaires (virus) et extracellulaires (bactéries, parasites) afin d'orienter spécifiquement la réponse adaptative.

Chaque CMH contient un emplacement pour la présentation d'un antigène peptidique à la fois. Ces peptides sont associés aux CMH lors de leur synthèse et assemblés dans la cellule. Ainsi une molécule cytosolique sera présentée par le CMH I alors qu'une protéine extracellulaire sera apprêtée par le CMH II (Figure 12) (144,145).

L'étape initiatrice de la présentation via le CMH de classe I est la dégradation de protéines intracellulaires par une structure appelée immunoprotéasome. Cette entité diffère du protéasome ubiquitaire car sa synthèse est sous la gouvernance d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$ . Suite à cette étape, les fragments du peptide sont associés au complexe TAP (Transporter associated with Antigen Processing) qui permet sa translocation dans le réticulum endoplasmique. La synthèse du CMH I fait intervenir de nombreuses protéines chaperonnes avec dans un premier temps la protéine  $\alpha$  du CMH associée avec ERp57 et la calnexine puis secondairement avec la  $\beta$ 2 microglobuline. La calnexine est alors remplacée par la tapasine et la calreticuline formant un complexe facilement substituable par l'antigène formant ainsi le CMH I final. Pour finir, celui-ci rejoint la membrane cellulaire grâce à des vésicules d'exocytose provenant de l'appareil de Golgi afin de présenter l'antigène aux TCR des LT CD8+ qui coopèrent en exprimant le CD28, ligand du CD80 présent sur la CPag (119).

Les CMH de classe II présentent quant à eux des protéines exogènes dégradées par l'intermédiaire des compartiments acides (endosomes précoces, tardifs et lysosomes) dont l'ultime étape permet l'association avec le CMH II. Suite à la synthèse des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , une protéine de chaîne invariante est associée avec celles-ci. Cela évite d'une part l'apprêtement de protéines présentes dans le réticulum endoplasmique grâce au domaine CLIP (CLass II associated Invariant chain Peptide) et d'autre part de diriger cette vésicule vers les endosomes acides porteurs de l'antigène. Dans ces vésicules, la chaîne invariante sera progressivement hydrolysée pour ne laisser que le domaine CLIP. Grâce au complexe HLA-DM exprimé uniquement dans ces endosomes, ce domaine sera retiré permettant une association forte avec l'antigène. Pour terminer, le CMH II sera transloqué à la membrane afin d'interagir avec le TCR des LT CD4+ qui coopèrent en retour avec le CD40L se liant au CD40 présent sur les CPag (119).

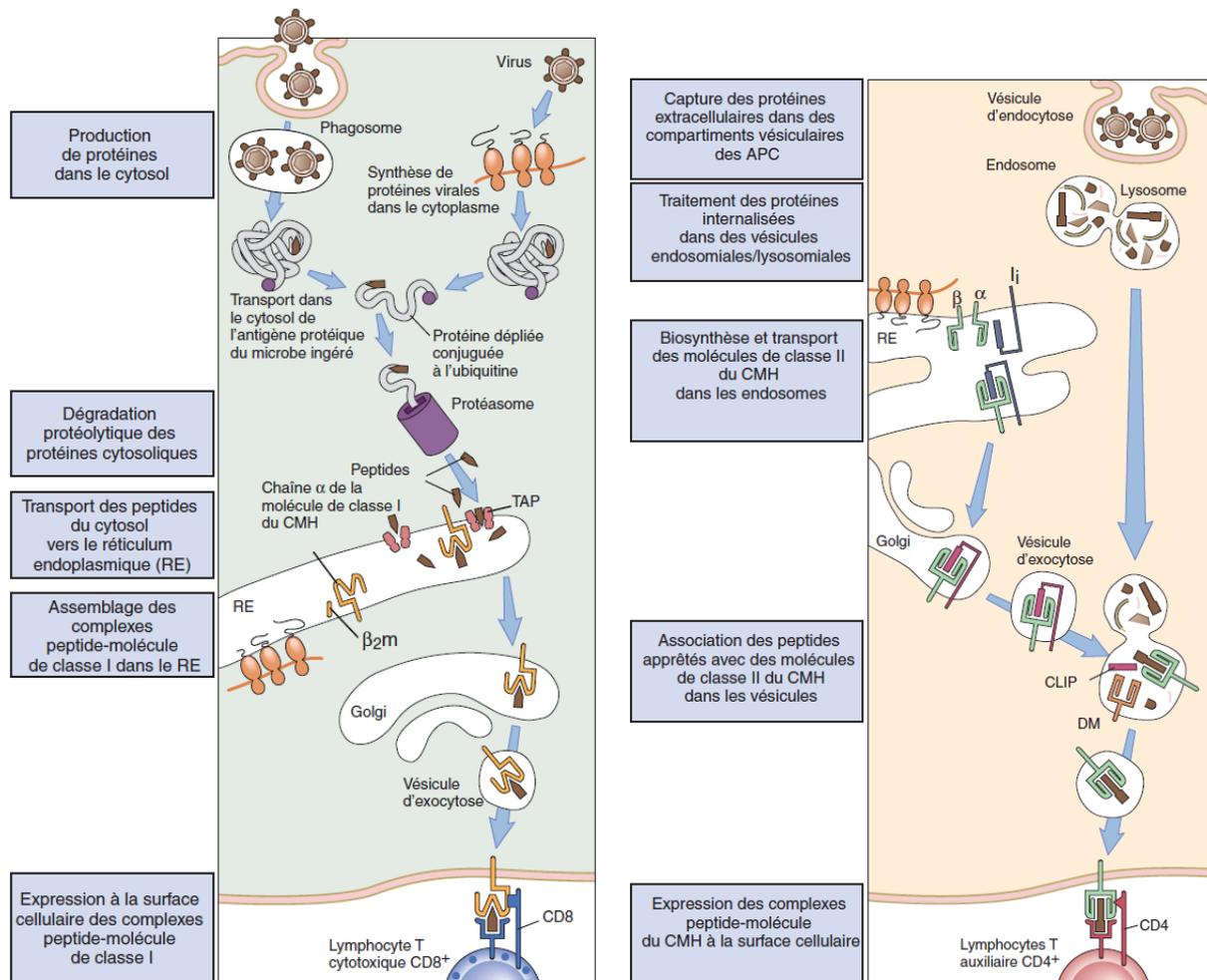
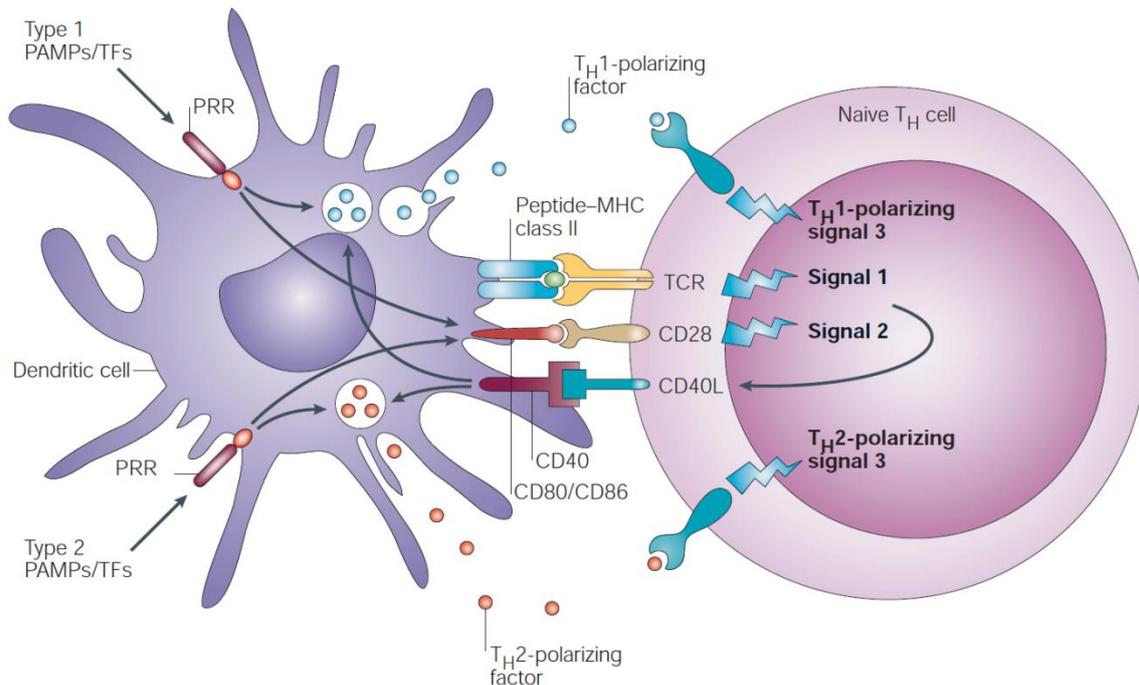


Figure 12. Voies de signalisation des CMH (146).

## 2. La réponse cellulaire

Cette partie de l'immunité adaptative a pour finalité la destruction des pathogènes soit par action directe des LT cytotoxiques soit grâce à leur coopération avec les LT auxiliaires. Les LT naïfs circulent constamment à travers le système lymphatique afin de rencontrer les CPAg migrant des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires. Lors de ce contact, quatre signaux (147) se succèdent pour former la synapse immunologique (**Figure 13**) :

- L'adhérence des cellules l'une à l'autre est obtenue par mise en jeu de l'intégrine LFA-1 (Lymphocyte Function associated Antigen) avec les ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule) des CPAg.
- La formation du complexe TCR en engageant celui-ci avec le CMH présentant l'antigène suivie de la reconnaissance du CMH II par le CD4, ou le CMH I par le CD8.
- L'engagement du CD40L avec le CD40 présent sur les CPAg ce qui accroît la synthèse de protéines CD80 et la sécrétion d'IL-2.
- La liaison du CD28 des LT avec les protéines CD80 et CD86



**Figure 13.** Synapse immunologique (147).

Sous l'action de l'IL-2 auto sécrétée, l'expansion clonale du LT activé est lancée. Suite à ces stimulations induites par le type d'infection (intra ou extracellulaire), une population de LT émerge résultant des cytokines sécrétées par les CPAg (Figure 14) (148) lors de la formation de la synapse immunologique et celles présentes dans le microenvironnement.

Les LT TH1 se différencient sous l'action de l'IFN $\gamma$  reçue par les cellules NK ainsi que les LT TH1 matures selon une boucle d'auto amplification. L'IL-12 sécrétée par les macrophages et DC suite à la stimulation des TLR 3 et 4 contribue de même à favoriser ce profil. Le rôle de cette réponse est de défendre l'organisme contre les microbes intracellulaires par augmentation de la phagocytose en favorisant le switch isotypique vers les Ig G2a très impliquées dans ce processus. Pour finir, l'IFN $\gamma$  favorise la différenciation des LT naïfs vers des LT CD8 $^{+}$  matures par action sur les DC.

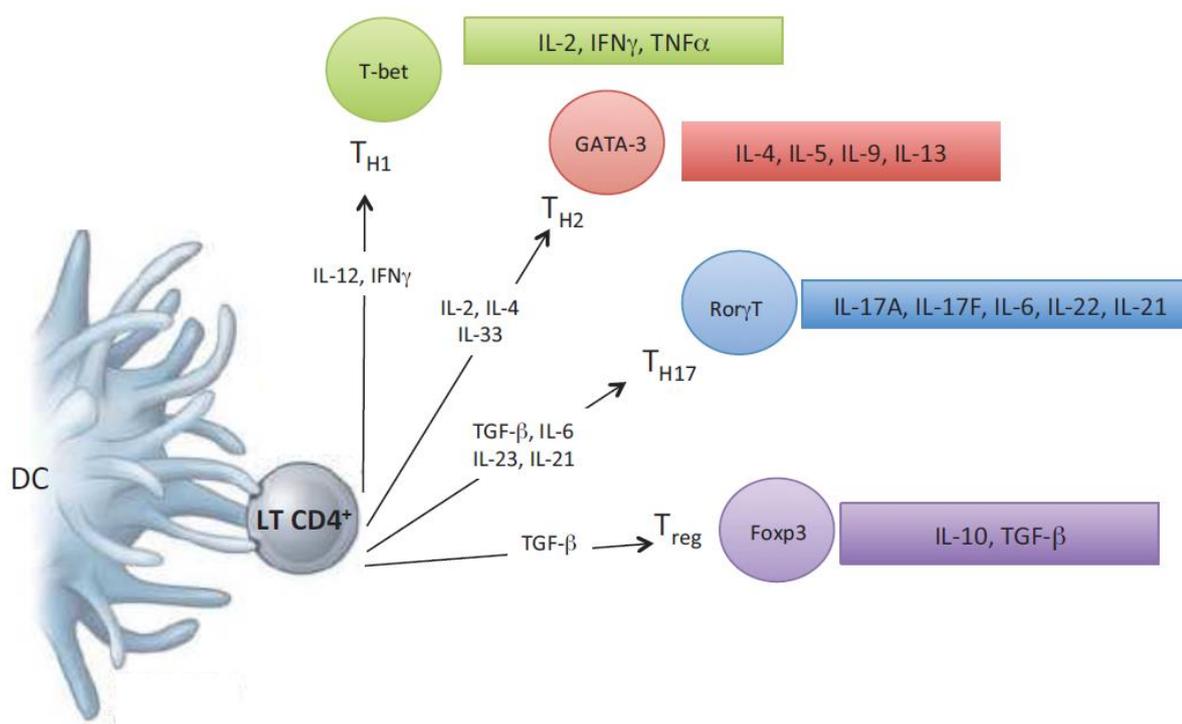
L'IL-4 provenant des centres germinatifs, des mastocytes, des PNB (PolyNucléaires Basophiles) et des cellules NK est à l'origine des LT TH2. Cette polarisation assure une défense contre les microorganismes extracellulaires tels que les helminthes et induisent des réactions allergiques. Suite à cette modification phénotypique, ces lymphocytes génèrent de l'IL-4 selon une boucle d'amplification de cette réponse et activent simultanément le switch isotypique des immunoglobulines vers l'isotype E. Ces actions sont complétées d'une part par l'IL-5 qui favorise la sécrétion d'Ig G1 et d'autre part par l'IL-13 qui assure une augmentation de l'immunité des muqueuses en accélérant la sécrétion de mucus par les épithéliums.

Afin d'éviter tout emballement de ces deux réponses, une balance entre-elles existe via un rétrocontrôle négatif exercé par les cytokines TH2 sur l'IFN $\gamma$  inhibant l'action des LT TH1 et vice-versa (119).

Le profil TH17 est sous la gouvernance de cytokines pro inflammatoires (IL-6 et TGF $\beta$ ) et assure grâce à l'élaboration d'IL-17 et d'IL-22 une défense contre certaines bactéries tout en maintenant le syndrome inflammatoire.

Le dernier profil appelé LT régulateur empêche l'emballement des réponses immunitaires en induisant un environnement immunosuppresseif et pro-fibrosant grâce à la libération d'IL-10 et de TGF- $\beta$  (119).

Au fur et à mesure de l'accroissement de la réponse cellulaire, la quantité d'antigènes présentée par les CMH I va s'amoinrir diminuant les probabilités de formation des synapses immunologiques entre les LT CD4<sup>+</sup> et les DC. A cette occasion, les concentrations d'IL-2 vont s'épuiser privant ainsi ces LT de signaux de survie et provoquant leur apoptose. Cette étape se conclura par une contraction clonale diminuant drastiquement le nombre de LT spécifiques du pathogène.



**Figure 14.** Différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs (149).

### 3. La réponse humorale

#### a) Les anticorps

La création d'immunoglobulines performantes dirigées contre le pathogène est la finalité recherchée dans la réponse humorale. Celles-ci sont composées de deux chaînes lourdes et deux légères assemblées ensemble par des ponts disulfures et possèdent chacune une région constante et une hypervariable.

Il existe deux types de chaînes légères ( $\lambda$ ,  $\kappa$ ) et cinq lourdes ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$ ,  $\gamma$ ) caractérisant les 5 isotypes d'immunoglobulines présentes chez l'homme (Tableau V). Les Ig M, premier isotype déployé lors de la réponse primaire, possèdent une faible

affinité pour le paratope. Cependant, sa configuration pentamérique lui confère une grande avidité grâce aux dix sites actifs contrebalançant ce défaut d'affinité (150).

**Tableau V.** Caractéristiques des isotypes.

Isotype	Sous Type	Chaîne lourde	Demi-vie (Jours)	Formes sécrétées	Fonctions
Ig A	1 et 2	$\alpha$	6	Monomère à trimère	Défense des muqueuses
Ig D	/	$\delta$	3	/	Récepteurs antigéniques sur LB naïfs
Ig E	/	$\epsilon$	2	Monomère	Dégranulation mastocytaire Défense parasitaire
Ig M	/	$\gamma$	5	Pentamère	Récepteurs antigéniques sur LB naïfs Activation du complément
Ig G	1 à 4	$\mu$	23	Monomère	Immunité néonatale Neutralisation des toxines et microbes Activation du complément Opsonisation pour la phagocytose Cytotoxicité à médiation cellulaire

La sécrétion des anticorps intervient tardivement dans la mise en place des défenses immunitaires. Pour autant, ils occupent un rôle central dans de nombreux mécanismes (151,152) qui permettent la destruction du pathogène et la protection de l'hôte. C'est pourquoi la concentration sérique dans les différentes classes d'Ig est l'un des paramètres d'importance lors des études vaccinales.

Les anticorps peuvent aussi neutraliser les micro-organismes en se fixant aux enveloppes bactériennes empêchant ainsi l'infection des cellules de l'hôte, ce qui inhibe le développement de l'infection. Cette neutralisation peut aussi intervenir sur les endotoxines bactériennes relarguées par les bactéries ayant colonisées la cellule. Cet effet est recherché avec les vaccins dirigés contre les anatoxines.

L'efficacité des phagocytes est tributaire de l'opsonisation médiée par les immunoglobulines qui reconnaissent l'antigène. Par la suite, les fragments Fc de ces anticorps possèdent une haute affinité pour le Fc $\gamma$ RI présents à la surface des PNN et macrophages ce qui initie la phagocytose du microbe.

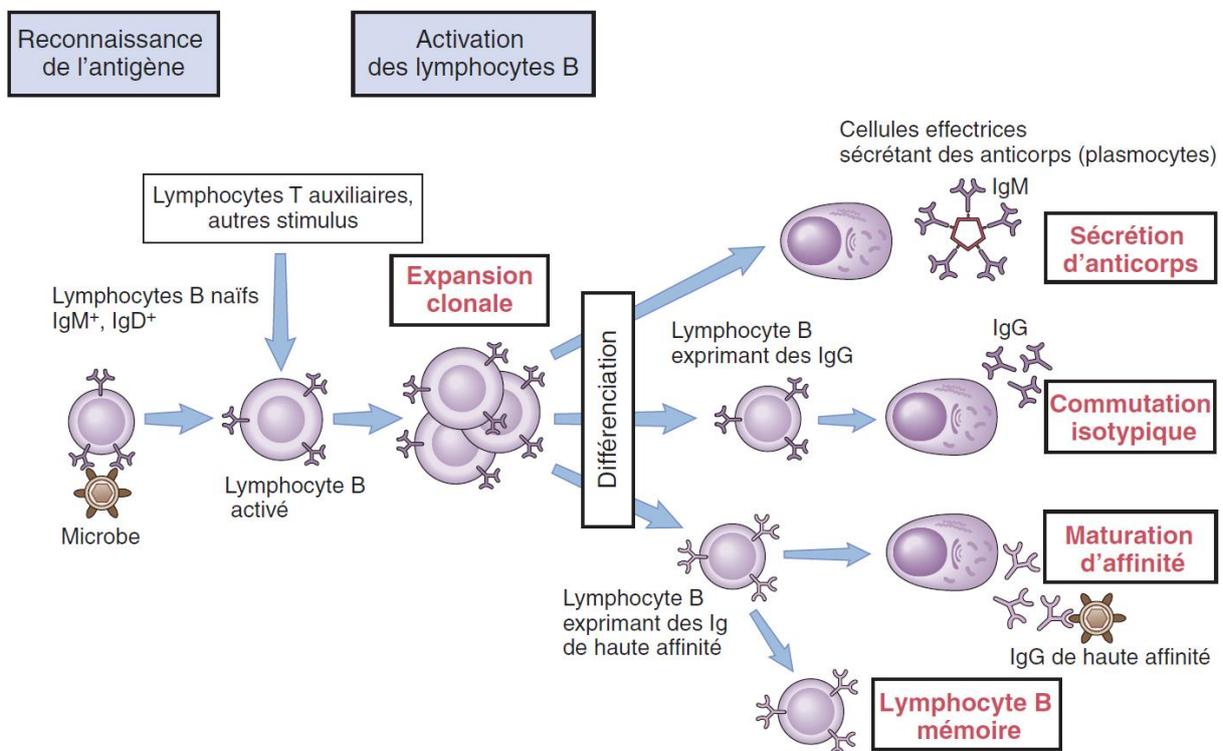
Les Ig E détiennent une propriété unique car elles sont les seules capables d'opsoniser les helminthes. En effet, ces parasites sont trop volumineux pour être phagocytés et leur constitution membranaire les immunise vis-à-vis des enzymes des PNN et macrophages. Suite à leur accolement, les Ig E peuvent se lier aux Fc $\epsilon$ RI distribués sur les mastocytes et PNE. Ce premier signal associé à la costimulation des

PNE par les LT CD4+ TH2 présents dans l'environnement de ce pathogène entraîne la dégranulation des éosinophiles agressant le parasite.

La dernière faculté des immunoglobulines est de provoquer la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps aussi nommé ADCC (Antibody Dependant Cellular Citotoxicity) en s'accolant aux cellules exprimant des antigènes du non soi. Dans cette configuration, les cellules cytotoxiques comme les NK ou LT CD8+ lient ces anticorps via le FcγRIII induisant la lyse des cellules infectées.

### b) Les deux types de réponse humorale

L'ontogénie des LB se conclut par la création de lymphocytes naïfs disposant de deux récepteurs constitués pour chacun d'une Ig de type M ou D. Suite à la reconnaissance d'un antigène, l'expansion clonale de ce lymphocyte se produit et la différenciation en plasmocytes sécrétant d'Ig opère (**Figure 15**).

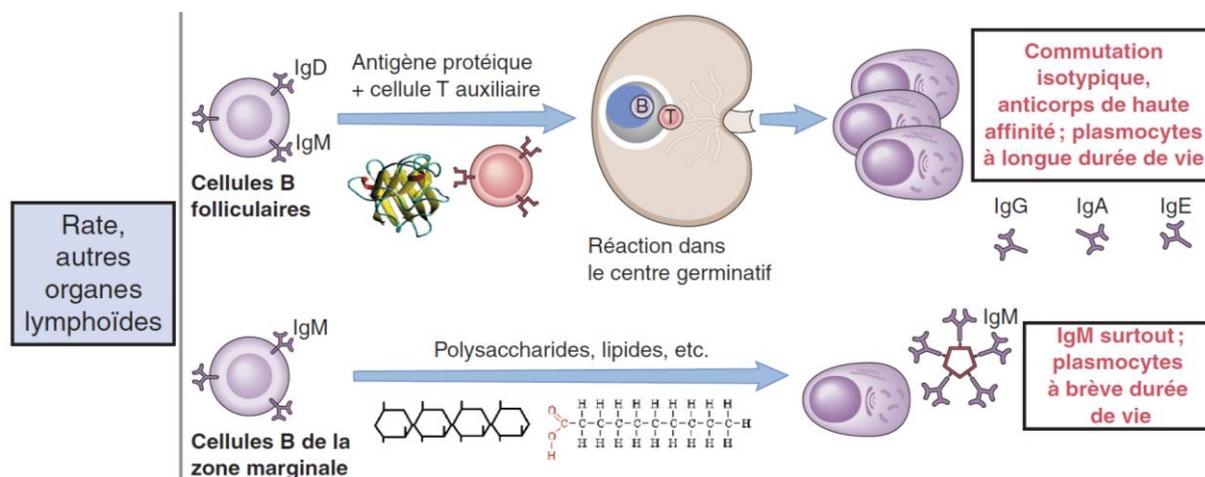


**Figure 15.** Les deux phases de la réponse humorale (146).

Cette stimulation peut survenir de deux façons (153,154) : soit en absence de LT CD4+ et par simple capture d'antigènes polysaccharidiques ou lipidiques (réponse T indépendante), soit par l'intermédiaire des LT CD4+ qui par coopération avec les CPAg apprêtent des Ag protéiques (réponse T dépendante). Dans le premier cas, la réponse est rapide sans commutation isotypique donnant lieu à la sécrétion d'Ig M ; dans le second, la mutation de ces Ig vers d'autres classes opère de façon simultanée avec l'augmentation d'affinité des domaines hypervariables.

Plus précisément, la localisation des LB est déterminante dans le fonctionnement de ce mécanisme (**Figure 16**). Ainsi les LB folliculaires résidant dans

les organes lymphoïdes secondaires peuvent interagir avec les LT donnant des plasmocytes sécréteurs d'anticorps à longue durée de vie. Contrairement à des derniers, les LB situés dans la pulpe blanche splénique répondent aux antigènes polysaccharidiques et s'abstiennent de se lier avec les LT provoquant une réponse T indépendante productrice d'Ig M.



**Figure 16.** Effet de la localisation des LB sur les propriétés finales de ces cellules (146).

### *c) La phase précoce de l'immunité humorale*

Le premier signal de cette stimulation survient lorsque le LB spécifique d'un antigène se trouvant dans les tissus lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate) reconnaît son épitope en associant son Ig membranaire avec l'antigène.

Densément représentés sur les lymphocytes, de nombreux récepteurs peuvent identifier la redondance des antigènes d'un même pathogène forçant les BCR à se rapprocher les uns des autres activant les motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif) ce qui abouti à la prolifération et à la différenciation de ce clone clôturant la phase précoce de l'immunité humorale.

Lors de celle-ci, l'expression des récepteurs de chimiokines sur la membrane des LB est inhibée autorisant la sortie des follicules du lymphocyte pour rejoindre les LT auxiliaires. Toutefois, dans le cas d'une réponse T indépendante, cette migration ne survient pas et les LB deviennent alors des plasmocytes sécréteurs d'Ig M sans maturation de l'affinité de son immunoglobuline.

### *d) La coopération avec les LT auxiliaires*

A la fin de cette étape précoce, les LB endocytent les fractions antigéniques afin de les apprêter sur leurs CMH de classe II aux TCR des LT CD4+ effecteurs. Cette coopération n'est toutefois possible qu'en bordure des follicules lymphoïdes, siège de la réunification entre les deux populations lymphocytaires. Pour opérer cette migration, les LT perdent leur récepteur CCR7 sensible aux chimiokines de la zone T suite à leur activation par les DC.

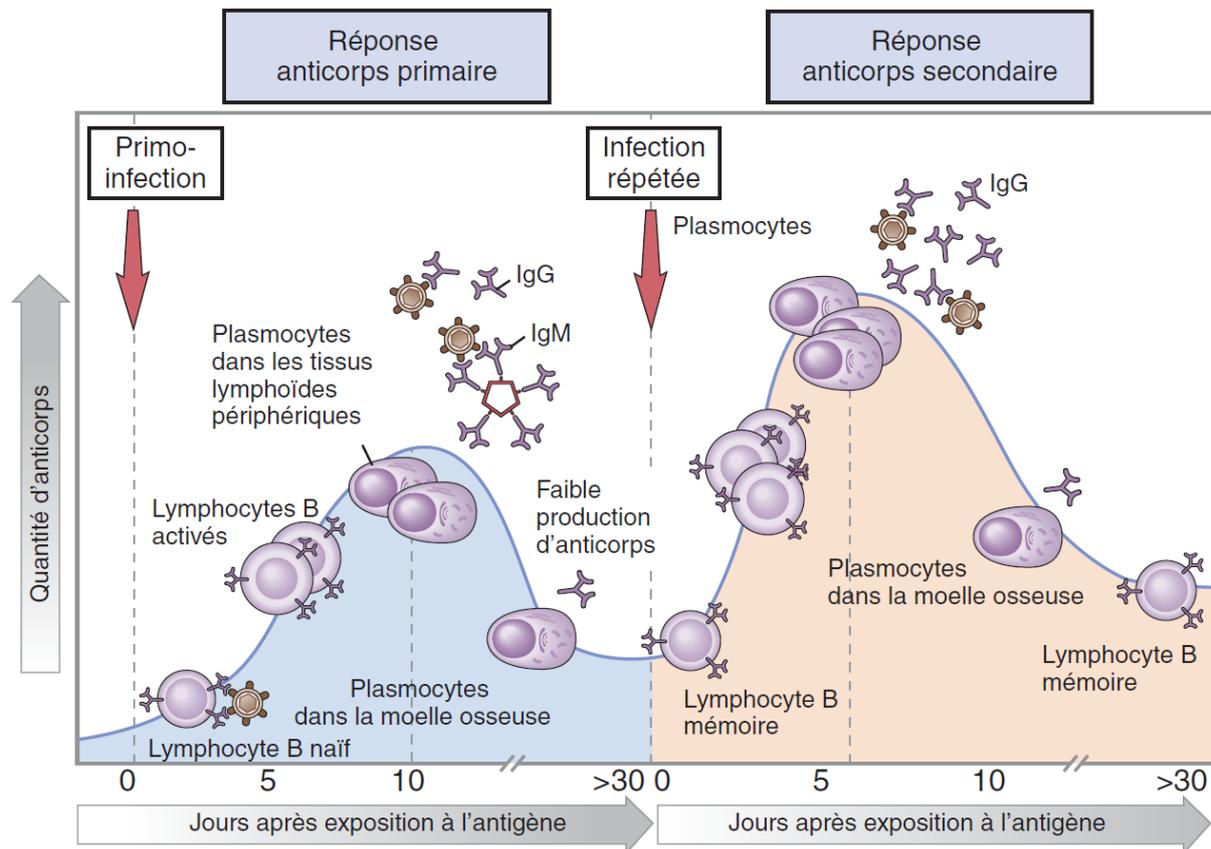
Suite à l'engagement du TCR avec le CMH II des LB, les LT enrôlent le CD40 via la présentation du CD40L. Ce signal associé à l'environnement cytokinique (IFN $\gamma$  pour les Ig G, IL-4 pour les Ig E, TGF $\beta$  pour les Ig A) induira la commutation isotypique et la migration des LB vers les centres germinatifs des follicules lymphoïdes.

L'ultime étape de la réponse humorale nommée hypermutation somatique consiste à augmenter l'affinité du paratope. Cette maturation sous la gouvernance de l'enzyme AID (Activation Induced cytidine Deaminase) entraîne la création de nombreux clones de LB ayant des sensibilités inégales pour l'épitope. Plus précisément, cette enzyme substitue la cytidine par de l'uracile créant des problèmes d'appariement entre les paires de bases azotées U/G. Lors de la réparation des séquences génétiques par les ADN polymérases, des mutations ponctuelles vont survenir sur la partie variable des gènes codant pour l'immunoglobuline (1 million de fois le taux de mutation classique rencontrée dans le génome) ce qui développera fortement le répertoire des LB sensibles pour l'antigène (119).

A ce stade, des signaux de survie peuvent être envoyés soit par les DC soit par les LT auxiliaires aux clones sélectionnés. Dans le cadre d'une interaction avec les DC folliculaires, les récepteurs Fc membranaires ont préalablement accolé les immunoglobulines de moindre affinité permettant de présenter l'antigène aux nouveaux BCR. Plus classiquement, l'interaction avec les lymphocytes s'opère via le CMH des LT (119,155).

Ces signaux permettent la différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'Ig G, A ou E de haute affinité pour le pathogène. Toutefois, une fraction minimale de cette population devient des LB mémoires circulants de longue durée de vie.

Ce versant de l'immunité est dit « éduicable » car lors d'une seconde rencontre ces cellules répondront plus vite en sécrétant un taux d'anticorps bien supérieur (**Figure 17**), ce qui limitera grandement l'infection et conjointement les signes cliniques du malade. Cette propriété est d'ailleurs le cœur de cible de la vaccination.



**Figure 17.** Cinétique des réponses primaire et secondaire du système immunitaire lors d'un contact avec un pathogène (146).

### 3. Développement d'une mémoire immunitaire

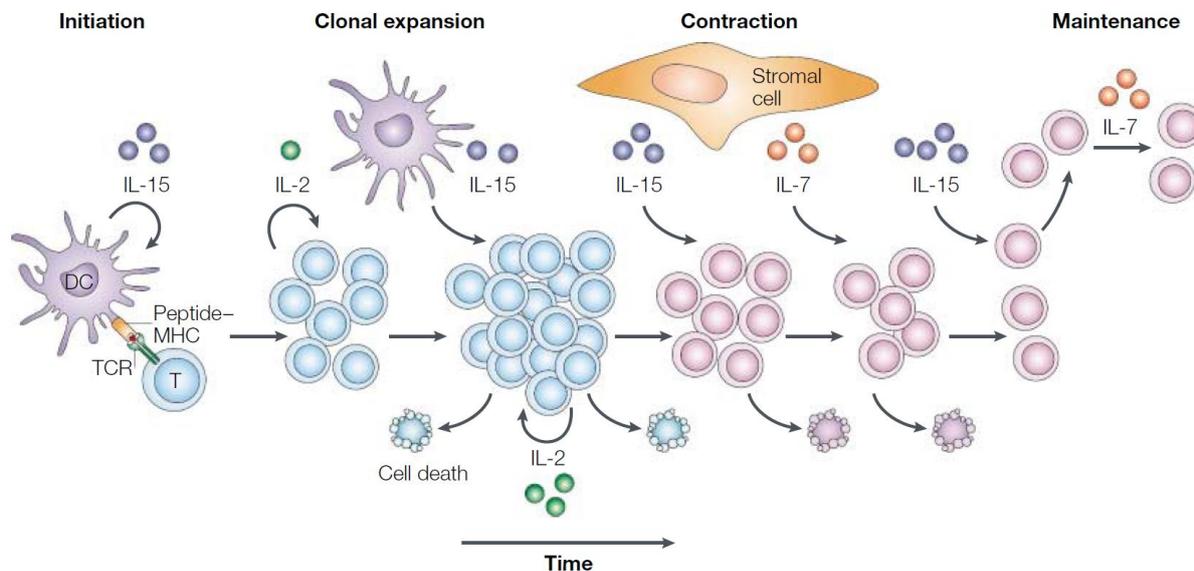
La destruction du microorganisme et la réparation des zones lésées sonnent la fin de la stimulation du système immunitaire. Pour éviter tout emballement de l'immunité adaptative, une phase de contraction clonale conclut ce processus. Durant cette phase, les cellules dispensables entreront en apoptose afin de conserver uniquement les lymphocytes mémoires de durée de vie très longue.

#### 1. Les Lymphocytes T

Le maintien de l'homéostasie cellulaire des LT est sous la gouvernance de l'IL-7 et 15 sécrétées par les cellules stromales (**Figure 18**) (156). Deux contingents de cellules sont alors en place : les LT précurseurs des lymphocytes mémoires exprimant l'IL-7R et les LT à demi vie courte n'ayant pas d'IL7R. Ces dernières entrent alors en apoptose soit passivement à cause de la carence en IL-2 dans le microenvironnement, soit activement car l'activation lymphocytaire aboutit à l'expression du récepteur FAS initiateur du processus apoptotique (157).

Lors de cette période, le pool de LT mémoires sera de l'ordre de 5% des cellules activées au pic de l'épidémie. Partant de ce constat, il est donc extrêmement important d'utiliser un antigène fortement immunogène capable d'effectuer un recrutement maximal des LT naïfs. De même, la persistance d'une inflammation étant

inversement proportionnelle avec la quantité de cellules T mémoires (158), un choix judicieux concernant l'adjuvant devra être opéré pour induire un syndrome inflammatoire transitoire.



**Figure 18.** Différenciation et maintien des LT mémoires (156).

Suite à cette cytolyse massive des lymphocytes activés, les LT CD8<sup>+</sup> se subdivisent en 3 types de lymphocytes mémoires (159,160).

Les LT de la mémoire centrale possèdent un phénotype CCR7<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> et IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>. Par maintien du récepteur aux chimiokines, ces cellules rejoignent les organes lymphoïdes secondaires pour devenir quiescentes. Leur rôle est de maintenir une sécrétion en IL-2 permettant une prolifération cellulaire au sein de son environnement et de se différencier rapidement en cellules effectrices lors d'un second contact avec l'antigène.

Uniquement positives pour le récepteur à l'IL7, les LT de la mémoire effectrice sont circulants afin d'atteindre le site infectieux dès les premiers signes d'invasions. Ces cellules conservent leur capacité proliférative et produisent de l'IL-4, 5 et de l'IFN $\gamma$  permettant d'activer instantanément les cellules de l'immunité innée et les LT CD4<sup>+</sup> naïfs.

La dernière population triplement négative est le lymphocyte T mémoire résident présent dans les tissus non lymphoïdes. Non circulants, ils sont majoritairement positionnés au niveau du système digestif. Contrairement aux deux autres phénotypes, ils sont incapables de proliférer mais sont une première ligne de défense extrêmement efficace.

De nombreuses études sont actuellement menées sur la compréhension des LT CD4<sup>+</sup> mais leur constitution n'est que partiellement découverte. L'hypothèse la plus avancée est que lors de permutation entre les différents profils (TH1, TH2, TH17), un quatrième phénotype mémoire folliculaire est induit sous l'impulsion des IL-6 et IL-21 (161).

Le maintien de ces compartiments reste sous la dépendance de l'IL-15 (particulièrement pour les CD8+) et l'IL-7. Plus controversé, il semblerait que la conservation de ces cellules soit affranchie des interactions entre le TCR et le CMH (162). Ainsi, ces lymphocytes mémoires effectuent des mitoses régulières sans nouvelle rencontre avec un antigène (163).

## 2. Les Lymphocytes B

A l'image des lymphocytes T, différentes sous populations de lymphocytes B mémoires ont été découvertes. Jusque récemment le marqueur CD27 était considéré comme discriminant les cellules effectrices des cellules mémoires (164) et l'on retrouvait alors trois variantes de cellules.

Les LB CD27+ IgM+ IgD- sont localisés dans le sang périphérique. Lors d'un second challenge antigénique, ces lymphocytes auront tendance à migrer dans les organes lymphoïdes et créer de nouveaux centres germinatifs pour rapidement effectuer les étapes de maturation lymphocytaire (165).

Les lymphocytes triples positifs sont localisés dans la zone marginale de la rate et sont impliqués dans les réponses T indépendantes (166).

Les cellules CD27+ IgM- IgD- Ig G+ résident dans les centres germinatifs et ont déjà achevé la commutation isotypique (167). Suite à un second challenge, la différenciation en plasmocytes sécréteurs d'IgG s'effectuera rapidement.

Dernièrement, un pool de lymphocytes atypiques soumis aussi à l'hypermutation somatique fut découvert. De phénotype CD27- FcRL4+ (Fc Receptor Like 4), elles atténuent via ce récepteur particulier les actions du BCR tout en renforçant l'activité des TLR environnants.

Cet effet est intéressant puisque que ces LB sont distribués dans les tissus lymphoïdes jouxtant les épithéliums tels que les cryptes, les ganglions mésentériques, sièges de nombreuses réponses de l'immunité innée. Résidentes, ces cellules sont peu observées dans le sang, la rate ou la moelle osseuse (168–170).

De durée de vie assez longue, leur homéostasie n'est pas encore élucidée. Il semblerait que ces cellules soit quiescentes et se divisent de façon asymétrique cycliquement : l'une des cellules filles maintiendra le pool des LB mémoires alors que l'autre deviendra une cellule effectrice (171). Les observations rapportées à ce sujet étant plus nébuleuses, on ne peut affirmer à ce jour si cette propriété intervient lors d'un nouveau challenge ou si cela se produit librement sans stimulation extérieure.

### 3. La persistance de la mémoire suite à la vaccination

Le but de la vaccination est de mimer les procédés physiologiques décrits précédemment. Lors de son administration, le vaccin induira donc tous les phénomènes de la réponse primaire selon 3 parties (**Figure 17**).

Les réactions immunitaires débiteront par une période de latence pouvant aller jusqu'à deux semaines avant la détection des premiers anticorps. Ce cycle est lié en premier lieu au type de vaccin ainsi qu'à la dose employée.

Cette étape est suivie d'une production croissante d'anticorps relativement faible avec une détection précoce des Ig M puis des Ig G.

Ce mécanisme se terminera par une décroissance apparentée à la contraction clonale constatée lors d'une infection naturelle. Cette diminution sera dépendante de l'isotype (Ig M et A plus précoce que les Ig G) après l'obtention d'une concentration maximale sérique.

Le maintien de cette réponse primaire sera dépendante à nouveau de la technologie vaccinale utilisée. Pour exemple les vaccins vivants atténués induisent des réponses plus longues que les vaccins sous unitaires polysacharridiques ce qui oblige une fréquence d'administration plus rapprochée (16). De plus, l'adjuvant utilisé aura un rôle central dans le recrutement des cellules de l'immunité et entretiendra par voie de conséquence ce répertoire. Pour terminer, les âges extrêmes sont des facteurs importants à considérer ; qu'il s'agisse de l'immaturité du système immunitaire chez les nouveaux nés nous privant de certaines technologies, ou encore de la sénescence du système immunitaire des personnes âgées, diminuant progressivement le pool de LT et LB naïfs disponibles et donc obligeant une stimulation accrue et récurrente.

La réponse vaccinale étant efficace environ un mois après l'injection, une réponse secondaire sera possible sur le pathogène ciblé par la vaccination dès ce délai dépassé. Dès lors, les Ig G matures affines seront sécrétées en grande quantité précocement par les plasmocytes différenciés issus des lignées lymphocytaires mémoires pré existantes (172).

### 4. Le cas particulier de l'immunité des muqueuses

Contrairement aux injections en intramusculaire et sous cutanée touchant majoritairement des cellules extérieures au système immunitaire, la vaccination au niveau des muqueuses frappe un nombre élevé de cellules immunitaires. En effet la structure particulière de ces tissus infiltrés par une importante concentration de CPAg, macrophages et lymphocytes en fait une cible intéressante pour ce type de médicament (173,174).

Sièges des échanges gazeux et des apports nutritifs, les muqueuses représentent une surface cumulative de 400 m<sup>2</sup> et tapissent toutes les communications avec le milieu extérieur (tractus aéro-digestif, uro-génital, oreille interne, canaux lacrymaux et conjonctive de l'œil). Leur histologie caractéristique s'explique par la

nécessité de maintenir une défense efficace vis-à-vis des agressions répétées des micro-organismes auxquelles doivent faire face ces compartiments.

Certaines muqueuses sont des environnements stériles (voies urinaires, conjonctives oculaires) alors que d'autres sont naturellement colonisées par une concentration plus (voies digestives, aériennes supérieures, muqueuse génitale) ou moins importante (muqueuse bronchique) de bactéries et levures commensales en compétition perpétuelle avec les pathogènes (175). En conséquence, le système immunitaire doit continuellement maintenir l'homéostasie de ces germes tout en détectant rapidement toute agression. Bien que les cellules immunitaires présentes dans ces tissus soient le principal rempart à l'infection, des barrières physiques ont été érigées afin de soutenir leurs activités.

## 1. Les barrières physiques de protection

La première protection siège dans la structure des épithéliums composant les muqueuses. De forme mono ou pluristratifiée, ces tissus possèdent des propriétés différentes en fonction de leur localisation.

Pour exemple, la forme pseudo stratifiée au niveau trachéale associée aux jonctions serrées nativement existantes (176) dans ces cellules empêche tous passages intercellulaires. Plus profondément, cette même muqueuse se transforme en cellules alvéolaires monostratifiées très fines facilitant les échanges gazeux.

En tapissant ces cellules, le mucus confère un bouclier supplémentaire à l'encontre des pathogènes. Ce gel poreux composé de mucines recouvre toutes les muqueuses de l'organisme et sa composition corrélée à la densité de micro-organisme varie en fonction de la localisation. Ainsi la couche de mucus pulmonaire est très fluide ne représentant que quelques micromètres car la lumière bronchique est dépourvue de pathogène en condition physiologique. En opposition, la couche de mucus augmente et se densifie le long du tractus intestinal pour atteindre 800µm dans le cadre colique. De même, la viscosité est faible dans les voies respiratoires comparativement au mucus vaginal facilitant son excrétion par les voies digestives.

Générées continuellement par les cellules caliciformes intercalées dans l'épithélium (177), les mucines sont des protéines O-glycosylées polymérisées entre elles retenant fortement l'eau. Capables de s'associer avec de nombreuses molécules lors de leur excrétion, ces protéines se collent entre autres aux lipides afin de créer une barrière hydrophobe à leur surface ou encore aux peptides microbiens dans le but de renforcer l'activité microbicide.

L'élimination de ce mucus se produit grâce à la clairance muco ciliaire en surface des épithéliums. De vélocité diverse, ce phénomène est plus rapide au niveau nasal permettant le renouvellement du mucus et l'expulsion des pathogènes transmis par voie aérienne. Sa composition est donc extrêmement importante car son altération peut induire une stase du gel qui n'empêche donc plus la colonisation par les pathogènes. Cette problématique est rencontrée chez les patients atteints de mutation des gènes CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) qui

dénaturent le fonctionnement du canal ionique. Le mucus se déshydrate et s'épaissit provoquant des infections récurrentes digestives et respiratoires par défaut d'élimination chez les patients atteints de mucoviscidose (178).

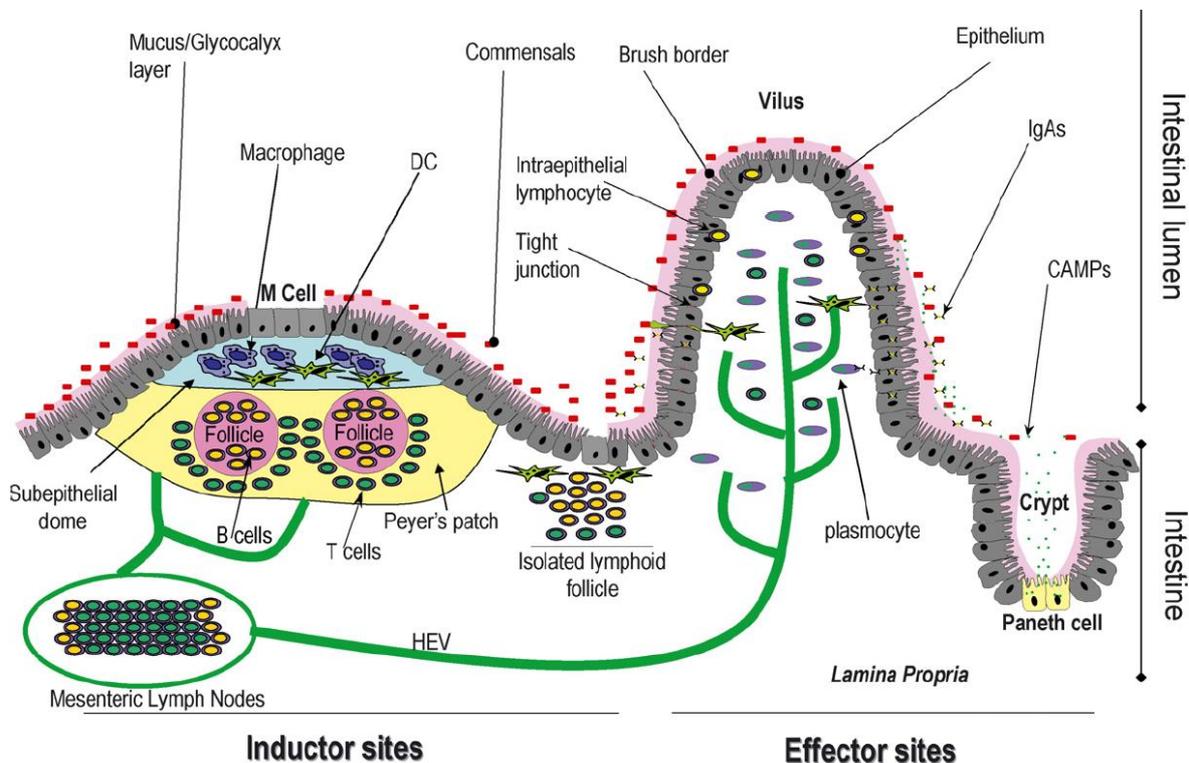
La dernière barrière est due à la production permanente de peptides anti microbiens, de protéines du complément ou d'Ig A sécrétoires capables d'opsoniser les pathogènes dans la lumière. Accompagnés de sels biliaires ou de protéines de surfactant spécifiques de certaines muqueuses, ces composés associés avec le mucus augmentent l'activité bactéricide de l'hydrogel avant toute action du système immunitaire.

## 2. Le système immunitaire des muqueuses

Le rôle du système immunitaire au niveau des muqueuses est identique à celui décrit préalablement. Néanmoins, contrairement à une infection profonde, ces cellules immunitaires ont aussi des missions préventives. A savoir qu'elles protègent à la fois les muqueuses contre les pathogènes à distance de l'épithélium pour éviter toute colonisation mais limitent aussi l'internalisation de bactéries commensales. Ce faisant peu de réactions sont engagées vis-à-vis de ces bactéries, préservant la protection octroyée par ces micro-organismes tout en modérant le développement de réactions inflammatoires non contrôlées.

La réponse innée reste le premier acteur de la réaction et n'est foncièrement pas modifiée au sein de ces sites. La principale différence réside dans la concentration de cellules phagocytaires nettement plus importante dans ces territoires. De multiples macrophages résidents sont ainsi retrouvés dans le parenchyme phagocytant de façon soutenue les pathogènes et les multiples cellules apoptotiques.

La particularité des muqueuses réside dans l'architecture des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses : le MALT (Mucosal Associated Lymphoid Tissue) (179). Peuplées de nombreuses cellules immunitaires (DC, macrophages, lymphocytes) infiltrées sous la membrane basale et de cellules M captant les pathogènes, ces muqueuses sont compartimentées en sites inducteurs et effecteurs de l'immunité (**Figure 19**).



**Figure 19.** Représentation des sites inducteurs et effecteurs lors d'une réponse immunitaire au niveau des muqueuses (180).

### a) Les mécanismes inducteurs

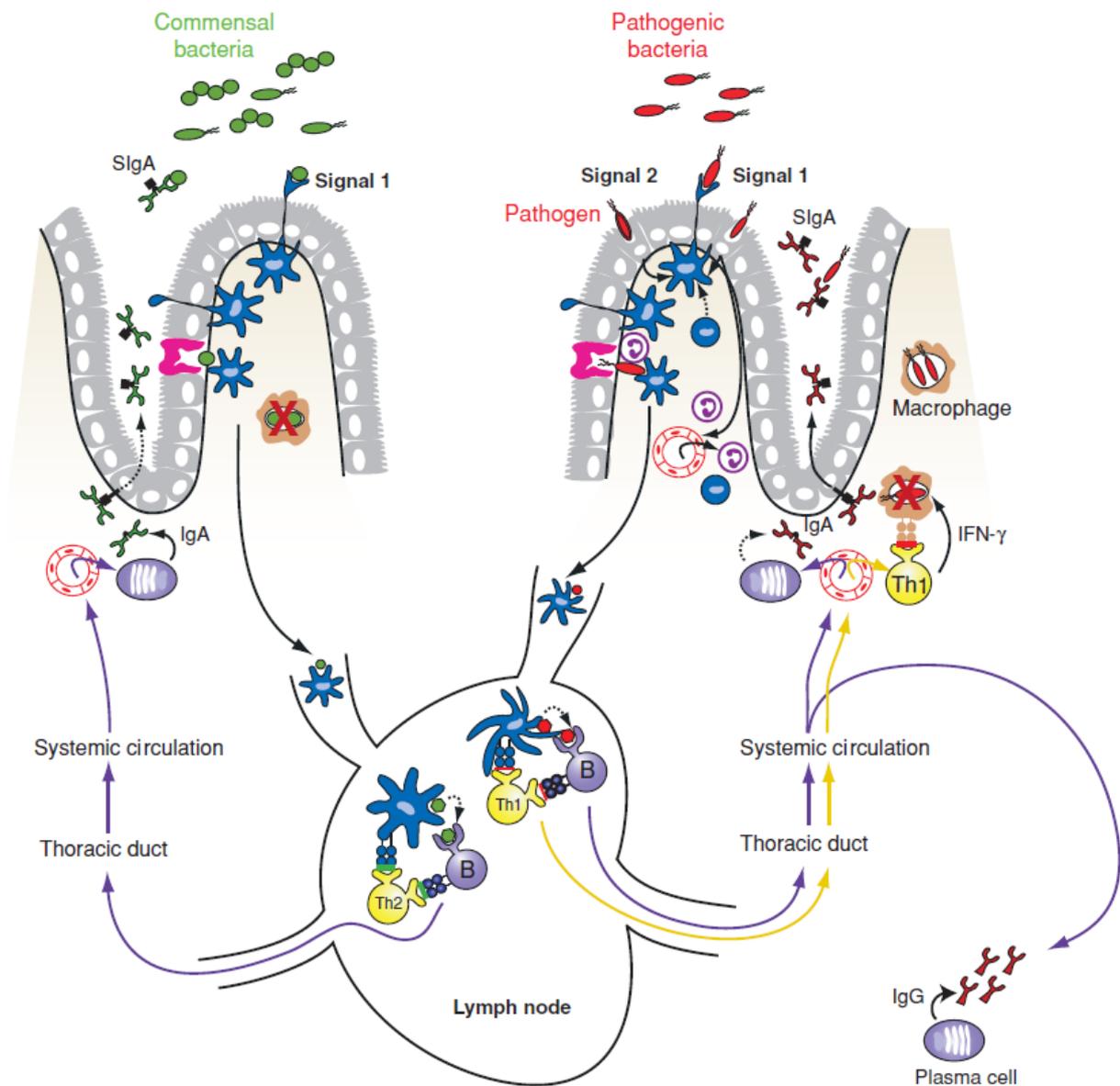
La typologie des sites inducteurs diffère d'une muqueuse à l'autre en lien avec les épithéliums sus-jacents (179) ce qui modifiera l'adressage de l'antigène. Ainsi dans les tissus monostratifiés, la stimulation du système immunitaire opère à la fois dans les follicules lymphoïdes du MALT pour une action in situ mais aussi vers les ganglions lymphoïdes périphériques empruntant le canal thoracique provoquant une réponse systémique. Par la suite, ces LT activés peuvent revenir dans les ganglions mésentériques pour entretenir cette réponse locale. Les épithéliums pluristratifiés induisent quant à eux majoritairement des réponses systémiques avec une activation extra folliculaire (119,181).

La morphologie de ces sites est marquée ponctuellement par l'enclassement de cellules M (182,183) près des régions fortement infiltrées en follicules. Ces entités divergent des épithéliums classiques : l'absence de villosité, une bordure en brosse irrégulière et la couche de mucus plus fine facilitent l'endocytose des antigènes présents dans la lumière qui seront ensuite transmis aux CPAg (macrophages et DC à proximité) par transcytose.

Bien que ces cellules soient spécialisées dans l'échantillonnage des antigènes, cette charge peut être partagée avec d'autres. Les pseudopodes des DC infiltrés dans les épithéliums peuvent procéder à cette captation (180) et les possibles transferts des complexes Ig G – Ag de la lumière vers les DC grâce aux FcRn présents sur le pôle apical des cellules épithéliales complètent l'action des cellules M.

Les CPAg migrent alors vers les follicules sous-jacents ou les ganglions périphériques dans le but d'activer les lymphocytes. Cette étape est cruciale dans l'homéostasie intestinale car ces cellules doivent discriminer les antigènes commensaux de ceux issus des pathogènes.

Cette balance est sous la gouvernance des DC résidant dans les muqueuses qui tolèrent les micro-organismes en induisant la genèse de lymphocytes T régulateurs sécréteurs d'IL-10 conduisant à une immunosuppression locale accompagnée d'une légère réponse TH2 (184). *A contrario*, la reconnaissance de motifs particuliers associés aux PAMPs constitue des signaux de danger conduisant à la différenciation TH1 / TH2 (**Figure 20**).



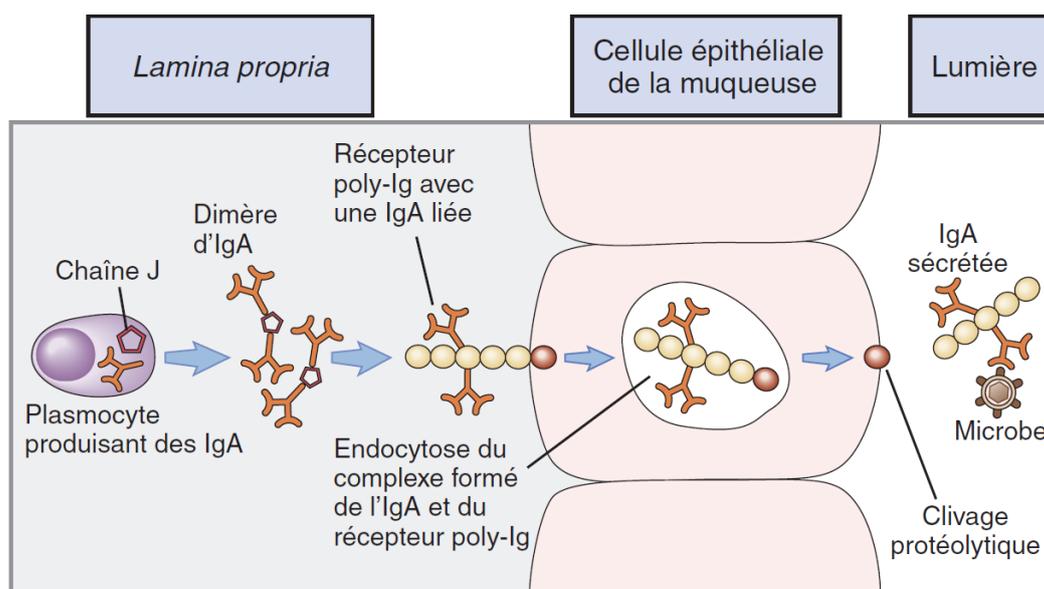
**Figure 20.** Réponse immunologique en présence d'une bactérie commensale ou pathogène (185).

## b) Induction des Ig A et migration vers les sites effecteurs

Les étapes de maturation des lymphocytes se déroulent dans ces follicules de façon similaire à celles décrites préalablement nécessitant la coopération entre les CPAg, les LB et les LT. En effet, le profil cytokinique de ces lymphocytes (IL-4, IL-5) ou des DC résidant dans les muqueuses qui expriment nativement BAFF (B-cell Activating Factor) favorisent la commutation des Ig M vers les Ig A (186).

Par la suite les plasmocytes se répartissent dans la *lamina propria* des sites effecteurs afin de sécréter les Ig A dimériques (association de 2 monomères stabilisées par une chaîne J) spécifiques du pathogène (**Figure 21**). Celles-ci sont reconnues par le PlgR (Polymeric Immunoglobuline Receptor) permettant aux immunoglobulines de traverser la lame basale pour rejoindre la lumière des muqueuses.

Par ce mécanisme, les Ig A permettent non seulement la neutralisation des virus intracellulaires mais renforcent aussi le blocage des pathogènes dans le mucus tout en excluant les antigènes qui ont franchi la barrière des muqueuses.



**Figure 21.** Libération des Ig A dans la lumière des muqueuses (146).

De nombreuses migrations entre les ganglions périphériques, les sites effecteurs et inducteurs surviennent pour combattre les pathogènes mais aussi pour favoriser la création d'une mémoire immunitaire. Ce trafic permet de conceptualiser les différentes muqueuses comme un seul et même tissu d'un point de vue immunitaire. Propriété intéressante pour une application vaccinale car il est admis qu'une stimulation pour une muqueuse particulière pourrait induire une protection systémique avec sécrétion d'Ig A et G en provoquant la migration des plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines à distance des sites infectés (187,188).

L'adressage dans ces muqueuses de ces lymphocytes activés se fait sous la responsabilité de molécules de homing exprimées sur ces cellules. Ainsi la présence

du CCR9 et de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  délocalisera ces cellules vers le tractus gastro intestinal exprimant les ligands CCL5 et MADCAM-1 (Mucosal vascular Addressin Cell Adhesion Molecule) (189) alors que la coopération CCR10 – CCL28 et  $\alpha 4\beta 1$  – VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) fera migrer ces cellules vers les muqueuses respiratoire et génitale (188,190).

### *c) Le GALT et le NALT*

Les muqueuses gastro-intestinale et nasale présentent quelques particularités du MALT appelées respectivement GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) et NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue).

Le GALT est un tissu lymphoïde très riche en LB dont le taux dépasserait le cumul le reste du système immunitaire. Sa particularité réside dans les sites inducteurs appelés plaques de Peyer organisées en dôme et présentes du pylore jusqu'au colon.

Comparativement les structures inductrices du NALT sont situées sous l'anneau de Waldeyer (191). Leur agencement est similaire mais comporte moins de cellules M compensé par la densité accrue des DC infiltrées (174,192).

Ces organisations possèdent de nombreuses connexions avec les canaux lymphatiques environnants accroissant les migrations vers les ganglions méésentériques et cervicaux sièges des réponses mémoires. Ces configurations particulières expliquent l'intérêt porté par de nombreuses équipes à mettre au point des vaccins administrables par les muqueuses.

## IV. Les nanoparticules en vaccination par voie muqueuse

Bien qu'étudiés depuis plusieurs dizaines d'années, seulement 25 nano-médicaments possèdent actuellement une AMM sur notre marché national. Récemment, cette catégorie s'est étoffée de plusieurs spécialités à visée vaccinale propulsant les nanoparticules au-devant de la scène internationale.

Dans le but d'estimer les avancées des recherches menées sur ce groupe de médicaments, une revue de la littérature scientifique a été effectuée en suivant les recommandations de la check list PRISMA (193) en mai 2022. En somme, nous souhaitons aussi évaluer les résultats obtenus et lister les avantages et inconvénients d'une administration sur les muqueuses, voie privilégiée par la nanoparticule du laboratoire.

### 1. Méthodologie de recherche

A cette fin, une requête a été soumise aux moteurs de recherche Medline. Les termes MeSH « Polysaccharides », « Lipids », « Polymers », « Nanoparticle », « Liposome », « Nanoemulsion », « Vaccination », « Vaccines », « Mucous Membrane », « Administration » ont été combinés selon l'algorithme décrit dans l'organigramme de la **figure 22**.

Nous avons limité notre champ d'investigation aux articles en anglais datant de moins de 10 ans traitant des nanoparticules à visée vaccinale administrées par les muqueuses. De plus, les revues et les articles n'abordant pas les réponses immunitaires induites ou présentant uniquement des résultats sur cellules ainsi que des modèles animaux peu pertinents pour ce type de vaccination furent exclus. En outre, les vaccinations à visée thérapeutique anti-cancéreuse, cardiologique, antiallergique ou sans protéine immunogène furent évincées. Pour terminer la méthodologie employée et la pertinence des objectifs ne furent pas des critères d'exclusion.

L'ensemble des articles extraits suite à notre requête a été répertorié selon différents paramètres : la voie d'administration, la composition de la nanoparticule et de l'antigène utilisés, le recours à un adjuvant, les quantités administrées, le schéma vaccinal employé, l'espèce vaccinée ainsi que le groupe contrôle constitué.

Les résultats décrits sur la dernière colonne des tableaux se font en comparaison du groupe contrôle. Une attention particulière a été apportée à la sécrétion d'immunoglobulines A, M, G marqueurs d'une immunité des muqueuses ou sériques. Les cytokines sécrétées par les cellules immunitaires après restimulation ont aussi été analysées afin de mettre en évidence le profil des lymphocytes effecteurs induit par cette vaccination. La prolifération des splénocytes après stimulation a été étudiée lorsque ce paramètre était rapporté dans l'article. En dernier point, la survie, les croissances virales, le nombre d'unités formant colonie ou les lésions induites après challenge ont été listées.

Les termes « augmentation », « diminution », « inférieur » font référence à des différences statistiquement significatives rapportées dans les articles sélectionnées. A contrario, les termes « identique » et « aucun effet » relatent une absence de différence statistique avec le groupe contrôle répertorié dans l'avant dernière colonne du tableau.

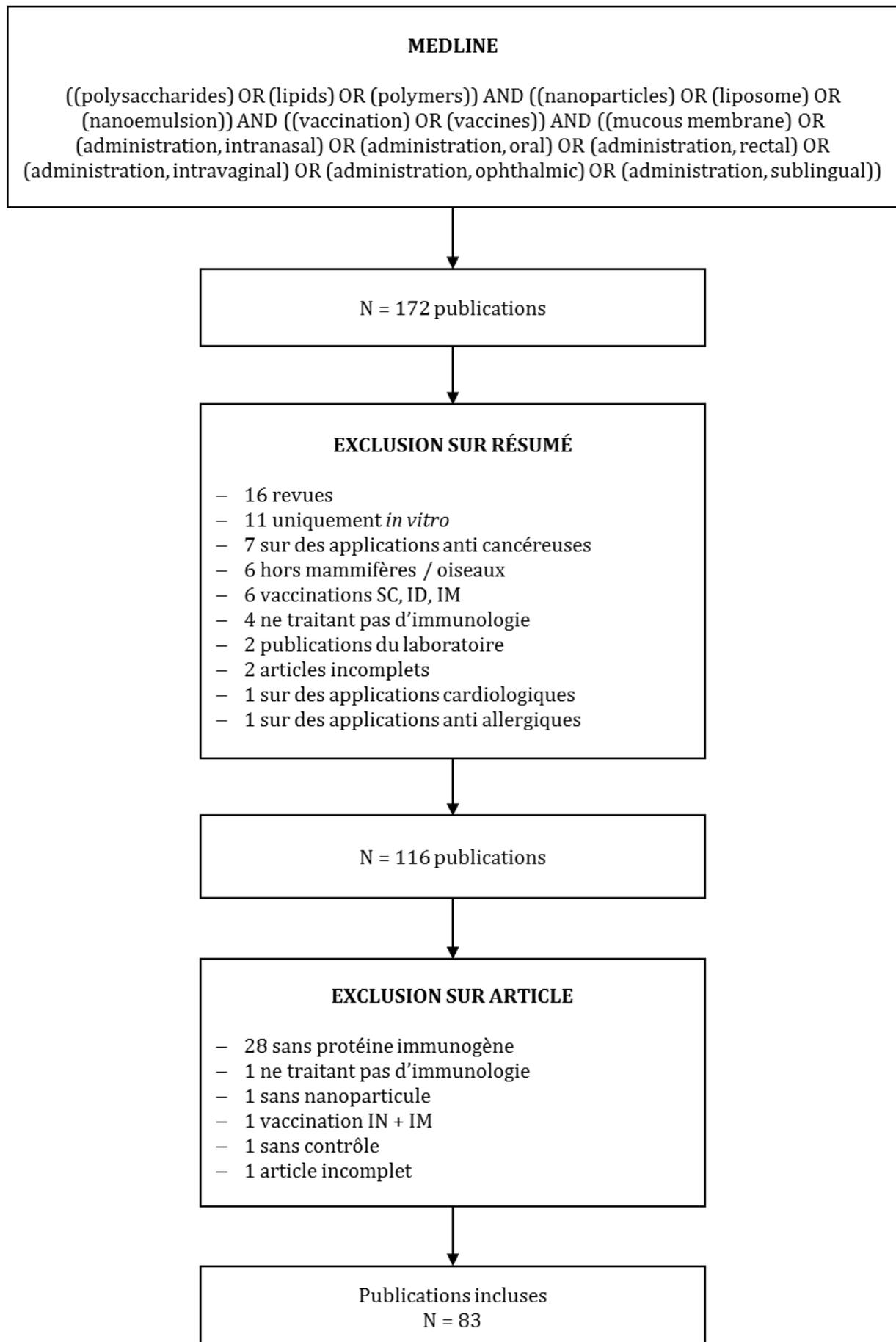
Ces articles n'étant pas menés chez l'Homme, l'objectif primaire n'est pas clairement énoncé. Ainsi, la diversité des paramètres rapportés ci-dessus empêchent toute construction de méta-analyse ou régression logistique multivariée. En conséquence, les constats écrits en partie IV.3 suite aux tableaux ne peuvent être que descriptifs sans fondement statistique.

## 2. Articles sélectionnés

Au total, 172 articles ont été intégrés dans notre champ de recherche et 83 études ont été sélectionnées dans cette revue systématique suite aux différentes étapes d'exclusion présentées dans la Figure 22.

Au sein de notre sélection, 26 études (31%) concernent l'administration orale (Tableau VI) contre 55 (66%) pour la voie nasale (Tableau VII) et 2 exceptions (3%) traitant de la voie rectale et de la voie oculaire (Tableau VIII). La majorité des articles portait sur des modèles murins (77%) suivis par des études aviaires (11%) puis le groupe des animaux de rentes (12%).

La Check List PRISMA permet une sélection rigoureuse des articles selon une méthodologie bien décrite. Cependant, la conception de l'algorithme soumis au moteur de recherche Medline peut être un point critiquable mais néanmoins nécessaire à l'acquisition d'articles traitant d'un sujet commun. En effet, le choix des mots clés issus de la banque de données MESH ainsi que des opérateurs de liaison (OR / AND) peuvent exclure certains articles n'employant pas ces mots clés (ou leurs dérivés terminologiques sous jacents) (194) ou ne répondant pas aux trois parties de l'algorithme (195) alors qu'ils s'inscrivent bien dans cette thématique.



**Figure 22.** Organigramme des études sélectionnées.

**Tableau VI.** Résumé des articles sélectionnés avec une administration par voie orale (4 pages + légende)

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe Contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Keikha (196)	Liposome (L)	ARN de protéine S (Coronavirus)	/	0,1 à 10 µg	J1, 21	Ag	Concentrations en Ig A et G augmentent de façon dose dépendante mais sans être améliorées par la NP Profil TH1 identique (Ig G2a / Ig G1 > 1 et sécrétion IFN $\gamma$ par les splénocytes restimulés augmentée) $\Rightarrow$ <b>Aucun effet constaté de la NP</b>
Han (197)	Chitosan (P)	Protéines OMP, FLA (S. non typhii)	/	25+25 µg	J1, 14	Ag	Expressions TLR 1, 4, 5 supérieures au niveau des amygdales Prolifération augmentée des splénocytes après restimulation $\Rightarrow$ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig A</b>
Renu (198)	Chitosan (P)	Protéines OMP, FLA (S. enteritidis)	/	50 à 500 µg	J1	Ag	Concentration en Ig A anti FLA intestinale augmentée Nombre d'UFC inférieur dans le caecum après challenge
Han (199)	Chitosan (P)	Protéines OMP, FLA (S. enteritidis)	/	5 à 25 µg	J1, 21, 28	Ag	Concentrations en Ig A et G augmentées Profil TH1 augmenté (prolifération plus importante des LT CD3+CD8 $\alpha$ +, CD3+TCR $\gamma$ $\delta$ -CD8 $\alpha$ +, CD3+TCR $\gamma$ $\delta$ +CD8 $\alpha$ -sécréteurs d'IFN $\gamma$ ) Nombre d'UFC inférieur dans le caecum après challenge
Akerele (200)	Chitosan (P)	Protéines ECP+FLA (C. perfringins)	CT	50 µg	J1, 3, 7, 14	Ag - NP - CT	Concentrations en Ig A et G anti ECP augmentées Prolifération augmentée des splénocytes après restimulation Aucun effet constaté de l'adjuvant
Renu (201)	Chitosan (P)	Protéines OMP, FLA (S. enteritidis)	/	50 + 50 µg	J1, 21, 42	Ag	Concentrations en Ig A intestinales anti OMP augmentées Profil TH1 augmenté (concentration en IFN $\gamma$ sérique supérieure) Prolifération augmentée des splénocytes après restimulation

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe Contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Akbari (202)	Chitosan (P)	Protéine rNipaD (S. flexneri)	/	500 µg	J1, 24, 28	NP	Concentrations en Ig A intestinales, oculaires et Ig G augmentées Signes cliniques oculaires diminués après challenge
Sahu (203)	Emulsion (L)	Protéine HbS (Hépatite B)	MPLA	2,5 à 10 µg	J1, 14	Genhevac®	Concentrations en Ig A augmentées avec 10µg ⇒ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G</b>
Liu (204)	PBCA (P)	Protéine CCF (H. pylori)	/	100 µg	J1, 7, 14, 21	Ag + alun	Concentrations en Ig A gastriques, G et M augmentées Profil TH1 et Th17 augmentés (sécrétions d'IFNγ et IL-17 par les splénocytes restimulés augmentées) Nombre d'UFC gastriques inférieur après challenge
Sahu (205)	Eudragit - PVA (P)	Protéines HbS (Hépatite B)	MPLA	2,5 à 10 µg	J1, 14	Genhevac®	Concentration en Ig A sériques augmentée ⇒ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G</b>
Du (206)	PLGA-UEA1 (P)	ADN ORF5 (PPRSV)	/	500 µg	J1, 14	Ag	Concentration en Ig A intestinales augmentée avec NP + UEA-1 ⇒ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G</b>
Abkar (207)	TMC (P)	Protéine OMP-31 (B. melitensis)	/	75 µg	J1, 7, 14	NP - Ag en IP	Concentration en Ig A augmentée Profil TH1 identique (sécrétion d'IFNγ par les splénocytes restimulés identique à l'Ag + Adjuvant de Freund ou NP - Ag en IP) Profil TH17 augmenté (sécrétion d'IL-17 par les splénocytes restimulés augmentée) Nombre d'UFC spléniques inférieur après challenge Prolifération augmentée des splénocytes après restimulation ⇒ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G</b>

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe Contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Lee (208)	β-glucan GRGDS (P)	Protéine PR8 (Grippe)	/	100 mg	J1, 2, 7, 8, 14	Ag	Concentrations en Ig A intestinales et Ig G augmentées
Tan (209)	PLGA-HP55 (P)	Protéine CCF (H. pylori)	/	100 µg	J1, 7, 14, 21	Ag + alun	Concentrations en Ig A, G, M augmentées Profils TH1, TH17 augmentés (sécrétions d'IFNγ, IL-17 et IL-6 par les LT spléniques augmentées) Nombres d'UFC gastriques inférieurs après challenge
Dinda (210)	PCL (P)	Protéine HbS (Hépatite B)	/	6,66 µg	J1	NP – Ag en IM	Concentration en Ig A augmentée Concentration en Ig G identique à l'IM
Marasini (211)	Liposome Chitosan Alginate (L/P)	Lipopeptides LCP-1 (S. pyogenes)	/	100 µg	J1, 14, 28	Liposome – Ag	Concentration en Ig A salivaires augmentée ⇒ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G</b> ⇒ <b>Absence de maintien des Ig sur le long terme</b>
Biswas (212)	Chitosan (P)	Protéine virale (Rougeole)	/	20 µg	J1, 7, 14, 28	Ag en SC	Concentration en Ig A intestinales augmentée ⇒ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G</b>
Wang (213)	Liposome (P)	Protéine HbS (Hépatite B)	Lipide A	0,5 µg	J1	Ag + alun en SC	Concentrations en Ig A salivaires et vaginales augmentées Concentration en Ig G identique à la SC Profil TH1 augmenté (Ig G2a / Ig G1 > 1 et sécrétions IFNγ sérique et par les splénocytes restimulés augmentées) Prolifération des splénocytes identique à la SC
Shrestha (214)	Chitosan-PVA	Protéine HbS (Hépatite B)	/	6 µg	J1, 28	Ag en IM	Concentration en Ig G identique à l'IM

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe Contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Barhate (215)	Sels d'or – Chitosan (Métallique)	Toxine (C. tetani)	ARE	/	J1, 14, 28	Ag + ARE	Concentrations en Ig A intestinales, fécales, sériques et Ig G sériques augmentées Effets intensifiés par l'adjuvant
Harde (216)	Chitosan – Mannose (P)	Toxine (C. tetani)	/	5 lf	J1, 21	Ag en IM	Concentrations en Ig A salivaires, intestinales et fécales augmentées Concentration en Ig G identique à l'IM Profil TH1 augmenté (concentrations en IFN $\gamma$ et d'IL-2 augmentées dans le lysat splénique)
Kaur (217)	Gomme Guar (P)	Protéine 85A (M. tuberculosis)	/	10 $\mu$ g	J1, 21	Ag	Concentrations en Ig A nasales, vaginales, salivaires et Ig G augmentées Profil TH1 augmenté (Ig G2a / Ig G1 > 1)
Mishra (218)	Chitosan (P)	Protéine HbS (Hépatite B)	LTA	10 $\mu$ g	J1, 14	Ag + alun	Concentrations en Ig A salivaires, intestinales et vaginales augmentées Concentration en Ig G identique Profil mixte TH1 et TH2 augmenté (concentrations en IFN $\gamma$ et d'IL-2 augmentées dans le lysat splénique mais Ig G2a / Ig G1 < 1)
Oliveira (219)	Chitosan-alginate (P)	Protéine SmRho (S. mansoni)	CpG	50 + 10 $\mu$ g	J1, 14, 28	Ag en IM	⇒ Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G ⇒ Aucun effet de la NP sur la diminution des lésions après challenge
Barhate (220)	Sels d'or – Chitosan (Métallique)	Toxine (C. tetani)	QS	20 lf	J1, 14, 28	Ag + QS	Concentrations en Ig A sériques, intestinales, fécales et Ig G augmentées Effets intensifiés par l'adjuvant
Oliveira (221)	Chitosan (P)	ADN Rho1 (S. mansoni)	/	25 $\mu$ g	J1	PBS	⇒ Aucun effet constaté de la NP

## LEGENDE DU TABLEAU :

Animal d'étude : Souris / **Rat** / Poulet / Cochon d'inde

Type de nanoparticule : **L** = Lipidique / **P** = Polymérique

Composés : **PLGA** = Acide Poly-Lactique-co-Glycolique / **PBCA** = Poly(n-ButylCyanoAcrylate) / **UEA-1** = *Ulex europaeus agglutinin* 1 / **GRGDS** = Glycine-Arginine-Glycine-Aspartic acid-Serine / **PCL** = Polycaprolactone / **PVA** : Poly(Vinyl Alcohol) / **TMC** : TriMéthyl-Chitosan

Antigènes : **PPRSV** = Porcine reProductive and Respiratory Syndrome Virus

Adjuvants : **CPG** = Cytosine phospho Guanine / **VCG** = *Vibrio cholerae* Ghosts / **CT** = Toxine Cholérique / **MPLA** = MonoPhosphoryl Lipid A / **QS** = Quillaja Saponin / **ARE** = Asparagus racemosus extract / **LTA** = Lotus Tetragonolobus

**LF** : Limite de Flocculation

**Tableau VII.** Résumé des articles sélectionnés avec une administration par voie nasale (11 pages + légende)

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Dong (222)	Poly-ethylenimine (P)	Hémagglutinine (Grippe)	CpG	5 / 5 µg	J1, 28	Ag	Concentrations en Ig A nasales, broncho-alvéolaires et Ig G augmentées Profil mixte TH1 / TH2 augmenté (sécrétions augmentées en IFN $\gamma$ et d'IL-4 par les splénocytes et les cellules des ganglions périphériques restimulés, Ig G2a / Ig G1 > 1) Effet intensifié par l'adjuvant 100% de survie des sujets vaccinés après challenge Protection croisée avec d'autres sérotypes
Najafi (223)	Chitosan (P)	Protéine PPE17 (M. tuberculosis)	CpG	6 / 2 µg	J1, 14, 28	BCG	Profil mixte TH1 / TH2 / TH17 augmenté en boost du BCG (sécrétions augmentées en IFN $\gamma$ , IL-4 et IL-17 par les splénocytes restimulés) ⇒ Aucun effet de la NP en prime ⇒ Aucun effet de la NP en nasal
Nelson (224)	Lipoprotéine (L)	Virus atténué (Grippe)	CpG	5 / 5 µg	J30 (boost de l'Ag)	Ag	LT CD4+ résidents mémoires augmentés dans toutes les voies aériennes Profil TH1 augmenté (sécrétion augmentée en IFN $\gamma$ par les splénocytes restimulés) Persistance de ces LT CD4+ mémoires après la vaccination 100% de survie des souris non vaccinées challengées ayant reçu les LT CD4+ des souris vaccinées
Zuo (225)	Chitosan (P)	Bactérie atténuée (C. psitacci)	VCG	10 <sup>6</sup> UFC / 25 à 100 µg	J1, 14	Ag	Concentration en Ig G augmentée Profil TH1 augmenté (concentrations en IFN $\gamma$ et d'IL-2 augmentées dans le lavage broncho alvéolaire) Nombre d'UFC et de lésions pharyngées inférieures après challenge Effets intensifiés par l'adjuvant de façon dose dépendante

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Dumkliang (226)	Chitosan (P)	Virus inactivé (Encéphalite Japonaise)	/	/	J1	Ag	Concentrations en Ig A salivaires et nasales augmentées Profil TH1 augmenté (sécrétion augmentée en IFN $\gamma$ par les splénocytes restimulés) $\Rightarrow$ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G</b>
Dong (227)	Poly-ethylenimine graphène (P)	Hémagglutinine (Grippe)	CpG	5 / 5 $\mu$ g	J1, 28	Ag	Concentrations en Ig A nasales, broncho-alvéolaires et Ig G augmentées Profil TH2 augmenté (sécrétion augmentée en IL-2 par les splénocytes et les cellules des ganglions cervicaux restimulés) 100% de survie des sujets vaccinés après challenge Protection croisée avec d'autres sérotypes Pas d'effet supplémentaire de l'adjuvant
Yuki (228)	Pullulane (P)	Protéine A (S. pneumoniae)	/	20 $\mu$ g	J1, 7, 49	Ag	Concentration en Ig A nasales augmentée $\Rightarrow$ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G</b>
Ni (229)	PLGA (P)	Protéine ArgF (M. bovis)	/	50 $\mu$ g	J28, 42, 56 (boost du BCG)	Ag	Concentrations en Ig A broncho-alvéolaire et Ig G augmentées Profil TH1 augmenté (sécrétion augmentée en IFN $\gamma$ par les splénocytes restimulés) Prolifération des LT CD4+ spléniques augmentée Nombres d'UFC et de lésions pulmonaires inférieurs après challenge

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Li (230)	Chitosan (P)	Protéine NMB0315 (N. meningitidis)	CpG	30 / 15 µg	J1, 7, 14, 21	Ag	Concentrations en Ig A nasales, vaginales et Ig G augmentées Profil mixte TH2 / TH17 augmenté (sécrétion augmentée en IL-4 et IL-17 par les splénocytes restimulés) Profil TH1 augmenté uniquement avec NP + adjuvant (sécrétion augmentée en IFN $\gamma$ par les splénocytes restimulés, Ig G2a / Ig G1 > 1) Survie augmentée après challenge avec effet synergique de l'adjuvant et de la NP
Zhao (231)	Héparine / Chitosan (P)	Lipopeptides LCP 1, 2, 3 (S. pyogenes)	/	30 µg	J1, 14, 28	Ag + CT	Concentrations en Ig A salivaires et Ig G identiques
Weilhammer (232)	Lipoprotéine (L)	6 Protéines (B. anthracis)	MPLA	10 / 0,1 µg	J1, 28, 56	Ag	Concentrations en Ig A sériques et broncho-alvéolaires augmentées avec les protéines BclA et BclB Concentrations en Ig G sériques et broncho-alvéolaires augmentées avec les 6 protéines Effet synergique de l'adjuvant et de l'administration des 6 protéines simultanément (NP + 6 protéines) Profil TH17 augmenté avec les protéines ExsK et EA1 (sécrétion accrue d'IL-17 par les LT pulmonaires restimulés)
Hosseini (233)	Chitosan (P)	Entérotoxine (S. aureus)	/	10 à 20 µg	J1, 14, 28, 42	Ag	⇒ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig A et G</b>

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Hajam (234)	Chitosan (P)	Protéines HA2-HA1 et M2e ARN HA2 et M2e (Grippe)	/	33 + 33 µg	J1, 21	NP	Concentrations en Ig A broncho-alvéolaires et Ig G anti HA augmentées  Effet synergique de l'ARN sur les résultats suivants : Concentrations en Ig A broncho-alvéolaires et Ig G anti M2e augmentées Prolifération des splénocytes augmentée Réplication virale diminuée après challenge
Renu (235)	Chitosan (P)	Virus Inactivé (Grippe)	Poly(I :C)	300 / 300 µg	J1, 21	Flusure®	Stimulation des LT mémoires identique Profil TH1 identique (prolifération augmentée des LT CD3+CD4+CD8α+ et LT γδ+ sécréteurs d'IFNγ, sécrétion augmentée en IFNγ et IL-2 par les cellules des ganglions bronchiques) Réplication virale et lésions pulmonaires identiques après challenge
Li (236)	Chitosan (P)	Protéines (C. psitacci)	/	40 µg	J1, 14, 28	NP + Ag en IM	Concentrations en Ig A nasales, vaginales, Ig G identiques Prolifération des splénocytes identique Profils mixte TH1 / TH2 identiques (proliférations identiques des LT CD4+ sécréteurs d'IL-4 ou d'IFNγ, sécrétions identiques en IFNγ, IL-2 et IL-4 par les splénocytes restimulés) Nombre d'UFC pulmonaires identique après challenge
Najminejad (237)	Chitosan (P)	Toxine + Hémagglutinine (B. pertussis)	/	6 + 6 µg	J1, 28	Ag + alun	Concentration en Ig A nasales supérieure Concentration en Ig G identique Profil mixte TH1 / TH17 augmenté (sécrétions augmentées en IFNγ, IL-17 par les splénocytes restimulés)

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Soh (238)	Chitosan (P)	Protéine Mdh (B. abortus)	/	30 µg	J1, 14, 28	NP	Concentrations en Ig A nasales, génitales, intestinales, sériques et Ig G augmentées Profil TH2 augmenté (sécrétion augmentée en IL-4 par les splénocytes restimulés)
Alkie (239)	PLGA + Mannane Ou Chitosan (P)	Hémagglutinine (Grippe)	CpG	2 µg	J1, 14	Ag	Concentrations en Ig A lacrymales et Ig G augmentées Effet identique pour tous les composés des NP
Khademi (240)	PLGA (P)	Protéine HspX/EsxS (M. tuberculosis)	MPLA	10 / 1 µg	J1, 14, 28	Ag + Ad	Concentrations en Ig A nasales (primo vaccination et boost) et Ig G1, 2a supérieures (primo vaccination) Effet intensifié par l'adjuvant Profil TH1 augmenté en primo vaccination (sécrétion augmentée en IFNγ par les splénocytes restimulés) Profil mixte TH2 / TH17 en boost (sécrétion augmentée en IL-4 et IL-17 par les splénocytes restimulés) Effets intensifiés en booster du BCG
Nevagi (241)	PGA-TMC (P)	Protéine J8P (S. pyogenes)	/	10 µg	J1, 21, 42	Ag + CT	Concentrations en Ig A salivaires et Ig G augmentées Nombre d'UFC naso-pharyngées inférieur après challenge
Tada (242)	Liposome (L)	Protéine Psp A (S. pneumoniae)	/	5 µg	J1, 7, 14	Ag	Concentrations en Ig A nasales, pulmonaires, vaginales et Ig G augmentées 100% de survie après challenge Profil mixte TH1 / TH2 / TH17 augmenté (sécrétion augmentée en IL-4, IL-17 et IFNγ par les splénocytes restimulés, Ig G2a / Ig G1 < 1)

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Dhakal (243)	Chitosan (P)	Virus atténué (Grippe)	/	10 <sup>7</sup>	J1, 21	Ag	Profil TH1 augmenté (sécrétion augmentée en IFN $\gamma$ et augmentation expression T-bet par les LT des ganglions trachéaux) ⇒ Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig ⇒ Aucun effet de la NP lors du challenge
Dabaghian (244)	TMC (P)	Protéines 4M2e, 4 M2e.HSP70c (Grippe)	/	10 $\mu$ g	J1, 14	Ag (4M2e)	Concentrations en Ig A broncho-alvéolaires et Ig G augmentées Profil TH1 augmenté (sécrétion augmentée en IFN $\gamma$ par les splénocytes restimulés) ⇒ Aucun effet de la NP sur ces résultats 100% de survie après challenge
Wu (245)	Chitosan Mannosylé (P)	ADN pPES (M. tuberculosis)	/	50 $\mu$ g	J1, 14, 28, 42	BCG	Concentration en Ig A broncho-alvéolaires augmentée Profil TH1 (sécrétions augmentées en IFN $\gamma$ par les splénocytes restimulés, prolifération augmentée des LT CD4+ et CD8+ pulmonaires sécréteurs d'IFN $\gamma$ ou d'IL-2) ⇒ Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G ⇒ Aucun effet de la NP sur la survie
Zhao (246)	TMC (P)	Virus atténué (Coronavirus aviaire)	/	/	J1	Vaccin référence	Concentrations en Ig A trachéales et Ig G augmentées Profil mixte TH1 / TH2 augmenté (sécrétions augmentées en IFN $\gamma$ , IL-4 par les splénocytes restimulés)

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Chowdhury (247)	PGA - Chitosan (P)	Protéine M2HA2 (Grippe)	CTA1	2 µg	J1, 14, 28	Ag	Concentrations en Ig A pulmonaires, intestinales, Ig G1 et Ig G2a augmentées Profil mixte TH1, TH2 augmenté (prolifération augmentée des splénocytes sécréteurs d'IFNγ ou IL-4) Effets intensifiés par l'adjuvant 100% de survie et réplication virale pulmonaire inférieure après challenge avec NP-Adjuvant Protection contre différents sérotypes
Dhakal (248)	CPTEG CPH (P)	Virus Inactivé (Grippe)	/	10 <sup>7</sup>	J1, 21	Ag	Profil TH1 augmenté (prolifération augmentée des LT CD3+CD4+ et CD3+CD8α+ sécréteurs d'IFNγ) ⇒ Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig ⇒ Aucun effet de la NP sur les lésions après challenge
Dhakal (249)	PLGA (P)	Virus Inactivé (Grippe)	/	10 <sup>7</sup>	J1, 21	Ag	Profil TH1 augmenté (prolifération augmentée des LT CD3+CD4+ et CD3+CD8α+ sécréteurs d'IFNγ) ⇒ Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig ⇒ Aucun effet de la NP sur les lésions après challenge
Pirouzmand (250)	Chitosan (P)	Toxine (C. tetani)	CDM	40 lf / 5 mg	J1, 14, 28	Ag + alun	Concentrations en Ig A nasales et Ig G augmentées
Genta (251)	PLGA (P)	Protéine CNA19 (S. aureus)	CpG	1 à 10 µg	J1, 14, 28	Ag en SC	Aucun effet de l'adjuvant ⇒ Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig
Marasini (252)	PLGA-TMC-Dextran (P)	Lipopeptides LCP-1 (S. pyogenes)	/	10 µg	J1, 14, 28	Ag + CT	Concentrations en Ig A salivaires et Ig G augmentées

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Marasini (253)	PLGA (P)	Lipopeptides LCP-1 (S. pyogenes)	/	10 µg	J1, 14, 28	Ag	Concentrations en Ig A salivaires et Ig G augmentées
Li (254)	PLGA Chitosan Mannane (P)	Protéine HbS (Hépatite B)	/	20 µg	J1, 21, 42	Ag + Alun	Concentration en Ig G identique Profil TH1 augmenté (sécrétion augmentée en IFNγ et IL-2 par les splénocytes restimulés)
Amirnasr (255)	Chitosan (P)	Protéines ENV-13 et 23 (Virus HTLV-1)	/	7,5 µg	J1, 14, 28	Ag en SC	⇒ <b>Aucun effet de la NP</b>
Li (256)	TMC (P)	ADN wapA (S. mutans)	/	100 µg	J1, 7, 14, 21	Ag en IM	Concentration en Ig A salivaires augmentée Concentration en Ig G identique Lésions dentaires inférieures après challenge
Ghaffar (257)	Liposome (L)	Protéines P25 et J14 (sous unité de LCP-1) (S. pyogenes)	/	60 µg	J1, 21, 42	Ag + CT	Concentrations en Ig A salivaires et Ig G1 augmentées avec NP-LCP1 Maintien des Ig 6 mois post-vaccination
Jesus (258)	PCL Chitosan (P)	Protéine HbS (Hépatite B)	/	1,5 à 10 µg	J1, 7, 21	Ag	⇒ <b>Aucun effet de la NP</b>
Lebre (259)	Chitosan (P)	ADN HbS (Hépatite B)	/	50 µg	J1, 7, 21	Ag	Concentration en Ig G augmentée ⇒ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig A</b>
Pavot (260)	PLA + CL235 ou CL365 (P)	Protéine p24 (VIH)	/	10 µg	J1, 7, 14, 28	Ag + Alun ou LT	Concentrations en Ig A vaginales et Ig G sériques identiques avec NP-CL365

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Nagatomo (261)	Pullulane (P)	Hémagglutinine (Grippe)	TNF $\alpha$	0,3 / 5 $\mu$ g	J1, 7, 14, 21	Ag + CT	Concentrations en Ig A nasales et Ig G1 sériques augmentées Profil mixte TH1/ TH2 (sécrétion d'IL4 augmentée par les splénocytes restimulés et d'IFN $\gamma$ par les cellules du NALT) Stimulation des splénocytes augmentée Survie identique après challenge
Liu (262)	TMC (P)	Protéines H1N1 (Grippe)	/	1 $\mu$ g	J1, 14, 28	Ag + Alun	Concentrations en Ig A naso-pharyngées et bronchiques augmentées Concentration en Ig G identique
Bento (263)	Chitosan (P)	Protéines PA (B. anthracis)	C48/80	2,5 $\mu$ g	J1, 14, 28	Ag	Concentrations en Ig A nasales augmentées intensifiées par l'adjuvant Concentrations en Ig G augmentées sans effet de l'adjuvant Profil TH1 augmenté intensifié par la NP (sécrétion d'IFN $\gamma$ augmentée par les splénocytes restimulés)
Xu (264)	Chitosan (P)	Protéine PsaA (S. pneumoniae)	/	15 $\mu$ g		Ag	Concentrations en Ig A nasales, pulmonaires, auriculaires et Ig G augmentées Profil mixte TH1 / TH2 / TH17 augmenté (sécrétions d'IFN $\gamma$ , IL-4, IL-17 augmentées par les splénocytes restimulés) 100% de survie et lésions histologiques tympaniques inférieures après challenge
Pan (265)	Chitosan - PLGA / Tréhalose	ADN Virus inactivé (Entérovirus)	/	1 mg (Virus) ou 15 à 30 $\mu$ g (ADN)	J1, 4, 7	Ag en IM	Concentrations en Ig A nasales et sériques augmentées Concentration en Ig G identique Prolifération des LT CD4+ plus importante que LT CD8+

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Pawar (266)	Chitosan - Glycol (P)	Protéine HbS (Hépatite B)	/	10 µg	J1, 21	Ag + Alun	Concentrations en Ig A salivaires, nasales et vaginales augmentées Concentration en Ig G identique Profil TH1 augmenté (sécrétions d'IFN $\gamma$ augmentées par les splénocytes restimulés)
Sawaengsak (267)	Chitosan (NP)	Hémagglutinine (Grippe)	/	1 µg	J1, 21	Ag	Concentrations en Ig A nasales, pulmonaires et Ig G augmentées Profil TH1 augmenté (prolifération augmentée des splénocytes sécréteurs d'IFN $\gamma$ ) 100% de survie après challenge
Chen (268)	Liposome Chitosan (NP)	ADN pGJA-P/VAX (S. mutans)	/	25 µg	J1, 14	Ag en IM	Concentrations en Ig A salivaires et vaginales augmentées Concentration en Ig G identique
Pawar (266)	PLGA - Glycol (P)	Protéine HbS (Hépatite B)	/	10 µg	J1, 14	Ag + alun	Concentrations en Ig A salivaires, nasales et vaginales augmentées Concentration en Ig G identique Profil TH1 augmenté (prolifération augmentée des splénocytes sécréteurs d'IFN $\gamma$ et d'IL-2)
Dwivedi (269)	PLGA (P)	Virus atténué (PPRSV)	/	5 * 10 <sup>6</sup>	J1	Ag	Profil TH1 augmenté (concentration en IFN $\gamma$ sérique et pulmonaire) ⇒ Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig A
Camacho (270)	PVM/MA (P)	Protéine OMV (S. flexneri)	/	10 à 20 µg 50 à 100 µg (oral)	J1	Ag	⇒ Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G et Ig A ⇒ Aucun effet sur la survie après challenge

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Tajdini (271)	Chitosan (P)	Virus inactivé (Entérovirus)	/	5*10 <sup>5</sup>	J1, 7, 14	Ag + Alun	Concentrations en Ig A bronchiques, intestinales augmentées Concentration en Ig G identique
Kong (272)	Pullulane (P)	Protéine PsaA (S. pneumoniae)	/	/	J1, 7, 14	Ag	Concentrations en Ig A nasales, pulmonaires et Ig G1 augmentées Profil mixte TH2 / TH17 augmenté (sécrétions d'IL-4 et IL-17 augmentées par les LT CD4+ spléniques et des ganglions lymphatiques) 100% de survie et nombres d'UFC nasales et pulmonaires inférieurs après challenge
Subbiah (273)	TMC (P)	Protéine HbS (Hépatite B)	/	10 µg	J1, 14, 28	Ag + Alun	Concentration en Ig A nasales augmentée ⇒ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G</b>
Moon (274)	PGA-Chitosan (P)	Hémagglutinine Virus inactivé (Grippe)	/	20 µg 1 µg	J1, 14, 28	Ag + CT	Concentration en Ig A pulmonaires identique Hémagglutinine plus efficace que le virus inactivé Profil mixte TH1 / TH2 identique (sécrétions d'IL-4 et IFNγ augmentées par les splénocytes restimulés) Survie identique après challenge ⇒ <b>Aucun effet de la NP sur la concentration en Ig G</b>
Tafaghodi (275)	TMC (P)	Protéine HbS (Hépatite B)	/	10 µg	J1, 14	Ag	Concentrations en Ig A nasales, vaginales et Ig G augmentées

## LEGENDE DU TABLEAU :

Animal d'étude : Souris / **Rat** / Poulet / Cochon d'inde / Lapin / Cochon / Bovin

Type de nanoparticule : **L** = Lipidique / **P** = Polymérique

Composés : **PLGA** = Acide Poly-Lactique-co-Glycolique / **PGA** = PolyGlutamic Acid / **CPH** = 1,6-bis(pCarboxyPhenoxy) Hexane / **CPTEG** = 1,8-bis(p-CarboxyPhenoxy)-3,6-dioxaocatane / **PCL** = Polycaprolactone / **PVM/MA** = Methyl Vinyl ether / Maleic Anhydride / **TMC** : TriMéthyl-Chitosan

Antigènes : **PPRSV** = Porcine reProductive and Respiratory Syndrome Virus / **HTLV-1** = Human T lymphotropic virus type 1

Adjuvants : **CPG** = Cytosine phospho Guanine / **CT** = Toxine Cholérique / **MPLA** = MonoPhosphoryl Lipid A / **CDM** = Cross-linked Dextran Microspheres

**LF** : Limite de Flocculation

**Tableau VIII.** Résumé des articles sélectionnés avec une administration par voies rectale ou oculaire

Auteurs	Composés (Type)	Antigènes (Pathogènes)	Adjuvants	Quantité Ag/Ad	Schéma Vaccinal	Groupe Contrôle	Résultats constatés avec les formulations (NP + Ag) par rapport au groupe contrôle
Sahu (276)	Liposome (L)	Protéine HbS (Hépatite B)	MPLA	10 µg	J1, 14 (R)	Genhevac®	Concentrations en Ig A salivaires, intestinales et vaginales augmentées Concentration en Ig G inférieure Profil TH1 augmenté (concentrations d'IFN $\gamma$ et IL-2 augmentées dans le lysat splénique)
Da Costa Martins (277)	PVM/MA - Mannose (P)	Protéine HS (B. ovis)	/	12 µg	J1 (O)	Ag en SC	Concentration en Ig A fécales augmentée Profil mixte TH1 / TH2 identique (sécrétions augmentées d'IL-2 et IL-4 par les splénocytes restimulés ou par les cellules des ganglions périphériques restimulés).

**LEGENDE DU TABLEAU :**

Animal d'étude : Souris / **Rat**

Administration : **R** = rectale / **O** = oculaire

Type de nanoparticule : **L** = Lipidique / **P** = Polymérique

Composés : **PVM/MA** = Methyl Vinyl ether / Maleic Anhydride

Adjuvants : **MPLA** = MonoPhosphoryl Lipid A

### 3. Analyse des articles

#### 1. Les nanoparticules

L'administration de nanoparticules métalliques et lipidiques (liposomes, lipoprotéines, émulsions) reste très minime par les muqueuses avec seulement 12 articles (16%) contre 72 (84%) portant sur les polymères avec en premier lieu les vecteurs à base de chitosan (49%) suivis par les PLGA / PGA / PLA (19%).

Ces résultats sont en contradiction avec les travaux menés sur l'injection parentérale de nanoparticules à visée thérapeutique (antibiotiques, chimiothérapies) ou prophylactique (vaccination à l'encontre du SARS-CoV2). En effet dans ces applications, les liposomes sont nettement plus représentés avec de nombreux essais cliniques en dermatologie, infectiologie et oncologie. Cette constatation se renforce lorsque l'on regarde le panel de 11 médicaments employant ces technologies en France avec entre autres : AMBISOME® (Amphotéricine-B), CAELYX® (Doxorubicine), COMINARTY® (ARN de protéine Spike) alors que seulement 2 médicaments : ABRAXANE® (Paclitaxel) et COPAXONE® (Glatiramer acetate) recourent à des polymères.

Ces polymères sont de plus différents de ceux décrits dans notre recherche car peu d'expériences sont menées en dehors des domaines vaccinaux sur le Chitosan ou les PLGA.

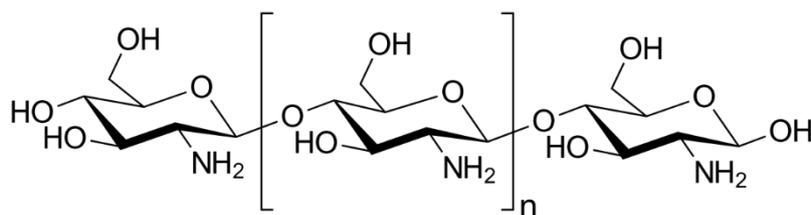
#### a) Le Chitosan

Le chitosan est fréquemment employé en nanomédecine, particulièrement pour les applications vaccinales par voies entérales. Ce polymère de D-glucosamine liée en  $\beta$ 1-4 (**Figure 23**) est obtenu après désacétylation chimique ou enzymatique de la chitine présente dans les squelettes des arthropodes ou céphalopodes.

Ce premier polymère a la faculté de se lier aux mucines négatives par liaisons électrostatiques avec ses groupements amines cationiques en condition acide. Le pKa du chitosan oscillant entre 6,3 et 6,7 en fonction du degré d'acétylation ; ces interactions peuvent survenir en condition physiologique avec un pH nasal situé entre 5,5 et 6,5 (278). Cependant, lors de survenue d'une rhinite, le milieu devient basique rendant impossible ces interactions ce qui pourrait altérer la performance de ce type de nanoparticule. Ainsi, ce paramètre n'est pas à négliger lors d'une administration chez l'Homme.

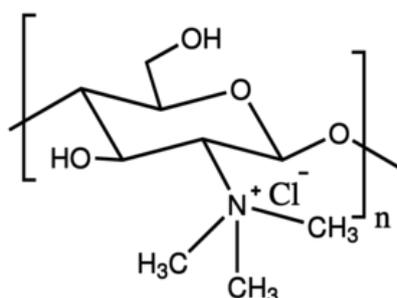
Bien que sa muco adhérence ralentisse sa pénétration dans le mucus (279), ces particules augmentent la biodisponibilité des antigènes vectorisés et ainsi améliorent leur immunogénicité. Néanmoins, ce polymère n'est pas parfait et son insolubilité dans l'eau due à la déprotonation de l'amine à pH physiologique limite l'association avec la fraction antigénique. Pour exemple, peuvent être citées les capacités d'encapsulations protéiques entre 2 et 5% (212,274) ou plus élevées de 13% mais avec une efficacité partielle (202). Défaut renforcé par l'instabilité de la liaison

avec les antigènes libérés en seulement quelques heures (200). Ces résultats sont donc plus une preuve de concept plutôt qu'une recherche transposable chez l'Homme.



**Figure 23.** Formule semi-développée du chitosan.

Afin d'accroître sa solubilité dans l'eau facilitant de ce fait ces paramètres, le triméthyl-chitosan a été synthétisé (**Figure 24**). Les effets de ce changement sont variables : on observe une capacité d'encapsulation dépendante de l'antigène allant de 23% (252) à 98% (273) avec une efficacité remarquable. Cependant la libération non contrôlée reste une problématique avec une diminution très rapide de la concentration antigénique dès les premiers jours (273) pouvant se stabiliser (207) ou s'empirer (246).



**Figure 24.** Formule semi-développée du tri(méthyl)-chitosan.

### *b) Les PLGA*

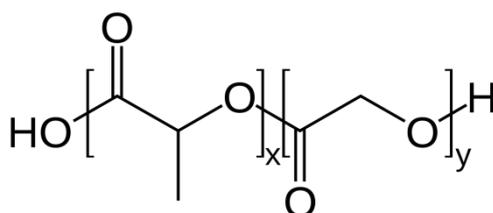
Les PLGA (acide poly(lactique-co-glycolique)) sont des polymères composées de deux types d'acides : les acides poly-lactiques et poly-co-glycoliques (**Figure 25**). En faisant varier le ratio entre ces deux parties et la quantité totale de ces résidus, on obtient un polymère de masse moléculaire extrêmement variable pouvant aller de quelques kDa à plusieurs centaines de kDa.

Les nanoparticules de PLGA sont certes moins fréquentes dans cette revue mais représentent une part non négligeable de recherches. Toutefois, ces polymères possèdent non seulement les carences du chitosan mais sont eux-mêmes instables sur le long terme indépendamment de toute association (auto-hydrolyse). La première difficulté reste les capacités d'encapsulations variables allant de 0,2% (240) à plus de 70% mais la plupart des études présentent un taux inférieur à 10% (229,254,260). De

plus, le taux d'association est à nouveau partiel s'étalant de 30 à 90% (209,229,254,260,266).

A nouveau, le relargage des antigènes vectorisés se fait précocement (254), pouvant s'étaler jusqu'à 15 jours (229) à un mois (239,249) mais se conclut à chaque fois par une libération totale de l'antigène dans le milieu de stockage. Bien que fâcheux, ce problème est souvent dépendant du pH et l'on déplore une libération immédiate à pH physiologique du principe actif alors qu'il n'en est rien lors d'un contact avec un milieu acide (209). De ce fait, la délivrance contrôlée de l'antigène dans un milieu plus basique tel que le jéjunum / iléon voire le cadre colique peut être envisagée sous couvert d'un maintien de l'intégrité de l'antigène vis-à-vis des agressions gastriques.

Contrairement au chitosan, les PLGA sont anioniques et ne présentent donc aucune liaison électrostatique avec les mucines. Pour outrepasser cette absence d'interaction, ce polymère est complété par du chitosane-glycol (266) ou du chitosan (247,252) en surface, ce qui accroît simultanément la stabilité colloïdale de la nanoparticule. Ce faisant, la taille des vecteurs augmente fortement pouvant atteindre le micromètre (239,254), les propriétés décrites des nanoparticules peuvent alors se transformer altérant l'intérêt de la vectorisation.



**Figure 25.** Formule semi-développée de l'acide poly(lactique-co-glycolique).

Quel que soit le polymère choisi, la problématique majeure de ces études reste la nécessité de synthèse de ces vaccins extemporanément à l'acte vaccinal. En effet dans ces articles, l'injection est effectuée juste après la préparation de ces vecteurs. Dans nos exemples, l'effet des conditions de stockage n'est pas étudié (température, humidité, exposition aux rayons UV). Ces procédés sont donc très éloignés de la vie réelle où l'entreposage des médicaments peut s'effectuer sur plusieurs années.

### *c) Le ciblage des cellules immunitaires*

Le dernier point intéressant dans la synthèse de ces vecteurs reste la possibilité de ciblage d'une population cellulaire en intégrant un agoniste lors de la formulation. Qu'il s'agisse de dérivés du mannose (216,239,245,254), d'agoniste des NLR (260) ou encore de lectine végétale d'UEA-1 composée de L-fucose reconnu par les cellules M (206,280), ces ajouts avaient pour finalité d'augmenter l'immunogénicité des vecteurs.

Le taux de réussite est malheureusement très variable. Pour exemple, les PLGA – UEA1 (206) induisent une augmentation des Ig A spécifiques de l'antigène supérieure aux PLGA seules mais n'influencent pas les Ig G alors que l'ajout d'agoniste NOD-2 à des nanoparticules de PLA (260) provoque une réponse humorale identique à la vaccination de l'antigène accompagné de sels d'aluminium.

Enfin, l'ajout de résidus mannose dans ces vecteurs n'induit aucun effet supplémentaire comparativement aux PLGA seules (239) mais peuvent aussi provoquer une réponse humorale identique à l'antigène injecté en intra musculaire seul (216) ou avec l'alun (254). Cette configuration présente même une réponse au challenge létal par *Mycobacterium tuberculosis* identique au BCG (245).

#### d) La problématique de la voie orale

Comme décrit en partie I.III.4, le tube digestif possède de multiples barrières érigées à l'encontre des micro-organismes colonisant sa lumière. Cette protection extrêmement bénéfique en conditions physiologiques est un frein à l'administration de vaccin. En premier lieu, l'acidité gastrique accompagnée de lipases et protéases peut dénaturer la fraction antigénique encapsulée voire la nanoparticule.

Pour surpasser ces barrières et délivrer l'antigène au niveau intestinal, différentes approches ont été testées consistant la plupart du temps à l'ajout de polymère gastro résistant en surface de la nanoparticule. Citons l'hydroxypropyl méthylcellulose phthalate (HP) (204,209), l'alginate (211,219), l'Eudragit® (205).

Les premières expériences vaccinales démontrant l'intérêt de l'enrobage des NP visaient *Helicobacter pylori*, bactérie responsable sur le long terme d'ulcères voire de cancers gastriques. L'HP englobant la nanoparticule provoquait une augmentation de l'immunité humorale et la régression simultanée des UFC gastriques après challenge des animaux (204,209) comparativement à la formulation Nanoparticule – Antigène seule.

Cependant, ce bénéfice n'est pas observable avec tous ces polymères. Pour exemple, l'ajout d'alginate de sodium autour d'un liposome lors d'essais vaccinaux contre les streptocoques du groupe A induisait une sécrétion d'Ig A transitoire incapable d'être maintenue à distance (211). Cette même protection employée avec des NP de chitosan lors d'une vaccination contre *Schistosoma mansoni* n'avait aucun effet comparativement à la formulation non protégée (219). Pour terminer, la protection octroyée par l'Eudragit® (205) est ininterprétable car aucun test n'a été effectué avec la formulation non protégée par ce composé. La seule conclusion possible de cet article étant que la réponse enregistrée semble être corrélée à la quantité d'antigène administrée.

## 2. Les antigènes

Différentes typologies d'antigènes ont été testées et se retrouvent en proportion égale par voie nasale ou orale. Seuls les pathogènes inactivés sont absents de la voie orale et ne sont administrés que sur la muqueuse naso-pharyngée (20% des antigènes de cette voie).

Toutefois, l'écrasante majorité des épitopes vectorisés concerne des protéines virales (28%) ou bactériennes (36%) et quelques toxines (7%). L'observation étonnante s'applique aux vaccins à acides nucléiques peu représentés (11%) avec une date médiane de ces articles de 2015 [2014 ; 2017] en retirant le papier testant l'ARN de protéine spike de coronavirus. Ce constat démontre que les vaccinations sur les muqueuses employant les ARN / ADN sont plutôt anciennes datant d'avant la pandémie restreignant les vaccins à acides nucléiques à une administration parentérale.

Parmi les pathologies incriminées, les infections virales grippales et à hépatite B semblent être des questions de santé publique extrêmement préoccupantes puisqu'elles concentrent à elles seules 19 et 16% respectivement des recherches suivies par la tuberculose (5%).

Ces constatations peuvent aisément s'expliquer par la transmission aérienne des influenzae virus et de *Mycobacterium tuberculosis* ; légitimant ainsi ces micro-organismes pour une vaccination nasale, première muqueuse en contact avec ces pathogènes. Cependant, le virus de l'hépatite B se transmettant principalement par voie sexuelle, la vaccination par voie orale ou nasale pourrait être controversée puisqu'à distance du site d'infection. Pour autant, certains articles démontrent à la fois la genèse d'une réponse systémique avec accroissement des Ig G (210,213,214,254,259) mais aussi *in situ* avec l'augmentation des Ig A vaginales (218,266,275,281). Cette observation renforce la vision des tissus muqueux communiquant entre eux et d'une immunité plutôt globale de ces tissus.

Les quantités d'antigènes administrées sont variables avec une tendance inférieure lors de l'utilisation des protéines virales (10 µg [5 ; 10]) et une quantité médiane 2 fois plus élevée pour les antigènes bactériens (20 µg [10 ; 50]).

Ainsi, pour des quantités élevées d'antigènes viraux, certains articles ne démontrent aucune efficacité (258), quand d'autres témoignent d'une réponse locale à Ig A (203,205,273,276) sans pour autant visualiser un effet systémique à Ig G alors qu'il est aussi possible de constater ces deux réponses simultanément (218,237,254,260,266,275,281). *A contrario*, de petites quantités de protéines virales confirment une efficacité dans ces deux domaines (213,247,262,267).

Concernant les vaccins anti bactériens, des doses importantes possèdent des effets variables avec l'absence d'efficacité (197), une immunité *in situ* (198,201,211) ou les deux simultanément (200,202,204,209,229,257). Pour finir, une concentration antigénique faible peut aussi avoir un effet important sur ces deux versants de l'immunité humorale (217,242,252,253,263) comme n'en avoir aucune (223,251).

Dans ces conditions, la qualité et la quantité d'antigènes ne sont pas les seuls paramètres à interférer sur la réponse immunologique. Le type de nanoparticule employée dans ces vaccinations, leurs capacité et efficacité d'encapsulation antigénique restent des critères centraux comme expliqué précédemment. Pour autant, ces éléments ne sont pas les seuls à considérer car le recours à un adjuvant ou à des schémas vaccinaux particuliers (vaccination primaire suivie de rappels) semble être un point crucial dans l'établissement d'une réponse immunologique concrète.

### 3. *Le schéma vaccinal*

La multiplicité des rappels reste difficilement interprétable et l'établissement d'une ligne de conduite concernant les schémas d'administrations est inenvisageable dans cette étude. Cependant, la réitération des doses semble être un critère majeur dans la construction d'une réponse immunitaire puisque les résultats d'une administration unique sont mitigés comportant des réussites (210,246,277) mais aussi des échecs (221,226,269,270).

Echec plutôt imposant puisqu'aucune différence immunologique n'est observée entre la formulation vaccinale (NP de chitosan – Acide Nucléique) à l'encontre de *Schistosoma mansoni* et le groupe témoin inoculé avec du PBS (221). De même, lors d'essais opposant la formulation NP – Antigène et l'antigène seul, aucune distinction n'a pu être décrite dans le cadre de vaccinations contre les Shigelles ou le virus respiratoire syncytial (269,270). Dans ces mêmes conditions, seule une réponse à Ig A a été constatée avec des nanoparticules de chitosan dirigées contre le virus de l'encéphalite japonaise (226).

En conséquence, il est important de souligner que la répétition des doses vaccinales est nécessaire pour l'obtention d'une réponse mémoire et cela indépendamment du vecteur administré.

### 4. *Les adjuvants*

Les auteurs ont eu recours à différents adjuvants dans plus d'un quart de ces articles afin d'augmenter l'immunogénicité de leurs vaccins. Les plus représentés dans nos articles sont le CpG (10%), les dérivés du lipide A (5%) et de la toxine cholérique (2%) suivis de nombreux adjuvants uniques (10%) présentant à nouveau une variabilité des effets qui seront décrits ci-dessous.

Les expériences ont montré que l'ajout des extraits d'*Asparagus racemosus* ou de *Quillaja* Saponin lors d'une vaccination contre la toxine tétanique encapsulée dans des sels d'or (215,220) agissait de façon synergique avec la nanoparticule sur la sécrétion d'Ig A et G. Ce constat se retrouvait avec des nanoparticules de chitosan administrées conjointement avec des microsphères de Dextran (250).

L'usage d'interleukine telle que le TNF $\alpha$  a été envisagé dans la vaccination grippale avec un polymère de pullulane. Non seulement, la réponse humorale

provoquée et la croissance des splénocytes après restimulation furent supérieures à l'antigène administré avec de la toxine cholérique mais la survie après challenge létal des sujets vaccinés fut aussi identique au groupe contrôle (261). Une autre formulation à base de chitosan et de Poly (I/C) (agoniste du TLR3) a été éprouvée et montrait une stimulation des lymphocytes T mémoires identique au vaccin commercialisé FLUSURE® et une diminution des lésions pulmonaires post challenge. Néanmoins, la nanoparticule avec l'antigène seul ne fut pas administrée limitant toute conclusion sur l'effet de la vectorisation (235).

L'ajout d'extraits de *Lotus tetragonolobus* à la formulation vaccinale de chitosan et de protéine S d'hépatite B se concluait par un taux d'Ig G similaire à l'immunisation par cet antigène injecté en IM avec des sels d'aluminium ainsi qu'une augmentation des Ig A salivaires, intestinales et vaginales supérieures (218).

Des essais de vaccinations à l'encontre de *Chlamydia psittaci* ont démontré une augmentation significative dose dépendante de l'adjuvant VCG (*Vibrio cholerae* Ghosts) des Ig G accompagnée d'une diminution des UFC et des lésions pharyngées après challenge (225). Le groupe contrôle étant l'antigène seul, il est une nouvelle fois difficile de conclure sur l'effet de la nanoparticule vis-à-vis de l'adjuvant.

Toutefois, l'effet bénéfique de l'adjuvant n'est pas toujours observable et l'on déplore une absence d'efficacité sur la génération d'Ig G (263) lors de l'administration d'une formulation contre le bacille de l'anthrax contenant du C48/80 (complexe activateur des monocytes) (282,283). Observation intéressante retrouvée précédemment dans la synthèse de nanoparticule contenant des agonistes aux NLR (260), l'administration concomitante de Nanoparticule – Antigène et de Nanoparticule – Adjuvant conduit à un effet similaire à l'injection de la formulation Nanoparticule – Antigène – Adjuvant.

Retrouvée dans deux articles, la toxine cholérique est employée contre le virus de la grippe (247) et *Clostridium perfringens* (200). Les impacts sur l'immunité humorale anti virale, le nombre d'UFC et les lésions après challenge sont indéniables et intensifiés par l'adjuvant. De plus, cet article est l'un des rares à relater le maintien de cette immunité 6 mois après la vaccination. Pour nuancer ce constat, aucun effet de la toxine n'est enregistré dans l'immunité anti bactérienne malgré l'influence positive de la nanoparticule.

Exploités dans de nombreux vaccins, les dérivés du lipide A sont ajoutés dans 4 formulations de notre recherche. L'efficacité sur l'hépatite B est visible avec une supériorité de la réponse humorale vis-à-vis de l'antigène administré en SC (213) mais cette synergie s'efface lors du comparatif avec le GENHEVAC® (vaccin commercialisé dirigé contre l'hépatite B) où seul l'impact sur les Ig A est décrit (205). De plus, aucun test n'est effectué sans l'adjuvant complexifiant l'interprétation du rôle de la nanoparticule. Commentaire renouvelé dans l'article contre *Bacillus anthracis* (232) dans lequel l'effet de la formulation (NP – Antigène – Adjuvant) est indéniable mais ne présentant aucun test en absence d'adjuvant ce qui limite toute conclusion sur l'impact de la vectorisation. Pour terminer, l'usage de cet adjuvant contre la tuberculose atteste

d'une synergie sur l'immunité humorale entre la nanoparticule de PLGA et l'adjuvant intensifié lors d'une administration de cette formulation en rappel du BCG (240).

L'adjuvant le plus fréquent dans cette revue est le CpG et reste le plus controversé. Aucun effet immunologique supplémentaire n'est retrouvé lors de l'ajout de l'adjuvant sur les vaccinations dirigées envers le méningocoque (230), la tuberculose (223), les toxidermies à *Staphylococcus aureus* (251) et les formulations anti grippales avec des NP de graphène (227). Cependant le bénéfice de la vectorisation seule est visible (227,230) sur la survie des sujets vaccinés. De même, il est difficile de conclure sur l'action positive de l'adjuvant ou de la nanoparticule lors d'essai grippal (219) ou anti parasitaire contre *Schistosoma mansoni* de par l'absence de formulation Antigène-Adjuvant (239).

Cependant, deux articles portant sur la vaccination grippale mettent en évidence l'utilité de cet adjuvant dans cette configuration. Dans le premier article, l'administration de NP de Poly-éthylèneimine contenant des hémagglutinines provoque une augmentation des immunoglobulines accrue par l'adjonction de CpG. Cette formulation améliore la survie des sujets vaccinés après challenge et protège vis-à-vis de plusieurs sérotypes viraux (222). Pour terminer, la vaccination à base de lipoprotéines englobant des pathogènes atténués accroît la proportion de LT CD4+ résidents mémoires dans toutes les voies aériennes. Cette protection est telle qu'elle rend possible la survie des souris ayant reçu la greffe de ces cellules activées (224).

En résumé, seulement un quart des articles de notre revue eurent recours à des adjuvants. Mais force est de constater que leurs effets paraissent notables dans bon nombre d'entre eux. Il est néanmoins difficile d'affirmer avec certitude l'effet synergique entre la nanoparticule et l'adjuvant dans certaines publications de par la présence de quelques écueils méthodologiques. Pour autant, la vectorisation reste dans la majorité des cas intéressante et l'ajout d'un adjuvant lors des tests précliniques de vaccinations sur les muqueuses ne peut être que préconisé.

## 5. Critique des réponses enregistrées

### a) La réponse humorale

La majorité des vaccins administrés dans les articles choisis provoquent une réponse humorale complète à Ig A et G (54%). Moins efficaces, certains résultats démontrent un effet partiel à Ig A (22%), ou à Ig G (5%) voire aucun effet (19%).

Pour autant, l'impact du vecteur sur cette réponse n'est pas toujours constatable. Ainsi malgré des résultats positifs, l'absence d'administration des protéines de *Streptococcus pyogenes* sans nanoparticule ne permet pas d'affirmer le lien entre le résultat et le vecteur employé (231). De même, le manque de formulation NP-ARN ou ARN / protéines grippales (234) ou d'hépatite B (210) sans nanoparticule incite au questionnement.

En somme, la très grande majorité des articles (52%) eurent recours à l'antigène comme groupe contrôle sans ajout d'adjuvant ou encore de vaccins commercialisés. Ce faisant, la réponse humorale visualisée peut plus aisément dépasser celle du contrôle faussant ainsi l'interprétation.

Cependant, le grand intérêt de cette revue réside dans les articles attestant d'une immunité des muqueuses à distance de la muqueuse vaccinée. Bien qu'il soit compréhensible qu'une vaccination nasale puisse induire des Ig A au niveau pulmonaire (242,247,267,271,272,274), il est plus étonnant de retrouver ces immunoglobulines au niveau génital (238,242,260,266,268,275) et cela même après une vaccination orale (218). De plus, la présence de ces anticorps au niveau sérique (215,238) n'est pas toujours admise. Étonnamment, les vaccinations orale et nasale permettent aussi de provoquer la sécrétion de ces Ig A aux niveaux oculaire (202) et auriculaire (264).

Les derniers faits remarquables concernent l'association de l'antigène et le choix du milieu de stockage. En effet, la dispersion des épitopes dans la matrice des nanoparticules semble provoquer une meilleure réponse comparativement à une association en surface (253). Pour finir, des auteurs (275) associant le TriMéthyl-Chitosan (TMC) et chitosan ont étudié le lien entre osmolarité de la solution de stockage et réponse humorale mettant en évidence l'absence d'immunité lors d'ajout de solutions isotonique et hypotonique. En conséquence, un soin particulier devrait être apporté à l'osmolarité des solutions employées lors de l'administration nasale des formulations vaccinales.

### *b) Les profils des lymphocytes T effecteurs*

L'étude de l'immunité cellulaire n'est décrite que dans 51% des articles. Cependant, une nette tendance pour le profil TH1 (29%) avec détection le plus souvent d'IFN $\gamma$ , IL-2, IL-12 se détache à travers ces tests pouvant être accompagné du profil TH2 (6%) (IL-4) ou TH17 (7%) (IL-17). Ces derniers ne sont que très peu représentés sans profil TH1 (7%).

Impliqué principalement contre les pathogènes intracellulaires, le profil TH1 renforce à la fois l'immunité innée en transformant les monocytes en macrophages ce qui potentialise la phagocytose des pathogènes mais aussi adaptative en améliorant la prolifération des lymphocytes B. Partant de ce constat, il n'est pas étonnant de retrouver ces LT effecteurs en majorité TH1 puisque quasiment la moitié des expériences rapportant ce profil est menée sur des antigènes viraux (196,213,218,226,235,243,244,248,249,254,261,266,267,269,274,276,281). De plus, lors d'une tuberculose pulmonaire, l'échappement à la phagocytose est un point crucial à la formation de granulome pulmonaire siège de la multiplication des bacilles. Dans ces conditions l'incitation vers un versant TH1 des LT effecteurs est un facteur protecteur retrouvé dans nos articles (217,229,240,245).

### *c) Les paramètres de protection*

La dernière évaluation concerne la protection concrète de la vaccination suite au challenge des animaux vaccinés. Pour ce faire, la survie des animaux, la diminution de la réplication des micro-organismes et la sévérité des lésions causées par le pathogène ont été étudiées. Non décrits dans 60% des articles, ces paramètres sont souvent améliorés par les formulations car seulement 6% d'entre eux sont inefficaces.

Ces expériences (243,248,249,270,274) menées pour la moitié par la même équipe ont en commun l'absence d'adjuvant dans leurs formulations. Quatre essais eurent recours à des virus inactivés grippaux (243,248,249,274) vectorisés par des nanoparticules différentes et administrés selon des schémas vaccinaux (prime / boost) similaires. Dans ces conditions, l'hypothèse la plus probable serait une inefficacité provoquée par l'antigène et non le système de délivrance.

## 4. Conclusion

La voie muqueuse est actuellement une possibilité intéressante en alternative aux voies parentérales conventionnelles. L'observation la plus marquante de cette revue reste l'induction d'une réponse humorale à distance du site d'administration avec pour certaines formulations la génération de réponses systémique et locale grâce à l'usage des nanoparticules.

Néanmoins, cette alternative présente quelques inconvénients nécessitant le renouvellement fréquent des administrations pour obtenir la réponse escomptée. De même, la qualité des épitopes semble être importante avec une nette supériorité des antigènes protéiques comparativement aux pathogènes atténués.

Une attention particulière devrait être apportée au choix des adjuvants incorporés dans ces formulations car plusieurs publications ayant recours au CpG et aux dérivés du lipide A démontraient leur utilité. Toutefois, une part non négligeable de ces adjuvants était représentée de façon unique ne permettant pas de conclure à leur égard.

Bien que certains articles témoignent d'une concrète efficacité, ces essais ne sont pour la plupart que des preuves de concepts. En effet, les problématiques d'encapsulations et de stockage confinent ces résultats à une recherche purement préclinique. En condition réelle, les formulations vaccinales doivent être stables plusieurs mois de préférence à température ambiante ou à 4°C afin de faciliter leur logistique. Ainsi, tant que les polymères employés présenteront ces défauts, toutes recherches cliniques ou vétérinaires ne seront envisageables.

La dernière critique à soulever reste la temporalité de ces essais. Les mesures des différents paramètres (réponse humorale, cellulaire, survie, lésions) sont effectuées traditionnellement juste après la vaccination. Mais qu'en est-il à distance : cette efficacité est-elle persistante ? L'induction de cette mémoire est-elle supérieure à la sénescence des lymphocytes octroyant ainsi une réponse efficace à distance de la vaccination ?

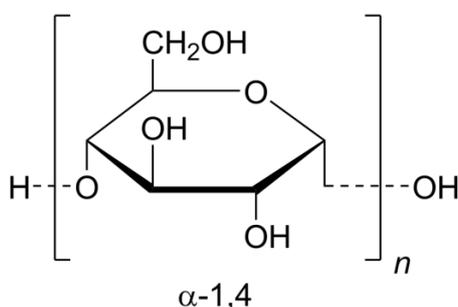
## V. Les NP de maltodextrine en vaccination muqueuse

Les nanoparticules décrites dans notre revue présentent pour bon nombre d'articles une réelle efficacité sur la réponse immunologique, voire une augmentation de la survie après challenge létal dans certaines conditions objectivant d'autant plus l'intérêt de la vectorisation. Cependant, le frein principal reste l'obligation de recourir à une synthèse de façon extemporanée empêchant toute transition vers des essais cliniques.

Par conséquent, les paramètres de stabilité du vecteur et de son association avec la fraction antigénique devraient être des points critiques élucidés avant tout essai vaccinal. Aussi, l'utilisation des NP de maltodextrine à cœur lipidique (NPL) ou non (NP+) revêt un intérêt tout particulier, outrepassant sur ces points toutes les technologies décrites en partie I.IV.1.

### 1. Les NP+

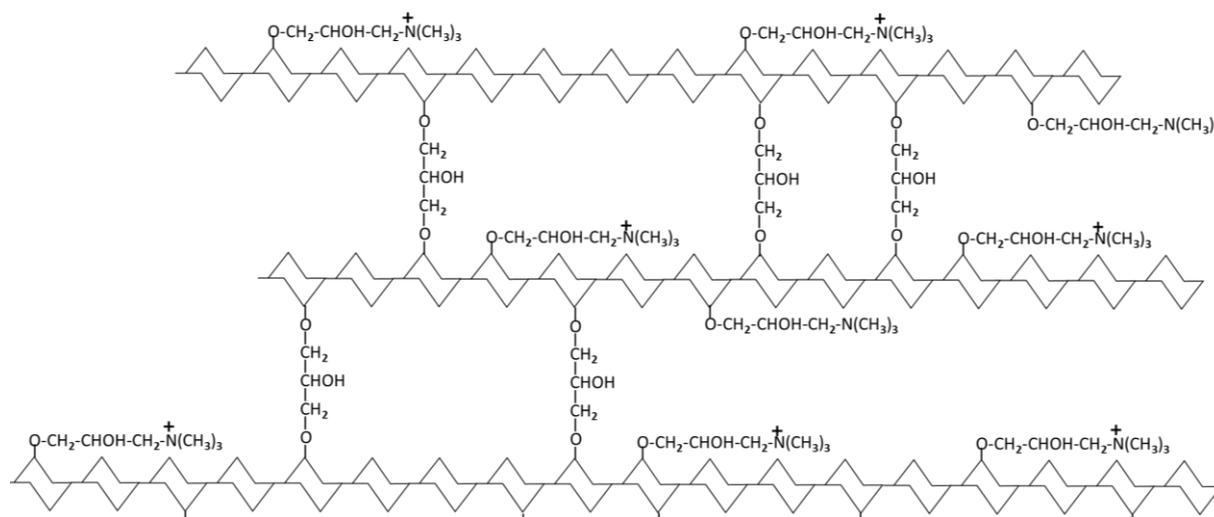
S'inscrivant dans le développement de nanoparticule polymérique, notre laboratoire a initié ses recherches sur les polysaccharides alimentaires et a produit des nanoparticules de maltodextrine (**Figure 26**) (polyoside à base de D-glucose branchée en  $\alpha$ 1-4 issue de l'hydrolyse partielle de la fécule de pomme de terre) cationisée par ajout de glycidyltriméthylammonium et réticulée par adjonction d'épichlorhydrine. Suite à ces étapes, l'hydrogel obtenu (**Figure 27** subit plusieurs cycles de broyage sous haute pression puis est purifié par ultrafiltration tangentielle pour recueillir une nanoparticule de diamètre compris entre 40 et 80 nm : la NP+ (284) (**Figure 28a**).



**Figure 26.** Formule chimique semi développée de la maltodextrine.

Cet intermédiaire de synthèse, difficilement observable en microscopie électronique du fait de sa porosité (285) présente une stabilité colloïdale dans l'eau exemplaire et aucune agrégation n'est observée lors de son stockage à température variable (4 à 40°C) sur de longues périodes. Sa charge de surface cationique lui confère une interaction électrostatique avec les membranes cellulaires qui est certes intéressante pour la délivrance de principe actif mais qui peut être responsable de toxicité cellulaire. Cependant, des essais de cytotoxicité et de génotoxicité ont démontré

l'absence d'événement délétère *in vitro* à des posologies bien supérieures aux doses usuelles (286).



**Figure 27.** Schéma de la maltodextrine réticulée et fonctionnalisée

## 2. Les NPL

Les NP+ furent modifiées par ajout de phospholipides anioniques pour synthétiser la NPL. Lors de cette étape, il a été observé que les NP+ pouvaient aisément accepter toutes sortes de lipides anioniques conférant une certaine flexibilité à cette plateforme. Peu coûteux et biocompatible, le DPPG (2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) fut choisi initialement. Suite à cette étape, les potentiels de surface mesurés des NP+ et NPL convergeaient démontrant que l'ajout de lipide s'effectuait au cœur de la NP+ et non en périphérie (**Figure 28b**) sans altérer les caractéristiques physico-chimiques de la NP+ (287) ni les paramètres de toxicité (288).

Les images enregistrées en microscopie électronique laissent penser que ces nanoparticules conservent leur porosité après lipitation (289). Les lipides seraient donc accessibles au milieu extérieur et induiraient des interactions pouvant être mises à profit en modulant sa composition. Cette hypothèse, fut à l'initiative du travail développé en troisième partie de ce manuscrit.



**Figure 28.** Représentations schématiques de la NP+ (A) et de la NPL (B).

### 3. Intérêts des nanoparticules de maltodextrine

Bien que l'association de principes actifs au cœur de ces vecteurs se fasse sans difficulté, ces nanoparticules ne peuvent être utilisées par voie intraveineuse. Leur structure non furtive au système immunitaire et leur charge positive empêcherait toute délivrance efficace entraînant simultanément un risque de thrombose veineuse non négligeable (290).

C'est pourquoi la NP+ puis la NPL furent étudiées pour des applications vaccinales par voie muqueuse. Lors des tests d'associations d'antigènes de complexité croissante, ces vecteurs ont montré une incomparable efficacité bien au-delà des nanoparticules de PLGA ou des liposomes. Ainsi, ces NPL peuvent associer jusqu'à 1/3 de leur poids en protéines sans modification de leurs paramètres physicochimiques (289,291,292). Enfin, grâce aux NPL, le recours à du matériel biologique vivant est dispensable (289,291), limitant tout risque de contamination, de réversion pathogénique ou de recombinaison hasardeuse pour la santé du patient.

La voie des muqueuses étant la principale porte d'entrée de la plupart des pathogènes, elle fut préférée aux voies parentérales classiques afin de s'approcher le plus fidèlement possible d'une infection naturelle. De plus, en optant pour une administration nasale, les problèmes relatifs à l'utilisation des aiguilles (blessures, réactions locales à l'injection, contamination croisée) sont aussi écartés sans pour autant diminuer la réponse immunitaire induite (293).

Suite à l'instillation nasale, la NPL persiste dans cette muqueuse pendant 6h, passe par la sphère naso-pharyngée pour être déglutie et éliminée par voie digestive. Ce paramètre est très nettement allongé chez la NPL comparativement aux liposomes et dérivés de PLGA recouverts ou non de chitosan. La captation des NPL est ainsi augmentée et la délivrance de la fraction antigénique dans ces cellules facilitée (294).

Suite à ces expériences, il a été constaté que la NPL conserve une certaine mobilité dans le mucus tapissant les cellules nasales comparativement aux NP+ plus muco-adhésives. En cause, le cœur anionique de DPPG qui diminue les interactions de la nanoparticule avec les mucines ce qui lui permet d'atteindre le pôle apical de l'épithélium nasal plus facilement (295).

Lors des essais *in vitro*, les NP+ et NPL sont captées rapidement par tous types de cellules (épithéliums pulmonaires, intestinaux, macrophages, cellules dendritiques) (284,292,294) après quelques minutes suivi d'une augmentation importante pendant une heure (285,296). Cette endocytose s'accomplirait par plusieurs voies mais l'interaction avec les récepteurs des clathrines serait la plus importante. Elles ne traversent toutefois pas l'épithélium nasal, délivrent leur antigène puis ressortent par exocytose médiée par une voie dépendante du cholestérol (285). Par conséquent, les NPL ne s'accumuleraient pas dans les tissus, et n'indui raient pas de toxicité systémique.

Toutefois, il semblerait que des divergences existent entre ces deux vecteurs au niveau intracellulaire avec une potentielle supériorité des NPL. En effet, la

distribution de ces dernières est plus diffuse dans le cytoplasme démontrant un échappement endosomal comparativement aux NP+ restreintes à ces territoires. De plus, des tests de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) mesurés par microscopie confocale ont démontré que la quantité d'antigènes déposée au niveau cellulaire était supérieure avec les NPL.

Les preuves du concept furent apportées lors de l'élaboration d'un vaccin contre *Toxoplasma gondii*, un parasite pour lequel aucune solution vaccinale ne satisfaisait les exigences de protection immunitaire chez l'Homme et l'animal. Dans ce vaccin, un lysat du pathogène fut encapsulé (289) de façon stable dans la NPL.

Après administration nasale à des souris puis challenge létale, seule les souris vaccinées survécurent apportant la première garantie d'efficacité. En outre, la transmission verticale du parasite a également été limitée, le parasite conduisant à des malformations et des avortements lorsque l'infection se produit pendant la gestation. La diminution des kystes cérébraux fut d'ailleurs observée chez ces souriceaux accompagnée d'une décroissance de l'inflammation oculaire. Ces résultats ont été reproduits chez la brebis, un animal de rente cible (297) et chez les singes (298), preuve de leur efficacité.

Dans un second temps, des tests furent menés sur un vaccin universel contre la grippe saisonnière. L'antigène sélectionné était une protéine construite en 3 parties : la toxine cholérique accompagnée de la fraction antigénique grippale M2e et la protéine A de *Staphylococcus aureus*. Associé à la NPL, cet antigène améliorait la survie des souris après challenge létal contre le virus de la grippe et la contagiosité de ces souris était (292).

## 4. La réponse immunologique des NPL

Il a été démontré récemment que la NPL était une plateforme vaccinale inerte à la fois lors d'un contact prolongé avec des cellules épithéliales mais aussi immunitaires (299). Pour autant, cette nanoparticule a été testée à l'encontre de plusieurs pathogènes et présente des résultats intéressants pour combattre certains parasites et virus.

### 1. *Toxoplasma gondii*

La première réussite vaccinale fut contre *Toxoplasma gondii*, protozoaire faisant partie des Apicomplexa sévissant chez de nombreuses espèces. L'infection par ce parasite survient par contamination orale et ne nécessite pas de contact direct avec l'hôte définitif (les félinés). Lors de cette infection, des oocystes vont être ingérés puis transformés en trophozoïtes capables de traverser l'épithélium intestinal du tube digestif. Par la suite, ces formes se disséminent à travers l'organisme mais possèdent un tropisme particulier pour les myocytes, cellules gliales et cellules de la choroïde (300). Afin de se protéger du système immunitaire, les trophozoïtes évoluent en

bradyzoïtes formant des kystes au sein des tissus ce qui stimulera continuellement les cellules immunitaires sans pour autant éliminer le parasite (301).

Selon l'ANSES (Saisine n° 2016-SA-0271), l'incidence en France des toxoplasmoses acquises durant la grossesse est d'environ 2 500 par an conduisant à 1 toxoplasmose congénitale sur 20 cas. Au vu de ces données de santé publique, la mort *in utero* chez l'Homme suite à cette infection est plutôt rare. Toutefois, l'infection par ce parasite reste problématique dans cette période avec un retentissement fœtal d'autant plus sévère que celle-ci intervient précocement. Grâce à leur tropisme, les kystes peuvent induire de nombreuses séquelles neurologiques et rétiniennes chez le nouveau-né et cela malgré l'administration d'antibiotiques depuis la séroconversion à l'accouchement. Enfin, la toxoplasmose congénitale peut être latente chez le nourrisson provoquant bien des années après des symptômes oculaires ou neurologiques souvent secondaires à une immunodépression.

Touchant tous les mammifères, cette maladie provoque régulièrement des avortements spontanés chez les animaux de rente imposant des pertes importantes aux professionnels de cette filière.

Dans ces expériences un lysat de parasite a été associé aux NPL permettant l'immunisation par voie nasale des souris (302). Le monitoring des souris gestantes vaccinées infectées a permis de mettre en évidence une augmentation de l'IL-6 et de l'IL-10 accompagnée d'une diminution de l'IFN $\gamma$ .

Lors de l'implantation du fœtus, il est admis qu'une réponse TH1 transitoire soit nécessaire mais que la persistance de celle-ci provoquerait l'avortement comme décrit chez les souris non vaccinées. Ainsi cette diminution associée à la promotion d'une réponse régulatrice via l'IL-10 limiterait la transmission transplacentaire réduisant les avortements et la quantité de kyste dans le cerveau des souriceaux âgés de deux mois.

Dans ce second travail (289), des études *in vitro* sur des macrophages et cellules dendritiques ont été menées. La stimulation de ces cellules montrait une traduction accrue de NF $\kappa$ B médiée par les TLR2 et 4 ainsi qu'une augmentation des cytokines pro inflammatoires par les DC attestant d'une efficacité sur l'immunité innée.

La vaccination des souris augmentait les Ig G à des concentrations similaires à celles obtenues avec un adjuvant à base de toxine cholérique. Cependant, aucune Ig A n'a pu être détectée. Pour finir, la stimulation des splénocytes induisait une sécrétion cytokinique des trois phénotypes TH1, TH2, TH17 principalement due aux LT CD4+.

L'étude plus récente (297), portant sur les brebis a testé à la fois une vaccination nasale mais aussi intra dermique. Fait surprenant le taux d'Ig G détecté était similaire entre le contrôle et la voie nasale mais supérieur en intra dermique. A nouveau aucune Ig A ne fut décelée. De plus, des cellules mémoires présentant le CMH de classe II spécifiques de l'antigène étaient présentes 6 mois après administration des vaccins dans les ganglions drainant les sites de vaccination.

Au niveau splénique, la prolifération des splénocytes permettait une détection importante d'IFN $\gamma$  et d'IL-12 pour toutes les modalités d'administrations alors que l'IL-10 augmentait fortement en sous cutanée. Cette balance précaire TH1 / Treg serait donc un facteur clé dans la protection des brebis avec une action délétère de l'IL-10. En effet, la proportion d'animaux présentant des kystes cérébraux est bien supérieure lors des administrations sous cutanées qu'ils s'agissent d'infections congénitales ou latentes chez l'adulte.

Ces expériences ont ainsi démontré l'utilité de la NPL contre ce parasite. Bien qu'aucune détection d'Ig A dans les muqueuses n'ait pu être enregistrée, ces formulations vaccinales modulent à la fois la polarisation des lymphocytes T effecteurs et activent la sécrétion d'Ig G spécifiques du parasite. Pour finir, l'efficacité de cette vaccination reste indéniable en empêchant quasiment toute transmission verticale chez l'animal.

## 2. *Leishmania donovani*

Ce concept assez simple de vaccination à l'encontre des parasites n'est malheureusement pas généralisable à l'ensemble de ces microorganismes et les résultats recueillis sont fluctuants d'une espèce à l'autre.

Pour exemple, l'association d'un lysat de *Leishmania donovani* selon un schéma vaccinal équivalent ne provoquait qu'une protection partielle vis-à-vis de la Leishmaniose (303). En effet, la densité de parasites hépatiques, spléniques ou dans la moelle osseuse était identique ; que l'immunisation soit faite par la formulation ou l'antigène seul.

Bien que les expériences *in vitro* démontraient initialement une augmentation des CMH II et des molécules de co-stimulation CD80 / CD86 par les BMDC (Bone Marrow derived Dendritic Cell) activées par la formulation. Ces signaux ne provoquaient aucune différence significative sur la prolifération de LT CD4+, CD8+, LB, NK dans la rate des souris. Fait surprenant, la proportion de LT CD4+ mémoires était toutefois supérieure lors d'une immunisation par la NPL.

Pour terminer, l'analyse de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-10 indiquait un déséquilibre de la réponse LT au profit TH1 visible au niveau splénique mais surtout sérique indépendamment du vaccin utilisé.

*Leishmania donovani* est un organisme eucaryote appartenant aux Euglenozoa dont le cycle infectieux nécessite un contact direct entre les hôtes du parasite. Transmis par la piqûre du phlébotome (hôte intermédiaire) à l'Homme, la forme promastigote se retrouve directement dans le compartiment vasculaire sans stimuler la réponse immunitaire des muqueuses. Ce faisant, le parasite est immédiatement phagocyté par les macrophages intra hépatiques lors de son passage par la veine porte. Résistante aux enzymes lytiques des phagocytes, cette forme lui permet de se protéger vis-à-vis des autres entités du système immunitaire, de croître et de se transformer en forme amastigote. Lors de l'apoptose du macrophage, ces

formes se disséminent dans l'organisme pouvant provoquer des lésions à distance du site d'infection (304).

Cette différence d'infection, entérale pour le Toxoplasme et parentérale pour la Leishmaniose pourrait expliquer l'absence d'efficacité constatée lors des essais menés dans cette maladie puisque ces modalités de vaccination ne répliqueraient pas fidèlement le mode de contamination du parasite.

Par cette constatation, nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : les PAMPs du lysat de parasites directement liés au mode d'infection du pathogène seraient à l'origine de la réussite ou de l'échec de cette vaccination. Ainsi la NPL, administrée par voie nasale à cette dose, serait un adjuvant « transporteur » vers les cellules immunitaires d'une efficacité remarquable. Pour autant, ce vecteur ne possède aucun effet immuno-modulateur intrinsèque et sa réponse obtenue serait étroitement connectée à la qualité de l'antigène sélectionné (305).

### 3. *Mycobacterium tuberculosis*

Des expériences furent menées parallèlement pour supplanter le vaccin anti tuberculeux (306) tout en se confrontant à un adjuvant : le DDA MPL (dimethyldioctadecyl-ammonium bromide/monophosphoryl lipid A). Ce dernier ayant déjà démontré son efficacité (307,308) contre cette maladie en s'associant avec l'antigène HBHA (Heparin-Binding Haemagglutinin) a été utilisé comme groupe contrôle.

Dans la première étape de ce travail, la vaccination fut effectuée par voie sous cutanée en combinant l'antigène HBHA avec la NPL. Le nombre d'Ig G était alors inférieur au DDA MPL. De même pour la quantification d'IFN $\gamma$  des splénocytes conduisant à une absence de protection pulmonaire des souris infectées par aérosol de *Mycobacterium tuberculosis*. Cependant, l'ajout de CPG à cette formulation accroissait les Ig G2a très impliquées dans la défense anti-malarique.

La seconde partie de cette étude permettait d'étudier l'influence du priming par le BCG sur cette vaccination. Dans cette configuration, seul le contrôle attestait d'une protection pulmonaire vis-à-vis du challenge et l'ajout de CPG n'avait plus l'effet escompté. La concentration d'Ig G était alors semblable entre le contrôle et la formulation avec CPG mais ne persistait pas dans le temps due à l'absence d'IL-17 constatée avec la NPL.

Pour finir, une vaccination intranasale fut éprouvée selon les mêmes conditions. En dépit d'un accroissement de l'IL-17 et de l'IFN $\gamma$  comparativement à l'administration sous cutanée, les valeurs enregistrées restaient inférieures au groupe contrôle expliquant l'absence de protection lors du challenge.

Cette absence d'efficacité pourrait de même s'expliquer par la physiopathologie particulière d'une infection à *Mycobacterium tuberculosis*. Suite à l'infection, cette bactérie atteint les voies respiratoires profondes et se retrouve

phagocytée par les macrophages tissulaires. Une fraction de ces pathogènes survit aux mécanismes de lyse et se multiplie à l'intérieur des cellules phagocytaires jusqu'à leur apoptose. Ces étapes conduiront à l'affluence de cellules immunitaires activées par l'environnement inflammatoire formant un granulome tuberculeux autour du bacille et cela malgré une augmentation importante du profil TH1. Ainsi, cette encapsulation par le système immunitaire inné propre à cette bactérie, empêche toute clairance du pathogène à l'image de *Leishmania* ce qui pourrait expliquer l'inefficacité de cette vaccination malgré la polarisation des LT effecteurs.

#### 4. *Virus Influenzae*

Les derniers tests se rapportaient à la prophylaxie anti virale et plus particulièrement dans l'élaboration de deux vaccins grippaux.

##### a) *Virus inactivé*

La fraction antigénique du premier correspondait à la souche Udorn (Influenza A virus A/Udorn/307/72, H3N2) inactivée puis détruite par ajout de détergent (309). Ces fragments furent mélangés à la NPL et à l'adjuvant CTA1-DD correspondant à la toxine cholérique et à la protéine A de *Staphylococcus aureus* pour un protocole de vaccination intranasal.

Les taux d'Ig G enregistrés étaient alors bien supérieurs pour la formulation comparativement à l'antigène seul et l'ajout de l'adjuvant ne renforçait pas ce résultat. Néanmoins, celui-ci démontra son intérêt lors des mesures de densités virales bien inférieures aux niveaux nasal et pulmonaire. Enfin, l'infectiosité des souris vaccinées infectées était atténuée, mais de façon similaire au virus Udorn non vectorisé.

##### b) *Protéine de fusion*

Le second vaccin (292) impliquait la protéine de fusion CTA1-3M2e-DD contenant un trimère de la fraction immunogène du virus de la grippe H3N2 (A/Victoria/3/75). Contrairement aux travaux précédents, cette vaccination avait pour objectif la création d'un vaccin universel grippal indépendant des souches circulantes mondiales. De ce fait, les populations à risque pourraient s'affranchir d'une administration annuelle du vaccin quadrivalent.

Cette protéine de fusion est donc composée du peptide M2e, extrêmement conservé entre tous les *Influenzae* virus de type A humain faisant de cet antigène un sérieux candidat à la vaccination universelle. Dans cette configuration, cette protéine est complétée comme précédemment par une fraction adjuvante constituée de la sous unité A1 de la toxine cholérique et d'un dimère du fragment D provenant de la protéine A de *Staphylococcus aureus* faisant figure d'agent de ciblage cellulaire pour les lymphocytes B (310). Cet adjuvant a la particularité de provoquer une forte réponse humorale à l'image de la toxine cholérique mais ne peut pas se fixer aux récepteurs aux gangliosides des cellules nucléées s'affranchissant ainsi de toute toxicité.

Dans ces expériences, le challenge des souris vaccinées par la formulation NPL/CTA1-3M2e-DD octroyait une survie totale à ces individus mais partielle lors d'une immunisation avec la seule protéine de fusion démontrant pour ce paramètre l'intérêt de la NPL. Pour la première fois, le taux d'Ig A était bien supérieur dans le lavage broncho alvéolaire des souris sous NPL pouvant expliquer cette différence de survie. Cette constatation étant très certainement due à la partie CTA1-DD de la protéine de fusion. Une hausse d'IFN $\gamma$  et d'IL-17 accompagnant l'accroissement du taux d'Ig G et la multiplication de LT CD4+ résidents mémoires étaient constatées sans pour autant se distinguer des effets de l'antigène seul. Cependant, à l'image des tests menés avec la souche inactivée Udorn, l'atténuation de la transmission virale fut identique entre les animaux vaccinés par nanoparticules et ceux touchés par l'infection naturelle.

Les dernières expériences enrichissent la formulation avec une hémagglutinine de virus H1N1 (A/Puerto Rico/8/34). Suite au challenge des souris vaccinées avec une souche grippale de forte virulence, seuls survécurent les animaux immunisés par la formulation totale (NPL/CTA1-3M2e-DD-HA) démontrant l'intérêt de cet ajout protéique. Bien que les taux d'Ig G et A dirigés contre la protéine de fusion soient inférieurs avec la formulation complexe, le développement d'un répertoire d'immunoglobulines à l'encontre de l'antigène HA semble être à l'origine de ce renforcement de la survie des animaux.

## 5. Conclusion

Les résultats obtenus avec cette nanoparticule sont certes étonnants dans certaines maladies tels que la toxoplasmose mais les réponses escomptées ne sont pas toujours obtenues. On déplore ainsi une absence d'efficacité contre les bactéries accompagnée d'un rendement fluctuant concernant les autres micro-organismes.

Ce propos est tout de même à nuancer, car les tests vaccinaux menés touchent des pathogènes particuliers capables de s'affranchir des actions du système immunitaire. Pour rappel, la stratégie vaccinale actuelle a recours au BCG dont l'effet n'est à la fois que peu observable sur les tuberculoses latentes mais aussi inversement corrélée à l'âge des patients.

De plus, les effets immunologiques mis en jeu semblent être dépendants de la fraction antigénique sélectionnée et de la présence d'un adjuvant complémentaire. Pour exemple, la sécrétion d'Ig A n'a pu être détectée que lors de l'utilisation d'une protéine de fusion intégrant une partie adjuvante sélectionnée pour sa capacité à induire une forte réponse humorale; la NPL n'étant pas acteur de cet effet. En conséquence, la conception des antigènes délivrés par la NPL reste un point crucial à étudier si l'on souhaite induire une réponse immunologique durable.

Bien que cette nanoparticule autorise une flexibilité d'association avec de nombreuses fractions antigéniques, elle complexifie parallèlement la compréhension de ses effets. A ce jour, les mécanismes précis permettant à la NPL suite à la

délivrance de l'antigène d'induire une réponse immunitaire restent toujours inconnus invitant au questionnement et à la formulation de plusieurs hypothèses.

## VI. But de la thèse

Depuis une trentaine d'années, les services de santé doivent quotidiennement s'adapter aux pathogènes émergents (Zika, Ebola, Coronavirus) et faire face à la présence de bactéries multi-résistantes (*Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). L'épuisement des antibiothérapies disponibles voire l'impossibilité de traiter certains patients devient une réelle problématique de santé publique.

Pour contrecarrer cela, la découverte de vaccin à visée prophylactique reste l'alternative la plus simple, utilisable à grande échelle et rapidement adaptable au pathogène. Toutefois, depuis l'apparition de la vaccination contre le papillomavirus, les évolutions se font rares et l'on déplorait jusqu'à la pandémie de SARS-CoV2 l'absence de nanoparticules dans ce groupe de médicaments. Les recherches dans ce domaine sont multiples et nous observons que sur ces 10 dernières années, les efforts de recherches portant sur des particules à visée vaccinale administrables via les muqueuses restent soutenus.

Dans cette ligne directrice, ma thèse a débuté en 2019 et avait pour but d'améliorer la NPL, plateforme vaccinale ayant déjà prouvé son efficacité à l'encontre de deux pathogènes. Cependant, cette technologie n'est pas parfaite et n'a d'ailleurs montré aucun pouvoir vaccinal à l'encontre de *Mycobacterium tuberculosis*, bactérie endémique dans certaines régions du monde.

Les causes de ces échecs pourraient être multiples : nécessité d'une co-administration avec un adjuvant pour accroître l'action de la NPL, choix inapproprié de l'antigène ou encore de la voie d'administration. En effet, le dilemme d'une administration nasale reste entier. Bien qu'un bénéfice soit observable chez les animaux infectés et déclenche une réponse mémoire dans certains cas, le suivi des Ig A n'a pu être étudié que dans les travaux portant sur la vaccination grippale.

La dernière hypothèse à ces revers reste l'absence de ciblage de la NPL pour un tissu particulier. Etant une nanoparticule de première génération, son administration se solde par un recouvrement de tout l'épithélium nasal. Bien qu'il soit maintenant admis que les cellules épithéliales puissent avoir un rôle dans la présentation antigénique aux cellules immunitaires, l'idée principale de ce travail est donc d'améliorer sa sélectivité à l'encontre des CPAg infiltrées dans ces tissus.

La NPL étant constituée d'une partie glucidique et d'une autre lipidique, nous avons synthétisé de nouvelles particules en substituant l'une ou l'autre de ces composantes par des substances reconnues par différents récepteurs de l'immunité innée.



## 2<sup>NDE</sup> PARTIE : SUBSTITUTION DE LA MATRICE GLUCIDIQUE DES NPL

### I. Introduction

La première approche consistait en la substitution de la matrice de maltodextrine (polymère linéaire de glucose) des NPL par un polymère de galactomannane ( $\beta$ -D-(1-4) manno-pyranoses reliés à des galactoses en  $\beta$ -(1-6)) issu de la gomme de guar partiellement hydrolysée.

Ce remaniement de la NPL en NPML (NanoParticule de Mannose à cœur Lipidique) a pour but de faciliter la reconnaissance des nanoparticules par les récepteurs du mannose (CD206) (311) et les TLR 2 / 4 octroyant ainsi un ciblage sur l'entièreté du système immunitaire. Ce polymère a été sélectionné car le CD206 est distribué à la surface des macrophages et DC alors que les TLR se retrouvent soit dans l'immunité innée soit sur toutes les cellules immunitaires. A la croisée des réponses innées et adaptatives, ces récepteurs induisent une présentation via le CMH des résidus mannose présents au sein des agents pathogènes (312).

Malgré une orientation de ce projet plutôt vers un versant vaccinal, ce changement structural encore peu développé pourrait être également un moyen de cibler les macrophages touchés par les infections parasitaires ou bactériennes afin d'y déposer spécifiquement un principe actif transporté (287,313).

### II. Matériel et méthodes

#### 1. Synthèse et caractérisation des nanoparticules

La synthèse des nanoparticules de maltodextrine NP+ a été décrite précédemment (314). Brièvement, 100 g de maltodextrine (Glucidex 6D, Roquette Frères, France) sont mis en solution dans 200 mL de NaOH 2M à température ambiante, réticulée avec 4,7 mL d'épichlorhydrine (2,3-époxychloropropane) puis cationisée par addition de 31,2 g de GTMA (glycidyl trimethyl ammonium). Le gel obtenu est ensuite homogénéisé par broyage à haute pression donnant une suspension de nanoparticules de 60 à 100 nm de diamètre. Cette suspension est ensuite purifiée par ultrafiltration tangentielle sur membrane de 300 kD (GE Healthcare, France).

Les nanoparticules de mannose (NPM) ont été synthétisées selon le même protocole en substituant la maltodextrine par de l'OPTIFIBRE® (Nestlé Healthcare, France). Ce composé issu de *Cyamopsis tetragonolobus* est obtenu grâce à l'hydrolyse partielle des chaînes de galactomannane de la gomme de guar par une endo- $\beta$ -D-mannanase. Le résultat de cette hydrolyse est le  $\beta$ -D-(1-4) manno-pyranose contenant environ 4 unités mannose pour 6 unités galactose avec un poids moléculaire moyen d'environ 20 kDa.

Afin de vérifier si la lipidation des NPM pouvait être similaire à celle des NPL, 100 mg de NP+ ou de NPM lyophilisées ont été remis en solution dans de l'eau ultrapure et une concentration croissante allant de 40 à 70 mg de lipides a été diluée dans une solution de solutol / eau à 17% (v/v). L'incorporation des lipides dans les nanoparticules se fait par mélange dans un bain marie à 80°C. Les nanoparticules lipidées sont stérilisées par filtration sur membrane nylon de 0,2 µm de porosité.

La taille des nanoparticules et des formulations est déterminée par diffusion dynamique de la lumière à l'aide d'un ZetaSizer (Malvern Instruments, Royaume - Uni) à la concentration de nanoparticules de 0,66 mg/mL dans 15mM de NaCl. L'indice de polydispersité (PDI) représente l'homogénéité de la taille des nanoparticules de l'échantillon ; un PDI inférieur à 0,3 indique que la population est homogène en taille. Les charges de surface (potentiel Zeta) des nanoparticules et des formulations sont mesurées par mobilité électrophorétique dans l'eau ultrapure avec le ZetaSizer.

## 2. Association de protéines aux nanoparticules

Pour disposer de formulations NPs / protéines, la BSA (Bovine Serum Albumine) est associée avec les NPL ou les NPML par mélange à température ambiante dans de l'eau ultrapure. Une quantité fixe de 5 µg de BSA a été associée pendant 72h avec 1 à 25 µg de nanoparticules. Pour les NPML, 1 µg de BSA a été associée avec 0,5 à 10 µg de nanoparticules pendant 3 à 8 jours.

Pour déterminer la quantité de protéines associées aux NP : les formulations ont été traitées avec un tampon Tris-HCl 125mM, 10% glycérol, 0.06% bleu de bromophénol suivies d'un dépôt en gel de polyacrylamide en condition non dénaturante (Native-PAGE) et révélées par la méthode du nitrate d'argent. L'analyse densitométrique des gels est exécutée à l'aide du logiciel ImageJ.

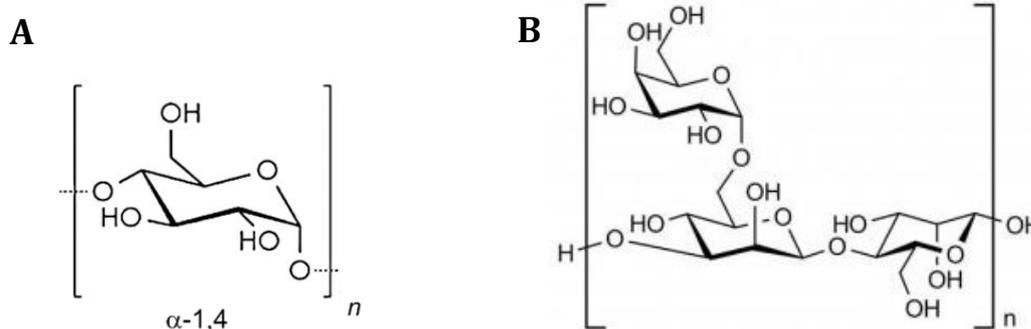
### III. Résultats

#### 1. Caractérisation des nanoparticules

Suivant les étapes de fabrication des NP+, des NPM sont synthétisées à partir du polymère de galactomannane (**Figure 29**). Contrairement à la synthèse reproductible des NP+, nous avons observé des disparités de tailles et de potentiels de surface sur les différents lots de NPM avec régulièrement des indices de polydispersité (PDI) supérieurs à 0,3, traduisant une hétérogénéité importante dans la taille de la population des NPM synthétisées (**Tableau IX**). Souhaitant outrepasser cette problématique, la synthèse a été légèrement révisée en augmentant la pression et le nombre de cycle de broyages appliqué à l'hydrogel, les paramètres physico chimiques s'amélioraient jusqu'à un optimum à 1 600 bars puis s'empiraient dès ce point dépassé. Une fois ces tests réalisés, nous avons effectué la lipitation des NPM pour constater si à l'image des NP+ cette étape permettait de normaliser le PDI des différents lots.

**Tableau IX.** Caractéristiques physico chimiques des nanoparticules.

	Diamètre (Z average) (nm)	PDI	Zeta Potentiel (mV)
NP+	102 ± 15	0,301 ± 0,074	30 ± 1
NPL	88 ± 17	0,228 ± 0,043	27 ± 1
NPM	247 ± 64	0,316 ± 0,083	45 ± 2
NPML <sub>40%</sub>	175 ± 3	0,114 ± 0,025	43 ± 1
NPML <sub>50%</sub>	218 ± 16	0,739 ± 0,392	/
NPML <sub>70%</sub>	205 ± 135	1 ± 0,407	/



**Figure 29.** Représentation schématique des polymères de maltodextrine (A) et de galactomannane (B).

A partir d'un lot de NP+ ou de NPM, des NPL et des NPML sont respectivement synthétisées en y incorporant du DPPG, puis la taille et le potentiel zêta des nanoparticules ont été analysés (**Tableau IX**). Lors de la lipitation des NPM avec des quantités supérieures à 40% (m :m) de DPPG, le PDI devenait très nettement supérieur à 0,3 et le potentiel zeta n'était pas mesurable. Ceci démontrait l'absence

d'incorporation du lipide au cœur ou en surface des NPM. De plus, à la concentration de 40% de DPPG, nous observions une normalisation des PDI avec une tendance à la diminution du diamètre des particules. Toutefois, les différences de taille constatées entre les différents lots de NPM demeuraient avec les NPML et les NPL restaient deux fois plus petites que les NPML dont le diamètre avoisine 180 nm. En conséquence, les expériences suivantes ont été réalisées avec des NPML lipidées à 40% (m :m) et des NPL lipidées à 70% (m :m) de DPPG.

Avant d'envisager toutes études de toxicité, d'endocytose et de délivrance sur cellules, il était obligatoire de standardiser les échantillons afin d'assurer la répétabilité des mesures. Pour homogénéiser la taille des nanoparticules, une filtration des NPM en solution sur filtre de 0,2  $\mu\text{m}$  de porosité fut entreprise suivie d'une lyophilisation pour mesurer la quantité perdue de l'échantillon initial. Toutefois, le rendement de cette opération fut très faible avec une perte de NPM lors de la filtration de l'ordre de 90% et des disparités de taille entre les lots subsistaient.

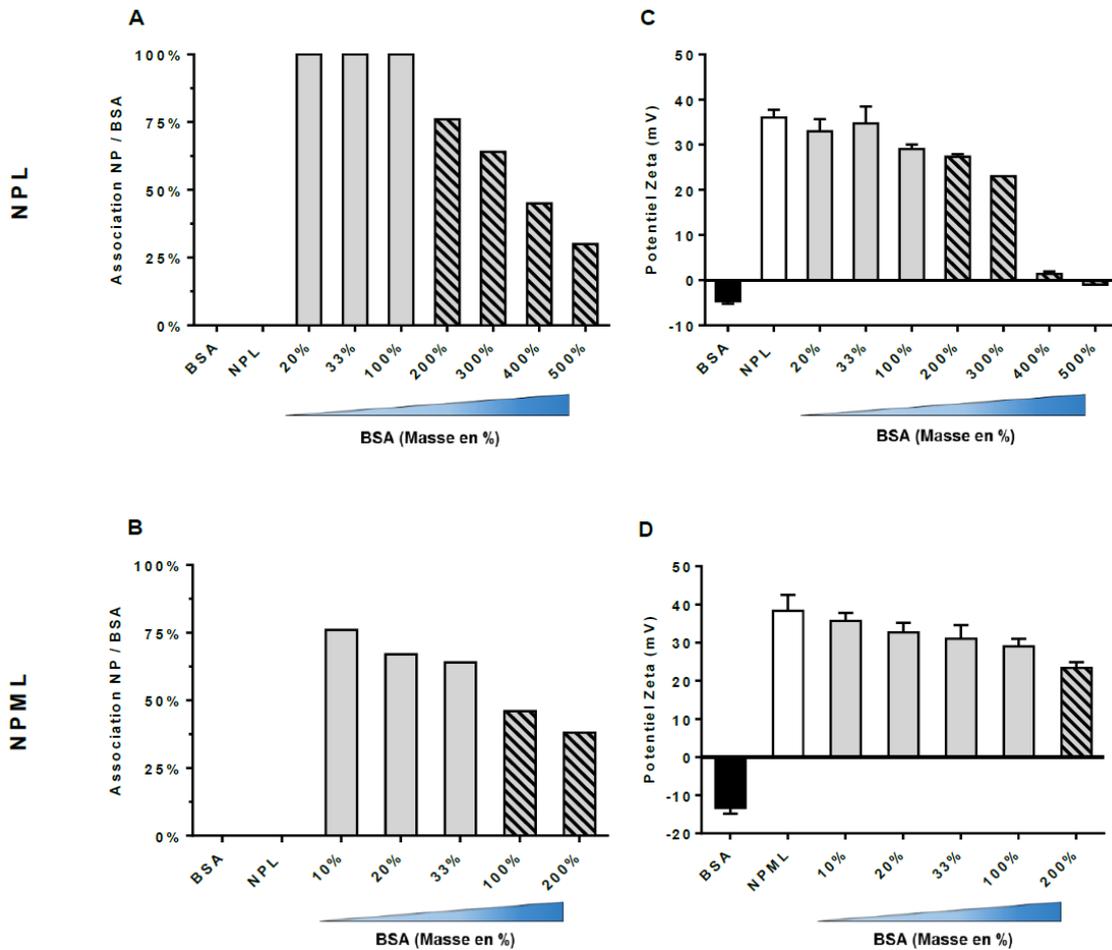
Enfin, les NPML s'agrégeaient en solution avant le délai nécessaire à l'association optimale avec une protéine témoin (cf. paragraphe ci-dessous). Par conséquent, cela a limité les études de délivrance de protéines sur cellules.

## 2. Association de protéines aux nanoparticules

En vue de comparer leur capacité d'association avec des protéines, des formulations NPL/BSA et NPML/BSA furent établies avec une concentration croissante de BSA. A nouveau des différences de protocoles entre les deux nanoparticules furent nécessaires afin d'optimiser les paramètres d'association. Pour ce faire, les NPL furent incubées classiquement pendant 3 jours alors que l'optimum de ces paramètres ne fut observé qu'après 8 jours d'incubation avec les NPML. L'association NP/BSA fut ensuite analysée en Native-PAGE où dans ces conditions, seules les protéines non associées aux NPs migrent dans le gel.

L'analyse densitométrique de ces gels a permis de conclure à une association totale jusqu'au ratio BSA / NP de 100% pour les NPL (**Figure 30.A**). Les NPML montrent une capacité d'encapsulation inférieure avec une efficacité de l'ordre de 76% avec un ratio BSA / NP de 10% (**Figure 30.B**) et cela malgré un diamètre de particule supérieure (**Tableau IX**).

Pour vérifier que la BSA est associée à l'intérieur de la nanoparticule, et non à sa surface, la mesure du potentiel zêta des formulations BSA / NP a été effectuée. La BSA ayant un potentiel zêta négatif, toute association en surface de la particule rendra son potentiel zêta également négatif. Les résultats attestent de l'incorporation de la BSA au cœur des nanoparticules jusqu'à un ratio BSA / NP de 300% pour les NPL et 200% pour les NPML. En effet, on remarque que jusqu'à cette concentration le potentiel de surface ne diffère pas suite à l'ajout de BSA (**Figure 30.C, D**).



**Figure 30.** Association de BSA aux NPs.

Les NPL (A) et NPML (B) ont été incubées avec des quantités croissantes de BSA (% massique) pendant 3 jours (A) ou 8 jours (B). L'efficacité d'encapsulation a été déterminée par électrophorèse en condition non dénaturante (Native-PAGE) avec révélation au nitrate d'argent. Le pourcentage de protéines associées a été quantifié à l'aide du logiciel imageJ. La charge de surface des différentes formulations a été mesurée par mobilité électrophorétique (C et D), les histogrammes hachurés représentent les formulations ayant un PDI supérieur à 0,3.

## IV. Discussion

Les NPML sont des nanoparticules de galactomannane comprenant un cœur de phosphatidylglycérol anionique de taille supérieure aux NPL et de potentiel de surface positif (**Tableau IX**). Étonnamment, les NPM ne peuvent subir une lipidation excédant 40% de leur masse malgré un diamètre deux fois plus grand et un procédé de fabrication similaire à celui des NP+ composées de maltodextrine.

Contrairement aux NPL synthétisées à partir de maltodextrine (chaîne linéaire de  $n$  glucoses branchés en  $\alpha$ 1-4 avec  $n$  compris entre 2 et 20) ; le polymère utilisé pour la synthèse des NPML n'est pas aussi bien caractérisé. Ce polysaccharide linéaire de ( $\beta$ 1-4) mannoses avec des résidus galactoses branchés en  $\beta$ 1-6 (**Figure 31**) pourrait potentiellement provoquer un encombrement stérique ce qui limiterait les capacités de chargement en protéines et en DPPG lors de la lipidation de ces nanoparticules.

Cette hypothèse est par ailleurs étayée par les résultats du potentiel associatif de ces nanoparticules (**Figure 30.B**) avec une protéine témoin, la BSA. De façon surprenante, les NPML ne s'associent pas de façon optimale en dépit d'un diamètre supérieur aux NPL.

En confrontant ces données à la littérature, les problématiques d'association sont nombreuses quel que soit le polymère de base. On retrouve une efficacité de l'ordre de 75% avec des nanoparticules hybrides métalliques / organiques au ratio protéine / NP : 1/20 (315) ou au ratio 1/50 avec des nanoparticules PLGA / chitosan (316). De même, on constate que les nanoparticules provenant de polysaccharides de mannoses présentent des diamètres souvent supérieurs aux NPL (317,318). Prenons pour exemple des nanoparticules de 700 nm dérivées du Konjac (plante de la famille des *Araceae* dont on extrait un polysaccharide contenant du mannose) (319), l'efficacité d'encapsulation de l'ovalbumine (ratio protéine / NP : 1/5) est de seulement 49% malgré une taille 3 fois plus grande. Par conséquent, ces résultats nous montrent que le diamètre des nanoparticules n'est pas le seul paramètre à considérer lors des mesures des capacités d'encapsulations.

Ces différences physico-chimiques auraient été à prendre en compte lors des études d'endocytoses. Les nanoparticules de diamètres inférieurs à 100nm étant plus rapidement captées par les cellules non-phagocytaires (320), les NPL d'une taille inférieure aux NPML auraient pu emprunter des voies différentes.

Souhaitant standardiser les échantillons afin d'homogénéiser la taille des nanoparticules, une filtration des NPM en solution sur filtre de 0,2  $\mu$ m de porosité fut entreprise puis les nanoparticules furent lyophilisées une seconde fois. Toutefois, le rendement de cette opération fut très faible et la résolution des défauts partielle. De plus, une agrégation de la solution de NPML fut observée au bout de quelques jours empêchant toute association avec une protéine témoin.

En conséquence, l'instabilité des NPML comparativement aux NPL, ne nous a pas permis de poursuivre nos investigations sur les cellules immunitaires.

## V. Conclusion

En résumé, les NPML sont des nanoparticules de taille homogène deux fois plus grandes que les NPL ne pouvant être lipidées par le DPPG qu'à 40% de leur masse. Bien que possédant des paramètres physico-chimiques légèrement différents, ces nanoparticules restent comparables de par l'analogie des matières premières et du procédé de synthèse utilisé. La capacité d'association avec une protéine est certes inférieure aux NPL, mais tout de même remarquable par rapport à d'autres nanoparticules couramment décrites dans la littérature.

Néanmoins, l'instabilité colloïdale des NPML après seulement quelques jours limitait les possibilités d'associations avec une protéine immunogène empêchant tout essai vaccinal ultérieur. En conséquence, ce projet ne fut pas poursuivi.



## **3<sup>EME</sup> PARTIE : SUBSTITUTION DU COEUR LIPIDIQUE**

La partie suivante est une publication soumise au journal International Journal of Pharmaceutics\_X, actuellement en cours de révision. Ce travail introduit, présente et discute les résultats obtenus lors de la substitution du cœur lipidique de DPPG classiquement utilisé dans la NPL par du DPPS.

# **Dipalmitoyl phosphatidyl serine (DPPS)-filled cationic maltodextrin nanoparticles exhibit enhanced efficacy for cell entry and intracellular protein delivery in phagocytic THP-1 cells**

*Brinkhuizen C.<sup>1</sup>, Schapman D.<sup>2</sup>, Lebon, A.<sup>2</sup>, Bénard M.<sup>2</sup>, Tardivel M.<sup>3</sup>, Dubuquoy L.<sup>1</sup>, Galas, L.<sup>2</sup>, Carpentier R.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>University of Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup>University of Rouen Normandy, INSERM US 51, CNRS UAR 2026, HeRacLeS-PRIMACEN, Normandy University, 76000 Rouen, France

<sup>3</sup>Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41 - UAR 2014 - PLBS, F-59000 Lille, France

## **KEYWORDS**

Nanoparticle, vaccine, lipid core, efferocytosis, targeting

## **ABBREVIATIONS**

NP+: Cationic maltodextrin-based nanoparticles

NPPS: NP+ with dipalmitoyl phosphatidyl serine core

NPL: NP+ with dipalmitoyl phosphatidyl glycerol core

PS: phosphatidyl serine

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank the Flow Core Facility of BiImaging Center Lille - UAR2014-US41-PLBS - (F-59000 Lille, France) for the expert technical assistance.

## **FUNDING**

No specific funding was received for this study. RC, CB, MT, LD was supported by University of Lille, INSERM and CHU Lille. PRIMACEN was supported was supported by the University of Rouen Normandy, Inserm, IRIB, Région Normandie (RIN plate-forme « 7D microscopy »), the European Regional Development Fund (ERDF « 7D Microscopy ») and the GIS IBISA.

## I. Abstract

Vaccination through upper respiratory tract is a promising strategy and particulate antigens, such as antigens associated to nanoparticles, triggered a stronger immune response than the sole antigens. Cationic maltodextrin-based nanoparticles with phosphatidyl glycerol core (NPL) are efficient for intranasal vaccination but non-specific to trigger immune cells. Here, we focused on phosphatidyl serine (PS) receptors, specifically expressed by immune cells including macrophages, to improve nanoparticle targeting through an efferocytosis-like mechanism. Consequently, the lipid core of NPL has been substituted by PS to generate NPPS.

Both NPPS and NPL exhibited similar physical characteristics and intracellular distribution in THP-1 macrophages. NPPS cell entry was faster and higher (two times more) than NPL. Surprisingly, competition of PS receptors with L-phosphoSerine did not alter NPPS cell entry and AnnexinV did not preferentially interact with NPPS. While protein association is similar, NPPS delivered more proteins than NPL. In contrast, the proportion of mobile nanoparticles (50%), nanoparticle dynamics (3  $\mu\text{m}/5$  min) and protein degradation kinetics in THP-1 were not affected by the lipid core substitution.

Together, the results indicate that NPPS enter cells and deliver protein better than NPL suggesting that modifying the lipid core of cationic-maltodextrin-based nanoparticles may be a useful strategy to enhance mucosal vaccination.

## II. Introduction

Intranasal vaccination is an interesting alternative strategy to intramuscular administration because it better mimics infection at the mucosal surfaces through which most of the pathogens enter the body (321). However, the lack of effective mucosal adjuvant, mucosal enhancer or mucosal immune booster may limit the efficacy of vaccine through upper respiratory tract. In this regard, nanocarriers able to associate, protect and deliver antigens through the mucosal barrier are promising (322,323).

Since cationic maltodextrin-based nanoparticles (NP+) have been successfully used through intranasal instillation, they are now considered as mucosal enhancer of antigenic protein delivery (324). When filled with anionic phospholipids such as dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG), NP+ are therefore called NPL with modified characteristics (287,296) and interactions with mucus (295) suggesting that the lipids remain accessible to the surrounding environment. NPL were able to associate and deliver a wide variety of proteins into epithelia (287,289,291,325) and to trigger an immune response when associate to antigens and administered into nasal cavity (289,309,326).

Nevertheless, the detailed mechanism from the antigen delivery to the nanoparticle-assisted immune response is still a matter of debate. Previous works have shown that NPL increase the nasal residence time of the associated antigens (294) but do not cross the nasal epithelial barrier being rather collected by the mucociliary system and eliminated through the digestive tract (291,302). However,

these studies mainly focused on epithelial cells while immune cells should be considered as demonstrated by the interaction between NPL and immune cells including macrophages and dendritic cells *in vitro* (294,325)(10, 13) or splenocytes *ex vivo* (289,302).

Phosphatidyl-serine (PS) is a *eat-me* signal allowing phagocytes to engulf apoptotic cells in a process called efferocytosis (327). In addition, macrophages exhibited a large diversity of membrane receptors involved in efferocytosis presenting affinity for PS. In particular, 4 members of T-cell immunoglobulin and mucin domain (TIM) receptor family that directly bind PS (328) are expressed by epithelial macrophages (329,330). Within the Tyro3-Axl-Mer (TAM) tyrosine kinase receptor family, Axl and Mer have also affinity for PS and have been detected in macrophages (331). Other receptors including brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1), CD300, PSR (JMJD6) or receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) are likewise proposed receptors for PS-mediated efferocytosis (331).

Alternatively, PS receptors may also be hijacked by viruses (332,333) and parasites (334,335) to enter cells or evade from immune vigilance. PS may consequently represent a prime target for immune cells and more specifically for phagocytic antigen-presenting cells that can also be strategically used for cationic maltodextrin-based nanoparticles that moreover behave like synthetic viruses or parasites (302,309).

We thus hypothesize that substituting DPPG in NPL by dipalmitoyl phosphatidyl serine (DPPS), leading to the formation of NPPS, could target the nanoparticles to PS receptor-expressing cells like macrophages. As a model to investigate the mechanism of nanoparticle-immune cell interactions, we used macrophage-like THP-1 cells, a well described monocyte cell line that can easily differentiate into macrophages expressing numerous PS receptors (336).

Consequently, after validating that macrophage-like THP-1 cells were competent for efferocytosis, we have compared NPL versus NPPS in their ability to enter, to associate and deliver proteins in these cells. Finally, we also characterized nanoparticle intracellular routes and processing through cell imaging and flow cytometry analyses.

### III. Material and methods

#### 1. Synthesis, labeling and lipidation of nanoparticles

The nanoparticles were synthesized as described previously (284). The maltodextrin (Glucidex 6, Roquette, France) was dissolved in a 2N sodium hydroxide solution with magnetic stirring at room temperature, then epichlorohydrin and glycidyl trimethyl ammonium chloride (Sigma-Aldrich, France) were added, leading to the formation of a cationic hydrogel. The gel was then neutralized with acetic acid and crushed by a high-pressure homogenizer (LM20-30 microfluidizer, Microfluidics, France). The nanoparticles were purified from oligosaccharides, low-molecular weight reagents and salts by tangential flow ultra-filtration (Akta Flux6, GE Healthcare, France) using a 300 kDa cut-off hollow fiber. The resulting purified cationic particles, called NP<sup>+</sup>, were the common intermediate for obtaining NPL and NPPS.

NPL are cationic and porous nanoparticles with a lipid core of 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-PG (DPPG, Bertin bioreagent, France) while NPPS are loaded with 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-PS (DPPS, Bertin bioreagent, France).

Whenever necessary, NP<sup>+</sup> were labelled by fluorescein isothiocyanate (FITC, ThermoFisher Scientific, France) according to Dombu *et al* (296). In an 0.1M bicarbonate buffer pH=8.3, NP<sup>+</sup> were labelled by 1% (w:w) of FITC for 12h. Labelled-NP<sup>+</sup> were further purified by gel permeation chromatography on a PD-10 Sephadex desalting column (Sigma Aldrich, France). NP<sup>+</sup> (or NP<sup>+</sup>-FITC) core was loaded with 70% (w:w) of phospholipids (DPPG or DPPS) as previously described (284). Phospholipids were dissolved in a 17% (w:v) aqueous solution of solutol HS15 (Sigma Aldrich, France) then mixed at 80°C with nanoparticles until complete incorporation. The resulting NPL or NPPS were filtered through 0.2µm polyethersulfone membrane.

#### 2. Characterization of nanoparticles

The size and the zeta potential of the nanoparticles were determined as previously described (284). The hydrodynamic diameter (number) of the nanoparticles was measured by dynamic light scattering (Zetasizer nanoZS, Malvern UK) at 25 °C, using 1 mg/ml nanoparticles in an aqueous solution of 15 mM NaCl.

The zeta potential of the nanoparticles was measured by electrophoretic light scattering (Zetasizer nanoZS) at 25 °C, using nanoparticles at 1 mg/ml in ultrapure water.

### 3. Cell culture

THP-1 cell (ATCC #TIB-202) is a monocyte isolated from peripheral blood from an acute monocytic leukemia patient. Mycoplasma-free cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) (Thermo Fisher Scientific) medium supplemented with 2 mM of L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.

For cytometry analyses, THP-1 cells were seeded at a density of 2.0 10<sup>5</sup> cells per well (1.9 cm<sup>2</sup>) in 24-well plates. For live-cell imaging, THP-1 cells were plated at a density of 0.4× 10<sup>4</sup> cells per cm<sup>2</sup> on 35-mm glass bottom microwell dishes (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA). Cells were then differentiated into macrophages (macrophage-like THP-1 cells) with 40 ng/ml of PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma-Aldrich, France) for 48 h followed by a recovery period without PMA of 24 h.

### 4. Efferocytosis assay

The ability of macrophage-like THP-1 cells to phagocytose apoptotic cells was assessed using the Efferocytosis assay kit (Bertin bioreagent, France) according to the manufacturer's instructions. Jurkat cells, an immortalized line of human T lymphocyte, were used as bait and were cultured using the same conditions as THP-1 cells.

Briefly, THP-1 cells were labeled with Cytotell Blue™ and differentiated into macrophages. Then, Jurkat cells were labelled with CFSE and treated with staurosporine for 6 h to induced apoptosis. Afterwards, apoptotic Jurkat cells were co-cultured for 18 h with macrophage-like THP-1 cells (cellular ratio 1:1) and cells were collected for flow cytometry analysis (Attune NxT, ThermoFisher Scientific, France).

A minimum of 5,000 cells were first selected on their size and internal complexity (FSC/SSC) then the fluorescence intensities related to the cellular labels were determined using the following excitation/emission wavelenths (nm): Cytotell Blue: 405/450, CFSE: 488/525.

### 5. Confocal microscopy

An inverted confocal laser scanning microscope (STELLARIS 8, Leica Microsystems, Nanterre, France) equipped with a white light laser (440–790 nm), an 86X objective (NA = 1.20, water immersion, WD = 300 µm) were used in this study. Fluorescence signal was detected (500-550 nm) in photon counting mode through new generation Power HyD detectors (Power HyD-S, Silicon Multi-Pixel Photon Counter). Confocal imaging of nanoparticle-labeled living macrophage-like THP-1 cells was performed with 488 nm WLL line (2% AOTF) for FITC excitation. A full bold line Okolab chamber (Ottaviano, Italy) installed on the inverted microscope stand was used to keep the temperature at 37 °C during image acquisition.

Z-stack was obtained at a step of 300 nm with a total thickness of 14.1  $\mu\text{m}$ . Bright-field image was acquired through activation of transmitted light detector. Images were processed through ImageJ for maximum projection and overlay.

## 6. TIRF microscopy

For live-cell imaging, macrophage-like THP-1 cells were exposed to 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of NPPS or NPL for 0.5 or 2 h in RPMI-1640 medium. Afterward, cells were washed three times with medium for 2 min each and kept in culture medium for observation. TIRF imaging (Leica Microsystems) of nanoparticle-internalized living macrophage-like THP-1 cells was performed with 488 nm line (25 % AOTF) for FITC excitation and sCMOS camera (Hamamatsu, Massy, France) for fluorescence collection through 100 $\times$  (NA = 1.46, oil immersion, WD= 0.17  $\mu\text{m}$ ) objective and GFP filter (excitation/bandwidth: 475/40 nm; dichroic cut: 495 nm; emission/bandwidth: 530/50 nm).

TIRF microscopy was performed with a depth penetration of 150 nm and a single focus plane was acquired. Time-lapse was obtained at a frequency of one image every 2 sec during 5 min. A full bold line Okolab chamber (Pecon, Erbach, Germany) installed on the inverted microscope stand was used to keep the temperature at 37  $^{\circ}\text{C}$  during image acquisition. Images were processed through ImageJ for contrast adjustment and through Imaris (version 9.0.2, Oxford Instruments, Imaris, Zurich, Switzerland) for nanoparticle counting and tracking.

## 7. Determination of nanoparticles cell entry by flow cytometry

Macrophage-like THP-1 cells were exposed to 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of FITC-labelled nanoparticles for 0.5, 1, 2, 4 or 6 h and collected using trypsin before flow cytometry analysis (Attune NxT, ThermoFisher Scientific, France) using the following excitation/emission wavelenths (nm): FITC: 488/525.

A minimum of 5,000 cells were first selected on their size and internal complexity (FSC/SSC) then the fluorescence intensity related to the FITC-labelled nanoparticle cellular content was determined. Whenever described, to compete with the phosphatidyl-serine receptors, cells were pretreated for 30 min with 2mM phospho-L-serine as previously described (337).

## 8. DPPS-core accessibility

To assess the accessibility of DPPS to the surrounding environment of the NPPS, annexin V, a phosphatidyl-serine binding protein, was used. FITC-labelled nanoparticles (5  $\mu\text{g}$ ) was mixed with 0.25, 1.25 or 2.5  $\mu\text{g}$  of annexin V-AF647 (640943, Biolegend, France) in a calcium-containing buffer (10mM HEPES, 140mM NaCl, 2.5mM  $\text{CaCl}_2$ , pH=7.4) for 30 min at room temperature. The binding of annexin V to

the nanoparticles was evaluated by flow cytometry (CytoFlex, Beckman Coulter, France).

A minimum of 450,000 nanoparticles were first selected with FITC fluorescence intensity (excitation/emission (bandwidth) wavelengths: 488 nm/525nm (338)) in comparison with unlabeled nanoparticles. The annexin V-AF647 (excitation/emission (bandwidth) wavelengths: 638 nm/660(10) nm) was analyzed in the FITC positive nanoparticle region.

## 9. Association of proteins to nanoparticles

Bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich, France) was used as a model protein. The loading of BSA in nanoparticles was performed by mixing both components in aqueous solution at room temperature for 1 h. Different ratios (w:w) of nanoparticles/BSA were used from 1/0 to 1/5.

The size and zeta potential were determined as described for the characterization of the nanoparticles. The association of BSA to nanoparticles was analyzed by non-denaturing PAGE as previously described (325).

## 10. Intracellular delivery of proteins

BSA labelled with FITC (BSA-FITC, Sigma Aldrich, France) was associated to nanoparticles at a ratio (w:w) nanoparticle/protein of 3/1. Then, macrophage-like THP-1 cells were exposed to 10 µg/ml of the formulations for 0.5, 1, 2, 4 or 6 h and collected using trypsin before flow cytometry analysis (Attune NxT, ThermoFisher Scientific) using the following excitation/emission wavelengths (nm): FITC: 488/525.

A minimum of 5,000 cells were first selected on their size and internal complexity (FSC/SSC) then the fluorescence intensity related to the BSA-FITC cellular content was determined.

## 11. Intracellular degradation of proteins

BSA-DQ (DQ-green BSA™, Sigma Aldrich, France) is a Bodipy-FL over-labeled protein used as a reporter of protein degradation. BSA-DQ was associated to nanoparticles at a ratio (w:w) nanoparticle/protein of 3/1. Then, macrophage-like THP-1 cells were exposed to 10 µg/ml of the formulations for 0.5, 1, 2, 4 or 6 h and collected using trypsin before flow cytometry analysis (Attune NxT, ThermoFisher Scientific) using the following excitation/emission wavelengths (nm): 488/525.

A minimum of 5,000 cells were first selected on their size and internal complexity (FSC/SSC) then the fluorescence intensity related to the cellular content of Bodipy-FL-labeled peptides released by the degradation of BSA-DQ was determined.

To assess the involvement of acid endosomes (i.e. lysosomes) in the process of BSA degradation delivered by nanoparticles, macrophage-like THP-1 cells were

pretreated for 15 min with 50 mM of chloroquine diphosphate salt (ThermoFisher Scientific) then exposed for 30 min to the BSA-DQ formulations before flow cytometry analyses. For longer time of exposure, a pH-sensitive fluorophore was used. BSA was labelled with pHrodo (pHrodo Red, SE™, ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions using 1% (w:w) of label. BSA-pHrodo was further purified by gel permeation chromatography on a PD-10 Sephadex desalting column (Sigma Aldrich, France) and protein content was determined by the microBCA method (microBCA assay kit, ThermoFisher Scientific). BSA-pHrodo was associated to nanoparticles at a ratio (w:w) nanoparticle/protein of 3/1. Then, macrophage-like THP-1 cells were exposed to 10 µg/ml of the formulations for 0.5, 1, 2, 4 or 6 h and collected using trypsin before flow cytometry analysis (Attune NxT, ThermoFisher Scientific) using the following excitation/emission wavelenths (nm): 560/585.

A minimum of 5,000 cells were first selected on their size and internal complexity (FSC/SSC) then the fluorescence intensity related to the cellular content of low pH-activated BSA-pHrodo was determined.

## 12. Statistics

All experiments were done at least 3 times. The distribution of the quantitative variables was assessed by the Shapiro-Wilk test completed by the calculation of the residuals and the coefficients of Skewness and Kurtosis. Student's tests and ANOVA with Tukey-Cramer correction was used to compare quantitative values. For kinetic analyses, multivariate regression with repeated measurements were used. All tests were performed with a risk alpha of 5% using the SAS Software (version 9.04.01M6P11072018). Only statistically significant difference is indicated on figures.

## IV. Results

### 1. Characterization of the cationic maltodextrin nanoparticles and macrophage-like THP-1 cells

NPPS and NPL are cationic maltodextrin nanoparticles (NP<sup>+</sup>) containing dipalmitoylphosphatidyl serine (DPPS) and dipalmitoylphosphatidyl glycerol (DPPG) respectively. To strictly compare the effect of lipid cores on cell entry and protein delivery, a common batch of NP<sup>+</sup> was used and either filled with DPPS or DPPG.

The characterization of nanoparticles through light scattering approaches revealed that NPPS and NPL had similar i) median hydrodynamic diameter (number size), ii) interquartile range (from 0.178 to 0.269) of the polydispersity index (PDI) and iii) zeta potential values (**Table X**).

**Table X.** Size and zeta potential of NPPS and NPL.

The median and interquartile of the hydrodynamic diameter (expressed as number size), polydispersity index (PDI) and zeta potential are indicated.

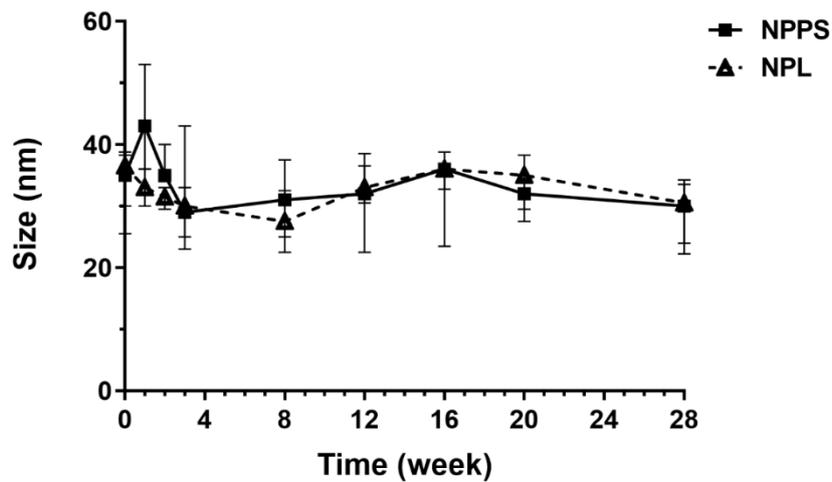
	<b>Diamètre (Number) (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Zeta Potentiel (mV)</b>
NPPS	35.00 [30.00; 38.75]	0,195 [0.178; 0.269]	26 [26; 28]
NPL	36.50 [25.50; 38.25]	0.254 [0.178; 0.261]	27 [26; 29]

Since nanoparticle characteristics were identical, NPPS and NPL are considered equal and the differential cellular effects could only be attributed to the lipid core composition. The colloidal stability of nanoparticles was then determined weekly by measuring the size and zeta potential of NPPS and NPL stored in water at room temperature. No significant variations of nanoparticle size could be detected during 28 weeks (**Figure 31**) demonstrating a robust stability of NPPS and NPL over time.

Then, the ability of macrophage-like THP-1 cells to phagocyte apoptotic Jurkat cells *via* a PS-dependent efferocytosis mechanism was assessed through flow cytometry. Derived from monocytes, THP-1 cells were differentiated into macrophages upon phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) stimulation and labelled with CytoTell Blue. In parallel, immortalized human T lymphocyte Jurkat cells were labelled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and treated with staurosporine to induce apoptosis and exposure of the PS *eat me* signal on the outer plasma membrane. Both cell types were then co-cultured for 18 h and flow cytometry analyses revealed that more than 20% of Jurkat cells were engulfed by macrophage-like THP-1 cells (**Figure 32**).

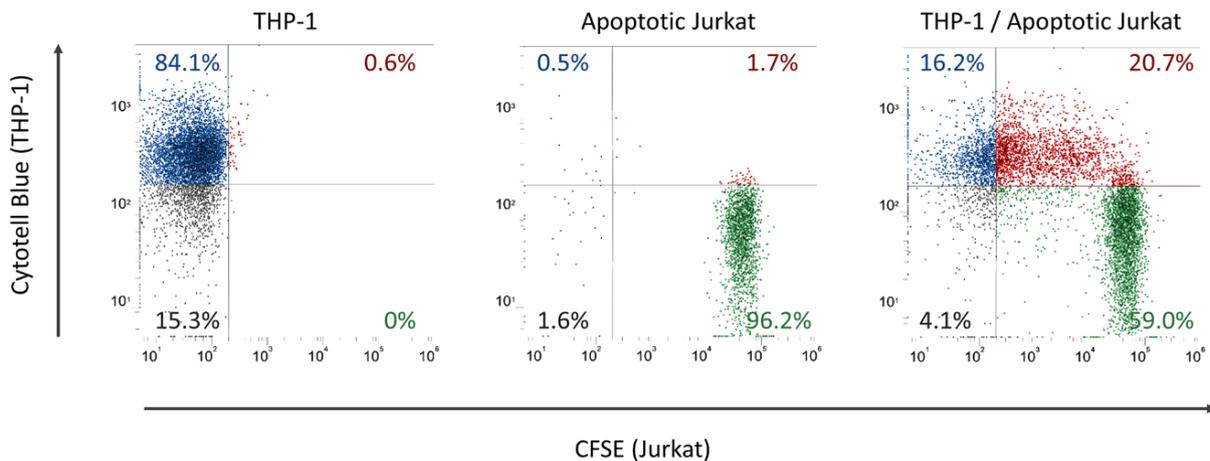
These data suggest that phagocytic macrophage-like THP-1 cells expressed PS-receptors responsible for efferocytosis and can potentially be targeted by PS-containing nanoparticles. Consequently, macrophage-like THP-1 cells can be

considered as a model to investigate the mechanisms of nanoparticle-assisted immune response in the context of nasal vaccination.



**Figure 31.** Colloidal stability of NPPS and NPL.

Nanoparticles are stored for 28 weeks at room temperature in water. The hydrodynamic diameter of NPPS and NPL are monitored by dynamic light scattering after sterile sampling of the nanoparticles. The graph represents the median and the interquartile of at least 6 samples. No significant difference is observed between NPPS and NPL.

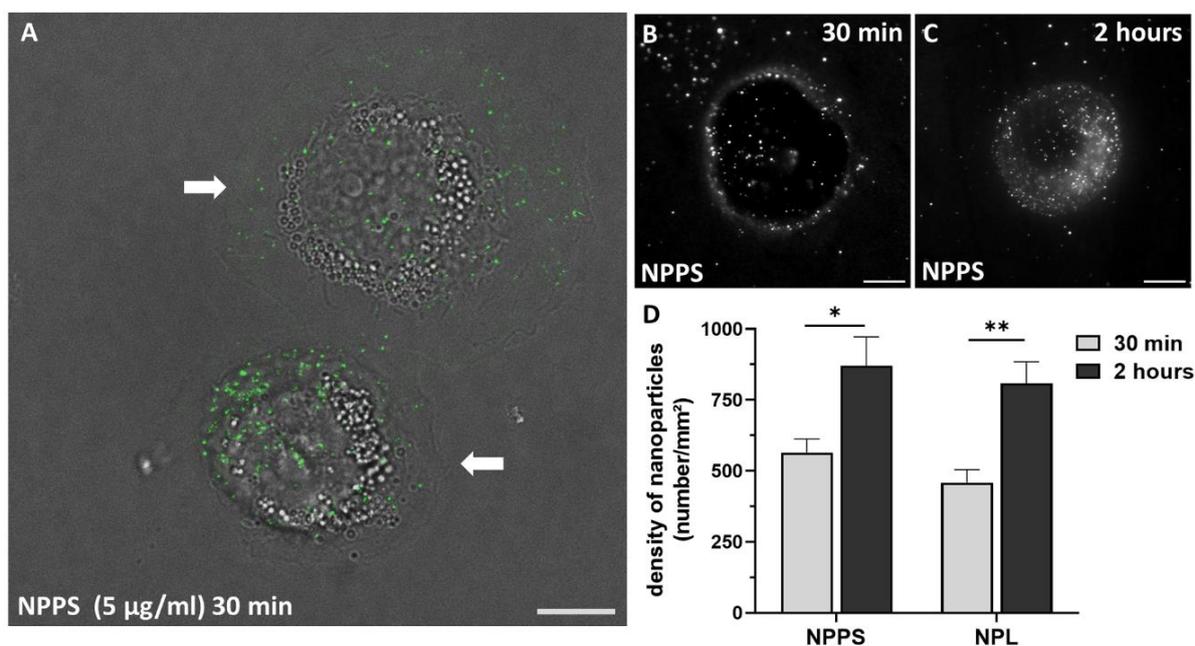


**Figure 32.** Macrophage-like THP-1 cells do efferocytosis.

THP-1 are labelled with CytoT cell Blue® (Left) while apoptotic Jurkat cells are labelled with CFSE (Middle) as revealed by cytometry. THP-1 are co-cultured with apoptotic Jurkat (ratio 1:1) for 18 h (Right) then cytometry analyses show that more of 20% of THP-1 has done efferocytosis. Grey : unlabelled cells, blue : CytoT cell Blue®-positive THP-1 cells, green : CFSE-positive Jurkat cells, red: CytoT cell Blue®-CFSE double positive THP-1 cells having captured apoptotic Jurkat cells.

## 2. Effect of nanoparticle-lipid core composition on cell entry efficacy

To study the impact of the lipid core composition on the nanoparticle ability to penetrate macrophage-like THP-1 cells, two complementary strategies were used.



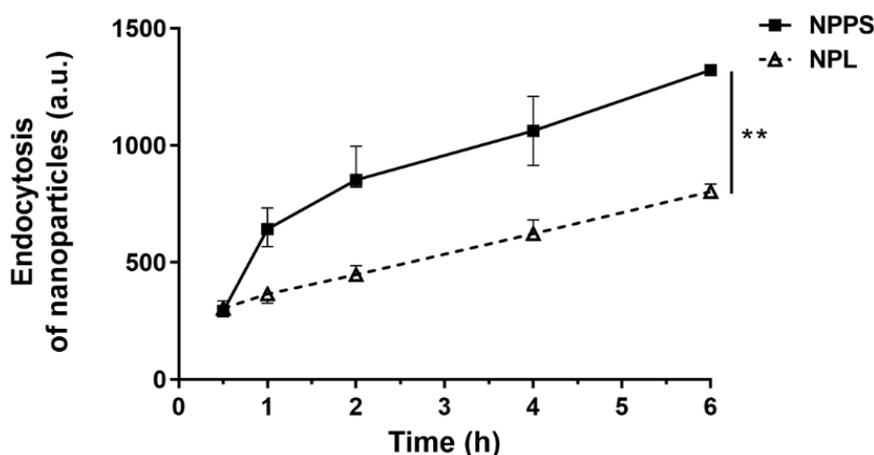
**Figure 33.** Internalized nanoparticle imaging in living macrophage-like THP-1 cells. (A) Macrophages-like THP-1 cells were exposed to 5 µg/ml of NPPS for 30 min and imaged through confocal microscopy (Green, FITC-labelled nanoparticles, maximum projection; Grey, bright-field, white arrows indicated lamellipodia edges). Scale bar: 10 µm. (B-C) Macrophages-like THP-1 cells were exposed to 5 µg/ml of NPPS for 30 min (B) or 2 hrs (C) and imaged in a single focal plane at the mid-cell body level through TIRF microscopy. Scale bar: 10 µm. (D) Density of nanoparticles within a single focus plane of macrophage-like THP-1 cells through TIRF microscopy are represented as histograms expressing the mean ( $\pm$  SEM) of a minimum of 7 cells. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Nanoparticle cell entry was first investigated on isolated living macrophage-like THP-1 cells with FITC-labelled NPPS and NPL (5 µg/ml) through confocal and TIRF microscopies. On cover glass, adherent macrophage-like THP-1 cells mainly showed rounded “fried egg” like morphology with variable-sized (white arrows) basal lamellipodia (**Figure 33A**).

Confocal imaging revealed the presence of NPPS and NPL in both lamellipodia and cytoplasm surrounding the nucleus (**Figure 33A**) suggesting that nanoparticles can actually integrate macrophage-like THP-1 cells at any site. However, TIRF experiments indicated that NPPS and NPL were mainly motionless in the lamellipodia in contrary to the upper cytoplasm. Consequently, for time resolution and standardization purposes, images were only acquired at the cell body mid-plane and considered as a cell index for NPPS and NPL TIRF evaluation. In this configuration, NPPS and NPL were mainly distributed at the periphery of the cells after 0.5 hr exposure and more widely found within the entire cytoplasm after 2 h of cell contact (**Figure 33B and C**). In particular, the density of NPPS and NPL within the focus plane significantly increased over time of exposure (**Figure 33D**). In addition, NPPS density was slightly higher to NPL density ( $565 \pm 47$  vs  $459 \pm 45$  particles/mm<sup>2</sup>) after 0.5 hr-exposure suggesting that NPPS may entered in macrophage-like THP-1 cells faster than NPL.

Then, nanoparticle cell entry was studied in living cell population through flow cytometry. In microplates, macrophage-like THP-1 cells were exposed to 10 µg/ml of FITC-labelled nanoparticles up to 6 h and the overall cellular content of fluorescent nanoparticles was detected.

Macrophage-like THP-1 cells loaded with NPL showed a constant increase (linear slope) in intracellular NPL content from 0.5 to 6 h (**Figure 34**). In contrast, NPPS cell entry displayed a strong initial start within the first two hours followed by a progressive increase during 4 hours (**Figure 34**). Although NPL and NPPS loading exhibited parallel slope of increase from time 2 h to time 6 hours, NPPS intensity signal is about two times higher than NPL one. These data demonstrate that cell entry was faster and higher for NPPS than for NPL as suggested by the early boosted penetration of NPPS in macrophage-like THP-1 cells.



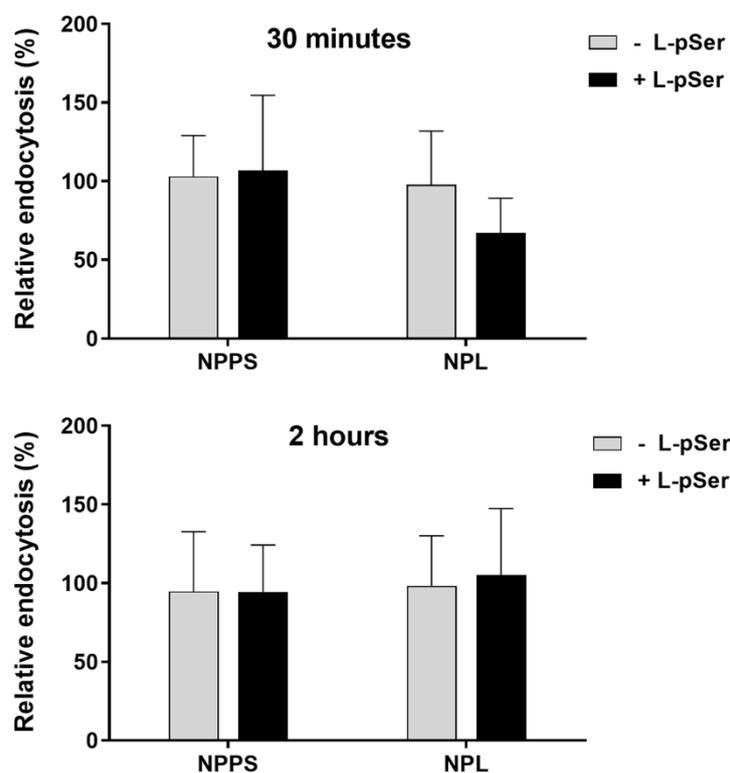
**Figure 34.** Endocytosis of NPPS and NPL by macrophage-like THP-1 cells.

THP-1 cells are exposed to FITC-labelled-NPPS or -NPL for 30 min to 6 h then analysed by cytometry to determine the cellular content of nanoparticles. The graph represents the mean (+/- SEM) of at least 3 experiments. \*\* $p < 0.01$ .

### 3. Mechanism of nanoparticle cell entry

Since phagocytic expressing PS-receptors THP-1 macrophages can preferentially target DPPS-filled nanoparticles, the mechanism of nanoparticle cell entry was studied in more details.

Firstly, L-phosphoSerine (L-pSer) was used to compete the interactions between PS (nanoparticles) and PS receptors (macrophages). Cells were pre-treated during 30 min with 2 mM L-pSer followed by NPPS or NPL exposure for 0.5 or 2 h. L-pSer had no effect on NPL or NPPS cell entry whatever the time of exposure (**Figure 35**). These data suggest that the early boost of NPPS cell loading may not be related to PS saturable receptors.

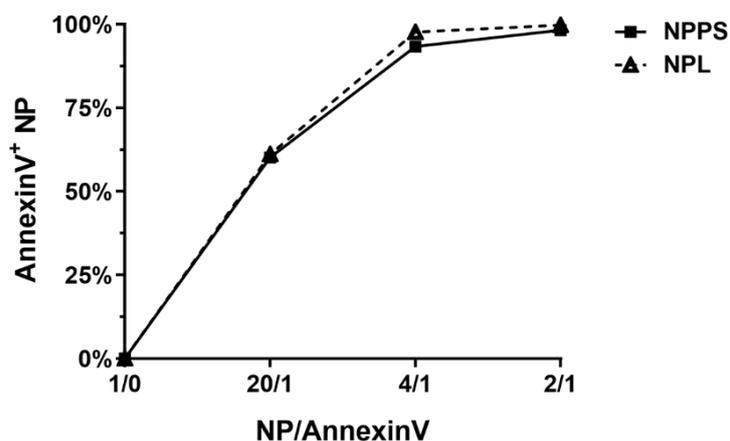


**Figure 35.** Inhibition of nanoparticle endocytosis by competition of PS receptors using L-phosphoSerine in macrophage-like THP-1 cells.

THP-1 cells are treated for 30 min to 2mM of L-phosphoSerine (L-pSer) and exposed to FITC-labelled-NPPS or -NPL for 30 min (Top) or 2 h (Bottom) then analysed by cytometry to determine the cellular content of nanoparticles. The graph represents the mean (+/- SEM) of at least 3 experiments. No statistically significant inhibition is observed using the L-pSer.

Secondly, Annexin V that displays high affinity for PS was selected to get more insight into NPPS/PS receptors interactions. Therefore, a flow cytometry-based analysis was developed to monitor nanoparticle-protein interactions in various ratio of NPPS and Annexin V, and NPL was used as a control. Consequently, NP<sup>+</sup> were first labelled with FITC and then filled either with DPPS or DPPG to produce FITC-labelled NPL or NPPS respectively. Nanoparticles were incubated for 30 min with Alexa Fluor 647-labelled Annexin V before flow cytometry analysis. Nanoparticles were successively gated according to i) size and structure (more than 450,000 events), ii) FITC fluorescence and iii) Alexa Fluor 647 fluorescence. Different ratios of NPPS/Annexin V and NPL/Annexin V (mass ratio: 1/0, 20/1, 4/1, 2/1) were examined.

With a 20/1 ratio, about 60% of NPPS/NPL were associated to Annexin V. With a 4/1 ratio, 95% of NPPS/NPL were associated to Annexin V while all nanoparticles interacted with Annexin V with a 2/1 ratio (**Figure 36**). These data indicate a clear interaction between nanoparticle and annexin V which do not depend on lipid core composition.



**Figure 36.** Nanoparticle-lipid core accessibility.

Different mass ratios FITC-labelled NP/Annexin V-AF647 (Alexa Fluor 647) are formulated for 30 min and analysed by cytometry. Nanoparticles are first selected on their FITC fluorescence then on the Annexin V-AF647 content. No statistically significant difference is observed between NPPS and NPL.

#### 4. Study of protein delivery by nanoparticles

Since NPPS had better properties for macrophage-like THP-1 entry compared to NPL, which are surprisingly not directly related to PS receptors, functional aspects of intracellular protein delivery by nanoparticles have been evaluated.

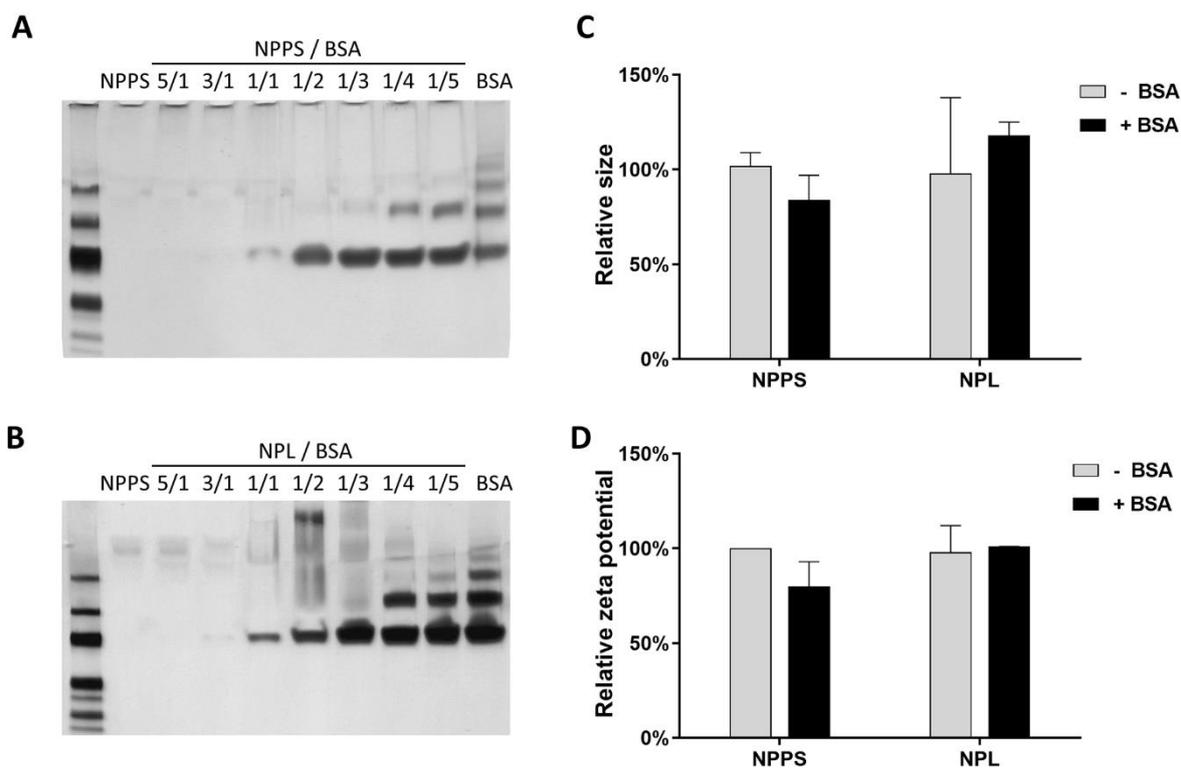
For this, FITC-labelled Bovine Serum Albumin (BSA) was integrated to NPPS or NPL and protein association, size and zeta potential were determined. Different mass ratio for nanoparticles/BSA (1/0, 5/1, 3/1, 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 0/1) were produced and formulations were run on non-denaturing PAGE. In these conditions, nanoparticle-associated BSA could not migrate and gel analyses only revealed unassociated proteins.

No unassociated BSA was observed for 5/1 or 3/1 ratios with NPL or NPPS. At 1/1 ratio, over 95% of BSA was associated to NPPS and 85% to NPL (**Figures 37A & B**). For further experiments, 3/1 nanoparticles/BSA mass ratio, leading to complete BSA association, was selected to compare NPPS and NPL formulations. For this ratio, BSA-NPPS and BSA-NPL did not exhibit any significant change in size and zeta potentials compare to NPPS and NPL (**Figures 37C & D**). The results demonstrate a similar association of BSA to NPPS and NPL and suggest that BSA is integrated within the nanoparticles rather than on the surface.

Since BSA-NPPS and BSA-NPL were characterized, their capacity to deliver BSA into macrophage-like THP-1 cells was investigated. Macrophage-like THP-1 cells were exposed to FITC-labelled BSA-NPPS or FITC-labelled BSA-NPL from 0.5 to 6 h and cellular delivery of FITC-labelled BSA was analysed by cytometry.

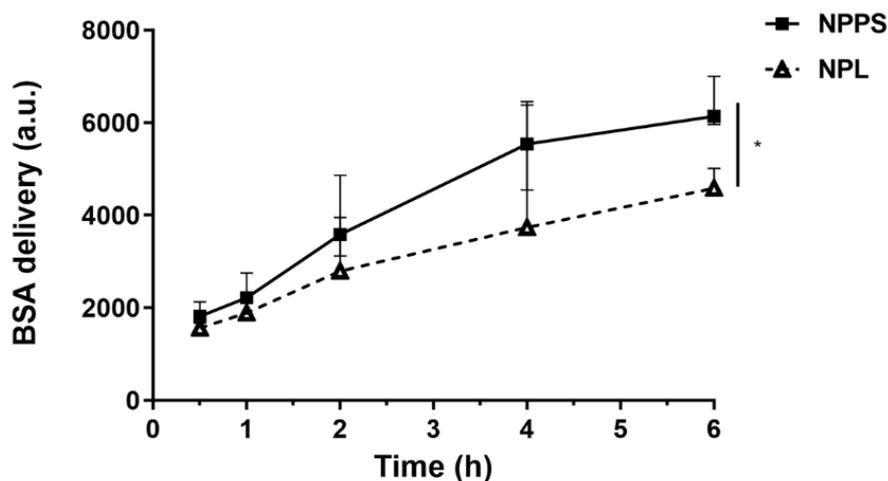
At the early time points (0.5 h and 1 h), NPPS and NPL delivered BSA in a similar manner. In contrast, from 2 h to 6 h of exposure, NPPS delivered more BSA

compared to NPL (**Figure 36**). These data indicate that, in addition to cell entry properties, NPPS also present enhanced capacity to deliver proteins in phagocytic cells compared to NPL.



**Figure 37.** Association of protein by NPPS and NPL.

Bovine serum albumin (BSA) are used as a model protein. Different mass ratio of NPPS/BSA (A) or NPL/BSA (B) are formulated for 30 min and run on non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The mass ratio nanoparticle/BSA: 3/1 is chosen since no free protein are detectable following silver nitrate staining of the gels. The relative size (C) and the relative zeta potential (D) of at least 3 formulations NPPS/BSA and NPL/BSA (3/1) are represented on the graphs with the NPPS values set to 100%. No statistically significant difference is observed between NPPS and NPL, with or without BSA.



**Figure 38.** Protein delivery by NPPS and NPL in macrophage-like THP-1 cells. FITC-labelled BSA is formulated (mass ratio 3/1) with NPPS or NPL and THP-1 cells are then exposed to the formulations before cytometry analyses of the cellular BSA-FITC content. The graph represents the median fluorescence intensity (+/- interquartile) of 3 experiments. \* $p < 0.05$ .

## 5. Characterization of nanoparticle intracellular routes and protein processing

After nanoparticles are internalized by macrophage-like THP-1 cells, the next matter is the intracellular routes that NPPS and NPL follow which determines their destination within cellular compartments.

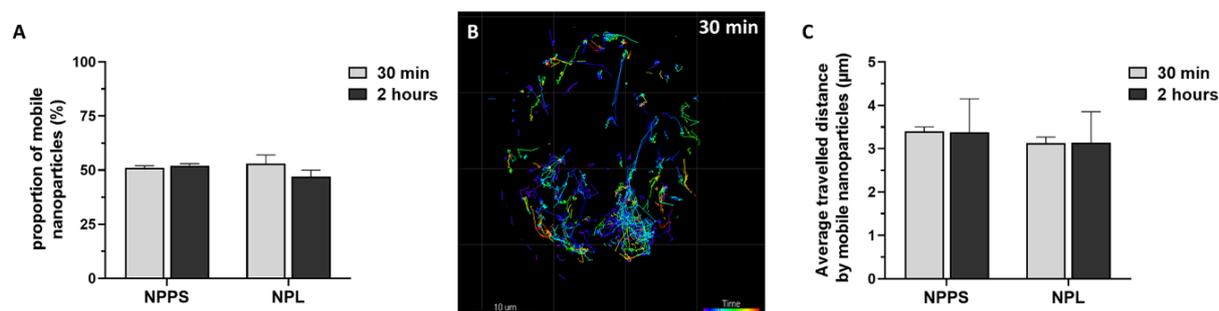
As previously described, nanoparticle dynamics were investigated in a single TIRF focal plan at the mid-cell body level. 5-min time-lapses through TIRF microscopy revealed that half of NPPS and NPL were mobile whatever the duration of exposure i.e. 0.5 hr or 2 h (**Figure 39A**). The average distance around 3  $\mu\text{m}$  covered by mobile NPPS and NPL in 5 min was not different between particles whatever the duration of exposure (**Figure 39B & C**). Interestingly, half of NPPS and NPL were motionless whatever the duration of exposure i.e. 0.5 hr or 2 h.

Therefore, the results indicate there is no difference between NPPS and NPL and that nanoparticles may have dynamic or static profiles in a 5-min time-lapse experiment.

Along intracellular routes, proteins (i.e. antigens) has to be processed to induce or stimulate an immune response and the first steps generally involve a pH-decrease dependent degradation in acid endosomes and/or lysosomes. Whether NPPS better direct proteins to acid degradation compared to NPL is also a main question and two approaches have been developed to test this hypothesis. Firstly, BSA-DQ which fluoresces when degraded by vesicular enzymes, was associated to

NPPS and NPL. Degradation of BSA-DQ in macrophage-like THP-1 cells was quantified by flow cytometry after 0.5 to 6 h of exposure.

No difference in BSA-DQ enzymatic degradation was observed between NPPS and NPL at any time of the experiment (**Figure 40A**).



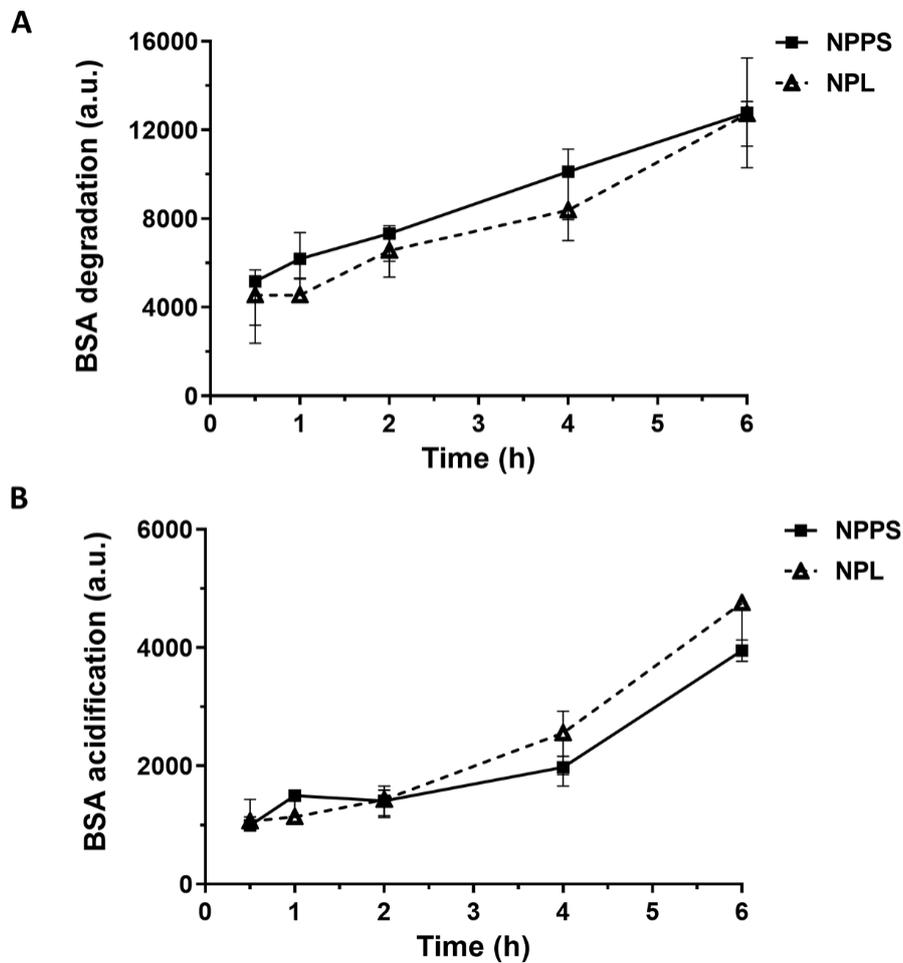
**Figure 39.** Characteristics of nanoparticle dynamics in living macrophage-like THP-1 cells through TIRF microscopy.

(A) Histograms indicating the proportion of mobile nanoparticles in a single focus plane after 30 min and 2 h of exposition. No statistically significant difference is observed. (B) Illustration of NPPS tracking in a single focus plane after 30 min of exposition and during 5 min-time-lapse acquisition. Scale bar = 10 μm. Rainbow scale revealed time window of NPPS movements during time-lapse (blue, beginning; red, end). (C) Histograms indicating the average distance travelled by mobile nanoparticles within the cell. Each value represents the mean ( $\pm$  SEM) of minimum 5 cells. No statistically significant difference is observed.

Secondly, the potential role of lipid core in pH-induced vesicular protein degradation was studied i) through a 30-min-pre-treatment with chloroquine which is described as an inhibitor of endosome acidification or ii) by using BSA-pHrodo which is a pH-sensitive labelled protein that fluoresce at lower pH. No difference in protein degradation within chloroquine-pre-treated macrophage-like THP-1 cells was observed when BSA was delivered by NPPS or NPL (data not shown).

BSA-pHrodo was formulated with NPPS and NPL, exposed to macrophage-like THP-1 cells for 0.5 to 6 h and the acidification of BSA was then analysed by flow cytometry. Similarly, no difference in the kinetics of acidification when BSA was carried either by NPPS or NPL (**Figure 40B**).

This suggests that, contrary to protein uptake and delivery, protein degradation through enzymatic or acidification processes was not dependent on lipid core composition of nanoparticles.



**Figure 40.** Characterization of nanoparticle-assisted protein degradation in macrophage-like THP-1 cells.

NPPS or NPL are formulated (mass ratio 3/1) with BSA-DQ (A) or with BSA-pH-rodo (B) to respectively monitor the enzymatic or the pH-dependent degradation of proteins. THP-1 cells are exposed for 30 min to 6 h to the formulations and the cellular content of degraded BSA is measured by cytometry. The graphs represent the median fluorescence intensity (+/- interquartile) of 3 experiments. No statistically significant difference is observed between NPL and NPPS.

## V. Discussion

Previous studies have underlined that i) adjuvants and/or excipients were required for mucosal vaccines and ii) particulate antigens such as antigens associated with nanoparticles triggered a stronger immune response than the sole antigens (339–341). In addition, the use of vaccines assisted by cationic maltodextrin-based nanoparticles is particularly well documented (289,292,309,324,326) including comparison of NP<sup>+</sup> (without lipid core) and NPL benefits (287,296). However, the role of the lipid core composition on the efficacy of cationic maltodextrin-based nanoparticles has never been explored so far. Here, two different nanoparticles with DPPG (NPL) and DPPS (NPPS) were developed and combined with differentiated macrophage-like THP-1 cells to investigate how the PS could modulate the targeting of the nanoparticles to phagocytic cells.

In the context of nasal vaccination and cationic maltodextrin-based nanoparticles, lipid core composition may have a direct impact on nanoparticle-cell interactions. Since filling the core of NP<sup>+</sup> with different lipids has not changed the size and zeta potentials characteristics (NPPS *versus* NPL), this suggests that varying the lipid core composition of NP<sup>+</sup> may generate a large family of nanocarriers with specific features and cellular interaction abilities. For example, in another procedure, a mixture of DPPC (dipalmitoyl phosphatidyl choline) and glycerol was associated at the surface of NP<sup>+</sup>, giving rise to the production of supramolecular biovectors<sup>™</sup> (342,343). Such a mixture could now be used to fill the core of NP<sup>+</sup> to simulate the low-density lipoproteins (LDL) behavior (326,344).

In our working model, we hypothesized that the lipid core of nanoparticles is of main importance and may be accessible to the surrounding environment. In particular, NPL had the advantage to move more freely than NP<sup>+</sup> in artificially reconstituted mucin mixture which is the main component of mucus (295). This interesting NPL property could be explained either by limited interactions between the anionic lipid core and the anionic mucins (295) or by limited nanoparticle-proteins interactions caused by the steric hindrance of their lipid core (287). It could be of interest to describe a lipid core composition that cumulate enhanced mucin permeation, enhanced antigen presenting cell targeting and enhanced cell penetration and protein delivery. This will lead to better nasal vaccine with a reduced antigen amount.

As described, NPL are non-specific nanocarriers and to date, no evidence suggests a targeting to immune cells. Instead, studies about NPL focus on nasal or respiratory epithelial cells (289,291,296). Their role as efferocytosis-competent (345,346) or accessory immune cells (347,348) is still debated and cannot be excluded, but the phagocytic cells remain the first step for antigen presentation in nasal mucosa (338). Macrophage-like THP-1 cells that expressed TIM and TAM receptors with affinity to PS (336), were able to perform efferocytosis.

We showed here that Jurkat cells were engulfed by macrophage-like THP-1 cells confirming the efferocytosis mechanism. Consequently, NPPS and macrophage-

like THP-1 cells were used in this work as a model to investigate antigen presentation through PS-targeting. Confocal and TIRF microscopies provided direct evidences of nanoparticles uptake within cell body and lamellipodia of cultured macrophage-like THP-1 cells. In airway epithelial cells, NPL and NP+ displayed different intracellular localization (296), indicating a role of the lipid core and its accessibility by the environment.

No difference in subcellular localization could be detected for NPL and NPPS in macrophage-like THP-1 cells. However, nanoparticles were observed at the cell periphery and within the entire cytoplasm after 0.5 hr and 2 hours of exposure, respectively. In addition, we showed by flow cytometry that cell entry was faster and higher for NPPS than for NPL as suggested by an early boosted penetration of NPPS in THP-1 cells.

The absence of L-phosphoSerine effect suggests that i) the diversity of receptors with affinity to PS might be not saturated by L-phosphoSerine or ii) other unconventional receptors might be involved. Alternatively, the early boost of NPPS cell loading may not be related to interaction between DPPS-lipid core with saturable macrophage-like THP-1 cell surface receptors. Since NP+ and NPL have high affinity to cell surface and are able to exploit multiple endocytosis pathways in parallel (284,294), they were very efficient in cell entry (294,296) compared to widely used liposomes or PLGA nanoparticles. Therefore, PS receptors-mediated NPPS cell entry may only represent a limited part of the overall nanoparticle uptake. Similarly, the absence of an enhanced interaction between NPPS and Annexin V suggested that NPPS-lipid core is not accessible by the surrounding environment. However, a competition between specific Annexin V/DPPS *versus* non-specific Annexin V/cationic maltodextrin interactions cannot be excluded since Annexin V, like BSA, is a protein that can freely associate to the nanoparticles (287,289,295). Although NPPS-lipid core accessibility is not clear, the stimulatory effect of DPPS on cell entry and protein delivery in macrophage-like THP-1 cells is well demonstrated.

In addition to cell entry properties, NPPS also present enhanced capacity to deliver proteins in phagocytic cells compared to NPL without favoring protein degradation. The protein delivery is consistent with the increased NPPS cell entry. However, once the protein is delivered, the speed of protein degradation may be slower than the nanoparticle uptake constituting consequently a limiting factor that explains why there is no difference between NPL and NPPS.

Our TIRF data support that hypothesis since the proportion and dynamics of mobile nanoparticles were similar for NPPS and NPL. Only half of nanoparticles were mobile and the apparent velocity is relatively slow compared to other nanoparticles. The intracellular velocity depends among other on the nanoparticle material, their interactions with the cytoskeleton, the internalization in endocytic vesicle, the hindrance in the cell or obviously their size. Large clusters of DNA-decorated gold nanoparticles moved at 50 nm/s in average while the single (70 nm) exhibited an average velocity of 150 nm/s (349). Concerning the interactions with the cytoskeleton and the endosome trafficking machinery, a velocity over 150 nm/s is described (350).

Our data showed a velocity of 10 nm/s, suggesting multiple interactions with the cellular component and an extended intracellular resident time, therefore a longer time for the carried proteins to interact with the cellular machinery. This could explain why these nanoparticles are more efficient than other conventional delivery system (325).

In addition, while a lipid core presence improved the lysosome-dependent degradation of carried protein by cationic maltodextrin-based nanoparticles (296), we showed here that such a protein degradation through enzymatic or acidification processes is not dependent on the lipid core composition. Taken together these data suggest that when nanoparticles entered cells, they waited for being processed or addressed to organelles or exocytosis. However, nanocarriers with enhanced delivery properties through the mucosal barrier may *in fine* reduce the initial amount of required antigens to trigger the immune response (351).

## VI. Conclusion

Macrophage-like THP-1 cells can be considered as a model to investigate the mechanisms of cationic maltodextrin-based nanoparticles-assisted immune response in the context of nasal vaccination. The nanoparticle core can be filled with lipids which composition drives properties. In particular, cell entry and protein delivery were higher for NPPS than for NPL. Since cell loading may not be related to PS receptors, this study highlighted a mechanism unrevealed so far.

Within macrophage-like THP-1 cells, half of nanoparticles were mobile and protein degradation through enzymatic or acidification processes was not dependent on lipid core composition. Nanoparticles with enhanced cell entry and delivery properties may reduce the quantity of antigens and associated cost to trigger an immune response. Further *in vivo* nanoparticle-assisted vaccine studies are required to fully settle the strategy.

## 4<sup>EME</sup> PARTIE : DISCUSSION GENERALE

Non invasive, l'administration *per os* de principes actifs s'effectue depuis l'aube de la médecine. Plus récemment, l'absorption quasi instantanée par les voies sublinguales et nasales s'est révélée très utile pour la prise en charge rapide d'accès algique (ABSTRAL® Fentanyl) ou de crises d'angor (NATISPRAY® Trinitrine). Ces résultats encourageants ont par la suite intéressés la communauté scientifique envisageant d'autres applications. Rapidement, l'espoir de vaccins inoculés via les muqueuses est apparu, évitant ainsi les injections parentérales.

### I. La vaccination par voie muqueuse

Porte d'entrée majoritaire des microorganismes, ces tissus sont richement peuplés de cellules immunitaires exacerbant l'intérêt pour cette voie d'administration. Ainsi, notre revue a démontré que certaines formulations vaccinales pulvérisées au niveau nasal induisaient à la fois une immunité locale mais aussi systémique. Ces observations renforcent l'hypothèse d'une communication entre les différentes muqueuses et d'une immunité globale.

De façon intéressante, une vaccination nasale à l'encontre de pathogènes sexuellement transmissibles (Hépatite B, HPV, Syphilis) pourrait conduire à une protection des muqueuses localement mais aussi à distance au niveau des voies génitales, sièges primaires de ces infections. De plus, la nature de l'antigène et la muqueuse touchée peuvent aussi faire varier la réponse induite (352).

La majorité des essais que nous avons sélectionné portait sur l'administration nasale ou orale de formulations (partie I.IV.2). Néanmoins, les alternatives sublinguales et génitales existent donnant de bons résultats lors de la délivrance de vaccin grippal dans le premier cas (353). Dans le second, l'absence d'enzyme, la surface de contact importante et le pH moins acide que la voie digestive pourraient rendre cette option envisageable (354). Se pose tout de même la question de l'acceptation du public pour ce type d'administration expliquant le peu d'articles recourant à cette technique.

Bien que la voie des muqueuses puisse paraître prometteuse, de nombreux obstacles viennent complexifier la mise au point de vaccins, en témoignent les seules 8 autorisations de commercialisation octroyées aux vaccins distribués par voie orale ou nasale (355). Parmi ceux-ci, seulement deux concernent la voie nasale dirigés à l'encontre des virus *Influenzae* : le FLUMIST® et le NASOVAC®. Ces vaccins vivants atténués quadrivalents sont certes efficaces (356) mais malheureusement indiqués uniquement pour les personnes âgés de 2 à 49 ans excluant les patients les plus sensibles à ce pathogène.

La principale problématique de cette voie d'administration reste sans contexte la clairance muco-ciliaire permettant une expulsion rapide des corps étrangers (partie I.III.4.1). Le temps de résidence est alors relativement faible (357) limitant tout contact

avec les DC infiltrées dans l'épithélium. En conséquence, l'antigène seul est rapidement dégradé présentant une faible immunogénicité.

Pour dépasser cette limitation, des nanoparticules peuvent être ajoutées pour protéger les épitopes jusqu'aux épithéliums. Malgré cela, la vaccination par cette voie reste un défi puisque sa réussite dépend de nombreux facteurs :

- Le type de nanoparticule employée et ses propriétés intrinsèques (taille, potentiel de surface, forme, hydrophobicité, composition).
- Le choix de l'antigène et sa localisation dans la nanoparticule (dispersé dans la NP ou complexé en surface).
- L'administration de rappels et la récurrence de ceux-ci.
- L'emploi d'adjuvants ajoutés dans le milieu ou associés au vecteur.

## **II. Le recours aux nanoparticules dans les vaccins**

Ces formulations peuvent s'effectuer via différents vecteurs mais le recours aux polymères reste nettement plus fréquent avec de multiples essais portant sur des nanoparticules de chitosan, de PLGA ou hybrides entre ces deux composés (partie I.IV.3.1).

Reconnu pour ses propriétés muco adhérentes remarquables nécessaires à cette voie d'administration, le chitosan est actuellement le composé le plus utilisé. Pour autant, sa faiblesse se situe dans sa sensibilité au pH due à son amine déprotonée en milieu physiologique. Dans cette condition, le polymère devient alors insoluble rendant tout stockage impossible. Si l'on place le polymère en milieu acide optimal pour sa stabilité, l'association avec la fraction antigénique se complexifie. En effet, les protéines peuvent d'une part être dénaturées et d'autre part se protoner lors d'un passage sous le pKa des acides aminés. Ce faisant l'antigène devient cationique, des forces de répulsions électrostatiques surviennent rendant impossible toute association durable avec les nanoparticules de chitosan. Ainsi, l'instabilité de cette liaison rend difficile le transfert de cette technologie chez l'Homme.

Dans ces conditions, la NPL est bien supérieure aux nanoparticules de chitosan car aucune problématique de stockage en milieu physiologique (iso osmolaire, pH neutre) n'est relatée. De plus, la dualité de ce vecteur contenant une partie anionique et une autre cationique pourrait expliquer sa flexibilité à de nombreuses fractions antigéniques. A l'image des autres technologies, les NPL sont sujettes à un relargage constant des protéines encapsulées. Toutefois, si l'on procède à des vérifications de ces solutions à distance de l'association en Native-PAGE comme décrit précédemment, la quantité de protéines encapsulées reste constante. Ces observations témoigneraient d'un équilibre entre association et relargage des antigènes en solution, facilité par les interactions ioniques et hydrophobes en jeu lors du mélange NPL-antigènes.

D'autres expériences vaccinales moins représentées existent telles que l'inoculation d'acides nucléiques encapsulés par des liposomes. Pour exemple, la

vaccination par voie nasale anti-grippale grâce aux acides nucléiques codant une hémagglutinine vectorisés par des liposomes provoquent une augmentation en Ig A et G (358). Un second essai portait sur la vaccination antituberculeuse employant des ARN codant la protéine HSP65 et démontrait la diminution des bacilles pulmonaires des souris challengées (359). Ces résultats doivent cependant être nuancés car le groupe contrôle était constitué de souris vaccinées en IM par ce même acide nucléique non encapsulé par la nanoparticule. Or l'immunogénicité de ce type d'antigène est connue pour être atténuée sans protection.

Malgré des résultats intéressants et le recours à des vecteurs différents non décrits dans notre revue, les différentes études relatent à nouveau les mêmes problèmes : l'absence de stabilité de la nanoparticule et de la liaison avec l'antigène (360).

Outre les acides nucléiques, la seconde possibilité consiste à vacciner les sujets à l'aide de vecteurs viraux plus stables sur le long terme. Cette technologie nécessite de nombreuses manipulations (partie I.I.3.1) pour insérer le génome d'intérêt et s'assurer de l'inhibition de son potentiel réplicatif. Bien que très efficace comme le montre l'exemple du VAXZEVRIA® dirigé contre la protéine S du SARS-CoV2, cette typologie de vaccin est soumise à certaines limitations.

En premier lieu, l'activation du système immunitaire et plus particulièrement la formation de potentiels complexes immuns à l'encontre de l'adénovirus limite le déploiement massif de telle technologie et cela reste une problématique majeure même après atténuation de sa virulence. Cet effet est la cause de l'échec du vaccin Ad5-nCov lors de son essai de phase I (361). De surcroît, l'efficacité de vecteur décroît avec la récurrence des rappels et une immunité croisée à l'encontre d'autres vaccins recourant à ces mêmes vecteurs n'est pas exclue. Pour autant, d'autres entités telles que le virus de Newcastle (362) ou les Poxvirus (363) pourraient être des alternatives sous couvert d'une sécurité biologique non confirmée à ce jour.

### **III. La NPL dans la vaccination par voie muqueuse**

Pour répondre aux problématiques de vectorisation d'antigène dans les vaccins administrés sur les muqueuses, la NPL a été développée (partie I.V). Sa stabilité colloïdale à 4°C (**Figure 33**) comme à 40°C (donnée non montrée) pendant plusieurs mois et sa capacité d'association avec les antigènes sont bien supérieures aux nanoparticules de PLGA et de chitosan décrites dans notre revue. Les antigènes sont dispersés dans la NPL ce qui contrairement aux PLGA de notre revue (253), favorise la réaction immunitaire. Cette formulation est stable dans le temps avec une conservation de la fraction antigénique les mois suivant le mélange. Par conséquent, une vaccination à distance de la fabrication reste possible et la quantité de formulation requise par acte vaccinal demeure extrêmement faible grâce au maintien de cette intégrité.

Suite à l'administration, une mobilité partielle des NPL au sein du mucus est conservée (295,297,302) permettant d'atteindre les DC infiltrées dans la muqueuse

nasale tout en limitant son élimination. Enfin, l'endocytose de ces NPL confrontées à d'autres nanoparticules est nettement supérieure.

De nombreuses expériences de notre revue portaient sur la vaccination contre le virus de l'hépatite B principalement à base de protéines HbS. Cette pathologie se transmet avec une forte probabilité en périnatal et moins fréquemment entre les individus par accident d'exposition au sang ou contact sexuel. Par la suite, deux cas de figures surviennent : soit le virus reste quiescent, contrôlé par le système immunitaire ; soit l'infection devient chronique provoquant des lésions hépatiques asymptomatiques conduisant inexorablement vers le processus fibrose / cirrhose / carcinome.

Pour combattre cette maladie, des traitements à base d'INF $\alpha$ -2a pegylé (PEGASYS<sup>®</sup>) et d'analogues de nucléosides ou nucléotides (Entecavir (BARACLUD<sup>®</sup>), Tenofovir (VIREAD<sup>®</sup>)) sont utilisables permettant de diminuer les scores de fibrose des patients (364). Malheureusement, ces médicaments contrôlent uniquement la réplication virale sans pour autant supprimer le pathogène. En conséquence, des mutations peuvent donc survenir, rendant ces traitements inefficaces. Les malades doivent de plus faire face aux effets indésirables à vie complexifiant la prise en charge de cette pathologie.

Pour répondre à cette problématique, l'industrie a mis au point dès les années 80 plusieurs vaccins contre l'hépatite B soit seul (ENGERIX B<sup>®</sup>) soit associés à d'autres pathologies (INFANRIX HEXA<sup>®</sup>, TWINRIX<sup>®</sup>). Ces vaccins ont démontré leur efficacité dans les régions endémiques telles que Taïwan où une diminution de la mortalité liée à l'atteinte hépatique a été constatée suite aux grandes campagnes vaccinales (365). Malheureusement, une fraction non négligeable de patients vaccinés (entre 10 et 40% des sujets selon les études) reste non répondeuse avec absence d'anticorps dirigés contre la protéine S du virus de l'hépatite B et cela même après un schéma vaccinal intensif (J0, J7, J21, J49, J77) à l'ENGERIX<sup>®</sup>. Cette pathologie reste donc très préoccupante pour ces patients qui, pour certains, présentent des facteurs de risque importants (personnels de santé, candidats aux greffes d'organes, patients immunodéprimés, hémodialysés, hémophiles).

Dans ces conditions, la NPL pourrait combler cette carence envers des patients non répondeurs et minimiser les infections materno-foétales encore trop présentes en Asie du Sud-Est. En effet, l'efficacité constatée lors de la transmission verticale de *Toxoplasma gondii* est un argument fort motivant les essais à l'encontre des virus de l'hépatite. Pour ce faire, la protéine HbS pourrait être employée à l'image des essais de notre revue. Toutefois, une technologie associant NPL et acides nucléiques pourrait être aussi tentée conjuguant ainsi deux techniques récentes.

Consacrée principalement aux applications vaccinales, la NPL s'adapte potentiellement à d'autres objectifs thérapeutiques.

La première possibilité serait de stimuler l'immunité anti tumorale, principe anciennement suivi lors de l'injection intra vésicale d'IMMUCYST<sup>®</sup> (BCG atténué) recrutant le système immunitaire *in situ* favorisant la cytotoxicité contre le cancer urothélial. Le but serait ainsi de faire affluer les cellules de l'immunité au site touché.

Facilement concevable pour les cancers ORL, cet effet serait sans doute amoindri pour des cancers à distance du site d'administration. Suivant cette idée, des essais recourant à une nanoparticule antérieure à la NPL appelée SupraMolecular BioVector (SMBV) chez la souris avaient été menés. Les SMBV utilisées étaient composées d'une matrice glucidique identique aux NPL et différaient de ces dernières par une implantation des lipides autour de la nanoparticule et non au cœur de celle-ci. Dans ces expériences, des formulations SMBV – IL-2 avaient été administrées chez des souris portantes d'une tumeur péritonéale. Le suivi de la croissance de la tumeur chez ces sujets avait démontré que ces formulations restreignaient significativement ce paramètre qu'il s'agisse d'une administration sous cutanée mais surtout nasale (366).

Dans le second cas, la vaccination se rapprocherait plus des immunothérapies recourant aux anticorps monoclonaux. Citons pour exemple les anti PD-1 (OPDIVO® (Nivolumab), KEYTRUDA® (Pembrolizumab)) ou anti PD-L1 (TECENTRIQ® (Atezolizumab), BAVENCIO® (Avelumab)) qui ont révolutionné le traitement des carcinomes bronchiques, urothéliaux, rénaux, épidermoïdes et des mélanomes. Par leur action, les checkpoints immunitaires inhibés par le microenvironnement tumoral sont à nouveau activés. De ce fait la pression exercée sur le système immunitaire par les cellules cancéreuses est levée potentialisant la cytotoxicité des macrophages, LT cytotoxiques et cellules NK. Ce principe est certes beaucoup plus complexe, nécessitant une séquence antigénique restreinte à la tumeur mais serait indéniablement plus efficace. Des études sont d'ailleurs menées en ce sens avec des nanoparticules de chitosan administrées par voie orale (367) ou nasale (368) ou encore des liposomes par cette même voie (369). Ces travaux pourraient être un pas en avant dans la médecine personnalisée de précision à l'image des CAR-T cells en déploiement dans de nombreuses pathologies tumorales.

Cependant, cette polyvalence de la NPL à toutes sortes d'antigènes est à la fois une qualité et un défaut. Cette particule présente en effet des résultats très prometteurs (289,297,302) mais aussi des échecs (303,306) ou des résultats plus nuancés (292). L'absence d'effet adjuvant (299) lors d'une administration seule est certes en faveur pour la sécurité biologique de la nanoparticule mais limite parallèlement son action sur le système immunitaire.

Partant de ce constat, le questionnement sur l'ajout d'adjuvants se pose. Et pour cause, lors des essais anti-grippaux (292) l'adjonction simultanée de la protéine recombinante contenant une fraction adjuvante et d'une hémagglutinine a montré une efficacité bien supérieure aux formulations sans l'un d'eux. De plus, le taux d'encapsulation très efficace de ces antigènes par la NPL permet à la fois d'envisager l'ajout d'un adjuvant et de l'épitope dans la nanoparticule sans pour autant altérer ce paramètre.

Ces modifications peuvent opérer de deux façons différentes. La plus simple consiste à ajouter lors du mélange de la NPL avec l'antigène une portion d'adjuvant (cytokines, CT, CpG, MPLA). Pour exemple, la vaccination antigrippale assistée par nanoparticules administrées par voie nasale contenant de l'IL-1 démontrait une augmentation des immunoglobulines comparativement au groupe contrôle (370). La

seconde technique modifie la structure du vecteur pour qu'il ait un effet adjuvant intrinsèque en ciblant des récepteurs de l'immunité. Notre choix s'est porté sur cette seconde alternative plus complexe mais comportant parallèlement de multiples possibilités de développements.

## **IV. L'optimisation de la NPL**

### **1. Modification du polysaccharide**

La première substitution effectuée dans nos travaux concerna la matrice glucidique de la NPL (partie II). En remplaçant la maltodextrine par un polysaccharide de galactomannane, nous espérions synthétiser une nanoparticule ayant une affinité pour les TLR-2/4 et le CD206. Cette reconnaissance est mise à profit dans plusieurs essais de notre revue portant sur des nanoparticules mannosylées (216,239,245,254,277), l'effet adjuvant est intrinsèque à leur structure et ne nécessite dans la plupart des cas aucun ajout post synthèse.

Dans cette optique, nous avons choisi la gomme de guar comme source du polysaccharide. Reconnu pour ses propriétés muco adhérentes, ce composé accroît le temps de résidence des principes actifs vectorisés (371,372) à l'image des NPL. Différents traitements peuvent être appliqués pour des objectifs variables. Pour exemple, l'estérification provoque la formation d'un hydrogel permettant la libération de protéines (373) alors que la carboxyméthylation initie la formation de nanoparticules dont le résultat fut testé en imagerie (374) ou à visée thérapeutique (375).

Lors des étapes de synthèse, nous avons constaté une hétérogénéité et une instabilité de ces NPM/NPML. Pour répondre à cette problématique, nous nous sommes questionnés sur la création d'une nanoparticule hybride maltodextrine / galactomannane. En diminuant la concentration du polymère de mannane, la fréquence des galactoses s'amoinerait simultanément ce qui devrait diminuer l'encombrement stérique dans la nanoparticule et par voie de conséquence rehausserait la capacité d'encapsulation des protéines par ce vecteur. Toutefois, il se pose alors la question de la reconnaissance des résidus mannose moins fréquents dans la structure de la nanoparticule par les récepteurs cités plus haut. En effet, l'étape de réticulation par l'épichlorhydrine peut opérer à la fois sur l'alcool secondaire du galactose mais aussi sur celui du mannose modifiant ainsi sa structure ce qui limite les interactions avec le milieu extérieur. Par conséquent, réduire la quantité de galactomannane revient à limiter les probabilités de reconnaissance par les cellules immunitaires, ce qui va à l'encontre de notre hypothèse de départ.

D'autres polysaccharides sont utilisés à cette fin et pourraient être des possibilités à envisager.

Pour exemple l'inuline (polymère de n fructoses liés en  $\beta$ 1-2 se terminant par un glucose branché en  $\alpha$ 1-2) reconnue par le TLR-4 (376) a été testée comme nanoparticule à l'encontre du SARS-CoV2. Prometteuse, cette nanoparticule reste

toutefois inférieure à la NPL à l'image des NP de chitosan et PLGA puisqu'elle est 3 fois plus grande, neutre (ce qui limite son interaction avec les membranes cellulaires) et libère passivement dans le milieu de stockage environ 80% de la protéine témoin encapsulée en seulement 10 jours.

Une autre possibilité serait de recourir aux  $\beta$ -glucanes (groupe hétérogène de polysaccharides de D-glucoses liés par des liaisons  $\beta$ ) issus des plantes, champignons et bactéries. Reconnus par les récepteurs aux lectines C (377,378), ces polymères ont la faculté de moduler la réponse immunitaire en potentialisant les réponses TH1 et TH17 (379,380).

## 2. Modification du cœur lipidique

La dernière partie consistait à substituer le DPPG présent dans la NPL par du DPPS (partie III). Le choix de cette modification s'est porté sur ce lipide par analogie avec la clairance des cellules apoptotiques conduite par les macrophages. En effet, toutes les membranes cellulaires sont constituées de PS majoritairement sur la partie intracellulaire de la bicouche phospholipidique (381). Lors de l'apoptose, la membrane est déstabilisée et l'action des floppases et scramblases conduit à l'exposition de la PS sur la face extracellulaire (382). Cette étape appelée efferocytose (327) permet l'élimination de ces cellules avant tout processus de nécrose grâce à ce « eat-me » signal, conservant ainsi l'intégrité des tissus concernés. Un large répertoire de récepteurs affins pour la PS existe sur ces cellules (TIM, TAM, BAI1, CD300, PSR) nous permettant d'émettre l'hypothèse d'un potentiel ciblage des cellules immunitaires.

L'effet de ce lipide n'est que peu exploré dans la vaccinologie. Fait assez étonnant car la PS est largement distribuée dans les cellules eucaryotes. De plus, sa dégradation en phosphatidyl-ethanolamine par la PS-decarboxylase mitochondriale (383) ou en Lyso-PS par les phospholipases A1 et A2 produisent des métabolites non toxiques capables de recruter les cellules immunitaires (384). Des facultés de régénération du tissu glial suite à des dommages neuronaux sont même décrites pour ces derniers métabolites (385).

Toutefois, les liposomes de PS montrent une nette supériorité vis-à-vis de la phosphatidyl-choline (386) sur l'activité phagocytaire des macrophages. Les études publiées attestent d'une réponse immunitaire similaire à une immunisation utilisant l'alun tout en ayant une réponse en immunoglobuline E (Ig E) allergisante très inférieure à celle retrouvée avec cet adjuvant (387,388).

La synthèse de cette nouvelle particule a permis d'obtenir des NPPS de composition, forme, taille, potentiel de surface similaires aux NPL. Cette synthèse était reproductible conduisant à des lots homogènes avec un indice de polydispersité satisfaisant et une stabilité colloïdale identique à celle de la NPL. *A contrario* des NPML, le maintien de l'intégrité de cette nouvelle particule sur le long terme a prouvé que la composition et la structure du polymère étaient responsables de la stabilité colloïdale et des propriétés d'association des nanoparticules en découlant.

Le point critique de notre travail reste sans nul doute notre modèle cellulaire. En effet, il est difficile d'affirmer un potentiel ciblage en recourant à une technique de culture unicellulaire. Certes plus complexes à travailler et toujours très éloignés de la réalité, des modèles de co-cultures existent. Les modèles mélangeant macrophages THP-1 et cellules épithéliales Caco-2 sont nombreux (389) mais très éloignés de notre application car ces dernières représentent plus fidèlement l'épithélium intestinal.

Deux autres associations cellulaires pourraient présenter un intérêt : la première concerne des BMDC différenciées en macrophages et des lymphocytes T issus de la rate de souris (390). Bien que ne comportant pas de cellules épithéliales, ce modèle présente deux entités pouvant coopérer permettant à la fois de mesurer la distribution des nanoparticules entre les deux types cellulaires mais aussi de vérifier l'activation des lymphocytes T grâce à la présentation des fractions antigéniques par les CMH des macrophages à ces derniers. Pour s'approcher plus fidèlement de la synapse immunitaire, l'emploi uniquement des DC dans le modèle de co-culture aurait été envisageable mais cela supprimerait l'intérêt de la reconnaissance par les récepteurs à la PS exprimés massivement sur les phagocytes.

Le dernier modèle comporte des macrophages THP-1 et des cellules épithéliales alvéolaires A549 (391) ensemencés au sein du même transwell. Bien que très éloigné de la réalité, ce modèle se rapproche plus fidèlement de l'épithélium nasal et aurait permis de visualiser ce potentiel ciblage envers les macrophages.

Pour compléter ces expériences en s'approchant du modèle animalier, des modèles d'organoïdes de la sphère nasale aurait pu être envisagés (392,393). La complexité de la culture n'est cependant pas la seule adversité de ces expériences, car les modèles décrits dans la littérature sont d'une part peu fréquents mais ne comportent surtout aucune cellule immunitaire, cible principale de ce travail de thèse.

La seconde faiblesse concerne l'absence d'expérience chez l'animal. Dans un premier temps, il aurait été intéressant de confronter les temps de résidence au niveau nasal et la cinétique d'élimination des NPPS et NPL. Lors des travaux menés sur la toxoplasmose, ces paramètres étaient très allongés comparativement à d'autres nanoparticules (302). Néanmoins, il est tout à fait possible qu'un potentiel ciblage de la NPPS puisse encore le prolonger. De même, l'intérêt majeur du ciblage souhaité était de restreindre la délivrance de protéines immunogènes aux cellules immunitaires infiltrées dans la muqueuse nasale épargnant ainsi le reste de l'épithélium. Difficilement visualisable en imagerie, ces expériences seraient néanmoins envisageables en testant la délivrance d'antigènes fluorescents sur des cellules co-marquées différenciant les CPAg des cellules épithéliales (394). Pour finir, cette affirmation pourrait être vérifiée en comparant les réponses immunitaires provoquées par les NPL et NPPS après vaccination.

La phosphatidylsérine est l'un des rares lipides sous sa forme pure à posséder une affinité pour le système immunitaire. Pour expérimenter d'autres substitutions du cœur lipidique de la NPL, il faudra par la suite se tourner sur des lipopeptides agonistes

des TLR-1 et 2. Ces constituants sont ubiquitaires des membranes bactériennes sous formes tri acétylées chez les Gram+ et di acétylées chez les Gram- (395).

Citons pour exemple le PAM2Cys (dipalmitoyl-S-glyceryl cysteine), composé recruteur et activateur des splénocytes et macrophages (396) ou encore le Pam3CSK4 (agoniste synthétique des TLR-1 et 2), lipopeptide potentialisant la sécrétion de cytokines pro inflammatoires lors de son contact avec les DC et macrophages (397). Incorporé dans des nanoparticules de PLGA conjointement à un extrait protéique de *Leishmania*, le Pam3CSK4 potentialise l'action *in vitro* de la nanoparticule. Ainsi, la concentration de cytokines pro inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) sécrétées par les macrophages activés et l'activité microbicide de ces cellules étaient augmentées plus durablement que pour les PLGA – Antigène. Conséquence de cette hausse d'activité, la quantité d'ADN de parasites dans les macrophages était amoindrie avec cette formulation (398).

Une seconde possibilité concerne le MALP-2 (Mycoplasma Associated LipoPeptide-2) qui induit le switch isotypique en Ig G et facilite le recrutement de LB naïfs (399). Lors d'essais vaccinaux à l'encontre de la tuberculose, ce lipopeptide a démontré une synergie avec le BCG en diminuant la quantité d'UFC après challenge des souris vaccinées (400). De plus, son utilisation en vaccination provoque un recrutement de cellules cytotoxiques et une augmentation des IgA dirigées contre le VIH-1 (401).

Bien plus complexe que le DPPG ou le DPPS, la lipodation des NP+ par les lipopeptides nécessitera sans doute une quantité moindre. Une possibilité serait à l'image des NPML de construire une NP+ hybride contenant une fraction de DPPG ou de DPPS complété par un lipopeptide. Cependant, cette étape de synthèse nécessite le chauffage des solutions de lipide et de nanoparticules à 80°C. Les protéines thermo sensibles pourraient se lyser à cette température empêchant toute efficacité ultérieure. Une seconde possibilité serait alors d'ajouter ces agonistes lors de la formulation avec les antigènes tels des adjuvants, leur sous unité protéique facilitant très certainement leur association avec la NPL.

Pour autant, les lipopeptides sont des agonistes des TLR-1, 2 et 6 situés en extracellulaire. Nos expériences ont démontré que l'ajout de DPPS modifiait le comportement de la nanoparticule en boostant son endocytose et délivrait parallèlement la protéine vectorisée. S'ensuit une dégradation identique aux protéines vectorisées par la NPL ce qui laisserait penser que la problématique se situe en intracellulaire plutôt qu'au niveau membranaire.

Ainsi, l'adjonction d'agonistes cités plus haut pourrait soit ne pas résoudre cette problématique soit au contraire attirer au niveau du site de contact les nombreux TLR membranaires (402). Par ce recrutement, la proximité entre les domaines transmembranaires des TLR-1, 2 et 6 faciliterait les actions des protéines de la voie NF $\kappa$ B potentialisant la cascade de signalisation se concluant par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (403). Dans ces conditions, il est envisageable qu'une délivrance antigénique identique puisse provoquer une réponse vaccinale supérieure chez un modèle animalier.

Il reste alors les observations décrites lors des essais vaccinaux anti grippaux (292) soulignant l'importance de la vectorisation d'une protéine de fusion contenant une fraction adjuvante par la NPL. Partant de ce constat, les choix des antigènes semblent être prépondérants dans la qualité de la réponse induite. Bien que complexes à construire, ces épitopes induisent souvent des réponses sur le long terme. En témoigne l'essai de phase II (NCT00869778) employant des liposomes provoquant une séroconversion à l'encontre de l'hépatite B supérieure au placebo (404). Lors de cet essai clinique, le lipopeptide vectorisé construit en 4 parties contenait deux fractions antigéniques reconnues par les LB et LT, une partie issue de la toxine cholérique induisant la polarisation TH1 juxtaposée à un acide palmitique.

## 5<sup>EME</sup> PARTIE : CONCLUSION

Durant ces 30 dernières années, l'industrie pharmaceutique a dû faire face à des problèmes de solubilité croissants des molécules nouvellement découvertes. Les premières nanoparticules constituées de nanocristaux ont alors vu le jour pour résoudre la faible hydro solubilité de ces médicaments. S'en suivit, la commercialisation de liposomes permettant de réduire la fréquence ou la gravité des effets indésirables des principes actifs non vectorisés : l'amphotéricine B liposomale (AMBISOME<sup>®</sup>) étant le parfait exemple de cette réussite.

Malgré quelques médicaments sur le marché, la recherche clinique à base de nanoparticules reste très complexe et les vecteurs employés sont souvent instables, non efficaces et potentiellement toxiques. Jusqu'à récemment, aucune nanoparticule n'était utilisée dans le domaine vaccinal mais leur utilité s'est révélée lors de la délivrance d'acides nucléiques à l'encontre du SARS-CoV2 redoublant l'intérêt des chercheurs pour cette technologie.

Bien avant la pandémie, la NPL fut synthétisée. Cette nanoparticule reste stable sur le long terme, est non-toxique et capable de vectoriser un large panel d'antigènes vers la muqueuse nasale. Malgré des effets non contestables sur la prévention de la toxoplasmose, les résultats des différentes expériences (grippe, leishmaniose, tuberculose) étaient plus nuancés. Ainsi, l'antigène serait responsable de la réponse immunitaire constatée et la NPL agirait comme un transporteur vers la localisation désignée par la nanoparticule. Mon travail de thèse s'est donc focalisé sur l'amélioration de cette nanoparticule en modifiant les deux composantes de la NPL.

La substitution totale de la maltodextrine par du galactomannane se solda par un échec avec la synthèse d'une nanoparticule plus grande, hétérogène et moins stable que la NPL nous empêchant toute tentative d'expériences *in vitro*.

Le second volet de cette thèse portait sur le remplacement du cœur lipidique de DPPG par du DPPS afin pour certains récepteurs de l'immunité innée. Ces expériences ont démontré que la qualité du lipide n'altérerait pas les propriétés de la NPL et améliorerait sa capacité à être endocytosées. Par ailleurs, la faible mobilité des NPL et NPPS dans les cellules est sans doute à l'origine d'interactions prolongées avec les organites cellulaires, initiant la présentation antigénique via les CMH au système immunitaire. Pour confirmer l'hypothèse de ciblage envers les cellules immunitaires, des expériences de co-cultures cultivant cellules immunitaires et épithéliales devraient être envisagées. Ces expériences devraient se conclure par un essai vaccinal murin afin de vérifier les différences de réponses immunitaires induites par la NPL et la NPPS.



# LISTE DES FIGURES

<b>FIGURE 1.</b> FRISE CHRONOLOGIQUE DU DEVELOPPEMENT DES DIFFERENTS VACCINS (11).....	10
<b>FIGURE 2.</b> MODES D'ACTION DES VECTEURS VIRAUX ET DES VACCINS A ARN (42). .....	15
<b>FIGURE 3.</b> CORRELATION ENTRE TAILLE DES PARTICULES ET SURFACE TOTALE (73).....	24
<b>FIGURE 4.</b> ECHELLE DE TAILLE DES STRUCTURES BIOLOGIQUES ET DES NANOPARTICULES (75). .....	24
<b>FIGURE 5.</b> CLASSIFICATION DES NANO OBJETS SELON LEURS DIMENSIONS. FIBRES A 1 DIMENSION (A), PLAQUES EN 2 DIMENSIONS (B) ET PARTICULES EN 3 DIMENSIONS (C). .....	25
<b>FIGURE 6.</b> GENERATIONS DE NANOPARTICULES (77). .....	26
<b>FIGURE 7.</b> EFFET DE PERMEABILITE ET DE RETENTION RENFORCEES (83).....	27
<b>FIGURE 8.</b> REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LIPOSOMES (97). .....	31
<b>FIGURE 9.</b> OBSERVATION EN CRYOMICROSCOPIE ELECTRONIQUE ET REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS TYPES DE LIPOSOMES (97).....	31
<b>FIGURE 10.</b> STRUCTURE EXTERNE (A) ET INTERNE (B) D'UN MASTADENOVIRUS (105). .....	34
<b>FIGURE 11.</b> REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INFLAMMASOME .....	40
<b>FIGURE 12.</b> VOIES DE SIGNALISATION DES CMH (146). .....	43
<b>FIGURE 13.</b> SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE (147).....	44
<b>FIGURE 14.</b> DIFFERENCIATION DES LT CD4+ NAÏFS (149). .....	45
<b>FIGURE 15.</b> LES DEUX PHASES DE LA REPONSE HUMORALE (146). .....	47
<b>FIGURE 16.</b> EFFET DE LA LOCALISATION DES LB SUR LES PROPRIETES FINALES DE CES CELLULES (146). .....	48
<b>FIGURE 17.</b> CINETIQUE DES REPONSES PRIMAIRE ET SECONDAIRE DU SYSTEME IMMUNITAIRE LORS D'UN CONTACT AVEC UN PATHOGENE (146). .....	50
<b>FIGURE 18.</b> DIFFERENCIATION ET MAINTIEN DES LT MEMOIRES (156).....	51
<b>FIGURE 19.</b> REPRESENTATION DES SITES INDUCTEURS ET EFFECTEURS LORS D'UNE REPONSE IMMUNITAIRE AU NIVEAU DES MUQUEUSES (180). .....	56
<b>FIGURE 20.</b> REPONSE IMMUNOLOGIQUE EN PRESENCE D'UNE BACTERIE COMMENSALE OU PATHOGENE (185).....	57
<b>FIGURE 21.</b> LIBERATION DES Ig A DANS LA LUMIERE DES MUQUEUSES (146).....	58
<b>FIGURE 22.</b> ORGANIGRAMME DES ETUDES SELECTIONNEES. ....	62
<b>FIGURE 23.</b> FORMULE SEMI-DEVELOPEE DU CHITOSAN. ....	82
<b>FIGURE 24.</b> FORMULE SEMI-DEVELOPEE DU TRI(METHYL)-CHITOSAN. ....	82
<b>FIGURE 25.</b> FORMULE SEMI-DEVELOPEE DE L'ACIDE POLY(LACTIQUE-CO-GLYCOLIQUE).....	83
<b>FIGURE 26.</b> FORMULE CHIMIQUE SEMI DEVELOPEE DE LA MALTODEXTRINE. ....	91
<b>FIGURE 27.</b> SCHEMA DE LA MALTODEXTRINE RETICULEE ET FONCTIONNALISEE.....	92
<b>FIGURE 28.</b> REPRESENTATIONS SCHEMATIQUES DE LA NP+ (A) ET DE LA NPL (B). .....	92
<b>FIGURE 29.</b> REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES POLYMERES DE MALTODEXTRINE (A) ET DE GALACTOMANNANE (B). .....	105
<b>FIGURE 30.</b> ASSOCIATION DE BSA AUX NPS. ....	107
<b>FIGURE 31.</b> COLLOIDAL STABILITY OF NPPS AND NPL. ....	121
<b>FIGURE 32.</b> MACROPHAGE-LIKE THP-1 CELLS DO EFFEROCYTOSIS. ....	121
<b>FIGURE 33.</b> INTERNALIZED NANOPARTICLE IMAGING IN LIVING MACROPHAGE-LIKE THP-1 CELLS. ....	122
<b>FIGURE 34.</b> ENDOCYTOSIS OF NPPS AND NPL BY MACROPHAGE-LIKE THP-1 CELLS. ....	123
<b>FIGURE 35.</b> INHIBITION OF NANOPARTICLE ENDOCYTOSIS BY COMPETITION OF PS RECEPTORS USING L-PHOSPHOSERINE IN MACROPHAGE-LIKE THP-1 CELLS.....	124
<b>FIGURE 36.</b> NANOPARTICLE-LIPID CORE ACCESSIBILITY.....	125
<b>FIGURE 37.</b> ASSOCIATION OF PROTEIN BY NPPS AND NPL. ....	126
<b>FIGURE 38.</b> PROTEIN DELIVERY BY NPPS AND NPL IN MACROPHAGE-LIKE THP-1 CELLS.....	127
<b>FIGURE 39.</b> CHARACTERISTICS OF NANOPARTICLE DYNAMICS IN LIVING MACROPHAGE-LIKE THP-1 CELLS THROUGH TIRF MICROSCOPY. .....	128
<b>FIGURE 40.</b> CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLE-ASSISTED PROTEIN DEGRADATION IN MACROPHAGE-LIKE THP-1 CELLS. ....	129

# LISTE DES TABLEAUX

<b>TABLEAU I.</b> LISTE DES DIFFÉRENTS TYPES DE VACCINS.....	21
<b>TABLEAU II.</b> DÉFINITIONS DES NANOPARTICULES.....	23
<b>TABLEAU III.</b> COMPARAISON DES SURFACES SELON LA TAILLE DES PARTICULES EXAMINÉES. ....	23
<b>TABLEAU IV.</b> CARACTÉRISTIQUES DES TLR (107,108).....	38
<b>TABLEAU V.</b> CARACTÉRISTIQUES DES ISOTYPES.....	46
<b>TABLEAU VI.</b> RÉSUMÉ DES ARTICLES SÉLECTIONNÉS AVEC UNE ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE .....	63
<b>TABLEAU VII.</b> RÉSUMÉ DES ARTICLES SÉLECTIONNÉS AVEC UNE ADMINISTRATION PAR VOIE NASALE .....	68
<b>TABLEAU VIII.</b> RÉSUMÉ DES ARTICLES SÉLECTIONNÉS AVEC UNE ADMINISTRATION PAR VOIES RECTALE OU OCULAIRE.....	80
<b>TABLEAU IX.</b> CARACTÉRISTIQUES PHYSICO CHIMIQUES DES NANOPARTICULES. ....	1055
<b>TABLE X.</b> SIZE AND ZETA POTENTIAL OF NPPS AND NPL.....	12020

## BIBLIOGRAPHIE

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. [cité 20 juill 2022]. Disponible sur: <https://covid19.who.int>
2. Centre Chirurgical Marie Lannelongue. Dexamethasone Combined With Hydroxychloroquine Compared to Hydroxychloroquine Alone for Treatment of Severe Acute Respiratory Distress Syndrome Induced by Coronavirus Disease 19 (COVID-19): a Multicentre, Randomised Controlled Trial [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2021 août [cité 18 juill 2022]. Report No.: NCT04347980.
3. Assistance Publique - Hôpitaux de Paris. Efficacy of Addition of Naproxen in the Treatment of Critically Ill Patients Hospitalized for COVID-19 Infection [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2021 févr [cité 18 juill 2022]. Report No.: NCT04325633.
4. Hoffmann-La Roche. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Tocilizumab in Patients With Severe COVID-19 Pneumonia [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2021 juin [cité 18 juill 2022]. Report No.: NCT04320615.
5. Novartis Pharmaceuticals. Phase 3 Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Multi-center Study to Assess the Efficacy and Safety of Ruxolitinib in Patients With COVID-19 Associated Cytokine Storm (RUXCOVID) [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2021 oct [cité 18 juill 2022]. Report No.: NCT04362137.
6. Gilead Sciences. A Phase 3 Randomized Study to Evaluate the Safety and Antiviral Activity of Remdesivir (GS-5734™) in Participants With Severe COVID-19 [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2020 déc [cité 18 juill 2022]. Report No.: NCT04292899.
7. Moulin AM, Moulin AM. L'aventure de la vaccination. Paris: Fayard; 1996. 498 p. (Penser la médecine).
8. Bazin H. Ce bon docteur Jenner: grâce à la première vaccination (14 mai 1796), il délivra le monde du fléau de la variole (9 décembre 1979): la première (et la seule) éradication d'une maladie infectieuse humaine. Paris: J. Lyon; 1997. 182 p.
9. Organisation Mondiale de la Santé. L'éradication mondiale de la variole [Internet]. 1980.
10. Nos missions - Les vaccins - ANSM [Internet]. [cité 20 juill 2022]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/qui-sommes-nous/notre-perimetre/les-vaccins/p/les-vaccins-2>
11. Généralités sur la vaccination [Internet]. [cité 28 août 2022]. Disponible sur: <https://www.pfizerpro.fr/parlons-vaccins/generalites/generalites-sur-la-vaccination>
12. Alleman MM, Chitale R, Burns CC, Iber J, Dybdahl-Sissoko N, Chen Q, et al. Vaccine-Derived Poliovirus Outbreaks and Events - Three Provinces, Democratic Republic of the Congo, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 16 mars 2018;67(10):300-5.

13. Gertosio C, Licari A, De Silvestri A, Rebuffi C, Chiappini E, Marseglia GL. Efficacy, immunogenicity, and safety of available vaccines in children on biologics: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 26 avr 2022;40(19):2679-95.
14. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, éditeurs. *Plotkin's vaccines*. Seventh edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018. 1691 p.
15. Eldred BE, Dean AJ, McGuire TM, Nash AL. Vaccine components and constituents: responding to consumer concerns. *Med J Aust*. 20 févr 2006;184(4):170-5.
16. Le calendrier des vaccinations - Ministère de la Santé et de la Prévention [Internet]. [cité 21 juill 2022]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/prevention-en-sante/preserver-sa-sante/vaccination/calendrier-vaccinal>
17. Lee WY, Sehon AH. Suppression of reaginic antibodies with modified allergens. I. Reduction in allergenicity of protein allergens by conjugation to polyethylene glycol. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1978;56(2):159-70.
18. Liu FT, Katz DH. Immunological tolerance to allergenic protein determinants: a therapeutic approach for selective inhibition of IgE antibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. mars 1979;76(3):1430-4.
19. Takatsu K, Ishizaka K. Reaginic antibody formation in the mouse. VI. Suppression of IgE and IgG antibody responses to ovalbumin following the administration of high dose urea-denatured antigen. *Cell Immunol*. déc 1975;20(2):276-89.
20. Peigue-Lafeuille H. Nouveaux vaccins. Vaccins recombinants. *Médecine Mal Infect*. sept 1987;17(9):528-34.
21. Subbiah J, Oh J, Kim KH, Shin CH, Park BR, Bhatnagar N, et al. A chimeric thermostable M2e and H3 stalk-based universal influenza A virus vaccine. *NPJ Vaccines*. 29 juin 2022;7(1):68.
22. Guo T, Xiao J, Li L, Xu W, Yuan Y, Yin Y, et al. rM2e-ΔPly protein immunization induces protection against influenza viruses and its co-infection with *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Mol Immunol*. déc 2022;152:86-96.
23. Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol*. sept 2003;11(9):438-44.
24. Fuenmayor J, Gòdia F, Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnol*. 25 oct 2017;39(Pt B):174-80.
25. Jackson LA, Gurtman A, Rice K, Pauksens K, Greenberg RN, Jones TR, et al. Immunogenicity and safety of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in adults 70 years of age and older previously vaccinated with 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. *Vaccine*. 2 août 2013;31(35):3585-93.
26. Avci FY, Li X, Tsuji M, Kasper DL. A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design. *Nat Med*. 20 nov 2011;17(12):1602-9.
27. Bégué P. Vaccination Hesitation and Vaccination Challenges in 2017. *Integr J Med Sci*. 3 mai 2017;4:80-5.

28. Aytekin ES, Şekerel BE, Şahiner ÜM. Allergic reactions during childhood vaccination and management. *Turk J Pediatr.* 2021;63(6):941.
29. Baay M, Bollaerts K, Verstraeten T. A systematic review and meta-analysis on the safety of newly adjuvanted vaccines among older adults. *Vaccine.* juill 2018;36(29):4207-14.
30. Ward JK, Guille-Escuret P, Alapetite C. Les « antivaccins », figure de l'anti-Science. *Déviance Société.* 2019;43(2):221-51.
31. Seneff S, Nigh G, Kyriakopoulos AM, McCullough PA. Innate immune suppression by SARS-CoV-2 mRNA vaccinations: The role of G-quadruplexes, exosomes, and MicroRNAs. *Food Chem Toxicol.* 1 juin 2022;164:113008.
32. Tapia MD, Sow SO, Ndiaye BP, Mbaye KD, Thiongane A, Ndour CT, et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a chimpanzee adenovirus vectored Ebola vaccine in adults in Africa: a randomised, observer-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis.* juin 2020;20(6):707-18.
33. Falsey AR, Sobieszczyk ME, Hirsch I, Sproule S, Robb ML, Corey L, et al. Phase 3 Safety and Efficacy of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 16 déc 2021;385(25):2348-60.
34. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med.* 4 févr 2021;384(5):403-16.
35. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 31 déc 2020;383(27):2603-15.
36. Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, et al. Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine. *Genes Dis.* juin 2017;4(2):43-63.
37. Lemarchand P, Jaffe HA, Danel C, Cid MC, Kleinman HK, Stratford-Perricaudet LD, et al. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant human alpha 1-antitrypsin cDNA to human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 juill 1992;89(14):6482-6.
38. Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, et al. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell.* 10 janv 1992;68(1):143-55.
39. Zaiss AK, Machado HB, Herschman HR. The influence of innate and pre-existing immunity on adenovirus therapy. *J Cell Biochem.* 1 nov 2009;108(4):778-90.
40. Coughlan L. Factors Which Contribute to the Immunogenicity of Non-replicating Adenoviral Vectored Vaccines. *Front Immunol.* 2020;11:909.
41. Kitonsa J, Ggayi AB, Anywaine Z, Kisaakye E, Nsangi L, Basajja V, et al. Implementation of accelerated research: strategies for implementation as applied in a phase 1 Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo two-dose Ebola vaccine clinical trial in Uganda. *Glob Health Action.* 31 déc 2020;13(1):1829829.

42. Vaccins contre le Covid-19 : cibles vaccinales, immunogénicité et réactions allergiques [Internet]. *Revue Medicale Suisse*. [cité 28 août 2022]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2021/revue-medicale-suisse-733/vaccins-contre-le-covid-19-cibles-vaccinales-immunogenicite-et-reactions-allergiques>
43. Ho W, Gao M, Li F, Li Z, Zhang X, Xu X. Next-Generation Vaccines: Nanoparticle-Mediated DNA and mRNA Delivery. *Adv Healthc Mater*. avr 2021;10(8):2001812.
44. Xue HY, Guo P, Wen WC, Wong HL. Lipid-Based Nanocarriers for RNA Delivery. *Curr Pharm Des*. 2015;21(22):3140-7.
45. John S, Yuzhakov O, Woods A, Deterling J, Hassett K, Shaw CA, et al. Multi-antigenic human cytomegalovirus mRNA vaccines that elicit potent humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine*. 14 mars 2018;36(12):1689-99.
46. Pollard C, Rejman J, De Haes W, Verrier B, Van Gulck E, Naessens T, et al. Type I IFN counteracts the induction of antigen-specific immune responses by lipid-based delivery of mRNA vaccines. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. janv 2013;21(1):251-9.
47. Zahednezhad F, Saadat M, Valizadeh H, Zakeri-Milani P, Baradaran B. Liposome and immune system interplay: Challenges and potentials. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 10 juill 2019;305:194-209.
48. Hassett KJ, Benenato KE, Jacquinet E, Lee A, Woods A, Yuzhakov O, et al. Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Mol Ther Nucleic Acids*. 15 avr 2019;15:1-11.
49. Liang F, Lindgren G, Lin A, Thompson EA, Ols S, Röhss J, et al. Efficient Targeting and Activation of Antigen-Presenting Cells In Vivo after Modified mRNA Vaccine Administration in Rhesus Macaques. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 6 déc 2017;25(12):2635-47.
50. Aouizerate J, De Antonio M, Bassez G, Gherardi RK, Berenbaum F, Guillevin L, et al. Myofiber HLA-DR expression is a distinctive biomarker for antisynthetase-associated myopathy. *Acta Neuropathol Commun*. 23 oct 2014;2:154.
51. Chen J, Yang J, Liu R, Qiao C, Lu Z, Shi Y, et al. Dual-targeting Theranostic System with Mimicking Apoptosis to Promote Myocardial Infarction Repair via Modulation of Macrophages. *Theranostics*. 2017;7(17):4149-67.
52. Geall AJ, Verma A, Otten GR, Shaw CA, Hekele A, Banerjee K, et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 sept 2012;109(36):14604-9.
53. Sahin U, Oehm P, Derhovanessian E, Jabulowsky RA, Vormehr M, Gold M, et al. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature*. sept 2020;585(7823):107-12.
54. Zhong Z, Mc Cafferty S, Combes F, Huysmans H, De Temmerman J, Gitsels A, et al. mRNA therapeutics deliver a hopeful message. *Nano Today* [Internet]. 1 déc 2018
55. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. *Vaccine*. oct 1995;13(14):1263-76.

56. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol.* 2013;4:114.
57. Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, HogenEsch H, Robinson JP, Hem SL. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine.* 18 févr 2005;23(13):1588-95.
58. HogenEsch H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine.* 31 mai 2002;20 Suppl 3:S34-39.
59. Aguilar JC, Rodríguez EG. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine.* 10 mai 2007;25(19):3752-62.
60. Bernstein DI, Edwards KM, Dekker CL, Belshe R, Talbot HKB, Graham IL, et al. Effects of Adjuvants on the Safety and Immunogenicity of an Avian Influenza H5N1 Vaccine in Adults. *J Infect Dis.* mars 2008;197(5):667-75.
61. Reisinger KS, Holmes SJ, Pedotti P, Arora AK, Lattanzi M. A dose-ranging study of MF59<sup>®</sup> -adjuvanted and non-adjuvanted A/H1N1 pandemic influenza vaccine in young to middle-aged and older adult populations to assess safety, immunogenicity, and antibody persistence one year after vaccination. *Hum Vaccines Immunother.* août 2014;10(8):2395-407.
62. Vesikari T, Kirstein J, Devota Go G, Leav B, Ruzycky ME, Isakov L, et al. Efficacy, immunogenicity, and safety evaluation of an MF59-adjuvanted quadrivalent influenza virus vaccine compared with non-adjuvanted influenza vaccine in children: a multicentre, randomised controlled, observer-blinded, phase 3 trial. *Lancet Respir Med.* mai 2018;6(5):345-56.
63. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. *J Immunol.* 15 nov 2009;183(10):6186-97.
64. Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM, et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 janv 1998;160(2):870-6.
65. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:709-60.
66. Kobayashi H, Horner AA, Takabayashi K, Nguyen MD, Huang E, Cinman N, et al. Immunostimulatory DNA pre-priming: a novel approach for prolonged Th1-biased immunity. *Cell Immunol.* 25 nov 1999;198(1):69-75.
67. Cowdery JS, Chace JH, Yi AK, Krieg AM. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 juin 1996;156(12):4570-5.
68. Klinman DM, Conover J, Coban C. Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect Immun.* nov 1999;67(11):5658-63.

69. Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Krieg AM, Li Y, et al. Safety and immunogenicity of CPG 7909 injection as an adjuvant to Fluarix influenza vaccine. *Vaccine*. 13 août 2004;22(23-24):3136-43.
70. Taslem Mourosi J, Awe A, Jain S, Batra H. Nucleic Acid Vaccine Platform for DENGUE and ZIKA Flaviviruses. *Vaccines*. 24 mai 2022;10(6):834.
71. Lacerda L, Bianco A, Prato M, Kostarelos K. Carbon nanotubes as nanomedicines: from toxicology to pharmacology. *Adv Drug Deliv Rev*. 1 déc 2006;58(14):1460-70.
72. Dick K, Dhanasekaran T, Zhang Z, Meisel D. Size-dependent melting of silica-encapsulated gold nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 13 mars 2002;124(10):2312-7.
73. Petit T. Nano-diamonds surface modifications: understanding of electron exchange mechanisms and evidence of a therapeutic effect; Modifications de surface des nanodiamants: compréhension des mécanismes d'échanges électroniques et mise en évidence d'un effet thérapeutique. 18 mars 2013
74. de Jong. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int J Nanomedicine*. juin 2008;133.
75. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Mol Basel Switz*. 27 déc 2019;25(1):E112.
76. Rancan F, Gao Q, Graf C, Troppens S, Hadam S, Hackbarth S, et al. Skin penetration and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability. *ACS Nano*. 28 août 2012;6(8):6829-42.
77. Robson AL, Dastoor PC, Flynn J, Palmer W, Martin A, Smith DW, et al. Advantages and Limitations of Current Imaging Techniques for Characterizing Liposome Morphology. *Front Pharmacol [Internet]*. 2018
78. Papini E, Tavano R, Mancin F. Opsonins and Dysopsonins of Nanoparticles: Facts, Concepts, and Methodological Guidelines. *Front Immunol*. 12 oct 2020;11:567365.
79. Ryan SM, Mantovani G, Wang X, Haddleton DM, Brayden DJ. Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects. *Expert Opin Drug Deliv*. avr 2008;5(4):371-83.
80. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*. 3 janv 2006;307(1):93-102.
81. Sebak AA, El-Shenawy BM, El-Safy S, El-Shazly M. From Passive Targeting to Personalized Nanomedicine: Multidimensional Insights on Nanoparticles' Interaction with the Tumor Microenvironment. *Curr Pharm Biotechnol*. 2021;22(11):1444-65.
82. Izi M, Maksoudian C, Manshian BB, Soenen SJ. The Use of Alternative Strategies for Enhanced Nanoparticle Delivery to Solid Tumors. *Chem Rev*. 10 févr 2021;121(3):1746-803.
83. Alasvand N, Urbanska AM, Rahmati M, Saeidifar M, Gungor-Ozkerim PS, Sefat F, et al. Therapeutic Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Drugs. In:

- Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics [Internet]. Elsevier; 2017 p. 245-59.
84. Yameen B, Choi WI, Vilos C, Swami A, Shi J, Farokhzad OC. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J Controlled Release*. sept 2014;190:485-99.
  85. McAleer JP, Vella AT. Educating CD4 T cells with vaccine adjuvants: lessons from lipopolysaccharide. *Trends Immunol*. nov 2010;31(11):429-35.
  86. Hajam IA, Dar PA, Shahnawaz I, Jaume JC, Lee JH. Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med*. 1 sept 2017;49(9):e373.
  87. Younis NK, Roumieh R, Bassil EP, Ghoubaira JA, Kobeissy F, Eid AH. Nanoparticles: Attractive tools to treat colorectal cancer. *Semin Cancer Biol*. nov 2022;86(Pt 2):1-13.
  88. Varani M, Bentivoglio V, Lauri C, Ranieri D, Signore A. Methods for Radiolabelling Nanoparticles: SPECT Use (Part 1). *Biomolecules*. 20 oct 2022;12(10):1522.
  89. Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol*. juill 2000;10(7):290-5.
  90. Torchilin VP, Levchenko TS, Rammohan R, Volodina N, Papahadjopoulos-Sternberg B, D'Souza GGM. Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 févr 2003;100(4):1972-7.
  91. Marty C, Meylan C, Schott H, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. Enhanced heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of cell-penetrating peptide-modified liposomes. *Cell Mol Life Sci CMLS*. juill 2004;61(14):1785-94.
  92. BRINKHUIZEN C. Des nanoparticules dans nos médicaments : Revue systématique et Exemple des Anthracyclines. [Faculté de Pharmacie]: Université de Lille; 2022.
  93. Kumar M, Kulkarni P, Liu S, Chemuturi N, Shah DK. Nanoparticle biodistribution coefficients: A quantitative approach for understanding the tissue distribution of nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*. mars 2023;194:114708.
  94. Maruggi G, Mallett CP, Westerbeck JW, Chen T, Lofano G, Friedrich K, et al. A self-amplifying mRNA SARS-CoV-2 vaccine candidate induces safe and robust protective immunity in preclinical models. *Mol Ther*. 4 mai 2022;30(5):1897-912.
  95. Carrasco MJ, Alishetty S, Alameh MG, Said H, Wright L, Paige M, et al. Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration. *Commun Biol*. 11 août 2021;4:956.
  96. Bangham AD. Liposomes: the Babraham connection. *Chem Phys Lipids*. sept 1993;64(1-3):275-85.
  97. Uchegbu IF, Schätzlein AG, Cheng WP, Lalatsa A, éditeurs. *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*. New York, NY: Springer New York; 2013

98. Gregoriadis G. LIPOSOMES IN THERAPEUTIC AND PREVENTIVE MEDICINE: THE DEVELOPMENT OF THE DRUG-CARRIER CONCEPT. *Ann N Y Acad Sci.* juin 1978;308(1 Liposomes and):343-70.
99. Szoka F, Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu Rev Biophys Bioeng.* 1980;9:467-508.
100. Kirby C, Clarke J, Gregoriadis G. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochem J.* 15 févr 1980;186(2):591-8.
101. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* déc 1953;84(3):570-3.
102. Mangel WF, San Martín C. Structure, function and dynamics in adenovirus maturation. *Viruses.* 21 nov 2014;6(11):4536-70.
103. Adenovirus Entry: From Infection to Immunity.
104. Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L, Nemerow GR. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol.* févr 2005;79(4):1992-2000.
105. Russell W. Russell, WC. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* 90: 1-20. *J Gen Virol.* 1 févr 2009;90:1-20.
106. Windheim M, Hilgendorf A, Burgert HG. Immune evasion by adenovirus E3 proteins: exploitation of intracellular trafficking pathways. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004;273:29-85.
107. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci.* 10 mai 1994;91(10):4407-11.
108. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther.* déc 2021;6(1):53.
109. Irvine DJ, Aung A, Silva M. Controlling timing and location in vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;158:91-115.
110. Purcell AW, McCluskey J, Rossjohn J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov.* mai 2007;6(5):404-14.
111. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers.* 1 sept 2011;3(3):1377-97.
112. Leelakanok N, Geary S, Salem A. Fabrication and Use of PLGA-based Formulations Designed for Modified Release of 5-Fluorouracil. *J Pharm Sci.* févr 2018;107(2):513-28.

113. Minigo G, Scholzen A, Tang CK, Hanley JC, Kalkanidis M, Pietersz GA, et al. Poly-l-lysine-coated nanoparticles: A potent delivery system to enhance DNA vaccine efficacy. *Vaccine*. 26 janv 2007;25(7):1316-27.
114. Wilson KL, Xiang SD, Plebanski M. A Model to Study the Impact of Polymorphism Driven Liver-Stage Immune Evasion by Malaria Parasites, to Help Design Effective Cross-Reactive Vaccines. *Front Microbiol*. 2016
115. Suwan J, Zhang Z, Li B, Vongchan P, Meepowpan P, Zhang F, et al. Sulfonation of papain treated chitosan and its mechanism for anticoagulant activity. *Carbohydr Res*. 6 juill 2009;344(10):1190-6.
116. Sogias IA, Khutoryanskiy VV, Williams AC. Exploring the Factors Affecting the Solubility of Chitosan in Water. *Macromol Chem Phys*. 2010;211(4):426-33.
117. Potaś J, Szymańska E, Winnicka K. Challenges in developing of chitosan – Based polyelectrolyte complexes as a platform for mucosal and skin drug delivery. *Eur Polym J*. 5 nov 2020;140:110020.
118. Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 1 août 2012;81(3):463-9.
119. Owen J, Punt J, Stranford SA, Kuby J. *Kuby immunology*. 7. ed., international ed. Basingstoke: Macmillan Higher Education; 2013.
120. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*. févr 2001;13(1):114-9.
121. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*. avr 2009;22(2):240-73, Table of Contents.
122. Broz P, Monack DM. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol*. août 2013;13(8):551-65.
123. Su SB, Tao L, Deng ZP, Chen W, Qin SY, Jiang HX. TLR10: Insights, controversies and potential utility as a therapeutic target. *Scand J Immunol*. 2021;93(4):e12988.
124. van der Meer JW, Barza M, Wolff SM, Dinarello CA. A low dose of recombinant interleukin 1 protects granulocytopenic mice from lethal gram-negative infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. mars 1988;85(5):1620-3.
125. Bistoni F, Vecchiarelli A, Cenci E, Puccetti P, Marconi P, Cassone A. Evidence for macrophage-mediated protection against lethal *Candida albicans* infection. *Infect Immun*. févr 1986;51(2):668-74.
126. Quintin J, Saeed S, Martens JHA, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ifrim DC, Logie C, et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe*. 16 août 2012;12(2):223-32.
127. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 29 janv 2009;457(7229):557-61.

128. Askenase MH, Han SJ, Byrd AL, Morais da Fonseca D, Bouladoux N, Wilhelm C, et al. Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity*. 16 juin 2015;42(6):1130-42.
129. Benn CS, Netea MG, Selin LK, Aaby P. A small jab - a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends Immunol*. sept 2013;34(9):431-9.
130. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):375-88.
131. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. août 2002;10(2):417-26.
132. Terra JK, Cote CK, France B, Jenkins AL, Bozue JA, Welkos SL, et al. Cutting edge: resistance to *Bacillus anthracis* infection mediated by a lethal toxin sensitive allele of Nalp1b/Nlrp1b. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 janv 2010;184(1):17-20.
133. Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB, Yun C, Radian AD, de Almeida L, et al. An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. *Immunity*. 23 mars 2012;36(3):464-76.
134. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*. août 2008;9(8):857-65.
135. Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2 mai 2008;320(5876):674-7.
136. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. août 2008;9(8):847-56.
137. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 19 juin 2008;453(7198):1122-6.
138. Li H, Willingham SB, Ting JPY, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 juill 2008;181(1):17-21.
139. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. IL-1 and related cytokines in innate and adaptive immunity in health and disease. *Immunity*. 16 avr 2019;50(4):778-95.
140. Sahoo M, Ceballos-Olvera I, del Barrio L, Re F. Role of the Inflammasome, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in Bacterial Infections. *Sci World J*. 1 nov 2011;11:2037-50.
141. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. nov 2011;11(11):723-37.

142. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol.* juin 2017;17(6):349-62.
143. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 19 mars 1998;392(6673):245-52.
144. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol.* juill 2007;7(7):543-55.
145. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 7 sept 2000;343(10):702-9.
146. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique.* 2016.
147. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* déc 2003;3(12):984-93.
148. Magombedze G, Reddy PBJ, Eda S, Ganusov VV. Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. *Front Physiol.* 2013;4:206.
149. Asrir A. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des différentes populations de Lymphocytes T CD4 Folliculaires Mémoires. :194.
150. Davies DR, Metzger H. Structural basis of antibody function. *Annu Rev Immunol.* 1983;1:87-117.
151. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520.
152. Palm NW, Rosenstein RK, Medzhitov R. Allergic host defences. *Nature.* avr 2012;484(7395):465-72.
153. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol.* janv 2009;9(1):15-27.
154. Schwickert TA, Victora GD, Fooksman DR, Kamphorst AO, Mugnier MR, Gitlin AD, et al. A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J Exp Med.* 6 juin 2011;208(6):1243-52.
155. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal Centers. :32.
156. Schluns KS, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol.* avr 2003;3(4):269-79.
157. Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression. *Crit Rev Immunol.* 2014;34(4):301-14.
158. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol.* août 2004;5(8):809-17.
159. Jameson SC, Masopust D. Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity.* févr 2018;48(2):214-26.

160. Liu Y, Ma C, Zhang N. Tissue-Specific Control of Tissue-Resident Memory T Cells. *Crit Rev Immunol.* 2018;38(2):79-103.
161. Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Johnston RJ, Monticelli L, et al. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity.* 24 juin 2011;34(6):932-46.
162. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 19 déc 2008;29(6):848-62.
163. Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R. From vaccines to memory and back. *Immunity.* 29 oct 2010;33(4):451-63.
164. Cancro MP, Tomayko MM. Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunol Rev.* sept 2021;303(1):72-82.
165. Seifert M, Przekopowicz M, Taudien S, Lollies A, Ronge V, Drees B, et al. Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10 févr 2015;112(6):E546-555.
166. Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity.* sept 2004;21(3):379-90.
167. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, Delbos F, Mégrét J, Storck S, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol.* déc 2009;10(12):1292-9.
168. Ehrhardt GRA, Hsu JT, Gartland L, Leu CM, Zhang S, Davis RS, et al. Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. *J Exp Med.* 19 sept 2005;202(6):783-91.
169. Ehrhardt GRA, Hijikata A, Kitamura H, Ohara O, Wang JY, Cooper MD. Discriminating gene expression profiles of memory B cell subpopulations. *J Exp Med.* 4 août 2008;205(8):1807-17.
170. Küppers R. Human memory B cells: memory B cells of a special kind. *Immunol Cell Biol.* déc 2008;86(8):635-6.
171. Barnett BE, Ciocca ML, Goenka R, Barnett LG, Wu J, Laufer TM, et al. Asymmetric B cell division in the germinal center reaction. *Science.* 20 janv 2012;335(6066):342-4.
172. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:745-63.
173. Mörbe UM, Jørgensen PB, Fenton TM, von Burg N, Riis LB, Spencer J, et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunol.* juill 2021;14(4):793-802.
174. Pabst R. Mucosal vaccination by the intranasal route. Nose-associated lymphoid tissue (NALT)-Structure, function and species differences. *Vaccine.* 26 août 2015;33(36):4406-13.

175. Ptasiwicz M, Grywalska E, Mertowska P, Korona-Głowniak I, Poniewierska-Baran A, Niedźwiedzka-Rystwej P, et al. Armed to the Teeth-The Oral Mucosa Immunity System and Microbiota. *Int J Mol Sci.* 14 janv 2022;23(2):882.
176. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:403-29.
177. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest.* juill 2018;154(1):169-76.
178. Ehre C. [Mucus buildup: the starting point of cystic fibrosis lung disease pathogenesis]. *Med Sci MS.* déc 2019;35(12):1217-20.
179. Woodrow KA, Bennett KM, Lo DD. Mucosal vaccine design and delivery. *Annu Rev Biomed Eng.* 2012;14:17-46.
180. Magalhaes JG, Tattoli I, Girardin SE. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol.* avr 2007;19(2):106-15.
181. Correa VA, Portilho AI, De Gaspari E. Vaccines, adjuvants and key factors for mucosal immune response. *Immunology.* 2022;167(2):124-38.
182. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* juill 2013;6(4):666-77.
183. Wang M, Gao Z, Zhang Z, Pan L, Zhang Y. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum Vaccines Immunother.* 2014;10(12):3544-51.
184. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol.* août 2001;2(8):725-31.
185. Iwasaki A. Mucosal Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol.* 1 avr 2007;25(1):381-418.
186. Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev.* juill 2014;260(1):76-85.
187. Wright PF. Inductive/effector mechanisms for humoral immunity at mucosal sites. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. mars 2011;65(3):248-52.
188. Lazarus NH, Kunkel EJ, Johnston B, Wilson E, Youngman KR, Butcher EC. A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 avr 2003;170(7):3799-805.
189. Stagg AJ, Kamm MA, Knight SC. Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin. *Eur J Immunol.* mai 2002;32(5):1445-54.
190. Abonia JP, Hallgren J, Jones T, Shi T, Xu Y, Koni P, et al. Alpha-4 integrins and VCAM-1, but not MAdCAM-1, are essential for recruitment of mast cell progenitors to the inflamed lung. *Blood.* 1 sept 2006;108(5):1588-94.

191. Perry M, Whyte A. Immunology of the tonsils. *Immunol Today*. 1 sept 1998;19(9):414-21.
192. Kuper CF. Histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol*. 2006;34(5):609-15.
193. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *Syst Rev*. déc 2021;10(1):89.
194. Saunders KO, Lee E, Parks R, Martinez DR, Li D, Chen H, et al. Neutralizing antibody vaccine for pandemic and pre-emergent coronaviruses. *Nature*. juin 2021;594(7864):553-9.
195. Gao X, Liu N, Wang Z, Gao J, Zhang H, Li M, et al. Development and Optimization of Chitosan Nanoparticle-Based Intranasal Vaccine Carrier. *Mol Basel Switz*. 29 déc 2021;27(1):204.
196. Keikha R, Hashemi-Shahri SM, Jebali A. The evaluation of novel oral vaccines based on self-amplifying RNA lipid nanoparticles (saRNA LNPs), saRNA transfected *Lactobacillus plantarum* LNPs, and saRNA transfected *Lactobacillus plantarum* to neutralize SARS-CoV-2 variants alpha and delta. *Sci Rep*. déc 2021;11(1):21308.
197. Han Y, Renu S, Schrock J, Acevedo-Villanuev KY, Lester B, Selvaraj RK, et al. Temporal dynamics of innate and adaptive immune responses in broiler birds to oral delivered chitosan nanoparticle-based *Salmonella* subunit antigens. *Vet Immunol Immunopathol*. oct 2020;228:110111.
198. Renu S, Han Y, Dhakal S, Lakshmanappa YS, Ghimire S, Feliciano-Ruiz N, et al. Chitosan-adjuvanted *Salmonella* subunit nanoparticle vaccine for poultry delivered through drinking water and feed. *Carbohydr Polym*. sept 2020;243:116434.
199. Han Y, Renu S, Patil V, Schrock J, Feliciano-Ruiz N, Selvaraj R, et al. Immune Response to *Salmonella* Enteritidis Infection in Broilers Immunized Orally With Chitosan-Based *Salmonella* Subunit Nanoparticle Vaccine. *Front Immunol*. 19 mai 2020;11:935.
200. Akerele G, Ramadan N, Renu S, Renukaradhya GJ, Shanmugasundaram R, Selvaraj RK. In vitro characterization and immunogenicity of chitosan nanoparticles loaded with native and inactivated extracellular proteins from a field strain of *Clostridium perfringens* associated with necrotic enteritis. *Vet Immunol Immunopathol*. juin 2020;224:110059.
201. Renu S, Markazi AD, Dhakal S, Shaan Lakshmanappa Y, Shanmugasundaram R, Selvaraj RK, et al. Oral Deliverable Mucoadhesive Chitosan-*Salmonella* Subunit Nanovaccine for Layer Chickens. *Int J Nanomedicine*. févr 2020;Volume 15:761-77.
202. Akbari MR, Saadati M, Honari H, Ghorbani HM. IpaD-loaded N-trimethyl Chitosan Nanoparticles Can Efficiently Protect Guinea Pigs against *Shigella Flexneri*. *Iran J Immunol*. sept 2019;16(3).
203. Sahu KK, Kaurav M, Pandey RS. Chylomicron mimicking solid lipid nanoemulsions encapsulated enteric minicapsules targeted to colon for immunization against hepatitis B. *Int Immunopharmacol*. janv 2019;66:317-29.

204. Liu H, Liu W, Tan Z, Zeng Z, Yang H, Luo S, et al. Promoting Immune Efficacy of the Oral *Helicobacter pylori* Vaccine by HP55/PBCA Nanoparticles against the Gastrointestinal Environment. *Mol Pharm.* 6 août 2018;15(8):3177-86.
205. Sahu KK, Pandey RS. Development and characterization of HBsAg-loaded Eudragit nanoparticles for effective colonic immunization. *Pharm Dev Technol.* 7 févr 2019;24(2):166-75.
206. Du L, Yu Z, Pang F, Xu X, Mao A, Yuan W, et al. Targeted Delivery of GP5 Antigen of PRRSV to M Cells Enhances the Antigen-Specific Systemic and Mucosal Immune Responses. *Front Cell Infect Microbiol.* 25 janv 2018;8:7.
207. Abkar M, Fasihi-Ramandi M, Kooshki H, Sahebghadam Lotfi A. Oral immunization of mice with Omp31-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles induces high protection against *Brucella melitensis* infection. *Int J Nanomedicine.* déc 2017;Volume 12:8769-78.
208. Lee DY, Nurunnabi M, Kang SH, Nafiujjaman M, Huh KM, Lee Y kyu, et al. Oral Gavage Delivery of PR8 Antigen with  $\beta$ -Glucan-Conjugated GRGDS Carrier to Enhance M-Cell Targeting Ability and Induce Immunity. *Biomacromolecules.* 10 avr 2017;18(4):1172-9.
209. Tan Z, Liu W, Liu H, Li C, Zhang Y, Meng X, et al. Oral *Helicobacter pylori* vaccine-encapsulated acid-resistant HP55/PLGA nanoparticles promote immune protection. *Eur J Pharm Biopharm.* févr 2017;111:33-43.
210. Dinda AK, Bhat M, Srivastava S, Kottarath SK, Prashant CK. Novel nanocarrier for oral Hepatitis B vaccine. *Vaccine.* juin 2016;34(27):3076-81.
211. Marasini N, Giddam AK, Ghaffar KA, Batzloff MR, Good MF, Skwarczynski M, et al. Multilayer engineered nanoliposomes as a novel tool for oral delivery of lipopeptide-based vaccines against group A *Streptococcus*. *Nanomed.* mai 2016;11(10):1223-36.
212. Biswas S, Chattopadhyay M, Sen KK, Saha MK. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. *Carbohydr Polym.* mai 2015;121:403-10.
213. Wang T, Zhen Y, Ma X, Wei B, Li S, Wang N. Mannosylated and lipid A-incorporating cationic liposomes constituting microneedle arrays as an effective oral mucosal HBV vaccine applicable in the controlled temperature chain. *Colloids Surf B Biointerfaces.* févr 2015;126:520-30.
214. Shrestha B, Rath JP. Poly(vinyl alcohol)-coated chitosan microparticles act as an effective oral vaccine delivery system for hepatitis B vaccine in rat model. *IET Nanobiotechnol.* déc 2014;8(4):201-7.
215. Barhate G, Gautam M, Gairola S, Jadhav S, Pokharkar V. Enhanced Mucosal Immune Responses Against Tetanus Toxoid Using Novel Delivery System Comprised of Chitosan-Functionalized Gold Nanoparticles and Botanical Adjuvant: Characterization, Immunogenicity, and Stability Assessment. *J Pharm Sci.* nov 2014;103(11):3448-56.

216. Harde H, Agrawal AK, Jain S. Tetanus Toxoids Loaded Glucomannosylated Chitosan Based Nanohoming Vaccine Adjuvant with Improved Oral Stability and Immunostimulatory Response. *Pharm Res.* janv 2015;32(1):122-34.
217. Kaur M, Malik B, Garg T, Rath G, Goyal AK. Development and characterization of guar gum nanoparticles for oral immunization against tuberculosis. *Drug Deliv.* 3 avr 2015;22(3):328-34.
218. Mishra N, Khatri K, Gupta M, Vyas SP. Development and characterization of LTA-appended chitosan nanoparticles for mucosal immunization against hepatitis B. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* août 2014;42(4):245-55.
219. Oliveira CR, Rezende CMF, Silva MR, Pêgo AP, Borges O, Goes AM. A New Strategy Based on Smrho Protein Loaded Chitosan Nanoparticles as a Candidate Oral Vaccine against Schistosomiasis. *Dalton JP, éditeur. PLoS Negl Trop Dis.* 29 nov 2012;6(11):e1894.
220. Barhate G, Gautam M, Gairola S, Jadhav S, Pokharkar V. Quillaja saponaria extract as mucosal adjuvant with chitosan functionalized gold nanoparticles for mucosal vaccine delivery: Stability and immunoefficiency studies. *Int J Pharm.* janv 2013;441(1-2):636-42.
221. Oliveira CR, Rezende CMF, Silva MR, Borges OM, Pêgo AP, Goes AM. Oral Vaccination Based on DNA-Chitosan Nanoparticles against *Schistosoma mansoni* Infection. *Sci World J.* 2012;2012:1-11.
222. Dong C, Wang Y, Zhu W, Ma Y, Kim J, Wei L, et al. Polycationic HA/CpG Nanoparticles Induce Cross-Protective Influenza Immunity in Mice. *ACS Appl Mater Interfaces.* 9 févr 2022;14(5):6331-42.
223. Najafi A, Ghazvini K, Sankian M, Gholami L, Amini Y, Zare S, et al. T helper type 1 biased immune responses by PPE17 loaded core-shell alginate-chitosan nanoparticles after subcutaneous and intranasal administration. *Life Sci.* oct 2021;282:119806.
224. Nelson SA, Dileepan T, Rasley A, Jenkins MK, Fischer NO, Sant AJ. Intranasal Nanoparticle Vaccination Elicits a Persistent, Polyfunctional CD4 T Cell Response in the Murine Lung Specific for a Highly Conserved Influenza Virus Antigen That Is Sufficient To Mediate Protection from Influenza Virus Challenge. *Schultz-Cherry S, éditeur. J Virol.* 26 juill 2021;95(16):e00841-21.
225. Zuo Z, Zou Y, Li Q, Guo Y, Zhang T, Wu J, et al. Intranasal immunization with inactivated chlamydial elementary bodies formulated in VCG-chitosan nanoparticles induces robust immunity against intranasal *Chlamydia psittaci* challenge. *Sci Rep.* déc 2021;11(1):10389.
226. Dumkliang E, Pamornpathomkul B, Patrojanasophon P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Yoksan S, et al. Feasibility of chitosan-based nanoparticles approach for intranasal immunisation of live attenuated Japanese encephalitis vaccine. *Int J Biol Macromol.* juill 2021;183:1096-105.

227. Dong C, Wang Y, Gonzalez GX, Ma Y, Song Y, Wang S, et al. Intranasal vaccination with influenza HA/GO-PEI nanoparticles provides immune protection against homo- and heterologous strains. *Proc Natl Acad Sci.* 11 mai 2021;118(19):e2024998118.
228. Yuki Y, Uchida Y, Sawada S ichi, Nakahashi-Ouchida R, Sugiura K, Mori H, et al. Characterization and Specification of a Trivalent Protein-Based Pneumococcal Vaccine Formulation Using an Adjuvant-Free Nanogel Nasal Delivery System. *Mol Pharm.* 5 avr 2021;18(4):1582-92.
229. Ni J, Liu Y, Hussain T, Li M, Liang Z, Liu T, et al. Recombinant ArgF PLGA nanoparticles enhances BCG induced immune responses against *Mycobacterium bovis* infection. *Biomed Pharmacother.* mai 2021;137:111341.
230. Li Z, Li Y, Wang Y, Hou Y, Cao H, Wu X, et al. Intranasal immunization with a rNMB0315 and combination adjuvants induces protective immunity against *Neisseria meningitidis* serogroup B in mice. *Int Immunopharmacol.* avr 2021;93:107411.
231. Zhao L, Yang J, Nahar UJ, Khalil ZG, Capon RJ, Hussein WM, et al. A dual-adjuvanting strategy for peptide-based subunit vaccines against group A *Streptococcus*: Lipidation and polyelectrolyte complexes. *Bioorg Med Chem.* déc 2020;28(24):115823.
232. Weilhammer DR, Dunkle AD, Boone T, Gilmore SF, Khemmani M, Peters SKG, et al. Characterization of *Bacillus anthracis* Spore Proteins Using a Nanoscaffold Vaccine Platform. *Front Immunol.* 23 juin 2020;11:1264.
233. Hosseini SA, Nazarian S, Ebrahimi F, Hajizade A. Immunogenicity Evaluation of Recombinant *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (rSEB) and rSEB-loaded Chitosan Nanoparticles Following Nasal Administration. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 29 avr 2020
234. Hajam IA, Senevirathne A, Hewawaduge C, Kim J, Lee JH. Intranasally administered protein coated chitosan nanoparticles encapsulating influenza H9N2 HA2 and M2e mRNA molecules elicit protective immunity against avian influenza viruses in chickens. *Vet Res.* déc 2020;51(1):37.
235. Renu S, Feliciano-Ruiz N, Ghimire S, Han Y, Schrock J, Dhakal S, et al. Poly(I:C) augments inactivated influenza virus-chitosan nanovaccine induced cell mediated immune response in pigs vaccinated intranasally. *Vet Microbiol.* mars 2020;242:108611.
236. Li Y, Wang C, Sun Z, Xiao J, Yan X, Chen Y, et al. Simultaneous Intramuscular And Intranasal Administration Of Chitosan Nanoparticles-Adjuvanted Chlamydia Vaccine Elicits Elevated Protective Responses In The Lung. *Int J Nanomedicine.* oct 2019;Volume 14:8179-93.
237. Najminejad H, Kalantar SM, Mokarram AR, Dabaghian M, Abdollahpour-Alitappeh M, Ebrahimi SM, et al. *Bordetella pertussis* antigens encapsulated into N-trimethyl chitosan nanoparticulate systems as a novel intranasal pertussis vaccine. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 4 déc 2019;47(1):2605-11.

238. Soh SH, Shim S, Im YB, Park HT, Cho CS, Yoo HS. Induction of Th2-related immune responses and production of systemic IgA in mice intranasally immunized with *Brucella abortus* malate dehydrogenase loaded chitosan nanoparticles. *Vaccine*. mars 2019;37(12):1554-64.
239. Alkie TN, Yitbarek A, Taha-Abdelaziz K, Astill J, Sharif S. Characterization of immunogenicity of avian influenza antigens encapsulated in PLGA nanoparticles following mucosal and subcutaneous delivery in chickens. Ho PL, éditeur. *PLOS ONE*. 1 nov 2018;13(11):e0206324.
240. Khademi F, Derakhshan M, Yousefi-Avarvand A, Najafi A, Tafaghodi M. A novel antigen of *Mycobacterium tuberculosis* and MPLA adjuvant co-entrapped into PLGA:DDA hybrid nanoparticles stimulates mucosal and systemic immunity. *Microb Pathog*. déc 2018;125:507-13.
241. Nevagi RJ, Khalil ZG, Hussein WM, Powell J, Batzloff MR, Capon RJ, et al. Polyglutamic acid-trimethyl chitosan-based intranasal peptide nano-vaccine induces potent immune responses against group A streptococcus. *Acta Biomater*. oct 2018;80:278-87.
242. Tada R, Suzuki H, Takahashi S, Negishi Y, Kiyono H, Kunisawa J, et al. Nasal vaccination with pneumococcal surface protein A in combination with cationic liposomes consisting of DOTAP and DC-chol confers antigen-mediated protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infections in mice. *Int Immunopharmacol*. août 2018;61:385-93.
243. Dhakal S, Renu S, Ghimire S, Shaan Lakshmanappa Y, Hogshead BT, Feliciano-Ruiz N, et al. Mucosal Immunity and Protective Efficacy of Intranasal Inactivated Influenza Vaccine Is Improved by Chitosan Nanoparticle Delivery in Pigs. *Front Immunol*. 2 mai 2018;9:934.
244. Dabaghian M, Latifi AM, Tebianian M, NajmiNejad H, Ebrahimi SM. Nasal vaccination with r4M2e.HSP70c antigen encapsulated into N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticulate systems: Preparation and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine*. mai 2018;36(20):2886-95.
245. Wu M, Zhao H, Li M, Yue Y, Xiong S, Xu W. Intranasal Vaccination with Mannosylated Chitosan Formulated DNA Vaccine Enables Robust IgA and Cellular Response Induction in the Lungs of Mice and Improves Protection against Pulmonary Mycobacterial Challenge. *Front Cell Infect Microbiol*. 16 oct 2017;7:445.
246. Zhao K, Li S, Li W, Yu L, Duan X, Han J, et al. Quaternized chitosan nanoparticles loaded with the combined attenuated live vaccine against Newcastle disease and infectious bronchitis elicit immune response in chicken after intranasal administration. *Drug Deliv*. 1 janv 2017;24(1):1574-86.
247. Chowdhury MYE, Kim TH, Uddin MB, Kim JH, Hewawaduge CY, Ferdowshi Z, et al. Mucosal vaccination of conserved sM2, HA2 and cholera toxin subunit A1 (CTA1) fusion protein with poly gamma-glutamate/chitosan nanoparticles (PC NPs) induces protection against divergent influenza subtypes. *Vet Microbiol*. mars 2017;201:240-51.

248. Dhakal S, Goodman J, Bondra K, Lakshmanappa YS, Hiremath J, Shyu DL, et al. Polyanhydride nanovaccine against swine influenza virus in pigs. *Vaccine*. févr 2017;35(8):1124-31.
249. Dhakal S, Hiremath J, Bondra K, Lakshmanappa YS, Shyu DL, Ouyang K, et al. Biodegradable nanoparticle delivery of inactivated swine influenza virus vaccine provides heterologous cell-mediated immune response in pigs. *J Controlled Release*. févr 2017;247:194-205.
250. Pirouzmand H, Khameneh B, Tafaghodi M. Immunoadjuvant potential of cross-linked dextran microspheres mixed with chitosan nanospheres encapsulated with tetanus toxoid. *Pharm Biol*. 1 janv 2017;55(1):212-7.
251. Genta I, Colonna C, Conti B, Caliceti P, Salmaso S, Speziale P, et al. CNA-loaded PLGA nanoparticles improve humoral response against *S. aureus* -mediated infections in a mouse model: subcutaneous vs. nasal administration strategy. *J Microencapsul*. 16 nov 2016;33(8):750-62.
252. Marasini N, Giddam AK, Khalil ZG, Hussein WM, Capon RJ, Batzloff MR, et al. Double adjuvanting strategy for peptide-based vaccines: trimethyl chitosan nanoparticles for lipopeptide delivery. *Nanomed*. déc 2016;11(24):3223-35.
253. Marasini N, Khalil ZG, Giddam AK, Ghaffar KA, Hussein WM, Capon RJ, et al. Lipid core peptide/poly(lactic-co-glycolic acid) as a highly potent intranasal vaccine delivery system against Group A streptococcus. *Int J Pharm*. nov 2016;513(1-2):410-20.
254. Li Z, Xiong F, He J, Dai X, Wang G. Surface-functionalized, pH-responsive poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles for intranasal vaccine delivery: Effect of surface modification with chitosan and mannan. *Eur J Pharm Biopharm*. déc 2016;109:24-34.
255. Amirnasr M, Fallah tafti T, Sankian M, Rezaei A, Tafaghodi M. Immunization against HTLV-I with chitosan and tri-methylchitosan nanoparticles loaded with recombinant env23 and env13 antigens of envelope protein gp46. *Microb Pathog*. août 2016;97:38-44.
256. Li H, Lu Y, Xiang J, Jiang H, Zhong Y, Lu Y. Enhancement of immunogenic response and protection in model rats by CSTM nanoparticles anticaries DNA vaccine. *Nanomed*. juin 2016;11(11):1407-16.
257. Ghaffar KA, Marasini N, Giddam AK, Batzloff MR, Good MF, Skwarczynski M, et al. Liposome-based intranasal delivery of lipopeptide vaccine candidates against group A streptococcus. *Acta Biomater*. sept 2016;41:161-8.
258. Jesus S, Soares E, Costa J, Borchard G, Borges O. Immune response elicited by an intranasally delivered HBsAg low-dose adsorbed to poly- $\epsilon$ -caprolactone based nanoparticles. *Int J Pharm*. mai 2016;504(1-2):59-69.
259. Lebre F, Borchard G, Faneca H, Pedroso de Lima MC, Borges O. Intranasal Administration of Novel Chitosan Nanoparticle/DNA Complexes Induces Antibody Response to Hepatitis B Surface Antigen in Mice. *Mol Pharm*. 1 févr 2016;13(2):472-82.

260. Pavot V, Climent N, Rochereau N, Garcia F, Genin C, Tiraby G, et al. Directing vaccine immune responses to mucosa by nanosized particulate carriers encapsulating NOD ligands. *Biomaterials*. janv 2016;75:327-39.
261. Nagatomo D, Taniai M, Ariyasu H, Taniguchi M, Aga M, Ariyasu T, et al. Cholesteryl Pullulan Encapsulated TNF-  $\alpha$  Nanoparticles Are an Effective Mucosal Vaccine Adjuvant against Influenza Virus. *BioMed Res Int*. 2015;2015:1-15.
262. Liu Q, Zheng X, Zhang C, Shao X, Zhang X, Zhang Q, et al. Conjugating influenza A (H1N1) antigen to n-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles improves the immunogenicity of the antigen after nasal administration: Conjugating Influenza A (H1N1) Antigen to Chitosan Nanoparticles. *J Med Virol*. nov 2015;87(11):1807-15.
263. Bento D, Staats HF, 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*. juin 2015;93:149-64.
264. Xu JH, Dai WJ, Chen B, Fan XY. Mucosal Immunization with PsaA Protein, Using Chitosan as a Delivery System, Increases Protection Against Acute Otitis Media and Invasive Infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Scand J Immunol*. mars 2015;81(3):177-85.
265. Pan L, Zhang Z, Lv J, Zhou P, Hu W, Fang Y, et al. Induction of mucosal immune responses and protection of cattle against direct-contact challenge by intranasal delivery with foot-and-mouth disease virus antigen mediated by nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. déc 2014;5603.
266. Pawar D, Mangal S, Goswami R, Jaganathan KS. Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: Effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *Eur J Pharm Biopharm*. nov 2013;85(3):550-9.
267. Sawaengsak C, Mori Y, Yamanishi K, Mitrevej A, Sinchaipanid N. Chitosan Nanoparticle Encapsulated Hemagglutinin-Split Influenza Virus Mucosal Vaccine. *AAPS PharmSciTech*. avr 2014;15(2):317-25.
268. Chen L, Zhu J, Li Y, Lu J, Gao L, Xu H, et al. Enhanced Nasal Mucosal Delivery and Immunogenicity of Anti-Caries DNA Vaccine through Incorporation of Anionic Liposomes in Chitosan/DNA Complexes. Yamamoto M, éditeur. *PLoS ONE*. 20 août 2013;8(8):e71953.
269. Dwivedi V, Manickam C, Binjawadagi B, Renukaradhya GJ. PLGA nanoparticle entrapped killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine helps in viral clearance in pigs. *Vet Microbiol*. sept 2013;166(1-2):47-58.
270. Camacho AI, Irache JM, de Souza J, Sánchez-Gómez S, Gamazo C. Nanoparticle-based vaccine for mucosal protection against *Shigella flexneri* in mice. *Vaccine*. juill 2013;31(32):3288-94.
271. Tajdini F, Amini MA, Mokarram AR, Taghizadeh M, Azimi SM. Foot and Mouth Disease virus-loaded fungal chitosan nanoparticles for intranasal administration: impact of

- formulation on physicochemical and immunological characteristics. *Pharm Dev Technol.* mai 2014;19(3):333-41.
272. Kong IG, Sato A, Yuki Y, Nochi T, Takahashi H, Sawada S, et al. Nanogel-Based PspA Intranasal Vaccine Prevents Invasive Disease and Nasal Colonization by *Streptococcus pneumoniae*. Morrison RP, éditeur. *Infect Immun.* mai 2013;81(5):1625-34.
273. Subbiah R, Ramalingam P, Ramasundaram S, Kim DY, Park K, Ramasamy MK, et al. N,N,N-Trimethyl chitosan nanoparticles for controlled intranasal delivery of HBV surface antigen. *Carbohydr Polym.* août 2012;89(4):1289-97.
274. Moon HJ, Lee JS, Talactac MR, Chowdhury MYE, Kim JH, Park ME, et al. Mucosal immunization with recombinant influenza hemagglutinin protein and poly gamma-glutamate/chitosan nanoparticles induces protection against highly pathogenic influenza A virus. *Vet Microbiol.* déc 2012;160(3-4):277-89.
275. Tafaghodi M, Saluja V, Kersten GFA, Kraan H, Slütter B, Amorij JP, et al. Hepatitis B surface antigen nanoparticles coated with chitosan and trimethyl chitosan: Impact of formulation on physicochemical and immunological characteristics. *Vaccine.* août 2012;30(36):5341-8.
276. Sahu KK, Pandey RS. Immunological evaluation of colonic delivered Hepatitis B surface antigen loaded TLR-4 agonist modified solid fat nanoparticles. *Int Immunopharmacol.* oct 2016;39:343-52.
277. Da Costa Martins R, Gamazo C, Sánchez-Martínez M, Barberán M, Peñuelas I, Irache JM. Conjunctival vaccination against *Brucella ovis* in mice with mannosylated nanoparticles. *J Controlled Release.* sept 2012;162(3):553-60.
278. England RJ, Homer JJ, Knight LC, Ell SR. Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* févr 1999;24(1):67-8.
279. Zhang X, Cheng H, Dong W, Zhang M, Liu Q, Wang X, et al. Design and intestinal mucus penetration mechanism of core-shell nanocomplex. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 28 févr 2018;272:29-38.
280. Maldonado-Contreras AL, McCormick BA. Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity. *Cell Tissue Res.* janv 2011;343(1):5-12.
281. Pawar D, Jaganathan KS. Mucoadhesive glycol chitosan nanoparticles for intranasal delivery of hepatitis B vaccine: enhancement of mucosal and systemic immune response. *Drug Deliv.* 2 janv 2016;23(1):185-94.
282. Staats HF, Fielhauer JR, Thompson AL, Tripp AA, Sobel AE, Maddaloni M, et al. Mucosal targeting of a BoNT/A subunit vaccine adjuvanted with a mast cell activator enhances induction of BoNT/A neutralizing antibodies in rabbits. *PloS One.* 27 janv 2011;6(1):e16532.
283. Wang SH, Kirwan SM, Abraham SN, Staats HF, Hickey AJ. Stable dry powder formulation for nasal delivery of anthrax vaccine. *J Pharm Sci.* janv 2012;101(1):31-47.

284. Salah N, Dubuquoy L, Carpentier R, Betbeder D. Starch nanoparticles improve curcumin-induced production of anti-inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells. *Int J Pharm X*. déc 2022;4:100114.
285. Dombu CY, Kroubi M, Zibouche R, Matran R, Betbeder D. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. *Nanotechnology*. 3 sept 2010;21(35):355102.
286. Merhi M, Dombu CY, Brient A, Chang J, Platel A, Le Curieux F, et al. Study of serum interaction with a cationic nanoparticle: Implications for in vitro endocytosis, cytotoxicity and genotoxicity. *Int J Pharm*. févr 2012;423(1):37-44.
287. Paillard A, Passirani C, Saulnier P, Kroubi M, Garcion E, Benoît JP, et al. Positively-Charged, Porous, Polysaccharide Nanoparticles Loaded with Anionic Molecules Behave as 'Stealth' Cationic Nanocarriers. *Pharm Res*. janv 2010;27(1):126-33.
288. Carpentier R, Platel A, Salah N, Nessler F, Betbeder D. Porous Maltodextrin-Based Nanoparticles: A Safe Delivery System for Nasal Vaccines. *J Nanomater*. 16 déc 2018;2018:1-8.
289. Dimier-Poisson I, Carpentier R, N'Guyen TTL, Dahmani F, Ducournau C, Betbeder D. Porous nanoparticles as delivery system of complex antigens for an effective vaccine against acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Biomaterials*. mai 2015;50:164-75.
290. Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: safety concerns. *Nanomed*. juin 2013;8(6):969-81.
291. Bernocchi B, Carpentier R, Lantier I, Ducournau C, Dimier-Poisson I, Betbeder D. Mechanisms allowing protein delivery in nasal mucosa using NPL nanoparticles. *J Controlled Release*. juin 2016;232:42-50.
292. Bernasconi V, Bernocchi B, Ye L, Lê MQ, Omokanye A, Carpentier R, et al. Porous Nanoparticles With Self-Adjuvanting M2e-Fusion Protein and Recombinant Hemagglutinin Provide Strong and Broadly Protective Immunity Against Influenza Virus Infections. *Front Immunol*. 12 sept 2018;9:2060.
293. Debin A, Kravtsoff R, Santiago JV, Cazales L, Sperandio S, Melber K, et al. Intranasal immunization with recombinant antigens associated with new cationic particles induces strong mucosal as well as systemic antibody and CTL responses. *Vaccine*. juin 2002;20(21-22):2752-63.
294. Le MQ, Carpentier R, Lantier I, Ducournau C, Dimier-Poisson I, Betbeder D. Residence time and uptake of porous and cationic maltodextrin-based nanoparticles in the nasal mucosa: Comparison with anionic and cationic nanoparticles. *Int J Pharm*. oct 2018;550(1-2):316-24.
295. Fasquelle F, Carpentier R, Demouveau B, Desseyn JL, Betbeder D. Importance of the Phospholipid Core for Mucin Hydrogel Penetration and Mucosal Cell Uptake of Maltodextrin Nanoparticles. *ACS Appl Bio Mater*. 21 sept 2020;3(9):5741-9.
296. Dombu C, Carpentier R, Betbeder D. Influence of surface charge and inner composition of nanoparticles on intracellular delivery of proteins in airway epithelial cells. *Biomaterials*. déc 2012;33(35):9117-26.

297. Ducournau C, Moiré N, Carpentier R, Cantin P, Herkt C, Lantier I, et al. Effective Nanoparticle-Based Nasal Vaccine Against Latent and Congenital Toxoplasmosis in Sheep. *Front Immunol.* 9 sept 2020;11:2183.
298. Un vaccin contre la toxoplasmose pour la faune menacée des parcs zoologiques [Internet]. INRAE Institutionnel. [cité 20 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.inrae.fr/actualites/vaccin-contre-toxoplasmose-faune-menacee-parcs-zoologiques>
299. Fasquelle F, Dubuquoy L, Betbeder D. Starch-based NP act as antigen delivery systems without immunomodulating effect. Omri A, éditeur. *PLOS ONE.* 29 juill 2022;17(7):e0272234.
300. Fabiani S, Caroselli C, Menchini M, Gabbriellini G, Falcone M, Bruschi F. Ocular toxoplasmosis, an overview focusing on clinical aspects. *Acta Trop.* janv 2022;225:106180.
301. Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, De Souza W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors.* 23 nov 2020;13:588.
302. Ducournau C, Nguyen TT, Carpentier R, Lantier I, Germon S, Précausta F, et al. Synthetic parasites: a successful mucosal nanoparticle vaccine against *Toxoplasma* congenital infection in mice. *Future Microbiol.* avr 2017;12(5):393-405.
303. Helou DG, Mauras A, Fasquelle F, Lanza JS, Loiseau PM, Betbeder D, et al. Intranasal vaccine from whole *Leishmania donovani* antigens provides protection and induces specific immune response against visceral leishmaniasis. Lopes UG, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis.* 17 août 2021;15(8):e0009627.
304. McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM Int J Med.* janv 2014;107(1):7-14.
305. Schijns V, Majhen D, van der Ley P, Thakur A, Summerfield A, Berisio R, et al. Rational Vaccine Design in Times of Emerging Diseases: The Critical Choices of Immunological Correlates of Protection, Vaccine Antigen and Immunomodulation. *Pharmaceutics.* 6 avr 2021;13(4):501.
306. Verwaerde C, Debrie AS, Dombu C, Legrand D, Raze D, Lecher S, et al. HBHA vaccination may require both Th1 and Th17 immune responses to protect mice against tuberculosis. *Vaccine.* oct 2014;32(47):6240-50.
307. Rouanet C, Debrie AS, Lecher S, Loch C. Subcutaneous boosting with heparin binding haemagglutinin increases BCG-induced protection against tuberculosis. *Microbes Infect.* 1 nov 2009;11(13):995-1001.
308. Parra M, Pickett T, Delogu G, Dheenadhayalan V, Debrie AS, Loch C, et al. The mycobacterial heparin-binding hemagglutinin is a protective antigen in the mouse aerosol challenge model of tuberculosis. *Infect Immun.* déc 2004;72(12):6799-805.
309. Quan Le M, Ye L, Bernasconi V, Carpentier R, Fasquelle F, Lycke N, et al. Prevention of influenza virus infection and transmission by intranasal administration of a porous maltodextrin nanoparticle-formulated vaccine. *Int J Pharm.* mai 2020;582:119348.

310. Eliasson DG, El Bakkouri K, Schön K, Ramne A, Festjens E, Löwenadler B, et al. CTA1-M2e-DD: a novel mucosal adjuvant targeted influenza vaccine. *Vaccine*. 26 févr 2008;26(9):1243-52.
311. Zhu L, Chen L, Cao QR, Chen D, Cui J. Preparation and evaluation of mannose receptor mediated macrophage targeting delivery system. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 30 nov 2011;152 Suppl 1:e190-191.
312. Apostolopoulos V, McKenzie IF. Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr Mol Med*. sept 2001;1(4):469-74.
313. Pinheiro M, Ribeiro R, Vieira A, Andrade F, Reis S. Design of a nanostructured lipid carrier intended to improve the treatment of tuberculosis. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:2467-75.
314. Debin A, Kravtsoff R, Santiago JV, Cazales L, Sperandio S, Melber K, et al. Intranasal immunization with recombinant antigens associated with new cationic particles induces strong mucosal as well as systemic antibody and CTL responses. *Vaccine*. juin 2002;20(21-22):2752-63.
315. Li X, Wang X, Ito A, Tsuji NM. A nanoscale metal organic frameworks-based vaccine synergises with PD-1 blockade to potentiate anti-tumour immunity. *Nat Commun*. déc 2020;11(1):3858.
316. Bansal A, Wu X, Olson V, D'Souza MJ. Characterization of rabies pDNA nanoparticulate vaccine in poloxamer 407 gel. *Int J Pharm*. juill 2018;545(1-2):318-28.
317. Mittal N, Kaur G. *Leucaena leucocephala* (Lam.) galactomannan nanoparticles: Optimization and characterization for ocular delivery in glaucoma treatment. *Int J Biol Macromol*. oct 2019;139:1252-62.
318. Kumari M, Purohit MP, Pahuja R, Patnaik S, Shukla Y, Kumar P, et al. Pro-inflammatory macrophage polarization enhances the anti-cancer efficacy of self-assembled galactomannan nanoparticles entrapped with hydrazinocurcumin. *Drug Deliv Transl Res*. déc 2019;9(6):1159-88.
319. Chen N, Zhu P, Du T, Han K, Wang D, Ye J, et al. Preparation of Modified Konjac Glucomannan Nanoparticles and their Application as Vaccine Adjuvants to Promote Ovalbumin-Induced Immune Response in Mice. *Pharm Res*. mai 2018;35(5):105.
320. Park JH, Oh N. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*. mai 2014;51.
321. Meenakshi S, Kumar VU, Dhingra S, Murti K. Nasal vaccine as a booster shot: a viable solution to restrict pandemic? *Clin Exp Vaccine Res*. mai 2022;11(2):184-92.
322. Bernocchi B. Nasal nanovaccines. *Int J Pharm*. 2017;11.
323. Huang J, Ding Y, Yao J, Zhang M, Zhang Y, Xie Z, et al. Nasal Nanovaccines for SARS-CoV-2 to Address COVID-19. *Vaccines*. 8 mars 2022;10(3):405.
324. Kravtsoff R, Betheder D, Davrinche C, Vaz Santiago J, Lule J. Use of Hydrophilic Particles Associated with Antigens for Preparing Vaccine Compositions [Internet].

2002 [cité 16 août 2022]. Disponible sur:  
<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2002034239>

325. Lê MQ, Carpentier R, Lantier I, Ducournau C, Fasquelle F, Dimier-Poisson I, et al. Protein delivery by porous cationic maltodextrin-based nanoparticles into nasal mucosal cells: Comparison with cationic or anionic nanoparticles. *Int J Pharm X*. déc 2019;1:100001.
326. De Miguel I, Imbertie L, Betbeder D, Lescure F, Kravtsoff R. Matrices Polymeriques Amphiphiles Et Ioniques Et Derives De Telles Matrices [Internet]. 2001 [cité 16 août 2022]. Disponible sur:  
<https://patentscope.wipo.int/search/fr/detail.jsf?docId=WO2001051090>
327. Boada-Romero E, Martinez J, Heckmann BL, Green DR. The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. juill 2020;21(7):398-414.
328. Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, Freeman GJ. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. juin 2003;3(6):454-62.
329. DeKruyff RH, Bu X, Ballesteros A, Santiago C, Chim YLE, Lee HH, et al. T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 févr 2010;184(4):1918-30.
330. Bonnardel J, Da Silva C, Henri S, Tamoutounour S, Chasson L, Montañana-Sanchis F, et al. Innate and adaptive immune functions of peyer's patch monocyte-derived cells. *Cell Rep*. 5 mai 2015;11(5):770-84.
331. Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol*. 26 avr 2018;36:489-517.
332. Oliveira LG, Peron JPS. Viral receptors for flaviviruses: Not only gatekeepers. *J Leukoc Biol*. sept 2019;106(3):695-701.
333. Chua BA, Ngo JA, Situ K, Morizono K. Roles of phosphatidylserine exposed on the viral envelope and cell membrane in HIV-1 replication. *Cell Commun Signal CCS*. 21 oct 2019;17(1):132.
334. Birge RB, Boeltz S, Kumar S, Carlson J, Wanderley J, Calianese D, et al. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ*. juin 2016;23(6):962-78.
335. Wanderley JLM, DaMatta RA, Barcinski MA. Apoptotic mimicry as a strategy for the establishment of parasitic infections: parasite- and host-derived phosphatidylserine as key molecule. *Cell Commun Signal CCS*. 15 janv 2020;18(1):10.
336. Forrester MA, Wassall HJ, Hall LS, Cao H, Wilson HM, Barker RN, et al. Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell Immunol*. oct 2018;332:58-76.
337. Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y. Production of proinflammatory cytokines by phorbol myristate acetate-treated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages

- after phagocytosis of apoptotic CTLL-2 cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 déc 1998;161(11):6245-9.
338. Jahnsen FL, Gran E, Haye R, Brandtzaeg P. Human nasal mucosa contains antigen-presenting cells of strikingly different functional phenotypes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* janv 2004;30(1):31-7.
339. Deng L, Mohan T, Chang TZ, Gonzalez GX, Wang Y, Kwon YM, et al. Double-layered protein nanoparticles induce broad protection against divergent influenza A viruses. *Nat Commun.* 24 janv 2018;9(1):359.
340. Vanloubbeeck Y, Pichyangkul S, Bayat B, Yongvanitchit K, Bennett JW, Sattabongkot J, et al. Comparison of the immune responses induced by soluble and particulate *Plasmodium vivax* circumsporozoite vaccine candidates formulated in AS01 in rhesus macaques. *Vaccine.* 16 déc 2013;31(52):6216-24.
341. Hagensaars N, Mastrobattista E, Glansbeek H, Heldens J, van den Bosch H, Schijns V, et al. Head-to-head comparison of four nonadjuvanted inactivated cell culture-derived influenza vaccines: effect of composition, spatial organization and immunization route on the immunogenicity in a murine challenge model. *Vaccine.* 2 déc 2008;26(51):6555-63.
342. Castignolles N, Morgeaux S, Gontier-Jallet C, Samain D, Betbeder D, Perrin P. A new family of carriers (biovectors) enhances the immunogenicity of rabies antigens. *Vaccine.* oct 1996;14(14):1353-60.
343. von Hoegen P. Synthetic biomimetic supra molecular Biovector (SMBV) particles for nasal vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 23 sept 2001;51(1-3):113-25.
344. Peyrot M, Sautereau AM, Rabanel JM, Nguyen F, Tocanne JF, Samain D. Supramolecular biovectors (SMBV): a new family of nanoparticulate drug delivery systems. Synthesis and structural characterization. *Int J Pharm.* 7 févr 1994;102(1):25-33.
345. Davies SP, Reynolds GM, Stamataki Z. Clearance of Apoptotic Cells by Tissue Epithelia: A Putative Role for Hepatocytes in Liver Efferocytosis. *Front Immunol.* 2018;9:44.
346. Seeberg JC, Loibl M, Moser F, Schwegler M, Büttner-Herold M, Daniel C, et al. Non-professional phagocytosis: a general feature of normal tissue cells. *Sci Rep.* 15 août 2019;9(1):11875.
347. Salik E, Tyorkin M, Mohan S, George I, Becker K, Oei E, et al. Antigen trafficking and accessory cell function in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* sept 1999;21(3):365-79.
348. McDougall CM, Blaylock MG, Douglas JG, Brooker RJ, Helms PJ, Walsh GM. Nasal epithelial cells as surrogates for bronchial epithelial cells in airway inflammation studies. *Am J Respir Cell Mol Biol.* nov 2008;39(5):560-8.
349. Liu M, Li Q, Liang L, Li J, Wang K, Li J, et al. Real-time visualization of clustering and intracellular transport of gold nanoparticles by correlative imaging. *Nat Commun.* 31 mai 2017;8:15646.

350. Toshima JY, Toshima J, Kaksonen M, Martin AC, King DS, Drubin DG. Spatial dynamics of receptor-mediated endocytic trafficking in budding yeast revealed by using fluorescent alpha-factor derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 avr 2006;103(15):5793-8.
351. Mao L, Chen Z, Wang Y, Chen C. Design and application of nanoparticles as vaccine adjuvants against human corona virus infection. *J Inorg Biochem*. juin 2021;219:111454.
352. Foged C. Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems. *Ther Deliv*. août 2011;2(8):1057-77.
353. Quan FS, Lee YT, Kim KH, Kim MC, Kang SM. Progress in developing virus-like particle influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines*. oct 2016;15(10):1281-93.
354. Singh J, Michel D, Getson HM, Chitanda JM, Verrall RE, Badea I. Development of amino acid substituted gemini surfactant-based mucoadhesive gene delivery systems for potential use as noninvasive vaginal genetic vaccination. *Nanomed*. févr 2015;10(3):405-17.
355. Azegami T, Yuki Y, Kiyono H. Challenges in mucosal vaccines for the control of infectious diseases. *Int Immunol*. sept 2014;26(9):517-28.
356. McDonald J, Moore D. FluMist vaccine: Questions and answers - summary. *Paediatr Child Health*. janv 2011;16(1):31.
357. Riese P, Sakthivel P, Trittel S, Guzmán CA. Intranasal formulations: promising strategy to deliver vaccines. *Expert Opin Drug Deliv*. oct 2014;11(10):1619-34.
358. Wang D, Christopher ME, Nagata LP, Zabielski MA, Li H, Wong JP, et al. Intranasal immunization with liposome-encapsulated plasmid DNA encoding influenza virus hemagglutinin elicits mucosal, cellular and humoral immune responses. *J Clin Virol*. 1 déc 2004;31:99-106.
359. Rosada RS, de la Torre LG, Frantz FG, Trombone APF, Zárata-Bladés CR, Fonseca DM, et al. Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes. *BMC Immunol*. 22 juill 2008;9:38.
360. Chen C, Han D, Cai C, Tang X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *J Controlled Release*. 19 mars 2010;142(3):299-311.
361. Zhu FC, Li YH, Guan XH, Hou LH, Wang WJ, Li JX, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *The Lancet*. 13 juin 2020;395(10240):1845-54.
362. Sun W, Leist SR, McCroskery S, Liu Y, Slamanig S, Oliva J, et al. Newcastle disease virus (NDV) expressing the spike protein of SARS-CoV-2 as a live virus vaccine candidate. *eBioMedicine*. 1 déc 2020;62.
363. Tscherne A, Schwarz JH, Rohde C, Kupke A, Kalodimou G, Limpinsel L, et al. Immunogenicity and efficacy of the COVID-19 candidate vector vaccine MVA-SARS-2-S in preclinical vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13 juill 2021;118(28):e2026207118.

364. Marcellin P, Gane E, Buti M, Afdhal N, Sievert W, Jacobson IM, et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet Lond Engl.* 9 févr 2013;381(9865):468-75.
365. Chiang CJ, Yang YW, You SL, Lai MS, Chen CJ. Thirty-year outcomes of the national hepatitis B immunization program in Taiwan. *JAMA.* 4 sept 2013;310(9):974-6.
366. El mir S, Casanova A, Betbeder D, Triebel F. A combination of interleukin-2 and 60 nm cationic supramolecular biovectors for the treatment of established tumours by subcutaneous or intranasal administration. *Eur J Cancer.* mai 2001;37(8):1053-60.
367. Liu Z, Lv D, Liu S, Gong J, Wang D, Xiong M, et al. Alginate Acid-Coated Chitosan Nanoparticles Loaded with Legumain DNA Vaccine: Effect against Breast Cancer in Mice. He X, éditeur. *PLoS ONE.* 5 avr 2013;8(4):e60190.
368. Yao W, Peng Y, Du M, Luo J, Zong L. Preventative Vaccine-Loaded Mannosylated Chitosan Nanoparticles Intended for Nasal Mucosal Delivery Enhance Immune Responses and Potent Tumor Immunity. *Mol Pharm.* 5 août 2013;10(8):2904-14.
369. Mai Y, Guo J, Zhao Y, Ma S, Hou Y, Yang J. Intranasal delivery of cationic liposome-protamine complex mRNA vaccine elicits effective anti-tumor immunity. *Cell Immunol.* août 2020;354:104143.
370. Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Arita S, Katayama K, Nomura T, et al. Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus. *J Virol.* déc 2010;84(24):12703-12.
371. Mansuri S, Kesharwani P, Jain K, Tekade RK, Jain NK. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *React Funct Polym.* 1 mars 2016;100:151-72.
372. Prabakaran M. Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems. *Int J Biol Macromol.* 1 août 2011;49(2):117-24.
373. Kono H, Otaka F, Ozaki M. Preparation and characterization of guar gum hydrogels as carrier materials for controlled protein drug delivery. *Carbohydr Polym.* 13 oct 2014;111:830-40.
374. Ghosh SK, Abdullah F, Mukherjee A. Fabrication and fluorescent labeling of guar gum nanoparticles in a surfactant free aqueous environment. *Mater Sci Eng C.* 1 janv 2015;46:521-9.
375. S. R, M. P. Multi-functional FITC-silica@gold nanoparticles conjugated with guar gum succinate, folic acid and doxorubicin for CT/fluorescence dual imaging and combined chemo/PTT of cancer. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 févr 2020;186:110701.
376. Bakkari MA, Valiveti CK, Kaushik RS, Tummala H. Toll-like Receptor-4 (TLR4) Agonist-Based Intranasal Nanovaccine Delivery System for Inducing Systemic and Mucosal Immunity. *Mol Pharm.* 7 juin 2021;18(6):2233-41.
377. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med.* 5 août 2002;196(3):407-12.

378. Pifferi C, Fuentes R, Fernández-Tejada A. Natural and synthetic carbohydrate-based vaccine adjuvants and their mechanisms of action. *Nat Rev Chem.* mars 2021;5(3):197-216.
379. Carroll EC, Jin L, Mori A, Muñoz-Wolf N, Oleszycka E, Moran HBT, et al. The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons. *Immunity.* 15 mars 2016;44(3):597-608.
380. Khan NS, Kasperkovitz PV, Timmons AK, Mansour MK, Tam JM, Seward MW, et al. Dectin-1 Controls TLR9 Trafficking to Phagosomes Containing  $\beta$ -1,3 Glucan. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mars 2016;196(5):2249-61.
381. Leventis PA, Grinstein S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys.* 2010;39:407-27.
382. Segawa K, Nagata S. An Apoptotic « Eat Me » Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol.* nov 2015;25(11):639-50.
383. Camici O, Corazzi L. Import of phosphatidylethanolamine for the assembly of rat brain mitochondrial membranes. *J Membr Biol.* 1 nov 1995;148(2):169-76.
384. Wen XY, Stewart AK, Skaug J, Wei E, Tsui LC. Murine phosphatidylserine-specific phospholipase A1 (Ps-pla1) maps to Chromosome 16 but is distinct from the lpd (lipid defect) locus. *Mamm Genome.* 1 févr 2001;12(2):129-32.
385. Lourenssen S, Blennerhassett MG. Lysophosphatidylserine potentiates nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Neurosci Lett.* 29 mai 1998;248(2):77-80.
386. Schroit AJ, Fidler IJ. Effects of liposome structure and lipid composition on the activation of the tumoricidal properties of macrophages by liposomes containing muramyl dipeptide. *Cancer Res.* janv 1982;42(1):161-7.
387. Naito S, Horino A, Nakayama M, Nakano Y, Nagai T, Mizuguchi J, et al. Ovalbumin-liposome conjugate induces IgG but not IgE antibody production. *Int Arch Allergy Immunol.* mars 1996;109(3):223-8.
388. Taneichi M, Naito S, Kato H, Tanaka Y, Mori M, Nakano Y, et al. T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 oct 2002;169(8):4246-52.
389. Biriken D, Yazihan N. Modulation of proliferation, apoptosis and inflammation of Caco-2 epithelial cells and THP-1 macrophage-like monocytes in LPS stimulated co-culture model. *Bratisl Lek Listy.* 2021;122(2):138-44.
390. Zhu J, Cao J, Liesz A, Roth S. A macrophage-T cell coculture model for severe tissue injury-induced T cell death. *STAR Protoc.* déc 2021;2(4):100983.
391. Wang G, Zhang X, Liu X, Zheng J. Co-culture of human alveolar epithelial (A549) and macrophage (THP-1) cells to study the potential toxicity of ambient PM2.5: a comparison of growth under ALI and submerged conditions. *Toxicol Res.* 29 oct 2020;9(5):636-51.

392. Ramezanzpour M, Bolt H, Hon K, Shaghayegh G, Rastin H, Fenix KA, et al. Characterization of human nasal organoids from chronic rhinosinusitis patients. *Biol Open*. 16 août 2022;11(8):bio059267.
393. Chiu MC, Li C, Liu X, Song W, Wan Z, Yu Y, et al. Human Nasal Organoids Model SARS-CoV-2 Upper Respiratory Infection and Recapitulate the Differential Infectivity of Emerging Variants. *mBio*. 13(4):e01944-22.
394. *Virologie et Immunologie Moléculaires - Olfaction et virus*.
395. Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev*. juin 1996;60(2):316-41.
396. Zeng W, Ghosh S, Lau YF, Brown LE, Jackson DC. Highly immunogenic and totally synthetic lipopeptides as self-adjuvanting immunocontraceptive vaccines. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 nov 2002;169(9):4905-12.
397. Huang L, Hinchman M, Mendez S. Coinjection with TLR2 Agonist Pam3CSK4 Reduces the Pathology of Leishmanization in Mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 4 mars 2015;9(3):e0003546.
398. Katebi A, Varshochian R, Riazi-rad F, Ganjalikhani-Hakemi M, Ajdary S. Combinatorial delivery of antigen and TLR agonists via PLGA nanoparticles modulates Leishmania major-infected-macrophages activation. *Biomed Pharmacother*. mai 2021;137:111276.
399. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol*. avr 2006;36(4):810-6.
400. Tschernig T, Pabst R. Macrophage activating lipopeptide 2 is effective in mycobacterial lung infection. *Ann Anat - Anat Anz*. janv 2021;233:151605.
401. Borsutzky S, Ebensen T, Link C, Becker PD, Fiorelli V, Cafaro A, et al. Efficient systemic and mucosal responses against the HIV-1 Tat protein by prime/boost vaccination using the lipopeptide MALP-2 as adjuvant. *Vaccine*. 15 mars 2006;24(12):2049-56.
402. Deci MB, Liu M, Dinh QT, Nguyen J. Precision Engineering of Targeted Nanocarriers. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. sept 2018;10(5):e1511.
403. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LAJ. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*. avr 2010;9(4):293-307.
404. Wei L, Zhao T, Zhang J, Mao Q, Gong G, Sun Y, et al. Efficacy and safety of a nanoparticle therapeutic vaccine in patients with chronic hepatitis B: A randomized clinical trial. *Hepatology*. janv 2022;75(1):182-95.

Université de Lille  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE  
**THESE DE DOCTORAT**  
Année Universitaire 2021/2022

**Last Name** : BRINKHUIZEN

**Name** : Clément

**Subject** : Optimization of maltodextrin based nanoparticles with lipid core for vaccine purposes

---

The Covid-19 pandemic has demonstrated that vaccine technologies need to be quickly adaptable to emerging pathogens. To address this problem, nanoparticle-assisted vaccines were the most effective tool against SARS-CoV2, highlighting the interest of these vectors.

Over the past ten years, the NPL, cationic and cross-linked maltodextrin nanoparticles containing a lipid core, have been developed to deliver antigenic proteins by nasal administration. Non-specific, NPL has proven its effectiveness against pathogens such as *Toxoplasma gondii*, but results remain more variable for other microorganisms.

In order to optimize the targeting of this nanoparticle to the immune system, we replaced the carbohydrate matrix of the NPL by galactomannan or its lipid core by phosphatidylserine. From these two strategies, lipid substitution made it possible to obtain a nanoparticle with physicochemical properties identical to NPL. Better endocytosis was demonstrated without however impacting the degradation of carried proteins, reflecting the potential targeting through lipid substitution. Nevertheless, to confirm this hypothesis, vaccine experiments in animals should be carried out.

---

**Keywords** : Nanoparticle, Vaccine, Targeting, Mucosal administration

Université de Lille  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE  
**THESE DE DOCTORAT**  
Année Universitaire 2021/2022

**Nom** : BRINKHUIZEN

**Prénom** : Clément

**Titre de la thèse** : Optimisation de nanoparticules de maltodextrine lipidées à visée vaccinale

---

La pandémie de Covid-19 a démontré que les technologies vaccinales devaient être rapidement adaptables aux pathogènes émergents. Pour répondre à ce problème, les vaccins assistés par nanoparticules furent l'arme la plus efficace de notre arsenal à l'encontre du SARS-CoV2, mettant en lumière l'intérêt de ces vecteurs.

Depuis ces dix dernières années, les NPL, des nanoparticules de maltodextrine cationique et réticulée contenant un cœur lipidique ont été développées pour délivrer des protéines antigéniques par une administration nasale. Non spécifique, la NPL a prouvé son efficacité à l'encontre de pathogènes tels que *Toxoplasma gondii* mais les résultats restent plus variables pour d'autres microorganismes.

Afin d'optimiser ce vecteur pour cibler des cellules du système immunitaire, nous avons remplacé la matrice glucidique de la NPL par du galactomananne ou son cœur lipidique par de la phosphatidylsérine. De ces deux stratégies, la substitution lipidique permet d'obtenir une nanoparticule aux propriétés physico-chimiques identiques à la NPL. Une meilleure endocytose a été mise en évidence sans toutefois impacter la dégradation des protéines transportées, traduisant un ciblage potentiel grâce à la substitution lipidique. Toutefois, pour confirmer cette hypothèse, des expériences vaccinales chez l'animal devraient être menées.

---

**Mots-clés** : Nanoparticules, Vaccin, Ciblage, Administration mucosale