



HAL
open science

Caractérisation et comparaison des propriétés immunostimulantes de nanoparticules biodégradables de poly(acide lactique) et de chitosane après adsorption de TLR ligands ou d'antigènes du VIH1

Caroline Weber Pibre-Weber

► **To cite this version:**

Caroline Weber Pibre-Weber. Caractérisation et comparaison des propriétés immunostimulantes de nanoparticules biodégradables de poly(acide lactique) et de chitosane après adsorption de TLR ligands ou d'antigènes du VIH1. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10333 . tel-00806837

HAL Id: tel-00806837

<https://theses.hal.science/tel-00806837>

Submitted on 22 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 10 décembre 2010

par

Mme Caroline PIBRE-WEBER

CARACTERISATION ET COMPARAISON DES PROPRIETES
IMMUNOSTIMULANTES DE NANOPARTICULES
BIODEGRADABLES DE POLY(ACIDE LACTIQUE) ET DE
CHITOSANE APRES ADSORPTION DE TLR LIGANDS OU
D'ANTIGENES DU VIH1

JURY : Pr Thierry Delair (président du jury)

Dr Christiane Moog (rapporteur)

Pr Christian Genin (rapporteur)

Pr Stéphane Paul

Dr Roger Legrand

Dr Bernard Verrier

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 10 décembre 2010

par

Mme Caroline PIBRE-WEBER

CARACTERISATION ET COMPARAISON DES PROPRIETES
IMMUNOSTIMULANTES DE NANOPARTICULES
BIODEGRADABLES DE POLY(ACIDE LACTIQUE) ET DE
CHITOSANE APRES ADSORPTION DE TLR LIGANDS OU
D'ANTIGENES DU VIH1

JURY : Pr Thierry Delair (président du jury)

Dr Christiane Moog (rapporteur)

Pr Christian Genin (rapporteur)

Pr Stéphane Paul

Dr Roger Legrand

Dr Bernard Verrier

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction de Bernard Verrier en co-direction avec Roger Legrand (CEA) et Martin Cranage (SGUL). Je souhaite remercier tout particulièrement Bernard pour son encadrement et son soutien au cours de ses trois années. Ses compétences et ses idées (plus que nombreuses) ainsi que sa bonne humeur constante ont rendu le travail plus facile.

Un merci spécial à Thierry Delair sans qui je n'aurais probablement jamais commencé cette aventure et qui a été d'une aide précieuse et d'un soutien indéfectible.

Je tiens à remercier tout ceux qui m'ont aidée notamment Franck Gaudin pour les nanoparticules de chitosane (merci d'avoir évité les chewing-gums), Elsa Luciani miss PLA toujours de bonne humeur, Charlotte Primard pour ses conseils, Céline Terrat pour les coups de main tout à fait salutaires et surtout Séverine Munier, Agnès Borel, Astrid Calamet et Vincent Pavot pour avoir accepté de m'aider pour les manip souris et avec le sourire !!

J'ai une pensée aussi pour tout les bons moments passés avec mes colocataires et ex-colocataires de bureau.

Et un dernier merci à ma famille, mes amis et mon mari qui ont du supporter mes frasques pendant toutes ces années.

Résumé

Caractérisation et comparaison des propriétés immunostimulantes de nanoparticules biodégradables de poly(acide lactique) et de chitosane après adsorption de TLR ligands ou d'antigènes du VIH1

Les vecteurs nanoparticulaires comme systèmes de relargage contrôlé pour des applications vaccinales font l'objet d'intenses recherches, notamment dans le domaine du VIH1. Une approche novatrice consiste à co-administrer des molécules immuno-stimulatrices avec les antigènes d'intérêt, afin d'amplifier le recrutement et l'activation des cellules dendritiques (DCs). Un tel vecteur vaccinal stimulerait l'intensité de la réponse immunitaire et une immunité au niveau des muqueuses vaginales et anales pourrait être obtenue après vaccination.

Des nanoparticules de poly(acide lactique) (NP-PLA) ou de chitosane/sulfate de dextrane (NP-CSD) ont été utilisées comme véhicules et adjuvants de protéines du VIH1, gp140 et p24. Le poly(I:C), ligand de TLR3 est la molécule immuno-stimulatrice retenue pour ses propriétés adjuvantes.

Les NP-PLA et NP-CSD présentent un potentiel équivalent pour l'adsorption de protéines. Par contre, si les NP-CSD permettent l'adsorption du poly(I:C) (95%), elle est moins reproductible sur les NP-PLA. Pour chaque formulation, la capacité à induire *in vitro* la maturation des DCs a été évaluée en suivant les marqueurs CD25, CD80, CD83, par cytométrie en flux. L'adsorption de poly(I:C) sur les NP-PLA ou les NP-CSD amplifie les capacités de maturation de ces nanoparticules, un effet synergique étant observé avec les NP-CSD.

Nos travaux montrent que la co-adsorption d'un TLR ligand, avec des antigènes protéiques du VIH sur des nanoparticules biodégradables, est possible et confère à la formulation vaccinale un effet immuno-stimulant *in vitro*. *In vivo*, les formulations vaccinales contenant du poly(I:C) induisent de très forts taux d'anticorps sériques chez la souris.

MOTS-CLEFS : nanoparticules, PLA, chitosane, adjuvant particulaire, vaccination, cellules dendritiques

Summary

Characterization and comparison of the immunostimulatory properties of biodegradable poly (lactic acid) and chitosan nanoparticles after TLR ligands or HIV-1 antigens adsorption

Use of nanoparticulate vectors in vaccination as controlled release systems based on biodegradable polymers has been widely studied, particularly for HIV vaccine research. An innovative approach is to co-administer antigens of interest with immuno-stimulatory molecules to amplify the recruitment and activation of dendritic cells (DCs). Such a vaccine candidate could boost the intensity of the immune response, and mucosal immunity in vaginal and anal secretions could be obtained after vaccination.

We used nanoparticles of poly(lactic acid) (NP-PLA) or chitosan / dextran sulfate (NP-CSD), as vehicles and adjuvants for HIV-1 proteins, gp140 and p24. Poly (I:C), TLR3 ligand molecule, is the immuno-stimulatory molecule chosen for its adjuvant properties.

The NP-PLA and NP-CSD have shown their great potential as carriers of proteins. By cons, if NP-CSD allows the adsorption of poly(I:C) with a yield of 95%, the adsorption is less reproducible on NP-PLA. For each formulation, the ability to induce in vitro maturation of DCs was evaluated by following the marker CD25, CD80, CD83, by flow cytometry. Adsorption of poly(I:C) on the NP-PLA or the NP-CSD amplifies the maturation abilities of particles and has a synergistic effect with the NP-CSD.

Our work shows that co-adsorption of a TLR ligand with HIV protein antigens onto biodegradable nanoparticles is possible and gives an immuno-stimulant effect to the vaccine formulation in vitro. In vivo, vaccine formulations containing poly(I:C) induce very high levels of serum antibodies in mice.

KEY WORDS : nanoparticles, PLA, chitosan, adjuvant, vaccination, dendritic cells

Résumé	- 7 -
Summary	- 9 -
Liste des abréviations	- 15 -
Introduction	- 17 -
Bibliographie	- 21 -
1. Vecteurs nanoparticulaires biodégradables et vaccination	- 23 -
1.1. Les composés à base d'aluminium	- 23 -
1.2. Les particules biodégradables	- 24 -
1.3. Les mécanismes de l'adjuvant	- 26 -
1.3.1. Exemple des particules d'aluminium	- 26 -
1.3.2. Exemple des particules de polyacide lactique (PLA) ou de polyacide lactique co-glycolique (PLGA).....	- 27 -
1.4. Les particules issues de polymères d'origine naturelle.....	- 28 -
1.4.1. Les particules biodégradables à base de PLA ou de PLGA	- 28 -
1.4.2. Applications du PLA	- 28 -
1.4.3. Les particules biodégradables à base de chitosane.....	- 29 -
1.4.4. Applications du chitosane	- 30 -
1.4.5. Les dérivés du chitosane.....	- 32 -
1.4.6. Influence du degré d'acétylation (DA)	- 32 -
2. TLR (Toll Like Récepteurs) ligands et vaccination	- 34 -
2.1. Les Toll Like Récepteurs	- 34 -
2.2. Structure des TLR	- 36 -
2.3. Les TLR ligands	- 37 -
2.3.1. Le TLR 3 et ses ligands	- 37 -
2.3.2. Les TLR 7 et 8 et leurs ligands	- 38 -
2.4. Distribution cellulaire et localisation intracellulaire des TLR	- 38 -
2.5. Les cellules dendritiques (DC)	- 39 -
2.5.1. Mode d'action des cellules dendritiques	- 40 -
2.5.2. Les cellules de Langerhans et autres types de cellules dendritiques	- 42 -
2.5.3. Nanoparticules, TLR et cellules dendritiques	- 44 -
3. Nanoparticules et VIH	- 46 -
3.1. VIH : une maladie des muqueuses.....	- 47 -
3.1.1. Structure du VIH.....	- 47 -
3.1.2. Transmission du VIH	- 48 -
3.1.3. Les muqueuses : cibles principales du VIH.....	- 49 -
3.2. Nanoparticules et thérapie du VIH1.....	- 52 -
3.2.1. Les thérapies HIV.....	- 53 -
3.2.2. Les nanoparticules pour améliorer la thérapie anti HIV	- 53 -
3.3. Nanoparticules et vaccination anti HIV	- 54 -
3.3.1. Problématique d'un vaccin HIV.....	- 54 -
3.3.2. Nanoparticules, vaccin HIV et travaux antérieurs au laboratoire.....	- 55 -
Projet de thèse	- 59 -
Matériels et méthodes	- 63 -
4. Élaboration des nanoparticules	- 65 -
4.1. Le poly(acide lactique)	- 65 -
4.1.1. Synthèse des particules de PLA par nanoprécipitation	- 65 -
4.2. Le chitosane	- 66 -
4.2.1. Purification du chitosane	- 66 -
4.2.2. Modification de la masse molaire du chitosane.....	- 67 -

4.2.3.	<i>Modification du degré d'acétylation du chitosane</i>	- 67 -
4.2.4.	<i>Préparation de particules colloïdales à base de polymères</i>	- 67 -
4.3.	Synthèse de particules fluorescentes	- 68 -
4.3.1.	<i>Particules de PLA fluorescentes</i>	- 68 -
4.3.2.	<i>Particules de chitosane fluorescentes</i>	- 68 -
4.4.	Caractérisation des lots de particules	- 69 -
4.4.1.	<i>Mesure du taux de solide des solutions de particules</i>	- 69 -
4.4.2.	<i>Mesure de taille des particules</i>	- 70 -
4.4.3.	<i>Mesure de charge des particules</i>	- 70 -
4.4.4.	<i>Estimation de la concentration en particules</i>	- 70 -
4.4.5.	<i>Quantification des solvants résiduels par RMN</i>	- 71 -
5.	Élaboration des immuno-complexes particulaires	- 72 -
5.1.	La protéine p24	- 72 -
5.1.1.	<i>Adsorption de la protéine p24 sur les particules de PLA</i>	- 72 -
5.1.2.	<i>Adsorption de la protéine p24 sur les particules de CSD</i>	- 72 -
5.2.	La protéine gp140	- 73 -
5.2.1.	<i>Adsorption de la protéine gp140 sur les particules de PLA</i>	- 73 -
5.2.2.	<i>Adsorption de la protéine gp140 sur les particules de CSD</i>	- 73 -
5.3.	Les TLR ligands	- 73 -
5.3.1.	<i>Adsorption du poly (I :C) sur les particules de PLA</i>	- 73 -
5.3.2.	<i>Adsorption du poly (I:C) sur les particules de CSD</i>	- 74 -
5.3.3.	<i>Adsorption du poly U sur les particules de PLA</i>	- 74 -
5.3.4.	<i>Adsorption du poly U sur les particules de CSD</i>	- 75 -
6.	Évaluation des complexes sur des modèles cellulaires - préparation des cellules à l'origine des cellules dendritiques	- 76 -
6.1.	Les cellules dendritiques dérivées de monocytes	- 76 -
6.1.1.	<i>Préparation des cellules à l'origine des cellules dendritiques (Lavenzechia, 1999)</i>	- 76 -
6.1.2.	<i>Différenciation des monocytes en DC immatures</i>	- 77 -
6.1.3.	<i>Phénotypage des cellules</i>	- 77 -
6.1.4.	<i>Traitement des DC par les particules</i>	- 78 -
6.2.	Les cellules de Langerhans dérivées de cellules CD34+	- 79 -
6.2.1.	<i>Préparation des cellules à l'origine des cellules Langerhans</i>	- 79 -
6.2.2.	<i>Mise en culture des cellules</i>	- 80 -
6.2.3.	<i>Congélation/décongélation des cellules stock</i>	- 81 -
6.3.	Microscopie confocale	- 82 -
6.3.1.	<i>Analyse par microscopie</i>	- 82 -
6.4.	Cytométrie en flux	- 83 -
7.	Évaluation des complexes in vivo	- 84 -
7.1.	Animaux	- 84 -
7.2.	Voies d'immunisation	- 84 -
7.3.	Les solutions d'immunisation	- 84 -
7.3.1.	<i>La protéine p24</i>	- 85 -
7.3.2.	<i>Le poly (I:C)</i>	- 85 -
7.3.3.	<i>Les particules de PLA</i>	- 85 -
7.3.4.	<i>Les particules de CSD</i>	- 85 -
7.4.	Dosage ELISA des anticorps anti-p24	- 86 -
7.5.	Évaluation par la technique ELISPOT du nombre de cellules produisant l'IFNγ et l'IL4	- 86 -
		86 -
	Résultats et discussion	- 89 -
8.	Élaboration de colloïdes multifonctionnels	- 91 -

8.1. Nanoparticules de PLA et interactions avec des molécules d'activité biologique	- 91 -
8.1.1. Synthèse des nanoparticules.....	- 91 -
8.1.2. Caractérisation des nanoparticules	- 91 -
8.1.3. Adsorption de protéines du HIV-1.....	- 92 -
8.1.4. Caractérisation des vecteurs protéiques	- 94 -
8.1.5. Adsorption de TLR ligands	- 95 -
8.2. Nanoparticules de CSD et interactions avec des molécules d'activité biologique	- 99 -
8.2.1. Synthèse des nanoparticules.....	- 99 -
8.2.2. Caractérisation des nanoparticules	- 100 -
8.2.3. Avancées sur la synthèse des CSD et leurs nouvelles caractéristiques..	- 104 -
8.2.4. Adsorption des protéines du HIV-1.....	- 106 -
8.2.5. Caractérisation des vecteurs protéiques	- 108 -
8.2.6. Adsorption de TLR ligands	- 109 -
9. Évaluation in vitro des formulations	- 113 -
9.1. Production de nanoparticules fluorescentes.....	- 113 -
9.1.1. Production de nanoparticules de PLA fluorescentes	- 113 -
9.1.2. Production de CSD fluorescentes.....	- 114 -
9.2. Toxicité des formulations	- 118 -
9.3. Internalisation des nanoparticules par les cellules dendritiques.....	- 120 -
9.4. Maturation et activation des cellules dendritiques par les formulations.....	- 121 -
9.4.1. Comportement des cellules dendritiques en présence de nanoparticules nues	- 121 -
9.4.2. Comportement des cellules dendritiques en présence de nanoparticules	- 122 -
formulées avec la p24	- 122 -
9.4.3. Comportement des cellules dendritiques en présence de différentes	- 124 -
formulations.....	- 124 -
9.4.4. Effet dose des formulations sur les cellules dendritiques.....	- 126 -
9.4.5. Effet dose des formulations sur les cellules de Langerhans.....	- 127 -
10. Propriétés immunologiques des formulations in vivo	- 130 -
10.1. Comparaison chez le modèle souris de la p24 formulée sur les PLA et CSD	- 130 -
10.1.1. Induction d'anticorps.....	- 130 -
10.1.2. Induction de cytokines.....	- 132 -
10.2. Influence du poly (I:C) sur la réponse immunitaire chez la souris.....	- 133 -
10.2.1. Induction d'une réponse muqueuse localisée.....	- 134 -
10.2.2. Induction d'une réponse humorale systémique	- 135 -
10.2.3. Induction de cytokines.....	- 135 -
Discussion et perspectives	- 137 -
Conclusion.....	- 145 -
Références bibliographiques	- 149 -
Publications	- 163 -

Liste des abréviations

ADN	A cide d ésoxyribonucléique
Ag	A ntigène
ARN	A cide ribonucléique
AZT	A zidothymidine
BSA	B ovine s erum a lbumin
CMH	C omplexe m ajeur d' h istocompatibilité
CPAG	C ellule p résentatrice d' a ntigène
CpG	C ytosine p olyguanine
CRF	C irculating r ecombinant f orms
CSD	C hitosane/ s ulfate de d extrane nanoparticules
CTL	L ymphocyte T c ytotoxique
DA	D egré d' a cétylation
DC	C ellules d endritiques
DL ₅₀	D ose l étale 50
ELISA	E nzyme-linked immunosorbent a ssay
ELISPOT	E nzyme-linked immunosorbent s pot assay
FDA	F ood and D rug A dministration
GM-CSF	G ranulocyte m acrophage colony s timulating f actor
GRID	G ay related immune d isorder
HTLV	H uman T -cell L ymphotropic V irus
IFN	I nterféron
Ip	I ndice de p olydispersité
LAV	L ymphadenopathy a ssociated v irus
LPS	L ipopolysaccharide
LRR	L euicin-rich repeats
Mw	M asse molaire
NALP3	N od-like récepteur
NRTI	N ucleoside reverse transcriptase inhibitor
PAMP	P athogen a ssociated m olecular p attern
pIC/poly (I:C)	P olyinosinic polycytidylic acid
PKR	P rotéine k inase R
PLA	P olyacide lactique
PLGA	P olyacide lactique co- g lycolique
PRD	P attern r ecognition d omain

pU/poly U	Polyuridylique acid
SC	Sous cutanée
SH	Sérum humain
SIDA	Syndrôme de l'immunodéficience acquise
TGF	Transforming growth factor
TIR	Toll / Il-1 receptor
TLR	Toll-like récepteur
TMC	Triméthyl chitosane
TNF	Tumor necrosing factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Introduction

La vaccination est un procédé visant à introduire un agent extérieur (le vaccin) dans un organisme afin d'induire une réaction immunitaire protectrice. Le terme de vaccination, apparu vers 1880, est utilisé, pour la première fois par Pasteur sur la base des travaux de l'anglais Jenner qui avait immunisé des patients contre la "variole de la vache", et donc de la variole commune.

Il existe actuellement deux types de vaccination : la vaccination préventive, visant à stimuler les défenses immunitaires de façon à prévenir l'apparition d'une maladie, et la vaccination thérapeutique. Aussi appelée immunothérapie active, cette technique consiste à stimuler le système immunitaire de l'organisme pour favoriser la production d'anticorps et l'immunité cellulaire.. La vaccination thérapeutique n'est pas faite pour prévenir l'apparition d'une maladie mais pour aider l'organisme humain déjà infecté à lutter en stimulant les défenses immunitaires. C'est le cas typiquement de la rage (dont la vaccination peut également être préventive).

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) qui a été isolé il y a 25 ans est reconnu comme le pathogène responsable du Syndrôme de l'Immunodéficience Acquise (SIDA). Depuis, l'épidémie s'est répandue dans toutes les régions du globe et environ 33 millions de personnes sont porteuses de ce virus. A ce jour, les seules armes disponibles pour lutter contre l'épidémie sont la prévention et des traitements anti-rétroviraux qui ne peuvent que ralentir la progression du virus pendant quelques années sans pour autant l'éliminer. La mise au point d'un vaccin contre le VIH a été lancée il y a plus de 20 ans mais les approches classiques utilisées pour les autres maladies virales se sont rapidement révélées non utilisables dans le cas du VIH. Récemment, des adjuvants particuliers à base de polymères biocompatibles et biodégradables ont été développés. Ces particules vectorisent les antigènes adsorbés en surface ou incorporés dans la matrice cellulaire. Ces nouveaux adjuvants sont prometteurs pour induire une réponse immune à médiation humorale ou cellulaire dans de nombreux contextes infectieux et c'est dans cette direction que s'inscrit ce travail de thèse.

Bibliographie

1. Vecteurs nanoparticulaires biodégradables et vaccination

La vaccination reste un outil indispensable dans la protection et l'éradication des maladies (Perrie, 2008). Depuis les précurseurs que sont Jenner et Pasteur, de nombreux modèles de vaccins à base d'agents viraux vivants atténués ou inactivés ont prouvé leur efficacité. Cependant la balance bénéfiques/risques fait pencher la recherche du côté de vaccins à base de sous-unités de ces agents infectieux, comme les protéines, qui offrent une alternative plus sûre. Leur efficacité étant néanmoins plus faible, la nécessité d'utiliser des adjuvants s'est faite ressentir.

Un adjuvant est une substance administrée en combinaison avec un antigène et qui induit une réponse immune plus importante que lorsque l'antigène est utilisé seul (Ramon, 1926). Les adjuvants sont des composés de structure hétérogène qui sont classés selon leur nature chimique, leur origine ou leurs propriétés physicochimiques. Cependant, des composés proches présentent fréquemment des propriétés immunologiques différentes (Marciani, 2003). Les seuls actuellement autorisés pour l'homme sont les sels d'aluminium (États-Unis et Europe) et le MF59 (Europe). La structure requise d'un adjuvant, ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont responsables de leur activité *in vivo*, ne sont que très peu connus (Schinjs, 2001).

Bien que leur grande hétérogénéité les rende difficiles à catégoriser, il est cependant possible de les séparer en deux familles : d'une part les adjuvants de type particulaire, tels que les sels minéraux, les liposomes ou les particules synthétiques ; d'autre part les adjuvants non particuliers qui sont souvent des stimulants et des modulateurs de la réponse immune, tels que les ligands des récepteurs Toll (Wischke, 2009). Nous nous intéresserons plus particulièrement dans cette première partie à des modèles d'adjuvants particuliers, avant de consacrer plus spécifiquement la deuxième partie aux récepteurs Toll.

1.1. Les composés à base d'aluminium

Les capacités adjuvantes des composés à base d'aluminium ont clairement été établies en 1930, plus particulièrement pour le tétanos et la diphtérie (Aguado, 1999). Leur utilisation est alors devenue courante. L'avantage d'utiliser ces adjuvants à base d'aluminium est le rapide développement d'une réponse anticorps élevée et durable après l'infection primaire (Gupta, 1998). Même si de nombreuses recherches sont ouvertes vers des adjuvants alternatifs, les adjuvants à base d'aluminium seront encore utilisés grâce à leurs qualités multiples. Ils présentent en effet une faible toxicité aux

concentrations efficaces, des capacités adjuvantes pour de nombreux antigènes et un faible coût. Pour les infections qui peuvent être prévenues par induction d'anticorps sériques, les composés à base d'aluminium formulés dans les conditions optimales sont des adjuvants de choix. L'adsorption des antigènes sur ces composés dépend des interactions électrostatiques entre l'antigène et l'adjuvant. Or, l'hydroxyde d'aluminium possède une structure cristalline et permet l'adsorption de protéines chargées négativement à pH neutre. Au contraire, le phosphate d'aluminium et les précipités d'alum présentent des structures amorphes chargées négativement, ou neutres à pH 7. Leur nature amorphe contribue à leur large surface externe ainsi qu'à leur grande capacité d'adsorption des protéines, principalement pour les protéines chargées positivement (Gupta, 1998). Le mécanisme d'adjuvantation des composés à base d'aluminium inclut plusieurs effets simultanés : le mécanisme physique de formation d'un dépôt, des phénomènes liés à la nature physicochimique des adjuvants, leur nature particulière et leur taille optimale (< 10 µm). Ils sont aussi capables de présenter efficacement des antigènes aux cellules présentatrices, de stimuler des cellules immunitaires d'un organisme à travers une activation du complément et des macrophages, et d'induire des éosinophiles (Gupta, 1998).

1.2. Les particules biodégradables

Les particules biodégradables ont un important potentiel d'application en tant que vecteurs de molécules à activité biologique. Ces molécules peuvent être des principes actifs médicamenteux ou des protéines et acides nucléiques pour des applications à but vaccinal. Il a été démontré que des antigènes encapsulés par des microparticules, produites à partir de polymères biodégradables, présentent un bon potentiel pour les systèmes de relargage et pour l'adjuvantation. Ces microparticules permettent un relargage contrôlé de l'antigène ayant pour effet de réduire le nombre de doses d'immunisation ou de développer des vaccins unidoses (Moldoveanu, 1989).

Cependant, les capacités de ces microparticules sont limitées par des problèmes de dégradation et de dénaturation de l'antigène après encapsulation et relargage.

L'activité adjuvante de ces particules a récemment été décrite comme induisant un inflammasome et complétant l'activité des ligands des Toll-like récepteurs (Rice Ficht, 2010). Il apparaît aussi, suite à l'étude effectuée par Xiang et *al.* sur un panel de différentes particules, que leur taille et leur nature influe sur la façon dont l'antigène présenté va être pris en charge et donc sur le type de réponse qui en résulte (Xiang, 2006) (*tableau 1*).

Nature de la particule	Taille	Surface	Immunogénicité	Références
hPGA (L-phenylalanine ethylester) poly(gamma-glutamic acid)	150-200 nm	amphiphile	Humorale et cellulaire	Akagi, 2007 Okamoto, 2007 Uto, 2007
Acid-labile polyacrylamide hydrogel	200-500 nm	hydrophile	Lymphocytes T cytotoxiques	Beaudette, 2009
Acid-labile polyacrylamide hydrogel	35 nm-3,5 µm	hydrophile	Lymphocytes T cytotoxiques	Cohen, 2009
Chitosane recouvert d'alginate	300-600 nm	hydrophile	Anticorps spécifiques Th1	Borges, 2008
Polystyrene	40-49 nm	hydrophile	T CD8, IgG1	Mottram, 2007
Poystyrene	93-123 nm	hydrophile	T CD4, IgG1 et II 4	Mottram, 2007
PLGA poly(L-lactique acide co glycolique)	3,4-4,3 µm	hydrophile	CMH 2, presentation étendue de l'épitope	Lu, 2007
PLA poly(L-lactide)	1 µm	hydrophile	CMH 2, presentation prolongée de l'antigène	Westwood, 2005
Dextrane acétylé	115-270 nm	hydrophile	CMH1, CMH 2	Broaders, 2009

Tableau 1 : La composition chimique et la taille des particules sont liées au type de réponse immunitaire engendré

Si l'on considère les différentes voies d'administration possibles d'un vaccin, les vecteurs particuliers prennent une importance accrue. Un des arguments clef de l'utilisation des particules pour la vaccination est l'observation d'une tolérance lorsque l'antigène libre est présenté aux tissus lymphoïdes des muqueuses (Fujihashi, 2001). La présentation de l'antigène par des complexes nanoparticulaires va favoriser sa prise en charge et sa reconnaissance par le système immunitaire selon la cible visée et la voie d'injection les tailles de prédilection vont varier (*figure 1*).

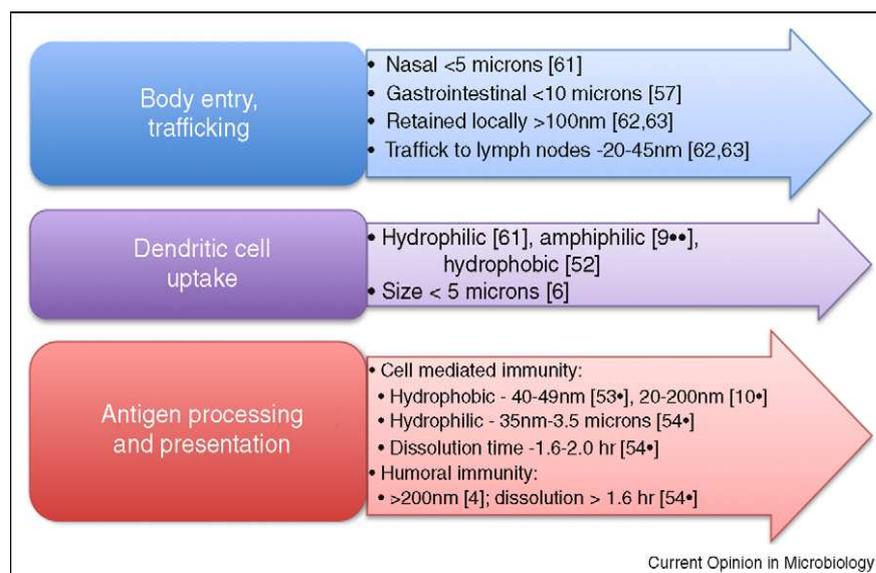


Figure 1: Destination et activité des particules de polymère *in vivo* (Rice-Ficht A., 2010).

La multiplication des tailles et des propriétés chimiques des particules permet de cibler les voies d'immunisation d'intérêt selon le but recherché.

1.3. Les mécanismes de l'adjuvant

Même si les mécanismes d'action des adjuvants restent peu connus, on peut décrire différents processus dans le cas des adjuvants particulaires :

- effet dépôt de l'antigène qui est progressivement relargué ;
- induction d'une inflammation permettant le recrutement des cellules présentatrices d'antigène (CPAG) ;
- induction de phagocytose de l'antigène qui, lié à l'adjuvant, n'est plus soluble mais sous forme particulaire.

1.3.1. Exemple des particules d'aluminium

L'aluminium, présent dans les vaccins sous forme de précipité, est utilisé depuis environ 80 ans pour renforcer les réponses vaccinales, sans que son mécanisme d'action soit connu. Initialement on pensait que les antigènes vaccinaux venaient s'adsorber sur les particules d'alumine d'où ils étaient libérés progressivement. En fait ces particules sont phagocytées par des macrophages avec augmentation de la production d'Il-1bêta et d'Il-18. Mais on ignorait le mécanisme responsable de cette production de cytokines. Eisenbarth et *al.* montrent que le NALP3 inflammasome, est stimulé par la présence de particules d'aluminium (Eisenbarth, 2008).

L'inflammasome est un complexe de protéines intracellulaires composé de NALP3, qui est activé par les cristaux, et d'une protéine d'association, appelée ASC, qui active la transformation des enzymes procaspase en caspase. La caspase-1 ou enzyme de conversion de l'interleukine-1 clive la pro-interleukine-1bêta en interleukine-1bêta qui est une cytokine pro-inflammatoire.

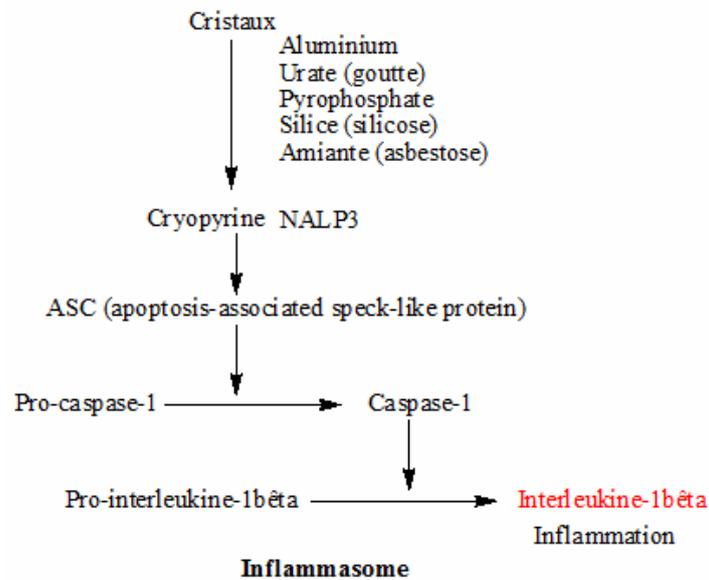


Figure 2: Mécanismes d'action de l'alum

1.3.2. Exemple des particules de polyacide lactique (PLA) ou de polyacide lactique co-glycolique (PLGA)

Une propriété propre aux particules synthétiques est le relargage progressif de l'antigène incorporé ou adsorbé aux nanoparticules. La délivrance en continu de l'antigène due à la dégradation des particules permet d'envisager de diminuer le nombre d'administrations pour la vaccination. Ce phénomène a été observé par Faisal et *al.* avec des particules de PLGA contenant la protéine antigène LigVar destinée à déclencher une protection contre la leptospirose dans un modèle animal (Faisal, 2009).

Suivant le polymère qui compose les particules synthétiques, celles-ci peuvent être neutres immunologiquement ou bien orienter la réponse immune vers un profil Th1 ou Th2. Ataman-Onal *et al.* montrent ainsi que des nanoparticules de PLA recouvertes de p24 suscitent de fortes réponses CTL et la production de cytokines (IFN γ , IL-2) orientées pour une réponse de type Th1 chez la souris (Ataman-Onal, 2006). La protéine p24 semble générer une réponse plus orientée Th1 lorsqu'elle est administrée à la surface de PLA qu'avec l'adjuvant de Freund. De plus, la capacité des particules des PLA-p24 à induire une réponse immune de type Th1 a aussi été confirmée dans le modèle macaque. Ce système de délivrance de protéines confirme le potentiel des nanoparticules chargées dans le domaine du développement des vaccins.

1.4. Les particules issues de polymères d'origine naturelle

1.4.1. Les particules biodégradables à base de PLA ou de PLGA

Le PLA est un biopolymère biodégradable et biorésorbable qui se dégrade par un mécanisme d'hydrolyse des chaînes macromoléculaires avec élimination des produits formés par métabolisation. Le PLA est un poly(alpha-hydroxy) acide obtenu en polymérisant par ouverture de cycle des monomères cycliques dérivés des acides lactiques et glycolique.

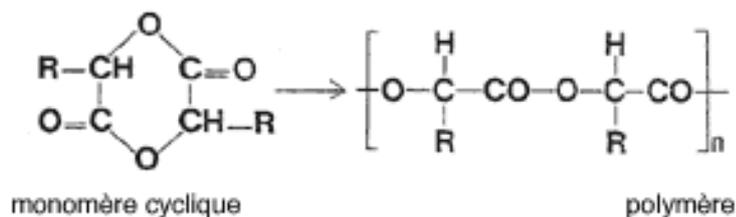


Figure 3 : Unité de répétition du PLA

Les unités de répétition (glycolique, L- ou DL-lactiques) peuvent être utilisées séparément ou en combinaison afin d'obtenir des polymères aux propriétés très différentes selon leur composition, leur structure et leur morphologie. Le polymère utilisé pour cette étude est un poly(acide lactique) racémique PLA50 fourni par la société Phusis (France).

1.4.2. Applications du PLA

a) Propriétés biologiques du PLA

Le PLA a une application bien connue en médecine et plus particulièrement en chirurgie car il permet de faire des fils de suture ainsi que des implants biorésorbables dont la fonction est temporaire: une fois la consolidation obtenue, la résorption complète restitue l'intégrité du site opéré tout en évitant une seconde intervention chirurgicale souvent nécessaire pour retirer le dispositif. Les principales applications de ces implants biorésorbables concernent les ligamentoplasties, l'ostéosynthèse et la chirurgie de la colonne vertébrale.



Figure 4 : Implants chirurgicaux en PLA

Le PLA sous forme de nanoparticules est un des composés les plus utilisés pour le développement de systèmes de relargage progressif d'un antigène ou d'un médicament incorporé dans le cœur des particules ou adsorbé en surface. La

délivrance en continu ou par saccades du produit, due à la dégradation des particules, permet d'envisager de diminuer le nombre d'administrations pour la vaccination au profit d'une administration unique. Il est également étudié pour le développement de vaccins nanoparticulaires pour ses capacités adjuvantes (Ataman-Onal, 2006).

b) Propriétés de biocompatibilité du PLA

○ Biodégradabilité

La biodégradabilité du PLA a été démontrée lors de la mise au point des implants chirurgicaux biorésorbables. Une étude a été menée sur des brebis auxquelles ont été implantées des vis en PLA, l'objet de l'étude étant de suivre chez les animaux la cinétique de résorption d'une vis d'interférence biorésorbable. Les animaux ont été sacrifiés à 3 mois, 6 mois, 1 an, 2 ans, 3 ans et 5 ans. Une histologie qualitative, une analyse histomorphométrique et un marquage fluorescent ont été effectués. Les premiers signes de résorption apparaissent à 1 an. Les vis sont entièrement fragmentées à 2 ans. La résorption complète des fragments est observée à 3 ans. À 5 ans, on observe la substitution de la vis résorbable par de l'os spongieux dans les vestiges histopathologiques témoignant de la présence directe ou indirecte de produits de dégradation (Phusis).

○ Toxicité, cytocompatibilité

De nombreuses études de toxicité ont été effectuées sur le PLA et les nanoparticules de PLA. Par exemple, Bhaskar et *al.* montrent que des formulations de PLA et de PLGA de différentes caractéristiques (taille, indice de polydispersité (Ip) et zéta) et à différentes concentrations n'ont pas d'effet sur la viabilité cellulaire. Ils n'ont pas non plus observé de différences significatives de toxicités entre les différents types de particules utilisés. Il semble cependant qu'il y ait une légère diminution de la viabilité cellulaire pour les concentrations en particules plus importantes (Bhaskar, 2010). Grâce à ses caractéristiques, le PLA a pu être approuvé par la Food and Drug Administration (FDA, USA).

1.4.3. Les particules biodégradables à base de chitosane

Le chitosane est un biopolymère biodégradable, dérivé désacétylé de la chitine, qui est un des mucopolysaccharides naturels les plus abondants constituant notamment l'exosquelette des insectes et crustacés. Le chitosane (*figure 4*) est constitué d'unités de glucosamine 2-amino-2-désoxy- β -D-glucose (B) et d'unités N-acétyl-D-glucosamine (A), et possède un pKa apparent de 6,5. Il s'agrège dans des solutions ayant un pH au-delà de 6.

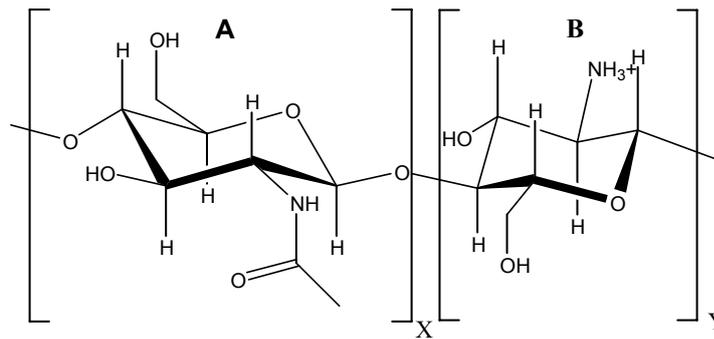


Figure 4: Unité de répétition du chitosane

Il est donc uniquement soluble dans des solutions acides (pH 1-6) dans lesquelles la plupart des groupements amines sont protonés. Le chitosane peut être caractérisé par sa masse molaire mais aussi par son degré d'acétylation, ou DA, qui correspond au pourcentage de fonctions N-acétyl.

1.4.4. Applications du chitosane

a) Propriétés biologiques du chitosane

Les premières applications biologiques du chitosane ont donc été faites dans des domaines où il avait un intérêt évident, comme la pharmacologie, la cosmétologie et surtout la médecine. En effet, ce polymère ne présente aucun comportement antigénique mais possède un caractère antithrombogénique et hémostatique ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables (Bacon, 2000). Le chitosane présente également des capacités inhibitrices sur la croissance de nombreux parasites et bactéries. Il a, de plus, des propriétés immunologiques, antitumorales, antibactériennes et antifongiques (Kornprobst, 2005).

L'utilisation de vecteurs colloïdaux fabriqués à partir de polysaccharides hydrophiles, dont le chitosane, s'est imposée comme une alternative prometteuse pour améliorer le transport de macromolécules à travers les membranes biologiques (Janes, 2001). Le développement de vecteurs appropriés pour délivrer de nouvelles macromolécules en provenance de l'industrie des biotechnologies est un domaine en pleine expansion. Dans le cadre de ces applications, le chitosane est devenu un polymère intéressant pour l'association et la diffusion de composants labiles macromoléculaires (Hejazi, 2003).

Ce polymère, non toxique, est facilement biodégradable. Les systèmes polymères de diffusion contrôlée à partir de chitosane sont maintenant utilisés dans une grande variété de médicaments (Dastan, 2004).

b) Propriétés de biocompatibilité du chitosane (Ueno H. et coll., 2001)

○ Biodégradabilité

La biodégradation et la biorésorption sont assurées par des enzymes hydrolysant le chitosane en oligomères. Cependant, le ou les mécanismes d'action ne sont pas encore clairement définis.

Chez l'homme et les mammifères, ce rôle est assumé principalement par des lysozymes (Varum, 1997) qui dégradent les liaisons $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidiques des unités N-acétyl glucosamine en des résidus N-acétylglucosamine et D-glucosamine, métabolisés ensuite dans l'organisme. Un chitosane de DA 50% est ainsi facilement dégradé *in vivo* dans le sang et les tissus, sans accumulation dans le corps (Onishi, 1999).

La dégradation dépend de l'origine et des caractéristiques du polysaccharide (DA, masse molaire...) (Ratajska, 1998). L'influence de la structure cristalline, de l'agrégation des N-acétylglucosamines et de leur distribution a été mise en évidence (Shigemasa, 1994). Une étude plus approfondie a montré d'abord une augmentation de la susceptibilité enzymatique pour les DA supérieurs à 50%, puis une diminution avec le DA, et finalement une absence de dégradation pour un chitosane de DA3 (Kurita, 2000). Cette influence du DA est également constatée, *in vitro* (dégradation par des lysozymes) et *in vivo* (implantation sous cutanée) (Tomihata, 1997). Un chitosane de DA 50% semble donc permettre une dégradation optimale.

○ Toxicité, cytocompatibilité

L'innocuité du chitosane a été démontrée chez la souris, le rat et l'homme pour des applications diététiques et cosmétiques. Dans le cas d'administration orale, la dose létale DL_{50} dépasse les 16 g/kg/jour chez la souris, soit une dose supérieure à celle du saccharose (12 g/kg/jour). L'administration sous-cutanée de chitosane conduit à une valeur de DL_{50} supérieure à 10 g/kg/jour chez la souris. La DL_{50} d'applications intrapéritonéales de chitosane est de 5,2 g/kg/jour pour la souris et de 3 g/kg/jour chez le rat. Globalement, pour des doses administrées adéquates, la non-toxicité du chitosane est admise (Rao, 1997).

La cytocompatibilité du chitosane vis-à-vis des fibroblastes, des kératinocytes, des chondrocytes et des ostéoblastes a été démontrée *in vitro*. Des travaux montrent que, quel que soit le DA (2-50%), la mise au contact prolongée de films de chitosane avec les deux premiers types de cellules n'induit ni la destruction, ni la croissance anarchique de celles-ci, et aucune substance cytotoxique n'est relarguée dans le milieu (Chatelet, 2001). Le même comportement est constaté dans le cas de cultures de chondrocytes et de kératinocytes sur un film de chitosane de DA 2,5% (Denuzière,

1998) et de culture de chondrocytes et d'ostéoblastes sur une surface similaire de DA 10% (Lahiti, 2000). Lors de cultures cellulaires sur un film de chitosane, la croissance des cellules dépend des caractéristiques et de la source du chitosane (Cid, 2000; Ramos, 2000).

1.4.5. Les dérivés du chitosane

Le chitosane a fait l'objet de nombreuses études notamment pour des applications pharmaceutiques, mais son efficacité est réduite de part sa faible solubilité. Kotze *et al.* ont de ce fait émis l'hypothèse qu'un polymère tel que le chitosane non modifié, avec un groupe amine primaire, ne peut pas être optimal dans l'ouverture des jonctions serrées, mais que des dérivés avec des substituants différents et différentes densités de charge auront le même effet voire une efficacité accrue face à ces jonctions serrées (Kotze, 1999).

Exemple du triméthyl chitosane (TMC)

Le chlorure de N-triméthyl chitosane est un dérivé du chitosane partiellement quaternarisé possédant une solubilité aqueuse fortement augmentée, particulièrement aux pH neutre et alcalins. Le chlorure de N-triméthyl chitosane a démontré précédemment un pouvoir potentiel de promoteur d'absorption et, comme le chitosane, il est capable d'ouvrir les liaisons étroites des cellules épithéliales pour permettre le transport paracellulaire des composés hydrophiles de grandes dimensions. La densité de charge du chlorure de N-triméthyl chitosane, déterminée par le degré de quaternarisation, est un facteur important qui influence les propriétés de promoteur d'adsorption de ce polymère (Hamman, 2000).

Ce dérivé du chitosane montre des résultats prometteurs, notamment pour la vectorisation de l'ADN. Le TMC et les autres dérivés peuvent être utilisés de la même manière que le chitosane mais avec des avantages, notamment au niveau de la solubilité. On constate aussi une diminution de la cytotoxicité (Mourya, 2009). Les résultats ont montré que le chlorure de N-triméthyl chitosane représente un nouveau promoteur d'absorption et qu'il peut contribuer au développement d'un système sûr et efficace pour l'administration non parentérale de produits tels que les peptides et les protéines (Hamman, 2000).

1.4.6. Influence du degré d'acétylation (DA)

Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine. Ces polysaccharides sont des copolymères constitués de β (1-4) N-acétyl-D-glucosamine et de D-glucosamine. Le degré d'acétylation représente la proportion d'unités N-acétyl-D-glucosamine par rapport à l'ensemble des unités présentes. Le DA est un paramètre

structural qui influence les propriétés physicochimiques ainsi que les propriétés biologiques comme la biodégradabilité (Varum, 1997). Chatelet *et al.* ont mené une étude sur les propriétés biologiques de films de chitosane de DA allant de 2,5 à 47 sur des cultures de fibroblastes et de kératinocytes. Il en ressort que le DA n'influence pas la cytocompatibilité du polymère mais que les capacités d'adhésions cellulaires sont augmentées par un DA faible (Chatelet, 2001). Une expérience menée sur des particules de chitosane de DA 15 ou 25 comme vecteur d'ADN montre que les particules constituées du DA plus élevé induisent un niveau de transfection plus important : il semblerait que les relargages de l'ADN soient plus rapides sur ce type de particules malgré de faibles différences constatées d'un point de vue physicochimique (Centelles, 2010).

Il est prouvé que les PLA sont des vecteurs protéiques d'intérêt avec des capacités adjuvantes importantes chez l'animal. Ces particules sont assez simples d'utilisation mais sont homogènes au niveau de leurs caractéristiques physicochimiques, donc peu flexibles dans leur utilisation. Les études menées jusqu'ici sur les nanoparticules composées de chitosane sont moins avancées, mais la nature même du polymère permet d'obtenir différentes propriétés en faisant varier DA et Mw. De plus, la synthèse des particules par complexation de polyélectrolytes permet d'ajouter au chitosane les propriétés d'un autre polymère (sulfate de dextrane, alginate, acide hyaluronique...) ainsi que d'obtenir des particules de charges variables, ce qui est un atout pour l'adsorption d'antigènes de natures différentes. Il est intéressant de comparer ces deux candidats à une vaccination par des vecteurs nanoparticulaires car leurs propriétés se complètent : stabilité et reproductibilité pour les PLA, flexibilité pour les nanoparticules à base de chitosane. Ils pourraient donc se montrer complémentaires.

2. TLR (Toll Like Récepteurs) ligands et vaccination

2.1. Les Toll Like Récepteurs

Les récepteurs TLR (pour "Toll-like receptors") sont des récepteurs présents chez certains types cellulaires de l'homme et des mammifères, qui sont homologues au produit du gène de drosophile Toll. Ces récepteurs très conservés par l'évolution jouent un rôle important dans l'immunité innée, et notamment dans les défenses contre les microorganismes. Ils peuvent reconnaître des motifs moléculaires uniquement présents chez les microorganismes pathogènes dénommés PAMPs pour "pathogen-associated molecular pattern". Parmi ces PAMPs on trouve :

- des composants des parois bactériennes comme les lipopolysaccharides (LPS) et les peptidoglycanes ou la flagelline composant du flagelle de certaines bactéries ;
- de l'ADN bactérien ;
- de l'ARN viral double brin.

La stimulation des TLR par les PAMPs est à l'origine d'une cascade d'activation moléculaire intracellulaire. Cette cascade conduit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui est une plaque tournante intra-cellulaire responsable de la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-1 et IL-12) et directement effectrices comme le TNF alpha aboutissant à la régulation de la réponse immunitaire adaptative.

Les TLRs sont des protéines transmembranaires contenant dans leur domaine extracellulaire une région riche en leucines, et un segment intracytoplasmique avec une région conservée appelée Toll/IL-1 receptor (TIR) commune à ces récepteurs et aux récepteurs pour l'IL-1 et l'IL-18. Ces récepteurs sont surtout exprimés dans les tissus lymphoïdes comme la rate ou sur les cellules ayant une activité présentatrice d'antigène comme les cellules dendritiques, ou dans les organes au contact avec le milieu extérieur comme le poumon et le tractus intestinal. Les cellules dendritiques vont ainsi jouer le rôle d'intégration de ces différents signaux et moduler les co-signaux délivrés aux lymphocytes T en plus du message purement antigénique à l'origine d'une régulation de la réponse adaptative. On connaît à l'heure actuelle 11 TLRs différents dans l'espèce humaine, dont 7 ont leurs ligands identifiés (Underhill , 2002). Les gènes codant pour les TLRs sont positionnés à différents endroits du génome, mais certains sont regroupés (TLR 1, 6, 10 sur le chromosome 4, TLR 7 et 8 sur le chromosome X).

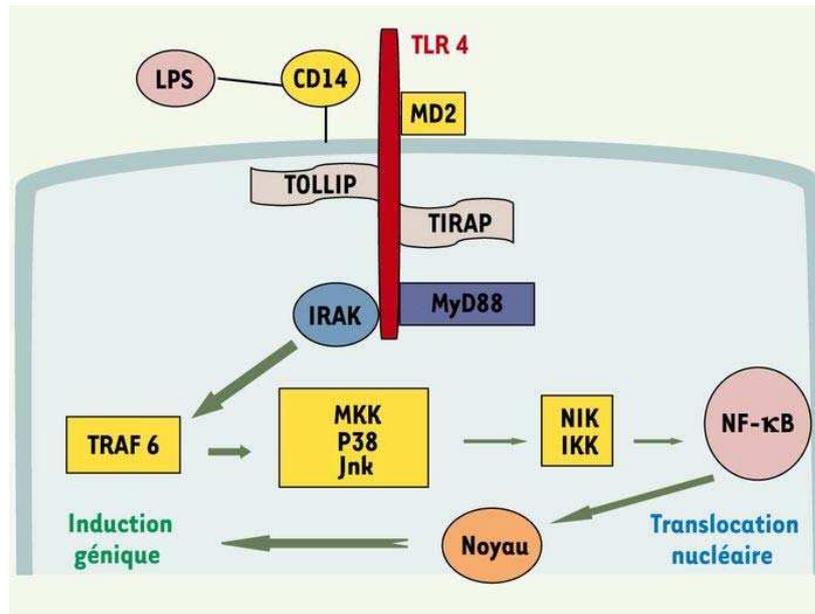


Figure 5 : Transduction du signal après fixation du ligand par le TLR4 :

voie NF-κB. LPS : lipopolysaccharide ; TOLLIP : Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein ; TIRAP : Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein ; MyD88 : myeloid differentiation factor 88 ; IRAK : IL-1R-associated kinase 1 ; MKK : MAPK (mitogen-activated protein kinase) kinase ; TRAF 6 : TNFα receptor-associated factor 6 ; JNK : c-Jun NH2-terminal kinase ; NIK : NF-κB inducing kinase ; IKK : inhibitor of κB kinase ; NF-κB : nuclear factor κB (Musette, 2006)

La densité antigénique des TLRs à la surface des cellules est faible : quelques milliers de molécules par cellule dans les monocytes, et quelques centaines dans les cellules dendritiques immatures. Bien souvent, l'expression intracytoplasmique est plus importante. Le répertoire des TLRs exprimés par les cellules mononucléées du sang circulant a fait l'objet de nombreuses études, montrant que le répertoire Toll est variable selon les cellules engagées dans la réponse immunitaire.

Ainsi, les TLR 1 et 6 sont exprimés dans tous les types cellulaires ; les TLR 2, 4 et 8, de leur côté, sont principalement présents dans les monocytes CD14⁺, tandis que les TLR 9 et 10 sont exprimés à un niveau élevé dans les cellules B CD19⁺. Le TLR 3 est, quant à lui, exprimé sélectivement par les cellules dendritiques. Le répertoire des TLRs diffère également au sein d'une même famille cellulaire : les monocytes expriment préférentiellement les TLR 1, 2, 4, 5 et 8, tandis que les cellules dendritiques immatures expriment sélectivement le TLR 3, et les cellules dendritiques plasmocytoïdes les TRL 7 et 9, à un niveau élevé. La variété et le niveau d'expression des TLRs varient en fonction de la maturation du monocyte vers la cellule dendritique : ainsi, l'expression du TLR 3 est accrue lors du passage du monocyte vers la cellule dendritique immature, tandis que celle du TLR 5 décroît.

2.2. Structure des TLR

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires. Ils sont composés d'un domaine N-terminal extracellulaire, récepteur du signal de danger, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine C-terminal intracellulaire qui permet la transduction du signal (*figure 6*).

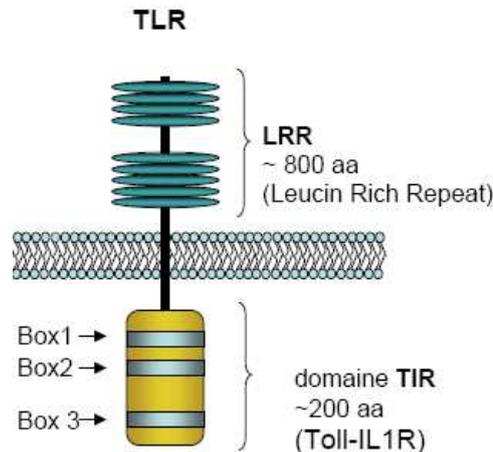


Figure 6 : Structure des TLRs (Akira, 2004)

Le domaine extracellulaire est composé de répétitions riches en leucines de 24 à 29 acides aminés, appelées Leucin-Rich Repeats ou LRR, séparées du domaine transmembranaire, du côté carboxy-terminal, par un motif riche en cystéines appelé motif C-flank. Ce domaine extracellulaire est impliqué dans la reconnaissance du signal de danger et joue un rôle clef dans l'initiation de signalisation des TLRs (Akira, 2003). La distribution et le nombre de motifs répétés riches en leucine, ainsi que l'organisation et le nombre d'insertions entre ces LRR est propre à chacun des TLRs, ce qui leur confère leur spécificité dans la reconnaissance des pathogènes (Bell, 2003 ; Choe, 2005). Le domaine intracellulaire est partagé par les membres de la famille du récepteur de l'Interleukine-1 (IL-1R) et également présent dans de nombreux gènes de résistance (R) des plantes ; il est appelé domaine TIR (Toll/IL-1R/R) (Imler, 2001).

Trois régions très conservées appelées boîte 1, boîte 2 et boîte 3 ont été caractérisées dans ce domaine TIR après alignement de séquences des 31 membres de la famille IL-1R/TLR (Luo, 2000). Ces régions sont impliquées dans la transduction du signal d'activation. Le domaine TIR comporte environ 150 à 200 acides aminés (Khan, 2004). Le nombre d'acides aminés conservés entre les boîtes est généralement de 20 à 30% et varie en fonction du récepteur (Akira, 2004). Ce motif TIR est fortement impliqué dans les mécanismes d'inflammation et de défense de

l'hôte, et toute modification de sa séquence en acides aminés est susceptible de modifier la réponse de l'hôte aux infections.

2.3. Les TLR ligands

De nombreux ligands infectieux des TLR (TLR 2, 3, 4, 5, 9) ont été mis en évidence. D'autres TLR ne semblent pas avoir de ligand spécifique : ainsi, les TLR 1, 6 et 10 seraient des corécepteurs, agissant en association avec les autres TLRs en modulant leur réponse.

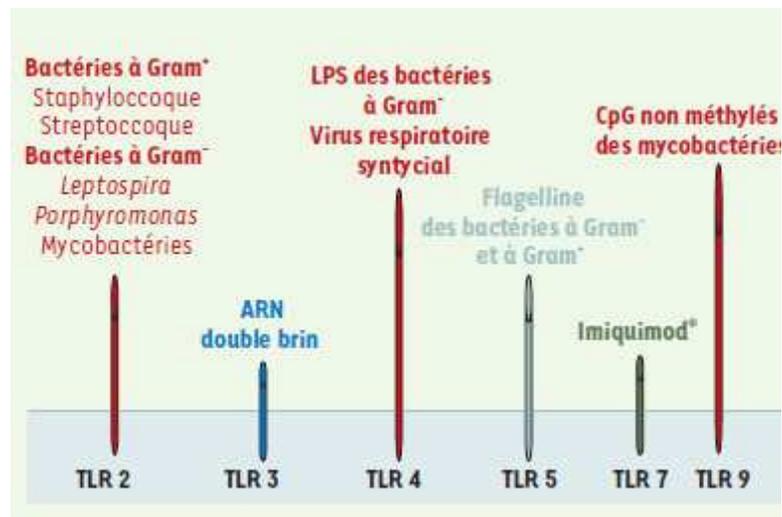


Figure 7 : Ligands infectieux des TLR.

Le TLR 2 est celui qui reconnaît le plus grand nombre de molécules associées aux pathogènes. Le TLR 3 a pour ligand l'ARN double brin, une structure moléculaire associée aux infections virales, produite par de nombreux virus durant leur étape de réplication. Quant au TLR 4, il a pour principal ligand le lipopolysaccharide des bactéries Gram -. Le TLR 5 a pour ligand la flagelline des bactéries gram + et -, une protéine pro-inflammatoire nécessaire à la propulsion bactérienne. Elle pourrait jouer un rôle dans la résistance aux infections à salmonelles. Le TLR 7 ne possède pas de ligand défini. Toutefois, un composant antiviral, l'imidazoquinoline (Imiquimod®), a récemment été proposé comme ligand de TLR 7. Enfin, le TLR 9 reconnaît des structures présentes dans l'ADN des mycobactéries, les CpG (Meyer, 2008).

2.3.1. Le TLR 3 et ses ligands

Le TLR 3 est impliqué dans la réponse à l'ARN double-brin (dsRNA) généré pendant le cycle de réplication des virus à ARN au cours d'une infection. Les dsRNA

peuvent se lier au TLR 3 et activer la protéine kinase PKR dont la signalisation en aval inhibe la réplication virale et favorise la production de cytokines pro-inflammatoires (Alexopoulou, 2001). Le poly (I:C), (ou Polyriboinosinic: Polyribocytidylic acid), un analogue synthétique de dsRNA, est souvent utilisé comme agent de maturation de TLR 3 (Alexopoulou, 2001 ; Cella, 1999). On a également rapporté que le TLR 3 peut être activé par les ARNm endogènes (Kariko, 2004).

2.3.2. Les TLR 7 et 8 et leurs ligands

Les TLR 7 et TLR 8 sont impliqués dans la réponse à l'ARN simple brin, d'origine virale ou non (Diebold, 2004 ; Heil, 2004). Le TLR 7 murin et le TLR 8 humain reconnaissent les virus à ARN simple brin comme l'influenza (Diebold, 2004 ; Lund, 2004), le virus Coxsackie B (Triantafilou, 2005) et le virus de Sendai (Melchjorsen, 2005).

Les TLR 7 et 8 ont été les premiers identifiés comme susceptibles de reconnaître un groupe d'imidazoquinolines synthétiques tels que le resiquimod (R848) et l'imiquimod, mais aussi les analogues de la guanine comme la loxoribine (Diebold, 2004). Les TLR 7 et 8 reconnaissent en particulier les ARN mono-brin riches en guanosine et uridine, et les polyuridines synthétiques agissent comme des ligands efficaces.

Récepteur	Ligands	Localisation cellulaire
TLR 3	- ARN double brin - poly (I:C)	cellules dendritiques lymphocytes B
TLR 7/8	- imidazoquinoline (imiquimod, résiquimod) - ARN simple - poly U	monocytes, macrophages certains types de cellules dendritiques (plasmacytoïdes...) lymphocytes B

Tableau 2 : Récapitulatif des ligands et de la localisation des TLR 3 et TLR 7/8

2.4. Distribution cellulaire et localisation intracellulaire des TLR

Les TLRs présentent une localisation différente selon les ligands qu'ils reconnaissent et la cellule dans laquelle ils sont exprimés. Ainsi, les TLRs qui sont activés par les PAMPs bactériens et fongiques (c'est à dire TLR 1, 2, 4, 5 et 6) sont exprimés à la surface cellulaire (Hopkins, 2005 ; Takeda, 2003). Les TLRs impliqués dans la réponse aux acides nucléiques (TLR 3, 7, 8, 9) sont exprimés dans les vésicules endosomales (Hopkins, 2005 ; Takeda, 2003). Les produits issus des bactéries et virus qui utilisent cette voie pour pénétrer chez l'hôte ou qui sont capturés par phagocytose sont alors détectés dans ces compartiments par les TLRs correspondants. TLR 3 constitue un cas particulier puisque sa localisation cellulaire dépend de la cellule dans laquelle il est exprimé. En effet, dans des lignées cellulaires

fibroblastiques humaines, des données expérimentales ont démontré son expression à la surface cellulaire (Matsumoto, 2002), alors qu'il est exprimé au niveau des vésicules endosomales dans les cellules dendritiques humaines d'origine myéloïde (Matsumoto, 2003). Il a été rapporté que le signal de localisation cellulaire de TLR 7 se trouve dans le domaine transmembranaire (Nishiya, 2005). Il semblerait que les TLR 8 et TLR 9 sont également localisés au niveau des vésicules endosomales du fait du signal contenu dans leur domaine transmembranaire (Takeda, 2003 ; Nishiya, 2005).

Les TLRs sont exprimés au niveau d'un grand nombre de cellules et de tissus incluant les cellules endothéliales, les monocytes et les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B (Janeway, 2002). L'expression des différents TLRs varie de façon importante en fonction du type et du niveau d'activation cellulaire. Ainsi, les monocytes et les macrophages expriment tous les TLRs, sauf TLR 3, alors que dans le cas des cellules dendritiques, l'expression de ces PRRs (Pattern recognition receptors) dépend de la sous-population des cellules dendritiques (Hopkins, 2005 ; Takeda, 2003 ; Zarembek, 2002 ; Muzio, 2000) (*figure 9*).

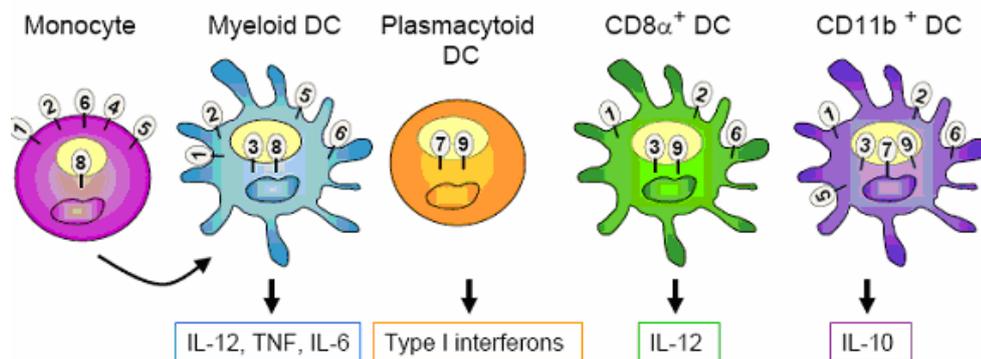


Figure 8 : Expression des différents TLR dans les monocytes et différents types de DC

2.5. Les cellules dendritiques (DC)

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPAG) responsables de l'induction de l'immunité spécifique de l'antigène (Gatti, 1999). Ce sont les seules à être capables de stimuler une réponse primaire des lymphocytes T, donc d'initier la réponse immune adaptée aux antigènes présentés.

2.5.1. Mode d'action des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques reconnaissent les pathogènes grâce à des structures spécifiques, par un accrochage à des récepteurs provoquant leur maturation et les rendant efficaces pour la présentation antigénique (Sato, 2004). Leur rôle principal est d'apprêter l'antigène pour la présentation aux lymphocytes T (Gluckman, 2004). Ce processus d'apprêtement fait passer les cellules dendritiques d'un stade immature à un stade mature. Les cellules immatures ont la capacité de capturer l'antigène et de l'apprêter, principalement par l'expression de récepteurs de surface (Pattern Recognition Domain) reconnaissant les molécules portées par les agents microbiens et viraux, mais non exprimées à la surface des cellules eucaryotes. La cellule mature n'exprime plus ces molécules.

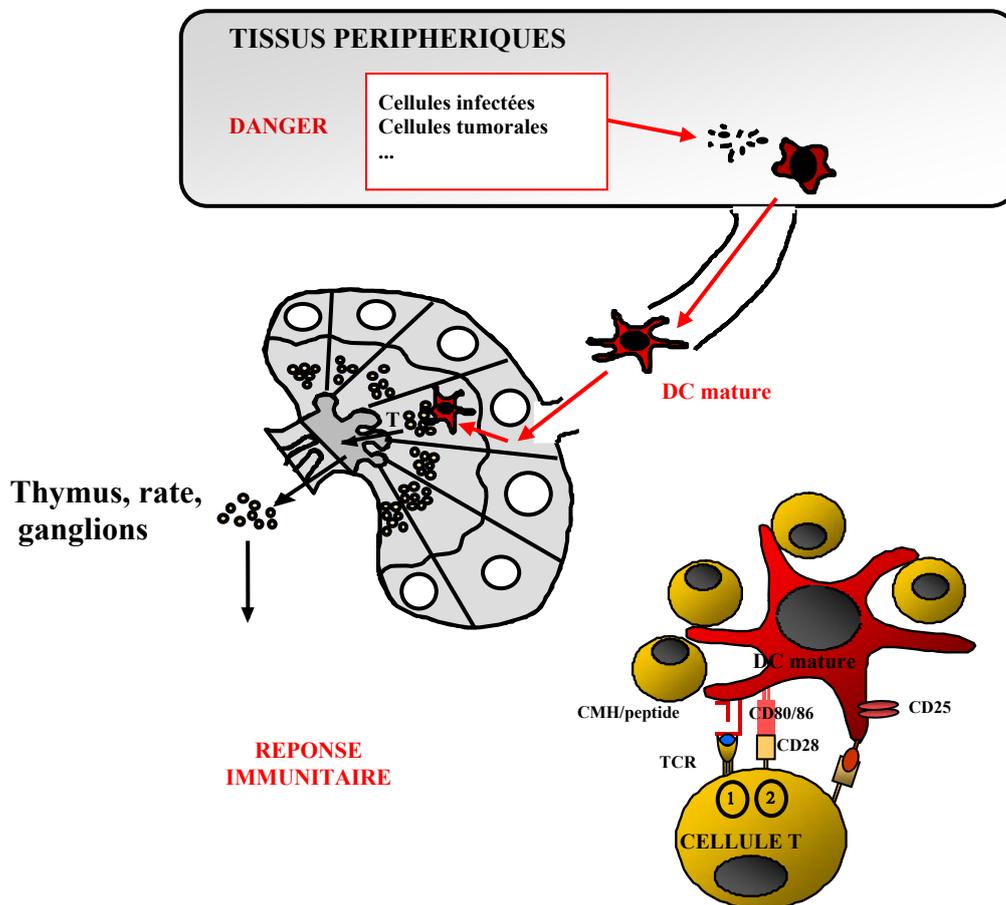


Figure 9 : Migration des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes et marqueurs de maturation

Les cellules dendritiques, à leur stade immature se trouvent dans les tissus périphériques où elles jouent un rôle de sentinelles. Dès leur rencontre avec un antigène, ces cellules vont maturer et migrer vers les organes lymphoïdes (figure 9). Les cellules dendritiques (DC) constituent une famille hétérogène de cellules d'origine

médullaire, qui sont spécialisées dans la capture d'antigènes et leur apprêtement afin de les présenter aux lymphocytes T (*figure 9*) (Fischer, 1999). Ces CPA expriment un taux élevé de molécules de co-stimulation et produisent de fortes concentrations d'IL-12, lequel stimule la production d'interféron gamma des lymphocytes-T et de cellules tueuses naturelles. Les signaux qui gouvernent le développement des cellules dendritiques *in vivo* sont toujours inconnus. Cependant, les expériences *in vitro* montrent que le facteur de stimulation des colonies granulocytes/macrophages (GM-CSF) joue un rôle clef dans l'induction de la différenciation des cellules dendritiques. La reconnaissance d'antigènes par les récepteurs Toll-like est connue pour être importante lors de l'induction de la maturation des cellules dendritiques, qui sont elles-mêmes indispensables pour l'initiation de la réponse de lymphocytes T (Régner, 2004).

Les cellules dendritiques sont présentes dans l'épiderme et les muqueuses de l'organisme, elles peuvent cependant être cultivées à partir de monocytes ou de progéniteurs CD34 issus de la moelle ou du sang de cordon ombilical. Il existe une dichotomie entre les cellules dendritiques myéloïdes provenant de précurseurs intermédiaires, exprimant le CD14 (marqueur des macrophages) et non le CD1a (souvent exprimé dans les cellules dendritiques), et les cellules de Langerhans, provenant de précurseurs intermédiaires exprimant le CD1a et non le CD14. De plus, lors de la maturation des DC, certains marqueurs de surface vont être exprimés comme le CD25 et le CD80, alors que d'autres vont voir leur expression augmentée, comme les CD83 et CD86.

Selon les facteurs de croissance utilisés, il est possible d'obtenir différents types cellulaires. Si on ajoute du TGF- β à la culture de monocytes, une proportion non négligeable des cellules dendritiques produites possède les caractéristiques des cellules de Langerhans. Ces populations distinctes peuvent donc provenir de précurseurs identiques.

La fonction des cellules dendritiques est de présenter l'antigène aux lymphocytes T et d'activer ces lymphocytes à produire des cytokines. Les cytokines ainsi produites peuvent être de type Th1 (essentiellement IFN- γ) induisant l'expansion de la réponse cellulaire, ou de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) favorisant la réponse anticorps. La réponse des cellules dendritiques semble due principalement à l'engagement de leurs PRD (Pattern Recognition Domain) de surface, dont les récepteurs Toll-like. Chacun d'entre eux reconnaît des molécules différentes sur les bactéries ou les virus et induit ainsi des circuits d'activation intracellulaire différents

dans la cellule dendritique, et donc une activation différente des lymphocytes T mis à leur contact.

Selon la population activée initialement et selon l'environnement, le contrôle par la cellule dendritique sera différent. Il est important de pouvoir aujourd'hui maîtriser ce phénomène pour utiliser ces cellules dendritiques *ex vivo* dans le cadre de l'immunothérapie cellulaire ou de les contrôler *in situ* pour s'en servir comme « adjuvants naturels », dans un contexte de vaccination thérapeutique anti-virale ou anti-tumorale.

2.5.2. Les cellules de Langerhans et autres types de cellules dendritiques

De nombreux types de cellules dendritiques peuvent intervenir en tant que cellules présentatrices d'antigènes (CPAG) lors de la reconnaissance d'un antigène, et notamment les cellules de Langerhans que l'on retrouve dans l'épiderme et les épithéliums pluristratifiés.

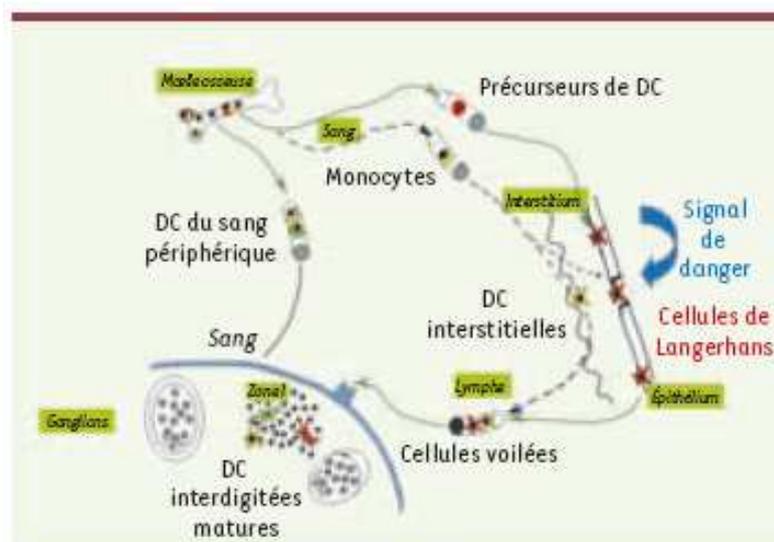


Figure 10 : Cycle de vie des cellules de Langerhans (Valladeau, 2006)

Les cellules de Langerhans procèdent, au cours de leur maturation, à des changements phénotypiques et fonctionnels. Elles se transforment en cellules dendritiques dites matures, ayant les caractéristiques des cellules dendritiques retrouvées dans les organes lymphoïdes. Suivant l'état de l'épithélium, des précurseurs hématopoïétiques ou des monocytes colonisent les épithéliums, où ils se différencient en cellules de Langerhans capables de reconnaître et d'internaliser les pathogènes. Un signal de danger entraîne alors la migration des cellules de Langerhans vers les organes lymphoïdes secondaires, où elles sont appelées cellules dendritiques interdigitées matures. Ces cellules sont capables de présenter des complexes CMH-Ag (complexe majeur d'histocompatibilité-antigène) à des

lymphocytes T spécifiques. Au cours de leur migration dans la lymphe, les DC sont nommées cellules voilées.

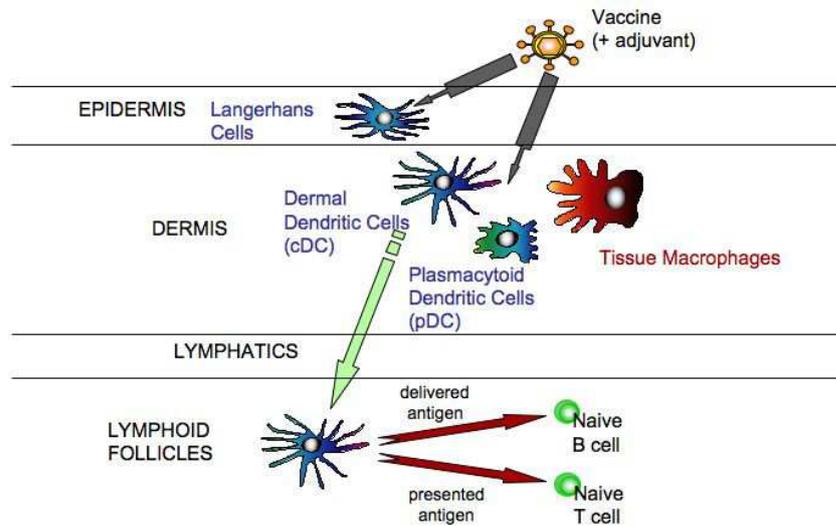


Figure 11 : Le contact avec les cellules dendritiques un élément pour un vaccin efficace (McCullough, 2009)

La communication entre les différents types cellules dendritiques présentes dans les muqueuses fait partie du processus qui va activer la réponse immunitaire (*figure 11*). Ces cellules sont appelées cellules dendritiques dermiques ou interstitielles, cellules dendritiques plasmacytoïdes. Toutes se différencient par l'expression de différents marqueurs de surface, ceux-ci permettent de les identifier et de suivre leur stade de maturation (*tableau 3*).

Cellule dendritique			 immature	 mature
Fonctions	Marqueurs	Expression des marqueurs		
Capture de l'antigène	CR, MR, TLR, SR, CLR	+++	+	
	CD32, CD64, CD91	+++	+	
Présentation de l'antigène	CMH-I, CMH-II, CD1	+	+++	
Migration	CCR1, CCR5, CCR6	+++	+	
	CCR7	+	+++	
Maturation	CD83	-	+++	
Adhérence	CD50, CD54, CD58	+	+++	
Costimulation	CD80, CD86	+	+++	
Activation	CD40	+	+++	
Production de cytokines	IL-6, IL-8, TNF α , IL-12	+	+++	

Tableau 3: Principales molécules associées à la maturation des cellules dendritiques (Maisnier-Patin, 2007).

CR : complement receptor ; MR : mannose receptor ; TLR : toll-like receptor ; SR : scavenger receptor ; CLR : c-type lectin receptor ; - : absence d'expression ; + : faible expression ; +++ : forte expression.

2.5.3. Nanoparticules, TLR et cellules dendritiques

Afin de pouvoir évaluer comment les vaccins peuvent cibler le système immunitaire, pour en améliorer les performances, il est important d'apprécier le rôle central des cellules dendritiques qui sont des cibles importantes pour la vaccination (Mc Cullough, 2009).

Les nanoparticules colloïdales à base de chitosane peuvent contenir les molécules d'intérêt thérapeutique (Bivas-Benita, 2004), soit encapsulées dans la matrice polymère, soit conjuguées à la surface (Babensee, 2005). Différents mécanismes comme la phagocytose, la pinocytose ou l'endocytose médiée par un récepteur peuvent intervenir dans la capture des particules. Après l'internalisation, les nanoparticules sont transportées vers les endosomes primaires. Des études menées sur une lignée de cellules dendritiques de souris (SRDC) (Ruiz, 2005) montrent que les nanoparticules de PLA sont également prises en charge par les cellules dendritiques (Primard, 2010). Il ressort de ces travaux que les nanoparticules sont considérées comme un signal de danger par les CPAG et sont de ce fait internalisées. L'intérêt d'apporter un antigène *via* des nanoparticules est qu'il va idéalement, pouvoir être pris en charge par les cellules dendritiques et être présenté au lymphocyte à la fin de leur migration. C'est pourquoi les cellules dendritiques vont

pouvoir nous servir de modèle *in vitro* lors de cette étude pour tester nos formulations grâce à l'étude de leur maturation qui, *in vivo*, serait synonyme de migration vers les organes lymphoïdes.

De même, les ligands des TLR 3, 7, 8 et 9, qui induisent la production d'interféron α , augmentent la présentation aux cellules dendritiques et activent les cellules T cytotoxiques, peuvent être des candidats potentiels pour activer les cellules dendritiques et amplifier ainsi l'effet d'une vaccination (Thomsen, 2004 ; Rechtsteiner 2005). Ce travail de thèse s'est intéressé à l'activation de signaux intracellulaires, via l'action de deux familles de TLR, le TLR 3 et le TLR 7/8.

3. Nanoparticules et VIH

En 1981, dans des grandes villes des États-Unis, sont observés un nombre anormalement élevé de cas de Pneumonie à *Pneumocystis Carinii* et de sarcome de Kaposi, en particulier au sein des communautés homosexuelles (rapport du Center for Disease Control d'Atlanta). On comprend alors qu'il s'agit d'une épidémie de pathologies liées à une baisse des défenses immunitaires. Le syndrome est nommé

GRID (Gay-Related Immune Disorder) puis Gay Syndrom.

Cependant, en 1982, les médecins sont confrontés à des cas similaires au sein de communautés haïtiennes, chez des toxicomanes et chez des hémophiles (receveurs de transfusions sanguines). On parle désormais de SIDA (Syndrome d'Immuno-Déficiences Acquis). La cause est toujours inconnue et c'est en 1983 que les français Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier de l'Institut Pasteur établissent le lien entre la pathologie et un rétrovirus qu'ils nomment LAV (Lymphadenopathy Associated Virus). L'équipe de l'Institut Pasteur fait parvenir son isolat à



Figure 12 : Chronologie du VIH (www.medeo.com)

l'américain Robert Gallo (National Cancer Institute), qui a isolé 3 ans auparavant le premier rétrovirus humain. C'est alors que le gouvernement américain annonce publiquement la découverte du virus du SIDA, nommé HTLV-III (Human T-cell Lymphotropic Virus type III), par l'équipe du National Cancer Institute. Cette même année, l'activité antirétrovirale de l'AZT est mise en évidence. S'en suit en 1985, la

commercialisation du test ELISA, en vue du dépistage dans le sang des anticorps anti-VIH produits par l'organisme, et le lancement des premiers essais thérapeutique de l'AZT aux États-Unis. En France, c'est le début de l'affaire du sang contaminé avec l'annonce par le gouvernement du dépistage obligatoire du VIH chez les donneurs de sang.

Dans les années 1990, des traitements sont mis progressivement sur le marché et les stratégies thérapeutiques sont mises en place. Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi obtiennent en 2008, le prix Nobel de médecine pour la découverte du VIH.

3.1. VIH : une maladie des muqueuses

3.1.1. Structure du VIH

Le VIH1 appartient à la famille des *Retroviridae* et plus précisément au genre Lentivirus. Ce virus, à ARN enveloppé, possède une géométrie icosaédrique, dont le diamètre varie de 80 à 120 nm.

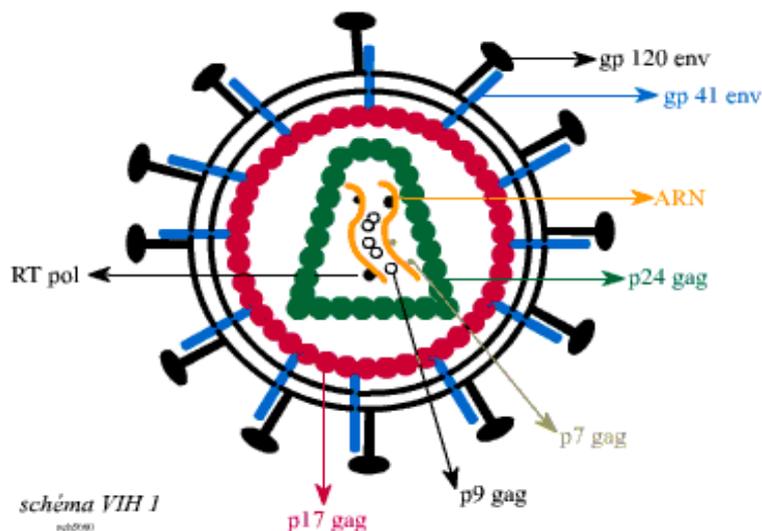


Figure 13 : Structure du VIH1 (<http://virologie.free.fr>)

L'enveloppe virale est composée d'une bicouche phospholipidique dérivant de la membrane plasmique de la cellule hôte. Ce sont les glycoprotéines gp 120 et gp 41 qui permettent l'attachement aux récepteurs cellulaires, et donc l'entrée du virus dans la cellule. Ces dernières sont enchâssées dans la bicouche lipidique. La capside, de structure conique, est formée par l'assemblage des protéines p24. Les deux ARN viraux simples brins sont protégés par cette nucléocapside. Deux types de VIH existent, ils sont antigéniquement distincts. Ils ont en commun 42% d'homologie au

niveau du génome. Ils diffèrent par un gène de régulation *vpx* pour VIH-2 et *vpu* pour VIH1.

3.1.2. Transmission du VIH

Le virus se transmet entre individus par l'intermédiaire de fluides contaminés :

- transmission directe du virus ou de cellules infectées par le sang ;
- transmission par contact sexuel *via* les muqueuses génitales et anales ;
- transmission verticale mère-enfant au fœtus pendant la grossesse puis l'accouchement, ou par les muqueuses buccales et intestinales lors de l'allaitement.

L'intégrité de la muqueuse impliquée joue un rôle important dans le risque d'infection par le VIH. Cependant le VIH se transmet très majoritairement par voie sexuelle ; les muqueuses vaginales et anales constituent ainsi le site principal d'infection par le virus. Les muqueuses qui couvrent les tractus gastro-intestinal, anorectal et génito-urinaire sont donc les principales portes d'entrée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans l'organisme (Milman, 1994). En effet, plus de 95% des infections se font à la suite de rapports sexuels non protégés ou durant l'allaitement maternel par des femmes séropositives pour le VIH mais dont les enfants sont nés non infectés. Ces muqueuses ont en commun d'être constituées de cellules épithéliales, organisées suivant l'un des deux types de structures suivants : épithélium squameux pluristratifié ou épithélium simple monostratifié (*figure 14*). Les mécanismes de transmission du VIH semblent dépendre de la structure de ces épithéliums de recouvrement.

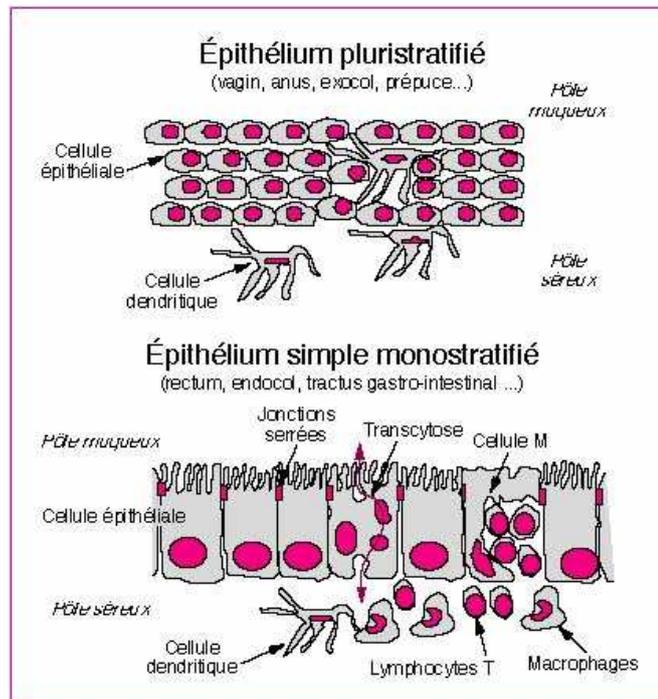


Figure 14 : Structure des épithéliums de recouvrement des muqueuses (Bomsel, 2002)

Pour que la transmission du VIH ait lieu, le virus doit tout d'abord traverser la barrière que constituent ces muqueuses. Lorsque le virus a traversé la barrière épithéliale, il rejoint la *lamina propria* ou chorion, tissu conjonctif vascularisé, riche en cellules T CD4+ macrophages, cellules dendritiques et cellules de Langerhans, infectables par le VIH. C'est ici le premier lieu de répllication du virus.

3.1.3. Les muqueuses : cibles principales du VIH

a) Les épithéliums pluristratifiés

Le vagin, l'exocervix de l'utérus, l'anus et le prépuce, par exemple, sont recouverts d'une muqueuse dont l'épithélium est pluristratifié. Ces muqueuses constituent une barrière plus difficile à franchir pour le virus que les épithéliums monocouches. Ceci a été démontré chez le macaque, pour qui le risque d'infection par le VIH de la muqueuse vaginale augmente lorsque l'épaisseur de l'épithélium diminue, sous l'influence d'hormones contraceptives (Smith, 2004). En effet, cette épaisseur dépend de la balance hormonale et des études d'infections menées à différentes périodes du cycle hormonal ont permis d'établir une corrélation directe entre efficacité de l'infection et épaisseur de la muqueuse (Marx, 1996).

Les cellules épithéliales y sont empilées de manière non jointive. C'est à travers les espaces laissés libres par cet empilement que des cellules d'un autre type, les cellules dendritiques, peuvent se faufiler et traverser dans les deux sens l'épaisseur de la muqueuse, ayant ainsi accès à la fois à la lumière de la muqueuse

où se trouvent éventuellement les agents pathogènes et à la sous-muqueuse, d'où elles pourront se diriger vers les ganglions lymphatiques proximaux. Plusieurs études menées sur des modèles d'infection simiens suggèrent que le VIH pénètrerait dans ces muqueuses pluristratifiées par l'intermédiaire des cellules dendritiques, soit en les infectant de manière proprement dite, soit en s'adsorbant à la surface des nombreuses invaginations de leur membrane plasmique (figure 15).

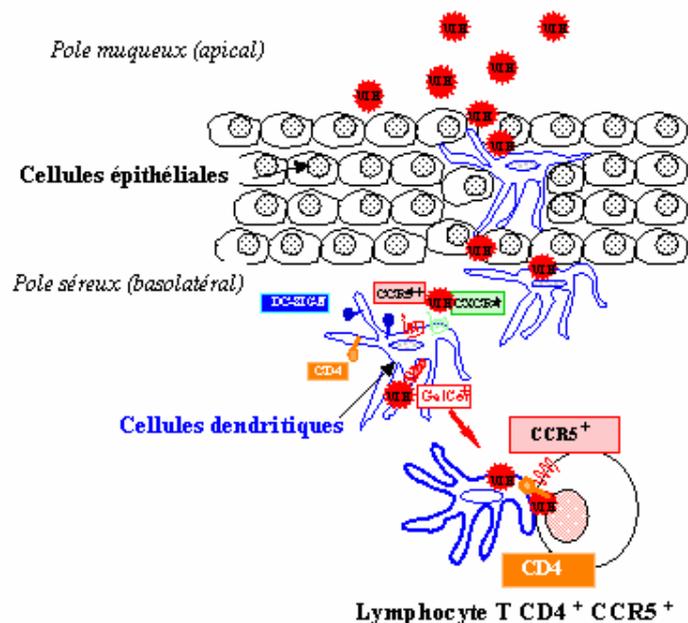


Figure 15 : Mécanisme de transfert du VIH des cellules dendritiques aux lymphocytes TCD4⁺ (<http://cochin.inserm.fr>).

Les cellules dendritiques immatures expriment le récepteur principal du VIH, le CD4, ainsi que les deux co-récepteurs CXCR4 et CCR5 et la lectine DC-SIGN, qui se lie à la protéine d'enveloppe virale gp120 (Geijtenbeek, 2000). La liaison du VIH à la cellule dendritique immature *via* DC-SIGN se fait indépendamment du CD4 et des co-récepteurs. Le virus est internalisé, ce qui peut mener à la fusion et à l'infection des cellules dendritiques. L'interaction avec le VIH entraîne la migration des cellules dendritiques hors de la muqueuse vers le ganglion lymphoïde proximal. Dans le ganglion, les cellules dendritiques interagissent avec les lymphocytes TCD4⁺. Ce contact permet le transfert du VIH des cellules dendritiques *via* les récepteurs du CD4, et des co-récepteurs vers les chimiokines présents sur le lymphocyte. L'infection se disséminerait lors de la rencontre avec les lymphocytes TCD4⁺ ou les monocytes-macrophages dans ces ganglions lymphoïdes proximaux. En effet, dans le ganglion lymphatique, les cellules dendritiques se lient aux cellules T, formant des agrégats cellulaires. Ce contact permet aux cellules CD4⁺ ou aux macrophages d'être

environnés d'une forte concentration de VIH, facilitant ainsi la capture du virus, puis l'infection. Dans les expériences, cela a pu être observé dès les deux premiers jours suivant l'infection (Spira, 1996 et Veazey, 2001). Les cellules épithéliales ne semblent en revanche pas être infectées.

b) Les épithéliums monostratifiés

La première barrière de protection des muqueuses aux pathogènes est le mucus sécrété par les cellules épithéliales de l'endocol chez la femme et par les cellules caliciformes de l'épithélium gastro-intestinal. Ce mucus constitue une barrière physique qui piège les pathogènes ainsi qu'une protection chimique de part la présence de protéines aux propriétés antivirales sécrétées par les cellules épithéliales de l'endocol (Moriyama, 1999).

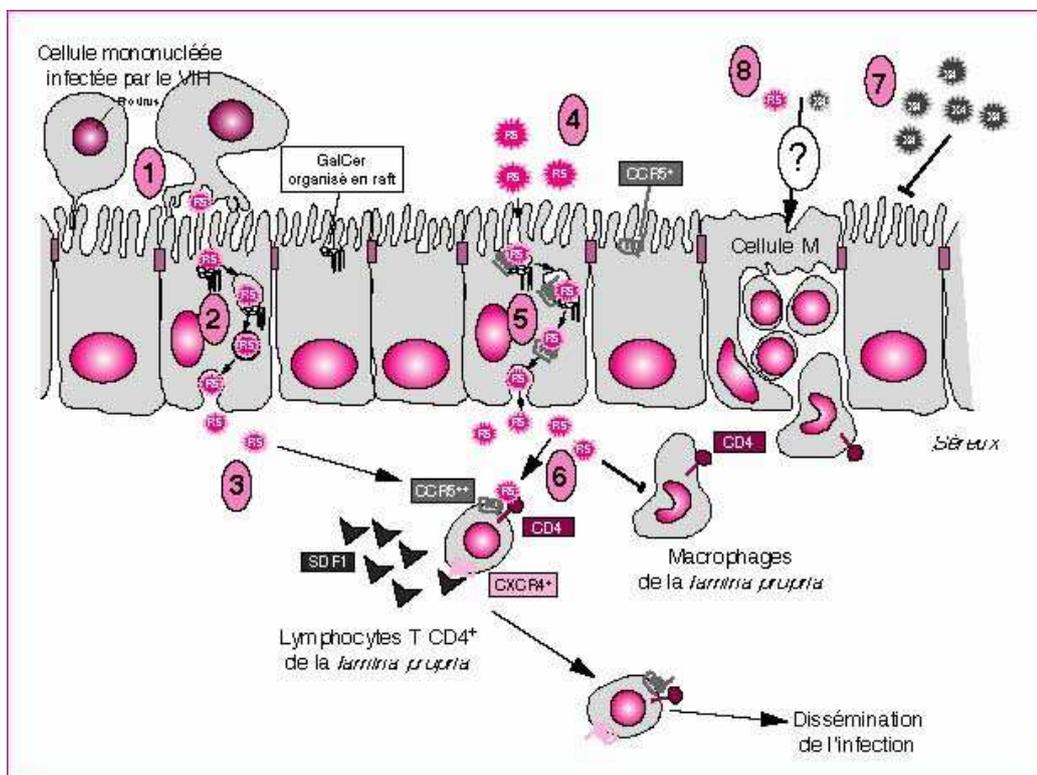


Figure 16 : Mécanisme de transcytose du VIH à travers un épithélium intact après contact entre les cellules mononucléées et l'épithélium simple (Bomsel, 2002)

1) adhérence des cellules VIH+, 2) Transcytose du VIH, 3) Particules infectieuses relarguées, 4-5-6) translocation de particules virales médiée par le galactosyl céramide épithélial via le CCR5, 7) cas des particules à récepteur CXCR4, 8) les cellules M

Les cellules épithéliales monostratifiées n'expriment ni CD4, ni co-récepteur pour la fusion CXCR4, mais expriment le co-récepteur pour la fusion CCR5 et le glycosphingolipide galactosyl céramide, récepteur de l'enveloppe virale. Les cellules mononucléées infectées par le VIH, principaux vecteurs du VIH dans le sperme ou différentes sécrétions, adhèrent à la surface luminale apicale de l'épithélium. Le

contact cellule-cellule induit une production de particules VIH polarisées vers l'épithélium sans rupture de l'intégrité de la monocouche. Ces VIH utilisent aussi bien CXCR4 que CCR5 pour la fusion. En conséquence, les cellules épithéliales internalisent les particules virales par mécanisme d'endocytose médié par récepteur, ce qui implique à la fois la gp120 de l'enveloppe du VIH et le galactosyl céramide, mais pas le CD4. À partir des structures épithéliales de type endosome, le VIH traverse l'épithélium et, au bout de 30 min, commence à être relargué dans le milieu basolatéral suite à la fusion de la vésicule de transcytose avec la membrane basolatérale. L'entrée du VIH dans la cellule dépend du galactosyl céramide épithélial. Les particules de VIH relarguées par transcytose sont infectieuses. Elles sont à même d'infecter productivement des macrophages ou des lymphocytes intra-épithéliaux de la sous-muqueuse. Elles peuvent donc être de nouveaux vecteurs de dissémination virale. Alternativement, lorsqu'une quantité importante de VIH utilisant CCR5 comme co-récepteur pour la fusion est inoculée au pôle apical, le virus est internalisé par un mécanisme dépendant également du galactosyl céramide. Le virus est transloqué vers le pôle basal de la cellule, probablement par un mécanisme dépendant de CCR5. Les cellules épithéliales primaires ne sont pas infectées. Le VIH peut alors infecter les lymphocytes muqueux qui expriment CD4, CCR5 et CXCR4, mais pas les macrophages muqueux qui n'expriment pas CXCR4 et CCR5. La chimiokine SDF1, dont le récepteur est CXCR4, semble être présente dans le milieu séreux. SDF1 est sans doute capable d'empêcher l'infection par les virus utilisant CXCR4 comme co-récepteur pour la fusion provenant de la transcytose suite à un contact cellule-cellule. L'ensemble de ces données pourrait permettre d'expliquer la sélection de virus utilisant CCR5 comme co-récepteur pour la fusion observée lors de la primo-infection.

3.2. Nanoparticules et thérapie du VIH1

Actuellement, il n'existe aucun remède ni vaccin préventif contre le VIH. Les thérapies à base d'association d'antirétroviraux ont considérablement amélioré le traitement, mais elles doivent être prises à vie, présentent des effets secondaires importants et sont inefficaces chez les patients dont le virus développe une résistance. La nanotechnologie est un domaine multidisciplinaire qui possède un fort potentiel pour une avancée radicale dans le traitement et la prévention du VIH.

3.2.1. Les thérapies HIV

Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTIs), tels que zidovudine (AZT), didanosine (ddI), lamivudine (3TC) et stavudine (D4T) ont été largement utilisés dans le traitement du VIH. Pour exercer leur activité antivirale, les NRTIs sont activés par les kinases cellulaires pour former les dérivés 5'-triphosphate correspondants, qui peuvent efficacement stopper la synthèse intracellulaire de l'ADN viral à partir de son ARN par compétition avec les nucléotides naturels comme substrat pour la transcriptase inverse dans les cellules infectées (Furman, 1986). Bien que les NRTIs aient réussi à augmenter la durée de vie de millions de patients infectés par le VIH à travers le monde, ils sont encore loin d'être idéaux étant donné certains effets secondaires, tels que la neutropénie, des neuropathies périphériques et une certaine résistance aux médicaments (Tan, 1999 ; Rando, 2000). En outre, l'administration fréquente de NRTIs à des doses relativement élevées entraîne l'inconfort des patients (Sosnik, 2009).

3.2.2. Les nanoparticules pour améliorer la thérapie anti HIV

L'utilisation des nanoparticules pour la distribution systémique d'antirétroviraux pourrait améliorer l'efficacité des traitements actuellement en place. Ces systèmes de relargage contrôlé peuvent maintenir les médicaments plus longtemps dans l'organisme à des concentrations efficaces. Ces systèmes nanoparticulaires permettent aussi de cibler la répartition des médicaments hydrophobes et hydrophiles vers et dans les différents tissus. Cette particularité des systèmes nanométriques semble des plus prometteuses pour leur utilisation dans le traitement et la prévention du VIH, et plus précisément pour l'administration ciblée de médicaments antirétroviraux aux cellules T CD4 + et aux macrophages. Les nanoparticules pourraient permettre aux médicaments d'atteindre les réservoirs latents du virus (Vyas, 2006 ; Amiji, 2006). L'utilisation de la nanotechnologie des systèmes de fourniture de médicaments antirétroviraux a été examinée de manière approfondie par Nowacek *et al.* et Amiji *et al.* (Nowacek, 2009).

Par exemple, des nanoparticules à base de chitosane encapsulant le d4t ont fait l'objet d'une étude en ce sens (Yang, 2009). Les résultats suggèrent que ce genre de thérapie peut être utilisé pour améliorer l'efficacité thérapeutique et réduire les effets secondaires du traitement antirétroviral. Très récemment Ashish *et al.* ont montré que des particules issues d'une émulsion de PLA et de chitosane étaient des candidats à l'amélioration de système de relargage contrôlé pour les antirétroviraux (Ashish, 2010). Les expériences menées par Dou *et al.* montrent que l'indinavir

formulé avec des nanoparticules peut être incorporé dans les macrophages qui, une fois injectés, déclenchent une activité antivirale significative avec des taux mesurables dans le sang pendant 14 jours (Dou, 2009). Cependant, si ces nanoparticules permettent d'améliorer les traitements, ils ne changent pas les résultats en termes de durée de vie des patients.

3.3. Nanoparticules et vaccination anti HIV

3.3.1. Problématique d'un vaccin HIV

La mise au point d'un vaccin contre le sida se heurte cependant à des obstacles considérables (Gallo, 2005). Le premier tient au fait que le VIH est un rétrovirus. Il appartient au sous-groupe lentivirus, de la famille des *Retroviridae*. On ne connaît aucun cas de guérison de l'infection par le VIH : une fois l'infection établie. Le virus est indéléguable, puisqu'il persiste dans l'organisme à l'état de provirus intégré dans des lymphocytes T CD4+ mémoire (Peterlin, 2003 ; Blankson, 2002).

Cela pose un sérieux défi pour le développement d'un vaccin. La situation est en effet très différente de celle des vaccins viraux classiques, dont l'efficacité repose en grande partie sur l'induction d'une mémoire immunitaire. En cas d'infection, il faut quelques jours pour que les cellules mémoire se réactivent, et cela suffit pour éliminer le virus et protéger l'hôte. Dans le cas du VIH, la fenêtre d'intervention du système immunitaire est infiniment plus réduite et il faudrait pouvoir maintenir en permanence un taux élevé d'anticorps et/ou de cellules effectrices pour bloquer l'infection à son stade précoce (Miller, 2005).

Le deuxième obstacle tient à l'immense variabilité génétique du virus (Korber, 2001 ; Tatt, 2001). On en connaît deux types, VIH1 et VIH2. Le VIH1 est subdivisé en trois groupes, M (*major*), O (*outlier*) et N (ni M, ni O). Le groupe M, qui est responsable de la pandémie, comporte une dizaine de sous-types désignés par les lettres A à K. La séquence d'acides aminés, consensus d'un sous-type donné, diffère de celles des autres sous-types par 25 à 35%. C'est dire que la probabilité de réactivité immunologique croisée entre souches de virus de sous-types différents est très faible, ce qui constitue un obstacle majeur à la mise au point d'un vaccin universel (Robinson, 2002). Le problème se complique encore du fait de la fréquence des co-infections et surinfections qui aboutissent à de nombreuses recombinaisons entre souches de virus (Altfeld, 2002 ; Mac Cutchan, 2005) d'où émergent des souches mosaïques, dites formes recombinantes en circulation (CRF : *circulating recombinant forms*) (Girard, 2006).

3.3.2. Nanoparticules, vaccin HIV et travaux antérieurs au laboratoire

Les nanoparticules sont des candidats potentiels comme adjuvants et systèmes de présentation de vaccins (*cf chapitre 1*). Au cours des ces dernières décennies, les systèmes de relargage contrôlé ont été utilisés pour libération prolongée de divers agents. Cette approche a de grands avantages pour la vaccination puisque le relargage des antigènes de façon contrôlée pourrait mener à une longue et forte mise en place de la réponse immunitaire. En protégeant l'antigène d'intérêt des différents fluides organiques (par exemple, la lymphe, le sérum et le mucus), l'encapsulation d'antigènes par les nanoparticules peut augmenter la durée de vie d'un antigène et donc son efficacité. Les nanoparticules peuvent aussi être conçues de façon à cibler efficacement les CPAG (Fahmy, 2008) (*cf chapitre 2*). Le fait de pouvoir délivrer un antigène directement aux cellules dendritiques est un avantage majeur pour initier la réponse immunitaire. Un autre avantage majeur des vaccins à base de nanoparticules est que ces dernières peuvent être optimisées pour être utilisées lors de différentes voies d'administration. Les vaccins classiques sont principalement administrés par voie intramusculaire, mais des nanoparticules permettent d'envisager des administrations orales ou des vaccinations par voie nasale où l'immunité des muqueuses pourrait être induite (Csaba, 2009). Pour délivrer des antigènes, les nanoparticules peuvent être utilisées soit pour les encapsuler, soit pour les absorber à leur surface. Les deux stratégies présentent des avantages, selon que la réponse immunitaire humorale ou cellulaire est désirée. Pour une présentation efficace des antigènes visant les cellules dendritiques, l'encapsulation peut permettre l'entrée d'un antigène extracellulaire dans le cytoplasme (Fahmy, 2008). De plus, la capacité à adsorber des antigènes à la surface des nanoparticules offre la possibilité de leur présentation directe aux cellules de l'immunité.

Type d'approche	Antigène, adjuvant ou molécules	Support	Stade de mise au point	Références
protéine ou peptide	gp41, gp120, gp160, p24, Env, Gag, Tat	liposomes, nanoémulsions, MF59, nanoparticules de PLA, nanoparticules de polyacide glutamique	preclinique	Sakaue, 2003 ; Watson, 2009 ; Leung, 2004 ; Brave, 2007 ; Bielinska, 2008 ; Guillon, 2007 ; Akagi, 2007 ; Wang, 2007
ADN	env, rev, tat, gag, CpG ODN	liposomes, nanoémulsions, nanoparticules de PLA	preclinique	Fairman, 2008 ; Burke, 2009
virus inactivé	particules virales de HIV inactivées	nanosphères de polystyrène	preclinique	Miyake, 2004 ; Kawamura, 2005
microbicides	-L-lysine dendrimère	L-lysine dendrimère nanoparticules de PLGA	Phase I/II	Rupp, 2007 ; Jiang, 2005
	- PSC-RANTES	PLAGA	preclinique	Ham, 2009
	- siRNA	Nanoparticules, lipides	preclinique	Palliser, 2006 ; Woodrow, 2009

Tableau 4 : Résumé des stades de développement des nanotechnologies pour la prévention du VIH

Le MF59 est une émulsion "huile dans eau" de taille nanométrique (< 250 nm) de squalène (Ott, 1995). Le MF59 a été validé pour l'utilisation en médecine humaine, il est notamment utilisé dans plus de 20 pays comme adjuvant du vaccin contre la grippe (Tritto, 2009). L'immunisation de babouins avec les ADN env et gag du VIH, suivie par des rappels avec un oligomère de la protéine Env encapsulée dans du MF59 a entraîné de plus fortes réponses anticorps et cellulaires que les vaccinations avec l'ADN seul (Leung, 2004).

Les nanoparticules à base de PLA et de PLGA montrent un fort potentiel pour la présentation de protéines et d'ADN dans le cas de candidats vaccins VIH. Des nanoparticules de PLA (300-600 nm) recouvertes avec la protéine p24 induisent des titres élevés d'anticorps chez les souris, les lapins et les macaques, et ont suscité de fortes réponses cytotoxiques chez la souris (Ataman-Onal, 2006). De même, la co-adsorption des protéines p24 et gp120 sur des nanoparticules de PLA (185-250 nm) a suscité des titres élevés d'anticorps chez la souris, ce qui illustre le potentiel d'utilisation de nanoparticules de PLA en tant que vaccins multivalents (Lamalle-Bernard, 2006). De plus, la vaccination de lapins avec différents antigènes du VIH (p24, WT et Tat mutée, Tat détoxifiée) en mélange avec les nanoparticules de PLA ou avec le MF59 a induit le même niveau d'anticorps (Guillon, 2007). La capacité des PLA à adsorber des antigènes en surface et à induire à la fois une réponse anticorps

et cellulaire semble être un atout dans la poursuite de son utilisation comme véhicule nanoparticulaire biodégradable de vaccination.

Parmi toutes les nanoparticules disponibles, les PLA sont intéressantes à plusieurs niveaux. Elles permettent l'adsorption d'antigènes de natures différentes ainsi que la coadsorption de plusieurs antigènes, leur permettant d'être polyvalentes comme support vaccinal. Ces nanoparticules de PLA sont prises en charge par les cellules permettant l'assimilation de l'antigène choisi par le circuit de présentation aux lymphocytes. Le PLA est un biopolymère biocompatible et biorésorbable, il n'y a donc pas de risques d'accumulation dans l'organisme et l'efficacité des nanoparticules dans les modèles animaux semble prouvée.

Ce travail de thèse s'inscrit dans une nouvelle approche vaccinale utilisant les PLA ainsi que d'autres nanoparticules biocompatibles que sont les complexes chitosane-sulfate de dextrane ou CSD. Afin d'obtenir une immunité au niveau mucosal, nous avons choisi la combinaison de différents TLR ligands avec des antigènes du VIH adsorbés sur des nanoparticules afin d'optimiser leur efficacité.

Projet de thèse

L'équipe du D^r Bernard Verrier, à Lyon, étudie depuis des années la capacité d'un vecteur synthétique et biodégradable anti-VIH1 à induire une réponse immune. Ce travail a été effectué en collaboration avec le P^f Thierry Delair, du *Laboratoire des Matériaux Polymères et des Biomatériaux* (UMR 5223 CNRS-UCBL).

Les nanoparticules utilisées lors de ce travail ont été étudiées pour leurs capacités adjuvantes. Ainsi, les nanoparticules de poly(acide lactique), en tant que vecteurs de protéines antigènes, ou PLA, permettent d'induire des titres élevés d'anticorps anti-VIH1 (chez la souris, le lapin et le macaque) (Ataman-Onal, 2006 ; Guillon, 2007 et Lamalle-Bernard, 2006), mais la réponse muqueuse reste faible. De même, les nanoparticules de chitosane/sulfate de dextrane ou CSD en tant que vecteur de la p24 montrent des capacités encourageantes, chez la souris, à induire des titres élevés en anticorps (Drogoz, 2008), mais aussi une capacité à induire une réponse muqueuse locale intéressante après une immunisation par voie nasale (Van der Lubben, 2001). Dans l'optique de développer cette réponse muqueuse, l'utilisation de ces deux types de particules, associées à l'action des TLR ligands, a été considérée dans ce travail de thèse.

L'hypothèse de travail était que la co-administration d'un antigène et d'une molécule immunostimulante, plus particulièrement des TLR ligands par des nanoparticules, pourrait résulter dans une amplification de la réponse immunitaire médiée par les cellules dendritiques. En effet, le traitement et la présentation de l'antigène étant simultanée à l'activation de la voie des TLRs qui mène à la maturation de cellules dendritiques, nous pouvons supposer que l'activation des lymphocytes T primaires, y compris les Thelper permettra l'induction optimale de cellules B et ainsi la réponse anticorps . Par ailleurs, en choisissant des adjuvants spécifiques comme le poly (I:C) (TLR 3) ou le poly U (TLR 7/8) avec des voies d'immunisations comme l'injection intradermique, la voie sous-cutanée ou l'application topique sur une muqueuse, il pourrait être possible de générer une réponse immune à la fois systémique et muqueuse, grâce à leur co-administration avec la p24 ou la gp140 (CN 54).

Les résultats de ce travail sont présentés en trois parties. La première est consacrée à l'élaboration et la caractérisation des différentes formulations comme autant de candidats vaccins. Dans une deuxième partie, ces nanoparticules ont été évaluées sur des cellules dendritiques et cellules de Langerhans humaines, grâce à

l'étude de l'induction de la maturation de ces dernières. Les différentes combinaisons possibles ont pu être comparées *in vitro* par ce moyen, permettant de mettre en évidence celles qui semblaient les plus efficaces. Enfin, la troisième partie évalue les réponses immunes induites, chez la souris, des vecteurs protéiques, ainsi que des formulations choisies après les tests cellulaires. Les réponses systémiques et muqueuses y sont comparées en fonction de la combinaison testée.

Matériels et méthodes

4. Élaboration des nanoparticules

4.1. Le poly(acide lactique)

Le polymère employé est un poly(acide lactique) racémique (PLA₅₀) (Phusis, France). Le procédé de synthèse utilisé ne fait appel à aucun catalyseur toxique pour réaliser la polymérisation par ouverture de cycle, puisque Phusis utilise le lactate de Zinc et non des catalyseurs à base d'étain, plus classiquement utilisés, mais toxiques (Scwach G., 1998). La polymérisation aboutit à un polymère linéaire dont les caractéristiques macromoléculaires ($M_w = 30\,000$ g/mol, $I_p = 1,7$) ne diffèrent pas de façon significative entre les lots de PLA utilisés pour les expériences qui suivront.

4.1.1. Synthèse des particules de PLA par nanoprécipitation

La méthode de synthèse des nanoparticules est la nanoprécipitation, ou diffusion de solvant, développée par Fessi (Fessi H., 1989), qui ne fait intervenir aucun tensio-actif. Le principe de synthèse nécessite l'utilisation de deux phases miscibles : une phase solvant dans laquelle le PLA peut se dissoudre et une phase non solvant dans laquelle le PLA se précipite. La solution organique de PLA est ajoutée avec un débit modéré dans un mélange aqueux, lui-même étant sous agitation modérée.

a) La phase solvant

L'acétone qui compose la phase solvant est un bon solvant du PLA, dans lequel les chaînes de polymères sont largement dépliées, favorisant ainsi les contacts polymères/solvant. Le choix du solvant employé pour la synthèse est important, puisqu'il conditionne le diamètre des particules. Le PLA est dissout dans l'acétone à une concentration de 2% w/w, sous agitation magnétique, dans un flacon de verre bouché pendant une heure à température ambiante.

b) La phase non-solvant (précipitante)

Le choix de la composition de la phase précipitante est également primordial. Le paramètre d'interaction des phases solvant et non-solvant est en corrélation avec le diamètre des particules formées et prend en compte les constantes diélectriques et les paramètres de solubilité des deux phases.

La phase non-solvant consiste en un mélange eau/éthanol dont le rapport peut varier et modifier la taille des particules synthétisées.

c) La nanopréciptation

La phase non-solvant est placée dans un ballon en verre sous agitation magnétique fixée à 250 rpm. La phase solvant est placée dans une ampoule à décanter et coulée en goutte à goutte rapide dans la phase non-solvant (*figure 17*). La vitesse du goutte à goutte est fixée manuellement et, ce paramètre influençant la taille des particules synthétisées, des différences de diamètres peuvent être observées entre deux utilisateurs.

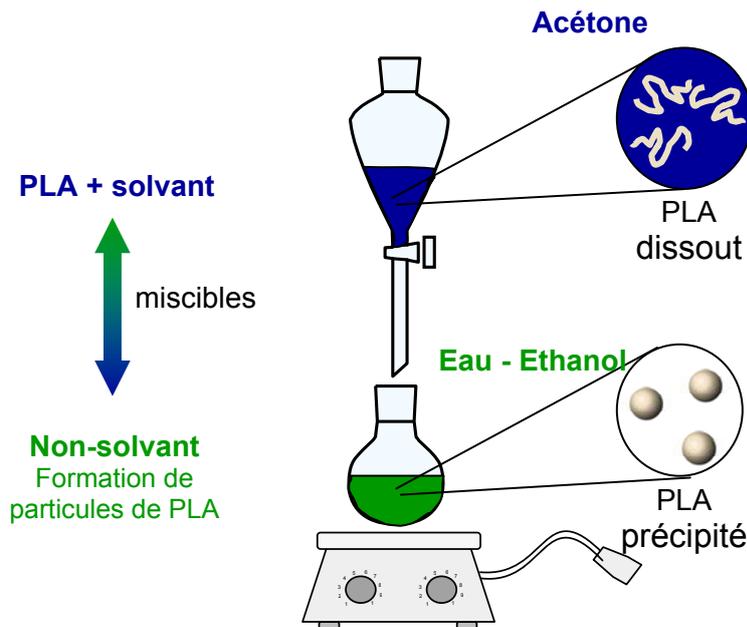


Figure 17 : Montage et procédé de synthèse des nanoparticules de PLA par déplacement de solvant

4.2. Le chitosane

4.2.1. Purification du chitosane

Le chitosane commercial (Mahtani, Inde) lot 244 est mis en solution à une concentration de 5 g/L dans l'eau avec 2 g/L d'acide acétique. La solution est laissée sous agitation magnétique moyenne (500 rpm) pendant au moins 12 heures. Elle est ensuite filtrée sous 2 bars de pression sur des filtres de porosité décroissante allant de 3 μm à 0,45 μm . Le chitosane contenu dans la solution filtrée est ensuite précipité en augmentant le pH jusqu'à 9, par ajout d'une solution d'ammoniaque (5N) diluée au cinquième en eau. Le précipité subit une série de 6 lavages par centrifugation (20 minutes à 3 500 g à 20°C). Après la dernière centrifugation, l'eau est éliminée par retournement et le culot étalé en couche fine, avant d'être congelé puis lyophilisé.

4.2.2. Modification de la masse molaire du chitosane

La masse molaire peut être ajustée par une désamination nitreuse (Allan G. G., 1995) suivie, comme précédemment, d'une précipitation à pH 9 puis d'une lyophilisation après plusieurs lavages. Il s'agit de casser la chaîne du polymère en ajoutant 10 g/L de nitrites à une solution de chitosane à 5 g/L en tampon (acide acétique acétate d'ammonium, 10 mM, pH 4,5). La solution est laissée sous agitation de 1 à 20 heures selon la taille initiale et la taille finale souhaitée. Le polymère hydrolysé est récupéré après les mêmes étapes de précipitation, lavage et lyophilisation, que ci-dessus. La taille du polymère obtenu est ensuite vérifiée par chromatographie par perméation de gel (GPC) au Laboratoire des Matériaux Polymères et Biomatériaux (LMPB) par J. M. Lucas.

4.2.3. Modification du degré d'acétylation du chitosane

Le degré d'acétylation (qui est la fraction molaire des fonctions amine acétylées du chitosane), ou DA, peut aussi être modifié en présence d'anhydride acétique en milieu hydroalcoolique (Vachoud L., 1997). Le chitosane est mis en solution dans de l'eau à la concentration de 10 g/L auxquels sont ajoutés 4 g/L d'acide acétique. La solution est laissée sous agitation magnétique (500 rpm) pendant 24 heures. Une fois le chitosane dissout, 350 mL de propane (1-2) diol sont ajoutés à la solution toujours sous agitation. Un mélange de 150 mL de propane (1-2) diol et de 1,7 g d'anhydride acétique est ensuite ajouté, puis le tout est laissé sous agitation plusieurs heures selon le DA voulu. Le polymère acétylé est récupéré après les mêmes étapes de précipitation, lavage et lyophilisation, que précédemment. Le DA est vérifié en RMN du proton par Franck Gaudin.

4.2.4. Préparation de particules colloïdales à base de polymères

a) Synthèse des particules de chitosane / sulfate de dextrane (CSD)

Le chitosane et le sulfate de dextrane (Sigma-Aldrich, France) 10 000 ou 500 000 g/mol sont mis en solution à 0,1% en masse dans de l'eau contenant 50 mM de NaCl avec un pH ajusté à 4 par ajout d'une solution HCl 1N. Les solutions sont laissées sous agitation magnétique pendant 12 heures puis passées sur des filtres de porosité 0,22 µm avant de préparer les particules. Deux types de particules peuvent être synthétisées : des particules chargées positivement (CSD(+)) et d'autres négativement (CSD(-)) selon le rapport de charge $R = [\text{NH}_3^+] / [\text{SO}_3^-]$ utilisé.

La solution en défaut est versée rapidement sur la solution en excès, placée sous agitation magnétique à 1 000 rpm. Le mélange est laissé 30 secondes sur l'agitateur à 500 rpm, puis il est centrifugé pendant 30 minutes à 6 000 g pour les

CSD(-) et à 7 000 g pour les CSD(+). Le surnageant est éliminé par retournement, le culot est repris dans de l'eau distillée puis à nouveau centrifugé pendant 30 minutes à 8 000 g. Les culots ainsi obtenus sont repris dans 200 µL d'eau filtrée et conservés à température ambiante sous agitation constante.

4.3. Synthèse de particules fluorescentes

En vue d'utilisations en conditions biologiques, il était nécessaire de pouvoir observer les particules obtenues. A ces fins, des particules fluorescentes ont été synthétisées. Deux méthodes étaient utilisées : le greffage d'une molécule fluorescente en surface ou bien son incorporation dans les particules.

4.3.1. Particules de PLA fluorescentes

La synthèse de nanoparticules de PLA fluorescentes par la méthode de diffusion de solvant a déjà été développée par de nombreuses équipes (Bejjani, 2005 ; Csaba, 2006...). De même, au sein du laboratoire, Charlotte Primard a développé pendant sa thèse, en collaboration avec Elsa Luciani, la synthèse de particules de PLA de plusieurs couleurs : bleues (ce qui avait déjà été fait), vertes (fréquemment utilisées) et rouge (en particulier pour s'affranchir de l'autofluorescence des cellules et des tissus dans le vert).

Fluorophores sélectionnés

Pour une bonne incorporation du fluorophore dans le cœur hydrophobe des particules de PLA, des marqueurs fluorescents ont été sélectionnés en fonction de leur hydrophobicité.

4.3.2. Particules de chitosane fluorescentes

a) Adsorption en surface d'une protéine fluorescente

La « Enhanced Green Fluorescent Protein » ou EGFP est une molécule de fluorescence verte. Elle est produite dans le laboratoire de l'UMR 2714 et aimablement fournie par Charlotte Primard.

Les particules utilisées pour cette expérience sont des CSD (+) de rapport de charge $R=2$ et de diamètre 689 nm (I_p de 0,4) synthétisées à partir de chitosane (150 000 g/mol, DA 50%) et de sulfate de dextrane (10 000 g/mol). Dans chaque tube sont introduits 80 µg de la protéine EGFP dilués dans 200 µL en tampon (acétate d'ammonium 10 mM, pH 4,5) et 200 µL des particules de chitosane à 1% de taux de solide soit 0.5% final. Les échantillons sont mis sous agitation sur une roue, à température ambiante pendant 20 heures. Après incubation, les tubes sont récupérés et centrifugés 10 minutes à 1 800 g à 20°C. Les surnageants sont récupérés et

centrifugés 15 minutes à 10 000 g à 20°C pour éliminer les quelques particules pouvant rester en suspension, puis sont dosés par la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA), utilisé pour le dosage des protéines. Les culots sont repris dans environ 200 µL d'une solution de NaCl 150 mM ou dans le tampon d'adsorption.

b) Intégration de la sulforhodamine B

La sulforhodamine B est une molécule fluorescente rouge (*figure 18*) qui est soluble dans l'eau. La molécule utilisée lors de ces expériences était une rhodamine commerciale (Molecular Probes, France) qui absorbe à 565 nm et émet à une longueur d'onde de 586 nm.

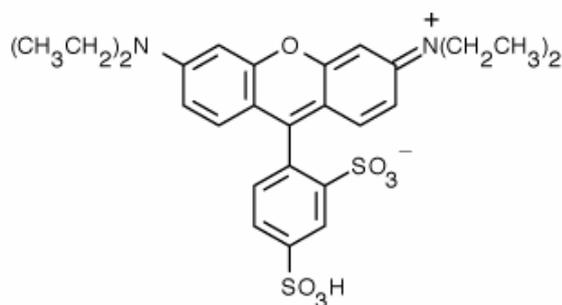


Figure 18 : Formule de la sulforhodamine B

Les particules fluorescentes synthétisées sont des CSD(+) de rapport de charge R=2. La sulforhodamine est ajoutée à la solution en défaut de sulfate de dextrane à une concentration finale de 10⁻⁵ mol/L. Cette solution est versée rapidement sur la solution de chitosane placée sous agitation magnétique à 1 000 rpm. Le mélange est laissé 30 secondes sur l'agitateur à 500 rpm, puis il est centrifugé pendant 30 minutes à 6 000 g. Le surnageant est éliminé par retournement, le culot est repris dans de l'eau distillée et filtrée, puis à nouveau centrifugé pendant 30 minutes à 6 500 g. Les culots ainsi obtenus sont repris dans 200 µL d'eau filtrée et conservés à température ambiante sous agitation constante. Les particules obtenues sont caractérisées par une mesure de leur taille et de leur charge ainsi que de leur taux de solide.

4.4. Caractérisation des lots de particules

4.4.1. Mesure du taux de solide des solutions de particules

Le taux de solide correspond à la concentration massique de la solution de particules. Il est mesuré pour chaque lot de particules après leur synthèse. Le taux de solide est calculé à partir de la pesée d'un volume de solution colloïdale, qui est ensuite séché à l'étuve pendant une nuit à 50°C.

4.4.2. Mesure de taille des particules

Les mesures de taille des différentes particules sont effectuées par diffusion quasi-élastique de lumière sur un sizer nanoS (Malvern Instruments, R.U.) cet appareil est équipé dans laser He/Ne opérant à 633 nm, les mesures étant effectuées à une température de 25°C et à un angle de 90°. Le diamètre hydrodynamique moyen et la distribution en taille (indice de polydispersité I_p) des particules sont déterminés à partir d'une solution très diluée de particules dans une solution de NaCl 1 mM. La mesure exprimée en nm est donnée par l'appareil après intégration de 4 mesures successives. L' I_p est une valeur qui s'échelonne de 0 à 1, un échantillon monodisperse en taille ayant une valeur proche de 0.

4.4.3. Mesure de charge des particules

La charge des particules est mesurée sur un zétasizer nanoZS (Malvern Instrument, R.U.) qui permet de mesurer la charge de surface ou potentiel zéta. Ces mesures sont déterminées à partir d'une solution très diluée de particules dans une solution de NaCl 1 mM. La mesure exprimée en mV est donnée par l'appareil après intégration de 5 mesures successives.

4.4.4. Estimation de la concentration en particules

La détermination de la concentration massique de la solution de particules et du diamètre moyen de ces particules permet d'estimer le nombre de particules qui composent cette solution.

Concentration de la solution de particules en nombre de particules

$$N = 1/(M \times T_s)$$

N : nombre de particules par gramme de solution (pour 100 mL)

Ts : taux de solide en % (masse de polymère par gramme de solution : 100 mL)

M : masse d'une particule en g $M(g) = V(dm^3) \times d(dm^3/kg) \times 1000$

V : volume d'une sphère ($V = 4/3 \pi r^3$)

r : rayon moyen des particules en dm

d : densité du polymère soit 1,25 dm³/kg

4.4.5. Quantification des solvants résiduels par RMN

Pour quantifier les solvants résiduels après synthèse des lots de particules de PLA, les spectres de résonances magnétiques du proton ont été enregistrés sur un spectromètre 500 MHz. Les particules diluées dans de l'eau à un taux de solide de 2% sont dissoutes dans de l'acétone deutéré. Le PLA dont on connaît la concentration sert d'étalon interne, permettant la quantification des différents composants (PLA, acétone, éthanol).

Le passage en RMN des lots de particules de CSD diluées dans l'eau deutérée, à laquelle est rajouté un peu de DCI, permet de déterminer le nombre de fonction acétyl et donc de connaître le DA des particules.

5. Élaboration des immuno-complexes particulaires

5.1. La protéine p24

La production de la protéine p24 chez E. Coli a été développée au laboratoire puis la technologie a été transmise à la société *Protéine Expert* qui en assure maintenant la production.

5.1.1. Adsorption de la protéine p24 sur les particules de PLA

Le protocole général d'adsorption de la protéine p24 à la surface des particules de PLA est le suivant : il consiste à mélanger volume à volume la protéine p24 diluée en tampon PBS 1X (Invitrogen, Cergy Pontoise) et les particules diluées à 1% en PBS 1X dans un tube eppendorf 2 mL à fond rond. La solution est agitée par rotation sur une roue à température ambiante. À la fin de l'incubation, les particules sont centrifugées à 1000 g pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant est récupéré et centrifugé à nouveau à 10 000 g pendant 10 minutes, pour éliminer complètement les particules, et la concentration de protéine résiduelle est dosée en utilisant le kit BCA (Pierce, Illkirch), avec l'albumine de sérum bovin utilisé comme étalon. Le culot des PLA-p24 est repris dans le tampon PBS 1X.

5.1.2. Adsorption de la protéine p24 sur les particules de CSD

Le protocole général d'adsorption de la protéine p24 à la surface des particules de CSD est le suivant : il consiste à mélanger volume à volume la protéine p24 diluée en tampon PBS 1X et les particules diluées à 0,2% ou 2% dans du PBS 1X dans un tube eppendorf 2 mL à fond rond. La solution est agitée par rotation sur une roue à température ambiante. A la fin de l'incubation, une partie des particules sont centrifugées à 1000 g pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant est récupéré et centrifugé à nouveau à 10 000 g pendant 10 minutes pour éliminer complètement les particules. La concentration de protéine résiduelle est dosée en utilisant le kit BCA, avec l'albumine de sérum bovin utilisé comme étalon. Le rendement d'adsorption étant très proche des 100%, les particules CSD-p24 ne sont pas centrifugées et peuvent être utilisées directement.

5.2. La protéine gp140

5.2.1. Adsorption de la protéine gp140 sur les particules de PLA

Le protocole général d'adsorption de la protéine gp140 à la surface des particules de PLA est le suivant : il consiste à mélanger volume à volume la protéine gp140 diluée à 150 µg/mL en tampon PBS 1X et les particules diluées à 0,25% dans de l'eau stérile dans un tube eppendorf 2 mL à fond rond. La solution est agitée par rotation sur une roue pendant 2 heures à température ambiante. À la fin de l'incubation, les particules sont centrifugées à 1000 g pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant est récupéré et centrifugé à nouveau à 1000 g pendant 10 minutes pour récupérer les particules non culottées à la centrifugation précédente. Le surnageant est à nouveau récupéré puis centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes, afin éliminer complètement les particules, et la concentration de protéine résiduelle est dosée en utilisant le kit BCA, avec l'albumine de sérum bovin utilisé comme étalon. Le culot des PLA-gp140 est repris dans le tampon PBS 1X.

5.2.2. Adsorption de la protéine gp140 sur les particules de CSD

Le protocole général d'adsorption de la protéine gp140 à la surface des particules de CSD est le suivant : il consiste à mélanger volume à volume la protéine gp140 diluée en tampon PBS 1X et les particules diluées à 0,2% ou 2% dans du PBS 1X dans un tube eppendorf 2 mL à fond rond. La solution est agitée par rotation sur une roue à température ambiante. À la fin de l'incubation, une partie des particules est centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant est récupéré et centrifugé à nouveau à 10 000 g pendant 10 minutes, pour éliminer complètement les particules, et la concentration de protéine résiduelle est dosée en utilisant le kit BCA, avec l'albumine de sérum bovin utilisé comme étalon. Le rendement d'adsorption étant très proche des 100% les particules CSD-gp140 ne sont pas centrifugées et peuvent être utilisées directement.

5.3. Les TLR ligands

5.3.1. Adsorption du poly (I :C) sur les particules de PLA

a) PLA nues

Le protocole général d'adsorption du poly (I:C) à la surface des particules de PLA est le suivant : il consiste à mélanger volume à volume le poly (I:C) dilué en tampon PBS 1X à la concentration voulue (0,5 g/L, 0,1 g/L ou 0,01 g/L) et les particules diluées à 0,2% ou 2% dans du PBS 1X dans un tube eppendorf Low binding DNA 2 mL à fond rond. La solution est agitée par rotation sur une roue à

température ambiante. À la fin de l'incubation, les particules sont centrifugées à 1000 g pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant est récupéré et centrifugé à nouveau à 10 000 g pendant 10 minutes pour éliminer complètement les particules et la concentration de poly (I:C) est dosée en utilisant le Nanodrop ou le kit QuantiT picogreen (Invitrogen, Cergy Pontoise). Les culots sont repris dans du PBS 1X.

b) PLA avec protéine en surface

Le protocole utilisé pour adsorber le poly (I:C) sur des particules de PLA portant soit la p24 soit la gp140 à leur surface est le même que ci-dessus.

5.3.2. Adsorption du poly (I:C) sur les particules de CSD

a) CSD nues

Le protocole général d'adsorption du poly (I:C) à la surface des particules de CSD est le suivant: il consiste à mélanger volume à volume le poly (I:C) dilué en tampon PBS 1X (Invitrogen, France) à la concentration voulue (0,5 g/L, 0,1 g/L ou 0,01 g/L) et les particules diluées à 0,2% ou 2% dans du PBS 1X dans un tube eppendorf Low binding DNA 2 mL à fond rond. La solution est agitée par rotation sur une roue à température ambiante. À la fin de l'incubation, une partie des particules est centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant est récupéré et centrifugé à nouveau à 10 000 g pendant 10 minutes, pour éliminer complètement les particules, et la concentration de poly (I:C) est dosée en utilisant le Nanodrop ou le kit QuantiT picogreen (Invitrogen, Cergy Pontoise). Le pourcentage d'adsorption du poly (I:C) sur les particules de CSD étant proche de 100%, il n'est pas nécessaire de les centrifuger, elles peuvent être utilisées en l'état.

b) CSD avec protéine en surface

Le protocole utilisé pour adsorber le poly (I:C) sur des particules de CSD portant soit la p24 soit la gp140 à leur surface est le même que ci-dessus.

5.3.3. Adsorption du poly U sur les particules de PLA

a) PLA nues

Le protocole général d'adsorption du poly U à la surface des particules de PLA est le suivant : il consiste à mélanger volume à volume le poly U dilué en tampon PBS 1X à la concentration voulue (0,5 g/L ou 0,1 g/L) et les particules diluées à 0,2% ou 2% dans du PBS 1X dans un tube eppendorf Low binding DNA 2 mL à fond rond. La solution est agitée par rotation sur une roue à température ambiante. À la fin de l'incubation, les particules sont centrifugées à 1000 g pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant est récupéré et centrifugé à nouveau à 10 000 g pendant 10 minutes, pour éliminer complètement les particules, et la concentration de poly U est dosée en

utilisant le Nanodrop ou le kit QuantIT ribogreen (Invitrogen, France). Les culots sont repris dans du PBS 1X.

b) PLA avec protéine en surface

Le protocole utilisé pour adsorber le poly U à la surface des particules de PLA portant soit la p24 soit la gp140 à leur surface est le même que ci-dessus.

5.3.4. Adsorption du poly U sur les particules de CSD

a) CSD nues

Le protocole général d'adsorption du poly U à la surface des particules de CSD est le suivant: il consiste à mélanger volume à volume le poly U dilué en tampon PBS 1X (Invitrogen, Cergy Pontoise) à la concentration voulue (0,5 g/L ou 0,1 g/L) et les particules diluées à 0,2% ou 2% dans du PBS 1X dans un tube eppendorf Low binding DNA 2 mL à fond rond. La solution est agitée par rotation sur une roue à température ambiante. À la fin de l'incubation, les particules sont centrifugées à 1000 g pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant est récupéré et centrifugé à nouveau à 10 000 g pendant 10 minutes, pour éliminer complètement les particules, et la concentration de poly U est dosée en utilisant le Nanodrop ou le kit QuantIT ribogreen. Les culots sont resuspendus à la concentration voulue en PBS 1X.

b) CSD avec protéine en surface

Le protocole utilisé pour adsorber le poly U à la surface des particules de CSD portant soit la p24 soit la gp140 à leur surface est le même que ci-dessus.

6. Évaluation des complexes sur des modèles cellulaires - préparation des cellules à l'origine des cellules dendritiques

6.1. Les cellules dendritiques dérivées de monocytes

Ces cellules dendritiques humaines sont obtenues par différenciation de monocytes de sang humain.

6.1.1. Préparation des cellules à l'origine des cellules dendritiques (Lavenzechia, 1999)

Une poche de sang frais (450 mL) est diluée au demi dans du PBS 1X enrichi avec 400 µL de gentamycine ainsi que 1 mL d'EDTA. La poche de sang est répartie sur des tubes contenant du FICOLL (Sigma Aldrich, Lyon) de densité 9,007. Les tubes sont alors centrifugés 20 minutes à 600 g à température ambiante sans frein, avec une accélération faible. Les anneaux de cellules mononuclées, situés juste au-dessus du Ficoll, sont récupérés dans des tubes Falcon de 50 mL à hauteur de 30 mL de leucocytes par tubes. Ces derniers sont complétés à 50 mL avec du PBS 1X contenant 50% de sérum de veau fœtal (SVF), puis centrifugés 10 minutes à 400 g à 4°C. Les culots sont lavés par centrifugation 10 minutes à 400 g à température ambiante. Le culot cellulaire est alors repris dans 36 mL de RPMI contenant 10% de SVF. À ce stade, une numération de la suspension cellulaire sur cellule de Malassez avec coloration au bleu Trypan est effectuée aux 1/10°.

Pour pouvoir enrichir la culture de cellules en monocytes les cellules sont séparées par un gradient de densité grâce à un mélange de 45 mL de PERCOLL, dilué au demi en PBS 1X. Les tubes sont centrifugés pendant 20 minutes à 700 g et à température ambiante sans frein, avec une faible accélération. Les anneaux de monocytes sont récupérés à la pipette et regroupés dans deux tubes Falcon de 50 mL puis lavés en OBS par centrifugation 10 minutes à 700 g et 4°C. Les culots de monocytes sont regroupés et à nouveau lavés en RPMI 10% SVF. Les cellules sont à nouveau numérées et la concentration ajustée à $10 \cdot 10^6$ monocytes par mL avec du RPMI 10% SVF enrichi avec 3% de sérum humain (SH). Les anticorps monoclonaux dirigés contre le CD19 (anti-lymphocyte B), le CD3 OKT3 (anti-lymphocyte T), le CD56 NKH1 (anti-lymphocyte NK) (Beckman Coulter, Etats-Unis) sont filtrés et ajoutés sur les cellules à hauteur de 160 µL chacun, ainsi que 16 µL de Glycophorine A. Le mélange cellules anticorps est mis sous agitation 30 minutes à 4°C. Après

deux lavages en RPMI 10 % SVF, le surnageant est éliminé par retournement. Le culot cellulaire est détaché et des billes magnétiques DYNAbeads anti-souris (QIAGEN, Allemagne) sont ajoutées aux cellules à la concentration préconisée par le fabricant. Le mélange est placé sous agitation à 4°C pendant 12 minutes puis mis sur un aimant pour une déplétion magnétique pendant 7 minutes à 4°C après dilution aux 1/3 en RPMI 10% SVF. Le surnageant est récupéré et à nouveau déplété sur l'aimant. Le surnageant récupéré est lavé puis une numération est faite avec une dilution au 1/2.

6.1.2. Différenciation des monocytes en DC immatures

Avant de mettre les monocytes en culture environ 10^6 cellules sont prélevées pour contrôler la pureté de la suspension cellulaire. Les monocytes sont ensuite mis en culture, à une concentration de 500 000 cellules/mL, avec des facteurs de croissance : IL4 $2,5 \cdot 10^{-3}$ µg/L et GM-CSF 0,04 µg/L final. Les cellules sont alors mises en culture pendant 5 jours à 37°C sous 5% de CO₂ et 50% d'humidité. Après ces 5 jours, les cellules sont numérées et phénotypées par cytométrie en flux.

6.1.3. Phénotypage des cellules

Afin de déterminer le type de cellules présentes dans notre culture, des marquages par des anticorps fluorescents sont réalisés pour pouvoir effectuer une lecture par cytométrie en flux. Pour cela, un million de cellules sont prélevées et lavées deux fois en PBS 1X par centrifugation 400 g, à 4°C pendant 10 minutes. Le culot cellulaire obtenu est repris dans 650 µL de PBS BSA (1%) Azide (0,01%) avec 3% de sérum humain (EFS) pour bloquer les récepteurs non spécifiques. Deux microlitres de chaque anticorps (*tableau 5*) sont déposés dans une plaque à 96 puits à fonds coniques. La suspension cellulaire est alors distribuée sur les anticorps, après 30 minutes à 4°C., les plaques sont lavées 3 fois par centrifugation à 700 g, 4°C pendant 2 minutes. Les culots sont resuspendus en PBS BSA Azide et déposés dans des microtubes contenant déjà 100 µl de PBS BSA Azide.

Anticorps	Quantité	Marquage attendu pour les DC immatures	Ref
1 IgG PE (mouse)	2 µL		555787
2 IgG FITC (mouse)	2 µL		555748
3 IgG PE-Cy5 (mouse)	2 µL		555750
4 Anti CD 1a PE (mouse)	2 µL	+	555807
5 Anti CD3 PE (mouse)	2 µL	-	555333
6 Anti CD14 FITC (mouse)	2 µL	-	555397
7 Anti CD 16 FITC (mouse)	2 µL	-	555406
8 Anti CD 25 PE-Cy5 (mouse)	2 µL	-	555433
9 Anti CD 40 PE-Cy5 (mouse)	2 µL	+/-	555590
10 Anti CD80 PE (mouse)	2 µL	+/-	557227
11 Anti CD83 FITC (mouse)	2 µL	-	556910
12 Anti CD86 PE-Cy5 (mouse)	2 µL	+/-	555666
13 Anti HLA DR PE-Cy5 (mouse)	2 µL	+	555813
14 Iodure de propidium (biosource)	4 µL	-	PNN1011
15 Annexine V FITC (Caltag)	2 µL	-	ANNEXINV01

Tableau 5 : Anticorps (BD pharmingen, États-Unis) utilisés pour le phénotypage des cellules obtenues après culture des monocytes

Les cellules sont analysées au cytomètre en flux afin de déterminer la pureté de la culture, leur phénotype, ou vérifier d'éventuelles contaminations cellulaires grâce à un large panel d'anticorps (*tableau 5*) marqués.

6.1.4. Traitement des DC par les particules

Les cellules obtenues après les différentes étapes de séparation et de culture précédentes sont mises en contact avec des particules dans différentes conditions, à raison de 100 µL de particules à 0,1% de taux de solide pour 1 mL de cellules à 1 million/mL. Le mélange est mis en culture à 37°C, 5% de CO2 et 50% d'humidité, pour étudier la maturation des DC après différents temps de culture. L'évolution et l'apparition de certains marqueurs de surface permettent de suivre le phénomène de maturation des cellules dendritiques. La procédure de marquage utilisée est la même que celle employée au paragraphe précédent. Les anticorps utilisés pour suivre la maturation des cellules ainsi obtenues sont décrits dans le tableau ci-contre (*tableau 6*).

	Anticorps	Quantité	Marquage attendu pour les DC matures	Ref
1	IgG PE (mouse)	2 µL		555787
2	IgG FITC (mouse)	2 µL		555748
3	IgG PE-Cy5 (mouse)	2 µL		555750
4	Anti CD 1a PE (mouse)	2 µL	++	555807
5	Anti CD3 PE (mouse)	2 µL	-	555333
6	Anti CD14 FITC (mouse)	2 µL	-	555397
7	Anti CD 56 PE-Cy5 (mouse)	2 µL	-	555517
8	Anti CD 25 PE-Cy5 (mouse)	2 µL	+	555433
3	Anti CD80 PE (mouse)	2 µL	++	557227
10	Anti CD83 FITC (mouse)	2 µL	+	556910
11	Anti CD86 PE-Cy5 (mouse)	2 µL	++	555666
12	Anti HLA DR PE-Cy5 (mouse)	2 µL	+	555813
13	Iodure de propidium (biosource)	4 µL	-	PNN1011
14	Annexine V FITC (Caltag)	2 µL	-	ANNEXINV01

Tableau 6: Anticorps (BD pharmingen, États-Unis) utilisés pour le phénotypage des cellules obtenues après mise en contact avec les particules

6.2. Les cellules de Langerhans dérivées de cellules CD34+

Les cellules de Langerhans sont obtenues après multiplication et différenciation des cellules CD34+ issues du sang de cordon humain.

6.2.1. Préparation des cellules à l'origine des cellules Langerhans

Le tube contenant l'échantillon de sang est décontaminé à l'alcool et le sang est préenrichi grâce au kit RosetteSep (StemCell, Grenoble) avant d'être dilué au 1/4 en PBS 1X. Ce sang dilué est réparti sur des tubes falcon de 50 mL contenant environ 25 mL de Ficoll (Sigma Aldrich, France) de densité 9,007 à 37°C. Les tubes sont alors centrifugés pendant 25 minutes à 2200 rpm à température ambiante, accélération lente et sans frein.

Les anneaux de cellules mononuclées, situés juste au dessus du Ficoll, sont récupérés dans des tubes Falcon de 50 mL puis lavé en PBS 1X par centrifugation pendant 15 minutes à 2000 rpm. Les surnageants sont éliminés et les culots lavés de nouveau en PBS 1X par centrifugation 10 minutes à 1300 rpm. Le surnageant est éliminé et les cellules CD34+ sont récupérées par sélection magnétique grâce au EasySep® Human Cord Blood CD34 Positive Selection Kit (StemCell, Grenoble).

Afin de vérifier la qualité des séparations, des cellules sont prélevées et sont marquées avec les anticorps fluorescents indiqués ci-dessous (*tableau 7*), puis analysées au cytomètre.

	Anticorps	Quantité	Marquage attendu pour les DC immatures	Ref
1	IgG PE (mouse)	2 µL		555787
2	IgG FITC (mouse)	2 µL		555748
3	IgG PE-Cy5 (mouse)	2 µL		555750
4	Anti CD 1a PE (mouse)	2 µL	+	555807
5	Anti CD3 PE (mouse)	2 µL	-	555333
6	Anti CD14 FITC (mouse)	2 µL	-	555397
7	Anti CD 16 FITC (mouse)	2 µL	-	555406
8	Anti CD 25 PE-Cy5 (mouse)	2 µL	-	555433
9	Anti CD 40 PE-Cy5 (mouse)	2 µL	+/-	555590
10	Anti CD80 PE (mouse)	2 µL	+/-	557227
11	Anti CD83 FITC (mouse)	2 µL	-	556910
12	Anti CD86 PE-Cy5 (mouse)	2 µL	+/-	555666
13	Anti HLA DR PE-Cy5 (mouse)	2 µL	+	555813
14	Iodure de propidium (biosource)	4 µL	-	PNN1011
15	Annexine V FITC (Caltag)	2 µL	-	ANNEXINV01

Tableau 7 : Anticorps (BD pharmingen, États-Unis) utilisés pour le phénotypage des cellules obtenues avant culture des CD34+

6.2.2. Mise en culture des cellules

De J0 à J5-7 : les cellules sont cultivées dans le milieu de multiplication à une concentration comprise entre 1 et $2 \cdot 10^6$ cellules/mL. Les cellules vont proliférer de façon plus ou moins intense, en fonction du donneur, à partir de J3. La concentration cellulaire est à ajuster en ajoutant uniquement du RPMI SVF 10% sans cytokines et en changeant la boîte de culture seulement si nécessaire.

Milieu de multiplication J1 à J7	
RPMI SVF 10%	
Flt3-L	50 ng/ml
GM-CSF	50 ng/ml
SCF	25 ng/ml
TPO	10 ng/ml

Tableau 8 : Composition du milieu de multiplication

De J5-7 à J11-14 : les cellules sont différenciées dans le milieu de différenciation à une concentration comprise entre 0,5 et $1 \cdot 10^6$ cellules/mL. Les cellules continuent de proliférer légèrement jusqu'à J9-10 environ. Il faut donc ajuster la concentration en ajoutant uniquement du RPMI SVF 10% sans cytokines et changer la boîte de culture si les cellules parviennent à confluence..

Milieu de différenciation J7 à J14	
RPMI SVF 10%	
GM-CSF	25 ng/mL
TGF-β1	6 ng/mL
TNF-α	2 ng/mL

Tableau 9 : Composition du milieu de différenciation

A l'issue de ces deux étapes, un phénotypage est réalisé à chaque étape et tout au long de la différenciation, afin de suivre l'expression du CD207, et des autres marqueurs d'intérêts.

Une fois les cellules caractérisées, elles peuvent être utilisées directement en suivant le même protocole que pour le chapitre 3.1.4 (*cf. 3.1.4 Traitement des DC par les particules*). Sinon, elles sont congelées pour constituer un stock de cellules.

6.2.3. Congélation/décongélation des cellules stock

a) Congélation

La congélation est réalisée après lavage des cellules à congeler. Le milieu de congélation utilisé est constitué de 90% de SVF et de 10% de DMSO. Le culot de cellules est remis en suspension par « grattage ». Les cellules à la concentration voulue sont placées dans du milieu de congélation froid (voir tableau 10), puis sont distribuées dans des ampoules de congélation (Nunc). Ces dernières seront immédiatement mises dans une boîte de congélation au congélateur -80°C. Après quelques jours, les cellules peuvent être congelées dans de l'azote liquide.

Stage de congélation	Concentration de congélation
CD34+ J0	entre 1 et 2.10 ⁶ cellules par ampoule/mL
CD34+ J7	entre 10 et 25.10 ⁶ cellules par ampoule/mL
LC/IDC J12	entre 15 et 25.10 ⁶ cellules par ampoule/mL

Tableau 10 : Concentrations optimales de congélations selon le stade des cellules

b) Décongélation

Selon le stade de congélation des cellules la procédure de décongélation varie :

- **à J0 : cellules CD34+**

Dans ces conditions, les cellules sont décongelées puis mises en culture dans le milieu de multiplication à 2.10⁶ cellules/mL.

- **à J5-7 : cellules CD34+**

La congélation se fait alors après le stade de multiplication et avant celui de différenciation. Dans ces conditions, les cellules sont décongelées puis mises en cultures dans le milieu de différenciation à 1,5.10⁶ cellules/mL. Un lavage peut être

réalisé après 2 jours, afin d'éliminer les débris cellulaires. Il est nécessaire de remettre des cytokines dans le milieu après lavage.

- **à J12 : au moment où le CD207 commence à être exprimé sur les LC**

Dans ces conditions, les cellules sont décongelées puis mises en cultures dans le milieu de différenciation à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL. Elles peuvent être utilisées 20h après la décongélation.

Dans tous les cas, les ampoules sont mises à décongeler au bain marie quelques minutes. Lorsqu'il reste un gros glaçon dans l'ampoule, les cellules sont diluées avec 500µL de RPMI chaud, puis récupérées et cette fois diluées dans 50 mL de RPMI chaud. Les cellules sont alors centrifugées 10 minutes à 1300 rpm et remises en suspension dans le milieu adéquat.

6.3. Microscopie confocale

6.3.1. Analyse par microscopie

a) Observation en microscopie optique (lumière blanche/fluorescence)

Des photos de microscopie optique en lumière blanche et en fluorescence sont réalisées à l'aide d'un microscope Axioplan 2 Imaging (Zeiss, Allemagne), équipé d'une caméra et d'un objectif à immersion dans l'huile Plan-NEOFLUAR (Zeiss, Allemagne) avec un grandissement x100 et une ouverture numérique de 1,3. Cet appareil dispose de deux sources de lumière : une lampe halogène (HAL 100) pour la lumière blanche et une lampe à mercure (HBO 100) pour la fluorescence. L'échantillon à analyser est dilué puis séché sur une lame porte-objet et enfin couvert avec une lamelle couvre-objet.

b) Observation en microscopie confocale

La microscopie confocale est une technique qui améliore la résolution axiale et latérale de la microscopie optique en fluorescence. Le microscope confocale Spectral TCS SP5 AOBS de Leica propose aussi la séparation spectrale.

La microscopie confocale permet aussi d'acquérir des coupes sériées optiques des échantillons et rend possible la visualisation tridimensionnelle des tissus et la localisation intracellulaire de plusieurs marqueurs fluorescents (colocalisation).

Les lasers utilisés par ce microscope sont :

- Diode laser 405 nm
- Argon 458/488/514 nm
- Diode laser 561 nm

- Hélium/Néon 633 nm

6.4. Cytométrie en flux

Les analyses de cytométrie en flux sont effectuées au plateau technique de l'ifr 128 (http://www.ifr128.prd.fr/Plateau_Cytometrie.htm) sur un FACSCALIBUR 3C.

7. Évaluation des complexes *in vivo*

7.1. Animaux

Le protocole d'immunisation est réalisé sur des souris femelles balb/c ou B6D2 F1 âgées de 5 semaines en début de protocole et fournies par le laboratoire Charles River (L'Arbresle). Les animaux sont hébergés au PBES (ENS, Lyon).

7.2. Voies d'immunisation

L'administration des formulations aux souris a été effectuée par voie sous-cutanée au niveau du pli de la cuisse, afin de viser les ganglions inguinaux. Les injections répétées ont été faites en alternant les côtés, pour éviter une nécrose des tissus. Pour des raisons pratiques, ces administrations ont été faites sous anesthésie gazeuse à l'isofluorane.

7.3. Les solutions d'immunisation

Plusieurs expériences d'immunisation ont été réalisées et sont résumées ci-dessous (*tableaux 11 et 12*).

Dans la première expérience (protocole 1) des souris balb/c sont utilisées. Le témoin positif consiste en un groupe auquel sont injectées des particules de PLA recouvertes de 10µg de p24, afin de comparer l'efficacité de ce vecteur protéique en fonction de son taux de solide.

Groupe	Nombre de souris	Dose	Voie	Volume
A	5	10µg PLA-p24 SC	SC	100 µl
B	5	10µg p24-CSD 1%	SC	100 µl
C	5	1µg p24-CSD 1%	SC	100 µl
D	5	10µg p24-CSD 0,1%	SC	100 µl
E	5	1µg p24-CSD 0,1%	SC	100 µl
F	5	CSD 1% / CSD 0,1% témoins	SC	100 µl

Tableau 11 : Plan d'injection des souris (protocole 1); SC : injection sous-cutanée

A) 10µg PLA-p24: polyacide lactique avec 10µg de p24 en surface ; B) 10µg p24-CSD (**1%**) : particules de chitosane/sulfate de dextrane à 1% de taux de solide avec 10µg de p24 en surface ; C) 1µg p24-CSD (**1%**) : particules de chitosane/sulfate de dextrane à 1% de taux de solide avec 1µg de p24 en surface ; D) 10µg p24-CSD (**0,1%**) : particules de chitosane/sulfate de dextrane à 0,1% de taux de solide avec 10µg de p24 en surface ; E) 1µg p24-CSD (**0,1%**) : particules de chitosane/sulfate de dextrane à 0,1% de taux de solide avec 1µg de p24 en surface ; F) CSD (**1%**) / CSD (**0,1%**) : particules de chitosane/sulfate de dextrane à 1% de taux de solide et particules de chitosane/sulfate de dextrane à 0,1% de taux de solide servant de contrôle négatif.

Dans cette deuxième expérience (protocole 2) des souris B6D2 F1 sont utilisées.

Groupe	Nombre de souris	Dose	Voie	Volume
A	5	(0,01 g/L) P24	SC	100 µl
B	5	(0,01 g/L) P24-PLA (0.02%)	SC	100 µl
C	5	CSD(+) (0.1%) + (0,01 g/L) P24	SC	100 µl en mélange
D	5	(0,01 g/L) P24 + (0,01 g/L) Poly(I:C)	SC	100 µl en mélange
E	5	(0,01 g/L) P24-PLA (0.02%)+ (0,01 g/L) Poly(I:C)	SC	100 µl en mélange
F	5	(0,01 g/L) P24-PLA (0.02%)+ CSD(+) (0.1%)	SC	100 µl en mélange
G	5	(0,01 g/L) Poly(I :C)- CSD(+) (0.1%)+ (0,01 g/L) P24	SC	100 µl en mélange
H	5	(0,01 g/L) P24-PLA (0.02%) + (0,01 g/L) Poly(I :C)- CSD(+) (0.1%)	SC	100 µl en mélange

Tableau 12 : Plan d'injection des souris (protocole 2) ; SC : injection sous-cutanée

A) p24 en solution à 0,01 g/L ; B) particules de PLA à 0,02% de taux de solide recouvertes de 0,01 g/L de p24 ; C)

7.3.1. La protéine p24

La protéine p24 est fournie par la société Protein Expert (Grenoble), stérile, purifiée des contaminants cellulaires et des endotoxines, en tampon PBS.

7.3.2. Le poly (I:C)

Le poly (I:C) est fourni par la société Invivogen (Toulouse), purifié en endotoxine, stérile et repris en tampon PBS.

7.3.3. Les particules de PLA

Les particules de PLA sont synthétisées de façon « stérile » : l'ensemble de la verrerie est prélavée à l'éthanol. Après synthèse, la stérilité des lots est vérifiée en étalant environ 100 µL de particules sur une boîte de pétri contenant de l'agarose sans antibiotiques. Une boîte sert de contrôle sur laquelle du PBS stérile est étalé. Après 24 heures d'incubation à 37°C, on vérifie l'absence de colonies de microorganismes. De plus, un dosage d'endotoxine peut être réalisé à partir du lot de particules. Néanmoins, la forte concentration de particules peut interférer avec le dosage.

7.3.4. Les particules de CSD

Les particules de CSD sont synthétisées de façon « stérile » : la mise en solution du chitosane et du sulfate de dextrane est réalisée dans de la verrerie prélavée à l'éthanol. Les mélanges sont mis sous agitations dans des pots stériles à usage unique sous une hotte à flux laminaire. Les différents lavages sont faits à l'eau stérile ou au PBS stérile et toujours sous la hotte. De la même façon que les PLA, les lots de particules sont contrôlés par étalement sur boîte de pétri. Le dosage d'endotoxine est plus difficile à effectuer car les particules semblent « boucher » le système.

7.4. Dosage ELISA des anticorps anti-p24

La présence des anticorps anti-p24 dans les séra pré-immuns et immuns a été déterminée par ELISA. La protéine p24 a été utilisée en capture et diluée à 1 µg/mL en PBS. 100 µL de cette solution sont distribués dans les puits d'une plaque 96 puits et incubés pendant la nuit à température ambiante. Le lendemain, la plaque est vidée par renversement, puis les puits sont saturés par 200 µL d'une solution de PBS-lait 10% pendant une heure à 37°C. Les séra de souris sont dilués en cascade au 1/10^{ème} dans du PBS contenant 1% de BSA, 100 µL de chaque dilution sont déposés sur la plaque et incubés une heure à 37°C. Les puits sont lavés 3 fois avec 200 µL de PBS-Tween 0,05%. La fixation des anticorps spécifiques est révélée par addition d'un conjugué anti-souris ; il s'agit d'anticorps anti-IgG total ou anti-IgG1 ou anti-IgG2a de souris couplés à la peroxydase (HRP) et dilués à 0,1 µg/mL en PBS-BSA 1%. La révélation est effectuée par 100 µL du réactif TMB, pendant 30 minutes à l'obscurité après une incubation de la réaction pendant une heure. L'acide sulfurique (1N, 100 µL) permet de stopper la réaction. La lecture des absorbances s'effectue à 450 nm sur le lecteur de plaques. Pour chaque souris le titre en anticorps spécifiques est déterminé.

7.5. Évaluation par la technique ELISPOT du nombre de cellules produisant l'IFNγ et l'IL4

L'ELISPOT permet de déterminer le nombre de cellules sécrétant une cytokine donnée, en réponse à un stimulus spécifique. Les cellules utilisées pour ces ELISPOT sont les cellules des rates des souris immunisées selon les indications du tableau 3.

Après dissection de la rate et obtention d'une suspension cellulaire à 10.10⁶ cellules/mL, les hématies présentes dans la suspension cellulaire sont lysées pour ne récupérer que les splénocytes.

La mise en culture pour l'ELISPOT stimulé par un fragment de la p24 (le peptide AMQ) est réalisée de la manière suivante : dans les plaques d'ELISPOT 96 puits avec des membranes de PVDF (Millipore) les anticorps anti-IFN-γ ou anti-IL-4 murin (10µg/mL en PBS) sont fixés et incubés pendant la nuit, à 4°C. Les plaques sont ensuite lavées et saturées par du milieu de culture αMEM (milieu essentiel minimum) complet, pendant 3 heures à 37°C. Les cellules spléniques sont alors reprises à 3.10⁶ splénocytes/ml, auxquelles on ajoute de l'IL-2 à une concentration

finale de 10U/ml. 300 000 cellules sont distribuées par puits et incubées avec 10 μ M final de peptide à tester. Pour chaque souris, on fait une stimulation spécifique avec le peptide AMQ de la p24 et aussi un contrôle négatif avec un peptide irrelevant. Une stimulation totale, non spécifique, servant de témoin positif est réalisée en utilisant la concanavaline A à 5 μ g/ml finale. Les plaques sont incubées 20 heures à 37°C.

En ce qui concerne l'ELISPOT stimulé par la p24 entière, la mise en culture des cellules est effectuée comme pour l'ELISPOT peptide. En revanche, au lieu d'utiliser une stimulation par IL-2 + peptide, les splénocytes sont stimulés par 5 μ g/mL final de la protéine p24. Les plaques sont incubées 42 heures à 37°C.

Après l'incubation, les plaques sont lavées 6 fois en PBS-Tween 0,05% pour éliminer les cellules et les molécules non fixées, puis 100 μ L d'un anticorps de détection biotinylé spécifique de la cytokine d'intérêt (1 μ g/mL) sont distribués dans les puits et incubés pendant la nuit à 4°C à l'obscurité. Après 6 lavages en PBS-Tween 0,05%, 100 μ L d'extravidine-phosphatase alcaline sont ajoutés (dilution au 1/6000) et incubés une heure à température ambiante. Les spots qui correspondent à chaque cellule sécrétant la cytokine d'intérêt sont révélés par les substrats de la phosphatase alcaline (Biorad, Marne la coquette). La réaction est stoppée par lavage à l'eau distillée. Le nombre de spots dans les puits est compté au microscope en utilisant le logiciel KS Elispot (Zeiss, Allemagne).

Résultats et discussion

8. Élaboration de colloïdes multifonctionnels

L'utilisation des nanoparticules comme adjuvants et vecteurs de vaccination impose la capacité à l'adsorption ou à l'encapsulation des antigènes d'intérêt. Ce travail propose de combiner la vectorisation de l'antigène par les particules ainsi que le potentiel adjuvant des TLR ligands. Pour cela, il faut que les supports particuliers soient polyvalents.

Cette partie de l'étude décrit les capacités des deux différents types de particules choisies à adsorber des protéines d'intérêt et les TLR ligands sélectionnés, tout d'abord séparément puis conjointement.

8.1. Nanoparticules de PLA et interactions avec des molécules d'activité biologique

8.1.1. Synthèse des nanoparticules

La méthode de synthèse des nanoparticules utilisée au laboratoire est la nanoprécipitation (Fessi, 1998). Cette méthode, décrite dans la partie matériels et méthodes (cf. 4.1.1 Synthèse des particules de PLA par nanoprécipitation), est également appelée diffusion de solvant et nécessite une phase solvant (acétone), dans laquelle le PLA est dissout, et une phase aqueuse (mélange éthanol/eau), dans laquelle le PLA va précipiter. La solution organique de PLA est coulée avec un débit modéré dans la phase aqueuse sous agitation. Ce mélange conduit à la formation des nanoparticules de PLA non solubles dans l'eau. L'acétone et l'éthanol sont ensuite éliminés par évaporation sous vide. La nanoprécipitation permet ainsi de former des nanoparticules contenant moins de 2% de solvants.

8.1.2. Caractérisation des nanoparticules

a) Taille

Le diamètre des particules est mesuré par diffusion quasi-élastique de la lumière (cf. 4.4.2 Mesure de taille des particules). Avec la technique de nanoprécipitation, il est possible de synthétiser au laboratoire des particules de 100 à 400 nm avec une bonne reproductibilité des synthèses, en particulier pour les particules d'un diamètre avoisinant les 200 nm.

b) Polydispersité

L'indice de polydispersité, ou I_p , caractérise l'homogénéité de la distribution en taille des particules. Il varie de 0 à 1. Plus il tend vers 0, plus la solution de particules sera monodisperse. La charge de surface des particules est déterminée par mesure du potentiel zêta exprimé en mV. Les lots de particules issus de la synthèse au laboratoire sont monodisperses avec un I_p inférieur à 0,1.

c) Charge de surface

Les particules formées sont chargées négativement, avec une densité de charge importante puisque la valeur du potentiel zêta moyenne est de l'ordre de -55 mV. En effet, les chaînes de polymères portent à leur extrémité une fonction carboxylique, qui se retrouve donc à la surface des particules lorsqu'elles sont synthétisées.

8.1.3. Adsorption de protéines du HIV-1

a) Protéine p24

Les PLA diluées en PBS 1X sont ajoutées volume à volume sur une solution de p24 diluée en PBS 1X, ce qui permet d'obtenir des vecteurs protéiques. La capacité d'adsorption de la p24 à la surface des PLA a été étudiée à la concentration de 0,2 g/L (concentration optimale d'adsorption).

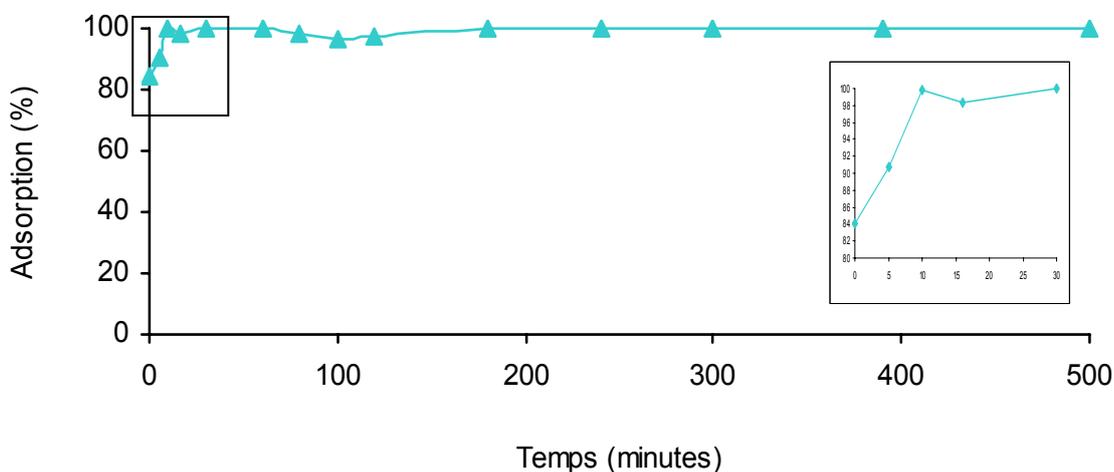


Figure 19: Cinétique d'adsorption de la p24 à 0,2 g/L sur les nanoparticules de PLA; exprimé en pourcentage d'adsorption en fonction du temps en minutes

La p24 présente un maximum d'adsorption avec une atteinte du plateau assez rapide (moins d'une heure). Le rendement d'adsorption correspond à presque 100% de la protéine introduite qui se retrouve sur les particules.

b) Protéine gp140

Les PLA dilués en PBS 1X ajoutés volume à volume sur une solution de gp140 diluée en PBS 1X permet d'obtenir des vecteurs protéiques. La capacité d'adsorption de la p24 à la surface des PLA a été étudiée à la concentration de 0,2 g/L.

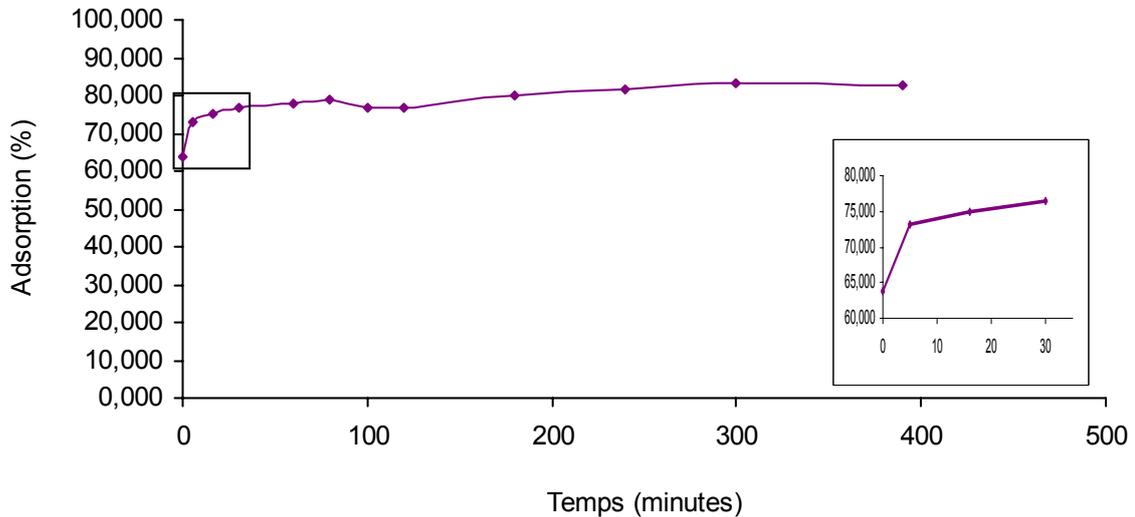


Figure 20: Cinétique d'adsorption de la gp140 à 0,2 g/L sur les nanoparticules de PLA; exprimé en pourcentage d'adsorption en fonction du temps en minutes

La gp140 présente un maximum d'adsorption avec une atteinte du plateau assez rapide (moins d'une heure). Le rendement maximal correspond à plus de 80% d'adsorption de la protéine introduite.

Des deux protéines étudiées, la p24 présente un rendement plus important que la gp140, à concentration équivalente. Il est cependant possible d'obtenir un rendement équivalent à des concentrations moins importantes de gp140.

Les deux types de formulations présentent une bonne stabilité dans le temps (plusieurs mois) et la taille, et l'lp des nanoparticules n'est pas modifié.

8.1.4. Caractérisation des vecteurs protéiques

Plusieurs lots de PLA-p24 ont été synthétisés ; à chaque fois la taille et l'Ip ont été mesurés grâce au Malvern nanoZS (cf. 4.4.2 Mesure de taille des particules).

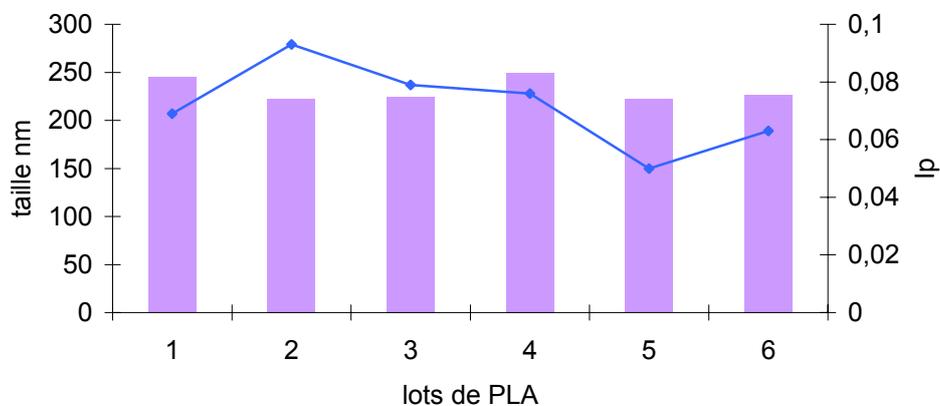


Figure 21: Répartition en taille et en Ip de différents lots de PLA-p24
■ taille des PLA-p24, ■ Ip des PLA-p24

Le diamètre des nanoparticules recouvertes de p24 est plus élevé que celui des particules nues (de 20 à 30 nm de plus) mais les tailles restent relativement homogènes (12 % d'écart entre les tailles les plus élevées et les plus basses). L'indice de polydispersité reste en dessous de 0,1, on peut donc considérer que les PLA-p24 sont monodisperses.

8.1.5. Adsorption de TLR ligands

a) Adsorption du poly (I:C)

○ Adsorption sur les PLA nues

La mise en contact de poly (I:C) dilué en PBS 1X avec des nanoparticules de PLA en PBS 1X permet d'étudier les capacités d'adsorptions de ces particules.

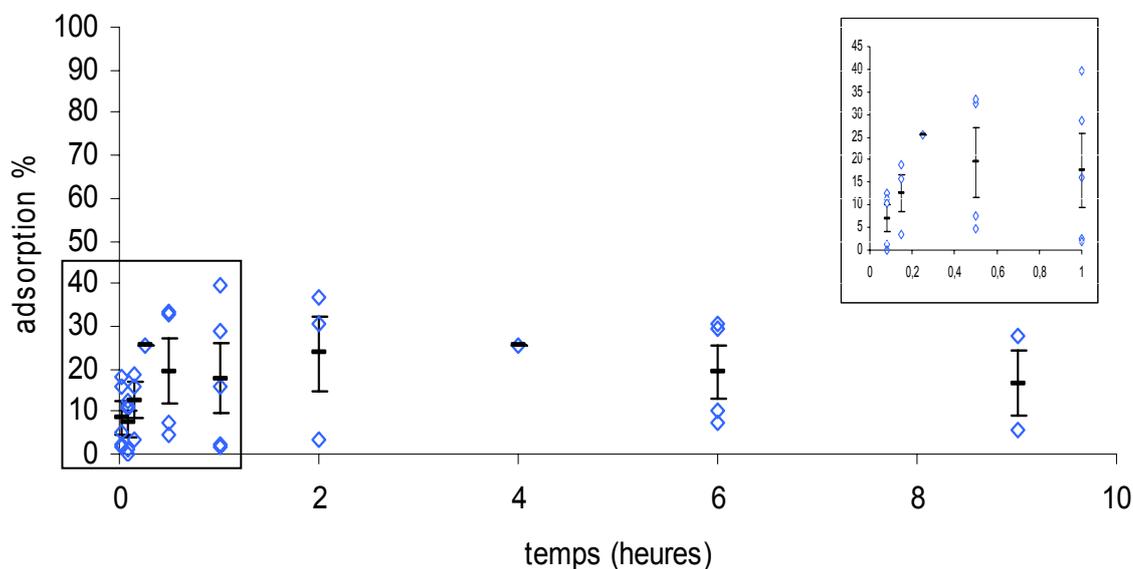


Figure 22: Cinétique d'adsorption du poly (I:C) à 0,5 g/L sur les nanoparticules (à 0,5% de taux de solide) de PLA; exprimée en pourcentage d'adsorption au cours du temps

Comme présenté sur le graphique ci-dessus, il est impossible de déterminer avec certitude l'adsorption ou non du poly (I:C) en surface des nanoparticules de PLA. La grande variabilité des résultats obtenus pourrait être expliquée par une désorption très rapide : il suffirait de quelques minutes de différence pour détecter ou non du poly (I:C) dans le surnageant. De même une variation de centrifugation même infime pourrait déclencher ou non un décrochage du TLR ligand. Une autre hypothèse serait que les particules peuvent interférer avec ce dosage, mais cela reste peu probable.

○ Adsorption sur les PLA formulées avec des protéines

Lors de ces essais d'adsorption, le manque de reproductibilité rencontré lors des tentatives d'adsorption sur PLA nues n'était en aucun cas modifié.

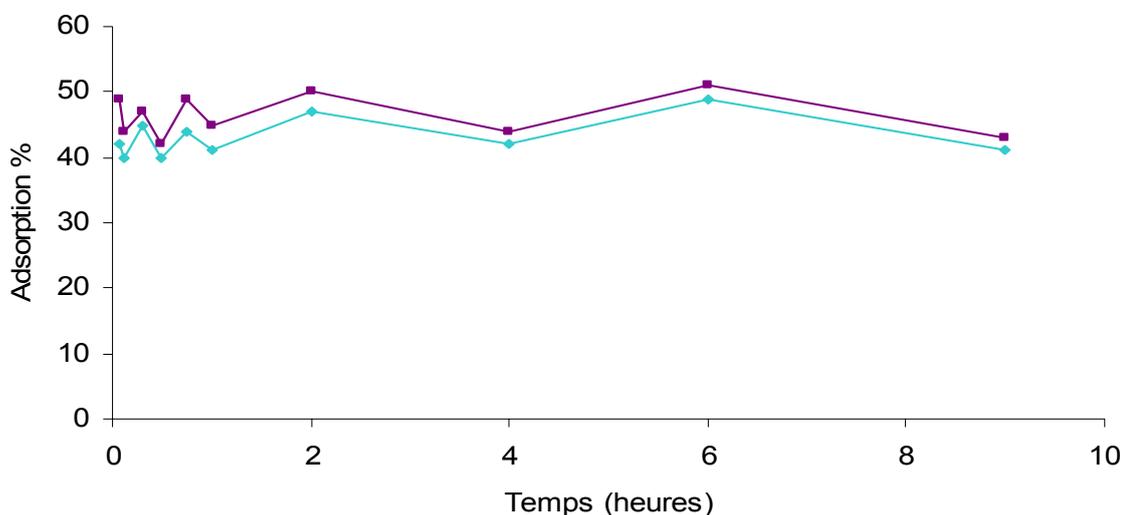
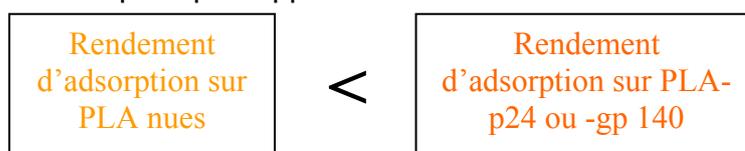


Figure 23: Cinétique d'adsorption du poly (I:C) à 0,5 g/L sur les nanoparticules de PLA (à 0,5% de taux de solide) recouvertes de p24 (0,2 g/L) ou gp140 (0,2 g/L); exprimée en pourcentage d'adsorption au cours du temps

La cinétique d'adsorption du poly (I:C) a été représentée sur des particules de PLA préalablement recouvertes de p24 ou de gp140. L'étude de l'adsorption du poly (I:C) sur ces PLA formulées avec la p24 ou la gp140 montre que la cinétique et le rendement d'adsorption sont quasi-identiques. Si les rendements d'adsorption du poly (I:C) ne sont pas très élevés (inférieurs à 60%), les cinétiques semblent assez rapides, voire quasi immédiates. Il semble qu'il y ait moins de variations de rendement, après environ une heure d'adsorption. Ce fait est probablement lié aux réarrangements des molécules à la surface des particules. Il sera donc bon de ne pas laisser les particules et les complexes en contact moins d'une heure lors des formulations.

Il est tout de même intéressant de mettre en évidence une augmentation globale du rendement d'adsorption par rapport aux PLA nues :



Cette hausse de rendement d'adsorption s'explique par une probable interaction entre la p24 ou la gp140 chargées positivement et le poly (I:C) chargé négativement.

○ Adsorption sur les PLA une fois complexés avec une protéine

Une autre approche de cette co-adsorption a été de tenter d'adsorber directement en surface des particules un mélange de TLR ligand et de protéine, laissés une heure sous agitation pour permettre à d'éventuelles complexations de se faire.

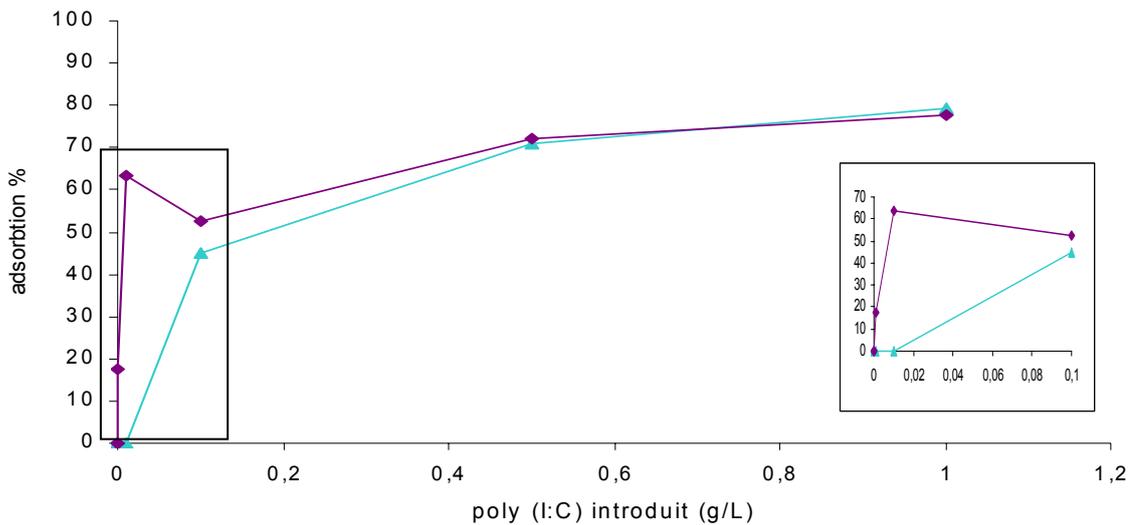
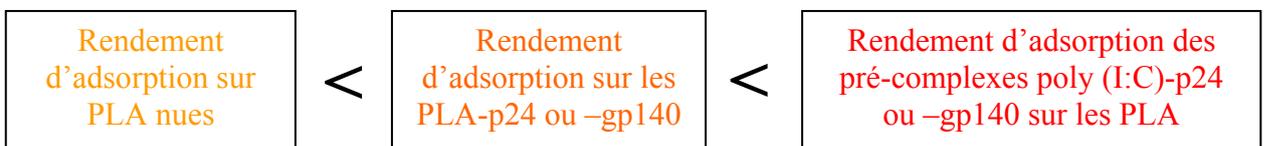


Figure 24 : Isotherme d'adsorption sur les PLA du poly (I:C) (0,5 g/L) complexé avec la p24 (0,2 g/L) et la gp140 (0,2 g/L)

Cette méthode d'adsorption permet d'avoir des résultats plus cohérents et semble reproductible sur les cinq expériences qui ont été faites. Il est donc possible d'interpréter les résultats obtenus sur ces premières isothermes d'adsorption, afin de déterminer la quantité maximale de poly (I:C) que les nanoparticules de PLA sont capables d'adsorber à leur surface. On peut constater que selon la protéine utilisée, la courbe d'adsorption est très différente pour des quantités faibles de poly (I:C) introduites. Cependant, plus les quantités de poly (I:C) augmentent, moins les protéines influent sur l'aspect de la courbe. On peut constater aussi que la quantité adsorbée de poly (I:C) continue d'augmenter et que son plateau ne sera atteint qu'au-delà des 1 g/L de poly (I:C) introduits.

De plus cette méthode permet d'augmenter à nouveau le rendement d'adsorption du poly (I:C).



b) Adsorption du poly U

○ Adsorption sur les PLA nues

Dans le cas du poly U, aucune adsorption n'a pu être détectée, quelles que soient les conditions d'adsorption testées.

○ Adsorption sur les PLA formulées avec des protéines

Lors de ces essais d'adsorption, le poly U ne présente aucune adsorption détectable. Que ce soit au spectromètre de fluorescence, à l'aide du kit QuantIR riboGreen (Invitrogen, Cergy Pontoise) ou à l'aide du Nanodrop tout est retrouvé dans le surnageant.

c) Adsorption sur les PLA une fois complexé avec une protéine

Afin de tenter d'adsorber le poly U à la surface des PLA, eux-mêmes dilués en PBS 1X, la méthode de « précomplexation » avec une protéine a été testée. Ainsi, un mélange protéine-poly U en PBS 1X est mis en contact avec les particules de PLA en PBS 1X.

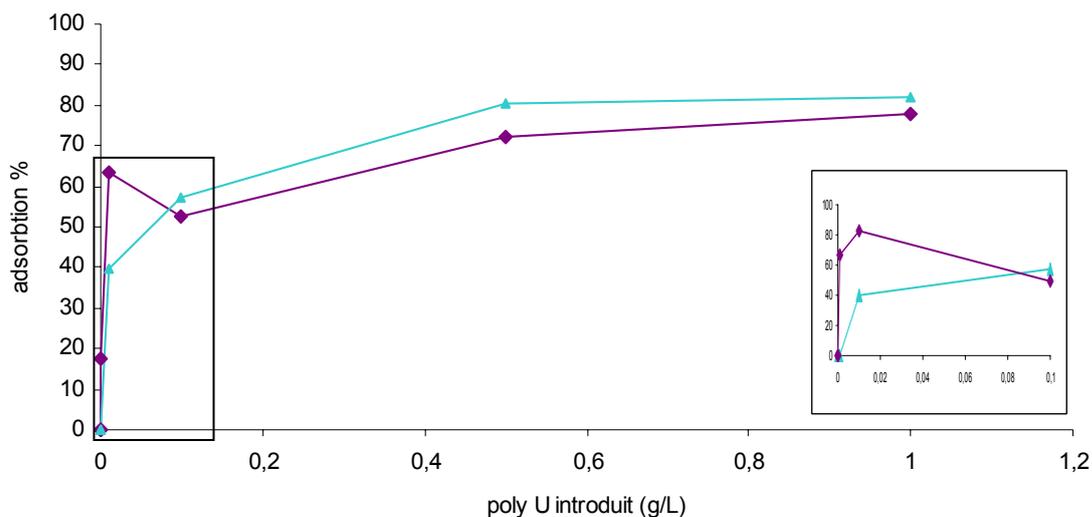


Figure 25 : Isotherme d'adsorption sur les PLA du poly U (0,5 g/L) complexé avec la p24 (0,2 g/L) ou la gp140 (0,2 g/L)

Cette méthode a permis d'obtenir une adsorption détectable du poly U, et ce sur trois expériences répétées. Il est intéressant de constater que, comme le poly U (I:C), la protéine semble avoir une influence sur le profil d'adsorption de faibles quantités de poly U. Pour les plus fortes concentrations de poly U introduites, l'influence des protéines diminue. Quelle que soit la protéine utilisée, le plateau est

atteint pour des quantités supérieures à 0,5 g/L de poly U introduit. Le rendement d'adsorption du complexe poly U-p24 est cependant plus important que celui avec la gp140.

Les deux modèles de pré-complexes TLR ligand-protéine semblent être la meilleure solution afin d'adsorber poly (I:C) ou poly U sur les particules de PLA. Cependant, les études d'adsorption n'en sont qu'à leurs débuts et vont faire l'objet d'un travail systématique dans l'équipe, afin d'affiner et d'améliorer leurs caractéristiques. De même, il conviendrait d'étudier la formation de ce supposé pré-complexe et de le caractériser avant de continuer plus loin sur ce type d'adsorption.

8.2. Nanoparticules de CSD et interactions avec des molécules d'activité biologique

8.2.1. Synthèse des nanoparticules

La méthode de complexation de polyélectrolytes permet de former des particules à base de chitosane et d'un autre polyélectrolyte chargé négativement. La coprécipitation de ces deux solutions aqueuses peut résulter en la synthèse de particules positives ou négatives selon le polyélectrolyte mis en excès. La solution en défaut est versée sur celle en excès sous agitation et les particules sont ainsi synthétisées sans aucun solvant (cf. 4.2.4 Préparation de particules colloïdales à base de polymères).

De nombreux échantillons de chitosanes différents ont été testés lors de la synthèse de particules avec du sulfate de dextrane. Des particules de charge globale positive CSD (+) ou négative CSD (-) peuvent être obtenues selon la nature du polysaccharide en excès lors de la coprécipitation. Les paramètres physicochimiques qui ont un fort impact sur l'obtention des CSD sont le degré d'acétylation et la masse molaire du chitosane, et la masse molaire du sulfate de dextrane, utilisés lors de la synthèse. La charge globale des CSD dépend du rapport molaire de charges $R = \frac{[NH_3^+]}{[SO_3^-]}$. Différents rapports ont été testés avant de définir un R optimal pour chaque type de CSD (+) ou (-).

Solution en excès →	[NH₃⁺]	[SO₃⁻]
Solution en défaut ↓		
[NH₃⁺]		CSD (-) R > 1
[SO₃⁻]	CSD (+) R < 1	

Tableau 13 : Formation de CSD de charge variable

■ impossible de former des particules

Selon des études précédentes effectuées au laboratoire, le rapport de charge optimal dans les cas des CSD (+) est R=2 et R=3, il est R=0,3 pour les CSD (-) (Schatz C., 2002; Drogoz A., 2007). Les effets de la masse molaire et du DA du chitosane et du sulfate de dextrane ont été étudiés en observant leur impact selon trois paramètres : la charge de surface, la taille de polydispersité (Ip) des CSD ainsi formées et leur indice.

8.2.2. 1 - 2 - 2 Caractérisation des nanoparticules

a) Taille

Variable			Taille particules positives		Taille particules négatives	
Chitosane		SD	nm avant centrifugation	nm après centrifugation	nm avant centrifugation	nm après centrifugation
DA %	Mw	Mw				
1	13 000	10 000	205	280	174	998
		500 000	173	304	191	427
1	150 000	10 000	253	362	155	247
		500 000	250	385	216	378
5	32 000	10 000	214	358	201	
		500 000	204	389	202	360
5	130 000	10 000	269	335	148	253
		500 000	258	290	194	379
9	105 000	10 000	255	302	144	580
		500 000	251	299	192	372
11,5	137 000	10 000	312	418	167	583
		500 000	308	444	209	401
30	120 000	10 000	350	614	778	1950
		500 000	327	578	251	497
51	150 000	10 000	308	632		
		500 000	340	714		
71	200 000	10 000	467	1109		
		500 000	560	1238		

Tableau 14 : Répartition en tailles des particules de CSD avant et après centrifugation en fonction de la nature du chitosane et du sulfate de dextrane (SD)
 ■ impossible de former de particules (Weber, 2010).

Dans le cas des CSD (+), la taille définitive augmente avec le DA du chitosane pour les mesures effectuées après centrifugation et redispersion en solution aqueuse. La masse molaire des deux composés ne semble par contre pas avoir d'influence sur les propriétés des CSD (+) formées. En prenant comme exemple les DA 1% et 5%, les tailles ne varient que d'une cinquantaine de nanomètres, ce qui ne représente pas un changement significatif. Une tendance générale peut cependant être constatée pour les CSD (+) après centrifugation : le DA et la masse molaire n'influent pas sur la taille des particules pour les chitosanes dont le DA est inférieur à 11,5% ; au delà, la taille semble augmenter avec le DA.

La taille des CSD (-) augmente après centrifugation. Le DA du chitosane semble être lié à l'augmentation de taille des particules négatives. Les DA 51% et 71% n'ont pas permis de former des CSD (-) lors de cette étude.

b) Polydispersité

Variable			Ip particules positives		Ip particules négatives	
Chitosane		SD	Ip avant centrifugation	Ip après centrifugation	Ip avant centrifugation	Ip après centrifugation
DA %	Mw	Mw				
1	13 000	10 000	0,22	0,35		0,91
		500 000	0,19	0,30	0,19	0,12
1	150 000	10 000	0,49	0,42	0,23	0,14
		500 000	0,48	0,55	0,28	0,06
5	32 000	10 000	0,23	0,29	0,22	
		500 000	0,18	0,61	0,20	0,12
5	130 000	10 000	0,41	0,21	0,19	0,27
		500 000	0,38	0,18	0,22	0,11
9	105 000	10 000	0,23	0,12	0,18	0,30
		500 000	0,34	0,21	0,20	0,10
11,5	137 000	10 000	0,47	0,35	0,20	0,56
		500 000	0,48	0,56	0,22	0,09
30	120 000	10 000	0,44	0,14	0,55	0,46
		500 000	0,45	0,31	0,24	0,07
51	150 000	10 000	0,40	0,34		
		500 000	0,43	0,22		
71	200 000	10 000	0,56	0,47		
		500 000	0,62	0,34		

Tableau 15 : Répartition des Ip des particules de CSD avant et après centrifugation en fonction de la nature du chitosane et du sulfate de dextrane (SD)
 ■ impossible de former de particules (Weber, 2010).

Les indices de polydispersité sont assez élevés. Cet indice, dans le cas des CSD (+), semble être peu influencé par les caractéristiques des polymères. De même que pour la taille, l'Ip semble d'autant plus élevé pour les DA les plus grands.

L'indice de polydispersité (Ip) des CSD (-) après centrifugation dépend de la masse molaire du sulfate de dextrane. Il est d'autant plus élevé que la masse est faible.

b) Surface de charge

Variable			Charge de surface particules positives mV	Charge de surface particules négatives mV
Chitosane		SD		
DA %	Mw	Mw		
1	13 000	10 000	20	- 34
		500 000	6	- 37
1	150 000	10 000	10	- 37
		500 000	13	- 31
5	32 000	10 000	28	
		500 000	28	- 36
5	130 000	10 000	25	- 36
		500 000	23	- 29
9	105 000	10 000	23	- 40
		500 000	24	- 21
11,5	137 000	10 000	26	- 35
		500 000	29	- 41
30	120 000	10 000	32	- 36
		500 000	29	- 44
51	150 000	10 000	15	
		500 000	29	
71	200 000	10 000	18	
		500 000	29	

Tableau 16 : Charge de surface des particules de CSD avant et après centrifugation en fonction de la nature du chitosane et du sulfate de dextrane (SD)
 ■ impossible de former de particules (Weber, 2010).

Que l'on observe les CSD (+) ou les CSD (-), aucun des paramètres étudiés ne semble avoir d'impact sur la charge de surface des particules synthétisées. Si l'on observe les particules formées de chitosane de DA > 9% avec le sulfate de dextrane 500 000 g/mol, il est cependant intéressant de constater que la charge de surface est maintenue et ce malgré la baisse du DA et donc de la charge globale du chitosane. Il est admis que la charge de 29 mV maintenue par les particules est la limite de stabilité colloïdale. Il est donc permis de penser que nous sommes en présence de réarrangements des polymères en présence visant à la stabilité des particules formées.

c) Stabilité en milieu salin

Variable		Taille en NaCl 150 mM (nm)		Stabilité en NaCl 150 mM		
Chitosane		SD	CSD positives	CSD négatives	CSD positives	CSD négatives
DA %	Mw	Mw				
1	13 000	10 000	> 2 nm	> 2 nm	non	non
	000	500 000	> 2 nm	> 2 nm	non	non
1	150 000	10 000	> 2 nm	> 2 nm	non	non
	000	500 000	> 2 nm	> 2 nm	non	non
5	32 000	10 000	> 2 nm	> 2 nm	non	■
	000	500 000	> 2 nm	> 2 nm	non	non
5	130 000	10 000	> 2 nm	> 2 nm	non	non
	000	500 000	> 2 nm	> 2 nm	non	non
9	105 000	10 000	> 2 nm	> 2 nm	non	non
	000	500 000	825	> 2 nm	non	non
11,5	137 000	10 000	> 2 nm	> 2 nm	non	non
	000	500 000	1505	1709	non	non
30	120 000	10 000	347	769	> 24 heures	non
	000	500 000	290	456	> 24 heures	non
51	150 000	10 000	328	■	> 6 jours	■
	000	500 000	355	■	> 24 heures	■
71	200 000	10 000	554	■	> 24 heures	■
	000	500 000	671	■	> 24 heures	■

Tableau 17 : Influence du sel sur les différentes particules de CSD synthétisées

; ■ impossible de former de particules (Weber, 2010).

En solution saline NaCl 150 mM, la tendance constatée pour les CSD (+) est inversée ; les particules sont agrégées pour les DA 1%, 5% et 9%, et les tailles des CSD (+) sont diminuées pour des DA supérieurs à 30%. La capacité des CSD (+) formées à résister aux solutions salines dépend du DA du chitosane. En effet, seules les CSD (+) synthétisées avec des chitosanes de DA élevés résistent au moins 24 heures à l'écrantage des charges. Ce point est important car, lors d'une étude en milieu biologique, la concentration minimale en sels requise est de 150 mM NaCl.

Aucune des CSD (-) formées ne supporte la présence de NaCl. En effet, certaines tailles mesurées sont inférieures au micron, mais les colloïdes ont floculé dans les minutes qui suivent.

Les CSD (-) résultant de ces différentes synthèses ne sont donc pas de bons candidats à l'utilisation en milieu biologique. Elles ne seront donc pas utilisées lors de la suite de ces travaux.

Les CSD (+) doivent avoir un DA inférieur à 71% pour permettre d'avoir la taille submicrométrique visée. Seuls les DA supérieurs à 30% présentent une stabilité suffisante pour poursuivre des études au niveau biologique. Il apparaît, en croisant tous les paramètres, que ce sont les CSD (+) synthétisées en utilisant du chitosane de DA 51% et Mw 150 000 g/mol avec un sulfate de dextrane de 10 000 g/mol, qui présentent les meilleures caractéristiques pour la suite de l'étude. C'est ce type de chitosane qu'il va

falloir reproduire au mieux, afin de vérifier si les particules conservent leurs caractéristiques malgré le changement de lot de chitosane. Par convention, pour la suite de ce travail, nous parlerons uniquement de CSD en évoquant les CSD (+), puisque les CSD (-) n'ont pas été retenues.

8.2.3. Avancées sur la synthèse des CSD et leurs nouvelles caractéristiques

Le lot de chitosane (Mahatani, Inde) utilisé pour cette étude est un nouveau lot. Il s'agit du lot 113 de DA 6% et masse molaire 470 000 g/mol avant toute purification ou modification. C'est avec ce lot qu'il faut reproduire le chitosane de DA 51% et masse molaire 150 000 g/mol qui nous intéressait pour ses propriétés de stabilité sous forme particulaire. Plusieurs lots ont pu être synthétisés avec un DA de 47% à 55% et différentes masses molaires.

DA (%) visé	DA (%) mesuré	Mw (g/mol)
51	47	106 000
51	47	290 000
51	47	96 000
47	55	133 000
51	48	180 000
60	67	180 000

Tableau18 : Caractéristiques des chitosanes préparés selon les DA visés

La réaction de réacétylation apparaît varier en fonction des volumes utilisés et semble assez sensible à de nombreux paramètres extérieurs (température, vitesse d'agitation...) compliqués à contrôler. La quantité d'anhydride acétique ainsi que la présence possible de réactions secondaires (Vachoud, 2001) peuvent aussi être à l'origine de cette sensibilité. Pour cette raison, il est assez difficile de reproduire avec exactitude un DA visé.

Cependant, les différents lots testés pour l'adsorption du poly (I:C) et la stabilité en milieu biologique PBS 1X semblent montrer les mêmes caractéristiques que les particules obtenues avec l'ancien lot, bien qu'ayant un comportement un peu différent de l'ancien lot utilisé.

a) Amélioration de la synthèse avec le nouveau chitosane

o Taille et polydispersité

Lors de cette étude, nous verrons uniquement le cas des particules positives, puisque ce sont celles qui correspondent à notre demande. La taille des particules avec chitosane de DA 47% et de masse molaire proche de 100 000 g/mol a été étudiée selon les différents sulfate de dextrane utilisés et les rapports stoechiométriques entre les charges des deux polymères (qui sont fonction du DA et de la Mw du sulfate de dextrane). L'influence de la présence ou non de fluorophore, incorporé dans les particules en l'ajoutant à la solution de chitosane, a également été étudiée.

Sulfate de dextrane	rapport stœchiométrique	taille (nm)	Ip
DS500 (lot 1)	2	351	0,20
	3	400	0,23
	4	390	0,22
DS5k	2	425	0,20
DS500+sulforhodamine (10 ⁻⁵ M)	2	470	0,26
	3	447	0,21
DS5k+sulforhodamine (10 ⁻⁵ M)	2	461	0,17
DS500 (lot 2)	3	421	0,24

Tableau 19 : Influence de différents paramètres sur la taille et l'Ip des particules de CSD

Il faut noter que si le sulfate de dextrane de haute masse molaire est le même que pour l'étude précédente, celui de faible masse molaire a été changé suite à une modification du catalogue du fournisseur. Il est sur cette étude de 5 000 g/mol au lieu de 10 000 g/mol. L'utilisation de chitosanes de masses molaires différentes (96 000 g/mol pour le DS500 (lot 2) et 106 000 g/mol pour les autres) semble ne pas avoir d'influence sur la taille des particules obtenues. La masse molaire du sulfate de dextrane ainsi que la présence de sulforhodamine ne sont pas non plus des facteurs de modification de la taille des nanoparticules. Il est intéressant de constater que, par rapport aux tailles obtenues tableau 2 avec le premier lot de chitosane, il y a ici une nette diminution du diamètre des particules et l'Ip est moins élevé, ce qui est signe d'une meilleure complexation.

○ Stabilité en milieu salin

Variable			Taille en NaCl 150 mM (nm)	Stabilité en PBS 1X
Chitosane	SD			
DA %	Mw	Mw		
47	95	5 000	513	> 7 jours
	000	500 000	501	> 7 jours
48	180	5 000	504	non
	000	500 000	593	non
67	180	5 000	485	non
	000	500 000	538	non

Tableau 20 : Caractéristiques de stabilité des particules de CSD (0,1 %) en 150 mM NaCl avec différents chitosanes et sulfates de dextrane

Malgré les modifications de taille et d'Ip observées, la stabilité en milieu PBS 1X est maintenue sur plusieurs jours dans le cas du DA 47%. Les particules formées avec les chitosanes d'autres DA flocculent immédiatement en PBS, ce qui va nous permettre de poursuivre avec ce lot de chitosane l'étude de nos particules.

Le premier lot de chitosane utilisé pour la première génération de particules ne permettait aucune stabilité en milieu biologique quel qu'il soit.

b) Amélioration des conditions d'adsorption

○ Taille et stabilité en milieu salin

Variable			Poly (I:C) g/L	Taille en solution aqueuse (nm)	Taille en NaCl 150 mM (nm)	Stabilité en NaCl 150 mM	Stabilité en PBS 1X
Chitosane	SD						
A %	Mw	Mw					
47	95 000	5 000	0,005	235	590	> 4 jours	++
			0,01	245	583	< 4 jours	++
	500 000	500 000	0,005	316	541	< 4 jours	++
			0,01	339	534	> 5 jours	++
48	180 000	5 000	0,005	381	456	> 4 jours	-
			0,01	409	447	> 4 jours	-
	500 000	500 000	0,005	380	571	> 5 jours	-
			0,01	418	613	< 4 jours	-
67	180 000	5 000	0,005	437	441	> 4 jours	-
			0,01	461	454	> 4 jours	-
	500 000	500 000	0,005		554	> 5 jours	-
			0,01		577	> 5 jours	-

Tableau 21 : Caractéristiques de différentes nanoparticules de CSD (0,1 %) recouvertes de poly (I:C)

■ impossible de former de particules

Une augmentation de taille immédiatement après avoir mis les particules en 150 mM NaCl a pu être constatée. Cependant, la stabilité en milieu salin reste intéressante malgré l'adsorption de poly (I:C) à la surface des particules. Il semble qu'il y a peu d'influence liée au type de chitosane ou de sulfate dextrane utilisé lors de la synthèse. L'adsorption de poly (I:C) à la surface des nanoparticules semble provoquer une légère augmentation de taille, ce qui peut être observé en 150 mM NaCl pour le DA 47. Ce dernier confirme sa capacité à former des nanoparticules beaucoup plus stables en milieu salin (ici PBS 1X) que les autres chitosanes.

○ Cinétique d'adsorption

La cinétique d'adsorption du poly (I:C) ainsi que celle du poly U restent inchangées avec ces nouvelles nanoparticules (cf. 8.2.6 Adsorption de TLR ligands).

8.2.4. Adsorption des protéines du HIV-1

Les cinétiques d'adsorption de la p24 et de la gp140 ont été étudiées pour l'obtention des complexes antigéniques optimaux.

a) Protéine p24

Comme décrit dans le matériel et méthode (cf. 5.1.2 Adsorption de la protéine p24 sur les particules de CSD), les particules de CSD en PBS 1X ont été ajoutées volume à volume à une solution de protéine p24 diluée en PBS 1X à température ambiante de façon à obtenir le taux de solide en CSD et la concentration en protéine finale voulue.

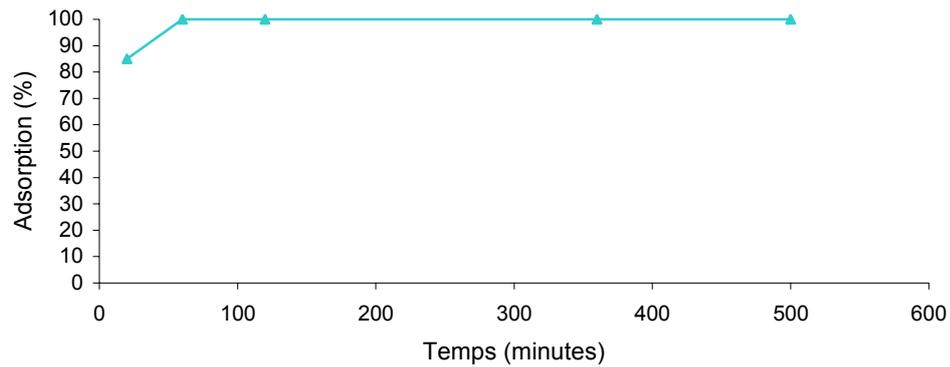


Figure 26: Cinétique d'adsorption de la p24 (0,2 g/L) sur les nanoparticules de CSD (0,1% - chitosane DA 47%, 95 000 g/mol et sulfate de dextrane 5000 g/mol); exprimée en pourcentage d'adsorption en fonction du temps en minutes

L'adsorption de la p24 sur les nanoparticules de CSD atteint son rendement maximal de 100 % en moins de deux heures alors qu'il était nécessaire d'attendre plus de 20 heures pour les particules formées avec un chitosane de l'ancien lot. Le rendement de ces dernières était plus faible de l'ordre de 80 % (thèse Alexandre Drogoz). Cependant la stabilité de ces formulations dans le temps est assez courte (inférieure à 7 jours) et le maintien de la taille et de l'Ip des nanoparticules d'origines est plus précaire que dans le cas des PLA.

b) Protéine gp 140

Comme décrit dans le matériel et méthode (cf. 2.2.2 Adsorption de la protéine gp140 sur les particules de CSD) les particules de CSD à 1% de taux de solide en PBS 1X ont été ajoutées volume à volume à une solution de protéine gp140 diluée à 1 g/L en PBS 1X à température ambiante.

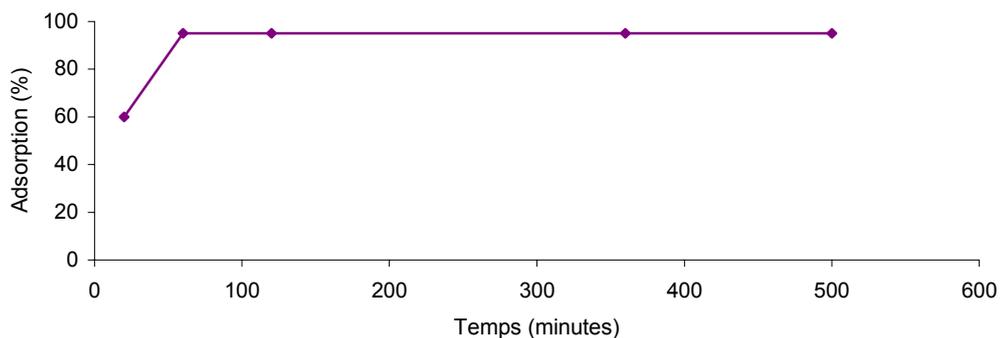


Figure 27: Cinétique d'adsorption de la gp140 (0,2 g/L) sur les nanoparticules de CSD (0,1% - chitosane DA 47, 95 000 g/mol et sulfate de dextrane 5000 g/mol); exprimée en pourcentage d'adsorption en fonction du temps en minutes

L'adsorption de la gp140 suit le même profil que pour la p24. Le rendement maximal de 96 % est atteint en moins de deux heures. Ceci montre que ces particules formées semblent des vecteurs protéiques plus performants que celles utilisant l'ancien

lot de chitosane. En effet ces dernières avaient des conditions d'adsorption très différentes selon les protéines utilisées alors qu'ici le protocole n'a pas changé. Cependant, la stabilité de ces formulations dans le temps est elle aussi inférieure à 7 jours.

Si les nanoparticules de PLA aussi bien que de CSD semblent être de bonnes candidates à la vectorisation des protéines étudiées, les PLA sont plus faciles d'utilisation. De fait, malgré les bons résultats de rendement et la cinétique, reproductible quelle que soit la protéine, les particules de CSD restent très peu stables (moins d'une semaine) une fois recouvertes avec la protéine. Leur utilisation nécessite donc de refaire des formulations pour chaque utilisation. Les PLA, quant à eux, permettent de synthétiser des vecteurs protéiques stables sur plusieurs mois, ce qui permet de pouvoir avoir un même lot pour une même expérience.

8.2.5. Caractérisation des vecteurs protéiques

Plusieurs lots de CSD-p24 ont été synthétisés et à chaque fois la taille et l'Ip ont été mesurés grâce au Malvern nanoZS (cf. 1.4.2 Mesure de taille des particules).

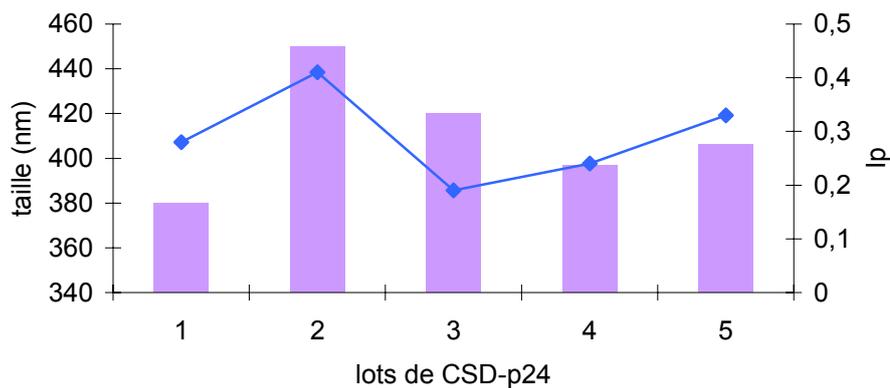


Figure 28: Répartition en taille et en Ip de différents lots de CSD-p24 (conditions identiques que pour la figure 8)

■ taille des CSD-p24, ■ Ip des CSD-p24

Le diamètre des nanoparticules de CSD recouvertes p24 est plus élevé que celui des PLA-p24 (environ 200 nm de plus) mais reste cependant nanométrique. L'indice de polydispersité est au-dessus de 0,1 : on peut donc considérer que les CSD-p24 sont polydisperses.

8.2.6. Adsorption de TLR ligands

a) Adsorption du poly (I:C)

○ Adsorption sur des CSD nues

La mise en contact du poly (I:C) en PBS 1X avec les particules de CSD en PBS 1X (cf. 2.3.2 Adsorption du poly (I:C) sur les particules de CSD) permet d'étudier les interactions possible entre TLR ligand et nanoparticules. Du fait de leur charge de surface positive, les particules de CSD semblaient des meilleures candidates à l'adsorption que les PLA. Après étude de l'adsorption en PBS 1X des deux TLR ligands choisis, il en ressort les résultats suivants.

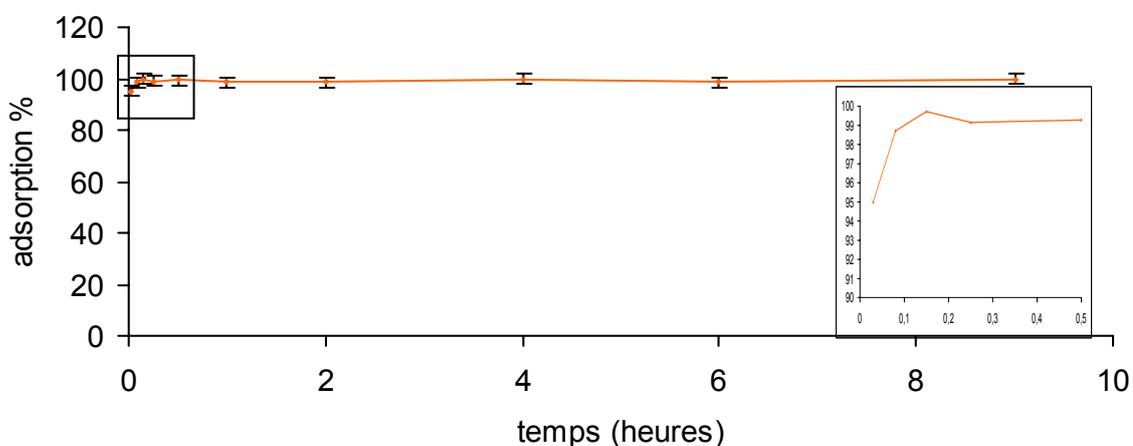


Figure 29: Cinétique d'adsorption du poly (I:C) à 0,5 g/L sur les nanoparticules (0,5% - chitosane DA 47%, 95 000 g/mol et sulfate de dextrane 5000 g/mol) de CSD; exprimée en pourcentage d'adsorption au cours du temps

Le graphe (figure 29) montre que le poly (I:C) est adsorbé à la surface des particules de CSD de façon quasi immédiate. Le plateau d'adsorption est atteint très rapidement. De même, à cette concentration de poly (I:C), le rendement d'adsorption est très proche des 100%, ce qui permet de s'affranchir d'une étape de lavage par centrifugation pour éliminer le poly (I:C) résiduel du sumageant. Pendant la première demi-heure d'adsorption cependant, les rendements d'adsorption peuvent être légèrement variables. Il convient donc, pour une meilleure reproductibilité, de laisser en contact les particules avec le poly (I:C) au moins une heure.

○ Adsorption sur des CSD une fois complexées avec une protéine

Afin de pouvoir comparer les formulations de CSD avec celles de PLA, la méthode d'adsorption des TLR ligands après complexation avec les protéines a été adoptée, même si les résultats d'adsorption ici ne diffèrent pas, quelle que soit la méthode employée.

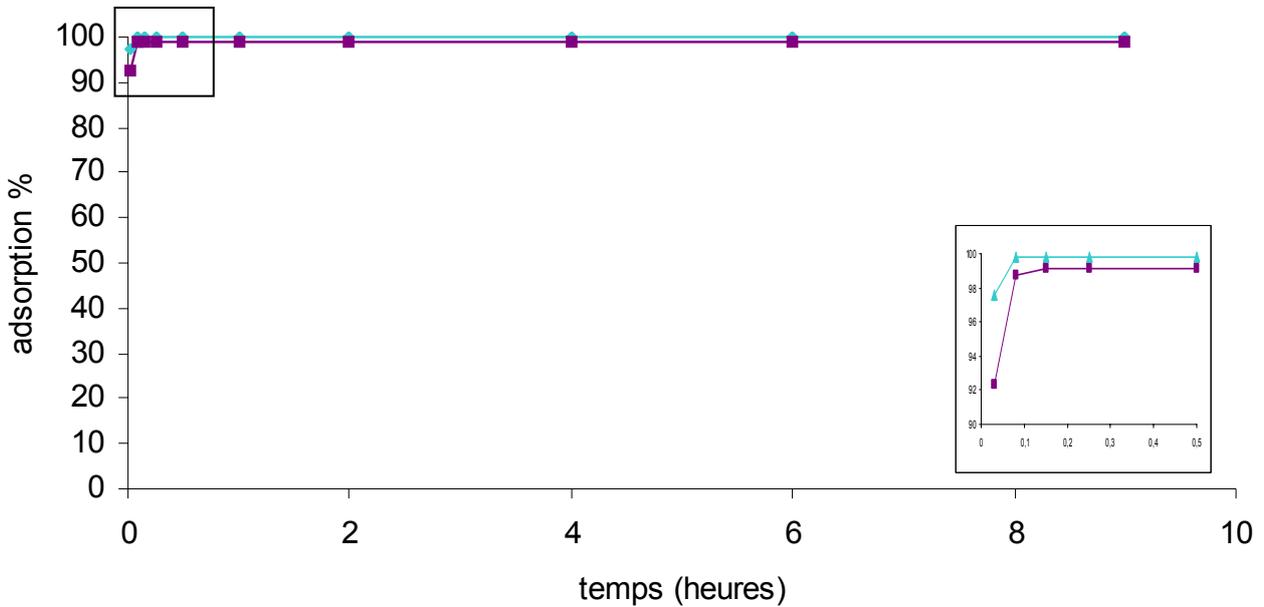


Figure 30: Cinétique d'adsorption du poly (I:C) à 0,5 g/L une fois complexé avec la p24 (0,2 g/L) ou la gp140 (0,2 g/L) sur les nanoparticules de CSD (0,5% - chitosane DA 47%, 95 000 g/mol et sulfate de dextrane 5000 g/mol) ; exprimée en pourcentage d'adsorption au cours du temps

Le graphe ci-dessus montre que le poly (I:C) est adsorbé à la surface des particules de CSD de façon quasi immédiate et ce que ce soit en présence de p24 ou de gp140. Le plateau d'adsorption est atteint très rapidement. De même, à cette concentration de poly (I:C), le rendement d'adsorption est très proche de 100%, ce qui permet de s'affranchir d'une étape de lavage par centrifugation pour éliminer le poly (I:C) résiduel du surnageant. Pendant la première demi-heure d'adsorption cependant, les résultats peuvent être légèrement variables. Il convient donc pour une meilleure reproductibilité de laisser en contact les particules avec le poly (I:C) au moins une heure.

b) Adsorption du poly U

○ Adsorption sur des CSD nues

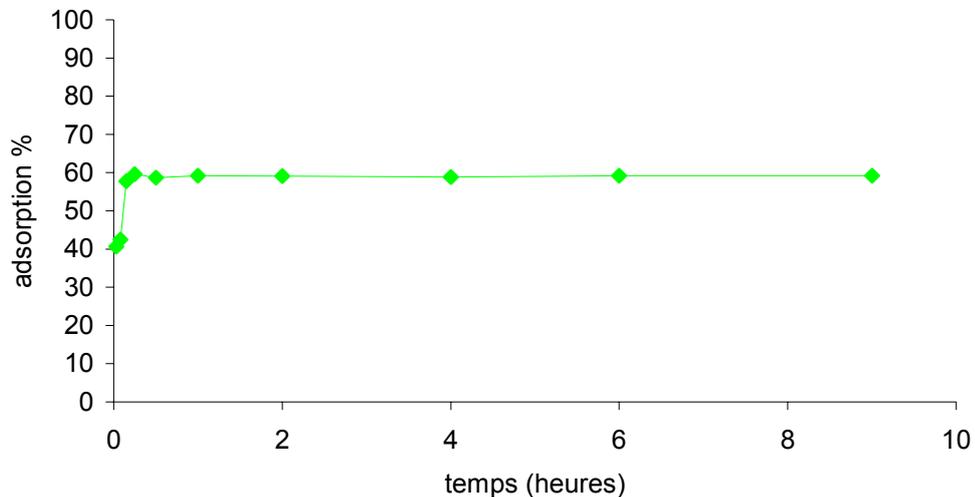


Figure 31 : Cinétique d'adsorption du poly U à 0,5 g/L sur les nanoparticules (0,5% - chitosane DA 47%, 95 000 g/mol et sulfate de dextrane 5000 g/mol) de CSD; exprimée en pourcentage d'adsorption au cours du temps

Le graphe (*figure 31*) montre que le poly U est adsorbé à la surface des particules de CSD de façon très rapide, puisque le plateau d'adsorption est atteint en moins de 20 minutes. À cette concentration de poly U, le rendement d'adsorption est d'environ 60%. Une étape de lavage par centrifugation pour éliminer le poly U résiduel sera donc obligatoire lors de cette formulation. Pendant la première heure d'adsorption, les rendements peuvent être légèrement variables, il convient donc pour une meilleure reproductibilité de laisser en contact les particules avec le poly U au moins deux heures.

Le fait que le poly U ait un rendement d'adsorption plus faible que celui du poly (I:C) pourrait s'expliquer par une dégradation du produit durant l'adsorption. En effet, le poly U étant simple brin il est plus fragile que le poly (I:C) et plus sensible à toute activité RNase.

- Adsorption sur des CSD une fois complexées avec une protéine

Pour pouvoir comparer CSD et PLA, le modèle d'adsorption avec « pré-complexation » du TLR ligand avec p24 ou gp140 est également étudié sur les CSD, malgré leurs capacités plus importantes à l'adsorption des TLR ligands.

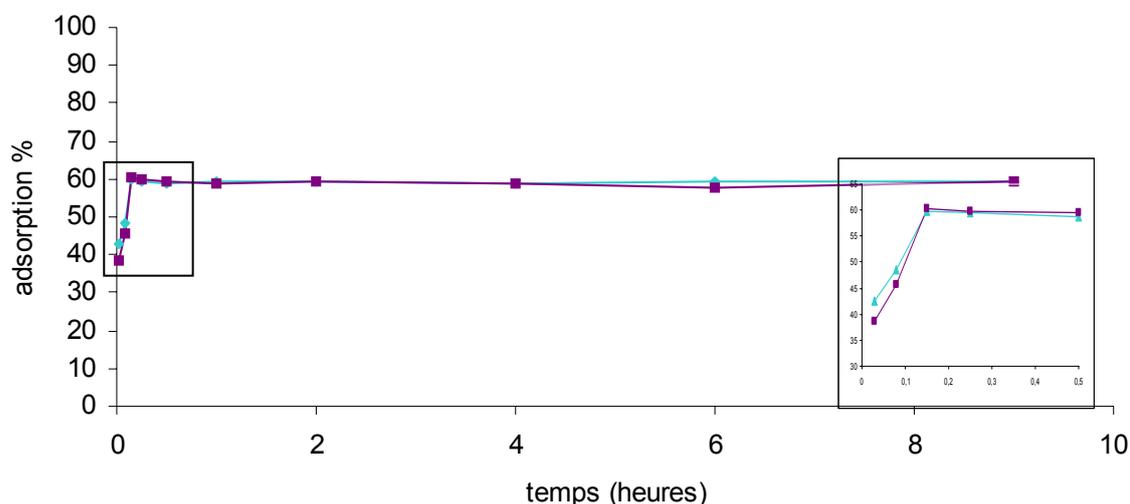


Figure 32: Cinétique d'adsorption du poly U à 0,5 g/L sur les nanoparticules de CSD (0,5% - chitosane DA 47%, 95 000 g/mol et sulfate de dextrane 5000 g/mol) recouvertes de p24 ou gp140; exprimée en pourcentage d'adsorption au cours du temps

Le graphe (*figure 32*) montre que le poly U se comporte de la même façon pour une adsorption en présence de protéine que sur les CSD nues. La nature de la protéine ne change pas le profil d'adsorption du poly U.

Si les nanoparticules de PLA semblent être de moins bonnes candidates pour formuler ces deux TLR ligands sur des supports, les CSD, pour leur part, sont prometteuses avec de bons rendements et reproductibles. Seul le manque de stabilité dans le temps des formulations avec les CSD présente un point négatif. En effet, il semble difficile de les conserver plus de 5 jours. Un travail sur ce point est effectué au laboratoire en modifiant certains paramètres de la synthèse des particules, dont le copolyélectrolyte. De part leurs qualités, ce travail va se poursuivre sur les deux types de particules, PLA et CSD, afin d'évaluer leurs propriétés adjuvantes en tant que vecteurs de protéines ou de TLR ligand.

9. Évaluation *in vitro* des formulations

Les formulations doivent être testées sur des modèles cellulaires afin de déterminer la capacité des cellules à internaliser nos particules, leur éventuelle toxicité et de déterminer quelles formulations seraient les plus efficaces sur le modèle *in vitro*.

Deux approches différentes seront menées en parallèle. Une étude sera menée sur la synthèse des particules fluorescentes et leur observation en microscopie photonique et confocale. Une autre partie s'attachera à étudier les interactions entre cellules dendritiques et nanoparticules, grâce à des techniques de microscopie confocale et de cytométrie en flux.

9.1. Production de nanoparticules fluorescentes

9.1.1. Production de nanoparticules de PLA fluorescentes

La production de nanoparticules de PLA fluorescentes a été étudiée par Charlotte Primard lors de sa thèse dans notre laboratoire en collaboration avec Elsa Luciani. Lors de la synthèse des particules, des fluorophores peuvent être introduits dans la solution de PLA ; ceux-ci doivent donc être hydrophobes.

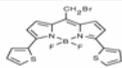
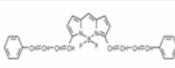
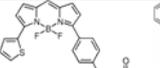
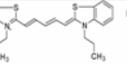
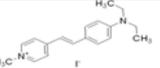
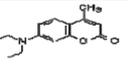
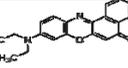
fluorophore	Bodipy 630/650	Bodipy 665/676	Bodipy cell trace	Cyanin iodid	4-Di-2-ASP	Coumarin 6	Nile Red
Molécule							
λ excitation	630	665	588	500	485	457	515
λ émission	650	676	616	705	603	505	535

Tableau 22 : Fluorophores potentiellement utilisables pour la synthèse de nanoparticules de PLA fluorescentes (travaux E. Luciani et C. Primard)

Après avoir sélectionné plusieurs marqueurs fluorescents susceptibles d'être compatibles avec la méthode et les conditions de synthèse des particules, elles ont pu étudier la faisabilité et les caractéristiques de particules fluorescentes avec les différents fluorophores sélectionnés. Deux d'entre eux ont été retenus pour leurs bons rendements d'incorporation et le fait qu'ils ne sont pas relargués rapidement par les particules.

Fluorophore	Taille (nm)	Ip	Rendement d'incorporation (%)
Coumarine 6	200	0,045	99
	260	0,062	
Cell trace bodipy	236	0,109	98
	266	0,060	
	228	0,038	
Aucun	211	0,077	-

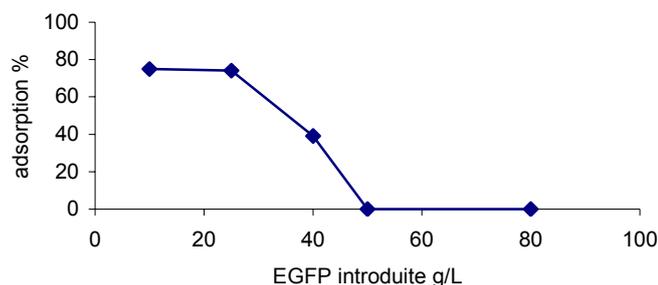
Tableau 23 : Caractéristiques des nanoparticules de PLA fluorescentes.

Ainsi, nous disposons au sein du laboratoire d'un panel de nanoparticules de PLA fluorescentes avec des longueurs d'ondes allant de 500 à 616 nm en émission.

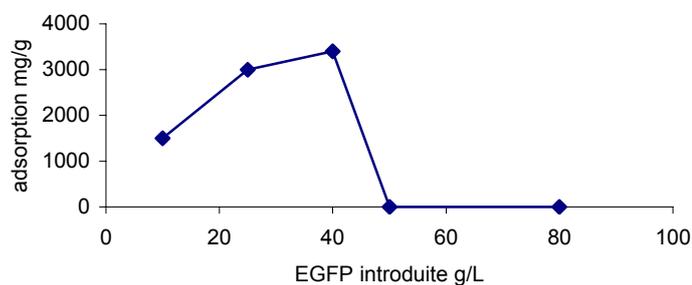
9.1.2. Production de CSD fluorescentes

a) Particules CSD marquées avec la protéine fluorescente EGFP

Des essais d'adsorption de l'EGFP à différentes concentrations en tampon phosphate 10 mM pH 5,7 ont été menés dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour l'adsorption de la p24. Après 20 heures de mise en contact sous agitation à température ambiante, les particules ont été centrifugées et l'EGFP a été dosée dans le surnageant par un dosage BCA. Ceci permet de déduire la quantité de protéine adsorbée sur les particules.



a) Rendement en pourcentage de l'EGFP adsorbée



b) Adsorption de l'EGFP en mg par g de CSD

Figure 33 : Adsorption de l'EGFP selon la quantité initiale introduite en g/L (tampon (acétate d'ammonium 10 mM, pH 4,5) et taux de solide 0,5% lors de la réaction)

La courbe de rendement d'adsorption obtenue (*figure 33 a*) montre un rendement élevé (supérieur à 70%) pour les concentrations inférieures à 20 g/L, puis une chute jusqu'à une adsorption inexistante pour des concentrations supérieures à 50 g/L. Les quantités d'EGFP adsorbées en surface des CSD (*figure 33 b*) augmentent jusqu'à des concentrations introduites supérieures à 50 g/L. Les CSD ne flocculent pas pour autant en présence de concentrations élevées en EGFP. Cette chute observée pourrait donc être due au fait que l'arrangement de la protéine en grande quantité à la surface des CSD est plus fragile que pour des concentrations plus faibles. La centrifugation des CSD ainsi formées, nécessaire au dosage des protéines présentes dans le surnageant, pourrait suffire dans ce cas à la détacher. La concentration d'EGFP à utiliser pour marquer les particules devait donc être inférieure à 20 g/L.

Pour vérifier que ces concentrations en EGFP étaient suffisantes pour que les CSD soient visibles, les particules ont été observées au microscope photonique.

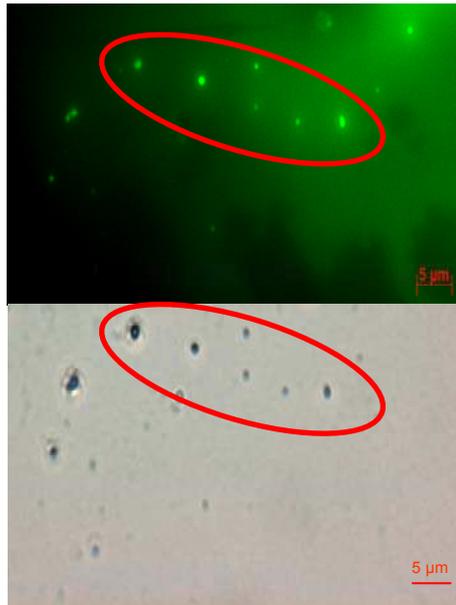


Figure 34 : Photos des CSD prises au microscope photonique

La figure ci-dessus, montrant les photos d'une suspension de CSD observées en fluorescence et en lumière blanche, permet de voir que les points fluorescents étaient colocalisés avec des CSD vues sans filtre en lumière blanche. Ces CSD peuvent donc être utilisées en présence de cellules. On constate cependant une fluorescence de fond liée à la présence d'EGFP non totalement éliminée du surnageant ou bien à un relargage rapide de la protéine. Cette stratégie a donc été éliminée, d'une part à cause du fort bruit de fond constaté, et d'autre part parce que les particules fluorescentes seront amenées à adsorber des protéines ou autres molécules à leur surface. Il est donc inutile de multiplier le nombre de molécules à la surface de nos CSD sous peine de perdre en rendement.

b) Particules CSD marquées avec la sulforhodamine B

Des essais d'encapsulation de la sulforhodamine B lors de la synthèse ont été réalisés. Il s'agissait d'introduire le marqueur fluorescent à différentes concentrations dans les solutions de polymères (sulfate de dextrane ou chitosane) avant la formation des CSD.

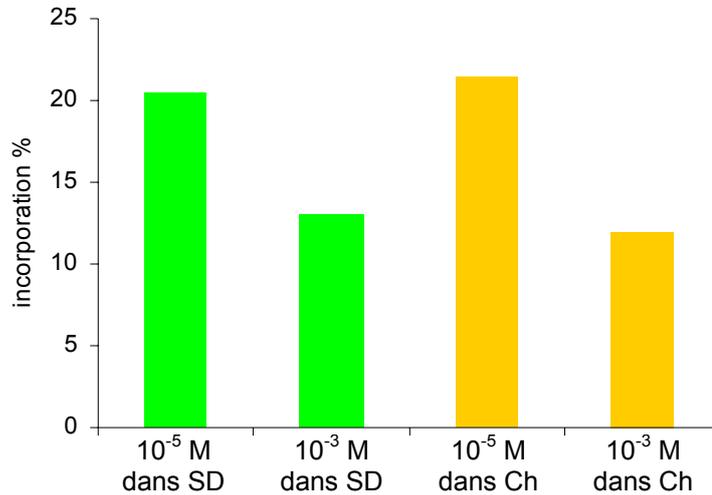


Figure 35 : Rendement d'incorporation de la sulforhodamine B selon les quantités introduites (obtenus indirectement par mesure de la sulforhodamine B présente dans les surnageants)

■ 10⁻⁵ ou 10⁻³ M de sulforhodamine introduite à la synthèse dans la solution de chitosane ; ■ 10⁻⁵ ou 10⁻³ M de sulforhodamine introduite à la synthèse dans la solution de sulfate de dextrane

Les rendements d'incorporation de la sulforhodamine B sont limités (*figure 35*), et ce, quelles que soient les conditions d'intégration aux CSD. Cependant, de très faibles quantités de sulforhodamine B sont suffisantes pour détecter une fluorescence. Il apparaissait que, lorsque la concentration initiale de sulforhodamine B augmentait, le rendement diminuait. Il semblait aussi y avoir peu de différence de rendement que la sulforhodamine B soit introduite dans la solution initiale de sulfate de dextrane ou dans la solution de chitosane.

Les conditions de formation des particules marquées à la sulforhodamine B les plus favorables ont été déterminées après observation en microscopie photonique.

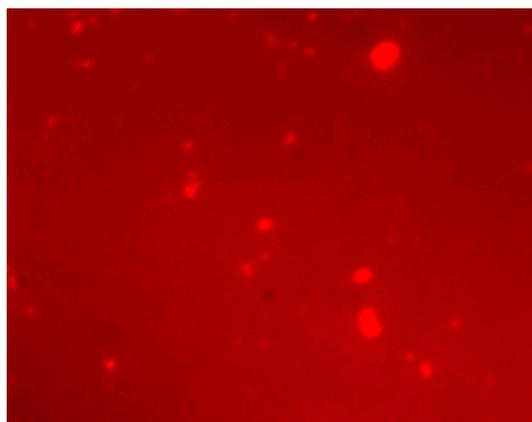


Figure 36 : Photo des CSD/sulforhodamine B à 10^{-5} M dans la solution de sulfate de dextrane

Après observation de toutes les conditions décrites dans la figure 4, la photo présentée sur la figure 5 correspond aux meilleures conditions de production des CSD fluorescentes avec la sulforhodamine B. Les CSD qui correspondent à ce résultat optimal sont celles pour lesquelles la sulforhodamine B a été introduite à une concentration de 10^{-5} M dans la solution de sulfate de dextrane. Les CSD formées avec la sulforhodamine B à la concentration de 10^{-3} M ne présentent qu'une très faible fluorescence non détectable au microscope. Les CSD coprécipitées en présence de 10^{-5} M de sulforhodamine B dans la solution de chitosane sont visibles au microscope à fluorescence, mais elles ont rapidement floculé. Ainsi, seules les particules dont la solution de sulfate de dextrane contenait 10^{-5} M de fluorophore ont pu être retenues pour une utilisation dans le cas d'un suivi *in vitro*. Le surnageant est lui aussi légèrement fluorescent, soit à cause d'un début de relargage, soit parce que la sulforhodamine B non incorporée n'a pu en être éliminée totalement. Des études à ce sujet sont prévues par l'équipe chimie du laboratoire afin de déterminer la cause de cette fluorescence.

Ce sont ces particules marquée à la sulforhodamine qui seront utilisées pour la suite de ce travail afin d'éviter des problèmes d'adsorption. En effet, l'EGFP se trouvant à la surface des particules, cela pourrait limiter l'adsorption des antigènes et autres immunostimulants d'intérêt.

9.2. Toxicité des formulations

Les cellules, mises en contact avec les particules, peuvent être altérées. Le marquage à l'iodure de propidium permet de déterminer la viabilité cellulaire et donc de définir la sensibilité des cellules dans différentes conditions utilisées. La viabilité des cellules a été comparée en présence de différentes concentrations de CSD. Des concentrations identiques en nanoparticules de PLA, connues pour leur innocuité, ont été testées en parallèle. Enfin, l'effet de la protéine modèle p24 ainsi que des TLR ligands

poly (I:C) et poly U susceptibles d'être utilisés lors de cette étude, ont aussi été observés. Leurs résultats de viabilité sont comparés à la viabilité des cellules en culture non traitées.

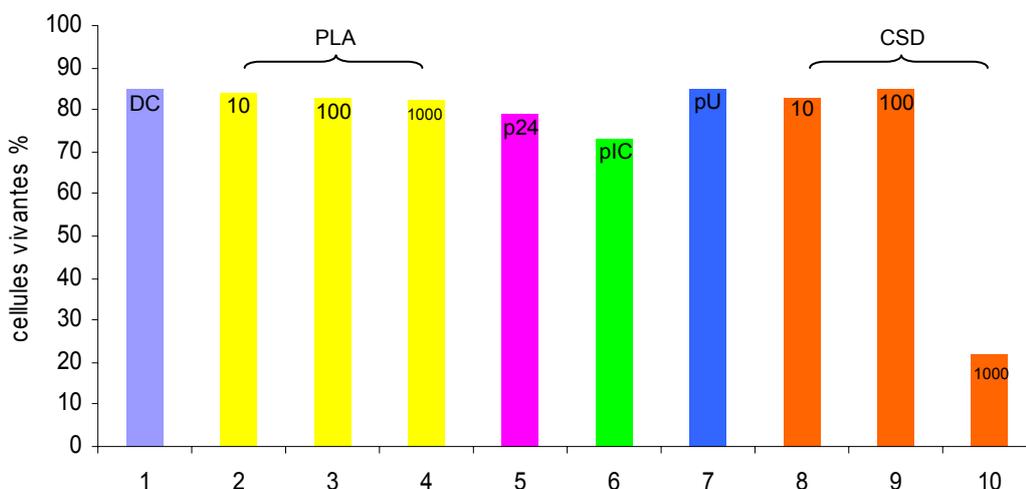


Figure 37 : Viabilité cellulaire dans différentes conditions

1 : cellules dendritiques seules, 2-3-4 : particules de PLA en concentration croissante 10, 100 et 1000 particules par cellule, 5 : p24 à 0,2 g/L, 6 : pIC à 0,5 g/L, 7 : pU à 0,5 g/L, 8-9-10 : particules de CSD en concentration croissante 10, 100 et 1000 particules par cellule

La mortalité des cellules non traitées est inférieure à 20%, comme dans la plupart des conditions testées. Le poly (I:C), connu pour provoquer la maturation cellulaire ainsi que pour sa toxicité, entraîne une mortalité cellulaire de 10% plus importante que le témoin négatif. Seules les nanoparticules de CSD à une concentration de 1 000 particules par cellule, provoquant une mortalité supérieure à 80%, dépassent le seuil de mortalité naturel des cellules en culture. Il est à noter que les PLA, quelle que soit la concentration étudiée, ne provoquent aucune dégradation détectable des cellules.

La concentration en CSD déposées dans le milieu cellulaire a donc un effet important sur la mortalité des cellules dendritiques. La concentration limite des CSD pour leur utilisation *in vitro* se situe donc entre 100 et 1000 particules par cellules. Pour plus de précaution, les particules seront utilisées à la concentration de 100 particules par cellule, cas dans lequel la mortalité cellulaire ne dépasse pas celle des cellules non traitées. Il en va de même pour les particules à la concentration de 10 particules par cellules. Cependant, pour des raisons pratiques, la concentration de 100 particules par cellule a été conservée car les rendements d'adsorption de la p24 à 100 particules par cellules sont optimaux. Les PLA seront utilisées à la concentration de 100 particules par cellule afin de pouvoir comparer au mieux les deux types de formulations.

9.3. Internalisation des nanoparticules par les cellules dendritiques

Les cellules, après avoir été séparées du sang total et différenciées pendant 5 jours, sont mises en contact avec des nanoparticules fluorescentes pendant 24 heures. La capacité des nanoparticules à entrer dans les cellules a été observée en microscopie confocale (microscope Confocal spectral SP5 (Leica) du PLATIM, ENS Lyon) en utilisant des CSD et des PLA fluorescentes, de façon à détecter leur présence dans les cellules.

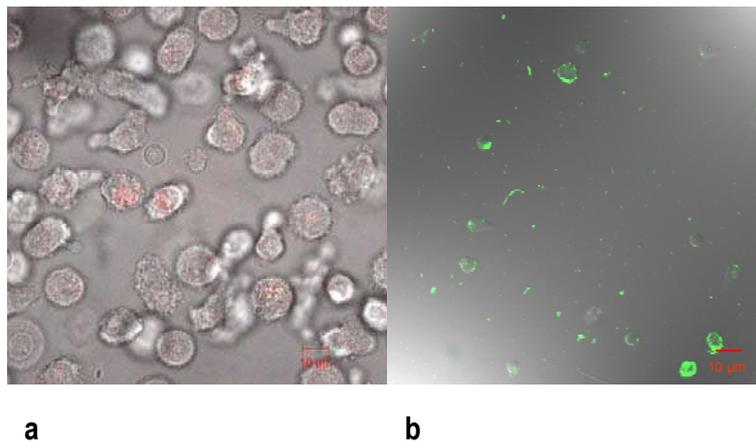


Figure 38 : Vue d'ensemble d'une culture de DCs traitées par les CSD marquées avec la sulforhodamine B (figure 38a) et par des PLA marquées à la coumarine (figure 38b)

La figure 38 présente une vue permettant de voir les cellules et la fluorescence liée aux nanoparticules qui semblent être colocalisées. Afin de vérifier qu'il ne s'agit pas uniquement d'une superposition, un « stacking » a été réalisé à travers une cellule. La figure 7 présente les photos d'une même cellule à différents plans focaux (A, B, C et D) et permet de conclure à la présence de nanoparticules internalisées dans la cellule.

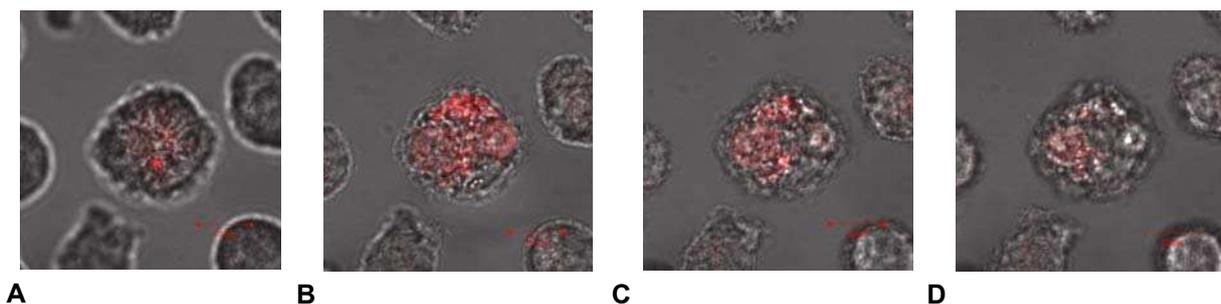


Figure 39 : Vues d'une même cellule par la méthode de « stacking » en microscopie confocale avec des stacks de 1 µm

9.4. Maturation et activation des cellules dendritiques par les formulations

Lors de l'étude de la maturation *in vitro* des cellules dendritiques issues de sang périphérique, les particules sont mises en contact avec les cellules en culture, puis les cellules sont analysées en cytométrie de flux (FACS calibre 3C).

Anticorps	Marquage attendu pour les DC immatures	Marquage attendu pour les DC matures
Anti CD 1a PE (IgG1 mouse)	+	+
Anti CD 25 PE (IgG1 mouse)	-	+ / ++
Anti CD80 PE (IgG1 mouse)	+/-	+++
Anti CD83 FITC (IgG1 mouse)	-	++
Anti CD86 PE (IgG1 mouse)	+/-	+++
Anti HLA DR PE (IgG1 mouse)	+	+++

Tableau 23 : Changement de profil phénotypique des cellules dendritiques lors de leur maturation

De nombreux marqueurs ont été étudiés. Ne seront présentés que les plus pertinents pour chaque expérience. Tous les résultats présentés montrent des seuils de mortalité similaires à ceux cellules seules en culture et ne dépassent pas les 20%.

9.4.1. Comportement des cellules dendritiques en présence de nanoparticules nues

Pour étudier le pouvoir de maturation des particules synthétisées au laboratoire sur les cellules dendritiques, les nanoparticules de PLA et de CSD ont été mises en contact pendant 24 et 48 heures à la concentration de 100 particules par cellule. Des essais de maturation ont été effectués avec des particules nues, ainsi que la p24 en solution dans du PBS 1X et les deux TLR ligands qui seront utilisés comme témoins positifs. Un puits ne contenant que des cellules servira de référence

Il convient de prendre en compte, en lisant les résultats, que les cellules utilisées sont issues de personnes non éligibles à un don thérapeutique d'où une variabilité inter-individus importante.

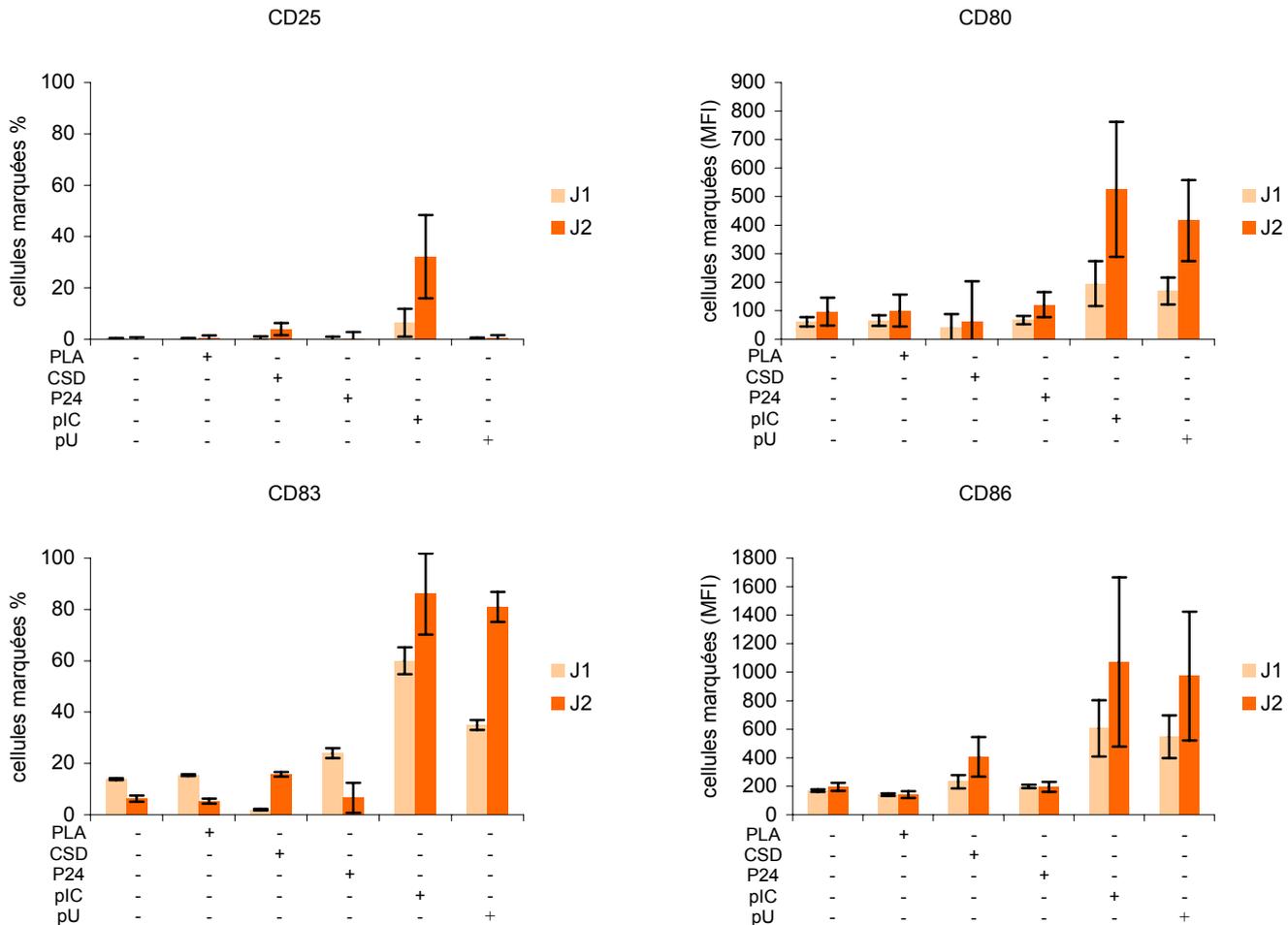


Figure 40 : Résultats obtenus sur différents marqueurs après mise en contact avec les cellules dendritiques de particules nues ; de gauche à droite : cellules seules, nanoparticules de PLA à 0,1% de taux de solide, nanoparticules de CSD à 0,1% de taux de solide, p24 à 0,2 g/L, poly (I:C) à 0,5 g/L, poly U à 0,5 g/L

Il est intéressant de constater à ce niveau qu'aucune des particules testées lors de cet essai n'a induit de maturation cellulaire détectable par cytométrie. La p24 en solution ne semble pas produire plus d'effet sur les cellules, alors que les deux TLR ligands induisent tous deux une maturation des cellules dendritiques, sauf au niveau du CD25.

9.4.2. Comportement des cellules dendritiques en présence de nanoparticules formulées avec la p24

Des premiers essais ont été menés pour déterminer la capacité adjuvante des particules sur les cellules dendritiques,. Les témoins particules nues et p24 en solution ont été comparés aux formulations. De plus, le poly (I:C) servira ici à nouveau de témoin positif.

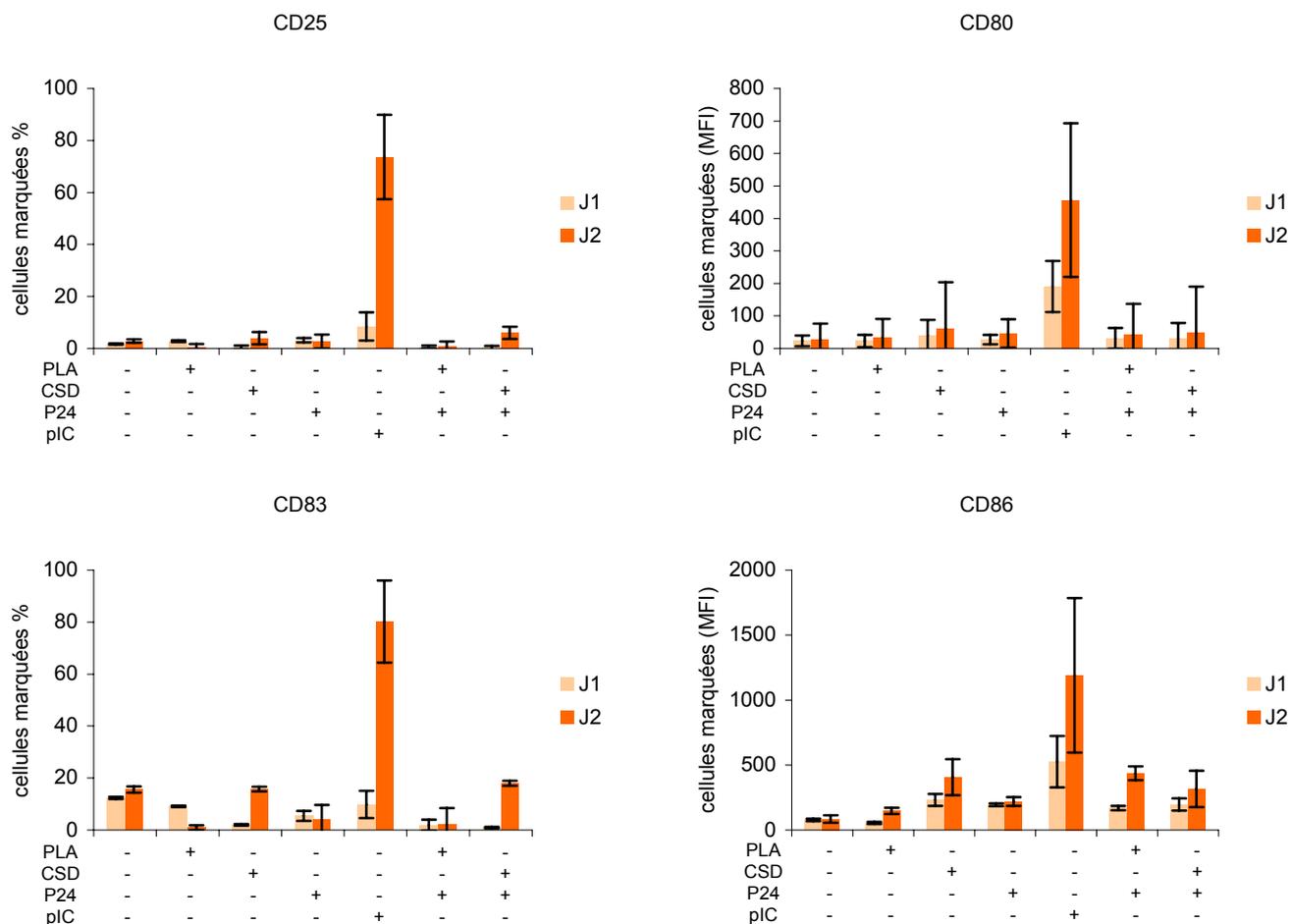


Figure 41 : Résultats obtenus sur différents marqueurs après mise en contact avec les cellules dendritiques de p24 formulée sur des particules ; de gauche à droite : cellules seules, nanoparticules de PLA à 0,1% de taux de solide, nanoparticules de CSD à 0,1% de taux de solide, p24 à 0,2 g/L, poly (I:C) à 0,5 g/L, PLA (0,1%)-p24 (0,2 g/L), CSD (0,1%)-p24 (0,2 g/L)

Nous pouvons constater que les particules nues n'interagissent pas visiblement avec les cellules dendritiques, alors que ces dernières réagissent au contact du poly (I:C) avec une très nette hausse de l'expression des marqueurs de maturation. Les formulations PLA-p24 et CSD-p24 ne semblent avoir aucune action détectable sur les cellules dans les conditions utilisées lors de cette expérience.

Les formulations présentées ici ont une forte activité *in vitro* et permettent d'obtenir de bons niveaux d'anticorps chez divers modèles animaux (Ataman Onal, 2006). Cependant, les réponses immunitaires de type cellulaire engendrées restent assez faibles. Une combinaison de ces formulations déjà actives au niveau humoral avec un activateur de la réponse cellulaire, tels que peuvent l'être le poly (I:C) et le poly U, pourrait être une voie d'amélioration. Par conséquent, notre modèle *in vitro* pourrait permettre de sélectionner les modèles de formulations, actifs au niveau cellulaire.

9.4.3. Comportement des cellules dendritiques en présence de différentes formulations

La suite de l'étude a donc été consacrée à l'étude de la maturation engendrée par les formulations obtenues par coadsorption de la p24 et du poly (I:C), le poly U ne montrant que de faibles résultats sur les cellules dendritiques dérivées de monocytes une fois mis à la surface de nos particules (résultats non montrés).

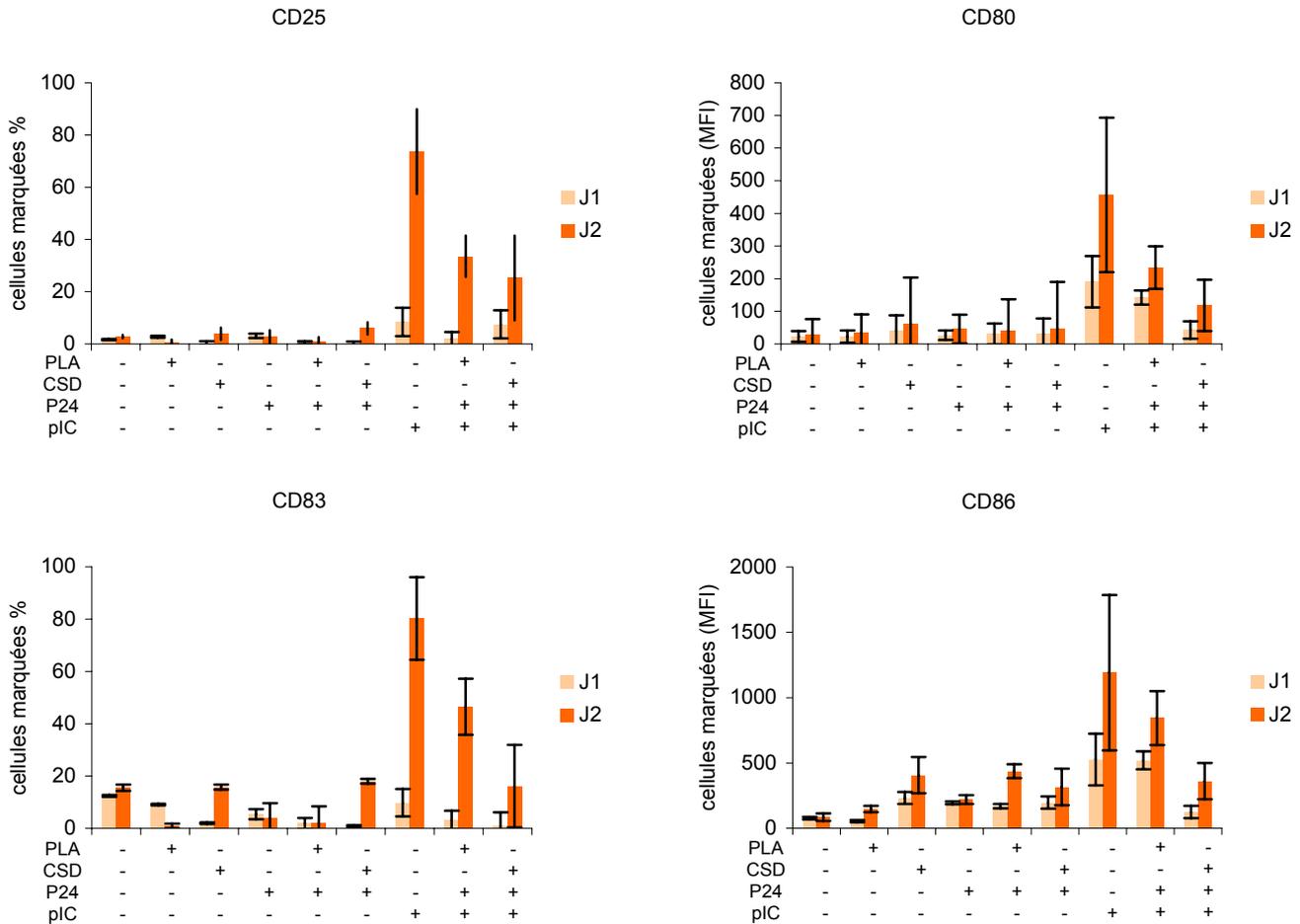


Figure 42 : Résultats obtenus sur différents marqueurs après mise en contact avec les cellules dendritiques de différentes formulations ; de gauche à droite : cellules seules, nanoparticules de PLA à 0,1% de taux de solide, nanoparticules de CSD à 0,1% de taux de solide, p24 à 0,2 g/L, PLA (0,1%)-p24 (0,2 g/L), CSD (0,1%)-p24 (0,2 g/L), poly (I:C) à 0,5 g/L, PLA (0,1%)-p24 (0,2g/L)-pIC (0,5 g/L), CSD (0,1%)-p24 (0,2g/L)-pIC (0,5 g/L)

La présence de poly (I:C) sur les particules avec protéine semble induire une maturation des cellules dendritiques mais plus faible que celle entraînée par le témoin poly (I:C) seul après 24 heures de contact pour les nanoparticules de PLA. Cet effet est augmenté après 48 heures et on constate un retard d'activation pour les particules de CSD. Ces résultats permettent de conclure que le poly (I:C) ajouté sur les particules quelles qu'elles soient ne perd pas son action sur la maturation des cellules. Ensuite, les niveaux d'activations peuvent varier d'un prélèvement de sang à l'autre en fonction de la variabilité individuelle et des éventuels traitements des personnes prélevées.

Comme l'effet des CSD combiné au poly (I:C) est encourageant et que les PLA sont de bons vecteurs pour la p24, il serait intéressant de voir l'effet qu'aurait la mise en présence avec les cellules d'un mélange de formulations. Pour l'expérience suivante, les quantités en p24 et en poly (I:C) prévues pour une immunisation *in vivo* ont été tout d'abord testées *in vitro*. Cela permet aussi de voir si en diminuant fortement les doses (poly (I:C) divisé par 50) l'activité de maturation cellulaire du TLR ligand est maintenue.

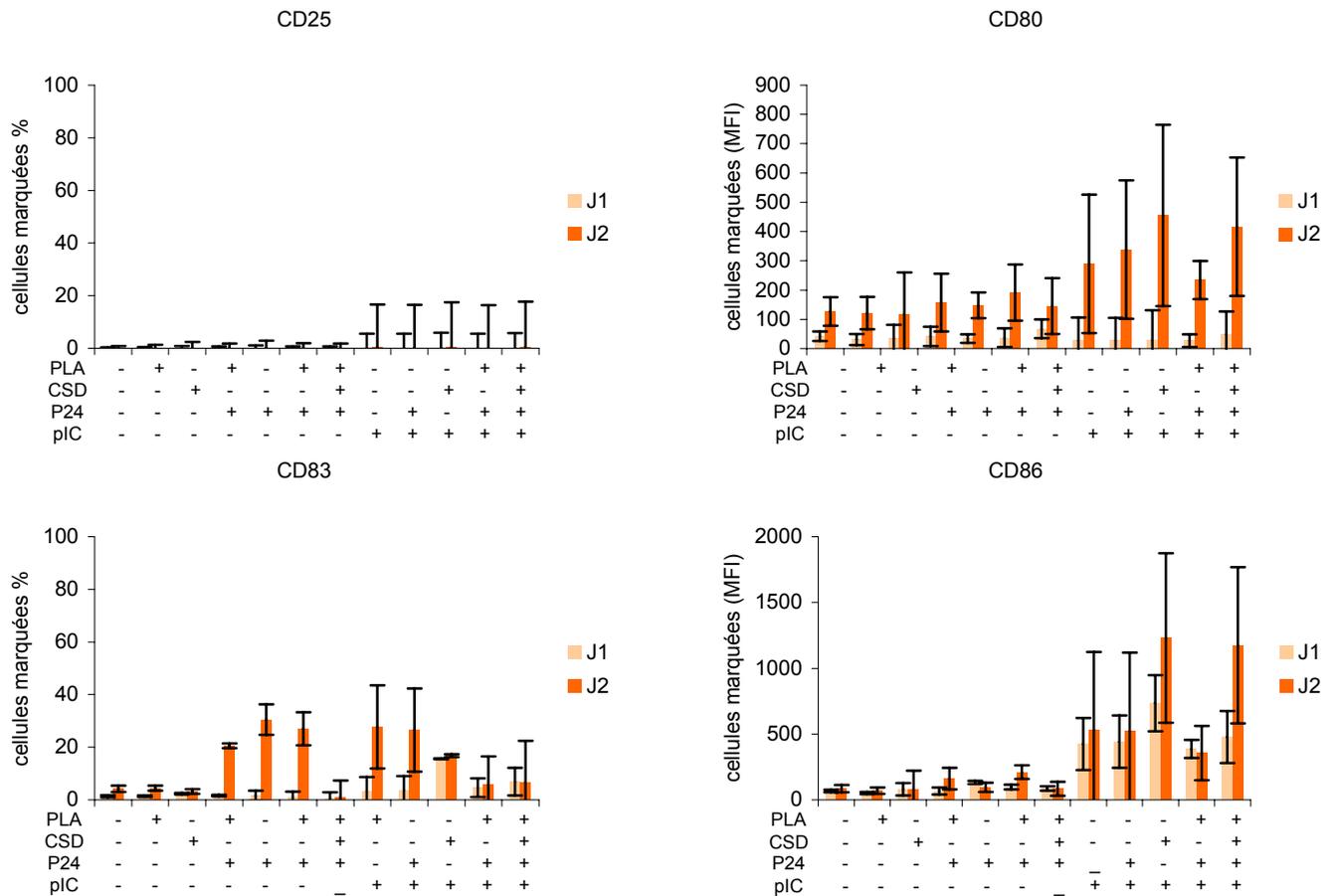


Figure 43 : Résultats obtenus sur différents marqueurs après mise en contact avec les cellules dendritiques de différentes formulations ; de gauche à droite : cellules seules, nanoparticules de PLA à 0,1% de taux de solide, nanoparticules de CSD à 0,1% de taux de solide, PLA (0,1%) + CSD (0,1%), p24 à 0,01 g/L, PLA (0,1%)-p24(0,01 g/L), PLA (0,1%)-p24 (0,01g/L)+CSD (0,1 %), poly (I:C) à 0,01 g/L, poly (I:C) (0,01 g/L) + p24 (0,01 g/L), CSD (0,1%)-pIC (0,01g/L), PLA (0,1%)-p24 (0,01g/L)+pIC (0,01 g/L), PLA (0,1%)-p24 (0,01g/L)+CSD (0,1%)-pIC (0,01 g/L)

On peut tout d'abord constater que le CD25 n'est exprimé en aucun cas dans cette expérience : les doses utilisées sont probablement trop faibles pour l'activer. Cependant, on peut constater que les autres marqueurs de maturation étudiés présentent des niveaux d'expressions assez élevés si on considère que les doses sont plus de 10 fois inférieures aux autres résultats présentés. On constate à nouveau l'effet synergique des particules de CSD sur le poly (I:C), plus particulièrement visible lors de l'étude du marqueur CD86. Il est intéressant de voir que ces formulations mises en mélanges avec des PLA-p24 ne perdent pas leur effet de maturation sur les cellules dendritiques. Ce

mélange de vecteurs portant chacun une molécule différente peut être une approche intéressante de stimulation du système immunitaire.

9.4.4. Effet dose des formulations sur les cellules dendritiques

Afin de documenter un peu plus l'effet des TLRs ligands sur les nanoparticules, une expérience visant à déterminer si la dose ajoutée aux particules était importante a été menée.

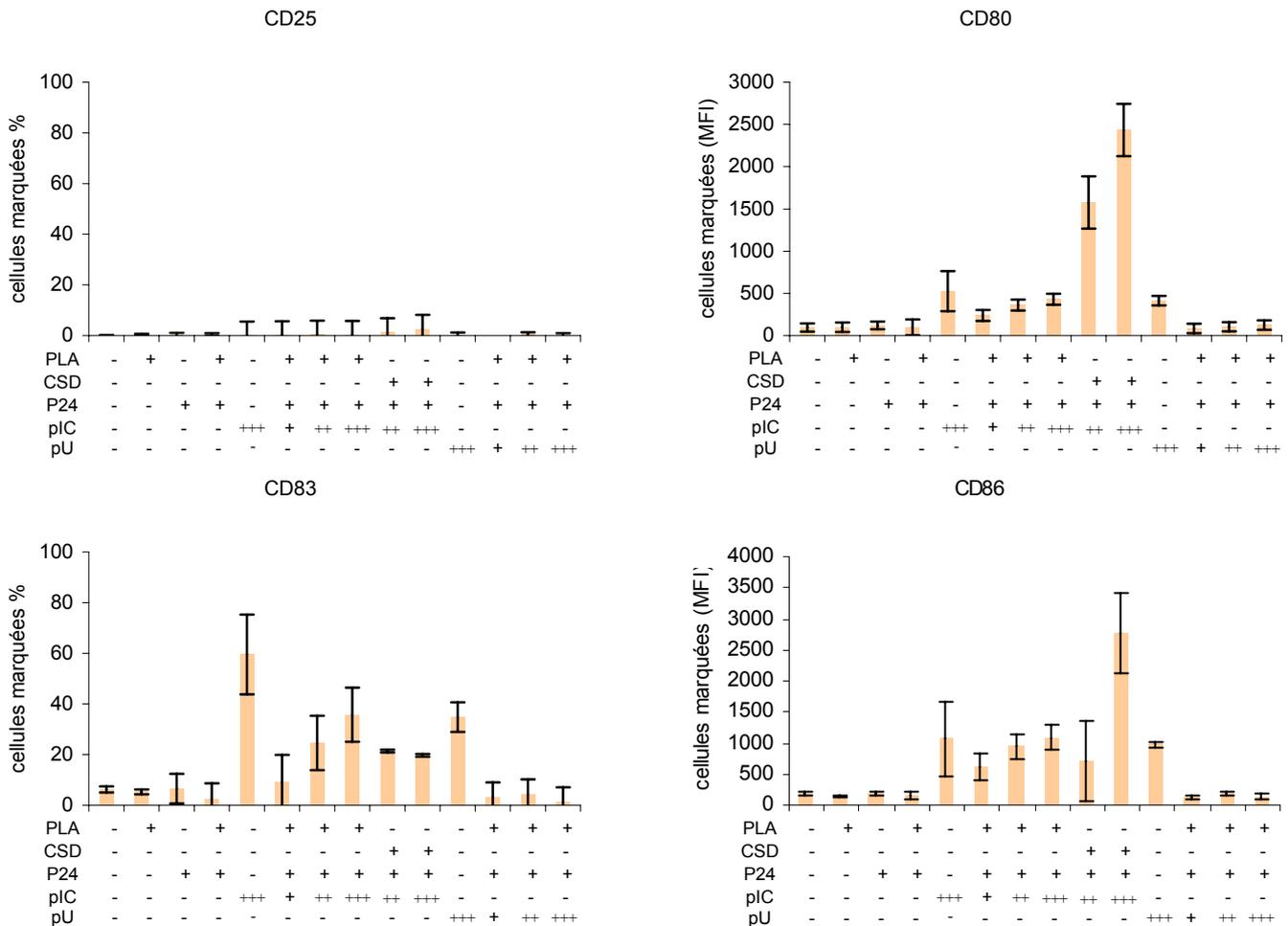


Figure 44 : Résultats obtenus sur différents marqueurs après mise en contact avec les cellules dendritiques de différentes formulations ; de gauche à droite :

cellules seules, nanoparticules de PLA à 0,1% de taux de solide, p24 à 0,2 g/L, PLA (0,1%)-p24 (0,2 g/L), poly (I:C) à 0,5 g/L, PLA (0,1%)-p24 (0,2g/L)-pIC (0,01 g/L), PLA (0,1%)-p24 (0,2g/L)-pIC (0,1 g/L), PLA (0,1%)-p24 (0,2g/L)-pIC (0,5 g/L), CSD (0,1%)-p24 (0,2g/L)-pIC (0,1 g/L), CSD (0,1%)-p24 (0,2g/L)-pIC (0,5 g/L), poly U à 0,5 g/L, PLA (0,1%)-p24 (0,2g/L)-pU (0,01 g/L), PLA (0,1%)-p24 (0,2g/L)-pU (0,1 g/L), PLA (0,1%)-p24 (0,2g/L)-pU (0,5 g/L)

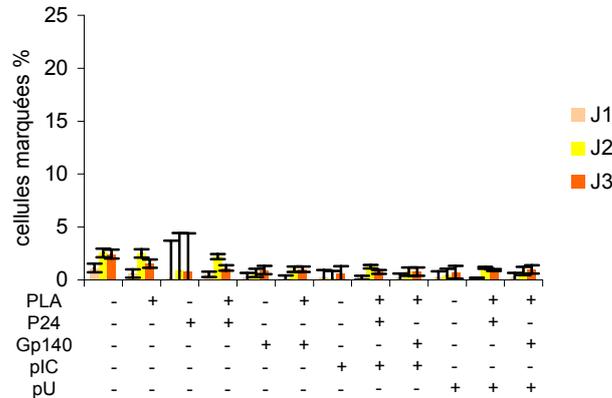
Dans cette expérience, les deux TLRs ligands candidats ont été testés. Il en ressort tout d'abord que si le poly U en solution montre un léger effet sur les cellules, une fois formulé sur les particules, plus aucun effet phénotypique n'est détectable et ce quelle que soit la dose testée. Le poly (I:C), quant à lui, conserve son effet sur la maturation des cellules dendritiques, quel que soit le type de particules sur lesquelles il est formulé. Dans

le cas de particules de PLA, on constate la présence d'un effet dose avec un pouvoir de maturation cellulaire quasi équivalent à celle du poly (I:C) seul à dose égale. Les particules de CSD montrent également la présence d'un effet dose et ce qui pourrait laisser présager d'un effet synergique pour les résultats présentés lors de l'étude de l'expression du CD80, où l'effet de maturation sur les cellules à dose équivalentes est augmenté d'un facteur trois.

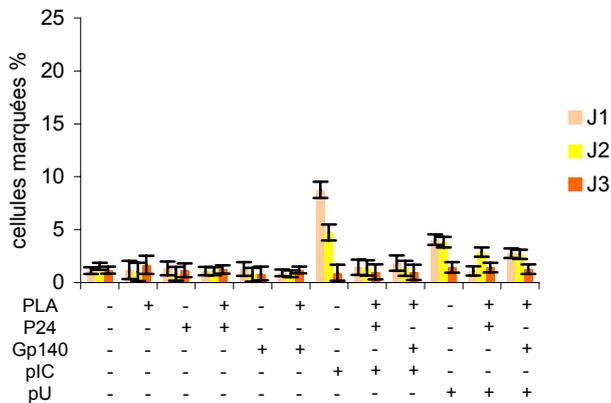
9.4.5. Effet dose des formulations sur les cellules de Langerhans

Les cellules dendritiques dérivées de monocytes nous permettent de sélectionner *in vitro* de potentiels candidats à une activation de la réponse cellulaire *in vivo*. Lors de l'utilisation des formulations pour des immunisations chez la souris, les injections se font en sous-cutanée. A cet endroit on trouve également un autre type de cellules dendritiques que sont les cellules de Langerhans. Afin de préciser nos résultats, nous avons choisi de tester l'effet de nos formulations sur des cellules de Langerhans issues de sang de cordon ombilical humain.

CD25



CD83



CD86

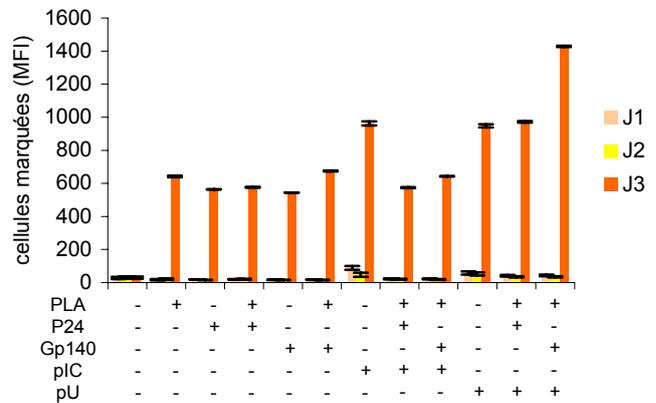


Figure 45 : Résultats obtenus sur différents marqueurs après mise en contact avec les cellules de Langerhans de différentes formulations ; de gauche à droite : cellules seules, nanoparticules de PLA à 0,1% de taux de solide, p24 à 0,2 g/L, PLA (0,1%)-p24(0,2 g/L), gp140 à 0,2 g/L , PLA (0,1%)-gp140 (0,2 g/L), poly (I:C) à 0,5 g/L, PLA (0,1%)-p24 (0,01g/L)-pIC (0,5 g/L), PLA (0,1%)- gp140 (0,2g/L)-pIC (0,5 g/L), poly U à 0,5 g/L, PLA (0,1%)-p24 (0,01g/L)-pU (0,5 g/L), PLA (0,1%)- gp140 (0,2g/L)-pU (0,5g/L)

La maturation *in vitro* de ce type de cellules est assez difficile à obtenir, aussi les résultats ci-dessus, même s'ils sont assez faibles, permettent quand même de dégager des tendances, vu que les expériences représentées figure 45 ont été reproduites 3 fois. Il semble qu'en solution, poly (I:C) et poly U aient tous deux une action sur la maturation de ces cellules avec un effet qui décroît dans le temps. En revanche, une fois formulés sur les particules de PLA, il semble que seul le poly U conserve sa capacité de maturation visible à l'expression du CD86.

Il ressort des tests *in vitro*, menés sur nos formulations, que l'utilisation des TLR ligands peut être un atout de poids pour augmenter l'action sur la réponse cellulaire de nos vecteurs particuliers. En effet, malgré la variabilité inter-individus, il est possible de constater que le poly (I:C) présente une forte action de maturation sur notre modèle de

cellules dendritiques. Couplé aux particules, il ne perd pas cette propriété et on entrevoit même un effet synergique entre les particules de CSD et le poly (I:C). Cependant, dans le cas des cellules de Langerhans, le poly U semble plus actif, surtout couplé aux nanoparticules. Même si une corrélation entre le *in vitro* et le *in vivo* est difficile, le poly U peut aussi être une voie d'amélioration des résultats.

10. Propriétés immunologiques des formulations *in vivo*

Après des résultats encourageants *in vitro*, les formulations les plus efficaces ont été utilisées lors de protocoles d'immunisation chez la souris. Un suivi de l'apparition des anticorps dans des prélèvements vaginaux, fécaux et de serum a été fait grâce à un dosage des anticorps anti-p24 par ELISA. La réponse cellulaire est aussi mesurée grâce au prélèvement, au dernier jour de l'expérience, des rates des souris afin d'observer différentes réponses par ELISPOT et d'évaluer la réponse cytotoxique.

10.1. Comparaison chez le modèle souris de la p24 formulée sur les PLA et CSD

Les nanoparticules de PLA-p24 ont prouvé leur capacité à induire de fortes réponses humorales dans différents modèles animaux (Ataman-Onal, 2006). De plus, l'étude de l'influence de la dose de p24 injectée a montré que l'efficacité des PLA est peu influencée et qu'elles entraînent le même taux en anticorps, malgré la moindre concentration de p24. Lors de cette expérience, nous avons voulu observer si ces paramètres influençaient les nanoparticules de CSD. Des formulations à base de CSD avec différentes concentrations en p24 et différents taux de solides de CSD ont été testées. Le protocole d'immunisation n°1 (*tableau 1*) a été mené comme décrit dans le matériel et méthode (*cf. 4.3 Les solutions d'immunisation*): les formulations ont été injectées aux animaux en sous cutanée et des prélèvements sont effectués avant chaque injection.

Ordre sur le graphique	Groupe	Nombre de souris	Dose	Voie	Volume
1	A	5	10µg PLA-p24 SC	SC	100 µl
2	B	5	10µg p24-CSD (1%)	SC	100 µl
3	D	5	10µg p24-CSD(0,1%)	SC	100 µl
4	C	5	1µg p24-CSD(1%)	SC	100 µl
5	E	5	1µg p24-CSD(0,1%)	SC	100 µl
6	F	5	CSD(1%) / CSD(0,1%) témoins	SC	100 µl

Tableau 24 : Plan d'injection du protocole d'immunisation 1

10.1.1. Induction d'anticorps

Pour ce protocole nous nous sommes surtout intéressés à la réponse humorale. En conséquence, nous avons choisi des souris de type BALB/c décrites pour produire des titres en anticorps élevés. Le titre en anticorps anti-p24 a été suivi et dosé toutes les deux semaines de 0 à 6 semaines pour tous les groupes de souris immunisés (*figure 46*).

Le groupe de souris auquel ont été injecté la p24 formulée sur les PLA sera considéré comme un contrôle positif.

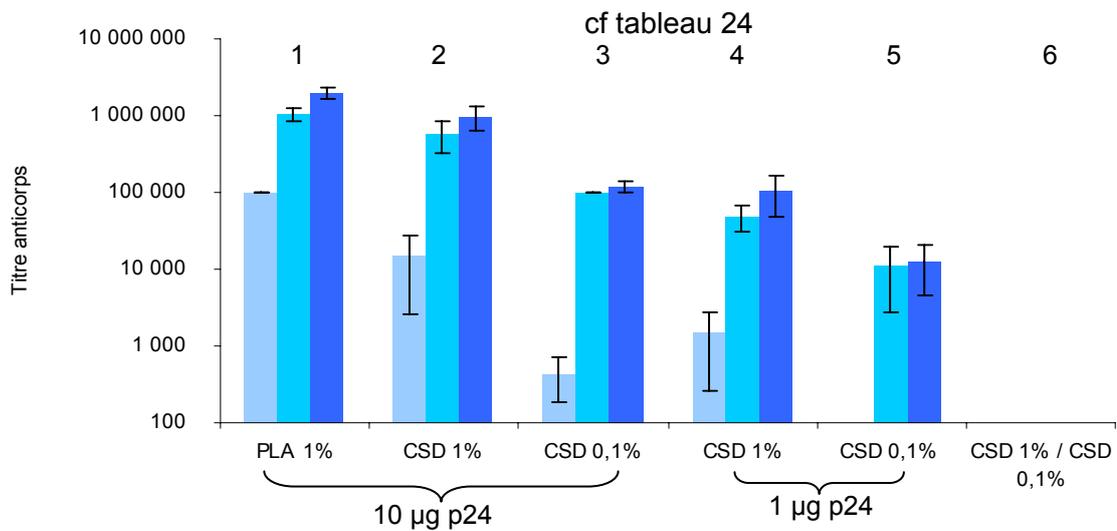


Figure 46 : Titre des anticorps (IgG) dans les sérums des souris

Comme attendu, les souris immunisées par injection de la p24 adsorbée sur les particules de PLA produisent des taux élevés d'anticorps avec un titre en anticorps de 10^6 . Les souris immunisées avec les CSD présentent des taux d'anticorps presque aussi élevés que les PLA. En effet, les souris immunisées avec les CSD 1% portant la plus forte concentration en p24 permettent d'atteindre les mêmes titres en anticorps que les souris du groupe témoin positif.

Il est intéressant de constater l'effet dose lié à la concentration en protéine. En effet, à taux de solide en particules égal on constate une baisse d'un log du titre en anticorps produit lorsque la concentration en p24 est diminuée d'une unité log. De même, la concentration en nanoparticules de CSD semble avoir une conséquence sur la production d'anticorps puisqu'à taux de p24 équivalent on constate également une diminution de l'ordre d'une unité log de la production d'anticorps lorsque le taux de solide baisse d'une unité log.

De façon assez intéressante, ces effets doses semblent se compenser l'un l'autre. Les souris immunisées avec un fort taux de solide de CSD mais une faible concentration de p24 (groupe C) présentent le même titre en anticorps que celles avec un faible taux de solide et une forte concentration protéique (groupe D) ce qui montre l'effet synergique des particules de CSD.

10.1.2. Induction de cytokines

La production de deux cytokines (IL4 et IFN γ) par les splénocytes a été dosée par ELISPOT pour les mêmes groupes A, B, C, D, E, et F de souris immunisées (*tableau 1*). Pour chaque groupe, le résultat de chaque souris a été analysé en individuel.

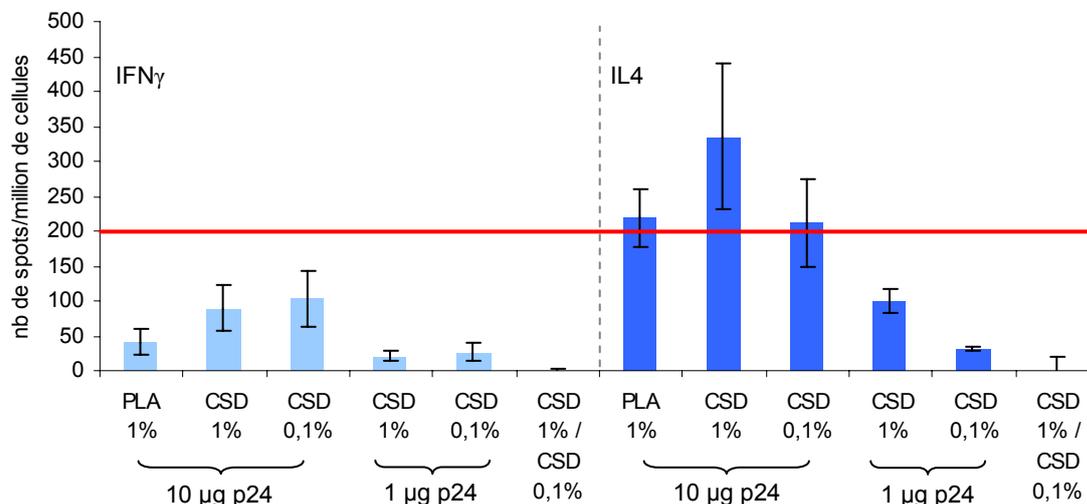


Figure 47 : Résultats des ELISPOT IL4 et IFN γ restimulés par la p24

Les résultats des dosages de cytokines sont considérés comme positifs lorsque la réponse était au-delà de 200 spots par millions de splénocytes, ce qui correspond à la moyenne des réponses obtenues en S0 ou « cut-off ». Dans le cas de l'IL4, certaines formulations dépassent cette limite, alors que pour l'IFN γ , les réponses restent toutes sous le « cut-off ».

Ces résultats obtenus pour la production d'IFN γ sont considérés comme négatifs puisqu'inférieurs à 200 spots par millions de cellules. Les échantillons présentant la plus forte concentration en p24 formulée sur les CSD sont environ deux fois supérieurs aux niveaux obtenus pour le témoin positif PLA. Il semble y avoir un fort effet dose lié à la concentration en p24 puisque lorsque la concentration en p24 est divisée par 10 la production IFN γ chute d'un facteur 50. Le taux de solide des CSD, lui, semble n'avoir que peu d'effet.

Le contrôle positif PLA-p24 dépasse bien le seuil des 200 spots par millions de splénocytes pour l'IL4. Les particules de CSD ayant le plus fort taux de protéine entraînent une production d'IL4 supérieure ou égale à celle du témoin. Les particules recouvertes avec un taux plus faible de p24 induisent une réponse en deçà du témoin positif et de la barre des 200 spots par million de cellules. Il semble donc bien y avoir un effet dose lié à la concentration en protéine. Cependant, contrairement à ce qui a pu être observé pour la production d'IFN γ , il semble y avoir aussi un effet dose lié au taux de solide des CSD, aussi bien pour les hautes concentrations en protéines que pour les plus

faibles. Cependant, la combinaison la plus efficace pour induire la production d'IL4 est celle des nanoparticules de CSD à 1% de taux de solide recouvertes de 10 µg de p24. Cette production d'IL4 permet de penser que la réponse serait de type Th2.

10.2. Influence du poly (I:C) sur la réponse immunitaire chez la souris

Suite au protocole d'immunisation 1, nous avons voulu confronter l'efficacité sur l'activation cellulaire *in vitro* de certaines des formulations testées. Les formulations ayant montré la meilleure activité d'induction de la maturation cellulaire ont été injectées à des souris lors du protocole d'immunisation 2 (tableau 25). Sur cette expérience, nous sommes intéressés plus particulièrement à la réponse cellulaire. Les souris utilisées sont des B6D2 qui sont connues pour présenter de fortes réponses cellulaires mais des réponses humorales plus faibles que les balb/c utilisées précédemment.

Groupe	Nombre de souris	Dose	Voie	Volume
A	5	(0,01 g/L) P24	SC	100 µl
B	5	(0,01 g/L) P24-PLA (0.02%)	SC	100 µl
C	5	CSD(+) (0.1%) + (0,01 g/L) P24	SC	100 µl en mélange
D	5	(0,01 g/L) P24 + (0,01 g/L) Poly(I:C)	SC	100 µl en mélange
E	5	(0,01 g/L) P24-PLA (0.02%)+ (0,01 g/L) Poly(I:C)	SC	100 µl en mélange
F	5	(0,01 g/L) P24-PLA (0.02%)+ CSD(+) (0.1%)	SC	100 µl en mélange
G	5	(0,01 g/L) Poly(I :C)- CSD(+) (0.1%)+ (0,01 g/L) P24	SC	100 µl en mélange
H	5	(0,01 g/L) P24-PLA (0.02%) + (0,01 g/L) Poly(I :C)- CSD(+) (0.1%)	SC	100 µl en mélange

Tableau 25 : Plan d'injection du protocole d'immunisation 2

10.2.1. Induction d'une réponse muqueuse localisée

a) Prélèvements vaginaux

Les IgA et IgG anti-p24 sont dosés par ELISA dans les prélèvements vaginaux. L'injection de ces formulations par voie sous cutanée en direction des ganglions inguinaux ne semble pas induire de réponse anti-p24 au niveau de la muqueuse vaginale pour ce modèle de souris.

Les IgA sont indétectables au-delà du bruit de fond.

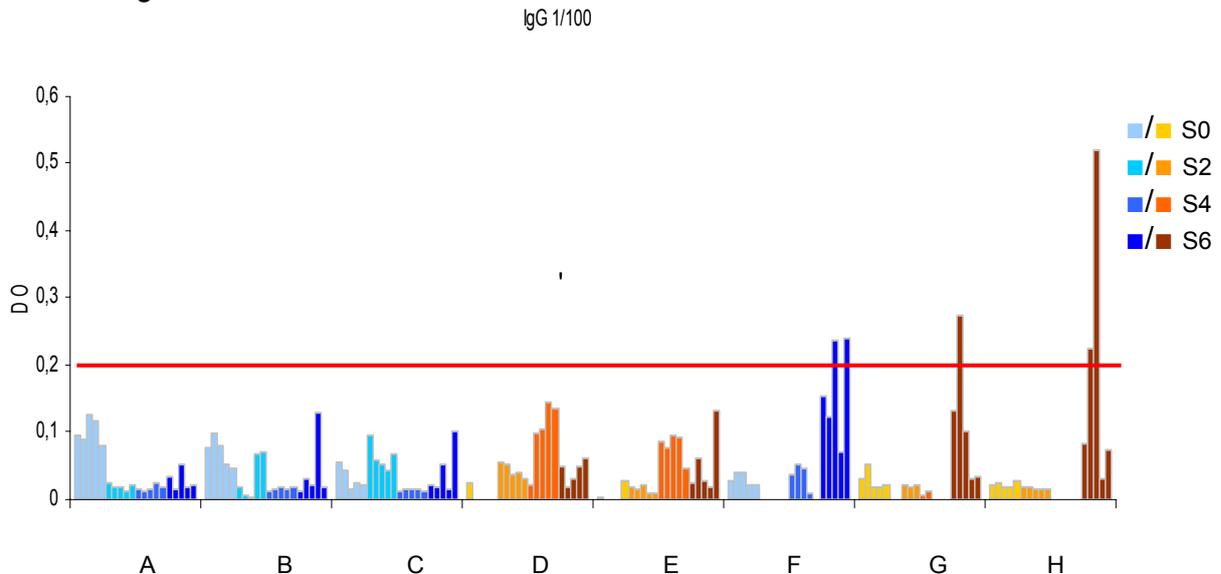


Figure 48 : Dosage des anticorps dans les prélèvements vaginaux dilués aux 1/100°

A : 1 µg de p24, B : 1 µg de p24-PLA (0,02%), C : CSD (0,1%) + 1 µg de p24, D : 1 µg de p24 + 1 µg de poly (I:C), E : 1 µg de p24-PLA (0,02%) + 1 µg de poly (I:C), F : 1 µg de p24-PLA (0,02%) + CSD (0,1%), G : 1 µg de poly (I:C)-CSD (0,1%) + 1 µg p24, H : 1 µg de p24-PLA (0,02%) + 1 µg de poly (I:C)-CSD (0,1%)

Les IgA sont indétectables au-delà du bruit de fond.

Lors du dosage de ces prélèvements, on constate que, malgré les lavages, un fort bruit de fond reste. De plus les niveaux d'anticorps sont assez faibles. Seules quelques souris semblent répondre au-delà du « cut off » (déterminé de la même façon que pour le protocole 1) en dernière semaine de traitement (après les trois injections). Cependant, ces réponses isolées ne peuvent en aucun cas être prises pour des réponses positives. Le dosage des IgA donne des réponses encore plus basses avec un bruit de fond important.

b) Prélèvements de fèces

Pour ces prélèvements, le bruit de fond était encore plus élevé, aussi bien pour les IgA que pour les IgG, et aucune réponse n'a pu dépasser ce niveau. L'injection de ces formulations par voie sous cutanée en direction des ganglions inguinaux semble n'induire aucune production d'anticorps au niveau de la muqueuse anale pour ce modèle de souris.

10.2.2. Induction d'une réponse humorale systémique

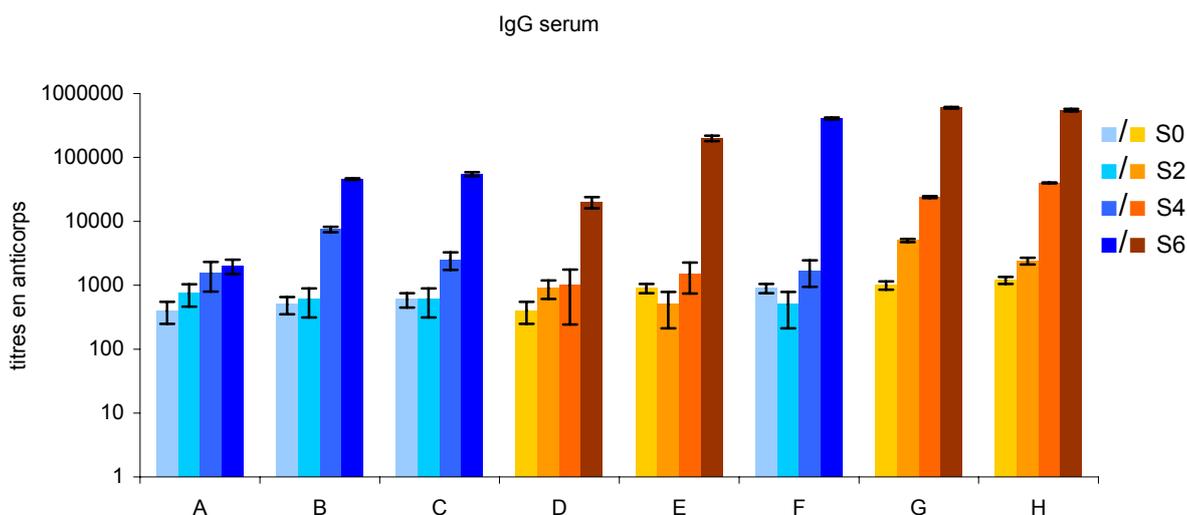


Figure 49 : Titre des anticorps (IgG) dans les sérums des souris

A : 1 µg de p24, B : 1 µg de p24-PLA (0,02%), C : CSD (0,1%) + 1 µg de p24, D : 1 µg de p24 + 1 µg de poly (I:C), E : 1 µg de p24-PLA (0,02%) + 1 µg de poly (I:C), F : 1 µg de p24-PLA (0,02%) + CSD (0,1%), G : 1 µg de poly (I:C)-CSD (0,1%) + 1 µg p24, H : 1 µg de p24-PLA (0,02%) + 1 µg de poly (I:C)-CSD (0,1%)

Dans les séra, les titres en anticorps sont tous identiques après la première injection (S2), sauf pour le groupe G qui présente un titre en anticorps de près d'un demi log plus fort que les autres groupes. La tendance est moins marquée après la deuxième injection (S4), mais les groupes G et H se démarquent toujours des autres. En semaine 6 les résultats se nivellent, même si les groupes E, F, G et H restent à un niveau supérieur. Le poly (I:C) combiné ou en mélange avec les particules semblent avoir un effet sur la production d'anticorps anti-p24. Cependant le groupe F injecté avec un mélange de PLA-p24 et de CSD induit des taux équivalents en anticorps que les groupes G et H avec poly (I:C).

Il ressort de ceci qu'il est possible d'obtenir un niveau assez élevé en anticorps grâce à nos différentes formulations, mais aucune ne se détache des autres de part une plus forte production d'anticorps. Si les titres en anticorps sont plus faibles de près d'un log à ceux présentés lors du protocole d'immunisation 1, cela doit être imputé au modèle de souris (B6D2) choisi plus particulièrement pour sa réponse cellulaire et qui présente une réponse humorale moins élevée que la souris BALB/c.

10.2.3. Induction de cytokines

Suite à des difficultés lors de l'expérience, les ELISPOT n'ont rien révélé, que ce soit au niveau des témoins positifs ou des essais. Quant au test de cytotoxicité, aucun résultat n'a pu être obtenu. Il faut déterminer à présent si cela résulte des conditions de l'expérience elle-même ou bien si les résultats sont réellement négatifs, car le bruit de

fond était assez important. Aussi, la décision de refaire une expérience *in vivo* sous quelques mois à été prise.

Ces protocoles d'immunisations ont pu montrer que les CSD, au même titre que les PLA, sont des vecteurs efficaces de la p24 pour induire de forts taux d'anticorps. Si les PLA sont moins influencés par la concentration en protéine que les CSD, l'utilisation de ces derniers semble néanmoins plus propice à la production d'IL4 que les PLA. Les souris B6D2, modèles choisis pour étudier la réponse cellulaire, montrent des taux d'anticorps humoraux plus faibles. Cependant, on constate que certaines souris immunisées avec le poly (I:C) présentent des anticorps vaginaux. Le groupe G peut laisser entrevoir un effet synergique des CSD sur le poly (I:C).

Afin d'affiner ces premiers résultats, une prochaine expérience est prévue. Le protocole se concentrera plus sur l'effet synergique entre les CSD et le poly (I:C) en étudiant l'influence du taux de solide des particules, ainsi que celle de la concentration de poly (I:C) utilisée.

Discussion et perspectives

La recherche d'un vaccin efficace et sans danger contre le VIH est un grand défi depuis la découverte de la maladie. Récemment, des échecs d'essais cliniques de grande envergure ont suscité un débat sur la recherche de ce vaccin (Watkins, 2008). Les principaux défis dans le développement d'un vaccin préventif contre le VIH sont la grande diversité des souches virales et l'échappement viral face aux réponses immunitaires humorales et cellulaires, ainsi que l'absence de méthodes permettant d'obtenir des anticorps neutralisants à large spectre ainsi que des cellules T cytotoxiques (Barouch, 2008).

Afin de générer la réponse des lymphocytes T, les antigènes protéiques doivent pénétrer dans les cellules présentatrices d'antigènes (comme les cellules dendritiques) où les peptides sont traités pour la présentation aux cellules T CD4 et les cellules T CD8. Au cours des dernières décennies, les systèmes de libération contrôlée ont été utilisés pour la libération prolongée de divers agents. Les nanoparticules ont un potentiel comme adjuvants et systèmes de livraison de vaccins. Cette méthode a de grands avantages pour l'administration des vaccins car le relargage d'antigènes de manière contrôlée pourrait conduire à une initiation prolongée et renforcée de la réponse immunitaire.

Synthèse des nanoparticules

La synthèse de nanoparticules de PLA est une méthode très étudiée et a montré sa robustesse que ce soit au niveau de la répétabilité et de la stabilité des nanoparticules obtenues. Ce travail de thèse a consisté à étudier plus en détails la synthèse de nanoparticules de CSD et a mis en évidence l'influence du degré d'acétylation. Il influe lors de la synthèse sur la taille des particules mais aussi sur leur capacité à rester stables en milieu salin. Varum *et al.* ont prouvé que le DA a une influence sur les propriétés physicochimiques ainsi que les propriétés biologiques comme la biodégradabilité (Varum, 1997). De plus, des études ont montré que le DA n'influence pas la cytocompatibilité du polymère mais que les capacités d'adhésion cellulaire sont augmentées par un DA faible (Chatelet, 2001).

Les particules de PLA et de CSD sont constituées de polymères naturels et les résultats de viabilité cellulaire *in vitro* que nous avons obtenus, permettent de dire qu'elles sont de toxicité réduite. Les travaux de Tiyaboonchaia *et al.* (Tiyaboonchaia, 2007) sur les particules de CSD prouvent une non toxicité pour

les reins *in vivo*. De plus les travaux d'Ataman-Onal et *al.* sur l'immunisation de différents modèles animaux par les PLA montrent l'innocuité des PLA (Ataman-Onal, 2006). Les particules issues de nos travaux ayant été utilisées sur des cultures de cellules mais aussi sur des organismes vivants semblent être sans danger même après assimilation dans différents organes. Aucune des souris immunisées lors de ce travail n'est décédée avant le terme du protocole et très peu de phénomènes inflammatoires ont été constatés après injection.

Dans le cas des particules de CSD, il est important de maîtriser aussi bien le DA que la masse molaire du chitosane utilisé afin de contrôler la toxicité des particules (Huang, 2004). C'est pourquoi, au sein du laboratoire, et en collaboration avec le Pr Delair du LMPB, des études systématiques des diverses caractéristiques physicochimiques et biologiques des différentes particules synthétisées sont prévues.

Adsorption d'antigènes et d'immunomodulateurs sur les nanoparticules de PLA et CSD

Choix de la stratégie : adsorption ou encapsulation ?

Pour fixer l'antigène aux particules, nous avons choisi la méthode empruntée par Kazzaz *et al.* qui ont développé une nouvelle façon d'utiliser les microparticules comme adjuvants par l'adsorption de protéines à leur surface (Jabbal-Gill 2000; Kazzaz, 2000) car en utilisant la méthode d'encapsulation, les protéines étaient dégradées. C'est ainsi que l'adsorption d'antigène à la surface de nos particules a été utilisée pour évaluer leur pouvoir adjuvant. Plusieurs antigènes différents ont pu être testés : les protéines p24 et gp140 du VIH1 et les TLR ligands poly (I:C) et poly U.

Adsorption sur les PLA

Les différents essais d'adsorptions d'antigènes du VIH1 sur les nanoparticules de PLA confirment la grande versatilité des PLA en tant que vecteurs de protéines. En effet, quelle que soit la protéine testée il est aisé d'adsorber de façon stable et répétable avec un bon rendement ce type d'antigène.

Le cas des immunomodulateurs choisis (ligands des TLR 3 et des TLR 7/8) pose un autre problème : le poly U et le poly (I:C) sont tous deux chargés négativement de même que les particules de PLA. L'adsorption dans ces

conditions peut-elle se faire et ce de manière stable ? Il apparaît après de nombreuses tentatives d'adsorption dans différentes conditions qu'il n'est pas possible d'adsorber ces deux TLR ligands de façon répétable sur les nanoparticules de PLA.

Une des alternatives à ce problème est de complexer, au préalable, le TRL ligand avec une protéine afin d'améliorer l'adsorption mais cette méthode demande encore de nombreuses études. Notamment l'étude du complexe protéine/TLR ligand afin d'utiliser la proportion idéale de chacun pour obtenir le complexe le plus facile à adsorber sur les PLA de façon stable et répétable. Une autre méthode qui pourrait permettre de n'adsorber que les immunomodulateurs sur les nanoparticules de PLA, serait de recouvrir ces dernières d'une couche de chitosane qui est chargé positivement comme montré dans les travaux de Messaï et *al.* (Messaï, 2005).

Adsorption sur les CSD

L'intérêt des nanoparticules de CSD vient du fait que l'on peut moduler leur charge de surface en fonction du polymère utilisé en excès pour la synthèse de la particule. En effet, nous obtenons de particules positives avec un excès de chitosane et inversement un excès de sulfate de dextrane va permettre de synthétiser des nanoparticules négatives.

L'adsorption d'antigènes protéiques à la surface des CSD est rapide, facile et répétable avec un rendement d'adsorption élevé. Cependant, les CSD ne permettent pas pour le moment de former des vecteurs protéiques stables sur plusieurs semaines comme les PLA. La stabilité maximale obtenue pour le moment et de quelques jours une fois les particules recouvertes de protéines.

Pour l'adsorption des TLR ligands, les CSD se montrent plus versatiles que les nanoparticules de PLA. En effet, poly (I:C) aussi bien que poly U peuvent être adsorbés directement sur les nanoparticules sans précomplexation ni traitement particulier, par le simple fait que les particules utilisées sont positives. Le point à améliorer tout comme pour les CSD porteurs de protéines reste la stabilité colloïdale des particules après formulation.

Nanoparticules et maturation des cellules dendritiques

Un vecteur d'antigène doit être capable de fixer facilement un antigène et de le transporter efficacement dans un organisme.

Des études menées en microscopie confocale sur des particules fluorescentes marquées à la sulforhodamine B ou la coumarine 6 ont prouvé que les particules pouvaient être internalisées par les cellules dendritiques. Cependant, les mécanismes de transport intracellulaire de ces particules, malgré de nombreuses études restent flous. On remarque que des travaux sur la transfection de gènes ont permis d'affirmer la capacité de vectorisation des nanoparticules. C'est ce que les travaux de Loretz et *al.* proposent avec des particules à base de chitosane et d'EDTA, qui obtiennent un rendement de 35% de transfection avec une cytotoxicité inférieure à 1% sur 4 heures. La faible toxicité de nos particules permet une mise en contact beaucoup plus longue avec les cellules ce qui pourrait permettre d'obtenir éventuellement des rendements plus élevés sinon égaux aux particules de chitosane-EDTA (Loretz, 2006).

Activation des cellules dendritiques *in vitro*

La mise en contact des CSD et PLA, formulées avec des protéines du VIH1 et des TLR ligands, avec les cellules dendritiques nous a permis de montrer que les particules vectorisant le poly (I:C) induisent la maturation des cellules. En effet, les particules (CSD ou PLA) nues ou vectorisant la p24 ne provoquaient aucune maturation cellulaire. De plus nous avons pu observer un effet synergique de la part des CSD sur le poly (I:C).

Pouvoir adjuvant des particules *in vitro*

Un adjuvant permet d'induire ou d'augmenter la réponse immunitaire lorsqu'il est associé à un antigène. Selon cette définition, les particules de CSD formées lors de notre travail, ont donc bien une capacité adjuvante synergique puisque lors des études menées *in vitro* il est possible d'obtenir, avec les CSD portant 1 ng de poly (I:C), une réponse équivalente à une concentration de 100 ng de poly (I:C) en solution. La capacité adjuvante de nos particules permet d'augmenter d'un facteur 100 l'activité du poly (I:C). La réponse anticorps dosée dans le sérum des souris immunisées avec un autre antigène, la p24, est élevée et correspond au niveau de réponse des particules de PLA et de l'adjuvant de Freund (Ataman-Onal, 2006).

Capacité d'induction de la réponse immune

Les particules synthétisées lors de ce travail présentent bien la capacité d'induire une réponse immunitaire lorsque la p24 est fixée à leur surface. En effet, les immunisations effectuées sur les souris montrent la présence d'anticorps humoraux anti-p24 en forte quantité, que la protéine soit vectorisée par les PLA ou les CSD. Cette réponse n'est pas liée seulement à la présence de la p24 qui, injectée à des souris, induit des titres inférieurs à 10^5 (Régnier S., 2004).

Parallèlement à l'induction des anticorps, les deux types de particules sont capables d'activer la production des cytokines par les cellules de rate des souris avec des taux légèrement supérieurs à ceux induits par les CSD-p24.

Si ces particules sont capables d'induire une réponse immunitaire systémique en présence d'un antigène, la réponse cellulaire reste très faible, d'où l'utilisation de TLR ligands comme adjuvants de nanoparticules. Ces dernières formulations permettent d'obtenir aussi une réponse anticorps systémique. La réponse cellulaire locale, au niveau des muqueuses vaginales et anales reste faible mais la détection d'anticorps vaginaux induits par l'injection de particules de CSD combinées au poly (I:C) associées aux particules de PLA-p24 indique que cette formulation pourrait être une bonne piste de travail pour l'amélioration de l'immunité cellulaire locale.

Pouvoir adjuvant des particules in vivo

Un effet dose lié aussi bien au chitosane qu'à la p24 a également pu être mis en évidence, mais il est difficile de déterminer lequel prévaut. En effet les groupes de souris immunisées avec des particules ayant une concentration plus élevée de chitosane et une faible dose de p24 (groupe D) ainsi que celles immunisées avec des particules de faible concentration en chitosane et une dose élevée en p24 (groupe E), présentent des résultats similaires. Une faible quantité de chitosane peut être compensée par une concentration plus importante en p24 et vice versa. Les vecteurs antigéniques produits provoquent donc une réponse immunitaire chez la souris et il existe un effet dose aussi bien pour la concentration en p24 que pour la concentration en particules.

Il faut aussi noter que le groupe de souris C, immunisées avec les CSD (1%) et 10 µg de p24 en surface, présentent des titres en anticorps plus de 10 fois

supérieurs à ceux obtenus avec seulement une injection de la protéine p24. Cette propriété de nos particules correspond à la définition d'un adjuvant. Il est donc possible de considérer que nos particules ont bien un effet adjuvant pour la p24 *in vivo*.

Lors de l'étude de l'induction de la réponse cellulaire au niveau des muqueuses grâce à l'injection de particules avec poly (I:C) à des souris B6D2 nous avons pu constater tout d'abord que la réponse humorale reste importante. Elle est plus faible que celle obtenue lors de la précédente immunisation à cause du modèle de souris qui privilégie la réponse cellulaire. Les taux d'anticorps retrouvés dans les lavements vaginaux sont faibles avec un bruit de fond important mais quelques tendances se distinguent. Il semble que la présence de CSD et de poly (I:C) soit importante pour l'induction d'une réponse cellulaire locale.

Il sera intéressant de pouvoir étudier de façon plus systématique l'influence du poly (I:C) pour cette réponse en faisant varier les concentrations utilisées et les taux de solide des particules utilisées afin de pouvoir déterminer les meilleures conditions d'induction d'une immunité muqueuse chez la souris.

Conclusion

Le but initial de ce travail de thèse était de tester l'hypothèse selon laquelle la co-adsorption d'un ligand de TLR et d'un antigène vaccinal sur des nanoparticules biodégradables pouvait amplifier la réponse immunitaire, notamment muqueuse. Pour cela, l'utilisation de nanoparticules de PLA et de CSD vectorisant un antigène du VIH1 associé à des TLR ligands dont le poly (I:C) et le poly U, a été testée. Nous avons ainsi étudié les possibilités d'adsorption et de co-adsorption sur les deux types de particules et évalué *in vitro* leur potentiel grâce à un test de maturation de cellules dendritiques humaines. Une fois les candidats le plus prometteurs choisis nous avons pu tester leur capacité à induire une réponse humorale et cellulaire chez la souris. Les nanoparticules de PLA apparaissent comme des vecteurs protéiques polyvalents mais l'adsorption ou la coadsorption de TLR ligands à leur surface, n'est pas satisfaisante et nécessite encore des travaux complémentaires pour atteindre une bonne reproductibilité, notamment après adsorption d'un complexe antigène + TLR ligand. Les nanoparticules de CSD qui sont le deuxième modèle choisi pour leurs capacités adjuvantes présentent de plus fortes affinités avec les TLR ligands que ce soit le poly (I:C) ou le poly U, tout en étant de bons vecteurs protéiques. Cette nouvelle génération de particules est très prometteuse, sous réserve que leur stabilité colloïdale après formulation soit améliorée.

Les différentes particules ont été mises en contact avec des cellules dendritiques dérivées de monocytes issus de sang périphérique humain. L'évolution de différents marqueurs de surface, variant selon l'état de maturation cellulaire, de ces cellules a été observée par cytométrie en flux. Nous avons ainsi pu montrer que le fait de coadsorber le poly (I:C) en présence de p24 sur les PLA ou les CSD permettait de conserver les propriétés d'activation cellulaire du poly I :C. De plus, les nanoparticules de CSD ont présenté un effet synergique sur le poly (I:C) pour la maturation de cellules dendritiques *in vitro*. Aussi, la combinaison de nanoparticules PLA en tant que vecteurs d'antigène protéique du VIH1 et des nanoparticules de CSD pour vecteurs du poly (I:C) permettait de combiner le potentiel déjà démontré des nanoparticules de PLA pour la production anticorps humoraux, avec le potentiel d'activation cellulaire des CSD-poly (I:C) et ainsi induire une réponse humorale et cellulaire plus forte.

Les particules de CSD-p24 ainsi que les PLA-p24 injectées en sous cutané à des souris balb/c permettent d'induire de forts taux d'anticorps humoraux au moins équivalent à l'adjuvant de Freund couramment utilisé dans le modèle murin. La réponse cellulaire reste faible même si les CSD semblent légèrement plus actives que les PLA. Afin d'étudier plus spécifiquement la réponse cellulaire et notamment au niveau des muqueuses, la combinaison de PLA-p24 avec les CSD-poly (I:C) a été injectée à des souris de type B6D2 connues pour être un bon modèle pour le suivi de la réponse cellulaire. Des prélèvements de sang pour les anticorps systémiques, ainsi que des prélèvements vaginaux et de fécès ont été réalisés. Les réponses anticorps obtenues étaient légèrement inférieures à celles observées lors de la précédente expérience à cause du modèle de souris. Aucun anticorps n'a pu être détecté dans les prélèvements de fécès peut être dû au fort bruit de fond observé. Les lavements vaginaux présentaient de faibles taux d'anticorps avec tout de même une augmentation lors de l'utilisation de particules en combinaison avec le poly (I:C). Nous avons donc montré que les nanoparticules, que ce soient les celles à base de PLA ou celles de CSD, sont de bons candidats vaccins pour la production d'anticorps systémiques. Ces candidats, associés au poly (I:C) montrent aussi un fort potentiel *in vitro*, et pourraient être un axe d'amélioration de la réponse cellulaire.

Pour la suite de ce travail, une étude systématique *in vivo* de l'effet dose du poly (I:C) et cela sur différents modèles de souris notamment des souris transgéniques ne pouvant pas exprimer les TLR étudiés (Kaisho, 2001 ; Takeda, 2004) pourrait valider les hypothèses d'activation. Il serait aussi intéressant de comparer la sensibilité au poly (I :C) de souris naïves, mais de différents fonds génétiques comme les BALB/c, B6D2 ou Black6 sur une même expérience afin de documenter l'importance de l'induction de la réponse cellulaire.

De même, la poursuite des travaux sur le poly U notamment son effet stimulant sur les cellules de Langerhans observé *in vitro* pourrait aussi être une voie d'amélioration de nos candidats vaccins. Dans ce contexte, une expérience en cours sur des macaques, en collaboration avec le CEA, et comparant les effets du poly (I :C) et du poly U permettra de donner une nouvelle interprétation aux résultats déjà obtenus pendant cette thèse.

Références bibliographiques

Alexopoulou L., Holt A. C., Medzhitov R., Flavell R. A., (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* **413**(6857):732-738.

Allan G. G. and Peyron M., (1995). "Molecular weight manipulation of chitosan II: prediction and control of extent of depolymerization by nitrous acid." *Carbohydrate research* **277**(2): 273-282.

Altfeld M., Allen T. M., Yu X. G., Johnston M. N., Agrawal D., Korber B. T., Montefiori D. C., O'Connor D. H., Davis B. T., Lee P. K., Maier E. L., Harlow J., Goulder P. J., Brander C., Rosenberg E. S., Walker B. D., (2002). "HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus." *Nature* **420**(6914):434-439.

Aguado T., Engers H., Pang T., Pink R., (1999). "Novel adjuvants currently in clinical testing." *Vaccine* **19**:2321-2328.

Akagi T., Wang X., Uto T., Baba M., Akashi M., (2007). "Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly(amino acid) derivatives." *Biomaterials* **28**:3427-3436.

Akira S., Yamamoto M., Takeda K., (2003). "Role of adapters in Toll-like receptor signalling." *Biochem. Soc. Trans.* **31**:637-642.

Akira S, Takeda K. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol.* 2004 Jun;327(6):581-589. Review.

Amiji M. M., Vyas T. K., Shah L. K., (2006). "Role of nanotechnology in HIV/AIDS treatment: potential to overcome the viral reservoir challenge." *Discov. Med.* **6**(34):157-162.

Ashish D., Binulal N. S., Anitha A., Nair S. V., Furuike T., Tamura H., Jayakumar R., (2010). "Preparation of poly(lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications." *Carbohydrate Polymers* **80**(3): 833-838.

Ataman-Onal Y., Munier S., Ganée A., Terrat C., Durand P. Y., Battail N., Martinon F., Le Grand R., Charles M. H., Delair T., Verrier B., (2006). "Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models." *J. Control. Release* **112**(2):175-185.

Babensee J. E. and Paranjpe A., (2005). "Differential levels of dendritic cell maturation on different biomaterials used in combination products." *J Biomed Mater Res A* **74**(4): 503-510.

Bacon A., Makin J., Sizer P. J., Jabbal-Gill I., Hinchcliffe M., Illum L., Chatfield S., Roberts M., (2000). "Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens." *Infect. Immun.* **68**(10):5764-5770.

Bejjani R. A., BenEzra D., Cohen H., Rieger J., Andrieu C., Jeanny J. C., Gollomb G., Behar-Cohen F. F., (2005). "Nanoparticles for gene delivery to retinal pigment epithelial cells." *Mol. Vis.* **11** : 124-132.

Barouch D. H., (2008). "Challenges in the development of an HIV-1 vaccine." *Nature* **455**(7213):613-619.

Bhaskar S., Pollock K. M., Yoshida M., Lahann J., (2010). "Towards designer microparticles: simultaneous control of anisotropy, shape, and size." *Small.* **6**(3):404-411.

Beaudette T. T., Bachelder E. M., Cohen J. A., Obermeyer A. C., Broaders K. E., Frechet J. M., Kang E. S., Mende I., Tseng W. W., Davidson M. G., (2009). "In vivo studies on the effect of coencapsulation of CpG DNA and antigen in acid-degradable microparticle vaccines." *Mol. Pharm.* **6**:1160-1169.

Bell J. K., Mullen G. E., Leifer C. A., Mazzoni A., Davies D. R., Segal D. M., (2003). „Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors." *Trends Immunol.* **24**(10):528-533.

Bielinska A. U., Janczak K. W., Landers J. J., Markovitz D. M., Montefiori D. C., Baker J. R., (2008). "Nasal immunization with a recombinant HIV gp120 and nanoemulsion adjuvant produces th1 polarized responses and neutralizing antibodies to primary HIV type 1 isolates." *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **24**(2): 271–281.

Bivas-Benita M., van Meijgaarden K. E., Franken K. L., Junginger H. E., Borchard G., Ottenhof T. H. and Geluk A., (2004). "Pulmonary delivery of chitosan-DNA nanoparticles enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding HLA-A*0201-restricted T-cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis." *Vaccine* **22**(13): 1609-1615.

Blankson J. N., Persaud D., Siliciano R. F., (2002). "The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection." *Annu. Rev. Med.* **53**:557-593.

Bomsel M., (2002). "Initial steps of HIV transmission at mucosal sites." *Virologie* **6** :363-378.

Borges O., Cordeiro-da-Silva A., Tavares J., Santarem N., de Sousa A., Borchard G., Junginger H. E., (2008). "Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**:405-416.

Brave A., Hinkula J., Cafaro A., (2007). "Candidate HIV-1 gp140dv2, gag and tat vaccines protect against experimental HIV-1/ MULV challenge." *Vaccine* **25**(39–40), 6882–6890.

- Broaders K. E., Cohen J. A., Beaudette T. T., Bachelder E. M., Frechet J. M., (2009). "Acetalated dextran is a chemically and biologically tunable material for particulate immunotherapy." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **106**:5497-5502.
- Burke B., Gomez-Roman V. R., Lian Y., (2009). "Neutralizing antibody responses to subtype b and c adjuvanted HIV envelope protein vaccination in rabbits." *Virology* **387**(1), 147–156.
- Cella M., Salio M., Sakakibara Y., Langen H., Julkunen I., Lanzavecchia A., (1999). "Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA". *J. Exp. Med.* **189**(5):821-829.
- Centelles M. N., Isasi J. R., Qian C., Campanero M. A., Irache J. M., (2010). "Influence of the chitosan nature on the transfection efficacy of DNA-loaded nanoparticles after hydrodynamic administration in mice." *J. Microencapsul.* **27**(5):460-469.
- Chatelet C., Damour O. and Domard A., (2001). "Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films." *Biomaterials* **22**: 261-268.
- Cid C., Ramos V., Lopez-Lacomba J. L. and Heras A., (2000). "Preparation and characterisation of chitosan films: application in cell cultures." **4**: 93-97.
- Cohen J. A., Beaudette T. T., Tseng W. W., Bachelder E. M., Mende I., Engleman E. G., Frechet J. M., (2009). "T-cell activation by antigen-loaded pH-sensitive hydrogel particles in vivo: the effect of particle size." *Bioconjug. Chem.* **20**:111-119.
- Csaba N., Garcia-Fuentes M., Alonso M. J., (2009). "Nanoparticles for nasal vaccination." *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **61**(2):140-157.
- Dastan T. and Turan K., (2004). "In vitro characterization of chitosan-DNA microparticles into mammalian cells." *J Pharm Pharm Sci.* **7**: 205-214.
- Denuzière A., Ferrier D., Damour O. and Domard A., (1998). "Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complex: biological properties." *Biomaterials* **19**: 1275-1285.
- Diebold S. S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S., Reis e Sousa C., (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." *Science* **303**(5663):1529-1531.
- Dou H., Grotepas C. B., McMillan J. M., Destache C. J., Chaubal M., Werling J., Kipp J., Rabinow B., Gendelman H. E., (2009). "Macrophage delivery of nanoformulated antiretroviral drug to the brain in a murine model of neuroAIDS." *J. Immunol.* **183**(1):661-669.
- Drogoz A., Munier S., Verrier B., David L., Domard A., Delair T., (2008). "Towards biocompatible vaccine delivery systems: interactions of colloidal PECs

based on polysaccharides with HIV-1 p24 antigen." *Biomacromolecules* **9**(2):583-591.

Eisenbarth S. C., Colegio O. R., O'Connor W., Sutterwala F. S., Flavell R. A., (2008). "Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants." *Nature* **453**(7198):1122-1126.

Fahmy T. M., Demento S. L., Caplan M. J., Mellman I., Saltzman W. M., (2008). "Design opportunities for actively targeted nanoparticle vaccines." *Nanomedicine* **3**(3):343-355.

Fairman J., Moore J., Lemieux M., (2008). "Enhanced *in vivo* immunogenicity of SIV vaccine candidates with cationic liposome- DNA complexes in a rhesus macaque pilot study." *Hum. Vaccin.* **5**(2).

Faisal S. M., Yan W., McDonough S. P., Chang Y. F., (2009). "Leptospira immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity." *Vaccine* **27**(3):378-387.

Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J. P., Benita S., (1999). "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement." *Int. J. Pharm.* **55**: R1-R4.

Fischer H. G. and Blielinsky A. K., (1999). "Antigen presentation function of brain derived dendriform cells depends on astrocyte help." *International Immunology* **11**(8): 1265-1274.

Fujihashi K., Kato H., van Ginkel F. W., Koga T., Boyaka P. N., Jackson R. J., Kato R., Hagiwara Y., Etani Y., Goma I., Fujihashi K., Kiyono H., McGhee J. R., (2001). "A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance." *Acta. Odontol. Scand.* **59**(5):301-308.

Furman P. A., Fyfe J. A., St Clair M. H., Weinhold K., Rideout J. L., Freeman G. A., Lehrman S. N., Bolognesi D. P., Broder S., Mitsuya H., (1986). "Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**(21):8333-8337.

Gallo R. C., (2005). "The end or the beginning of the drive to an HIV-preventive vaccine: a view from over 20 years." *Lancet* **366**(9500):1894-1898.

Gatti E., Velleca M. A. and al, (1999). "Large-Scale culture and selective maturation of human Langerhans cells from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized CD34+ progenitors." *Yale University school of medicine.*

Geijtenbeek T. B., Kwon D. S., Torensma R., van Vliet S. J., van Duijnhoven G. C., Middel J., Cornelissen I. L., Nottet H. S., KewalRamani V. N., Littman D. R., Figdor C. G., van Kooyk Y., (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." *Cell* **100**(5):587-597.

Girard M. P., Osmanov S. K., Kieny M. P., (2006). "A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV)." *Vaccine* 24(19):4062-4081.

Gluckman J. C., (2004). "Les cellules présentatrices de l'antigène." *Inserm EMI-0013 et Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Immunopathologie de l'EPHE* **Conférence**.

Guillon C., Mayol K., Terrat C., (2007). "Formulation of HIV-1 tat and p24 antigens by pla nanoparticles or mf59 impacts the breadth, but not the magnitude, of serum and faecal antibody responses in rabbits." *Vaccine* 25(43), 7491–7501.

Gupta R. K., (1998). "Aluminum compounds as vaccine adjuvants." *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 32(3):155-172.

Ham A. S., Cost M. R., Sassi A. B., Dezzutti C. S., Rohan L. C., (2009). "Targeted delivery of psc-rantes for HIV-1 prevention using biodegradable nanoparticles." *Pharm. Res.* 26(3): 502–511.

Hamman J. H., Schultz C. M., Kotzé A. F., (2003). "N-trimethyl chitosan chloride: optimum degree of quaternization for drug absorption enhancement across epithelial cells." *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 29(2):161-172.

Heil F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H., Bauer S., (2004). „Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* 303(5663):1526-1529.

Hejazi R. and Amiji M., (2003). "Chitosan-based gastrointestinal delivery systems." *Journal of controlled release* 89(2): 151-165.

Hillaireau H., Couvreur P., (2009). "Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery." *Cell. Mol. Life Sci.* 66(17): 1873-2896.

Huang M., Khor E., Lim L. Y., (2004). "Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation." *Pharm. Res.* 21(2):344-353.

Imler J. L., Hoffmann J. A., (2001). „Toll receptors in innate immunity." *Trends Cell. Biol.* 11(7):304-11.

Jabbal-Gill I., LinW., Jenkins P., Watts P., Jimenez M., Illum L., Davis S. S., Wood J. M., Major D., Minor P. D., Li X., Lavelle E. C. and Coombes A. G. A., (2000). "Potential of polymeric lamellar substrate particules (PLSP) as adjuvants for vaccines. ." *Vaccine* 18: 238-250.

Janes K. A., Calvo P. and Alonso M. J., (2001). "Polysaccharide colloïdal particles as delivery systems for macromolecules." *Adv Drug Deliv Rev.* 47: 83-97.

Janeway C. A. Jr, Medzhitov R., (2002). "Innate immune recognition." *Annu. Rev. Immunol.* **20**:197-216.

Jiang Y. H., Emau P., Cairns J. S., (2005). "Spl7013 gel as a topical microbicide for prevention of vaginal transmission of sHIV89.6p in macaques." *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **21**(3): 207-213.

Kaisho T., Akira S., (2001). "Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice." *Trends in Immunology* **22**(2): 78-83.

Karikó K., Ni H., Capodici J., Lamphier M., Weissman D., (2004). "mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3." *J. Biol. Chem.* **279**(13):12542-12550.

Kawamura M., Wang X., Uto T., (2005). "Induction of dendritic cell-mediated immune responses against HIV-1 by antigen-capturing nanospheres in mice." *J. Med. Virol.* **76**(1): 7-15.

Kazzaz J., Neidleman J., Singh M., Ott G. and O'Hagan D. T., (2000). "Novel anionic microparticles are potent adjuvant for the induction of cytotoxic T lymphocytes against recombinant p55 gag from HIV-1. ." *Journal of controlled release* **67**: 347-356.

Khan J. A., Brint E. K., O'Neill L. A., Tong L., (2004). "Crystal structure of the Toll/interleukin-1 receptor domain of human IL-1RAPL." *J. Biol. Chem.* **279**(30):31664-31670.

Korber B., Gaschen B., Yusim K., Thakallapally R., Kesmir C., Detours V., (2001). "Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation." *Br. Med. Bull.* **58**:19-42.

Kornprobst J. M. (2005). Invertébrés protosomiens. Substances naturelles d'origine marine et Chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies É. T. Doc, Lavoisier. **2**.

Kotzé A. F., Thanou M. M., Luebetaen H. L., de Boer A. G., Verhoef J. C., Junginger H. E., (1999). "Enhancement of paracellular drug transport with highly quaternized N-trimethyl chitosan chloride in neutral environments: in vitro evaluation in intestinal epithelial cells (Caco-2)." *J. Pharm. Sci.* **88**(2):253-257.

Kurita K., Kaji Y., Mori T. and Nishiyama Y., (2000). "Enzymatic degradation of b-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation." *Carbohydrate Polymers* **42**: 19-21.

Lamalle-Bernard D., Munier S., Compagnon C., Charles M. H., Kalyanaraman V. S., Delair T., Verrier B., Ataman-Onal Y., (2006). "Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity." *J. Control. Release* **115**(1):57-67.

Lanzavecchia A., (1999). "Dendritic cells maturation and generation of immune responses." *Haematologica* **84**: 23-25.

Leung L., Srivastava I. K., Kan E., (2004). "Immunogenicity of HIV-1 *env* and *gag* in baboons using a DNA prime/protein boost regimen." *AIDS* **18**(7): 991–1001.

Loretz B. and Bernkop-Schnurch A., (2006). "In vitro evaluation of chitosan-EDTA conjugate polyplexes as a nanoparticulate gene delivery system." *AAPS J.* **8**(4): 756-764.

Lu D., Garcia-Contreras L., Xu D., Kurtz S. L., Liu J., Braunstein M., McMurray D. N., Hickey A. J., (2007). "Poly (lactide-co-glycolide) microspheres in respirable sizes enhance an in vitro T cell response to recombinant Mycobacterium tuberculosis antigen 85B." *Pharm. Res.* **24**:1834-1843.

MacCullough K. C., Summerfield A., (2009). "Targeting the porcine immune system--particulate vaccines in the 21st century." *Dev. Comp. Immunol.* **33**(3):394-409.

McCutchan F. E., Hoelscher M., Tovanabutra S., Piyasirisilp S., Sanders-Buell E., Ramos G., Jagodzinski L., Polonis V., Maboko L., Mmbando D., Hoffmann O., Riedner G., von Sonnenburg F., Robb M., Birx D. L., (2005). "In-depth analysis of a heterosexually acquired human immunodeficiency virus type 1 superinfection: evolution, temporal fluctuation, and intercompartment dynamics from the seronegative window period through 30 months postinfection." *J. Virol.* **79**(18):11693-11704.

Maisnier-Patin K., Crabé S., Breton G., Dupuy F. P., Yassine-Diab B., Sékaly R. P., (2007). "mRNA-transfected dendritic cells: a promising strategy in immunotherapy." *Med. Sci.* **23**(3):279-284

Marciani D. J., (2003). "Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity." *Drug. Discov. Today* **8**(20):934-943.

Matsumoto M., Kikkawa S., Kohase M., Miyake K., Seya T., (2002). "Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**(5):1364-1369.

Melchjorsen J., Jensen S. B., Malmgaard L., Rasmussen S. B., Weber F., Bowie A. G., Matikainen S., Paludan S. R., (2005). „Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner." *J. Virol.* **79**(20):12944-12951.

Messai I., Delair T., (2005). "Adsorption of Chitosan onto Poly(D,L-lactic acid) Particles: a physico-chemical investigation." *Macromol. Chem. Phys.* **206**(16) : 1667-1674.

Meyer T., Stockfleth E., (2008). "Clinical investigations of Toll-like receptor agonists." *Expert Opin. Investig. Drugs* **17**(7):1051-65.

Miller J. D., Masopust D., Wherry E. J., Kaech S., Silvestri G., Ahmed R., (2005). "Differentiation of CD8 T cells in response to acute and chronic viral infections: implications for HIV vaccine development." *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **5**(2):121-129.

Milman G., Sharma O., (1994). "Mechanisms of HIV/SIV mucosal transmission.AIDS." *Res. Hum. Retroviruses.* **10**(10):1305-12.

Moldoveanu Z., Staas J. K., Gilley R. M., Ray R., Compans R. W., Eldridge J. H., Tice T. R., Mestecky J., (1989). "Immune responses to influenza virus in orally and systemically immunized mice." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **146**:91-99.

Moriyama A., Shimoya K., Ogata I., Kimura T., Nakamura T., Wada H., Ohashi K., Azuma C., Saji F., Murata Y., (1999). "Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) concentrations in cervical mucus of women with normal menstrual cycle." *Mol. Hum. Reprod.* **5**: 656-661.

Mottram P. L., Leong D., Crimeen-Irwin B., Gloster S., Xiang S. D., Meanger J., Ghildyal R., Vardaxis N., Plebanski M., (2007). "Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus." *Mol. Pharm.* **4**:73-84.

Mourya V. K., Inamdar N. N., (2009). « Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery." *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **20**(5):1057-79.

Musette P., Auquit Auckbur I., Begon E., (2006). "Innate immunity: cutaneous expression of Toll-like receptors." *Med. Sci.* **22**(2):149-152.

Muzio M., Polntarutti N., Bosisio D., Prahladan M. K., Mantovani A., (2000). "Toll like receptor family (TLT) and signalling pathway." *Eur. Cytokine Netw.* **11**(3):489-90.

Miyake A., Akagi T., Enose Y., (2004). "Induction of HIV-specific antibody response and protection against vaginal sHIV transmission by intranasal immunization with inactivated sHIV-capturing nanospheres in macaques." *J. Med. Virol.* **73**(3): 368–377.

Nishiya T., Kajita E., Miwa S., Defranco A. L., (2005). „TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements." *J. Biol. Chem.* **280**(44):37107-17.

Nowacek A. S., Miller R. L., McMillan J., Kanmogne G., Kanmogne M., Mosley R. L., Ma Z., Graham S., Chaubal M., Werling J., Rabinow B., Dou H., Gendelman H. E., (2009). "NanoART synthesis, characterization, uptake, release and toxicology for human monocyte-macrophage drug delivery." *Nanomedicine* **4**(8):903-917.

Okamoto S., Yoshii H., Akagi T., Akashi M., Ishikawa T., Okuno Y., Takahashi M., Yamanishi K., Mori Y., (2007). "Influenza hemagglutinin vaccine with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles enhances the protection against influenza virus infection through both humoral and cell-mediated immunity." *Vaccine* **25**:8270-8278.

Onishi H., Machida Y., (1999). "Biodegradation and distribution of water soluble chitosan in mice." *Biomaterials* **20**: 157-176.

Ott G., Barchfeld G. L., Van Nest G., (1995). "Enhancement of humoral response against human influenza vaccine with the simple submicron oil/water emulsion adjuvant MF59." *Vaccine* **13**(16):1557-1562.

Palliser D., Chowdhury D., Wang Q. Y., (2006). "An siRNA-based microbicide protects mice from lethal *herpes simplex virus 2* infection." *Nature* **439**(7072): 89-94.

Perrie Y., Mohammed A. R., Kirby D. J., McNeil S. E., Bramwell V. W., (2008). "Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens." *Int. J. Pharm.* **364**(2):272-80.

Peterlin B. M. and Trono D., (2003). "Hide, shield and strike back : how HIV-infected cells avoid immune eradication." *Nat Rev Immunol.* **3**(2): 97-107.

Primard C., Rochereau N., Luciani E., Genin C., Delair T., Paul S., Verrier B., (2010). "Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells." *Biomaterials* **31**(23):6060-6068.

Ramos V., Garcia-Cantelajo J. M., Heras A. and Lopez-Lacomba J. L., (2000). "Chitosan influence on the growth of several cellular lines." **4**(194-199).

Rando R. F., Nguyen-Ba N., (2000). "Development of novel nucleoside analogues for use against drug resistant strains of HIV-1." *Drug Discov. Today* **5**(10):465-476.

Rao S. B. and Sharma C. P., (1997). "Use of the chitosane as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential." *Journal of Biomedical Materials Research* **34**: 21-28.

Rechtsteiner G., Warger T., Osterloh P., Schild H., Radsak M. P., (2005). "Cutting edge: priming of CTL by transcutaneous peptide immunization with imiquimod." *J. Immunol.* **174**(5):2476-2480.

Régnier S., (2004). "Immunogénicité des Protéines P24 et TAT du VIH1 dans une nouvelle formulation vaccinale : adjuvantation par les nanoparticules PLA." *Diplôme EPHE*.

Rice-Ficht A. C., Arenas-Gamboa A. M., Kahl-McDonagh M. M., Ficht T. A., (2010). "Polymeric particles in vaccine delivery." *Curr. Opin. Microbiol.* **13**(1):106-112.

Robinson H. L., (2002). "New hope for an AIDS vaccine." *Nat. Rev. Immunol.* **2**(4):239-250.

Ruiz S., Beauvillain C., Mévélec M. N., Roingeard P., Breton P., Bout D., Dimier-Poisson I., (2005). "A novel CD4-CD8alpha+CD205+CD11b- murine spleen dendritic cell line: establishment, characterization and functional analysis in a model of vaccination to toxoplasmosis." *Cell. Microbiol.* **7**(11):1659-1671.

Rupp R., Rosenthal S. L., Stanberry L. R., (2007). "Vivagel (spl7013 gel): A candidate dendrimer – microbicide for the prevention of HIV and hsv infection." *Int. J. Nanomedicine* **2**(4) : 561-566.

Sakaue G., Hiroi T., Nakagawa Y., (2003). "HIV mucosal vaccine: Nasal immunization with gp160-encapsulated hemagglutinating virus of japan-liposome induces antigen-specific ctls and neutralizing antibody responses." *J. Immunol.* **170**(1): 495-502.

Sato A. and Iwasaki A., (2004). "Induction of antiviral immunity requires Toll-like receptor signaling in both stroma and dendritic cell compartments." *PNAS* **101**(46): 16274-16279.

Schatz C. (2002). "Chitosane : comportement en solution et formation de particules", Thèse, Université Claude Bernard Lyon 1.

Schijns V. E., (2001). "Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants." *Crit. Rev. Immunol.* **21**:75-85.

Shigemasa Y., Saito K., Sashiwa H. and Saimoto H., (1994). "Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins." *International Journal of Biol. Macromol.* **16**(1): 43-49.

Smith S. M., Mefford M., Sodora D., Klase A., Singh M., Alexander N., Hess D., Marx P. A., (2004). "Topical estrogen protects against SIV vaginal transmission without evidence of systemic effect." *AIDS* **18**: 1631-1643.

Sosnik A., Chiappetta D. A., Carcaboso A. M., (2009). "Drug delivery systems in HIV pharmacotherapy: what has been done and the challenges standing ahead." *J. Control. Release* **138**(1):2-15.

Spira A. I., Marx P. A., Patterson B. K., Mahoney J., Koup R. A., Wolinsky S. M., Ho D.D., (1996). "Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques." *J. Exp. Med.* **183**(1):215-225.

Takeda K., Kaisho T., Akira S., (2003). "Toll-like receptors." *Annu. Rev. Immunol.* **21**:335-376.

- Tan X., Chu C. K., Boudinot F. D., (1999). "Development and optimization of anti-HIV nucleoside analogs and prodrugs: A review of their cellular pharmacology, structure-activity relationships and pharmacokinetics." *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **39**(1-3):117-151.
- Tatt I. D., Barlow K. L., Nicoll A., Clewley J. P., (2001). "The public health significance of HIV-1 subtypes." *AIDS* **15**(5):S59-71.
- Thomsen L. L., Topley P., Daly M. G., Brett S. J., Tite J. P., (2004). "Imiquimod and resiquimod in a mouse model: adjuvants for DNA vaccination by particle-mediated immunotherapeutic delivery." *Vaccine* **22**(13-14):1799-1809.
- Tiyaboonchaia W. and Limpeanchobb N., (2007). "Formulation and characterization of amphotericin B–chitosan–dextran sulfate nanoparticles ", *International Journal of Pharmaceutics* **329**(1-2): 142-149.
- Tomihata K. and Ikada Y., (1997). "In vitro and in vivo degradation of films of chitins and its partially deacetylated derivatives." *Biomaterials* **18**(7): 567-575.
- Triantafilou K., Orthopoulos G., Vakakis E., Ahmed M. A., Golenbock D. T., Lepper P. M., Triantafilou M., (2005). "Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent." *Cell. Microbiol.* **7**(8):1117-1126.
- Tritto E., Mosca F., De Gregorio E., (2009). "Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants." *Vaccine* **27**(25-26):3331-3334.
- Ueno H., Mori T. and Fujinaga T., (2001). "Topical formulations and wound healing applications of chitosan." *Advanced drug delivery reviews* **52**: 105-115.
- Underhill D. M., Ozinsky A., (2002). "Toll-like receptors: key mediators of microbe detection." *Curr. Opin. Immunol.* **14**(1):103-110.
- Uto T., Wang X., Sato K., Haraguchi M., Akagi T., Akashi M., Baba M., (2007). "Targeting of antigen to dendritic cells with poly(gammaglutamic acid) nanoparticles induces antigen-specific humoral and cellular immunity." *J. Immunol.* **178**:2979-2986.
- Vachoud L., Zydowicz N. and Domard A., (1997). "Formation and characterisation of a physical chitin gel." *Carbohydrate research* **302**(3-4): 169-177.
- Valladeau J., (2006). "Langerhans cells." *Med. Sci.* **22**(2):144-148.
- Varum K. M., Myhr M. M., Hjerde R. J. N. and Smidsrod O., (1997). "In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum." *Advanced drug delivery reviews* **21**: 157-176.
- Veazey R. S., Marx P. A., Lackner A. A., (2001). "The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS." *Trends Immunol.* **22**(11):626-33.

Vyas T. K., Shah L., Amiji M. M., (2006). "Nanoparticulate drug carriers for delivery of HIV/AIDS therapy to viral reservoir sites." *Expert Opin. Drug Deliv.* **3**(5):613-628.

Wang X., Uto T., Akagi T., Akashi M., Baba M., (2008). "Poly(γ -glutamic acid) nanoparticles as an efficient antigen delivery and adjuvant system: Potential for an AIDS vaccine." *J. Med. Virol.* **80**(1): 11–19.

Watkins D. I., Burton D. R., Kallas E. G., Moore J. P., Kof W. C., (2008). "Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans." *Nature Medicine* **14** : 617–621.

Watson D. S., Huang Z., Szoka F. C. Jr, (2009). "All-trans retinoic acid potentiates the antibody response in mice to a lipopeptide antigen adjuvanted with liposomal lipid a." *Immunol. Cell Biol.* (2009).

Weber C., Drogoz A., David L., Domard A., Charles M. H., Verrier B., Delair T., (2010). "Polysaccharide-based vaccine delivery systems: Macromolecular assembly, interactions with antigen presenting cells, and in vivo immunomonitoring." *J. Biomed. Mater. Res. A* **93**(4):1322-1334.

Westwood A., Healey G. D., Williamson E. D., Eyles J. E., (2005). "Activation of dendritic cells by microparticles containing Bacillus anthracis protective antigen." *Vaccine* **23**:3857-3863.

Wischke C. , Zimmermann J., Wessinger B., Schendler A., Borchert H. H., Peters J. H., Nesselhut T., Lorenzen D. R., (2009). "Poly(l:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation." *Int. J. Pharmaceutics* **365**(1-2): 61-68.

Woodrow K. A., Cu Y., Booth C. J., Saucier-Sawyer J. K., Wood M. J., Saltzman W. M., (2009). "Intravaginal gene silencing using biodegradable polymer nanoparticles densely loaded with small-interfering RNA." *Nat. Mater.* **8**(6): 526-533.

Xiang S. D., Scholzen A., Minigo G., David C., Apostolopoulos V., Mottram P. L., Plebanski M., (2006). "Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter?" *Methods* **40**:1-9.

Yang W., Fu J., Wang T., He N., (2009). "Chitosan/sodium tripolyphosphate nanoparticles: preparation, characterization and application as drug carrier." *J. Biomed. Nanotechnol.* **5**(5):591-595.

Zarembek K. A., Godowski P. J., (2002). "Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines." *J. Immunol.* **169**(2): 1136-1143.

Publications

Liste des communications

Effect of chitosan nanoparticles on the maturation of dendritic cells, Barcelone Munanovac janvier 2008. C. Weber, T. Delair & B. Verrier - présentation orale.

Optimisation of an HIV gp140/TLR agonist co-delivery nanoparticle modality for the induction of mucosal antibody responses, Europrise course Stockholm avril 2008. C. Weber C.Primard, E.Luciani, S. Munier, C. Terrat, A. Calamel & B. Verrier - présentation orale.

Design of nanoparticular carriers targeting toll like receptors for vaccine purpose, Europrise course Londres septembre 2008. C. Weber, C.Primard, E.Luciani, S. Munier, C. Terrat, A. Calamel & B. Verrier - poster.

Co-adsorption of TLR3 ligand and HIV-1 antigens as a tool for increasing potency of biodegradable vaccine vehicle, Europrise Malte novembre 2008. C. Weber, C.Primard, E.Luciani, S. Munier, C. Terrat, A. Calamel & B. Verrier - présentation orale.

Co-adsorption of TLR3 ligand and HIV-1 antigens as a tool for increasing potency of biodegradable vaccine vehicle, Munanovac Lyon décembre 2008. C. Weber, C.Primard, E.Luciani, S. Munier, C. Terrat, A. Calamel & B. Verrier - présentation orale.

Co-injection of TLR3 ligand and HIV-1 antigens as a tool for increasing potency of biodegradable vaccine vehicle, Europrise Budapest, 2010. C. Weber, V. Pavot, C.Primard, E.Luciani, S. Munier, A.Borel, C. Terrat, A. Calamel, T. Delair & B. Verrier - présentation orale.

Co-injection of TLR3 ligand and HIV-1 antigens as a tool for increasing potency of biodegradable vaccine vehicle, Munanovac Barcelone, 2010. C. Weber, V. Pavot, C.Primard, E.Luciani, S. Munier, A.Borel, C. Terrat, A. Calamel, T. Delair & B. Verrier, - présentation orale.

Co-injection of TLR3 ligand and HIV-1 antigens as a tool for increasing potency of biodegradable vaccine vehicle, AIDS vaccine Atlanta, 2010. C. Weber, V. Pavot, C.Primard, E.Luciani, S. Munier, A.Borel, C. Terrat, A. Calamel, T. Delair & B. Verrier - poster

Co-injection of TLR3 ligand and HIV-1 antigens as a tool for increasing potency of biodegradable vaccine vehicle, AIDS Vienna, 2010 C. Weber, V. Pavot, C.Primard, E.Luciani, S. Munier, A.Borel, C. Terrat, A. Calamel, T. Delair & B. Verrier - poster

Publication n°1

Ce travail a été repris dans ce mémoire de thèse notamment lors du chapitre 8 abordant l'étude des particules de CSD et leur sélection.

Polysaccharide-based vaccine delivery systems: Macromolecular assembly, interactions with antigen presenting cells, and *in vivo* immunomonitoring

Caroline Weber,¹ Alexandre Drogoz,² Laurent David,² Alain Domard,²

Marie-Hélène Charles,³ Bernard Verrier,¹ Thierry Delair²

¹Institut de Biologie et Chimie des Protéines, 69367 Lyon Cedex 07, France

²Laboratoire des Matériaux Polymères et des Biomatériaux, UMR CNRS 5223 Ingénierie des Matériaux Polymères, Université de Lyon, Université Lyon 1, Domaine Scientifique de la Doua, Villeurbanne Cedex 69622, France

³BioMérieux, chemin de l'orme, Marcy l'Etoile 69280, France

Received 12 September 2008; revised 12 June 2009; accepted 18 June 2009

Published online 26 October 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.a.32605

Abstract: Using a strategy of macromolecular assembly, a colloidal vaccine delivery system was obtained from chitosan and dextran sulfate and loaded with an antigenic protein (p24, the capsid protein of HIV-1). The colloidal polyelectrolyte complexes (PECs) were obtained by charge neutralization of the polyanion and polycation at a charge ratio (n^+/n^-) of 2 (CHDS). The conditions of assembly were tuned to maintain the colloidal properties of the carrier in high salt environment. The relative molar masses of the two polyions and the degree of acetylation (DA) of chitosan were essential parameters to achieve this goal, and this could be related to the nanometric scale organization of the colloids observed by Small Angle X-rays Scattering experiments. The binding of p24 to the colloidal carrier was achieved and the release of the antigen was investigated. Antigen presenting cells [dendritic cells (DCs)],

obtained from monocytes, could internalize the colloids. Immature DCs (iDCs) were not matured by the colloidal PECs either loaded or not loaded with p24, as proved by Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS) analysis. Despite this lack of *in vitro* interaction, a specific immune response was observed in mice with a high production of antibodies, after subcutaneous injection. The analysis of the interleukin production shows that both the cellular and the humoral responses were stimulated. This work brings a physico-chemical insight on polysaccharide-based antigen delivery systems and opens up new perspectives for their use as vaccine carriers. © 2009 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res* 93A: 1322–1334, 2010

Key words: chitosan; vaccine delivery; particles; polyelectrolyte complexes; HIV

INTRODUCTION

Nanoparticles associated to proteins offer a great potentiality of applications in life sciences^{1,2} specially for drug³/vaccine⁴ delivery systems. For *in vivo* applications, colloids based on polyelectrolyte complexes (PECs) are quite attractive because they can be obtained in the absence of potentially toxic organic solvents or chemical cross-linkers, simply by mixing two aqueous solutions of polyelectrolytes of opposite charges.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Correspondence to: T. Delair; e-mail: Thierry.Delair@univ-lyon1.fr

© 2009 Wiley Periodicals, Inc.

The formation of colloidal polyelectrolyte complexes was pioneered by Dautzenberg.⁵ Besides high polymer dilution, other factors have an important impact on the course of the particle formation like the order of reactant addition,⁶ the addition rate,⁷ the respective molar mass of the polycation and polyanion,^{5–7} the salt concentration, and pH.^{5,8}

Colloidal polyelectrolyte complexes from natural polymers are of particular interest in Life Sciences because the biopolymers can be chosen for their low toxicity and bioresorbability. Chitosan is mainly obtained by deacetylation of chitin, a polysaccharide naturally occurring in biomass. PECs between chitosan and various polyanions were obtained: DNA, for gene delivery,⁹ poly(γ -L-glutamic acid),¹⁰ carboxymethyl cellulose,¹¹ alginates,¹² carboxymethyl konjac glucomannan,¹³ and dextran sulfate.^{14,15}

Particles composed of polysaccharides and proteins were produced by mixing a protein solution

with a chitosan solution. Hence, nanocomplexes of chitosan derivatives and insulin were synthesized¹⁶ via electrostatic interactions and nanogels of chitosan and ovalbumin could be prepared, provided a heating step was carried out.¹⁷ Proteins could be incorporated within chitosan gels obtained with sodium tripolyphosphate,^{18,19} sodium sulfate,²⁰ or within particles obtained by polyelectrolyte complexes of polysaccharides.^{11,21–24} A second approach toward protein/nanoparticles associations, called bionanoparticles, was to make the colloid first and then to adsorb the protein, as reported by various authors.^{25–28}

Here, we report on the design and the synthesis of bionanoparticles for vaccine delivery. The particles were obtained by polyelectrolyte complexation, based on our previous results,²⁹ with the aim of keeping the colloidal stability in high salt concentration media. Their impact on the maturation of DCs, which are involved in the establishment of an adapted immune response, was assessed *in vitro* on both phenotypic and functional features. Finally, the bionanoparticle immunogenicity was investigated in a mouse model.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials

Chitosan was produced from squid pens chitin, with a relatively high weight-average molar mass and low Degree of Acetylation (DA) (Mahtani chitosan PVT, batch 124, DA ~5%, M_w ~349,000 g/mol). Prior to use, the sample was purified as follows: dissolving in a 0.1M acetic acid aqueous solution, filtration through Millipore membranes of decreasing porosity (from 3 to 0.22 μm), precipitation with an ammonia/methanol mixture, rinsing with deionized water until neutrality and lyophilization. Purified high molar mass chitosans were N-acetylated in homogeneous medium at different DAs with acetic anhydride. The reaction was performed in a hydro-alcoholic mixture according to the procedure previously described by Vachoud.³⁰ After re-acetylation, chitosans were neutralized, rinsed with deionized water, then freeze-dried. In addition, controlled nitrous deaminations yielding chain scissions^{14,15} were performed to produce low molar mass polymers. Chitosans were dissolved at 0.5% (w/v) in a 0.2M acetic acid/0.1M sodium acetate buffer. A 0.15M sodium nitrite solution was added to chitosan solutions to obtain a nitrite/glucosamine unit molar ratio of 0.5. The reaction was performed under moderate magnetic stirring for various times (2–15 h), depending on the targeted M_w . Low molar mass chitosans were recovered by precipitation with an ammonia/methanol mixture and purified by several washings with deionized water until neutrality and finally lyophilized.

Dextran sulfates (DS) with weight-average molar masses ~104 g/mol (DS 10 k) or 1×10^6 g/mol (DS 500 k) were provided by Sigma and used without further purification.

The sulfur content was determined for each sample by colloidal titration. The degree of sulfation was 2.2 ± 0.2 (mol/mol) for both dextran sulfate, the water content was provided by the manufacturer.

Recombinant HIV-1 protein p24 was prepared in *Escherichia coli* (*E. Coli*) as previously described.³¹ The pMH-24 expression vector contains the HIV-1 p24 gene and a 6-histidine tag at its N-terminal end, allowing efficient purification by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). *E. coli* strain RRE was transformed with this expression plasmid and the extracts of soluble proteins were purified by IMAC using a Ni-NTA activated resin. Residual endotoxin was removed by adsorption to polymyxin B. The purified protein (pI 5.9, $M_w = 26,931$ g/mol)³² was more than 95% pure; the endotoxin content was below 10 EU/mg of p24 protein, as determined using the QCL-1000 Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) kit (BioWhittaker, Walkersville, Verviers, Belgium).

Methods

Characterization of chitosan

Degrees of acetylation were determined on purified chitosans by ¹H NMR spectroscopy (Varian, 500 MHz), according to the method developed by Hirai et al.³³ The water content was determined by thermogravimetric analysis (DuPont Instrument 2950). The weight-average molecular weight (M_w) and the polydispersity index (I_p) were measured by size exclusion chromatography (SEC) (3000 and 6000 PW TSK gel columns, inner diameter = 7.8 mm and length = 300 mm) coupled on line with a differential refractometer (Waters 410) and a multi-angle-laser-light-scattering (MALLS, Wyatt, Dawn DSP) spectrophotometer equipped with a 5 mW He/Ne laser operating at $\lambda = 632.8$ nm. Analyses were performed in micro-batch mode using the K5 flow cell. A degassed 0.2M acetic acid/0.15M ammonium acetate buffer (pH = 4.5) was used as eluent. The flow rate was maintained at 0.5 mL/min. Refractive index increments (dn/dc) were determined from a master curve previously established under identical conditions, i.e., in the same solvent and with an interferometer (NFT Scan Ref) operating at $\lambda = 632.8$ nm.³⁴

Preparation of polyelectrolyte solutions

Chitosan was dispersed in de-ionized water at various concentrations, taking into account the water content in the solid state. Dissolution was achieved under moderate stirring by adding a stoichiometric amount of 0.1M hydrochloric acid, with respect to the free amino functions, for each degree of acetylation. Sodium chloride was added to vary the ionic strength. Then, solutions were adjusted to pH = 4.0 with 0.1M sodium hydroxide or hydrochloric acid and the added amount was considered to calculate the final concentration and the total ionic strength of 0.05M. Before use, all solutions of chitosan were filtered on 0.22 μm pore size Millipore membranes. Dextran sulfate solutions, at different concentrations, were prepared directly in de-ionized water.

Sodium chloride was added to obtain the required ionic strength and pH was adjusted at 4.0 with 0.1M hydrochloric acid. Solutions were also filtered on 0.22 μm pore size Millipore membranes before use.

Polyelectrolyte complex formation

Colloidal PECs were formed in non stoichiometric conditions at a polymer charge molar ratio $R (n^+/n^-) = 2$, at room temperature using chitosan as starting solution.^{14,15} The solution containing dextran sulfate was added in one shot to the starting solution at identical ionic strength (50 mM) and pH = 4, under a constant magnetic stirring of 1250 rpm. The final volume of the particle dispersion was 30 mL with a solid content of 0.1% w/w. In all experiments, the initial amino and sulfate moieties concentrations in the starting solutions of chitosan and dextran sulfate, respectively, were set at $6 \times 10^{-3}M$ corresponding to a weight concentration close to 0.1% for both polymer solutions. Because of non stoichiometric conditions, the polymer in excess was not completely consumed, thus, a low amount of free polymer still remained in solution. To remove it, particles were separated from the continuous phase by centrifugation at 7800 g for 30 min at 20°C. The supernatant was discarded, the pellet re-suspended in de-ionized water and the centrifugation repeated. Finally, the particles were re-dispersed in a minimum volume of de-ionized water to reach a solid content of 2%.

Synthesis of fluorescent particles

Fluorescent particles were synthesized by incorporation within the particles of the red fluorophore sulforhodamine B (Molecular Probes, France, absorption/emission wavelengths: 565 nm/586 nm). Sulforhodamine B is water soluble and was added to the dextran sulfate solution at a final concentration of $10^{-5}M$. The protocol used was that described earlier.

Protein sorption onto colloidal PECs

The sorption process consisted in mixing equal volumes of the particle dispersion (at 1% initial solid content) and of the p24 solution (at various concentrations) in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 5.7. The incubation was carried out for 20 h at room temperature under moderate end-over-head stirring. Then, the tubes were centrifuged for 10 min (1800 g, 20°C). The supernatants were recovered and centrifuged for 15 min (3000 g at 20°C) to remove the particles that would potentially remain in suspension. The amount of loaded p24 was deduced from titration of the free p24 in the supernatant with a BCA assay (Pierce, Bezons, France), according to the instructions of the manufacturer. The pellets were re-dispersed in $\sim 200 \mu\text{L}$ of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 5.7 (for long term storing), or PBS (for DC cells interactions and immunisations), according to the desired protein concentration for a final solid content around 1% (w/v). The particles obtained

were characterized in terms of size, surface charge, and solid content.

Physico-chemical characterization of the complex dispersions

Particle solid contents

The solid content was defined by the ratio between the weight of dried particles (after purification) at 150°C for 30 min, to the initial weight of the solution.

Quasi-elastic light scattering

Dynamic light scattering measurements of polyelectrolyte complex dispersions were carried out using a Malvern Zetasizer HS3000 equipped with a 10 mW He/Ne laser beam operating at $\lambda = 633 \text{ nm}$ (at 90° scattering angle). All indicated values were triplicates of ten measurements each, obtained at $25.0^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$. The self-correlation function was expanded in a power series (Cumulants method). The polydispersity value provided by the software is a dimensionless value defined by $\mu_2/(\Gamma)^2$, where μ_2 is the second cumulant of the correlation function and (Γ) the average decay rate. For a monodisperse colloid, the polydispersity index should be below 0.05, but values up to 0.5 can be used for comparison purposes.³⁵

Small angle X-ray scattering

Small Angle X-ray Scattering (SAXS) was performed at the ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France on BM2-D2AM). The data were collected at an incident photon energy of 16 keV. We used a bidimensional detector (CCD camera from Roper Scientific). All data corrections were performed thanks to the software *bm2img* available on D2AM. The data were corrected from the dark current (i.e., non exposed camera), flat field response (i.e., homogeneously illuminated camera), and taper distortion. Finally, the radial average around the image center (location of the center of the incident beam) was performed. To deduce the scattering vector values (q), we used a calibration standard (silver behenate). The polyelectrolyte complex dispersions (solid content of 1% w/w) obtained as described above, were put in cylindrical sample holders (internal diameter of about 5 mm). The contribution of the cell filled with the solvent alone was subtracted from the scattering curve of the sample studied. To estimate the width of transition layer, the Porod's asymptotic behavior was studied, and modeled according to:

$$I(q) = C/q^4 - B/q^2.$$

The value of the interface of transition layer L_1 was calculated from the determination of the Porod's constant C and the interface constant B , according to $L_1 = \sqrt{12\pi B/C}$. This expression assumes that the shape of the electron

density profile is linear in the transition layer.³⁶ Results are expressed as the average of three measurements in the same conditions.

Electrophoretic mobilities

Electrophoretic mobilities (μ_E) of the colloids were determined at 25°C with a Malvern Zetasizer HS3000 equipped with a 10 mW He/Ne laser beam operating at $\lambda = 632.8$ nm. μ_E was expressed as the average of 15 measurements with a relative error of ~5%. To avoid physi-sorption of the free polymer onto the surface of particles, they were separated from the medium by centrifugation. Zeta potentials were derived from the electrophoretic mobility measurements using the Smoluchowski's equation.

Critical concentration of coagulation

The calculation of the critical concentration of coagulation allowed the determination of the limiting NaCl concentration for which the particles passed from a slow mode of aggregation to a fast one. Measurements were done with diluted samples, at a solid content of 0.01%, and by using solutions at concentrations from 1 mM to 2M NaCl. The aggregation process was monitored with time by plotting the variations of the absorbance at 500 nm of the sample (UVIKON XL UV-VIS) versus time. The slope of the linear section of each trace was determined. The ratio of this slope to the maximum slope corresponds to the stability factor W . Finally, the log plot of W versus I , the ionic strength, afforded the CCC corresponding to the junction of both linear sections of the plot.

Interactions with DCs

The cells were obtained after the various stages of separation and culture corresponding to the Lanzavecchia method.³⁷ Cells were issued from peripheral human blood, obtained via a convention signed with EFS (Etablissement Français du Sang). Cells were put in contact during 24 h and 48 h with PEC colloids diluted in PBS, at various conditions, at a ratio of 1 mL of cells at 1 million/mL, and 100 μ L of colloidal dispersion at 0.1% of solid content. The mixture was distributed in the wells of cell culture plates and incubated at 37°C, 5% CO₂ and 50% of moisture, to study the maturation of DC. The evolution and the appearance of certain surface markers [CD1a (IgG1 clone BL6), CD25 (IgG2a clone B1.49.9), CD80 (IgG1 clone L307.4), CD83 (IgG1 clone HB15e), CD86 (IgG2b clone IT2.2)] was carried out by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) with a Facsibur 3C (Becton-Dickinson, Le Pont-de-Claix, France), using labeled antibodies from Beckman-Coulter, (Villepinte, France). Experimental conditions were selected so as to at least 80% of cell viability was obtained. All experiments with DCs were carried out on three independent donors, as stipulated in Figure 4.

Cytokine assay

After 3 days of treatment of DCs, the cellular supernatants were recovered and frozen at a temperature of -20°C. The cytokine assays from the supernatants were carried out, after centrifugation, with the technique of the multiplexed balls of a made-to-order kit "10plex" (Linco, RU) according to the recommendations of the supplier. This kit allows the simultaneous assay of IL1b, IL2, IL6, IL8, IL10, IL12p70, IFN γ , IL12p40free, IP10, IFN α .

Mouse immunization

Six- to eight-week-old female Balb/C mice from Charles River Laboratories (Lyon, France), were hosted in the PBES (Plateau de Biologie Expérimental de la Souris/Mice experimental biology facility) animal care facility of Ecole Normale Supérieure de Lyon (<http://www.ifr128.prd.fr/PBES.htm>), and handled following the institutional guidelines. The positive control consisted in a group injected subcutaneously with poly(lactic acid) (PLA) particles carrying 10 μ g of p24.

The first injection (Table I) was performed subcutaneously at week 0 (W0) followed by a boost with the same formulation on week three (W3). Blood sampling was performed from the retro-orbital vein, on W2, W4, and W6. The animals were sacrificed on W6, after the last blood sampling.

Anti-p24 antibody titers

The presence of anti-p24 antibodies in the pre-immune and immune sera was determined by ELISA; 96-well plates were coated overnight at room temperature with 100 μ L of a 1 μ g/mL p24 protein solution in PBS buffer. The plates were then blocked for 1 h at 37°C with 200 μ L of 10% non fat dry milk PBS and washed three times with 0.05% PBS-Tween (PBST) serial dilutions of mouse serum were prepared in 1% bovine serum albumin (BSA) PBS; 100 μ L were added to the plates in duplicate and incubated for 1 h at 37°C. After three washes with PBST buffer, bound mouse antibodies were detected with peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (Southern Biotech by Clinisciences, Montrouge, France) at a concentration of 0.1 μ g/mL in 1% BSA-PBS for 1 h at 37°C. Following washing, plates were developed with 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) (BD Pharmingen, Le Pont-de-Claix, France), prepared according to the manufacturer's instructions, for 30 min in the dark and the reaction was stopped with 100 μ L of 1N sulphuric acid. The absorbance at 450 nm was measured with a Model 680 Microplate Reader (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Antibody titers represent the reciprocal of the serum dilution producing an absorbance of 0.1 in the ELISA test. The results are expressed as the average of each group of animals for duplicates.

Enzyme linked immunospot assay

This technique consists the evaluation of the number of cells producing IFN γ and IL4. ELISPOT makes possible to

TABLE I
Mouse Immunization Protocol

Group	Number of Mice	Immunogene (solid content)
A	5	10 µg PLA-p24 (1%)
B	5	10 µg p24-CHDS(+) (1%)
C	5	1 µg p24-CHDS(+) (1%)
D	5	10 µg p24-CHDS(+) (0.1%)
E	5	1 µg p24-CHDS(+) (0.1%)
F	5	CHDS(+) (1%) CHDS(+) (0.1%)

100 µL of immunogene were injected subcutaneously each time to the animals on weeks 0 and 3. In group F, 50 µL of each CHDS particle dispersion (at 1 and 0.1% solid content) were injected subcutaneously as a blank.

determine the number of cells secreting a particular cytokine in response to a specific stimulus. The cells used for these ELISPOT were the spleen cells of the immunized mice, according to Table I. After dissection of spleen and obtaining a cellular suspension with 1×10^7 cells/mL, the red blood corpuscles present were lysed to recover only the splenocytes. A classical ELISPOT was carried out with stimulation, for 42 h (at 37°C and 5% CO₂) of cells by p24 (7.5 µg/mL). The spots corresponding to each cell secreting the cytokine of interest were counted under the microscope by using the KS Elispot software (Zeiss, Germany). The results were expressed as the average of each group of animals.

RESULTS AND DISCUSSION

The first objective of this work was to obtain colloidal PECs from dextran sulfate and chitosan featuring a colloidal stability compatible with a salt concentration of 0.15M sodium chloride, corresponding to the usual biological environment. Then, the sorption of the model antigen, HIV-1 p24, onto the colloids was investigated so as to obtain p24-coated particles as potential new immunogens. Finally, these immunogens were loaded into DC cells *in vitro* and an *in vivo* immunogenicity assay in mice was carried out.

Colloid elaboration and stability in the presence of salt

Chitosan samples of various DAs and molar masses were prepared according to the method described in the Materials section and their physico-chemical properties are reported in Table II. Particles were prepared by complexation of polyelectrolytes of opposite charges, as described in the Methods section. This strategy is quite attractive as particles were formed directly from the aqueous solutions, in the absence of organic solvent, surfactant, and chemical cross-linker.

The formation of a complex between chitosan in the hydrochloride ammonium form and dextran sulfate was checked by thermogravimetric analysis (TGA) in comparison with the two parent polysaccharides. Whatever the molar charge ratio, a degradation temperature of the complex of about 250°C was observed, between that of dextran sulfate (220°C) and that of chitosan (in the ammonium hydrochloride form; 300°C), confirming that the polymers were effectively associated and not simply physically blended. Similar results were obtained for complexes obtained with chitosan and DS,²⁴ chondroitine sulfate³⁸ and alginates.³⁹

The particles were formed from an experimental protocol according to previous investigations.^{14,15} Core-shell like particles were obtained, the polymer in excess forming the soft shell around a hydrophobic core of neutralized polyelectrolytes.²⁹ The various colloidal dispersions obtained in this work were characterized by measuring their size distribution after the complexation process (crude particles) and purification by centrifugation and redispersion in water or 150 mM sodium chloride.

The obtained colloids were in the submicron range, as seen from Table II. The trends observed in our previous works were confirmed: the crude particle mean size increased with the molar mass and DA of chitosan, but decreased with increasing molar masses of dextran sulfate.^{14,15} This last aspect is true till DA = 30%, above the reverse is observed, particles obtained with the lower mass DS were smaller than with the higher molar mass DS. The centrifugation step, carried out to purify the colloids from the uncomplexed polymer in excess, led to an increase in the average diameter though a limited alteration of the polydispersity index was observed. This size increase can reach 100% of the original value for DAs above 30% with a concomitant decrease in polydispersity indexes. This particular behavior will be discussed with the SAXS results of Table IV.

The zeta potentials of the purified particles were always positive, confirming the localization of the excess chitosan at the solid-liquid interface, but no impact of the DA of chitosan on these values could be observed, though the higher the DA, the lower the charge density of the polycation.

The colloidal stability was investigated by storing the particle dispersions at 1% solids in a 150 mM sodium chloride aqueous solution, to mimic a physiological environment. The charge screening, due to the presence of salt in the medium, induced the aggregation of most of the colloids in less than 24 h, except for all samples obtained with chitosans of DA higher than 30%. With the two DS, stabilities higher than 24 h could be observed. Interestingly, one sample, obtained with chitosan of 150,000 g/mol and DA 51% and the low molar mass dextran sulfate,

TABLE II
Characterization of Positive Particles

Variable			Size of the Particles						Zeta-Potential	Colloidal Stability (%) in Saline
Chitosan		DS ^b	Crude Particles (50 mM NaCl)		Purified Particles (Water)		Purified Particles (150 mM NaCl)			
DA (%)	M_w^a (g/mol)	M_w (g/mol)	nm	I_p^c	nm	I_p^c	nm	I_p^c	mV	
1	13.000	10,000	205	0.22	280	0.35	>2 μ m	1	20	no
		500,000	173	0.19	304	0.30	>2 μ m	1	6	no
1	150.000	10,000	253	0.49	362	0.42	>2 μ m	1	10	no
		500,000	250	0.48	385	0.55	>2 μ m	1	13	no
5	32.000	10,000	214	0.23	358	0.29	>2 μ m	1	28	no
		500,000	204	0.18	389	0.61	>2 μ m	1	28	no
5	130.000	10,000	269	0.41	335	0.21	>2 μ m	1	25	no
		500,000	258	0.38	290	0.18	>2 μ m	1	23	no
9	105.000	10,000	255	0.23	302	0.12	>2 μ m	1	23	no
		500,000	251	0.34	299	0.21	825	0.71	24	no
11.5	137.000	10,000	312	0.47	418	0.35	>2 μ m	1	26	no
		500,000	308	0.48	444	0.56	1505	0.80	29	no
30	120.000	10,000	350	0.44	614	0.14	347	0.15	32	<24 h
		500,000	327	0.45	578	0.31	290	0.13	29	>24 h
51 ^d	150.000 ^d	10,000 ^d	308	0.40	632	0.34	328	0.19	15	>6 days
		500,000	340	0.43	714	0.22	355	0.23	29	>24 h
71	200.000	10,000	467	0.56	1109	0.47	554	0.32	18	>24 h
		500,000	560	0.62	1238	0.34	671	0.36	29	>24 h

Charge ratio $R = 2$.

^a M_w : Molecular weight of polymers.

^bDS: Dextran sulfate.

^c I_p : Polydispersion index.

^dInjection formulation.

featured a stability over 6 days. To better understand this result, this particular colloid, named CHDS in the rest of this article, was investigated in more details.

Physico-chemical characterization of the CHSD colloidal dispersion

The colloidal stability on storing was measured either in milliQ grade water or 150 mM sodium chloride as 1% solid dispersions. From Figure 1, this colloid appears to be stable up to 10 days in a high ionic strength medium. The mean diameter measured in 150 mM sodium chloride was lower than in water, probably as a result of the charge screening leading to a shrinkage of the colloid. The critical coagulation concentration CCC was measured via the variations of turbidity of the particle dispersion, at 0.01% solids, with increasing NaCl concentrations. This CCC was determined as 355 mM, confirming that the stabilization was, at least partly, steric in nature. Hence, the chitosan chains in excess present at the particle interface are oriented toward the aqueous external phase, preventing particles from aggregation.

To further investigate the structure of the interface, Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) experiments were carried out. As seen in Table III, the interface can feature an organization, a diffuse interface, whose width can be measured by SAXS, on conditions that both polymers are quite different in molar mass. In other words, to observe a diffuse interface, the polyelectrolyte should be organized according to the host-guest model developed by Kabanov^{40,41} for which the lower molar mass polymer (of sufficient charge density) can bind in a ladder like manner to the higher one. This model applies well when the low molar mass dextran sulfate was used with chitosans of various DAs and molar masses between $132\text{--}150 \times 10^3$ g/mol, but it does not account for the results obtained with low and high molar masses chitosan and dextran sulfate, respectively. Anyhow, this interfacial organization alone cannot account for the observed stability in a medium of high salt concentration. Indeed, only chitosan with a DA of 51% allowed this stabilization. To try and explain this result, one should consider the physico-chemical properties of chitosan as a function of DA.

Domard and collaborators have extensively investigated the impact of DA on the physico-chemical

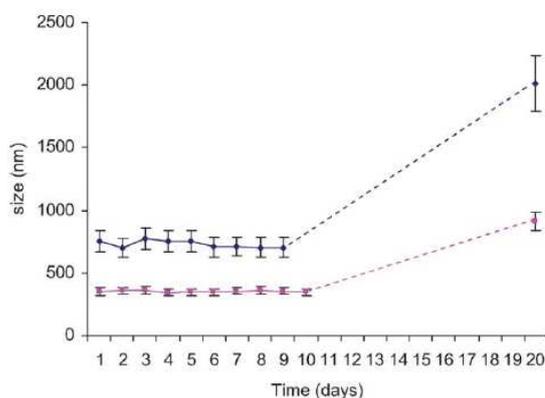


Figure 1. Variations with time of CHDS size at 1% solids; ◆ in water; ■ in 150 mM NaCl. Results are given as the average \pm SD and $n = 4$. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

properties of chitosan in aqueous solution and they have established a general law of behavior.^{34,42,43} Three regions in the DA range were identified:

- $0\% \leq DA \leq 25\%$ in which chitosan, having a high charge density, behaves as a strong polyelectrolyte (with, for instance, a high intrinsic viscosity, high second virial coefficient). In this DA range, the screening of repulsive electrostatic forces by an electrolyte can alter the conformation of the chain;
- $25\% \leq DA \leq 50\%$ where the physical chemical properties of chitosan remain constant due to balanced hydrophilic and hydrophobic interactions;
- $DA \geq 50\%$ for which hydrophobic interactions predominate, favoring polymer chain association.

So, for the current investigation, this translates in terms of various modes of stabilization of the colloids. For $DA \leq 25\%$, the stabilization is predominantly electrostatic and the presence of electrolyte in the medium induces the aggregation of the colloid. In the intermediate DA range (25–50%), the influence of electrostatic forces is still important, hence the

TABLE III
SAXS Values of the Diffuse Interface Depending on the Molar Masses of Dextran Sulfate and DA of Chitosan

		DA (%)	4	5	30	51
Chitosan	M_w (g/mol)		18,000	132,000	130,000	150,000
	DS	500,000	35 ± 4	0	0	
Diffuse interface width (Å)	DS 10,000			61 ± 5	68 ± 8	68 ± 5

DA, degree of acetylation; M_w : molar mass (g/mol).

TABLE IV
Diffuse Interface and Average Diameter Values of Colloids in Various Media

Chitosan (DA = 51%, $M_w = 150,000$ g/mol)	10 mM Phosphate (pH = 5.7)		50 mM NaCl (pH = 5.5)
	Water		
Diffuse interface (Å)	68 ± 5	45 ± 4	95 ± 7
particle size (nm)	790 ± 36	653 ± 31	428 ± 26

Results are given as the average \pm SD, $n = 10$ for particle size.

observed tendency of the dispersions to aggregate in the presence of salt. In the last DA range, 50% and above, the charge density of the chitosan macromolecule is low and steric stabilization predominates. In this domain, too high a DA would favor aggregation of the colloids (in the presence of salt) due to a synergy between the salting out of the chain and the hydrophobic interactions, as seen when $DA = 71\%$. So, $DA = 51\%$, represents the optimum of steric stabilization with a minimum of chain associations.

An interesting behavior of CHDS colloid was reported in Table IV. The colloid was stored as a 1% solid dispersion in water, 10 mM sodium phosphate buffer pH 5.7 and 50 mM sodium chloride, pH 5.5. The average particle diameter was measured by quasi-elastic light scattering and the interface observed by SAXS. Changing the nature of the medium from water to a salt containing buffer led to a decrease in the average diameter of the colloid, confirming the data from Table II where an increase in diameter was observed when particles were changed from 50 mM sodium chloride to de-ionized water. This effect can result from a partial screening of the charges of the outer shell, leading to its compaction, as observed for core-shell latexes, in particular when the shell was composed of polyelectrolytes.⁴⁴ In our case, according to the Guest-Host model, the particles are composed of a hydrophobic core of neutralized charges and a shell of excess chitosan. But the contraction of the shell alone is certainly not enough to explain the large amplitude of variations in diameters reported in Table IV. Hence, one should consider the particular features of these colloids. First, with a chitosan of DA 51%, with a low charge density, it is quite likely that some charges from dextran sulfate remain non neutralized within the core of the colloid. These charges could provoke an expansion of the core at low ionic strength induced by electrostatic repulsive forces. Second, polysaccharides are rather hydrated and the salt increase could also induce a partial desolvation of the polymer chains, favoring the collapse of the core at high ionic strength. Therefore, at this stage of the investigation, one can conclude that ionic strength not only impacts the conformation of the shell but also the core of the particles.

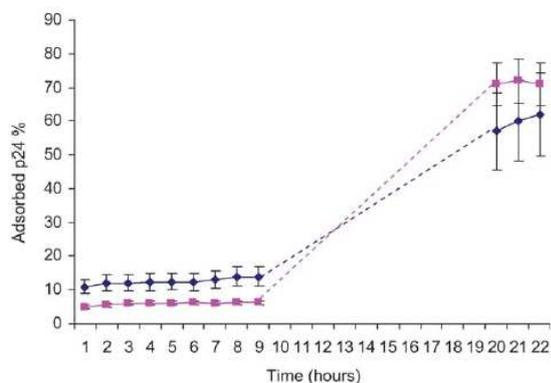
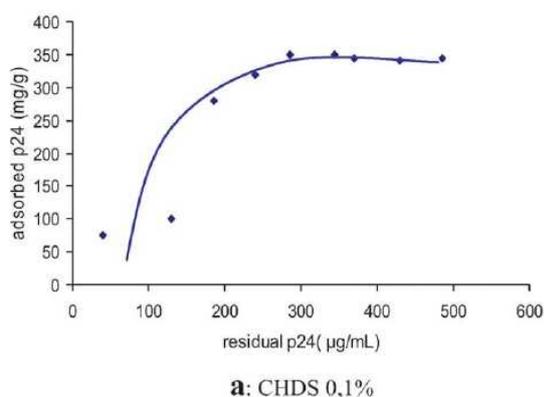


Figure 2. p24 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sorption kinetics for CHDS colloids at two different solid contents; \blacklozenge CHDS 1%; \blacksquare CHDS 0.1% (the data are the average of two independent experiments). Results are given as the average \pm SD and $n = 5$. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

For the interfacial organization, the presence of phosphate salts reduced the diffuse interface, whereas sodium chloride increased the observed width as compared to water. One can speculate that phosphate ions, known to induce chitosan precipitation,⁴⁵ could reduce the diffuse interface by a partial collapse of the chains on the core of the colloid, whereas sodium chloride increases the diffuse interface by de-solvation of chitosan chains and their assembly via hydrophobic interactions or hydrogen bonding.

Sorption of HIV-1 p24

The sorption of the model antigen p24 was investigated in 10 mM sodium acetate buffer pH4.7 as



previously reported,²⁸ but CHDS of particles instantaneously flocculated. So, a 10 mM sodium phosphate buffer pH 5.7 was selected. In this medium, the sorption kinetics was similar to that of the acetate buffer for other types of colloidal polyelectrolyte complexes,²⁸ 20 h were necessary to reach the plateau, as seen in Figure 2. The sorption plateau value was in the 60–80% yield range, depending on the amount of particles used. The maximum particle loading capacity was 350 mg/g (protein/particles) when the particles were in default in comparison with the protein, i.e., when the solid content was of 0.1% (Fig. 3). Such loading capacity is in accordance with previous results obtained with colloidal PECs (from other types of chitosan and dextran sulfate) and results from the diffusion of p24 through the chitosan shell.²⁸ This diffusion process can be understood by considering the protein as a multivalent counter-ion interacting with the ammonium groups of the shell, as suggested by Ballauff and coworkers for spherical polyelectrolyte brushes⁴⁶ and Kabanov et al. for cross-linked polyelectrolyte hydrogels.⁴⁷ The concomitant release of monovalent counter-ions induces an entropic gain that counter-balances the repulsive electrostatic interactions and steric hindrance.

On storing in 150 mM NaCl solution at 37°C, the desorption of p24 from the particles was slow and, after 10 days, 20% of the initial amount remained sorbed on the particles. The colloidal stability of the CHDS particles covered with proteins was maintained for 4 days at 37°C in 150 mM NaCl. The presence of the protein at the interface decreased the colloidal stability but this aspect needs further investigations.

In vitro interactions with DCs

DCs were obtained by separation of monocytes from whole blood as described in the experimental

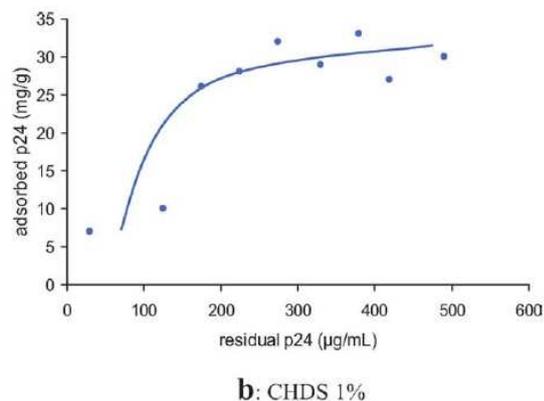


Figure 3. Sorption isotherm of HIV-1 p24 onto CHDS particles; p24 adsorbed (mg/g): mg of adsorbed p24 per g of CHDS; (a) CHDS at 0.1% solids; (b) CHDS at 1% solids. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

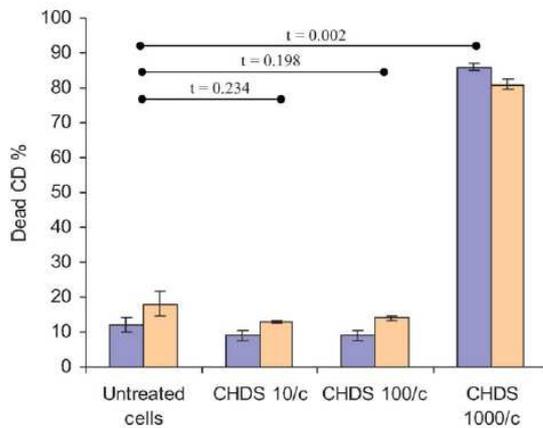


Figure 4. DC cell mortality induced by naked CHDS particles; ■ Day 1; □ Day 2: respectively 24 and 48 h after contact with 10 (CHDS10/c), 100 (CHDS100/c), and 1000 (CHDS 1000/c) particles of chitosan/dextran sulfate per cell, t values were calculated with student test. Results are given as the average \pm SD and $n = 3$. See also supplement material. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

section. The cell culture contained 70–80% of monocytes after purification steps, as determined by FACS. Monocytes were incubated with GM-CSF and IL4 for 5 days to obtain immature DCs, characterized by the presence of the following markers: CD1a, CD40, low percentage of labeled cells for CD80 and CD86, a low fluorescence intensity for HLA BC and HLA DR.

Cells were loaded with increasing amounts of particles, and the impact on cell viability was investigated by propidium iodide labeling 1 or 2 days after loading. As shown in Figure 4, for 1000 particles/cell a high cell death rate of 80% was significantly observed in comparison with the untreated cells ($t < 0.05$). For 100 or 10 particles/cell, no toxicity was observed, as the level of cell death was identical to the control without colloid (no significant difference

with the untreated cells over the four different experiments). Hence, for *in vitro* experiments, the 100 particle/cell ratio was selected to have the highest particle load with the maximum cell viability. Maintaining a high level of cell viability suppresses the eventual impact of cell death on the following cell maturation experiments. The internalization of colloidal CHDS by DCs was demonstrated by confocal microscopy with fluorescent CHDS particles. Figure 5, shows the same cell at various focal plans, the red dots representing the fluorescent CHDS colloids.

The maturation of DCs is one of the fundamental steps toward an effective immune response *in vivo*. It can be evidenced *in vitro* by measuring the level of expression of a variety of markers on the surface of the cells. One and two days after loading immature DCs with colloidal CHDS, containing p24 or not, no increase or expression of CD25, CD80, and CD83 was observed, though the positive control (bacterial lipopolysaccharide) induced a strong expression of these markers. This lack of phenotypic maturation was also confirmed by an analysis of the profile of released cytokines, showing that no stimulation of the cell had occurred after loading with CHDS colloids (data not shown).

With chitosan films, Babensee and Paranjpe observed the maturation of DCs deposited onto these films.⁴⁸ Using chitosan coated PLGA microparticles both Fischer et al.⁴⁹ and Wischke et al.⁵⁰ independently reported the preservation of the phenotype of immature DC cells upon internalization of the carriers. This difference in behavior could be related to differences in the physical form, film versus particles of the materials, but Yoshida and Babensee⁵¹ reported that PLGA under both forms induced DC cell maturation. Nevertheless, it is worth noting that the maturation of DC cells by PLGA particles is a conflicting issue: some articles observed this maturation with blank^{51,52} or cationized particles⁵³ whereas others never observed it with both types of colloid.^{49,50,54}

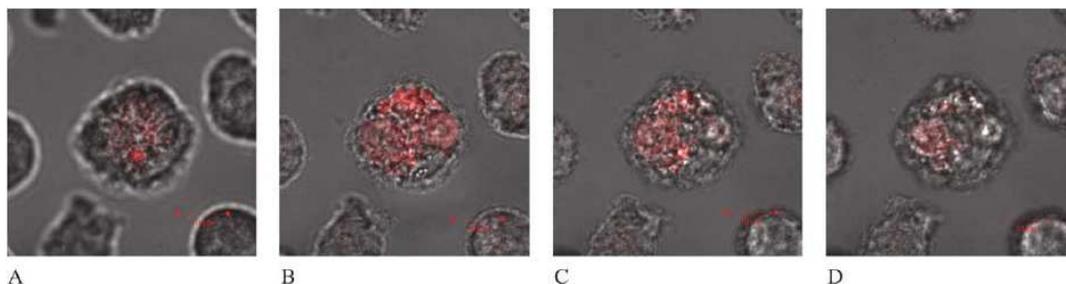


Figure 5. Internalization of CHDS particles by DC cells observed by confocal microscopy. (A–D) different focal points. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

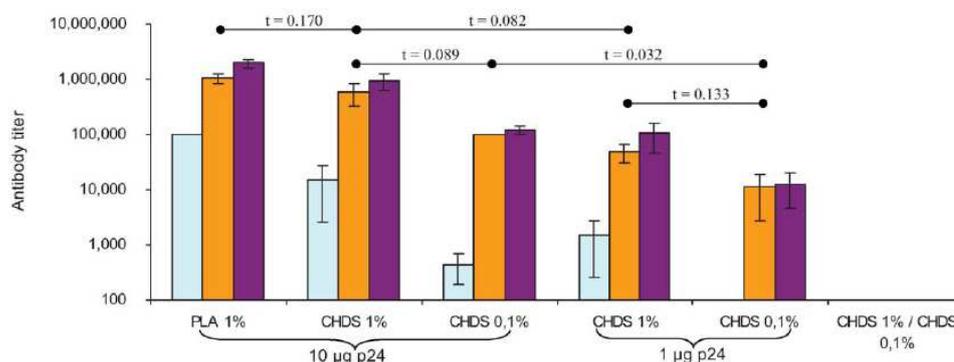


Figure 6. Antibody titer induced in mice by subcutaneous injections of p24-coated particles on sera collected on respective weeks 2, 4, and 6 (Error bars represent the inter-individual variability). Results are given as the average \pm SD and $n = 5$ mice. \square week 2; \blacksquare week 4; \blacksquare week 6; 10 μ g p24 PLA 1%: particles of poly(D,L-lactic acid) at 1% solids loaded with 10 μ g of p24; 10 μ g p24 CHDS 1%: CHDS particles loaded with 10 μ g of p24; 10 μ g p24 CHDS 0.1%: CHDS particles at 0.1% solids loaded with 10 μ g of p24; 1 μ g p24 CHDS 1%: CHDS particles at 1% solids loaded with 1 μ g of P24; 1 μ g p24 CHDS 0.1%: particles of chitosan/dextran sulfate at 0.1% solids loaded with 1 μ g of P24; CHDS 1% CHDS 0.1%: particles of chitosan/dextran sulfate at 1% or 0.1% solids (first injection at 1% solid level, second one at 0.1%); t values were calculated with student test. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

These discrepancies underline the complexity of this type of experiments, with the involvement of many different parameters such as particle concentration in immature DCs, percentage of cell viability during culture, particle size and charge, chemical nature and physico-chemical properties of the polymer matrix, level of endotoxin associated to the formulations.

In vivo immunogenicity

The absence of maturation of DC cells *in vitro* suggests that the carriers did not deliver all the required information to the cultured cells. However, upon *in vivo* administration, one can suspect that local inflammation could trigger DC maturation, concomitantly with particle uptake. Hence, we carried out an *in vivo* assay on a murine model, the animals were injected twice, on weeks 0 and 3, and the immunomonitoring was carried out on blood samples withdrawn on weeks 2, 4, and 6, as detailed in the experimental section (Table I).

The anti-p24 antibody titers reported in Figure 6 showed a strong production of antibodies at week 4 and 6, in animals injected with CHDS particles loaded with 10 μ g of protein, similar to the positive control (animals injected with PLA particles loaded with 10 μ g of p24, according to Ataman-Önal et al.; this PLA control provides higher antibody titers than alum⁵⁵). The impact on antibody production of the injected dose of p24 and the amount of particles used were investigated in this preliminary series of experiments. At low solid content, 0.1%, a signifi-

cant decrease in antibody titer ($t < 0.05$) was observed when the antigen dose was decreased from 10 μ g to 1 μ g. For 1% solids, the decrease was less significant ($t = 0.082$) and this trend should be confirmed or infirmed by a further investigation including more animals, as the t value was probably impacted by the inter-individual variability. Similarly, the impact of the reduction of the amount of particles at constant protein load ($t = 0.089$ for 10 μ g and $t = 0.133$ for 1 μ g) reveals a trend toward the reduction in antibody titers that needs confirmation with a greater amount of animals. Nevertheless, at 1% solids, even with only 1 μ g of injected p24, the antibody titer (at week 4 for instance) was very high, in particular with regards to the low amount of injected antigen, which is quite encouraging. Moreover, the titer obtained with 10 μ g of p24 at 0.1% solids was similar ($t = 0.224$, hence without significant difference) to that obtained with 1 μ g of p24 at 1% solids showing that a reduction in antigen load can be offset by an increase in the number of particles. Finally, the negative control consisting of unloaded CHDS particles induced no specific response.

Along with the antibody production, the release of two cytokines was monitored by the ELISPOT technique: IL4, involved in the establishment of a humoral response (Th2), and IFN γ for the cellular response (Th1). As a general feature (Fig. 7), the signals obtained for IFN γ were lower than for IL4, suggesting that the immune response could rather be Th2 biased. But one has to be careful as there is a Th2 bias in BALB/c mice.²⁷ Moreover, though it remains a trend to be confirmed, as t values are

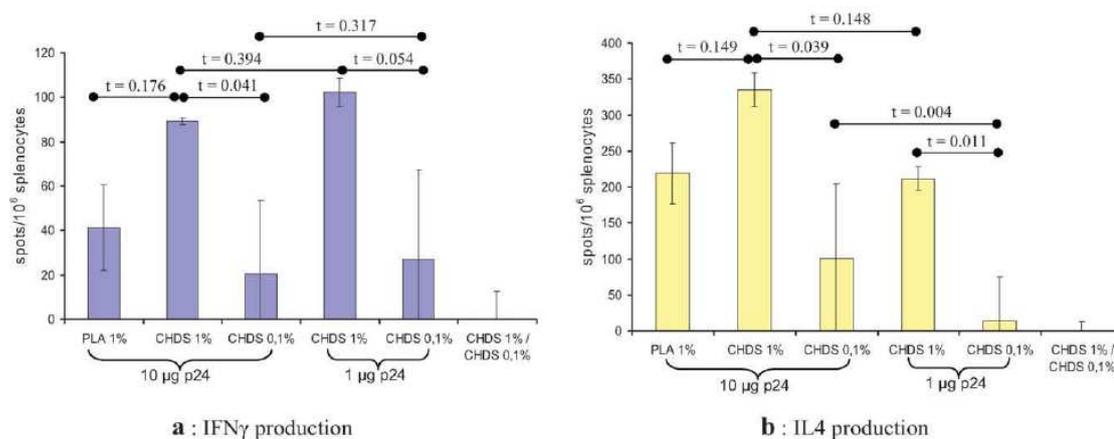


Figure 7. Induction of IL4 and IFN γ production by CHDS immunized mice splenocytes: by ELISPOT re-stimulated by p24 (Error bars represent the inter-individual variability). Results are given as the average \pm SD and $n = 5$ mice. 10 μ g p24 PLA 1%: mice group injected with positive control PLA nanoparticles at 1% solids coated with 10 μ g of p24; 10 μ g p24 CHDS 1%: mice group injected with chitosan/dextran sulfate (CHDS) at 1% solids coated with 10 μ g of p24; 10 μ g p24 CHDS 0.1%: mice group injected with CHDS at 1 solids coated with 1 μ g of p24; 1 μ g p24 CHDS 1%: mice group injected with CHDS at 0.1% solids coated with 10 μ g of p24; 1 μ g p24 CHDS 0.1%: mice group injected with CHDS at 0.1% solids coated with 1 μ g of p24; CHDS 1% CHDS 0.1%: mice group injected with negative control naked CHDS at 1% and 0.1% solids (first injection at 1% solids, second one at 0.1%); t values were calculated with student test. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

0.176 and 0.149 for, respectively, IFN γ and IL4, the level of expression of both cytokines was higher for CHDS colloids than for PLA particles with the same experimental conditions.

In contrast with the antibody titers, the impact of a reduction in the amount of particles per injection was drastic and led to a significant decrease in the level of expression of both IL4 and IFN γ at constant p24 load. However, the impact of the protein load at constant amount of colloid remains a trend that needs further confirmation. But, more interestingly, the level of expression of both cytokines significantly increased when the protein load was reduced from 10 μ g to 1 μ g with a concomitant 10-fold increase in the amount of particles, confirming the trend observed with the antibody titers in Figure 6. Finally, for both cytokines, the values obtained at 0.1% solids were always more scattered (larger error bars obtained from inter-animal variability) than for those at 1% solids, underlining the importance of the amount of particle used per injection on both the intensity and quality of the immune response generated.

The conclusion of this preliminary work is that p24-loaded CHDS particles are able to trigger both the arms of the immunity after subcutaneous injection, whereas an earlier report had concluded that this route of administration was ineffective for chitosan suspensions.⁵⁶ When administered by intraperitoneal injections, chitosan-based nanoparticles and

emulsions had a strong stimulating activity in mice, with a poorly immunogenic recombinant protein.²⁷ But only recently, Zaharoff et al. demonstrated that subcutaneous vaccination with viscous chitosan solutions as adjuvant enhanced both humoral and cell-mediated immunities.⁵⁷ Hence, the combination of this work and ours confirms the potentialities of chitosan-based delivery systems by the subcutaneous route, not limiting chitosan to mucosal delivery^{58,59} nor intraperitoneal injections.²⁷

CONCLUSION

This article demonstrated that colloidal PECs, surfactant, and chemical cross-linker free, could be obtained by charge neutralization between chitosan and dextran sulfate. This work pointed out that the colloidal stability of the dispersions could be preserved in a high salt concentration medium by selecting the intrinsic properties of chitosan (molar mass and DA) and of dextran sulfate. We could correlate this colloidal stability to a particular organization of the interface at the nanometric scale, observed by SAXS, and to the charge density of the polycation. This organization was obtained by the assembly of the polyelectrolytes according to the Guest-Host model, i.e., a high molar mass for chitosan and low molar mass for dextran sulfate, the charge density of chitosan being low enough to

avoid the behavior of a strong polyelectrolyte, but not too low, to avoid the predominance of attractive van der Waals forces resulting in a lack of stability of the colloids.

An antigen could efficiently be associated to these carriers and high loading capacities could be obtained, suggesting that p24 was at least partially entrapped within the chitosan shell of the colloids. We showed by confocal microscopy with fluorescent particles that immature DCs could internalize CHDS colloids. These colloids were non toxic at 100 particles/cell but did not induce DC cell maturation *in vitro*, even when loaded with p24. In the murine model, after subcutaneous vaccination, a strong, specific anti-p24 antibody production was obtained and our preliminary analysis on cytokine release suggests that both the arms of the immunity are stimulated, though the immune response could be Th2 biased. An important result is that for both the antibody titers and cytokine production, a reduction in the antigen dose as low as 1 µg could be counterbalanced by an increase in the amount of particles, with an identical quality of the immune response.

Our results, obtained with particles of controlled physico-chemical properties, open up new perspectives in the field of vaccine delivery, using non toxic and non immunogenic polysaccharides. It confirms that the subcutaneous route allows the stimulation of the immune system with chitosan-based particle. Further work is on-going with these CHDS colloids in particular concerning a more thorough investigation of the immune responses generated as well as the tuning of the immunological properties of this new carrier for vaccine delivery.

This work was partially supported by the NanoBiosaccharide and MunanoVac European Programs and the Europrise NoE. The authors thank, Jean-Michel Lucas for SEC data, Cyrille Rochas for Small angle X-ray Scattering, Christine Servet (IFR 128, BioSciences) and Marie-Madeleine Fiers-Didelot for help in DC cell culture and fruitful discussions.

References

- Gu HW, Ho PL, Tsang KWT, Yu CW, Xu B. Using biofunctional magnetic nanoparticles to capture Gram-negative bacteria at an ultra-low concentration. *Chem Commun* 2003;15:1966-1967.
- Caruso F, Schuler C. Enzyme multilayers on colloid particles: Assembly, stability, and enzymatic activity. *Langmuir* 2000;16:9595-9603.
- Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:329-347.
- Köping-Höggard M, Sanchez A, Alonso MJ. Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *Expert Rev Vaccines* 2005;4:185-196.
- Dautzenberg H. Polyelectrolyte complex formation in highly aggregating systems. I. Effect of salt: Polyelectrolyte complex formation in the presence of NaCl. *Macromolecules* 1997;30:7810-7815.
- Buchhammer HM, Mende M, Oelmann M. Formation of mono-sized polyelectrolyte complex dispersions: Effects of polymer structure, concentration and mixing conditions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects* 2003;218:151-159.
- Dragan ES, Schwarz S. Polyelectrolyte complexes. VII. Complex nanoparticles based on poly(sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate) tailored by the titrant addition rate. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2004;42:5244-5252.
- Etrych T, Leclercq L, Boustta M, Vert M. Polyelectrolyte complex formation and stability when mixing polyanions and polycations in salted media: A model study related to the case of body fluids. *Eur J Pharm Sci* 2005;25:281-288.
- Köping-Höggard M, Tubulekas I, Guan H, Artursson P. Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethyleneimine *in vitro* and after lung administration *in vivo*. *Gene Ther* 2001;8:1108-1121.
- Lin YH, Chung CK, Chen CT, Liang HF, Chen SC, Sung HW. Preparation of nanoparticles composed of chitosan/poly-gamma-glutamic acid and evaluation of their permeability through Caco-2 cells. *Biomacromolecules* 2005;6:1104-1112.
- Ichikawa S, Iwamoto S, Watanabe J. Formation of biocompatible nanoparticles by self-assembly of enzymatic hydrolysates of chitosan and carboxymethyl cellulose. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005;69:1637-1642.
- Douglas KL, Tabrizian M. Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. *J Biomater Sci Polym Ed* 2005;16:43-56.
- Du J, Sun R, Zhang LF, Zhang LF, Xiong CD, Peng YX. Novel polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles for drug delivery. I. Physicochemical characterization of the carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles. *Biopolymers* 2005;78:1-8.
- Schatz C, Domard A, Viton C, Pichot C, Delair T. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules* 2004;5:1882-1892.
- Schatz C, Lucas JM, Viton C, Domard A, Pichot C, Delair T. Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir* 2004;20:7766-7778.
- Kissel T, Mao S, Bakowsky U, Jintapattanakit A. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and insulin. *J Pharm Sci* 2006;95:1035-1048.
- Yu SY, Hu JH, Pan XY, Yao P, Jiang M. Stable and pH-sensitive nanogels prepared by self-assembly of chitosan and ovalbumin. *Langmuir* 2006;22:2754-2759.
- Vila A, Sanchez A, Janes K, Behrens I, Kissel T, Jato JLV, Alonso MJ. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;57:123-131.
- Xu YM, Du YM. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* 2003;250:215-226.
- Ozbas-Turan S, Akbuga J, Aral C. Controlled release of interleukin-2 from chitosan microspheres. *J Pharm Sci* 2002;91:1245-1251.
- Shi XW, Du YM, Sun LP, Zhang BZ, Dou A. Polyelectrolyte complex beads composed of water-soluble chitosan/alginate: Characterization and their protein release behavior. *J Appl Polym Sci* 2006;100:4614-4622.
- Dumitriu S, Chornet E. Immobilization of xylanase in chitosan-xanthan hydrogels. *Biotechnol Prog* 1997;13:539-545.

23. Chen Y, Mohanraj VJ, Parkin JE. Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide. *Lett Pept Sci* 2003;10:621–629.
24. Sarmento B, Ribeiro A, Veiga F, Ferreira D. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006;53:193–202.
25. Van Der Lubben IM, Konings FAJ, Borchard G, Verhoef JC, Junginger HE. In vivo uptake of chitosan microparticles by murine Peyer's patches: Visualization studies using confocal laser scanning microscopy and immunohistochemistry. *J Drug Target* 2001;9:39.
26. Nagamoto T, Hattori Y, Takayama K, Maitani Y. Novel chitosan particles and chitosan-coated emulsions inducing immune response via intranasal vaccine delivery. *Pharm Res* 2004;21:671–674.
27. Seferian PG, Martinez ML. Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations. *Vaccine* 2000;19:661–668.
28. Drogoz A, Munier S, Verrier B, David L, Domard A, Delair T. Towards biocompatible vaccine delivery systems: Interactions of colloidal PECs based on polysaccharides with HIV-1 p24 antigen. *Biomacromolecules* 2008;9:583–591.
29. Drogoz A, David L, Rochas C, Domard A, Delair T. Polyelectrolyte complexes from polysaccharides: Formation and stoichiometry monitoring. *Langmuir* 2007;23:10950–10958.
30. Vachoud L, Zydowicz N, Domard A. Formation and characterisation of a physical chitin gel. *Carbohydr Res* 1997;302:169–177.
31. Cheynet V, Verrier B, Mallet F. Overexpression of HIV-1 proteins in *Escherichia coli* by a modified expression vector and their one step purification. *Protein Expr Purif* 1993;4:367–372.
32. Allard L, Cheynet V, Oriol G, Mandrand B, Delair T, Mallet F. Versatile method for production and controlled polymer-immobilization of biologically active recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng* 2002;80:341–348.
33. Hirai A, Odami H, Nakajima A. *Polym Bull* 1991;87.
34. Schatz C, Viton C, Delair T, Pichot C, Domard A. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules* 2003;4:641–648.
35. Coombes AGA, Scholes PD, Davies MC, Illum L, Davis SS. Resorbable polymeric microspheres for drug-delivery—Production and simultaneous surface modification using Peo-Ppo surfactants. *Biomaterials* 1994;15:673–680.
36. Kim MH. Modified Porod's law estimate of the transition-layer thickness between two phases: Test of triangular smoothing function. *J Appl Crystallogr* 2004;37:643–651.
37. Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: Intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 2000;290:92–97.
38. Chen WB, Wang LF, Chen JS, Fan SY. Characterization of polyelectrolyte complexes between chondroitin sulfate and chitosan in the solid state. *J Biomed Mater Res Part A* 2005;75:128–137.
39. Sarmento B, Ferreira D, Veiga F, Ribeiro A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydr Polym* 2006;66:1–7.
40. Kabanov V, Zezin AB. A new class of complex water-soluble polyelectrolytes. *Macromol Chem* 1984;(Suppl 6):259.
41. Kabanov VA, Zezin AB. Soluble interpolymeric complexes as a new class of synthetic poly-electrolytes. *Pure Appl Chem* 1984;56:343–354.
42. Montebault A, Viton C, Domard A. Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent. *Biomacromolecules* 2005;6:653–662.
43. Lamarque G, Lucas JM, Viton C, Domard A. Physicochemical behavior of homogeneous series of acetylated chitosans in aqueous solution: Role of various structural parameters. *Biomacromolecules* 2005;6:131–142.
44. Wittemann A, Drechsler M, Talmon Y, Ballauff M. High elongation of polyelectrolyte chains in the osmotic limit of spherical polyelectrolyte brushes: A study by cryogenic transmission electron microscopy. *J Am Chem Soc* 2005;127:9688–9689.
45. Berthold A, Cremer K, Kreuter J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs. *J Control Release* 1996;39:17–25.
46. Wittemann A, Haupt B, Ballauff M. Adsorption of proteins on spherical polyelectrolyte brushes in aqueous solution. *Phys Chem Phys* 2003;5:1671–1677.
47. Kabanov VA, Skobeleva VB, Rogacheva VB, Zezin AB. Sorption of proteins by slightly cross-linked polyelectrolyte hydrogels: Kinetics and mechanism. *J Phys Chem B* 2004;108:1485–1490.
48. Babensee JE, Paranjpe A. Differential levels of dendritic cell maturation on different biomaterials used in combination products. *J Biomed Mater Res Part A* 2005;74:503–510.
49. Fischer S, Uetz-Von Allmen E, Waeckerle-Men Y, Groettrup M, Merkle HP, Gander B. The preservation of phenotype and functionality of dendritic cells upon phagocytosis of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles. *Biomaterials* 2007;28:994–1004.
50. Wischke C, Borchert HH, Zimmermann J, Siebenbrodt I, Lorenzen DR. Stable cationic microparticles for enhanced model antigen delivery to dendritic cells. *J Control Release* 2006;114:359–368.
51. Yoshida M, Babensee JE. Poly(lactic-co-glycolic acid) enhances maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Biomed Mater Res Part A* 2004;71:45–54.
52. Yoshida M, Babensee JE. Molecular aspects of microparticle phagocytosis by dendritic cells. *J Biomater Sci Polym Ed* 2006;17:893–907.
53. Jilek S, Ulrich M, Merkle HP, Walter E. Composition and surface charge of DNA-loaded microparticles determine maturation and cytokine secretion in human dendritic cells. *Pharm Res* 2004;21:1240–1247.
54. Waeckerle-Men Y, Scandella E, Allmen EU, Ludewig B, Gillissen S, Merkle HP, Gander B, Groettrup M. Phenotype and functional analysis of human monocyte-derived dendritic cells loaded with biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microspheres for immunotherapy. *J Immunol Methods* 2004;287:109–124.
55. Ataman-Onal Y, Munier S, Ganee A, Terrat C, Durand PY, Battail N, Martinon F, Le Grand R, Charles MH, Delair T. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J Control Release* 2006;112:175–185.
56. Marcinkiewicz J, Polewska A, Knapczyk J. Immunoadjuvant properties of chitosan. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1991;39:127–132.
57. Zaharoff DA, Rogers CJ, Hance KW, Schlom J, Greiner JW. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine* 2007;25:2085–2094.
58. Van Der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *Eur J Pharm Sci* 2001;14:201–207.
59. Read RC, Naylor SC, Potter CW, Bond J, Jabbal-Gill I, Fisher A, Illum L, Jennings R. Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. *Vaccine* 2005;23:4367–4374.

Publication n°2

Ce travail a été effectué dans le cadre de la formation dispensé par l'organisme fournissant ma bourse de thèse (Europrise). Il est repris dans la partie bibliographique de cette thèse.

Parallèlement à la rédaction de cette revue j'ai été amenée de part cette formation à assister à plusieurs semaines de formation (Londres et Stockholm en 2008) et à présenter mes travaux lors de présentations orales aux congrès internationaux organisés tous les ans (Malte 2008, Budapest 2009).



REVIEW

Open Access

Rational design of HIV vaccine and microbicides: report of the EUROPRISE annual conference

Britta Wahren¹, Priscilla Biswas², Marie Borggren³, Adam Coleman⁴, Kelly Da Costa⁵, Winni De Haes⁶, Tessa Dieltjens⁶, Stefania Dispinseri^{2,7}, Katrijn Gruppings⁶, David Hallengård¹, Julia Hornig⁴, Katja Klein⁵, Lara Mainetti^{2,8}, Paolo Palma⁹, Marc Reudelsterz¹⁰, Janna Seifried¹⁰, Philippe Selhorst⁶, Annette Sköld¹, Marit J van Gils¹², Caroline Weber¹¹, Robin Shattock⁵, Gabriella Scarlatti^{2*}

Abstract

EUROPRISE is a Network of Excellence sponsored from 2007 to 2011 by the European Commission within the 6th Framework Program. The Network encompasses a wide portfolio of activities ranging from an integrated research program in the field of HIV vaccines and microbicides to training, dissemination and advocacy. The research program covers the whole pipeline of vaccine and microbicide development from discovery to early clinical trials. The Network is composed of 58 partners representing more than 65 institutions from 13 European countries; it also includes three major pharmaceutical companies (GlaxoSmithKline, Novartis and Sanofi-Pasteur) involved in HIV microbicide and vaccine research. The Network displays a dedicated and informative web page: <http://www.europrize.org>. Finally, a distinguishing trait of EUROPRISE is its PhD School of students from across Europe, a unique example in the world of science aimed at spreading excellence through training.

EUROPRISE held its second annual conference in Budapest in November, 2009. The conference had 143 participants and their presentations covered aspects of vaccine and microbicide research, development and discovery. Since training is a major task of the Network, the students of the EUROPRISE PhD program summarized certain presentations and their view of the conference in this paper.

Introduction

Budapest, Hungary, hosted the second annual conference of the EUROPRISE Network of Excellence (NoE) from the 15th to the 18th of November 2009. The Network has organized several conferences, workshops and PhD courses on specific topics related to HIV vaccines and microbicides. To facilitate access to information, it provides a weekly newsletter edited by Anne-Marie Prieels from GlaxoSmithKline BIO that is freely accessible on the web homepage <http://www.europrize.org>. This is one of the first e-newsletters about HIV and the first to simultaneously cover the broad fields of prevention, science and technology, as well as policy aspects. It covers most scientific publications on HIV research and the most relevant news from the media.

The PhD School has 20 students directly receiving stipends from EUROPRISE and about 30 additional

students, who, through their supervisors or collaborations, attend courses and meetings given by the network. The EUROPRISE training program has enhanced the students' possibilities to get involved in new collaborations with other scientific groups in Europe. This provides invaluable opportunities for students to prepare and deliver their scientific work in the form of abstracts, posters and oral presentations at meetings, including this annual conference.

The complete conference program is available at the EUROPRISE website <http://www.europrize.org>. Overview lectures concentrated on microbicide use, HIV vaccine design and trials in developed and developing countries. The lectures addressed the biological and medical aspects of vaccine and microbicide research, which are fundamental for basic research.

This article presents the students' own selection of presentations and is not meant to be a comprehensive coverage of the EUROPRISE second annual conference.

* Correspondence: scarlatti.gabriella@hsr.it

²San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

Full list of author information is available at the end of the article



Harmonization

An important issue for this large network is the standardization and reproducibility of assays to facilitate cross comparison and validation of data produced by the partners.

Measuring immune responses

One workpackage of the network is devoted to harmonize assays for the measurement of cytokine secretion as a marker of cellular immune responses [1]. Richard Stebbings from NIBSC, Potters Bar presented a new standard for ELISpot and intracellular cytokine staining (ICS) assays. For this purpose, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated in the presence of a secretion inhibitor to accumulate intracellular cytokines. The cells were stabilized and suspended in freeze-drying buffer for long term stability to be used as lyophilized stimulated cell standards. Once reconstituted, these cells can be enumerated with cytokine based assays. Within the network, a collaborative study was performed to evaluate the lyophilized stimulated cell standards using both ICS and ELISpot assays. For comparison of results, partners received standard reagents for intracellular staining by FACS (detecting IL-2, IFN γ and TNF α) and for ELISpot assays (detecting IFN γ and TNF α) together with a strong and a weak cell positive control and the corresponding negative cell controls. All the participants placed the negative, weak and strong positive controls in the correct order, albeit with differing levels of sensitivity. Overall, less variability was found in ELISpot than in the ICS assay results. Taken together, these preliminary results demonstrate that lyophilized stimulated cells represent a good standard for the harmonization of cellular cytokine-based assays. Nevertheless, there are still some qualitative issues to be addressed, for instance cell size, debris and staining intensity of antigens. It also appeared that a longer stimulation and cytokine accumulation step would be needed to optimize ELISpot controls.

Measuring neutralisation activity

Another workpackage of the network aims to develop, standardize and compare relevant assays for the detection of antibody responses. A previously initiated consortium, the NeutNet coordinated by Gabriella Scarlatti from San Raffaele Scientific Institute in Milan involves 18 independent laboratories from 12 EU countries. These participants showed in a first stage of activity that the sensitivity of different neutralisation assays differ, depending on both the antibodies and the virus used [2]. A second stage of NeutNet's work focused on comparing 8 polyclonal reagents against a panel of viruses in 17 different assays <http://www.europrise.org/neutnet>.

html, utilizing uncloned virus supernatant (virus infectivity assays-VIA) or Env pseudotyped viruses (PSV assays) [3]. Target cells included PBMCs and engineered cell lines in single- or multiple-cycle infection formats. A comparison of findings showed a variation of neutralisation by a combination of three broadly neutralising monoclonal antibodies (TriMab) in both the PSV and the VIA assays. For the PBMC-based VIA, Inhibitory concentration (IC) 50 showed more variation than IC75 and IC90. In general, PSV assays were not more sensitive than VIA. Again, the variation was dependent on both the sera and the viruses that were used. Specific assay-to-assay comparison showed an important impact also of the target cell used. As of now, protective HIV neutralising immunity *in vivo* has not been defined. It is therefore recommended that more than one assay is used to obtain optimal information on the virus neutralisation potential of a serum or agent.

Susceptibility to HIV-1 infection

Guido Poli from the San Raffaele Scientific Institute in Milan presented post-entry events of viral infection. The discovery of CCR5 and CXCR4 as obligatory entry co-receptors in CD4 + cells (T lymphocytes, macrophages and dendritic cells) has resulted in creation of novel antiretroviral agents targeting these host determinants. Some of these are also in development as potential microbicide candidates. This knowledge has also contributed to an understanding of the distribution of HIV-1 variants, both world-wide and inter-individually. In acute infection there is a disproportionate distribution of HIV-1 strains using exclusively CCR5 as entry co-receptors (R5 viruses), while CXCR4 utilization (usually in association with CCR5) mostly occurs in subtype B infection in late stages of disease [4]. HIV-1 transmission on the other hand most frequently occurs from R5 viruses, even when the transmitter harbours a CXCR4-using virus as the dominant quasi species. A central issue is the understanding of whether the asymmetric distribution of HIV-1 transmission can be explained by the efficiency of viral entry into the targets cell or by post-entry effects. Previous work [5] has demonstrated that CCR5-dependent R5 viruses replicate in primary CD4 + T-cells of cord blood origin, while CXCR4-dependent X4 viruses do not. This replication can be mimicked *in vitro* in interleukin-2 enriched medium after initial mitogenic stimulation.

Using a modified version of this protocol, Poli and collaborators have analysed a transcriptome of the host genome of about 22,000 genes, 11% of which were found to be activated by either R5 or X4 infection (productive and non-productive). The group is also optimizing a similar model system using peripheral CD4 +

T-cells obtained from both healthy children and from children affected by primary immunodeficiency collected before and after gene therapy. The results confirm the original finding that a post-entry permissive signal for HIV replication is delivered by R5, but not by X4 viruses.

Mucosal immune responses to HIV

Dendritic cell populations

The role of dendritic cells (DCs) in the detection, spread and control of HIV-1 infection has been under investigation for quite some time. At the EUROPRIME conference, Dominique Kaiserlian from INSERM in Paris and Maryse Peressin (PhD student) from the University of Strasbourg emphasized the role of DCs in HIV-1 infection. Since DCs play a major role in the induction of an adaptive immune response within the mucosa [6], it is crucial to understand the functions and roles of the various DC populations, including Langerhans' cells (LCs), dermal DCs (dDCs), blood-derived myeloid DCs (mDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs).

Kaiserlian drew attention to the *in vivo* ability of mucosal and skin DCs to induce CD8 + CTL response and tolerance within monostratified (gastrointestinal tract) and pluristratified (buccal mucosa and skin) epithelia. Indeed, the nasal, buccal and intestinal mucosal tissues provide ideal surfaces for vaccine delivery to induce mucosal immune responses. However, the efficacy by which a vaccine can be delivered to such surfaces is hampered by mucosal tolerance, particularly in the gastrointestinal tract [7]. Hence, there needs to be a balance between immunological tolerance and immunity. As shown by intradermal vaccination into the skin or buccal mucosa, DC recruitment via the CCR6/CCL20 pathway, rather than resident mDCs, was responsible for *in vivo* cross-priming of CD8 + CTL responses. In addition, testing of adjuvants shown to induce local secretion of CCL20 was followed by strong antigen specific CD8 cross-priming. This suggests that targeting of specific DC populations in conjunction with local secretion of specific substances can lead to the induction of CD8 T-cells. One such pathway was shown to be the up-regulation of CCL20 in the epithelium followed by DC recruitment via CCR6. By a series of experiments Kaiserlian and collaborators concluded that newly recruited DCs, rather than tissue resident LCs or dDCs, prime CD8 + CTLs. As the balance between immune response and tolerance is important in the design of an HIV vaccine, Kaiserlian's group investigated the mechanism of oral tolerance against antigen delivered intragastrically. They showed that antigen leakage from the gastrointestinal tract to the liver allowed antigen uptake and presentation by tolerogenic pDCs in the liver and mesenteric lymph nodes. pDCs are essential for oral

tolerance in that they induce T-cell hypo-responsiveness. Bypassing antigen uptake by pDC might thus be a way to circumvent oral tolerance and generate an anti-infectious oral vaccine.

Since DCs are implicated in the sexual transmission of HIV-1 [8], Maryse Peressin has investigated inhibitory activities of HIV-1-specific antibodies in the context of HIV-1 infection and DCs/T cells co-localization. In her talk on HIV-1 infection and cell-to-cell transfer in primary DCs/T-lymphocytes coculture, she addressed the role that HIV-1 specific antibodies might play, for instance, after sexual transmission of HIV. *In vivo*, DCs such as LCs or interstitial DCs (iDCs), located in mucosal epithelium or sub-mucosal tissue respectively, are considered to be the first HIV targets [9]. Moreover, these DCs have been demonstrated to transfer HIV to permissive CD4 + T-lymphocytes *in vitro*. Using an *in vitro* model of LCs and iDCs Peressin was able to show that immunoglobulin G (IgG) can prevent HIV infection of LCs and iDCs by two mechanisms: first, neutralisation of the virus *via* the Fab fragment of the antibody; second, inhibition of virus and/or infected cells infection mediated by the action of the antibody Fc receptor. Peressin demonstrated that non-neutralising IgGs also inhibited HIV infection of the LCs/iDCs via an Fc γ receptor dependant mechanism. This mechanism may also involve effector cells binding to the antibody Fc receptor. HIV transfer from LCs/iDCs to CD4 + T lymphocytes can be efficiently inhibited by non-neutralising IgGs, highlighting the need for vaccines to induce mucosal neutralising as well as non-neutralising Igs in order to prevent the initial establishment of infection [10].

Dendritic cell maturation

Annette Sköld from the Karolinska Institute in Stockholm presented her work on the effect of different Toll-Like Receptor (TLR) ligands on monocyte-derived DC (moDC) evaluated by upregulation of CD80 surface expression. moDC are known to express TLR1 to TLR6 and TLR8, possibly also TLR9. Sköld showed that the TLR3 agonist Poly(I:C) and the TLR4 agonist LPS, but not CpG DNA (a TLR9 agonist), can induce maturation of moDCs. TLR9 activation worked together with TLR4 but not with TLR3 activation. The TLR3 activation induced the production of cyto/chemokines IL-12, IL-4, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α and MIP-1 β . Phosphorylation of IRF3 occurred after TLR3 activation, but not after TLR9 activation by CpG DNA. The fast timing of these events suggests that the inhibitory effect of TLR9 ligands must occur early in the transduction pathway. Finally, Sköld presented a CpG DNA molecule with a modified backbone which did not induce moDC maturation, and was only partially able to inhibit the

TLR3 Poly(I:C)-induced maturation. This implies that the structure of the fine structure of the oligonucleotide CpG DNA is essential for its inhibitory function [11].

Mucosal immunity

Human mucosa displays a surface area of more than 400 m² and contains roughly 80% of all immune cells. Hence, research has been focused on the development and improvement of mucosal adjuvants and routes of vaccine delivery to elicit mucosal immune responses. In the context of HIV-1 infection, mucosal priming events in particular are essential to elicit memory cells at sites of pathogen entry. As underscored by Donata Medaglini from the University of Siena, T-cell priming results may be important as early markers of vaccine immunogenicity and immunological memory. However, the study of T-cell priming is hampered by the low precursor frequency of naïve T-cells. Using an adoptive transfer model of naïve antigen-specific transgenic T-cells in syngeneic recipient mice, Medaglini's group tested the ability of various mucosal TLR-dependent as well as -independent adjuvants (CpG, LTK63, CTB, and α -GalCer), or of different vaccine delivery systems (*Streptococcus gordonii* and Adenovirus), to prime local CD4 + and CD8 T-cells. Vaccine formulations were administered either nasally or vaginally and T helper and CTL proliferation, expression of activation and migration markers were analysed [12]. Intranasal immunisation with recombinant *S. gordonii* vaccine vector allowed efficient internalization of the vaccine by DCs, followed by DC maturation and activation. The intranasal immunisation induced primed CD4 + and CD8 + T-cells in the lymph nodes draining the respiratory, genital and intestinal tract. This response was maintained post immunisation. Using this type of vaccination strategy, Medaglini and her group were able to observe activation of proliferating T-cells as measured by the up-regulation of CD69. At the same time, a modulation of migration markers such as CCR7 and CD62L could be detected on proliferating CD4 + and CD8 + T-cells. A comparison of routes for vaccine administration showed differences between intranasal and intravaginal administration. Although good proliferative responses were found in both scenarios in lymph nodes draining the immunisation site at day 5 post vaccination, proliferation in distal sites was observed primarily following intranasal vaccination. Overall, it was concluded that the adoptive transfer model is a powerful tool for studying priming by mucosal adjuvants and delivery systems *in vivo*.

Mucosal adjuvants

The talk on mucosal adjuvants for the genital tract by Ali Harandi from the University of Göteborg highlighted the significance of the development of adequate mucosal

adjuvants and their efficient delivery to the genital tract. Although mucosal vaccines have been approved for use in humans, no mucosal adjuvants have been licensed so far. Much attention has been paid to the use of TLR ligands as adjuvants, though their efficiency and safety as mucosal adjuvants in the vaginal tissue has yet to be confirmed. Harandi's group examined the effectiveness of CpG oligodeoxynucleotides (ODN), which are TLR9 ligands, and α -GalCeramide as potential mucosal adjuvants in the murine female genital tract. He reported that mice given an immunogen (herpes simplex virus, HSV) together with CpG ODN were protected against HSV challenge [13]. Similarly, α -GalCer was able to confer 80% protection to a subsequent HSV challenge [14]. This suggests that both reagents could potentially also be used as adjuvants in the human vaginal tract. The myeloid differentiation primary-response gene 88 (MyD88), regarded as one of the key signaling adaptor proteins for TLRs, activates the transcription factor NF- κ B. This signaling pathway is considered essential for a protective innate response. However, as highlighted by Harandi, the development of an antibody response to live HSV-2 at the murine vaginal mucosa was MyD88-independent, suggesting that MyD88 is not essential for inducing acquired protection and, in this case, a genital mucosal immune response. Given that CpG ODN and α -GalCer both showed the potential to enhance mucosal immunity, Harandi's group investigated the effect of these adjuvants on global gene expression using a microarray for the whole mouse genome. They grouped genes commonly induced by adjuvants into various categories, including cytokines and chemokines. A group of common genes including those for CCL9 and CXCL11 was identified with an expression pattern in the vagina that was linked to the mucosal adjuvant. Ways of directly targeting these genes or proteins were discussed as means to induce a controlled mucosal immune response.

Safety is critical in the improvement of adjuvants and vaccines. Hence, the degree of inflammation and IL-1 production in the presence of such adjuvants in mucosal tissue was analysed α -GalCer was described to induce low levels of inflammation, while CpG oligonucleotides up-regulated a larger number of genes in vaginal tissue and induced inflammation to a greater extent [15]. Since increased inflammatory reaction may enhance HIV infection, Harandi strongly emphasized the importance of carefully identifying and selecting mucosal adjuvants for vaginal application in humans.

One of the major challenges in the field of HIV-1 prevention is to elicit both systemic and mucosal protection. To address this question, a novel approach of mucosal immunisation was evaluated by Quentin Sattentau from the University of Oxford; he combined an

Env-based experimental vaccine antigen (gp140CN54) with PRO2000, a candidate topical microbicide (Wegmann F, Krashias G, Luhn K, Laamanen K, Jeffs SA, Shattock RJ, Sattentau QJ: A mucosal vaccine strategy for enhanced mucosal HIV-1 antibody responses in an anti-inflammatory environment, Submitted). This vaccine - microbicide combination, tested in mice and rabbits, significantly increased the titres of Env specific mucosal IgA (mice) and systemic and mucosal IgG (rabbits) compared to immunisation with Env alone. Furthermore, rabbit vaginal IgG was able to neutralise the virus. Moreover, PRO2000 was shown to be a robust TLR4 antagonist which may create a mucosal anti-inflammatory environment by skewing the mucosal immune response towards a Th2-type and suppressing the production of inflammatory mediators. This anti-inflammatory environment in combination with the induction of locally produced neutralising antibodies may provide a primary barrier to mucosal HIV-1 infection.

Adaptive immunity parameters

T cell maturation

Nicolas Ruffin's PhD project at the Karolinska Institute, Stockholm, concerns the adaptive immune response. Increase of CD28-CD8 + T-lymphocytes is characteristic for ageing and for chronic inflammatory infections such as HIV-1 [16]. The increase is a consequence of massive cell division, due to continuous immune responses to persisting viral antigens. The CD28- T-cells are considered to be at a final differentiation stage of antigen-activated cells. They are reported to be resistant to apoptosis and once generated they will persist. This could explain the increasing proportion in HIV infected individuals [17,18]. Work presented by Ruffin has focused on apoptotic and proliferative abilities of the CD28 + and CD28- T-cell populations in HIV infected individuals. High levels of CD28- T-cells were found in HIV-infected individuals, but surprisingly the levels were equally high in treatment naïve and treated individuals, demonstrating that antiretroviral treatment cannot restore CD28- T-cells to normal levels. The accumulated CD28- T-cells show a senescent phenotype and in treatment naïve patients they have a propensity to apoptosis. This finding is in contrast with a previous study reporting that CD28- T-cells were resistant to apoptosis [17]. The enhanced apoptotic ability could be due to viral replication, since the level of apoptotic cells correlated with viral load. A difference between treatment naïve and treated patients was also found with regard to the proliferating ability of CD28- T-cells. Cells from treated patients instead showed a strong proliferating ability in response to TCR triggering. Thus, the work by

Ruffin shows that viral replication alters the T-cell homeostasis and functionality of CD28- T-cells.

Induction of improved antibody responses

Donato Zipeto from the University of Verona talked about broad-spectrum neutralising antibodies against HIV-1 elicited by fusion complexes and CD4-independent gp120/41s. Due to the extraordinarily high variability of the HIV envelope glycoprotein, it is essential to focus on conserved epitopes. Such conserved epitopes are exposed transiently during fusion of the gp41 transmembrane region with the target cell. Immunisation of mice or rabbits with fusion complex intermediates or CD4-independent gp120/41s demonstrated that such complexes are immunogenic and induced antibodies [19]. Indeed, monoclonal antibodies produced from immunised animals could neutralize viruses expressing the envelope glycoproteins from diverse HIV-1 isolates.

One project focused on the possible role that broadly-neutralising antibodies might have in limiting HIV disease progression. However, Zelda Euler (PhD student) from the Academic Medical Center at the University of Amsterdam found no correlation between cross-reactive HIV-1 specific neutralising activity in serum and the clinical course of HIV-1 infection [20]. This study took advantage of the large Amsterdam Cohort of HIV-infected patients established before the highly effective antiretroviral compounds were used. Sera from 82 members of the cohort collected 3 years after seroconversion were tested for levels of cross-reactive neutralising activity and correlated with the length of time the patients remained free of disease. Broadly neutralising antibodies were present in the sera of 23 of the patients but this finding did not appear to be beneficial. The rate of progression to AIDS was similar to that of patients with no such neutralizing activity. Even more surprising was the observation that the presence of cross-reactive antibodies was associated with a lower CD4 + T-cell count at viral set point. The results therefore indicate that although the HIV envelope glycoprotein is highly immunogenic during natural infection, even the development of broadly cross-reactive neutralising antibodies does not appear to benefit the host. It seems likely that the virus present in the patient at the time of sampling and thereafter represents a neutralisation escape mutant. HIV-specific cytotoxic cells and other factors than antibodies appear to play a role in the continued capacity of the patient to maintain a deterred viral set point and prolong the progression to AIDS in the so called elite controllers [20].

Presentations by the PhD students Tessa Dieltjens, Lara Mainetti, Marie Borggren, Evelien Bunnik and Marit van Gils concerned the evolution of HIV-1 virus

in response to the humoral immune pressure. A range of viruses from patients at various stages of disease progression were studied for susceptibility to neutralisation, using autologous sera or monoclonal antibodies. All viruses were shown to escape from the neutralising antibody response mounted by the host [21-23]. Interestingly, viruses with escape mutations were still susceptible to neutralization with autologous sera obtained at later time points or with certain monoclonal antibodies. Discussions of the potential mechanisms of viral escape attributed it to changes in the number, length and charge of potential N-linked glycosylation sites. It has been suggested that over time HIV-1 has adapted to the pressure exerted by the human immune system. On a similar note, the long-term use of antiretroviral drugs is expected to be reflected in the worldwide appearance of drug-resistant HIV.

Novel cross-priming strategies

An HIV-1 vaccine solely based on inducing cellular immunity appears to be insufficient to protect against HIV-1 infection (for example, the Merck vaccine study). A particular challenge for the induction of a neutralising antibody response is to improve immunogen capturing, processing and presentation by antigen presenting cells (APC). Hans Wolf, from the University of Regensburg, presented a new approach that uses a novel technique to reactivate virus-specific cytotoxic T-cells and T-helper cells by means of cross-presentation of soluble proteins mediated by urea adjuvants.

Priming and re-stimulation of CD8 + CTL requires the endogenous processing of proteins and the expression of relevant fragments within the context of the MHC-I molecule, a process usually resulting from *de novo* intracellular protein synthesis. Exogenous proteins, despite being internalised by macrophages, do not usually enter this pathway and vaccines based on inactivated viruses or purified proteins are generally poor inducers of the CTL response. However, certain types of antigen presenting cells are able to facilitate the induction of CTLs upon exposure to protein antigens via the process of cross-presentation. Novel modifications of proteins have been developed to take advantage of this phenomenon. It was shown that dissolution of proteins in high molar urea followed by pulsing of cells in low urea concentrations can overcome the barrier to endogenous processing. The urea treatment facilitated protein translocation into both the MHC-I and the MHC-II presentation pathways. Using the Epstein-Barr Virus (EBV) BZLF1 protein, Wolf's group showed that the urea-treated EBV protein (uBZLF1) undergoes temperature-dependent uptake by APC and also that different sub-populations and mononuclear cells from EBV-seropositive individuals pulsed with uBZLF1 were efficiently

induced BZLF1-specific cytotoxicity and T-helper cells by means of cross-presentation [24]. Similar results were obtained when this technique was applied to two cytomegalovirus proteins. Finally, the *in vivo* priming of cytotoxic T-cells was demonstrated in mice using urea-treated HIV-1 p24 combined with CpG oligonucleotides. Overall, Wolf stressed that urea treatment of proteins successfully induces antigen-specific CTL, and that this technology may be considered as a new strategy to increase protein-specific CTLs. This innovation may have prominent implications for *in vivo* priming of HIV-1-specific CTLs in therapeutic vaccine studies.

Early Clinical Studies

Margarita Bofill from Irsicaixa in Barcelona investigated the effects of the administration of growth hormone (GH) on immune reconstitution of HIV-infected adults. HIV-infection causes a severe down-regulation of virus-specific CD4 + and CD8 + T-cells that is not restored upon treatment with highly active antiretroviral therapy (HAART) [25]. Bofill and collaborators analysed whether treatment with GH and HAART could lead to expansion of the thymus and thus restore antigen specific immune responses. One of the earliest associations linking GH with the thymus was the observation that thymic atrophy in aging individuals correlated with lower GH-levels [26]. Several authors have subsequently reported that GH affects T-cell function by promoting thymic function and progenitor survival as well as improving peripheral T-cell functions. Both GH and IGF-1 have been shown to increase T-cell functions *in vitro*. This suggests a role for recombinant human GH as a possible immunomodulatory therapy, complementary to the benefits of effective antiretroviral drug therapy, for HIV-1 infection [27]. Patients with HAART and complete viral suppression who failed to elicit a humoral response to Tetanus Toxoid, or to Hepatitis A or to Hepatitis B virus were selected for this study and randomized in 3 groups: one group receiving HAART + GH + vaccines; another group receiving HAART + GH but not vaccines; and a control group receiving HAART + vaccines but no GH. GH was given for 6 months at the dosage of 3 mg/kg aiming to enhance thymic output and restore specific responses to vaccine antigens. The GH administration resulted in an increase of thymus volume in nearly 50% of the treated patients. This increase correlated with increased CD4 + counts and number of T regulatory cells, but not with the level of IL-7. Overall, recall responses to Hepatitis A, Tetanus Toxoid and HIV (p24-gag) seem to be restored in the majority of patients treated with GH compared to the other groups. Despite the high toxicity related to GH treatment reported in the literature, minor adverse events were observed in this trial in the short-term

follow-up. Viral load was maintained under 50 copies/ml in all patients and no difference in proviral DNA was reported. Although long-term toxicity related to GH treatment seems to preclude large scale application of this strategy [28], this study shows that selective molecules targeting thymic function may represent a therapeutic option, particularly in those patients who are severely immunocompromised.

Vaccines

A special guest of the meeting was Jerome Kim (U.S. Military HIV Research Program), who presented the recently concluded Phase III Prime Boost HIV Vaccine Trial performed in Thailand [29]. The ALVAC-HIV and AIDSVAX B/E combination used for the prevention of HIV-1 infection in young Thai adults showed for the first time in the HIV/AIDS vaccine era a modest effect of 31% protection on the acquisition of HIV-1 infection. The vaccination had a more pronounced efficacy in the low and medium risk groups (40 - 47% reduction) than in the high risk population (3.7% reduction). There was no difference in either early viral load or post-infection CD4 + T-cell count between vaccine and placebo groups. This study raises some important issues, such as the part played by the CD8 T-cell response, the definition of the impact of risk and the need to understand which arm of the immune response is working. Consideration should be paid to further efficacy trials, possibly based on this vaccine principle, in high risk cohorts.

Model studies in macaques

Vaccination of Rhesus macaques with live attenuated SIV provides immediate protection against wild-type virus. While the use of attenuated HIV in humans is unlikely, the model may provide important insights on the mechanisms of protection. In order to investigate the role of adaptive immune responses and to understand whether the persistence of the vaccine virus is central to protection in macaques, a conditional live attenuated (Δ nef) SIV has been developed that is dependent on the presence of doxycycline (SIVrtTA) [30]. SIVrtTA has proven to be infectious *in vivo*, with peak viremia slightly lower and kinetics similar to SIVmac 239 Δ nef [31]. The virus persisted in 2 out of 4 animals after doxycycline delivery had been terminated. Partial protection against challenge with wild-type SIVmac 239 was observed in vaccinated animals, but only in those with detectable SIVrtTA titers after removal of doxycycline. Thus, it was proposed that the persistence of the vaccine virus is crucial for protection; the hypothesis will be further investigated with the SIVrtTA model.

It is difficult to cross-calibrate the human and macaque models for immunisation studies; it is therefore crucial to design challenge experiments that resemble the

human system as closely as possible. Hence, to reflect human transmission routes such as sexual intercourse, repeated low-dose mucosal challenges in monkeys may be performed instead of intravenous challenges [32]. HIV dynamics are fast, the time to act is short. The best time to immunise with a mucosal vaccine is the mid-point of the female follicular cycle, but this is easily missed. Constant immunisation, using a microbicide that causes constant effector function and simultaneously immune-stimulates mucosal surfaces, would bypass this problem. Cranage from St George's University of London showed that repeated intravaginal administration of HIV-1gp140 in macaques augments systemic and mucosal antibody responses following systemic priming with adjuvanted protein [33].

Lentiviral vectors

Andrea Cara from the National AIDS Center in Rome summarised his work aimed at increasing the safety of lentiviral vectors. The use of such vectors for vaccination is currently cautious because of the potential dangers posed by integration of vector nucleic acids into the host genome. Integrase-defective lentiviral vectors (IDLV) based on HIV or SIV with mutational inactivation of the catalytic sites do not integrate. Transduction of both dividing and non-dividing cells results in transcription of episomal forms of the vector and a strong expression of the gene of interest. In non-dividing cells, episomal vector expression continues over a long period of time, whereas in dividing cells the expression decreases as the cells proliferate [34]. A single immunisation with gp120-expressing IDLV in mice resulted in vigorous immune responses, i.e. the induction of polyfunctional CD8 + T-cells and specific serum antibodies directed to gp120. Experiments using human DCs and macrophages transduced *ex vivo* with influenza M1-expressing vectors demonstrated that these cells induced a strong expansion of autologous, antigen-specific CD8 + T-cells. This suggests that replication-defective vectors could be used for safe and efficient transduction of human antigen-presenting cells for vaccination purposes.

Vehicles and virus-like particles

Caroline Weber (PhD student) presented her work on the use of nanoparticles as a vaccine vehicle for the delivery of adjuvants and antigens. For this purpose, biodegradable synthetic Poly D, L-lactic acid (PLA) or chitosan (CNP) nanoparticles, which are readily phagocytosed by DCs, were used [35]. Phagocytosis of nanoparticles with immunomodulators, such as HIV-1 antigens, adsorbed onto them leads to the maturation of DC increasing MHC-I and II expression and other activation markers and the release of cytokines [35,36]. Weber demonstrated

that the nanoparticles can be used to deliver HIV-1 antigens p24 and gp140 and that they could also be used to deliver TLR agonists to endosomal TLR3 and TLR7/8. Combining the delivery of vaccines and adjuvants using nanoparticles could improve conditions for potent antigen presentation. TLR agonists adsorbed to nanoparticles provide a synergistic effect in the maturation of DC, while agonists associated with other types of particles only showed additive effects. This type of particles are promising as potential vaccine or adjuvant delivery systems.

Luigi Buonaguro from the National Cancer Institute in Naples emphasized the advantage of virus-like particles (VLPs) in HIV-1 vaccine development. The concept of using VLPs to induce cellular immune responses has already been used in many areas of virus vaccine research, the reasons being their ability to structurally mimic the actual pathogenic agent and their potential to express multiple epitopes in order to induce a broad immune response. Buonaguro's group engineered VLPs expressing HIV-1 gp120 and Pr55gag and used them for intraperitoneal and intranasal immunisation of mice [37]. Intranasal vaccination led to the induction of both local mucosal and systemic immune responses. This confirms the efficiency of VLPs to induce local immune responses and also validates the notion that systemic immune responses can be triggered through mucosal vaccination. Buonaguro's team is currently optimizing their VLP-based anti-HIV-1 vaccine (subtype A clade from Uganda) by means of a signal sequence of the transmembrane gp41 protein to obtain a trimeric form of the envelope [38]. Cells from HIV + and HIV- individuals treated *in vitro* with HIV VLPs did not show differences in the expression of cell surface markers such as CD83, HLA, CD80 or CD14. However, a difference in CD86 expression levels was observed between the two groups, suggesting that immune cells from seropositive individuals are capable of responding to the HIV antigens incorporated in the VLPs. The study of the pattern of cytokine production showed that IL-10 and IL-6 were more expressed in seropositive individuals than in seronegative controls. In the presence of VLPs, low doses of IL-10 were measured, suggesting that VLPs support a Th2 or a T regulatory pathway rather than a switch to Th1 response. Finally, the activation of both lymphokine clusters and IFN- stimulated gene clusters was confirmed in the PBMCs of infected individuals.

Therapeutic vaccines

Julianna Lisziewicz and Esther Natz from Genetic Immunity in Budapest described the DermaVir Patch, a novel therapeutic vaccine against HIV/AIDS. The DermaVir Patch is their lead therapeutic vaccine candidate

and originates from a development pipeline for plasmid-based vaccines [39]. The aim of this vaccine is to lower the viral load in HIV positive individuals by inducing immune responses of broad specificity against the virus. Key difficulties with plasmid-based vaccines, such as choice of construct, mode of delivery and formulation, have been specifically addressed during the development of this candidate. Hence the DermaVir Patch contains the full (mutated) viral genome providing coverage of the different HIV clades. The epitopes are combined in a single plasmid for maximal synergy, while reducing the total plasmid amount. Furthermore, the vaccine takes advantage of the properties of its carrier substance, mannose-polyethyleneimid (PEIm). Both the carrier and the vaccine formulation have been optimized to maximize plasmid uptake and release in DCs. This leads to efficient epitope presentation and long-lasting as well as specific immune responses, as demonstrated in immunogenicity and reduction of viral load in SIV-infected monkeys. Further hallmarks of this vaccine candidate is the delivery method (DermaPrep) on large areas of abraded skin to target Langerhans cells. A phase I clinical trial has demonstrated the safety of the vaccine and the DermaPrep delivery method. The vaccine is currently being tested in several placebo controlled phase II trials for immunogenicity and preliminary efficacy in treatment-naïve patients and patients receiving HAART.

Microbicides

The emerging field of microbicide research is evolving rapidly, with several new innovative approaches, such as colorectal explants, freeze-dried tablets, new potential inhibitory molecules, and a vaccine-microbicide combination for mucosal immunisation. Carolina Herrera from St. George's Hospital, University of London, explored the use of drug combinations for colorectal application. To this end, the antiviral efficacy of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) and two non- NRTIs (NNRTI), alone or in combination, were assessed in a colorectal explant model. The results clearly depicted the higher inhibitory activity of drug combinations compared to each drug alone. Furthermore, triple and quadruple combinations showed higher inhibitory activity than two drugs even against RTI escape mutants [40].

Freeze-dried muco-adhesive tablets, designed to overcome problems of poor mucosal retention and maintained gel structure, were presented by Manish Umrethia from Queen's University in Belfast. Carbopol, dapivirine and other polymer components were mixed to form multiple polymeric gels, and freeze-dried. *In vitro* testing of the gels and their freeze-dried variants demonstrated an advantage of the freeze-dried tablets. The latter displayed better stability, in addition to the

higher viscosity and muco-adhesive properties compared to gels. Furthermore, there was no significant difference between the two formulations in the release of the antiviral compound dapivirine. In summary, due to their physicochemical properties, the freeze-dried tablets offer a prolonged vaginal residence time and a sustained release of antiviral compounds.

New inhibitory molecules based on natural substances in body fluids or sulfonamides were identified by Edward Karamov, Sylvaine Blois and William Paxton. Oliphat™, a humic substance that is only moderately toxic, had a pronounced dose-dependent activity towards both AZT-sensitive and resistant HIV strains *in vitro*. In addition, Oliphat™ showed synergistic effects with the nucleoside RT inhibitor AZT. Paxton reported two molecules that can block HIV-1 capture and transfer through binding to DC-SIGN expressed on DCs. One molecule, bile-salt stimulated lipase (BSSL), was isolated from human milk and the other, mucin6 (MUC6), from the seminal plasma. They have similarities in structure and in their specific glycosylation patterns, which likely facilitates their binding efficiencies [41].

Antibodies as microbicides

Andrea Gorlani (PhD student) from Utrecht University emphasised the importance of microbicide development and introduced the use of llama heavy-chain antibody fragments (VHH) combined with topical microbicides. Immunoglobulin of the *Camelidae* family, devoid of the light chains [42], have been reported to show neutralising properties and high affinity for HIV-1 gp120 [43]. Gorlani presented results showing how these VHH can fulfill the criteria for use in a successful HIV microbicide. The requirements for a microbicide include stability, effective formulation, tissue permeability and low cost. The VHH were produced in a fed-batch fermentation system, followed by purification, a method that can easily be scaled up at low cost. The VHH have been formulated in a vaginal gel as well as in novel intravaginal ring devices, and shown to be stable in both. Stability was sustained in harsh conditions such as high temperature and low pH. Permeability through vaginal mucosa was demonstrated and showed a satisfactory rate through both intact and damaged epithelium. In summary, Gorlani showed that llama heavy-chain antibody fragments binding HIV gp120 can be used as entry inhibitors and applied as topical microbicides.

A series of posters addressed various hurdles in microbicide research. Since microbicides will inevitably be used also by undiagnosed HIV + women, there is growing concern about acquiring resistance to HIV if antiviral agents are incorporated in the microbicide. Katrijn Gruppung (PhD student) showed that high level

resistance to two microbicide candidate CD4 binding site (bs) inhibitors was easily induced *in vitro*, requiring only a few amino acid changes while displaying cross-resistance with other CD4 bs inhibitors. However, this should not be a problem as these inhibitors are not used in therapy. Reverse transcriptase inhibitors are, however, essential in HIV-1 therapy and their use as microbicides could narrow systemic therapeutic options, as demonstrated by Philippe Selhorst (PhD student). Thus, RTI microbicides might promote the selective transmission of resistant virus [44,45]. Therefore, as in systemic treatment, the solution seems to be a combination of different drug classes. In this context there is promising news as Sylvain Blois from the University of Cagliari has discovered a new class of HIV-1 inhibitors which seem to be active against the conserved nucleocapsid protein 7, resulting in production of defective virus. While these benzene sulfonamides are active only at micromolar levels, they compensate with their broad spectrum activity and structural simplicity.

The next important issue is microbicide delivery. Youssef Gali et al. (PhD student, Institute of Tropical Medicine) have measured the toxicity profile *in vitro* of different pharmaceutical excipients in vaginal microbicide formulations. Their study revealed that excipients show a distinct hierarchy in their potential to exert toxic effects and that this should be addressed when considering their inclusion in developing new formulations. One novel approach to optimize mucosal protection would be to combine microbicides with a mucosal vaccine. To this end, Katja Klein (PhD student) screened different permeation enhancers as potential antigen carriers for mucosal delivery. She demonstrated that at least some of the compounds were able to increase the bioavailability of vaccine antigens through the vaginal route. Donatella Negri et al. (Istituto Superiore di Sanità, Rome), demonstrated that sublingual immunisation also showed promise as an alternative route for vaccine delivery as it induces a persistent immune response in mice. Umrethia et al. focused on optimizing the administration of mucosal vaccines or microbicides containing gp41 constructs. Freeze-dried formulations were developed which are suitable for administration via sublingual and vaginal routes. The lyophilized formats can release gp41 molecules at a high rate, have an increased antigen stability and are easy to apply, representing a useful tool for the development of microbicides.

Novel adjuvant approaches

Two approaches for HIV vaccination have been investigated. One strategy is based on the activation of DC by apoptotic cells [46]. Apoptotic cells obtained from γ -irradiated DCs were used as an adjuvant for DNA vaccination in a proof-of-concept study ([47] and unpublished

data). Macaques were immunised with autologous apoptotic activated cells that had previously been infected *ex vivo* with replication defective SIVmac239ΔEnv/VSVEnv pseudovirus. Activated but not resting apoptotic cells proved to be adequate adjuvants for systemic IgG and mucosal IgA production. Three intradermal immunisations induced IFN- γ production, Th1 and CD8 + T-cell responses as well as neutralising antibodies and no detectable levels of virus replication. The second strategy involves biocompatible microspheres (H1D) as a delivery system for DNA and protein vaccines.

Microspheres have been hypothesised to favour the uptake of protein, induce maturation of APC, protect and permit a controlled release of antigen. Cynomolgus monkeys immunised with biologically active HIV-1 Tat protein adsorbed on H1D microspheres showed a significant control of viremia after challenge which correlated with the preservation of CD4 + T-cells. One hypothesis is that vaccine modalities that specifically improve T-helper cell responses might lead to better protection. Sieghart Sopper (German Primate Center, Göttingen) showed in a macaque/SIV model for AIDS that expression of activation markers are related to higher viral load and disease progression as early as four weeks after infection. Vaccination using different prime boost regimens, which reduced acute and post-acute viral load, resulted in earlier activation of CD4 + T-cells [48]. These results suggest that T-helper cells may contribute to the containment of viral replication during acute infection in macaques.

Conclusion

The conference presentations focused on common goals of developing effective HIV prevention strategies. EURO-PRISE brings together scientists from both microbicide and vaccine fields. The program focuses on the premise that vaccines and microbicides that target multiple stages of viral transmission through the mucosa will have the best chances of success. To demonstrate such approaches several partners are involved in clinical trials. The meeting in Budapest was focused on collaborative work between partners and was largely presented by the shared PhD students of the network. The showcasing of presentations by PhD students at the meeting promises a bright future for HIV research within Europe.

Acknowledgements

This work was supported by the FP-6-funded EUROPRISE, EC grant LSHP-CT-2006-037611. A special thank to Natasha Polyanskaya, the valuable project manager of EUROPRISE, for her outstanding coordination of all the activities of the consortium.

Author details

¹Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. ²San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy. ³Lund University, Lund, Sweden. ⁴Imperial College, London, UK. ⁵St. George University, London, UK. ⁶Institute of Tropical Medicine, Antwerp,

Belgium. ⁷Università degli Studi di Milano, Milan, Italy. ⁸Università Vita-Salute San Raffaele, Milan, Italy. ⁹University of Rome "Tor Vergata", Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy. ¹⁰Robert Koch Institute, Berlin, Germany. ¹¹Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, France. ¹²Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands.

Authors' contributions

All authors participated at the EUROPRISE conference as to be able to report on it. MB, AC, KDC, WDH, TD, SD, KG, DH, JH, KK, LM, PP, MR, JS, PS, AS, MJVG, and CW were in charge of the writing of dedicated chapters covering the different sessions of the conference. GS, BW and RS organized the sessions and the writing. Together with PB they wrote, corrected and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 5 March 2010 Accepted: 26 July 2010 Published: 26 July 2010

References

1. Janetzki S, Britten CM, Kalos M, Levitsky H, Maecker HT, Melief CJ, Old LJ, Romero P, Hoos A, Davis MM: "MIATA"-minimal information about T cell assays. *Immunity* 2009, **31**:527-528.
2. Fenyö EM, Heath A, Dispinseri S, Holmes H, Lusso P, Zolla-Pazner S, Donners H, Heyndrickx L, Alcamì J, Bongertz V, et al: International network for comparison of HIV neutralization assays: the NeutNet report. *PLoS One* 2009, **4**:e4505.
3. Scarlatti G, Alcamì J, Bongertz V, Fenyö EM, Heath A, Heyndrickx L, Holmes H, Jansson M, Lopalco L, Malnati M, et al: Comparison of HIV neutralization assays for use in vaccine research and clinical trials, phase II: results from the NeutNet working group. *Retrovirology* 2009, **6**(Suppl 3): P46.
4. Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, Miedema F, Schellekens PT, Tersmette M: Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4 + cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993, **118**:681-688.
5. Vicenzi E, Bordignon PP, Biswas P, Brambilla A, Bovolenta C, Cota M, Sinigaglia F, Poli G: Envelope-dependent restriction of human immunodeficiency virus type 1 spreading in CD4(+) T lymphocytes: R5 but not X4 viruses replicate in the absence of T-cell receptor restimulation. *J Virol* 1999, **73**:7515-7523.
6. Sato A, Iwasaki A: Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**:1333-1338.
7. Ogra PL, Faden H, Welliver RC: Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin Microbiol Rev* 2001, **14**:430-445.
8. Wu L, KewalRamani VN: Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 2006, **6**:859-868.
9. Schmitt D, Dezutter-Dambuyant C: Epidermal and mucosal dendritic cells and HIV1 infection. *Pathol Res Pract* 1994, **190**:955-959.
10. Holl V, Peressin M, Decoville T, Schmidt S, Zolla-Pazner S, Aubertin AM, Moog C: Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. *J Virol* 2006, **80**:6177-6181.
11. Klinman DM, Tross D, Klaschik S, Shirota H, Sato T: Therapeutic applications and mechanisms underlying the activity of immunosuppressive oligonucleotides. *Ann N Y Acad Sci* 2009, **1175**:80-88.
12. Ciabattini A, Pettini E, Arsenijevic S, Pozzi G, Medaglini D: Intranasal immunization with vaccine vector *Streptococcus gordonii* elicits primed CD4 + and CD8 + T cells in the genital and intestinal tracts. *Vaccine* 2010, **28**:1226-1233.
13. Tengvall S, Lundqvist A, Eisenberg RJ, Cohen GH, Harandi AM: Mucosal administration of CpG oligodeoxynucleotide elicits strong CC and CXC chemokine responses in the vagina and serves as a potent Th1-tilting adjuvant for recombinant gD2 protein vaccination against genital herpes. *J Virol* 2006, **80**:5283-5291.
14. Lindqvist M, Persson J, Thorn K, Harandi AM: The mucosal adjuvant effect of alpha-galactosylceramide for induction of protective immunity to sexually transmitted viral infection. *J Immunol* 2009, **182**:6435-6443.
15. Lindqvist M, Navabi N, Jansson M, Samuelson E, Sjölund A, Orndal C, Harandi AM: Local cytokine and inflammatory responses to candidate vaginal adjuvants in mice. *Vaccine* 2009, **28**:270-278.

16. Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, Hausner MA, Hirji K, Wang L, Harley CB, Villeponteau B, West MD, Giorgi JV: Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8 + cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *Aids* 1996, **10**:F17-22.
17. Effros RB: Impact of the Hayflick Limit on T cell responses to infection: lessons from aging and HIV disease. *Mech Ageing Dev* 2004, **125**:103-106.
18. Rethi B, Fluor C, Atlas A, Krzyzowska M, Mowafi F, Grutzmeier S, De Milito A, Bellocchio R, Falk KI, Rajnavolgyi E, Chiodi F: Loss of IL-7Ralpha is associated with CD4 T-cell depletion, high interleukin-7 levels and CD28 down-regulation in HIV infected patients. *Aids* 2005, **19**:2077-2086.
19. Zipeto D, Mautucci A, Ripamonti C, Scarlatti G, Rossolillo P, Turci M, Sartoris S, Tridente G, Bertazzoni U: Induction of human immunodeficiency virus neutralizing antibodies using fusion complexes. *Microbes Infect* 2006, **8**:1424-1433.
20. Euler Z, van Gils MJ, Bunnik EM, Phung P, Schweighardt B, Wrin T, Schuitemaker H: Cross-Reactive Neutralizing Humoral Immunity Does Not Protect from HIV Type 1 Disease Progression. *J Infect Dis* 2010, **201**:1045-53.
21. Dieltjens T, Heyndrickx L, Willems B, Gray E, Van Nieuwenhove L, Gruppig K, Vanham G, Janssens W: Evolution of antibody landscape and viral envelope escape in an HIV-1 CRF02_AG infected patient with 4E10-like antibodies. *Retrovirology* 2009, **6**:113.
22. Mainetti L, Mullins J, Scarlatti G: Humoral immune response in acute HIV-1 infection. *Retrovirology* 2009, **6**(Suppl 3):P48.
23. Bunnik EM, Euler Z, Welkers M, Grijns M, Prins J, Schuitemaker H: Adaptation of HIV-1 envelope glycoprotein to humoral immunity at a population level. *Retrovirology* 2009, **6**(Suppl 3):P389.
24. Barabas S, Gary R, Bauer T, Lindner J, Lindner P, Weinberger B, Jilg W, Wolf H, Deml L: Urea-mediated cross-presentation of soluble Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *PLoS Pathog* 2008, **4**:e1000198.
25. Isgro A, Leti W, De Santis W, Marziali M, Esposito A, Firmiani C, Luzzi G, Pintti M, Cossarizza A, Aiuti F, Mezzaroma I: Altered clonogenic capability and stromal cell function characterize bone marrow of HIV-infected subjects with low CD4 + T cell counts despite viral suppression during HAART. *Clin Infect Dis* 2008, **46**:1902-1910.
26. Dardenne M, Smaniotto S, de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Savino W: Growth hormone modulates migration of developing T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009, **1153**:1-5.
27. Tesselaar K, Miedema F: Growth hormone resurrects adult human thymus during HIV-1 infection. *J Clin Invest* 2008, **118**:844-847.
28. Darzy KH, Shalet SM: Pathophysiology of radiation-induced growth hormone deficiency: efficacy and safety of GH replacement. *Growth Horm IGF Res* 2006, **16**(Suppl A):S30-40.
29. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Premisi N, Namwat C, de Souza M, Adams E, et al: Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 2009, **361**:2209-2220.
30. Das AT, Klaver B, Centlivre M, Harwig A, Cooms M, Page M, Almond N, Yuan F, Piatak M Jr, Lifson JD, Berkhout B: Optimization of the doxycycline-dependent simian immunodeficiency virus through in vitro evolution. *Retrovirology* 2008, **5**:44.
31. Falkensammer B, Rubner B, Hiltgartner A, Willingseder D, Stahl Hennig C, Kuete S, Uberla K, Norley S, Strasak A, Racz P, Stoiber H: Role of complement and antibodies in controlling infection with pathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) in macaques vaccinated with replication-deficient viral vectors. *Retrovirology* 2009, **6**:60.
32. Cranage M, Sharpe S, Herrera C, Cope A, Dennis M, Berry N, Ham C, Heeney J, Rezk N, Kashuba A, et al: Prevention of SIV rectal transmission and priming of T cell responses in macaques after local pre-exposure application of tenofovir gel. *PLoS Med* 2008, **5**:e157, discussion e157.
33. Cranage MP, Fraser CA, Stevens Z, Huting J, Chang M, Jeffs SA, Seaman MS, Cope A, Cole T, Shattock RJ: Repeated vaginal administration of trimeric HIV-1 clade C gp140 induces serum and mucosal antibody responses. *Mucosal Immunol* 2010, **3**:57-68.
34. Michelini Z, Negri DR, Baroncelli S, Spada M, Leone P, Bona R, Klotman ME, Cara A: Development and use of SIV-based Integrase defective lentiviral vector for immunization. *Vaccine* 2009, **27**:4622-4629.
35. Elamanchili P, Diwan M, Cao M, Samuel J: Characterization of poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine* 2004, **22**:2406-2412.
36. Aline F, Brand D, Pierre J, Roingeard P, Severine M, Verrier B, Dimier-Poisson I: Dendritic cells loaded with HIV-1 p24 proteins adsorbed on surfactant-free anionic PLA nanoparticles induce enhanced cellular immune responses against HIV-1 after vaccination. *Vaccine* 2009, **27**:5284-5291.
37. Buonaguro L, Devito C, Tornesello ML, Schroder U, Wahren B, Hinkula J, Buonaguro FM: DNA-VLP prime-boost intra-nasal immunization induces cellular and humoral anti-HIV-1 systemic and mucosal immunity with cross-clade neutralizing activity. *Vaccine* 2007, **25**:5968-5977.
38. Buonaguro L, Tornesello ML, Gallo RC, Marincola FM, Lewis GK, Buonaguro FM: Th2 polarization in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects, as activated by HIV virus-like particles. *J Virol* 2009, **83**:304-313.
39. Lori F, Trocio J, Bakare N, Kelly LM, Lisiewicz J: DermaVir, a novel HIV immunisation technology. *Vaccine* 2005, **23**:2030-2034.
40. Herrera C, Cranage M, McGowan I, Anton P, Shattock RJ: Reverse transcriptase inhibitors as potential colorectal microbicides. *Agents Chemother* 2009, **53**:1797-1807.
41. Stax MJ, van Montfort T, Sprenger RR, Melchers M, Sanders RW, van Leeuwen E, Repping S, Pollakis G, Speijer D, Paxton WA: Mucin 6 in seminal plasma binds DC-SIGN and potently blocks dendritic cell mediated transfer of HIV-1 to CD4(+) T-lymphocytes. *Virology* 2009, **391**:203-211.
42. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R: Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993, **363**:446-448.
43. Forsman A, Beimaert E, Aasa-Chapman MM, Hoorelbeke B, Hijazi K, Koh W, Tack V, Szyndol A, Kelly C, McKnight A, et al: Llana antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120. *J Virol* 2008, **82**:12069-12081.
44. Lederman MM, Offord RE, Hartley O: Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nat Rev Immunol* 2006, **6**:371-382.
45. Martinez J, Coplan P, Wainberg MA: Is HIV drug resistance a limiting factor in the development of anti-HIV NNRTI and NRTI-based vaginal microbicide strategies? *Antiviral Res* 2006, **71**:343-350.
46. Clarke C, Smyth MJ: Calreticulin exposure increases cancer immunogenicity. *Nat Biotechnol* 2007, **25**:192-193.
47. Spetz AL, Patterson BK, Lore K, Andersson J, Holmgren L: Functional gene transfer of HIV DNA by an HIV receptor-independent mechanism. *J Immunol* 1999, **163**:736-742.
48. Ochieng W, Sauermaun U, Schulte R, Suh YS, Kim KS, Sung YC, Hunsmann G, Stahl-Hennig C, Sopper S: Susceptibility to Simian immunodeficiency virus ex vivo predicts outcome of a prime-boost vaccine after SIVmac239 challenge. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009, **52**:162-169.

doi:10.1186/1479-5876-8-72

Cite this article as: Wahren *et al.*: Rational design of HIV vaccine and microbicides: report of the EUROPRISE annual conference. *Journal of Translational Medicine* 2010 **8**:72.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Caractérisation et comparaison des propriétés immunostimulantes de nanoparticules biodégradables de poly(acide lactique) et de chitosane après adsorption de TLR ligands ou d'antigènes du VIH1

L'utilisation de vecteurs nanoparticulaires en vaccination comme systèmes de relargage contrôlé à base de polymères biodégradables a déjà été largement étudiée en vue d'un vaccin anti-VIH. Une approche novatrice consiste à co-administrer des molécules immuno-stimulatrices avec les antigènes d'intérêt, afin d'amplifier le recrutement et l'activation des cellules dendritiques (DCs). Un tel vecteur de vaccination pourrait amplifier l'intensité de la réponse immunitaire et une immunité au niveau des muqueuses vaginales et anales pourrait être obtenue après vaccination.

Nous avons utilisé des nanoparticules (180 nm) de poly(acide lactique) (PLA) ou de chitosane/sulfate de dextrane (CSD) (350 nm), comme véhicules et adjuvants de protéines du VIH1, gp140 et p24. Le poly(I:C) est la molécule immuno-stimulatrice choisie pour ses propriétés adjuvantes.

PLA et CSD ont montré leur grand potentiel comme supports de protéines. Les CSD permettent l'adsorption du poly(I:C) avec un rendement de 95%, l'adsorption est plus délicate à réaliser sur les PLA. Pour chaque formulation, la capacité à induire *in vitro* la maturation des DCs a été évaluée en suivant les marqueurs CD25, CD80, CD83, par cytométrie en flux. L'adsorption de poly(I:C) sur les PLA ou les CSD amplifie les capacités de maturation des particules et présente un effet synergique avec les CSD.

Nos travaux montrent que la co-adsorption d'un TLR ligand, avec des antigènes protéiques du VIH sur des nanoparticules biodégradables, est possible et confère à la formulation vaccinale son effet immuno-stimulant *in vitro*. *In vivo*, les formulations vaccinales contenant du poly(I:C) induisent de très forts taux d'anticorps sériques chez la souris.

MOTS-CLEFS : nanoparticules, PLA, chitosane, adjuvant particulaire, vaccination, cellules dendritiques

Characterization and comparison of the immunostimulatory properties of biodegradable poly (lactic acid) and chitosan nanoparticles after TLR ligands or HIV-1 antigens adsorption

Use of nanoparticulate vectors in vaccination as controlled release systems based on biodegradable polymers has been widely studied for an HIV vaccine. An innovative approach is to co-administer antigens of interest with immuno-stimulatory molecules to amplify the recruitment and activation of dendritic cells (DCs). Such a vaccine candidate could boost the intensity of the immune response and mucosal immunity in vaginal and anal intercourse could be obtained after vaccination.

We used nanoparticles of poly (lactic acid) (PLA) (180 nm) or chitosan / dextran sulfate (CSD) (350 nm), as vehicles and adjuvants for HIV-1 proteins, gp140 and p24. Poly(I:C) is the immuno-stimulatory molecule chosen for its adjuvant properties.

PLA and CSD have shown their great potential as carriers of proteins. The CSD allows the adsorption of poly(I:C) with a yield of 95%, it is more difficult to perform adsorption on the PLA. For each formulation, the ability to induce *in vitro* maturation of DCs was evaluated by following the markers CD25, CD80, CD83, by flow cytometry. Adsorption of poly(I:C) on the PLA or the CSD amplifies the maturation abilities of particles and has a synergistic effect with the CSD.

Our work shows that co-adsorption of a TLR ligand with protein antigens of HIV onto biodegradable nanoparticles is possible and gives a positive immuno-stimulant effect to the vaccine formulation *in vitro*. *In vivo*, vaccine formulations containing poly(I:C) induce very high levels of serum antibodies in mice.

KEY WORDS : nanoparticles, PLA, chitosan, particular adjuvant, vaccination, dendritic cells

DISCIPLINE : sciences, santé, immunologie

LABORATOIRE : Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (IBCP)

UMR 5086 CNRS Université de Lyon - 7 passage du Vercors

69 367 Lyon cedex 07