

Agonistes des récepteurs Nod et encapsulation dans des particules biodégradables pour l'induction de réponses immunitaires muqueuses anti-VIH-1

Vincent Pavot

▶ **To cite this version:**

Vincent Pavot. Agonistes des récepteurs Nod et encapsulation dans des particules biodégradables pour l'induction de réponses immunitaires muqueuses anti-VIH-1. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. ⟨NNT : 2013LYO10110⟩. ⟨tel-02612474⟩

HAL Id: tel-02612474

https://theses.hal.science/tel-02612474v1

Submitted on 19 May 2020

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.



HAL Authorization

Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé de Lyon

DIPLOME DE DOCTORAT

par

Vincent PAVOT

Agonistes des récepteurs Nod et encapsulation dans des particules biodégradables pour l'induction de réponses immunitaires muqueuses anti-VIH-1

Présentée et soutenue publiquement le 5 juillet 2013

Jury :	Pr Thierry Delair	Président
	Pr Véronique Préat	Rapporteur
	Dr Jean-Claude Sirard	Rapporteur
	Dr Bernard Verrier	Directeur de thèse
	Dr Christian Genin	Directeur de thèse
	Dr Stéphane Paul	Co-directeur de thèse

Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé de Lyon

DIPLOME DE DOCTORAT

par

Vincent PAVOT

Agonistes des récepteurs Nod et encapsulation dans des particules biodégradables pour l'induction de réponses immunitaires muqueuses anti-VIH-1

Présentée et soutenue publiquement le 5 juillet 2013

Jury :	Pr Thierry Delair	Président
	Pr Véronique Préat	Rapporteur
	Dr Jean-Claude Sirard	Rapporteur
	Dr Bernard Verrier	Directeur de thèse
	Dr Christian Genin	Directeur de thèse
	Dr Stéphane Paul	Co-directeur de thèse

"The impact of vaccination on the health of the world's people is hard to exagerate. With the exception of safe water, no other modality, not even antibiotics, has had such a major effect on mortality reduction and population growth."

Stanley Plotkin

REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier **Mme Véronique Préat** et **M. Jean-Claude Sirard** pour avoir accepté de rapporter ce travail et de se déplacer pour la soutenance de ma thèse. Je remercie également **M. Thierry Delair** pour avoir accepté de la présider.*

*Je tiens à remercier et à témoigner toute ma reconnaissance à **Bernard Verrier** et **Christian Genin**, mes directeurs de thèse, d'une part, pour la confiance que vous m'avez accordée dès mon arrivée dans le laboratoire, mais également pour vos multiples conseils, pour votre disponibilité, pour toutes les heures que vous avez consacrées à diriger cette recherche. Merci de m'avoir donné la chance de réaliser l'apprentissage du métier de chercheur dans ces conditions. Je n'aurais pas pu espérer mieux : toutes ces opportunités de collaborations, de congrès et surtout d'un environnement scientifique optimal à la fois à l'IBCP et au GIMAP… Quelle chance !*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à **Stéphane Paul**, mon co-directeur de thèse, pour toutes ces discussions professionnelles et personnelles, tes encouragements, ton soutien et ta confiance qui sans le savoir m'ont fait avancer ! Merci de m'avoir inculqué l'immunologie même s'il me reste encore beaucoup de chemin avant d'arriver à ton niveau ! Je te remercie également pour ta disponibilité et ton implication dans mon encadrement durant ces 3 ans malgré un planning souvent chargé.*

*Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreux collaborateurs : **Nuria Climent, Felipe Garcia, Odile Damour, Beste Kinikoglu et Marie-Rose Rovere** pour votre aide dans la mise au point de certaines manips et votre implication dans ce projet. Merci également à l'équipe de Cayla-Invivogen (**Gérard Tiraby**, **Éric Perouzel** et **Thierry Lioux**) qui m'ont donné les outils nécessaires à la bonne réalisation de cette thèse. Sans oublier bien sûr **Nico**, à la fois collaborateur et maintenant un grand ami.*

*Je n'oublie évidemment pas la « Team Verrier ». La bonne ambiance qui règne entre nous a contribué à rendre très agréables tous les moments passés au laboratoire. **Astrid** la Suissesse (« maman »), **Sophie** la râleuse (« j'en ai maaarre !!! »), **Nadège** la chimiste déguisée en biologiste (Mme Couvreur), **Vincent** l'apprenti chimiste (Mr Particoules) et **Julien** (Mr Zebra), cinq personnes qui comptent tellement pour moi, il est toujours très motivant de venir au labo en sachant qu'on vient voir ses potes. Tous les « anciens », **Céline, Charlotte, Franck, Thomas**, et les stagiaires (**Christelle**, **Gloria**, **Anne-Sophie**,…) : je vous remercie pour toutes nos discussions tant scientifiques que personnelles, nos fous rires et autre moments de détente, en bref pour toutes ces journées passées ensemble au labo. Surtout un très grand merci à **Séverine**, **Perrine**, **Sophie** et **Astrid** (oui je les cite encore une fois ☺) pour*

votre aide lors de ces nombreuses manips souris (« Aujourd'hui ? 50 prélèvements, pourquoi ? »), ELISpot (« Allez Vincent, on ne va pas t'abandonner »), ELISA (« Comment ça 12 plaques en une fois c'est trop ??? ») et génération de DCs (« Ficoll, Percoll, … vous connaissez la chanson… »), pour la complicité que nous garderons j'espère longtemps et pour nos longues discussions qui m'ont personnellement enrichies. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans votre aide, cette thèse est donc aussi un peu la votre.

Merci à ***Corinne*** *et* ***Ouahida,*** *nos deux gestionnaires de choc, ultra-réactives qui m'ont toujours permis d'obtenir l'ensemble des réactifs et matériels nécessaires au bon déroulement de cette thèse, même dans les situations les plus in extremis !*

Je souhaite également remercier tous les titulaires de l'équipe Nanovecteurs, ***Claire****,* ***Damien****,* ***Dominique****,* ***Jean-Yves****,* ***Loris*** *et* ***Simon*** *pour l'entraide, les discussions scientifiques partagées entre nous et les corrections d'articles.*

Enfin je remercie les membres des équipes de choc Sigaudo-Roussel et SRB, ***Carine****,* ***Chloé****,* ***Franck****,* ***Jeremy****,* ***Léa****,* ***Marie****,* ***Marie-Sophie****,* ***petit Romain*** *et* ***Sofiane****. Ainsi que les équipes du GIMAP de Saint-Etienne et tout particulièrement* ***Fahd*** *et* ***Alex*** *pour leur humour et leur bonne humeur permanente à chacun de mes passages au labo.*

Je remercie également les thésards, stagiaires, collègues rencontrés pendant ces trois années à l'IBCP ainsi que la joyeuse troupe ***Calo, Mélina & Ramdam****, qui sont aujourd'hui des amis, ma famille et mes repères lyonnais… Je souhaite les remercier pour l'entraide qui règne entre nous, pour nos discussions scientifiques partagées entre chimistes et biologistes, mais aussi pour toutes ces soirées partagées ensemble !*

Enfin, je voudrais finir en remerciant ma famille. Il n'y a pas de mots pour remercier ceux sans qui (c'est sûr !) je ne serais pas là. ***Papa****,* ***Maman****, merci pour votre amour et votre soutien. Mes deux petites sœurs,* ***Elodie*** *et* ***Lucie****, merci pour tout, merci d'être comme vous êtes, je pense souvent à vous même si on est loin les uns des autres. Pour finir,* ***ma Méli*** *: toi qui me donnes tant chaque jour qu'il faudrait en écrire une thèse pour tout dire. Merci infiniment pour ton soutien tout au long de ces trois ans (et surtout ces six derniers mois…).*

Table des Matières

ABREVIATIONS **1**

LISTE DES ILLUSTRATIONS **3**

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **5**

INTRODUCTION GENERALE 7

1. LE SYSTEME IMMUNITAIRE MUQUEUX 9
1.1. Défenses épithéliales & extra-épithéliales 10
1.2. Organes & tissus muqueux 11
1.2.1. Les tissus lymphoïdes organisés associés aux muqueuses (sites inducteurs) 12
1.2.2. Les tissus lymphoïdes diffus associés aux muqueuses (sites effecteurs) 16
1.2.3. Coopération entre sites inducteurs et effecteurs : mécanistique de la prise en charge de l'antigène à la réponse immunitaire 17
1.3. Vaccination & induction de réponses immunitaires muqueuses 20
1.3.1. Par voie parentérale 20
1.3.2. Par voie muqueuse 22
1.3.3. Par voie parentérale ou muqueuse 25
1.3.4. Prise en charge et devenir de l'antigène après vaccination muqueuse ou parentérale 27
1.3.5. Stratégies vaccinales à l'étude pour l'induction de réponses immunitaires muqueuses 30
1.3.6. Immunité *vs* Tolérance : le Yin et le Yang de la vaccination muqueuse 31
1.4. Conclusions 33

2. ADJUVANTS PARTICULAIRES ET MOLECULES IMMUNOSTIMULANTES 35
2.1. Adjuvants particulaires 37
2.1.1. L'Alum 37
2.1.2. Emulsions d'huiles dans l'eau : MF59® et AS03 38
2.1.3. Les liposomes 39
2.1.4. VLP et IRIV 40
2.1.5. Adjuvants à base de saponine : ISCOMs 41
2.1.6. Microparticules et nanoparticules de polymères 42
2.2. Molécules immunostimulantes 46
2.2.1. Toxines bactériennes et dérivés 47
2.2.2. Ligands du TLR3 et RLR 49
2.2.3. Ligands TLR4 : MPL® 49
2.2.4. Ligands TLR5 50
2.2.5. Ligands TLR7 et TLR8 51
2.2.6. Ligands TLR9 : CpG-ODN et ADN formulé 52
2.3. Récepteurs Nods et adjuvanticité 53
2.3.1. Structure et distribution 54
2.3.2. Ligands des récepteurs Nods et activation 54
2.3.3. Réponses biologiques à l'activation de la voie des Nods 56
2.2. Ciblage des DCs et vectorisation d'antigènes/ligands par des systèmes particulaires 57
2.4. Conclusions 60

3. IMMUNITE MUQUEUSE ET INFECTION PAR LE VIH-1 : APPLICATION AU DEVELOPPEMENT D'UN VACCIN INDUCTEUR DE REPONSES IMMUNITAIRES MUQUEUSES 63
3.1. Structure et cycle réplicatif du VIH-1 64
3.1.1. Les protéines 65
3.1.2. Cycle de réplication 66
3.2. Le SIDA, une maladie des muqueuses 67
3.2.1. Traversée de la barrière épithéliale 68
3.2.2. Etablissement des réservoirs viraux 70
3.3. L'intestin : réservoir du VIH-1 71
3.4. Corrélats de protection 72
3.4.1. Résistance naturelle et facteurs génétiques de l'hôte 73

3.4.2. Corrélats immunitaires....73
3.5. Trente ans de recherche vaccinale anti-VIH-1....75
3.5.1. Réponses immunitaires cellulaires et humorales anti-VIH-1....76
3.5.2. Essais cliniques et vaccins anti-VIH-1....77
3.5.3. Développement de vaccins inducteurs d'anticorps neutralisants....79
3.5.4. Développement de vaccins inducteurs de réponses cellulaires....80
3.5.5. Autres approches vaccinales anti-VIH-1....81
3.5.6. Adjuvants et vaccins anti-VIH-1....81
3.6. Conclusions....82

PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE 85

RESULTATS 87

RESULTATS 1 : ENCAPSULATION DE LIGANDS DES RECEPTEURS NOD1 ET NOD2 DANS LES NANOPARTICULES DE PLA ET EVALUATION DE LEUR POTENTIEL IMMUNOSTIMULANT *IN VITRO* ET *IN VIVO*. 89
Introduction 90
Article 92
Résultats et discussion 99

RESULTATS 2 : UTILISATION DE NPS DE PLA POUR L'INDUCTION DE REPONSES IMMUNITAIRES MUQUEUSES ET ETUDE DE L'EFFET ADJUVANT DE MOLECULES AGONISTES DES RECEPTEURS NOD1 ET NOD2....103
Introduction.... 104
Article .... **Erreur ! Signet non défini.**
Résultats et discussion 125

RESULTATS 3 : EVALUATION DU POTENTIEL IMMUNOSTIMULANT D'UNE MOLECULE CHIMERIQUE AGONISTE DES RECEPTEURS NOD2 ET TLR2, *IN VITRO* ET *IN VIVO* 133
Introduction.... 133
Article 134
Résultats et discussion 149

RESULTATS 4 : TRANSPORT ET BIODISTRIBUTION DES NANOPARTICULES DE PLA *IN VITRO* ET *IN VIVO*....155
4.1. Introduction....155
4.2. Matériels et méthodes 156
4.2.1. Elaboration de nanoparticules de PLA fluorescentes 156
4.2.2. Modèle d'épithélium intestinal associé aux follicules reconstruit *in vitro* 157
4.2.3. Muqueuse orale reconstruite *in vitro* 159
4.2.4. Biodistribution au niveau de la muqueuse intestinale *in vivo*.... 163
4.2.5. Biodistribution des NPs au niveau des ganglions lymphatiques inguinaux *in vivo* 164
4.2.6. Administration intradermique des NPs de PLA-Nods 166
4.3. Résultats 167
4.3.1. Epithélium intestinal associé aux follicules reconstruit *in vitro*.... 167
4.3.2. Anse intestinale *in vivo* 169
4.3.3. Muqueuse orale reconstruite *in vitro* 171
4.3.4. Biodistribution des NPs au niveau des ganglions lymphatiques inguinaux *in vivo* 173
4.3.5. Administration intradermique des NPs de PLA-Nods 174
4.4. Discussion 175
4.5. Conclusions....179

DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... 181

1. Résumé des objectifs et résultats obtenus 183
2. Agonistes de PRRs et vaccination 187
3. Vacciner par voie parentérale ou muqueuse ? 189
4. Co-administration ou co-délivrance de l'antigène et du ligand ? 190
5. Amélioration du Système d'adressage muqueux et de ciblage des DCs 191
6. Perspectives 192
7. Choix d'un immunogène pertinent en vaccination anti-VIH-1 193
8. Choix des voies d'administrations muqueuses et vaccination anti-VIH-1.....194

CONCLUSION GENERALE.....197

ANNEXE..... 199

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 215

ABREVIATIONS

Ac : Anticorps
ADCC : Cytotoxicité Cellulaire Dépendante de l'Anticorps
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
Ag : Antigène
ARN : Acide RiboNucléique
BALT : Bronchus-Associated Lymphoid Tissue
BCG : Bacille de Calmette-Guérin
CD : Cluster de Différentiation
Cellule M : Cellule Microfold
Cellule NK : Cellule Natural Killer
LC : Cellule de Langerhans
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CT : Toxine Cholérique
CTB : Sous-unité B recombinante de la Toxine Cholérique
CTL : Lyphocytes T cytotoxiques
DC : Cellule Dendritique
DAP : Diaminopimelic acid
EC : Elite Controllers
ECET : *Escherichia coli* enterotoxigénique
ET : Entérotoxine Thermolabile de *E. coli*
ENI : Exposé Non Infecté
FAE : Epithélium Associé au Follicule
FcRn : Récepteur néonatal du Fc
FDC : Cellules Dendritiques Folliculaires
GALT : Gut-Associated Lymphoid Tissue
gp : glycoprotéine
HPV : Human Papillomavirus
HEV : High Endothelial Venules
ID : Intradermique
Ig : Immunoglobuline
IELs : Lymphocytes Intra-Epithéliaux
IFN : Interféron
IL : Interleukine
ILFs : Follicules Lymphoïdes Isolés
IM : Intramusculaire
IPV : Vaccin Poliomyélite inactivé Injectable
IRIV : Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virosomes
ISCOMs : Complexes immunostimulants
LB : Lymphocyte B
LP : *Lamina Propria*
LPMC : Cellules Mononucléées de la LP
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
LT_{FH} : Lymphocyte T Folliculaire Helper
LTNP : Long Term Non-Progressors
LTS : Long Term Survivors
MALT : Système Immunitaire Associé aux Muqueuses
MAdCAM-1 : Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule-1
MDP : Muramyl DiPeptide
MEB : Microscopie Electronique à Balayage
MET : Microscopie Electronique en Transmission
MLNs : Ganglions Lymphatiques Mésentériques
MOR : Muqueuse Orale Reconstruite
MP : microparticule
MPL : MonoPhosphoryl Lipide A

NALT : Tissus Lymphoïdes Associés à la Muqueuse Nasale

NF-κB : Nuclear Factor-κB

NK : Natural Killer

NLR : Nod-Like Receptor

Nod : Nucleotide-binding and Oligomerization Domain

NP : Nanoparticule

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPV : Vaccin Poliomyélite Oral

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

pIgR : récepteurs à Ig polymériques

PLA : Poly(acide lactique)

PLGA : Poly (acide lactique-co-glycolique)

Poly I:C : polyinosinic:polycytidylic acid

PP : Plaque de Peyer

PRR : Pattern Recognition Receptor

TEER : Résistance trans-épithéliale

SC : Sous-Cutané

SED : Dôme Sous-Epithélial

SI : Système Immunitaire

SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise

SIgA : Immunoglobuline A sécrétoire

SIV : Simian Immunodefiency Virus

Th : Lymphocyte T helper

TLR : Toll-Like Receptor

T_{reg} : Lymphocyte T régulateur

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLP : Virus-Like Particle

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1.1 - Caractéristiques des tissus muqueux de type I et de type II.
Figure 1.2 - Délimitation et distribution des tissus lymphoïdes au niveau de l'intestin et différences entre espèces.
Figure 1.3 - Description des plaques de Peyer.
Figure 1.4 - Fonction du FAE.
Figure 1.5 - Description du système immunitaire muqueux humain et coopération entre sites inducteurs et effecteurs.
Figure 1.6 - Homing des LB au niveau des tissus muqueux et périphériques.
Figure 1.7 - Voies d'immunisations muqueuses et compartimentations des réponses SIgA.
Figure 1.8 - La vaccination intranasale induit des réponses immunitaires au niveau du NALT et du tractus génital.
Figure 1.9 - Modèle des mécanismes de tolérance orale.
Figure 2.1 - Développement des premières générations de vaccins possédant intrinsèquement des ligands TLRs et implication dans le développement de nouvelles approches.
Figure 2.2 - Les différents composants d'un virosome.
Figure 2.3 - Structure chimiques du chitosane.
Figure 2.4 - Structures chimiques du PLA, PGA, PLGA, PCL et PACA.
Figure 2.5 - TLRs et ligands.
Figure 2.6 - Interaction entre une molécule de flagelline et deux récepteurs TLR5.
Figure 2.7 - Structure des récepteurs Nod1 et Nod2.
Figure 2.8 - Peptidoglycan et ligands Nod1 et Nod2.
Figure 2.9 - Cascade d'activation de la voie des récepteurs Nods.
Figure 2.10 - Modes d'internalisations des particules en fonction de leur taille.
Figure 3.1 - Nombre de personnes nouvellement infectées par le VIH entre 1990 et fin 2011.
Figure 3.2 - Structure du VIH.
Figure 3.3 - Représentation du cycle de réplication virale du VIH-1.
Figure 3.4 - Principaux sites d'invasions du VIH-1.
Figure 3.5 - Transmission du VIH à travers une muqueuse mono et pluristratifiée.
Figure 3.6 - Incidence du VIH à six mois d'intervalle chez des sujets vaccinés et placebos lors de l'essai clinique STEP.

Tableaux

Tableau 1.1 - Vaccins licenciés à administration parentérale contre les maladies initiant leur infection au niveau muqueux.
Tableau 1.2 - Vaccins licenciés à administration muqueuse contre les maladies initiant leur infection au niveau muqueux.
Tableau 2.1 - Nanovecteurs et systèmes de délivrance communément employés dans les études de vaccins muqueux.
Tableau 2.2 - Adjuvants vaccinaux utilisés dans des vaccins dirigés contre des infections à tropisme muqueux.
Tableau 3.1 - Probabilité de transmission du VIH-1 en fonction du site d'invasion.
Tableau 3.2 - Principaux corrélats de protections contre le VIH-1.
Tableau 3.3 - Principales études cliniques vaccinales anti-VIH-1.

Etude Bibliographique

Introduction générale

1. Le Système immunitaire muqueux

2. Adjuvants particulaires et molécules immunostimulantes

3. Immunité muqueuse et infection par le VIH-1 : application au développement d'un vaccin inducteur de réponses immunitaires muqueuses

INTRODUCTION GENERALE

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) a été isolé il y a 30 ans et reconnu comme pathogène responsable du Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise (SIDA). Depuis, l'épidémie s'est étendue à toutes les régions du monde, et environ 34 millions de personnes sont porteuses du virus. Certes, la prévalence des personnes infectées par le VIH se stabilise à l'échelle mondiale depuis 2000 (UNAIDS, 2012), mais les seules armes disponibles pour lutter contre l'épidémie sont la prévention et des traitements anti-rétroviraux qui ne peuvent que contenir le virus pendant quelques années. A l'heure actuelle, « on ne connaît aucun cas de guérison naturelle de l'infection VIH : l'organisme paraît spontanément incapable de monter une réponse immunitaire qui lui permettrait d'éliminer le virus » (Girard, 2007), et un vaccin constitue l'un des meilleurs espoirs de contrôler cette épidémie. La mise au point d'un vaccin contre le VIH a été lancée il y a plus de 25 ans, mais rapidement, les approches développées pour les autres maladies virales se sont révélées non-applicables au VIH. Ainsi, l'utilisation du VIH vivant atténué comme antigène de vaccination est très difficile et majoritairement exclue, en raison des risques de développer un SIDA lié à la vaccination. L'utilisation du VIH inactivé n'est pas non plus envisagée du fait que les essais de vaccination par le SIV inactivé chez le macaque n'ont pas été convaincants pour induire une protection efficace. En outre, les effets secondaires liés à la pathogénicité du virus restent trop importants pour que cette voie soit expérimentée chez l'Homme (Gallo, 2005). La voie des recombinants est depuis 20 ans largement explorée, avec l'utilisation de protéines recombinantes, de peptides synthétiques ou encore de plasmides ADN. Mais ces éléments seuls sont peu immunogènes et doivent être adjuvantés. Les « vaccins vivants recombinants » (Girard, 2007) ont été les premiers développés, la particule virale étant chargée de véhiculer et d'exprimer les antigènes du VIH. Ces recherches ont conduit à des essais cliniques de Phase II comme par exemple l'adénovirus Ad5 recombinant de Merck, inducteur d'une réponse immune à médiation cellulaire cytotoxique, mais inefficace à induire une protection contre l'infection. Sans compter que l'utilisation de tels vaccins induit une réponse immune anti-vecteur qui limite les possibilités de rappels. Plus récemment, ont été développés des adjuvants particulaires synthétisés à partir de polymères biocompatibles et biodégradables qui vectorisent des antigènes protéiques ou nucléiques adsorbés en surface, ou inclus dans la matrice particulaire. Ces nouveaux adjuvants sont prometteurs pour induire une réponse immune à médiation humorale ou cellulaire dans de nombreux contextes infectieux.

La majorité des vaccins est aujourd'hui administrée par voie parentérale, en sous-cutanée ou intra-musculaire, et induisent des réponses immunes systémiques et sont, dans certains cas, capables de protéger contre des pathogènes à tropisme muqueux. Les muqueuses constituent en effet la principale porte d'entrée des pathogènes, et l'application du vaccin au site de pénétration du pathogène a été démontrée comme inductrice d'une immunité protectrice dans un certain nombre de vaccins déjà homologués chez l'Homme. Pour le développement d'un vaccin anti-

VIH/SIDA efficace, outre le vecteur de vaccination, la voie d'administration doit être considérée ainsi que la ou les molécule(s) adjuvante(s) capable(nt) de potentialiser et/ou d'orienter la réponse immunitaire.

Dans cette étude bibliographique ces différents aspects vont être développés. Après la description du système immunitaire muqueux et des différentes possibilités d'induire des réponses immunitaires au niveau de ces sites, à la fois à l'aide de systèmes de délivrance et/ou de molécules immunostimulantes, nous exposerons l'établissement de ce virus dans les muqueuses et comment le SIDA, d'abord jugé comme une maladie des ganglions, est aujourd'hui considéré comme une maladie des muqueuses. A ce titre, l'induction de réponses immunitaires muqueuse, semble s'imposer.

1. LE SYSTEME IMMUNITAIRE MUQUEUX

Les muqueuses représentent des tissus essentiels pour l'organisme ; elles tapissent les cavités ouvertes vers le milieu extérieur et recouvrent une surface de plusieurs centaines de mètres carrés chez l'humain adulte (~ 400 à 600 m^2) soit environ 200 fois la surface de la peau[1]. Elles sont majoritairement représentées par les tractus gastro-intestinal, respiratoire et uro-génital.

Situées à l'interface entre l'organisme et l'environnement, les muqueuses sont donc la première ligne de contact avec les agents infectieux et sont par conséquent exposées à de nombreuses infections par des micro-organismes pathogènes. Il a en effet été estimé que 70 % des agents infectieux pénètrent dans l'organisme par cette voie[2]. Les muqueuses sont cependant protégées des attaques extérieures par des mécanismes de défenses de nature physicochimique mais aussi par une immunité innée et adaptative capable de distinguer les antigènes (Ags) envahissant l'organisme par voie muqueuse de ceux introduits directement par voie systémique. Une activité immunitaire importante est donc maintenue au niveau de ces surfaces permettant de « fournir des informations » sur l'environnement extérieur.

Le système immunitaire muqueux est un système dont la description est beaucoup plus récente que celle du système immunitaire systémique, puisque son étude n'a vraiment été abordée qu'à la fin des années 1970. Le système immunitaire muqueux est constitué d'un réseau de tissus, de cellules lymphoïdes et de molécules effectrices telles que des anticorps (Ac), des chimiokines et des cytokines. Ces facteurs sont capables de répondre à des invasions par des agents infectieux (de même qu'à des vaccins administrés par voie muqueuse) en orchestrant des réponses immunitaires innées et adaptatives afin de développer une protection efficace. L'initiation d'une réponse immune spécifique d'un Ag débute au niveau des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT). Ces derniers sont caractérisés par la présence de nombreux follicules que l'on retrouve au niveau des surfaces intestinales (plaques de Peyer - PPs) et du tractus respiratoire (tissus lymphoïdes associés au bronches – BALT). Le tractus uro-génital ne possédant pas de MALT, les réponses immunitaires adaptatives sont initiées exclusivement au niveau des ganglions lymphatiques draînant la muqueuse (ganglions inguinaux)[3]. L'organisation des tissus immuns muqueux et des cellules immunitaires s'y trouvant est très différente de celle du système immunitaire systémique et diffère d'un tissu muqueux à un autre.

Ces différentes barrières font donc face à un environnement extérieur riche en pathogènes ayant développé des mécanismes de colonisation des surfaces épithéliales et d'invasion des tissus muqueux, mais aussi à des Ags inoffensifs, tels que ceux contenus dans la nourriture, dans l'air ou encore dans la flore bactérienne commensale de l'intestin. Ces derniers représentent la grande majorité des Ags rencontrés et requièrent donc une réponse appropriée, caractérisée par une suppression active de la réponse immunitaire définie par le terme de tolérance. A l'inverse, concernant les éléments pathogènes, une réponse immunitaire efficace sera nécessaire.

Dans cette partie, nous nous intéresserons à l'organisation du système immunitaire muqueux ainsi qu'aux techniques permettant d'induire des réponses immunitaires au niveau de ces sites.

1.1. DEFENSES EPITHELIALES & EXTRA-EPITHELIALES

La barrière épithéliale constitue un élément clé dans la prévention de la pénétration des micro-organismes. Ainsi, l'épithélium muqueux possède des moyens de défense à la fois physicochimiques et cellulaires qui diffèrent légèrement d'un site muqueux à un autre. Un épithélium monostratifié (type I) recouvre la muqueuse intestinale, le tractus respiratoire varie d'un épithélium pseudostratifié à un épithélium monostratifié, le vagin varie d'un épithélium mono- à pluristratifié (type II) et des épithéliums pluristratifiés recouvrent la cavité orale, le pharynx, l'œsophage et l'urètre (Figure 1.1)[4].

Les mouvements de fluides (ex. salive, sécrétions nasales, urine) ainsi que les cellules ciliées exercent des effets mécaniques à la surface des muqueuses, permettant d'éliminer les micro-organismes indésirables. Toutefois, si ces derniers parviennent tout de même à adhérer aux surfaces, des barrières alternatives telles que le mucus, composé de mucines et contenant des immunoglobulines A sécrétoires (SIgA), sécrété par les cellules en gobelet, vont aussi permettre de limiter voire stopper la progression de ces micro-organismes. Des mécanismes additionnels vont aussi inhiber les développements bactériens et fongiques : le pH acide de l'estomac, des enzymes (lysozyme, lactoferrine, lactoperoxidase), des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales (défensines, cathélicidines et histatines) et notamment les cellules de Paneth[5]. La flore commensale représente elle aussi une barrière très efficace : elle occupe les sites de fixation, développe une compétition pour la capture des nutriments et sécrète des composés bactéricides ou bactériostatiques (bactériocines ou produits issues du métabolisme).

Les cellules épithéliales intestinales forment aussi une barrière physique très sélective. En effet, des flux trans-cellulaires et para-cellulaires, contrôlés par des pompes membranaires, des canaux ioniques ainsi que des jonctions serrées, vont adapter la perméabilité en fonction des besoins physiologiques. En plus de ses fonctions protectrices, l'épithélium procure au système immunitaire un flux d'informations sur le milieu extérieur. Cette fonction requière le transport de molécules et d'Ags à travers la barrière épithéliale et la mise en place d'une collaboration entre les cellules épithéliales, les cellules présentatrices d'Ags (CPAs) professionnelles et les lymphocytes[6].

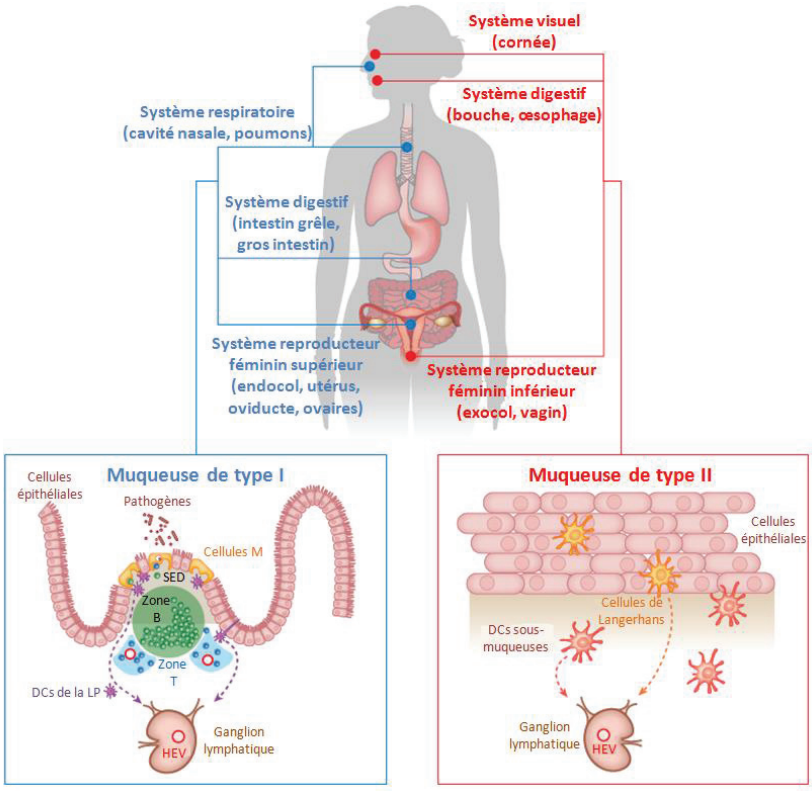


Figure 1.1 - Caractéristiques des tissus muqueux de type I et de type II (adapté de Woodrow *et al.*[4]). Le tractus génital féminin comprend à la fois une muqueuse de type I (endocol et utérus) et une muqueuse de type II (exocol et vagin). Un épithélium monostratifié recouvre les surfaces de type I alors que les muqueuses de type II sont recouvertes d'un épithélium pluristratifié. Sous l'épithélium des muqueuses de type I sont retrouvés le MALT et des cellules M (Microfold) dans l'épithélium. Les SIgA peuvent ainsi être exportées à travers l'épithélium jusque dans la lumière des muqueuses de type I et représentent la principale protection au niveau de ces sites. Les IgG sont les principales Ig protectrices au niveau des muqueuses de type II. Les cellules dendritiques (DCs) sont retrouvées un peu partout dans le MALT et sont capables de présenter les Ags localement ou bien de migrer dans les ganglions lymphatiques drainants. Chez l'adulte, les muqueuses de type II ne possèdent pas de MALT et les DCs situées dans et sous l'épithélium stratifié doivent migrer jusque dans les ganglions lymphatiques drainants afin de présenter l'Ag aux lymphocytes naïfs. HEV : High Endothelial Venules ; SED : Dôme sous-épithélial.

1.2. ORGANES & TISSUS MUQUEUX

Les MALTs, abordés dans la première sous-partie, peuvent être morphologiquement et fonctionnellement subdivisés en deux grandes composantes[7] :

- Les sites inducteurs : tissus lymphoïdes **organisés** associés aux muqueuses, comprenant divers follicules, sont responsables de l'induction de la réponse immunitaire. Ces sites vont permettre la prise en charge des Ags à la surface des muqueuses permettant ensuite la stimulation des lymphocytes T (LT) et B (LB) sous-jacents.

- Les sites effecteurs : tissus lymphoïdes **diffus** associés aux muqueuses, comprennent l'ensemble des leucocytes disséminés au niveau des épithéliums et de la *lamina propria* (LP). Ils sont responsables de la réponse immune effectrice. Ces sites vont permettre l'action des cellules effectrices - après extravasation, rétention et différenciation - notamment par la sécrétion d'SIgA. La distribution et la composition de ce type de structure lymphoïde varie considérablement d'une espèce à l'autre (Figure 1.2).

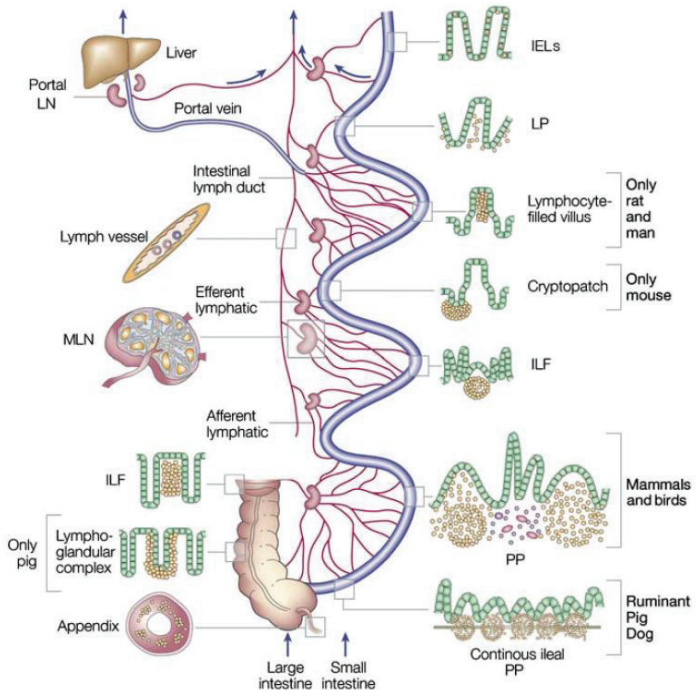


Figure 1.2 - Délimitation et distribution des tissus lymphoïdes au niveau de l'intestin et différences entre espèces[8]. Les lymphocytes quittent la muqueuse intestinale *via* le système lymphatique afférent vers les ganglions mésentériques, ou *via* la veine porte vers le foie.

1.2.1. Les tissus lymphoïdes organisés associés aux muqueuses (sites inducteurs)

Le MALT organisé inclut plusieurs structures anatomiques bien identifiables. Ainsi, au niveau de la sphère ORL (nez, gorge, oreilles), le terme de NALT (Nasopharyngeal-Associated Lymphoid Tissue) regroupe les amygdales palatines, les amygdales pharyngées, les amygdales linguales, les végétations adénoïdes ainsi que le tissu lymphoïde tapissant la trompe d'Eustache en deçà de l'oreille interne. On entendra aussi parler du terme de « cercle ou anneau de Waldeyer » pour désigner cet ensemble[9].

Au niveau du GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue), les PPs, l'appendice ainsi que les ganglions lymphatiques mésentériques (MLNs) constituent d'autres structures identifiables macroscopiquement. Les PPs sont des formations lymphoïdes macroscopiques retrouvées dans la sous-muqueuse tout au long de l'intestin grêle mais de façon beaucoup plus dense au niveau de l'iléon où le risque de remontée des bactéries depuis le côlon est le plus important[10].

Quatre régions peuvent être distinguées dans les PPs :

- L'épithélium associé aux follicules (FAE) assurant le transport des Ags vers la muqueuse.

- La région du dôme sub-épithélial contenant des DCs, ainsi que des LT et LB qui contrôlent la nature de la réponse immunitaire induite.

- Des follicules riches en LB, impliqués dans le développement d'une réponse à médiation humorale.

- Une zone para-folliculaire riche en LT, impliquée dans le développement d'une réponse à médiation cellulaire.

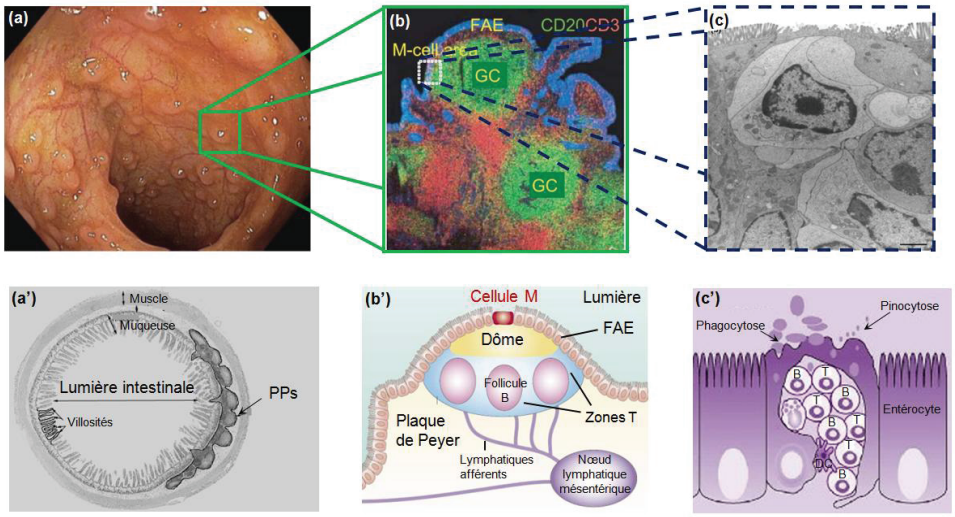


Figure 1.3 - Description des plaques de Peyer[11, 12, 13]. (a) Plaques de Peyer (PP) au niveau de l'iléon d'un homme de 20 ans (iléoscopie). Au niveau de l'iléon, les PPs forment des anneaux (a'). (b) Immunofluorescence d'une PP : en vert les LB (CD20), les LT en rouge (CD3) et l'épithélium en bleu (cytokératine). (c) Microscopie électronique en transmission d'une cellule M (Microfold) (au centre) entourée de deux entérocytes. Échelle = 1 µm.

Épithélium associé aux follicules et cellules M

Le FAE comprend des cellules entérocytaires et des cellules M (Microfold) (Figure 1.3). Ces dernières ont pour fonction de fixer et de transporter sélectivement des Ags ou des micro-organismes présents dans la lumière intestinale par exocytose vers les cellules immunitaires sous-jacentes[14]. Leur présence n'est pas limitée à l'intestin, elles sont également retrouvées dans le tractus respiratoire supérieur et notamment au niveau nasal[15]. Elles sont morphologiquement et fonctionnellement différentes des autres cellules épithéliales. Leur surface apicale ne comporte ni bordure en brosse ni glycocalix, rendant leur fonction de transport plus efficace. Par ailleurs, l'expression des enzymes digestives apicales comme la phosphatase alcaline ou l'iso-sucrose maltase et le nombre de lysosomes y sont fortement réduits[16]. Les molécules les traversent ainsi sans altération de leurs propriétés antigéniques[17]. Les cellules M ont un état de glycosylation différent de celui des entérocytes voisins. Chez la souris, par exemple, les cellules M de la PP de l'intestin grêle expriment principalement le α(1-2)-fucose[18]. Enfin les cellules M ne possèdent pas de cytosquelette rigide, ce qui leur permet d'avoir, au niveau de la membrane basale, une poche intra épithéliale contenant des LB, LT et des DCs[19]. Cette poche réduit considérablement la distance à traverser et donc le temps pour qu'une molécule pénètre (10 à 15 minutes) (Figure 1.4).

La capacité de transcytose des Ags par les cellules M peut également faciliter l'invasion par des pathogènes intestinaux comme les bactéries Salmonella[20], Shigella[21] et Yersinia[22]. Par exemple, les protéines fimbriales de la membrane externe de Salmonella typhimurium jouent un rôle clé

dans la liaison de ces bactéries aux cellules M[23]. Dans la plupart des cas, l'infection entraine une désorganisation cellulaire suivie de l'altération de l'intégrité de la barrière épithéliale. D'autres données suggèrent que les cellules M sont des sites importants dans le transport de prions de la lumière intestinale vers les PPs. En effet, sur des souris déplétées en cellules M (souris déficientes pour le gène RANK n'induisant pas la différenciation des entérocytes en cellules M), le passage des prions dans la PP, ainsi que le développement de la maladie sont bloqués[24].

Enfin, bien que le rôle des cellules M dans le traitement et la présentation des Ags n'ait pas été complètement élucidé à ce jour, certaines études montrent une expression de molécules CMH-II et de la cathepsine E (protéine exprimée par les CPAs) à la surface des cellules M[25]. Enrichie par sa capacité à produire des cytokines immuno-régulatrices, telles que l'interleukine (IL)-1[26], les cellules M pourraient donc avoir un rôle de CPA et ainsi avoir une part importante dans l'initiation de la réponse immunitaire intestinale.

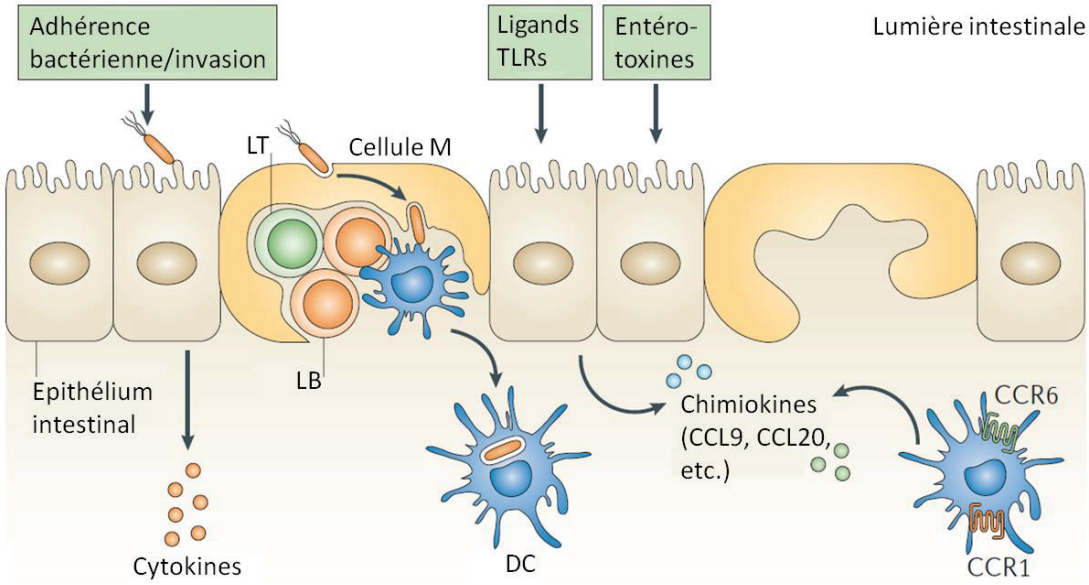


Figure 1.4 - Fonction du FAE (adapté de Neutra *et al.*[27]). L'épithélium associé aux follicules contient des entérocytes et des cellules M. Ces dernières sont spécialisées dans l'endocytose et le transport transépithélial d'Ags intacts et de micro-organismes dans la poche intraépithéliale riche en LT et LB et en DCs. Les entérocytes sécrètent les chimiokines CCL9 et CCL20 spécifiques de certaines DCs, permettant ainsi l'attraction de ces cellules phagocytaires au point d'entrée des pathogènes dans la muqueuse.

Dôme sub-épithélial

Le dôme sous-épithélial des PPs est riche en LB, LT, macrophages et DCs, pour la plupart attirés par les chimiokines sécrétées par les cellules du FAE (CCL9, CCL20). Leur fonction est cruciale pour contrôler la nature, la qualité et l'intensité de la réponse immunitaire induite au niveau de la muqueuse. Lorsque l'Ag a traversé la paroi épithéliale par transcytose à travers les cellules M, il est capturé par les DCs, ce qui provoque leur maturation et leur migration vers les zones intra-folliculaires. Les DCs lymphoïdes exprimant le CD8α et des cellules doubles négatives CD8α$^-$

$CD11b^-$ induisent la différenciation de LT naïfs en LT « helper » de type Th1, favorisant l'induction d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Des cellules de la lignée myéloïde, $CD11b^+$, sécrétant de l'IL-10 et de l'IL-6, sont également présentes dans le dôme où leur rôle est d'induire des réponses de type Th2 stimulant l'immunité humorale[28]. Enfin, certaines DCs migrent *via* les vaisseaux lymphatiques efférents vers les ganglions lymphatiques mésentériques[29]. Plusieurs sous-populations de DCs ont été décrites chez la souris et sont souvent classées en fonction de l'expression de leurs récepteurs de surface[30]. Néanmoins, la fonction et le phénotype des DCs sous-muqueuses restent à ce jour peu décrits.

Les lymphocytes activés quittent ensuite le site inducteur et migrent *via* la lymphe vers les ganglions mésentériques ou médiastinaux, le canal thoracique puis le sang jusqu'à la *lamina propria* de la muqueuse au site initial d'entrée du pathogène où ils se différencient en cellules effectrices ou cellules mémoire[31]. Enfin, l'induction de réactions tolérogènes, en l'absence de signaux inflammatoires exogènes, semble être dépendante de l'action des DCs par l'intermédiaire de LT régulateurs de type Th3[32].

Les cellules dendritiques de la PP

Les DCs résidant dans la PP sont dans un état dit « immature », caractérisé par une forte capacité de capture et d'internalisation d'Ags. Une fois la capture de l'Ag effectué, les DCs vont maturer puis migrer vers les zones inter- et intra-folliculaires. Leur rôle est alors de stimuler les cellules T naïves et d'induire la production d'IgA par les cellules B. Les DCs de la PP présentent aussi des propriétés tolérogènes (production d'IL-10 et de TGF-β, induction de LT régulateurs) et pourraient ainsi participer au maintien de la tolérance périphérique aux Ag alimentaires et aux bactéries de la flore commensale[33]. De nombreuses DCs sont donc retrouvées dans le dôme sous-épithélial et dans les régions folliculaires. En revanche, très peu sont représentées dans l'épithélium, bien que l'émission de dendrites entre une monocouche de cellules épithéliales puisse leur permettre de capturer des Ag de la lumière intestinale[34].

Les PPs ainsi que les MLNs sont donc les principales sources de plasmocytes à IgA au niveau de l'intestin et la différenciation de ces cellules a lieu durant la migration entre les différents sites effecteurs. Ainsi, au niveau des PPs, le pourcentage de plasmocytes sécréteurs d'IgA n'est que de 2 % et de 50 % dans les MLNs, 75 % dans le canal lymphatique thoracique et de 90 % dans la LP, site terminal de maturation des plasmocytes[35].

Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses de l'intestin comporte aussi des follicules lymphoïdes isolés (ILFs) en plus des PPs. Les ILFs sont des tissus lymphoïdes tertiaires induits par la flore à partir d'amas de cellules inductrices de tissus lymphoïdes appelés cryptoplaques[36]. Tout comme les PPs, le rôle des ILFs est de maintenir l'homéostasie intestinale *via* la production d'IgA sécrétoires. Nous parlerons plus particulièrement des PPs qui siègent au niveau de la *lamina propria* de la muqueuse, partie terminale de l'iléon.

Certains tissus muqueux, tels que la muqueuse vaginale, ne possèdent pas de MALT organisé local, mais sont liés à des ganglions drainants situés au niveau de l'aine : les ganglions inguinaux[3].

1.2.2. Les tissus lymphoïdes diffus associés aux muqueuses (sites effecteurs)

Les tissus lymphoïdes diffus regroupent les cellules mononucléées de la LP (LPMC) ainsi que les lymphocytes intra-épithéliaux (IELs).

Au niveau des deux autres grands territoires muqueux (respiratoire et uro-génital), les tissus lymphoïdes diffus tapissent de façon plus ou moins dense la LP sous-épithéliale. On parlera de BALT (Bronchus-Associated Lymphoid Tissue) et de VALT (Vulvovaginal-Associated Lymphoid Tissue).

La LP est une couche de tissu conjonctif située entre l'épithélium et le tissu musculaire muqueux. Elle est constituée de cellules musculaires lisses, de fibroblastes et de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Au niveau de l'intestin grêle et du gros intestin (chez l'humain adulte), la LP est parsemée de cellules myéloïdes et lymphoïdes. Des LT, LB, des macrophages, des DCs, des neutrophiles (et autres granulocytes), ainsi que des mastocytes y sont retrouvés[37]. La présence importante de macrophages et de DCs dans la LP facilite la présentation des Ags ayant traversé l'épithélium, aux LT $CD4^+$. Dans un intestin normal, environ 80 % des plasmocytes sont sécréteurs d'IgA[38].

Les IELs représentent l'autre composante majeure des MALT diffus et sont localisés au-dessus de la lame basale, au niveau de la couche épithéliale. Ils sont séparés des entérocytes adjacents par un espace de 10 à 20 nm et n'établissent pas de structure de jonctions[39].

Ces IELs possèdent des fonctionnalités variées, anti-tumorales, natural killer (NK) ou CTL. Presque tous les IELs sont $CD3^+$ et parmi ces cellules, seul 5 à 15 % expriment le CD4 (helper) le reste étant $CD8^+$ (cytotoxiques)[40]. Les IELs ont pour première fonction de limiter la dissémination des agents pathogènes et des cellules malignes ainsi que le contrôle de l'infiltration des cellules systémiques au niveau des surfaces épithéliales. Le micro-environnement des IELs va influencer leur différenciation et donc leur fonction pouvant aller d'une activité cytotoxique à la régulation du renouvellement de l'épithélium muqueux et à la tolérance[41]. Presque tous les IELs présentent à leur surface l'intégrine αEβ7 qui contribue à la rétention des LT dans l'épithélium ainsi qu'aux phénomènes de « homing » des cellules effectrices[42] (voir partie 1.2.3.).

Un type particulier d'IELs, les IELs gamma-delta (IELγδ), sont des acteurs essentiels de l'homéostasie entre l'hôte et sa flore commensale intestinale en produisant des facteurs antimicrobiens grâce notamment à un « cross-talk » avec les cellules épithéliales voisines[43].

Contrairement aux MALT organisés, ces structures ne semblent pas se développer de manière prénatale[11] et leur développement dépendra de l'induction par des stimuli exogènes. Par exemple, le BALT n'est généralement pas retrouvé au niveau des poumons d'un adulte sain[44].

1.2.3. Coopération entre sites inducteurs et effecteurs : mécanistique de la prise en charge de l'antigène à la réponse immunitaire

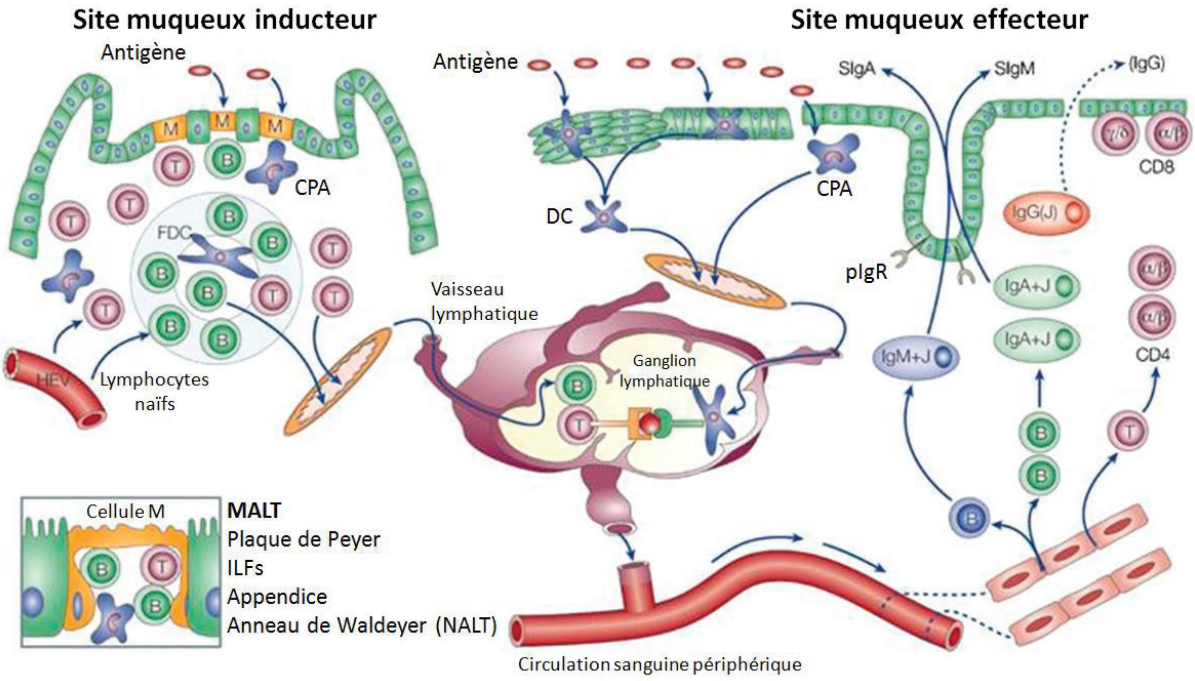


Figure 1.5 - Description du système immunitaire muqueux humain et coopération entre sites inducteurs et effecteurs (adapté de Brandtzaeg *et al.*[7]). Les sites inducteurs des MALT sont constitués d'un épithélium associé aux follicules comportant des cellules M, des follicules riches en LB sécréteurs d'IgA et entourés d'une zone para-folliculaire riche en LT. Les ganglions lymphatiques mésentériques assurent le drainage de la muqueuse. De nombreux lymphocytes circulants sont localisés dans la *lamina propria* où ils peuvent s'insérer entre les cellules épithéliales. La *lamina propria* est un site effecteur de la réponse immunitaire muqueuse.

De nombreux travaux ont démontré que les réponses immunitaires muqueuses étaient généralement compartimentées, non seulement entre les différents organes muqueux, mais aussi au sein d'un même organe/système, par exemple le duodénum et le rectum[31, 45].

Les sites inducteurs de la réponse immunitaire muqueuse sont donc constitués de MALT avec des follicules B et des cellules M au travers desquelles les Ags exogènes sont transportés afin d'être mis en contact avec les CPAs (DCs, macrophages, LB et FDCs). Il est aussi possible pour les DCs (intra- ou subépithéliales) quiescentes de capturer les Ags par émission de pseudopodes dans la lumière de l'appareil qu'elles tapissent[34]. Une fois activées, les DCs ainsi que les LT et LB (mémoire/effecteurs) vont migrer, *via* les vaisseaux lymphatiques, jusque dans les ganglions drainants. Les DCs se différencieront en CPAs actives, permettant ainsi d'activer les LT qui iront stimuler ou atténuer (LT suppressifs) la réponse immunitaire. Les LB et LT pénètrent dans le

MALT (et les ganglions lymphatiques) *via* les HEVs (High Endothelial Venules)[7]. Après avoir été stimulés et s'être différenciés en cellules mémoires ou effectrices, ils migrent du MALT et des ganglions dans la circulation sanguine périphérique pour rejoindre les sites muqueux effecteurs par extravasation, on parlera de « homing ». Il y a donc une compartimentation distincte pour les LB et les LT qui vont rejoindre préférentiellement la muqueuse d'origine où ils se sont différenciés en cellules effectrices. L'« affinité anatomique » de ces cellules est déterminée par la présence d'intégrines spécifiques - « homing receptors » (α4β7, α4β1) et « chemokine receptors » (CCR9, CCR10) à la surface des lymphocytes muqueux - et de molécules d'adhésion (adressines) présentes au niveau de l'endothélium des différents tissus muqueux et spécifiques de ces derniers (Mucines, ICAM, P-selectines) ainsi que l'expression de chimiokines (cytokines chimioattractantes : CCL25, CCL28) qui diffère d'un tissu muqueux à un autre[46] (Figure 1.6). C'est le cas notamment pour le homing au niveau de l'intestin des plamocytes à IgA et des plasmoblastes ainsi que des LT $CD4^+$ et $CD8^+$ exprimant α4β7 – intégrine spécifique de l'adressine MAdCAM-1 (Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule-1) exprimée spécifiquement au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins de la muqueuse intestinale (HEV)[47]. L'expression de ces intégrines est induite par les DCs muqueuses au niveau des sites inducteurs (PPs et MLN). Cette propriété est spécifique des DCs $CD103^+$ et est directement dépendante de leur capacité à métaboliser la vitamine A car la concentration en acide rétinoïque semble être responsable de l'induction des gènes codant pour l'ALDH1A2 et de l'activité aldéhyde déhydrogénase, qui sont impliqués dans les mécanismes de marquage des lymphocytes[48]. Durant ce processus, les DCs peuvent aussi être influencées par des co-facteurs sécrétés par les cellules épithéliales en réponse à un stimulus (pathogène, vaccin, etc.) pouvant influencer indirectement le homing et la différenciation des LB et des LT. Il n'a pas encore été déterminé comment les cellules épithéliales délivrent l'acide rétinoïque aux DCs dans la LP.

De plus, les chimiokines produites par les cellules épithéliales induisent un chimiotactisme des cellules immunitaires exprimant le récepteur spécifique. Par exemple, CCL28 (mucosa-associated epithelial chemiokine), attire spécifiquement les plasmocytes et plasmoblastes à IgA exprimant le CCR10 ; alors que le CCL25 (abondamment produit au niveau de l'intestin grêle) permet d'attirer spécifiquement les LB et LT exprimant le récepteur CCR9[49]. L'ensemble de ces récepteurs de homing et de chimiokines exprimés spécifiquement à la surface des lymphocytes activés (α4β7, CCR9, CCR10, etc.) ainsi que les adressines et les chimiokines produites au niveau des muqueuses permettent d'expliquer à la fois les phénomènes de ségrégation des réponses immunitaires au niveau muqueux plutôt que systémique ainsi que la dissémination préférentielle au niveau des sites muqueux.

La LP intestinale contient peu de LB mais beaucoup de plasmocytes et de plasmoblastes sécréteurs d'IgA (dimériques) et d'IgM (pentamériques). On retrouve aussi quelques plasmocytes à IgG avec chaîne variable J (rares) et beaucoup de LT (principalement $CD4^+$). Les autres

caractéristiques de la LP sont la génération de SIgA et de SIgM *via* un transport épithélial médié par les récepteurs à Ig polymériques (pIgR) ainsi que par des « fuites » para-cellulaires d'IgG, en faibles quantités, dans la lumière intestinale[50]. On peut aussi observer un transport actif d'IgG médié par le Fc récepteur néonatal (FcRn)[51, 52].

Indépendamment des mécanismes de prise en charge au niveau muqueux, les Ags sont donc transportés vers les ganglions lymphatiques par les DCs ou sont directement capturés par les FAE et délivrés aux CPAs dans les PPs puis présentés aux lymphocytes Tαβ $CD4^+$ et $CD8^+$. Il semblerait aussi que certains Ags puissent être directement présentés par les cellules épithéliales aux LT situés près de la surface du tissu[53].

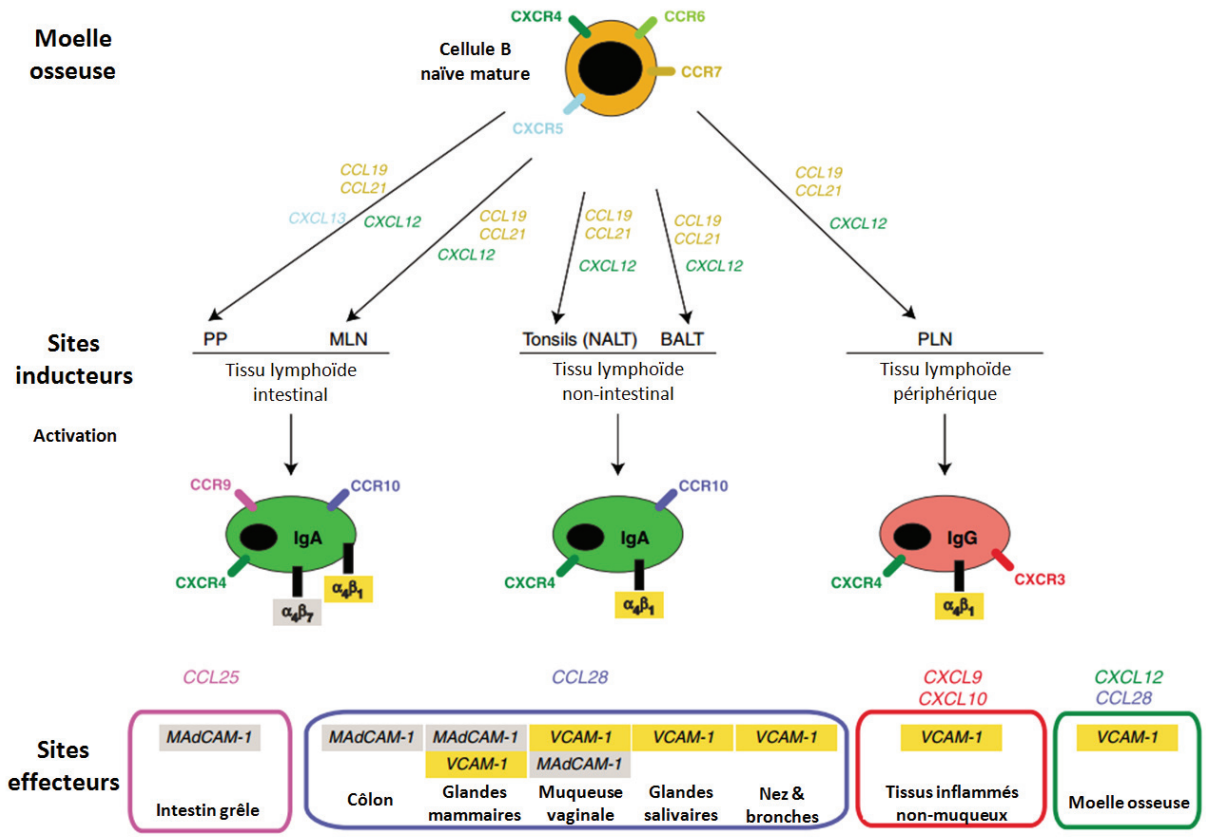


Figure 1.6 – Homing des LB au niveau des tissus muqueux et périphériques (adapté de Macpherson *et al.*[54])**.** Le homing est médié par des combinaisons de chimiokines/récepteurs et d'adressines qui vont varier d'un tissu à un autre.

La compartimentation du système immunitaire (muqueux et systémique), est un point important à prendre en compte dans le développement des futurs vaccins capables d'induire des réponses immunitaires efficaces au niveau de ces sites. La voie d'immunisation sera donc un paramètre important à prendre en considération et sera discutée dans la partie suivante.

1.3. VACCINATION & INDUCTION DE REPONSES IMMUNITAIRES MUQUEUSES

La majorité des infections débutent ou affectent les tissus muqueux ; l'élaboration de vaccins inducteurs de réponses immunitaires efficaces au niveau de ces sites est donc un véritable enjeu en vaccinologie.

C'est le cas notamment pour les infections gastro-intestinales causées par *Helicobacter pylori*, *Shigella* spp. ou *Escherichia coli* entérotoxigénique (ECET) ; les infections respiratoires causées par *Mycoplasma pneumoniae* ou le virus respiratoire syncytial (RSV) ainsi que les infections sexuellement transmissibles causées par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhaeae* ou les Herpes Simplex Virus (HSV). Ces infections représentent des défis majeurs dans la mise au point de vaccins pouvant empêcher l'attachement et la colonisation des épithéliums muqueux (bactéries non invasives) ou la pénétration et la réplication dans les tissus muqueux (virus et bactéries invasives).

Les infections intestinales induisant des diarrées très sévères et parfois mortelles sont un problème de santé publique mondial, causant environ 3 milliards d'infections et 3 millions de morts par an dans les pays en voie de développement. Des vaccins efficaces existent aujourd'hui contre trois des principaux pathogènes – *V. cholerae*, *S. typhi* et les rotavirus – alors que des vaccins contre les deux autres grandes causes de maladies, ECET et *Shigella*, ne sont toujours pas disponibles. Les vaccins existant à l'heure actuelle contre le choléra et les rotavirus n'ont prouvé leur efficacité que par voie muqueuse (administration par voie orale), il semblerait donc que cette voie soit particulièrement intéressante[55]. D'un autre côté, il faut considérer le fait que beaucoup de vaccins engendrant des protections efficaces contre un grand nombre d'infections muqueuses sont administrés par voie parentérale (tuberculose, diphtérie, coqueluche, etc.) plutôt que par voie muqueuse, et engendrent tout de même des protections efficaces, spécialement ceux induisant de forts taux d'IgG sériques qui vont traverser l'épithélium muqueux grâce à un transport médié par le récepteur FcRn et sans doute par des mécanismes de transsudation[52].

Le choix de la voie d'immunisation se fera donc en fonction de la formulation vaccinale (vivant-atténué, inactivé, sous-unitaire) mais surtout du type d'infection que l'on veut combattre : une vaccination par voie muqueuse semble en effet être cruciale pour développer une protection efficace contre les infections non invasives au niveau des surfaces muqueuses qui sont normalement imperméables au passage des Ac sériques. En revanche, pour beaucoup d'infections respiratoires ou urino-génitales, une vaccination parentérale peut être tout aussi efficace.

1.3.1. Par voie parentérale

La majorité des vaccins homologués actuellement pour un usage chez l'Homme, sont essentiellement administrés par voies parentérales (sous-cutanée, intramusculaire ou intradermique). En effet, lorsque les infections se développent au niveau des muqueuses

respiratoires et uro-génitales qui sont plus perméables que l'intestin, à la transsudation des Ac sériques, une vaccination par voie parentérale peut suffir (grippe, tuberculose, papillomavirus, etc.) (Tableau 1.1). De la même manière, une vaccination par voie parentérale peut être efficace dans le cas d'infections par des pathogènes intestinaux qui ne causent l'infection qu'une fois la barrière épithéliale intestinale franchie et infecte le côté basolatéral de l'épithélium (*Shigella* spp.) ou seulement après multiplication dans la muqueuse sous-épithéliale (salmonelles) où les IgG induites au niveau systémique pourront venir agir.

L'une des pathologies les plus représentative de l'efficacité d'une vaccination parentérale (ID) permettant de protéger d'une infection touchant les muqueuses est la tuberculose. *Mycobacterium tuberculosis*, agent étiologique de la tuberculose, est une des principales causes de maladie et de décès chez l'homme (1,4 million de victimes en 2010 selon l'OMS), en particulier dans les pays en développement. Le vaccin préparé à partir du bacille de Calmette-Guérin (BCG) existe depuis 80 ans et est l'un des vaccins les plus largement utilisés actuellement (près de 100 millions d'enfants vaccinés chaque année). Les mécanismes de protection engendrés par le BCG ne sont pas encore très clairs. Il semblerait cependant que les réponses T $CD4^+$ et $CD8^+$ ainsi que l'activation des macrophages par l'IFNγ, jouent un rôle important dans les mécanismes permettant d'éliminer les bacilles intracellulaires[56].

Un autre pathogène nécessitant une vaccination parentérale permettant de protéger d'une infection touchant les muqueuses est le papillomavirus humain (HPV). A l'heure actuelle, deux vaccins anti-HPV sont commercialisés au plan international, le Cervarix® et le Gardasil® (administration intramusculaire). A l'aide des techniques de recombinaison, tous les deux sont préparés à partir de protéines structurales L1 purifiées qui s'auto-assemblent entre elles pour former des enveloppes vides ou des particules de type viral (VLP) spécifiques des différents types d'HPV. Les VLP induisent chez l'homme des titres d'Ac pouvant être 40 fois supérieurs aux titres constatés après une infection naturelle. On considère qu'en générant des taux d'Ac aussi élevés par voie parentérale, il se produit une transsudation prolongée des Ac à partir du sérum vers les muqueuses cervicales, site d'entrée du virus[57]. La concentration en IgG induite étant suffisamment élevée pour lier les particules de virus et les neutraliser. La corrélation précise entre les titres en Ac anti-HPV spécifiques et la protection contre une infection avec une éventuelle évolution vers des lésions intra-épithéliales et le cancer, n'a pas encore été déterminée[58].

Tableau 1.1 - Vaccins homologués à administration parentérale contre les maladies d'origine muqueuse.

Infections	Formules vaccinales	Administrations	Corrélats de protection	Nom commercial (producteur)	Réfs
Anthrax	Surnageants de culture d'anthrax (filtrés) : PA (Protective Antigen)	IM	Ac sériques anti-PA agissant au niveau pulmonaire	BioThrax AVA BioThrax IM	59
Diphtérie	Exotoxine dénaturée	IM	Ac sériques anti-exotoxine agissant au niveau du tractus respiratoire	DT Polio Pentavac	60
Haemophilus influenza de type b	Polysaccharide (PS) de surface	IM	Ac sériques anti-PS inducteurs de la phagocytose et de la mort de la bactérie au niveau muqueux et systémique	Pentavac	61
Hépatite A	Virus entier inactivé	IM	Ac sériques neutralisants	Havrix® (GSK), Avaxim® (Sanofi Pasteur)	62
Papillomavirus	VLP	IM	Ac sériques neutralisants + transsudation vers la muqueuse cervicale	Cervarix® (GSK) Gardasil® (Merck)	58
Grippe (types A & B)	Virus inactivé	IM	Ac sériques neutralisants + transsudation au niveau pulmonaire	Nombreux	63
Rougeole	Virus vivant-atténué	SC	Ac sériques neutralisants et réponse cellulaire	Nombreux	64
Méningocoques	Polysaccharide de capsule seul ou conjugué	IM	Ac sériques anti-PS inducteurs du complément et de phagocytose	Nombreux	65
Pertussis (Coqueluche)	Produits bactériens purifiés	IM	Ac sériques neutralisants	Infanrix quinta	66
Pneumococcus	Polysaccharide de capsule	IM	Ac anti-PS sériques et muqueux	Nombreux	67
Poliomyélite	Virus inactivé	SC/IM	Ac sériques neutralisants	Salk vaccine (IPV)	60
Tuberculose	Bactérie vivante-atténuée	ID	Réponses T $CD4^+$ et $CD8^+$ & macrophages	BCG	56
Typhoïde	Polysaccharide Vi	SC/IM	Réponses cellulaires et humorales au niveau muqueux et systémique	TyphimVi® (Aventis)	68

Malgré l'efficacité indéniable de l'ensemble de ces vaccins parentéraux, certaines maladies peuvent aussi être évitées grâce à de vaccins administrés par voies muqueuses (grippe, polio, etc.), voire uniquement par cette voie (choléra et rotavirus). De plus, les voies muqueuses (spécialement orale et nasale) offrent des avantages en termes de praticité d'administration (notamment lors de larges campagnes de vaccination) et d'acceptabilité par les populations. Ces différentes stratégies sont développées dans la partie suivante.

1.3.2. Par voie muqueuse

Les premières administrations à but prophylactique par voie muqueuse remontent au XI^{ème} siècle. Les chinois pratiquaient en effet la « variolisation » en inoculant une forme - qu'ils espéraient - peu virulente de la maladie (le contenu de la substance suppurante des vésicules d'un malade) par voie nasale à la personne à immuniser. Cependant, le terme de vaccination muqueuse fut

réellement introduit dans les années 50 avec le vaccin polio oral (vivant atténué) développé par Albert Sabin (voir partie 1.3.3.).

Une vaccination par voie muqueuse semble donc cruciale pour développer une protection efficace contre des infections non-invasives au niveau des surfaces muqueuses normalement imperméables au passage des Ac sériques. Aujourd'hui, seules cinq infections à tropisme muqueux peuvent être évitées par des vaccins administrés par voie muqueuse (Tableau 1.2). Les infections gastro-intestinales à *Vibrio cholerae* en sont un exemple où seules les formulations vaccinales délivrées par voie orale sont efficaces. En effet, le vaccin oral induit une protection médiée principalement, si ce n'est exclusivement, par la production locale d'SIgA (dirigées contre la bactérie et sa toxine (CT)) associée à une mémoire immunitaire[69]. Il existe actuellement 2 types de vaccin anticholérique oraux : (1) Dukoral®, ainsi que (2) Shanchol™ et mORCVAX™ [55].

Le plus largement utilisé (Dukoral®), est composé de la sous-unité B recombinante de la toxine cholérique (CTB) et de la bactérie *V. cholerae* O1 inactivée (whole) de différents sérotypes et biotypes, et a prouvé son innocuité, sa stabilité et sa large efficacité dans des essais cliniques réalisés au Bangladesh, au Pérou et au Mozambique, conférant une protection à court-terme (6 mois) de 85 à 90 % et à long-terme (3 ans) de 60 %[70].

Les vaccins anticholériques oraux bivalents Shanchol™ et mORCVAX™, étroitement associés, sont préparés à partir des sérogroupes O1 et O139. Ces vaccins confèrent une protection supérieure à deux ans chez les enfants âgés de moins de 5 ans et ne nécessitent pas de dose de rappel tous les 6 mois[70].

Un vaccin injectable préparé à partir de souches de *V. cholerae* inactivées au phénol est encore fabriqué dans quelques pays mais l'OMS n'en recommande pas l'utilisation, principalement à cause de son efficacité limitée et de sa brève durée de protection[70].

Un autre exemple de vaccins efficaces exclusivement par voie muqueuse est celui contre les rotavirus. Ces derniers (avec les ECET) sont la cause principale de maladies diarrhéiques mortelles chez les jeunes enfants (< 2 ans). Les deux vaccins oraux anti-rotavirus disponibles actuellement sont un vaccin monovalent atténué (RotaRix®, GSK)[71] et un vaccin pentavalent réassorti bovin-humain (RotaTeq®, Merck)[72]. Selon les premières données, il y aurait déjà une baisse de la morbidité et de la mortalité dans de nombreux pays grâce à ces vaccins. Les données en provenance du Mexique en particulier, confirment une diminution sensible de la mortalité par diarrhée dès 2008[73]. Là encore, la production d'SIgA intestinales est probablement le mécanisme principal d'une protection à long-terme, mais ces mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés[72].

Tableau 1.2 - Vaccins homologués à administration muqueuse contre les maladies d'origine muqueuse[55].

Infections	Formule vaccinale	Administration	Corrélats de protection	Nom commercial (producteur)
Poliomyélite	Vivant atténué	Orale	Ac neutralisants systémiques et muqueux	Nombreux (OPV)
Choléra	Sous-unité B de la toxine cholérique + *V. cholerae* O1 inactivé	Orale	SIgA intestinales anti-toxines et anti-bactériennes (LPS) +	Dukoral® (SBL Vaccin)
	Sérogroupes O1 et O139	Orale	Ac sériques anti-bactériens	Shanchol™ et mORCVAX™
Typhoïde	Ty21a vivant atténué	Orale	SIgA muqueuses et réponse cellulaire systémique	Vivotif® (Bern SSVI)
Rotavirus	Rotavirus humain monovalent vivant atténué	Orale	Génération d'Ac neutralisants muqueux et (peut-être) systémiques	RotaRix® (GSK)
	Vaccin vivant pentavalent	Orale		RotaTeq® (Merck)
Grippe	Vivant atténué	Nasal	SIgA et IgG neutralisantes muqueuses	FluMist® (MedImmune)

Le MALT organisé joue donc un rôle primordial dans la prise en charge des Ags et la génération de lymphocytes incluant les plasmocytes à IgA ainsi que les LT et LB mémoire. Malgré les nombreux avantages que semblent procurer la vaccination par voie muqueuse, il perciste des difficultés pratiques pour entraîner de fortes réponses SIgA et des mécanismes de protection lors de l'administration d'Ags par ces voies.

Les difficultés de la vaccination par voie muqueuse

La vaccination par voie muqueuse a donc démontré une certaine efficacité dans le développement de réponses immunitaires protectrices vis-à-vis d'un certain nombre de pathogènes. Cependant, il existe de nombreuses difficultés pour le développement de nouvelles stratégies ciblant des pathogènes pour lesquels aucun vaccin n'est disponible actuellement.

Un des problèmes majeurs est la dilution de la formulation vaccinale et son élimination par les fluides sécrétés au niveau des muqueuses[27]. De plus, le mucus présent a tendance à retenir le vaccin et induire sa dégradation par les nombreuses enzymes protéolytiques qui sont présentes. Les avancées récentes suggèrent que les vaccins muqueux seraient plus efficaces s'ils étaient conçus de manière à mimer les propriétés physico-chimiques des pathogènes à tropisme muqueux, notamment sur des paramètres de taille et de charge[27, 74].

De nombreuses stratégies existent pour la délivrance et la présentation de molécules immunomodulatrices au système immunitaire. Parmi ces stratégies, les plus efficaces pour des immunisations par voies muqueuses nécessiteront de (i) passer les barrières physiologiques au niveau de ces sites, (ii) cibler les CPAs muqueuses afin d'induire une présentation appropriée de l'Ag conduisant à une activation spécifique des réponses immunitaires –T et –B, et (iii) contrôler les cinétiques de prise en charge de l'Ag et de l'adjuvant afin d'induire des réponses immunes mémoires protectrices à long terme. L'un des principaux défis dans le développement de vaccins muqueux est d'augmenter l'immunogénicité sans compromettre l'innocuité de la formulation.

Dans ce but, l'une des plus anciennes approches est de développer des vaccins basés sur des agents infectieux viraux ou bactériens rendus inoffensifs par des procédés d'atténuation ou d'inactivation. Une autre approche consiste à utiliser des vaccins sous-unitaires en utilisant des protéines virales ou bactériennes recombinantes pouvant être rendues suffisamment immunogènes grâce à la co-administration d'adjuvants sans toutefois conduire à des formulations réactogènes. Une troisième approche prometteuse est basée sur des systèmes de délivrance par des particules synthétiques développés afin de mimer les propriétés immunogènes naturelles des pathogènes. Ces différentes approches seront développées dans la partie 2.

Il est aussi important de noter que bien que l'administration de vaccins par voie muqueuse présente des risques moins importants que par voie parentérale, deux vaccins muqueux récemment développés chez l'Homme, le RotaShield (vaccin rotavirus par voie orale) et un vaccin nasal sous-unitaire contre la grippe, adjuvantés tous les deux avec de la LT (non modifiée), ont été retirés du marché, après une courte période de commercialisation, du fait d'effets secondaires importants[55].

L'ensemble de ces points souligne la difficulté de la mise au point de vaccins efficaces et sans aucun danger pour la population.

1.3.3. Par voie parentérale ou muqueuse

Pour certaines pathologies, il existe des formulations vaccinales pouvant être administrées par voie parentérale ou par voie muqueuse. En effet, si l'on prend l'exemple des vaccins injectables contre la grippe et les infections à pneumocoque, leur mécanisme de protection principal est l'induction d'Ac sériques, principalement d'isotype IgG, qui vont empêcher la prolifération systémique du pathogène et aussi, par un mécanisme de transsudation, exercer une protection locale au niveau des surfaces muqueuses du tractus respiratoire. Un vaccin anti-grippe vivant-atténué administré par spray intranasal a cependant fait son apparition sur le marché en 2003, le FluMist®, composé de virus atténués[75]. Ce vaccin permet d'induire une réponse immunitaire se rapprochant davantage de la réponse naturelle que celle induite par voie injectable[76]. Les deux types de réponses, systémique et muqueuse, contribuent à la résistance à l'infection grippale : la production locale d'SIgA dirigées contre les Ags de surface du virus (hémagglutinine et neuraminidase) est très importante pour la protection des voies respiratoires supérieures, et la production d'IgG pour la protection des voies respiratoires inférieures et la virémie. L'immunité à médiation cellulaire, principalement dirigée contre les Ags de matrice et les nucléoprotéines, ne protège pas contre l'infection, mais est importante pour la clairance du virus et la guérison. Il est important de noter que le vaccin nasal induit une production locale d'IgA significativement supérieure à celle du vaccin injectable, ainsi qu'une immunité à médiation cellulaire locale mais des titres en Ac sériques moindre. Malgré ces différences, les deux types de vaccins ont une

efficacité protectrice équivalente (60-90 %), et chez les personnes âgées, leur utilisation combinée augmenterait l'efficacité en comparaison à l'utilisation d'un seul des deux vaccins[77].

Le vaccin polio par voie orale (OPV) est LE vaccin type utilisé par cette voie. En plus de son rôle essentiel sur la réduction de la polio dans le monde, ce vaccin a aussi servi de modèle pour élucider les mécanismes fondamentaux de l'immunité muqueuse chez l'Homme[78]. De la même manière que la version inactivée injectable (IPV), l'OPV induit la production d'Ac sériques qui vont protéger de la myélite infectieuse en prévenant la propagation du virus au niveau du système nerveux. De façon plus efficace que l'IPV, l'OPV induit la production d'SIgA au niveau de la muqueuse intestinale, site d'entrée et de multiplication du poliovirus[79]. En revanche, il y a un risque (faible mais réel) de réversion de la souche virale composant l'OPV, vers une souche neurovirulente, qui a conduit au remplacement de l'OPV par l'IPV dans la plupart des pays industrialisés. Comme l'éradication de la polio est aujourd'hui proche, les inquiétudes se portent sur le maintien de l'utilisation de l'OPV dans les pays en voie de développement après éradication, et comment financer et rendre possible l'utilisation, dans ces pays, de la version injectable plus sûre mais aussi plus coûteuse[80].

La version injectable du vaccin contre la fièvre typhoïde, le vaccin polyosidique Vi est un vaccin sous-unitaire homologué pour la première fois aux Etats-Unis en 1994. Il est constitué du polyoside capsulaire Vi de la souche Ty2 de *S. Typhi* et est administré par voie sous-cutanée ou intramusculaire (une seule dose). Le vaccin polyosidique Vi induit des réponses IgG sériques anti-Vi chez 85 à 95 % des adultes et des enfants âgés de plus de 2 ans. Plus de 50 % de ces enfants avaient encore des concentrations protectrices en Ac 10 ans après la vaccination[81]. L'autre vaccin contre la fièvre typhoïde homologué chez l'Homme est un vaccin vivant-atténué administré par voie orale, le Ty21a, produit par mutation chimique d'une souche pathogène de *S. Typhi* notamment au niveau des gènes responsables de la production du Vi. Trois ans après les essais de terrain à grande échelle menés chez des enfants en Egypte, au Chili et en Indonésie, l'efficacité protectrice contre la fièvre typhoïde confirmée par des hémocultures était de 33 à 67 % pour le Ty21a en gélules ; l'efficacité induite par la formulation liquide actuellement homologuée de ce même vaccin était de 53 à 78 %. Il a été démontré que l'immunisation par voie orale avec le Ty21a induisait des SIgA muqueuses et des IgG sériques dirigées contre le polyoside O. De plus, il a été mis en évidence par Kantele *et al.* que seul le vaccin oral induisait la recirculation de plasmocytes exprimant l'intégrine α4β7 qui favorise le « homing » au niveau de la muqueuse intestinale[82].

1.3.4. Prise en charge et devenir de l'antigène après vaccination muqueuse ou parentérale : corrélation pour le choix de la voie d'immunisation.

Les pathogènes muqueux diffèrent les uns des autres par la façon d'induire leur pathologie. En fonction du pathogène, le vaccin devra être administré par voie topique ou parentérale afin d'induire les réponses immunitaires les plus adaptées à une protection efficace.

Les facteurs principaux expliquant comment la vaccination parentérale peut protéger contre certaines infections muqueuses dépendent à la fois du site d'infection et plus précisément de la perméabilité de la muqueuse aux Ac sériques, à la capacité invasive du pathogène et aux expositions antérieures à l'agent infectieux.

En effet, les tissus muqueux diffèrent les uns des autres notamment par leur perméabilité aux Ac sériques. Le tractus respiratoire inférieur et le tractus génital féminin sont relativement perméables, à l'inverse de l'intestin grêle. En prenant en compte ces facteurs, les vaccins anti-pneumocoques injectables peuvent, en plus de protéger contre les infections systémiques, procurer une protection au niveau pulmonaire *via* la transsudation des Ac sériques anti-polysaccharide de capsule. A l'inverse, les infections à *V. cholerae* et ECET sont des exemples de maladies non-inflammatoires de l'intestin grêle pour lesquelles la protection vaccinale est médiée par la production locale de SIgA et requièrent normalement une administration par voie orale[4].

La vaccination parentérale peut aussi fonctionner au niveau de muqueuses moins perméables contre des pathogènes ayant une forte capacité invasive. C'est le cas pour *Shigella* qui va passer la barrière épithéliale *via* les cellules M des PPs et infecter les entérocytes du côté basolatéral où les bactéries pourront être en contact avec les Ac sériques. De même, les Ac sériques peuvent se retrouver en contact de manière efficace avec des pathogènes causant des maladies après induction d'une inflammation dans les tissus lymphoïdes sous-muqueux (*Salmonellae* spp. et *Campylobacter jejuni*) ou encore de manière plus efficace, après leur entrée dans la circulation sanguine (*S. typhi* et poliovirus).

Une exposition antérieure à un pathogène conduisant à un « priming » muqueux est un autre facteur déterminant. En effet, bien que les anciennes versions des vaccins anticholériques injectables (whole) n'aient jamais induit de fortes immunités capables de perdurer dans le temps, elles peuvent tout de même induire une protection modeste pendant quelques mois chez des sujets vivants dans des zones endémiques[83]. De la même manière, l'IPV protège non seulement contre la paralysie mais aussi permet de réduire la transmission fécale dans les zones endémiques[84]. Ces effets sont expliqués par la capacité de ces vaccins à stimuler des réponses SIgA protectrices au niveau de l'intestin d'individus préalablement exposés de manière naturelle à l'infection[85].

Aux prémices de l'immunologie des muqueuses, il était couramment admis qu'une réponse immunitaire initiée au niveau d'un site muqueux pouvait se développer au niveau d'autres tissus

muqueux. Comme l'existence d'un « système immunitaire muqueux général » était admise, cela signifiait qu'une immunisation par n'importe quelle voie muqueuse, telle que la voie orale, pouvait être utilisée afin d'induire des réponses immunitaires efficaces, non seulement au niveau du tractus gastro-intestinal, mais aussi au niveau des tractus respiratoire et génito-urinaire. De nombreuses études ont démontré par la suite que le système immunitaire muqueux était hautement compartimenté du fait des propriétés migratoires des lymphocytes activés au niveau des différents sites muqueux[86]. Cela impose donc des contraintes dans le choix de la voie d'administration muqueuse.

Des administrations d'Ag par voie rectale, vaginale et plus récemment par voie sublinguale ont été explorées mais seulement dans un but expérimental et chez l'humain principalement pour l'étude des réponses humorales à SIgA. De manière générale, les réponses immunitaires les plus fortes sont obtenues au niveau du site initial d'administration du vaccin et des sites muqueux adjacents. Cependant, quelques exceptions sont à noter, telles que les immunisations par voie nasale et sublinguale avec l'induction de réponses Ac au niveau génital ayant un intérêt certain pour le développement de vaccins muqueux contre des maladies sexuellement transmissibles[86] (Figure 1.7). Nous pouvons aussi prendre l'exemple de sites muqueux anatomiquement distincts mais liés au cours de l'évolution tels que l'intestin et les glandes mammaires, permettant lors de l'allaitement un passage des SIgA spécifiques des pathogènes auxquels la mère a été exposée, au nourrisson, le préparant à de futures expositions.

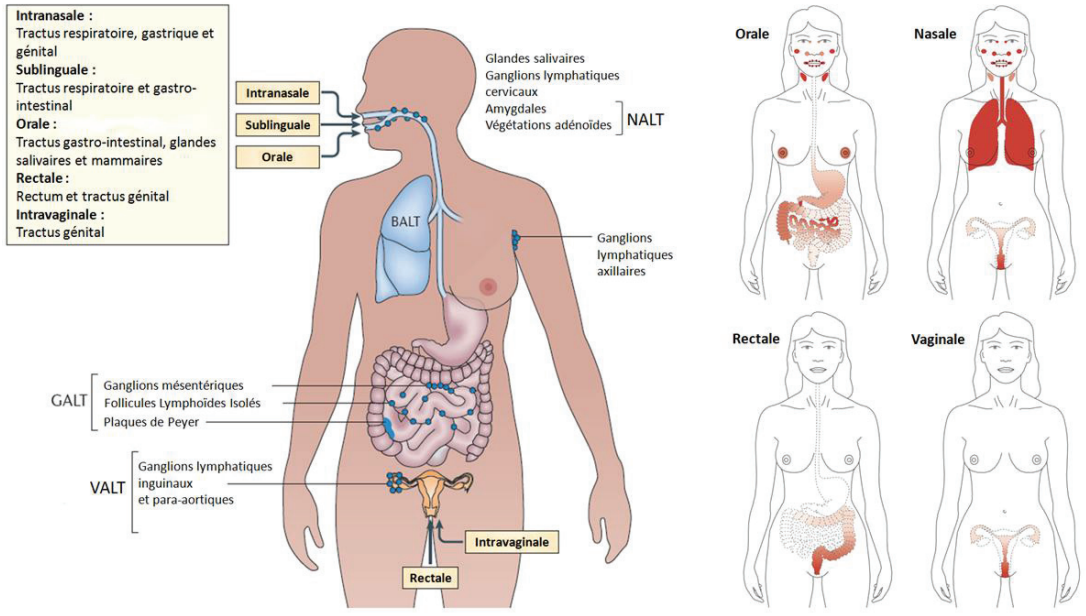


Figure 1.7 - Voies d'immunisations muqueuses et compartimentations des réponses SIgA (adapté de Lycke *et al.* ; Holmgren *et al.*[31, 45]**).** Le système immunitaire muqueux est très compartimenté. Chez l'Homme, des immunisations avec la CTB par différentes voies d'administrations muqueuses ont clairement montré que les réponses les plus fortes étaient obtenues au niveau du site d'administration, les tissus voisins et dans les muqueuses interconnectées. Une exception notable avec l'immunisation par voie nasale stimulant non seulement des réponses immunitaires dans le tractus respiratoire mais aussi au niveau génital.

Les voies traditionnelles de vaccination muqueuse chez l'Homme incluent les voies orale et nasale. Si des Ags appropriés et suffisamment immunogènes sont utilisés par voie orale, seuls ou adjuvantés, ils peuvent induire de fortes réponses Ac au niveau de l'estomac, de l'intestin grêle, du côlon ascendant ainsi qu'au niveau des glandes mammaires et salivaires. La vaccination par voie orale est cependant très peu efficace pour induire des IgA au niveau du rectum, des amygdales, du tractus respiratoire et génital. A l'inverse, l'immunisation par voie rectale induit de fortes réponses Ac locales (rectum et côlon sigmoïde), de plus faibles réponses au niveau du côlon descendant et des réponses minimes, voire nulles, au niveau du côlon ascendant et de l'intestin grêle. L'immunisation par voie nasale, ou au niveau des amygdales chez l'Homme, induit des réponses humorales au niveau du tractus respiratoire supérieur et dans les sécrétions (salive et sécrétions nasales) sans réponses intestinales. Des immunisations par voie nasale chez l'Homme ont cependant permis d'obtenir des réponses IgA et IgG substantielles au niveau des muqueuses cervico-vaginales. L'intensité des réponses obtenues au niveau de ces muqueuses apparait comparable à celles obtenues par des vaccins administrés par voie vaginale[87] (Figure 1.8).

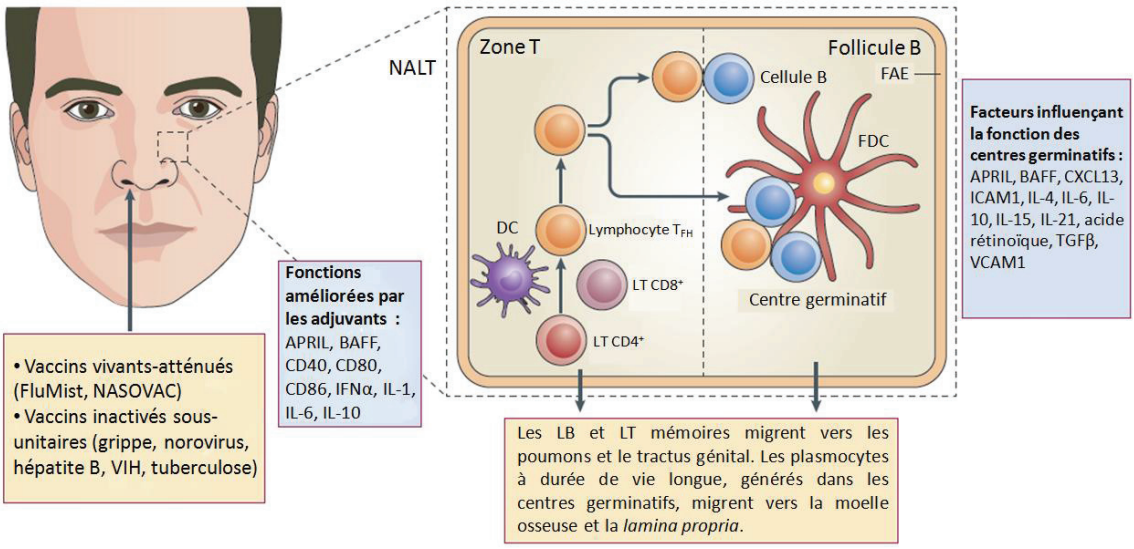


Figure 1.8 - La vaccination intranasale induit des réponses immunitaires au niveau du NALT et du tractus génital (adapté de Lyck *et al.*[45]) . Les Ags sont pris en charge au niveau du FAE recouvrant le NALT où les DCs vont ensuite activer les LT $CD4^+$ et $CD8^+$ naïfs. Les LT et LB mémoire vont ensuite migrer vers les ganglions lymphatiques drainants, les poumons et le tractus génital.

Outre les différences anatomiques d'induction des réponses SIgA entre les voies orale et nasale, la cinétique de mise en place de la réponse varie elle aussi. De nombreuses études ont montré que l'induction d'une réponse immunitaire intestinale après immunisation par voie orale était rapide, de courte durée mais souvent associée à une mémoire immunitaire sur le long terme[88]. Les données sur la vaccination anticholérique par voie orale ont montré que les IgA induites disparaissaient entre 6 et 9 mois après vaccination, la protection étant cependant efficace plusieurs années. La protection serait donc due à la réactivation rapide des cellules-B mémoire à IgA. Chez l'Homme et la souris, il a été démontré que la réponse IgA par les cellules mémoire

suite à un challenge muqueux était très rapide, en quelques jours. Cela a été documenté lors de rappels par voie orale chez des sujets déjà vaccinés contre le choléra qui ont montré de fortes réponses à IgA au niveau du duodénum, avec un pic après une semaine et une redescente sur une période de 5 mois[89]. Ces données sont en accord avec la notion décrivant que la mémoire immunitaire après vaccination par voie orale chez l'humain peut durer jusqu'à 5 ans.

Cependant, bien que la voie nasale soit une voie d'immunisation attractive, il semblerait exister des risques de passage de la formulation vaccinale vers le cerveau *via* le nerf olfactif pouvant induire d'importants effets secondaires[90].

Du fait de l'efficacité limitée de la vaccination par voie orale pour induire des réponses IgA au niveau d'autres muqueuses que le tractus gastro-intestinal, des voies alternatives ont été explorées. Le potentiel de la voie sublinguale pour l'administration de vaccins gagne de plus en plus d'intérêt au sein de la communauté scientifique. Cela vient du fait que des études récentes ont montré que cette voie pouvait induire des réponses immunitaires non seulement de forte amplitude mais aussi disséminées au niveau de différents sites muqueux et systémiques[91]. Ces études ont en effet montré que l'administration sublinguale d'Ag solubles et vectorisés, incluant des bactéries et des virus inactivés ou vivants-atténués, pouvait induire un large spectre de réponses immunitaires muqueuses et extra-muqueuses allant de la production d'SIgA et d'IgG systémiques, à des réponses CTL[92]. De plus, principalement étudiée chez la souris, la voie sublinguale semble nécessiter 10 à 50 fois moins d'Ag que la voie orale. L'immunisation par voie sublinguale induit de fortes réponses immunitaires protectrices au niveau des poumons chez la souris comme cela a été démontré avec des vaccins grippaux inactivés ou atténués[93]. De la même manière que la voie intra-nasale, la voie sublinguale semble stimuler de manière efficace des réponses IgA et IgG spécifiques ainsi que des réponses CTL au niveau génital[91]. De plus, il a été démontré que la vaccination sublinguale avec des VLP de HPV procurait une protection contre des infections génitales à HPV[94]. Des immunisations chez la souris par cette voie avec des vaccins expérimentaux *H. pylori* ou ECET et *V. cholerae* (Whole) administrés ensemble et adjuvantés avec de la CT, induisent des réponses -B et -T au niveau de l'estomac et de l'intestin (respectivement), résultant en une protection efficace contre des challenges infectieux[95, 96].

1.3.5. Stratégies vaccinales à l'étude pour l'induction de réponses immunitaires muqueuses

Aujourd'hui, nous avons des données précises à propos des signaux nécessaires pour stimuler une réponse immunitaire adaptative. Cela implique la stimulation progressive des LT naïfs par la reconnaissance du peptide antigénique grâce aux molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et de manière plus complexe, l'implication de signaux secondaires induits par des cytokines et des molécules de co-stimulation présentes à la surface des CPAs. Des molécules de co-stimulation telles que CD40, CD80, CD86 et OX40L ont été démontrées comme

primordiales pour conduire à une réponse adaptative T-dépendante. Le lien entre la réponse innée et adaptative est la clé pour comprendre comment mettre au point des vaccins muqueux efficaces. Il faut noter que bien que nous possédions beaucoup de données concernant l'induction et le maintien d'une réponse immunitaire (systémique et/ou muqueuse) chez l'animal, il reste encore un sérieux manque de données complémentaires sur les mécanismes concernant les vaccins homologués, qu'ils soient administrés par voie muqueuse ou parentérale, mais qui ont cependant fait leurs preuves en matière de protection contre des pathogènes touchant les surfaces muqueuses.

L'ensemble des stratégies vaccinales par voies muqueuses a été décrit dans une revue que nous avons publiée dans le journal *Vaccine* en janvier 2012[55] (cf. annexe).

1.3.6. Immunité vs Tolérance : le Yin et le Yang de la vaccination muqueuse

Bien que le but d'une vaccination muqueuse est d'induire une immunité protectrice, dans la plupart des modèles animaux, la plus grande partie des Ags étrangers rencontrés au niveau des surfaces muqueuses ne génère aucune réponse immunitaire, c'est ce que l'on appelle communément le phénomène de tolérance[97]. Classiquement, l'administration orale de protéines solubles n'induit aucune réponse immunitaire suite à un challenge systémique avec la même protéine[97]. Ce mécanisme de tolérance n'est pas seulement observé au niveau de la muqueuse gastro-intestinale car la plupart des surfaces muqueuses possède ce mécanisme par défaut. Ce phénomène touche à la fois les réponses -T et -B. Parfois, ce phénomène peut être partiel avec par exemple une réponse -T coexistant avec une tolérance -B.

Bien que l'administration par voie orale d'Ags puisse induire à la fois des IgA muqueuses ainsi qu'une tolérance systémique, dans la plupart des études, une forte réponse IgA requière de contourner les mécanismes de tolérance. Cela est rendu possible lorsque des pathogènes colonisent et/ou envahissent les surfaces muqueuses car ils induisent des « signaux de danger » qui sont reconnus spécifiquement par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptors : PRRs), conduisant à des réponses humorales (IgA principalement) et T helper (Th) $CD4^+$ qui vont ainsi contourner la tolérance. Il est clairement admis que les vaccins vivant-atténués et inactivés (whole) possèdent une meilleure capacité à induire des réponses immunitaires du fait de l'expression intrinsèque de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs)[98]. Les vaccins à base de peptides synthétiques/recombinants ou d'ADN ne possédant pas « naturellement » ces motifs, des stratégies prometteuses portent sur l'incorporation d'un ou plusieurs PAMPs dans ces formulations afin de mimer ces « signaux danger » retrouvés lors d'une infection naturelle, et de cette manière, contourner la tolérance et augmenter l'immunogénicité de l'Ag.

Le mécanisme dominant dans ce phénomène de tolérance est l'induction de LT régulateurs (T_{reg}) à la suite de l'exposition d'une muqueuse à un Ag. Par exemple, les T_{reg} sont capables de réduire

les réponses Th1 ou Th17 et de limiter la production d'IFNγ et d'IL-17, permettant de prévenir des dommages tissulaires[99]. Les T_{reg} expriment le facteur de transcription Foxp3, et produisent du TGFβ ou de l'IL-10, qui inhibent les LT effecteurs[100]. La modulation de la fonction de ces T_{reg} pourrait être aussi une voie prometteuse de recherche pour le développement de futurs adjuvants vaccinaux. Par exemple, bloquer le développement des LT $Foxp3^+$ pourrait être une stratégie efficace pour augmenter la stimulation des LT et la production d'Ac, comme cela a pu être démontré dans l'étude de certains vaccins anti-cancer[101]. Pour le moment, très peu de stratégies vaccinales ont incorporé des molécules permettant de moduler les réponses T_{reg} afin d'induire de réponses immunitaires systémiques, et encore moins muqueuses.

Classiquement, l'induction d'une tolérance, muqueuse ou systémique, dépend de la dose et du temps de délivrance de l'Ag. La délivrance progressive de faibles doses peut sembler intéressante pour des composés pharmacologiques, mais pour des Ag vaccinaux, le relargage lent peut entrainer une perte du bénéfice de l'activité adjuvante et ainsi induire une tolérance. A l'inverse, une délivrance rapide d'une forte dose d'Ag pourrait permettre de contourner cette tolérance. La mise au point de formulations vaccinales permettant de contrôler ces paramètres doit donc être une priorité.

Dans le passé, des protocoles d'immunisations induisant des réponses humorales et T_{reg} ont été utilisés afin de développer des réponses Ac protectrices notamment contre le poliovirus ou encore contre l'influenza. Des approches similaires peuvent être utilisées afin de diminuer les réponses inflammatoires systémiques et muqueuses dans des troubles tels que l'asthme ou la polyarthrite rhumatoïde, mais peuvent s'avérer être des obstacles pour la vaccination par voie muqueuse. Dans de tels cas, une approche combinant des vaccinations muqueuse et systémique ou ciblant des cellules avec des fonctions régulatrices moins importantes, mais une capacité à développer une activité Th1 ou CTL, telles que les neutrophiles et les cellules phagocytaires $CD14^+CD33^+$ de la LP, pourraient s'avérer efficaces[102].

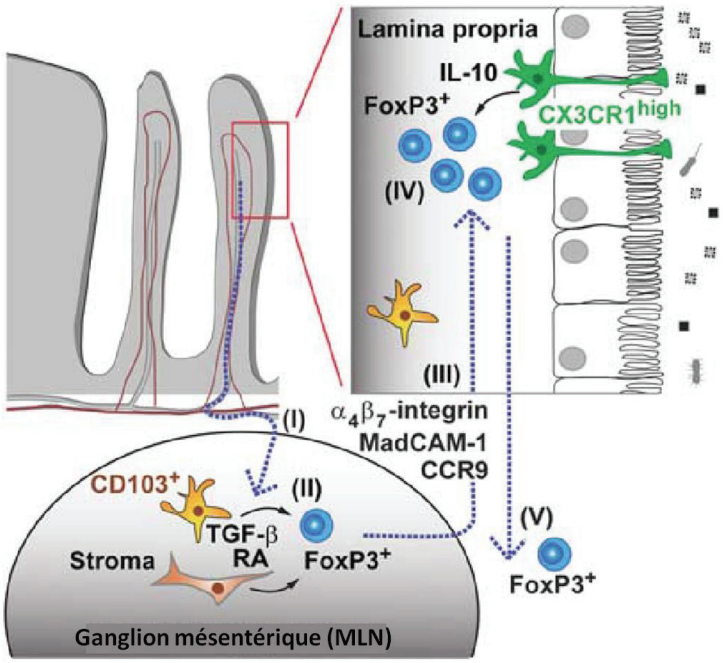


Figure 1.9 – Modèle des mécanismes de tolérance orale[103]. La tolérance est initiée par la migration des DC CD103$^+$ chargées avec l'Ag depuis la LP jusqu'aux MLN (I). Dans le MLN, le RA produit par les DCs et les cellules stromales induit l'expression d'α4β7 et de CCR9 par les LT et favorise la différenciation (TGFβ) de T_{reg} Foxp3$^+$ (II). Ces derniers migrent vers la LP (III) où ils vont subir une seconde prolifération sous l'effet de l'IL-10 produite par les DCs CX3CR1^{high} (IV). Dans une cinquième étape (V), il est possible que certains T_{reg} sortent de la muqueuse, disséminent dans l'ensemble du système immunitaire et induisent une tolérance systémique.

1.4. CONCLUSIONS

Le nombre de vaccins administrés par voies muqueuses actuellement sur le marché reste limité (Tableau 1.2), mais de nombreux autres sont à l'étude et certains déjà en phases d'essais cliniques. Il faut cependant garder à l'esprit que depuis l'OPV, il y a eu très peu de succès dans les 50 années qui ont suivi. Cela est en partie dû à un manque d'adjuvants muqueux sûrs qui permettraient de rendre plus efficaces des vaccins non-vivants, et au fait que de nombreux vaccins vivants-atténués sont instables génétiquement ou bien insuffisamment ou trop atténués. De nombreux vaccins muqueux sont actuellement en cours d'évaluation dans divers essais cliniques, incluant des alternatives aux vaccins actuellement homologués ou contre des maladies à tropisme muqueux ne bénéficiant pas encore de vaccin efficace comme par exemple ECET et la shigellose. Cependant, le développement de vaccins muqueux, spécialement sous-unitaires, nécessitera l'amélioration des systèmes de délivrance ainsi que des adjuvants efficaces. De nombreuses recherches chez l'animal et chez l'Homme sont actuellement en cours afin d'identifier des adjuvants plus efficaces et analyser les différentes voies d'administration, les doses d'Ag et les formulations[86]. Malgré tout, ces dernières années, des vaccins muqueux vivant-atténués contre la grippe, les rotavirus et la fièvre typhoïde ont été produits et des vaccins parentéraux contre les HPV ont aussi connu un grand succès. Un vaccin inactivé oral contre le choléra a apporté la preuve que des vaccins muqueux non-vivants peuvent être très efficaces. Les raisons pour lesquelles ce vaccin est efficace, alors que d'autres formulations non-vivantes ne le sont pas, ne

sont pas encore élucidées. Aujourd'hui, nous faisons aussi face à un certain nombre de problèmes : pourquoi certains candidats vaccins ont été démontrés comme hautement efficaces sur des modèles animaux et très peu d'entre eux ont pu conférer une protection chez l'Homme ? De plus, certains facteurs restent encore à prendre en compte afin de développer des vaccins efficaces dans toute la population, tels que les différences au niveau de la flore intestinale, la nutrition ainsi que les pré-expositions à d'autres pathogènes. L'ensemble de ces facteurs doit encore être défini plus en détails. De nombreux vaccins ont démontré une efficacité moindre dans les pays en voie de développement en comparaison avec les pays industrialisés. Mieux comprendre l'origine de ces différences et trouver des moyens de les contourner est aujourd'hui un challenge important.

Malgré tout, la perspective de la mise au point de nouveaux vaccins inducteurs de réponses muqueuses semble aujourd'hui plus claire du fait que les mécanismes capables d'initier des réponses muqueuses commencent à être mieux compris. En se basant sur les nouvelles connaissances sur l'activation de réponses immunitaires innées au niveau des sites muqueux et une meilleure compréhension de la mise en place des réponses IgA et de la mémoire immunitaire à long-terme, nous devrions voir apparaître de nouveaux vaccins muqueux efficaces dans les années à venir. Dans cette optique, le choix de l'adjuvant semble être primordial afin de potentialiser et/ou d'orienter des réponses immunitaires au niveau des sites muqueux désirés. Cet aspect est développé dans la partie 2.

2. ADJUVANTS PARTICULAIRES ET MOLECULES IMMUNOSTIMULANTES

De nombreux vaccins contre des maladies à tropisme muqueux sont élaborés à partir de pathogènes vivants-atténués (rougeole, tuberculose, rotavirus, etc.). Leur administration induit une légère infection, le plus souvent asymptomatique, qui génère une immunité similaire à celle observée chez les individus ayant développé l'infection naturelle. Cependant, pour beaucoup de pathogènes, des vaccins vivants-atténués n'ont pas pu être développés. Pour vacciner contre ces micro-organismes, des vaccins inactivés sont utilisés, allant du pathogène entier « whole » à des Ags sous-unitaires recombinants ou purifiés (grippe, coqueluche, hépatite A, etc.).

Ces vaccins sous-unitaires recombinants ou purifiés, sont souvent peu immunogènes et requièrent d'être supplémentés afin de stimuler, d'activer, de prolonger, de renforcer et/ou de moduler la réponse immunitaire au niveau cellulaire et/ou humoral, sans que cette substance n'ait par elle-même d'effet antigénique. Ces composés additionnels sont appelés adjuvants immunologiques, et procurent l' « aide » nécessaire à la potentialisation de la réponse immunitaire vis-à-vis de l'Ag vaccinal qu'ils accompagnent.

Les mécanismes par lesquels les adjuvants assurent leurs effets incluent la génération de dépôts des Ags, une augmentation de la présentation des Ags vaccinaux par activation des APCs et l'induction de molécules co-stimulatrices, afin d'aider et d'orienter la réponse immunitaire. Ces dix dernières années, de nombreux récepteurs et voies de signalisation de la réponse immunitaire innée ont été décrits et démontrés comme influençant de manière importante la réponse immunitaire adaptative et sont donc très souvent ciblés par ces molécules. Le système immunitaire est en effet capable de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes, appelés PAMPs, grâce aux PRRs tels que les Toll-like récepteurs (TLRs), les Nod-like récepteurs (NLRs) ou encore les RIG-I-like récepteurs (RLRs)[104]. Les premières générations de vaccins mis au point incluent les virus et les bactéries atténués ou inactivés, possèdant une activité adjuvante intrinsèque du fait qu'ils contiennent des molécules capables de se fixer à ces récepteurs (Figure 2.1). Le fait que des composants de la paroi bactérienne, les ADN bactériens et les ARN viraux soient capables d'activer différents PRRs, les ligands des PRRs ont été utilisés dans des vaccins pendant des décennies sans être connus.

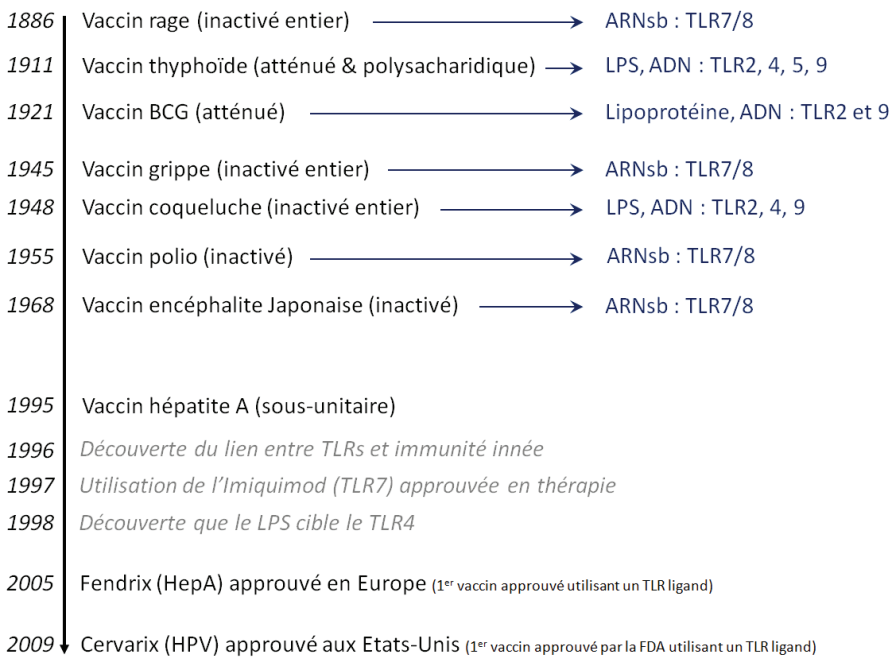


Figure 2.1 - Développement des premières générations de vaccins possédant intrinsèquement des ligands TLRs et implication dans le développement de nouvelles approches.

Les adjuvants sont de plus en plus utilisés aussi bien chez l'Homme que chez l'animal, et ont été pour la plupart développés de façon empirique sans réelle compréhension des mécanismes d'action aux niveaux cellulaire et moléculaire. De récentes études suggèrent que la plupart, voire la totalité, des adjuvants améliorent les réponses cellulaires -T et -B en agissant sur des composants de l'immunité innée plutôt que sur les lymphocytes directement[105].

Comme décrit dans la première partie de la thèse, la majorité des infections débutent ou affectent les tissus muqueux ; l'élaboration de vaccins inducteurs de réponses immunitaires efficaces au niveau de ces sites est donc primordiale. L'un des aspects les plus importants de la réponse immunitaire au niveau des surfaces muqueuses est la production d'IgA dimériques qui sont transportées à travers l'épithélium et relarguées sous forme d'IgA sécrétoires (SIgA)[106]. Cette réponse SIgA représentant la première ligne de défense contre les invasions virales et bactériennes, les études les plus récentes se concentrent sur le développement de vaccins capables d'induire de tels Ac au niveau des tissus muqueux. Le défit majeur est donc de réussir à déclencher ce type de réponse par vaccination systémique ou directement par voie muqueuse. Pour ce faire, l'utilisation d'adjuvants efficaces et capables de cibler ces compartiments et d'orienter la réponse immune est primordiale.

Les adjuvants immunologiques peuvent être classés en fonction de leur composition, de leurs propriétés physicochimiques ou encore de leurs mécanismes d'action. Deux classes d'adjuvants sont retrouvées dans les vaccins modernes : les systèmes de délivrance et les molécules immunostimulantes. Dans cette partie, nous nous intéresserons uniquement aux adjuvants inducteurs de réponses muqueuses.

2.1. ADJUVANTS PARTICULAIRES

Les véhicules de vaccination, qui vont permettre de présenter les Ags vaccinaux de manière optimale au système immunitaire, incluent les « systèmes de relargage contrôlé » et les « systèmes de délivrance par dépôt » afin de potentialiser la réponse immunitaire dirigée contre l'Ag vectorisé. Ces systèmes de délivrance regroupent les sels minéraux, les émulsions, les liposomes, les VLP, les virosomes, les complexes immunostimulants (ISCOMs), les vecteurs recombinants, les particules de phosphate de calcium et les particules de polymères.

2.1.1. L'Alum

Les adjuvants à base de sel d'aluminium, référencés sous le nom d'« Alum », sont retrouvés dans de nombreux vaccins homologués chez l'Homme, incluant des pathologies à tropisme muqueux : diphtérie, coqueluche, le vaccin polio inactivé (IPV), ou encore le papillomavirus humain (HPV). La formulation est réalisée par adsorption de l'Ag à la surface des particules d'aluminium hautement chargées. Les mécanismes d'actions les plus fréquemment cités sont : (i) la formation d'un dépôt permettant un relargage continu de l'Ag ; (ii) une structure particulaire facilitant la phagocytose de l'Ag par les CPAs telles que les cellules dendritiques (DCs), les macrophages et les LB ; (iii) l'induction d'une inflammation résultant du recrutement et de l'activation des macrophages, des monocytes et des polynucléaires neutrophiles (PNN) ainsi que l'augmentation de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) et des molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) à la surface des CPAs améliorant la présentation antigénique dans les tissus lymphoïdes secondaires[107, 108]. L'Alum est prioritairement utilisé afin de potentialiser la réponse Ac sans passer par la stimulation des récepteurs Toll (TLR) *in vivo*[109]. Chez l'Homme, les réponses obtenues avec une protéine combinée à l'Alum, sont de types Th1 et/ou Th2[110] ; cependant, chez la souris, l'Alum induit des réponses immunitaires fortement polarisées Th2. Des études *in vitro* utilisant des macrophages et des DCs ont démontré qu'à la suite d'une stimulation avec du lipopolysaccharide (LPS), l'Alum peut activer l'inflammasome contenant NLRP3, entraînant la production d'IL-1β[111].

Malgré les données démontrant une activation de l'inflammasome par l'Alum, il y a de nombreuses controverses autour de cette voie d'activation dans le rôle adjuvant de l'Alum *in vivo*[112]. Ces conflits peuvent être liés à des différences au niveau des protocoles de formulation ou d'immunisation utilisés par les différents laboratoires. Si l'induction d'IL-1β et d'IL-8 par l'activation de l'inflammasome-caspase-1 (jouant un rôle dans la polarisation Th2 par l'Alum chez la souris) n'est pas clair, l'induction de cytokines tel que l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-25 par l'Alum a été proposée comme une alternative pour expliquer la forte orientation Th2 observée chez la souris[105].

Les avantages des adjuvants à base d'aluminium incluent (i) une augmentation de la réponse Ac (plus rapide, titres plus importants et qui perdurent dans le temps), (ii) une stabilisation de l'Ag

ainsi (iii) qu'une formulation relativement simple permettant une production à grande échelle. Les limites de l'utilisation de cet adjuvant incluent leur inefficacité à induire une réponse cellulaire Th1 ou cytotoxique, qui est indispensable pour contrôler la plupart des pathogènes intracellulaires[107]. De plus, les vaccins contenant de l'Alum ne peuvent pas être congelés avec le risque de perdre les propriétés immunologiques de cet adjuvant[113]. L'Alum peut enfin induire des granulomes au niveau du site d'injection dans le cas des vaccins nécessitant plusieurs rappels.

Les adjuvants à base de sel d'aluminium semblent donc être de très bons inducteurs de réponses protectrices muqueuses après délivrance par voie parentérale (vaccins HPV, IPV, etc.) mais restent inefficaces lorsqu'ils sont administrés par voie muqueuse[114].

2.1.2. Emulsions d'huiles dans l'eau : MF59® et AS03

MF59® (Novartis) et AS03 (GlaxoSmithKline) sont deux adjuvants utilisés dans des vaccins ciblant une des pathologies à tropisme muqueux la plus répandue, la grippe. Ces deux adjuvants ont été approuvés pour une utilisation par voie parentérale (intramusculaire) dans des vaccins contre la grippe pandémique (Focetria®, Pandemrix® et Prepandrix®) et le MF59® a été homologué en Europe pour l'utilisation dans les vaccins contre la grippe saisonnière pour les personnes âgées (Fluad®).

Le MF59® et l'AS03 sont définis comme des nano-émulsions (gouttelettes < 250 nm) d'huile dans l'eau basées sur le squalène, une huile métabolisée de manière plus aisée que l'huile de paraffine utilisée dans l'adjuvant de Freund (utilisation vétérinaire uniquement). Ces émulsions stimulent fortement la réponse Ac, permettant de diminuer la dose d'Ag administrée et générant une réponse mémoire de qualité de type Th1-Th2[115]. Le mécanisme d'adjuvanticité du MF59® semble être directement lié à la stimulation cytokinique induisant des stimuli locaux, le recrutement des DCs, des granulocytes et la différenciation des monocytes en DCs ainsi qu'une amélioration de la prise en charge des Ags par ces dernières[116]. Il a été démontré récemment que le MF59® permettait d'amplifier la réponse à un vaccin grippal sous-unitaire par l'intermédiaire de mécanismes indépendants des IFNs de type I[117]. De manière générale, l'ensemble des études menées semble indiquer une parfaite innocuité et un effet adjuvant du MF59, chez l'Homme, bien établi.

Même si la grande majorité de ces études a permis évaluer l'effet adjuvant du MF59® délivré par voie parentérale, une autre étude s'est intéressée à la délivrance par voie muqueuse nasale dans le cadre d'essais d'un vaccin grippal. Le vaccin a été très bien toléré indiquant qu'une réponse muqueuse peut être générée par voie nasale, mais la réponse humorale n'a pas été augmentée par le MF59® en comparaison avec le vaccin non adjuvanté[118].

Le MF59® est donc un adjuvant puissant permettant l'induction de réponses muqueuses, mais son efficacité semble limitée à une administration parentérale induisant de fortes réponses au niveau des muqueuses du tractus respiratoire.

2.1.3. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques composées d'une bicouche lipidique qui entoure un cœur aqueux, dont la taille varie entre 50 nm et plusieurs microns. Historiquement, Gregoriadis *et al.*[119] les ont conçus pour encapsuler et délivrer des enzymes et des principes actifs avec l'objectif de d'empêcher et de retarder leur dégradation trop rapide, et de pouvoir les transporter dans des sites cibles. Ils peuvent être utilisés en tant que véhicules d'Ag ou en tant qu'immunostimulants. Ils peuvent être associés à des VLP et des IRIVs (détaillés ci-dessous), lorsqu'ils sont constitués de lipides viraux. L'absence de toxicité est certaine lorsque ces liposomes sont produits à partir de phospholipides naturels retrouvés au sein des cellules de mammifères. Cependant, l'utilisation de phospholipides naturels présente des inconvénients certains, avec une sensibilité aux phospholipidases présentes dans notre organisme, une certaine instabilité au stockage sous forme liquide et une difficulté de production à l'échelle industrielle associée à un fort coût de production.

En tant que tels, les liposomes composés de lipides non viraux ne sont pas immunogènes. Ils le deviennent indirectement lorsqu'ils présentent un ligand, un Ag ou un autre lipide immunogène. L'Ag peut être encapsulé dans le cœur aqueux, piégé au sein de la bicouche lipidique ou encore être adsorbé à la surface de la bicouche[120]. Lorsqu'il est encapsulé dans le cœur aqueux, l'Ag est protégé de sa dégradation naturelle dans l'organisme. Les liposomes permettent de réduire les effets secondaires de certains immunostimulants, comme le muramyl dipeptide (MDP), le LPS ou encore le monophosphoryl lipide A (MPL), en les libérant progressivement.

Le pouvoir adjuvant serait dû à un effet dépôt au niveau du site d'injection et à une présentation de l'Ag durable et efficace grâce à sa libération progressive. L'immunité développée, humorale ou cellulaire, serait dépendante de plusieurs facteurs. Le premier est la manière dont est associé l'Ag aux liposomes. Lorsque ce dernier est associé au cœur des liposomes par encapsulation, l'immunité humorale est davantage développée. Lorsque l'Ag est retrouvé à la surface des liposomes, l'immunité cellulaire est alors prédominante[121]. Un second facteur serait la nature du lipide utilisé. En effet, lorsque l'Ag est associé à des lipides de type acide gras insaturé, les titres en IgG, l'incorporation de l'Ag dans les macrophages, la digestion de l'Ag et la production d'IL-2 sont beaucoup plus importants que lorsque l'Ag est associé à des acides gras saturés. Un autre phénomène important est la présentation efficace de l'Ag aux LT $CD4^+$ et $CD8^+$, avec production d'IFNγ par les cellules T $CD8^+$, lorsque des acides gras insaturés sont utilisés. En revanche, avec des acides gras saturés, seule la présentation aux LT $CD4^+$ est efficace, avec une absence de sécrétion d'IFNγ[121]. L'utilisation d'Ag à la surface des liposomes présente plusieurs avantages : une meilleure efficacité de l'association de l'Ag au liposome, une réduction de la production d'IgE allergisantes et une meilleure présentation aux CPA, lorsque sont associés des ligands de type mannose à des lipides inertes[121].

Aux États-Unis, des médicaments formulés à base de liposomes sont déjà sur le marché. En revanche, aucune formulation vaccinale à base de liposomes n'a encore été commercialisée. L'utilisation de formulation à base de VLP, virosome ou ISCOM, détaillées ci-dessous, est préférée pour des raisons de stabilité.

CAF01 est un nouveau système de véhicule basé sur des liposomes formés à l'aide d'un surfactant cationique, le diméthyldioctadécylammonium bromide (DDA) et du tréhalose 6,6-dibéhénate (TDB) (immunostimulant). Cet adjuvant possède une activité immunostimulante caractérisée par l'induction de réponses cellulaires et humorales lorsqu'il est administré par voie parentérale, avec des niveaux de protection intéressants lors d'une co-administration avec des Ag vaccinaux, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* et *Plasmodium falciparum*[122].

Cet adjuvant a aussi été testé par voie intranasale chez la souris en combinaison avec un Ag du virus de la grippe. Les résultats ont démontré que le CAF01 améliore le transport de l'Ag à travers une muqueuse nasale reconstruite *in vitro* (cellules Calu-3). *In vivo*, les études ont mis en évidence une augmentation des réponses cellulaires et humorales[123].

2.1.4. VLP et IRIV

Les VLP (Virus-Like Particles) sont des particules auto-assemblées composées d'une ou plusieurs protéines virales, résultant en la formation de nanoparticules de 20 à 100 nm de diamètre. Des vaccins contenant des VLP sont déjà commercialisés (hépatite B et papillomavirus) et son basés respectivement sur l'expression de l'Ag de surface HBs (AgHBs) et de la protéine majeur de capside L1 du HPV. Le vaccin commercialisé le plus récent (2006) contenant des VLP est le Gardasil® (HPV) qui, en plus, est adjuvanté avec de l'Alum.

Les IRIVs (Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virosomes) sont des protéoliposomes composés de phospholipides, d'hémagglutinine grippale (HA), de neuraminidase (NA) et d'un Ag vaccinal. Ils sont pris en charge par les CPAs grâce à une endocytose médiée par l'interaction HA-récepteur[124].

Les IRIVs sont des composants des vaccins hépatite A (Epaxal®) et grippe saisonnière (Inflexal®) utilisés en Europe, Asie et Amérique du sud et des études ont montré l'efficacité de ce type de vecteur après administration nasale chez l'Homme[125]. Ces vecteurs étant formulés pour vectoriser des Ags hétérologues, les virosomes (Figure 2.2) peuvent être considérés comme des systèmes de délivrance ayant une activité adjuvante intrinsèque. Ce type de particules est pris en charge par les DCs et a été démontré comme efficace pour stimuler des réponses cellulaire et humorale[126]. L'efficacité de ce type de vecteur lors d'essais de vaccination par voie muqueuse est amplifiée par la co-formulation d'adjuvants tel que la sous-unité B de la Cholera Toxine (CT) ou encore le MPL® par voies orale et nasale[127, 128].

Une étude récente de M. Bomsel[129], a démontré une protection contre SHIV (simian-HIV) chez le primate non-humain, après vaccination par voie intramusculaire et intranasale avec des virosomes vectorisant l'Ag de surface gp41 du VIH-1. Les animaux protégés ont tous montré des IgAs anti-gp41 au niveau de la muqueuse vaginale, avec une activité bloquante de la transcytose du virus ainsi que des IgGs vaginales neutralisantes et/ou inductrices d'ADCC (Cytotoxicité Cellulaire Dépendante de l'Anticorps).

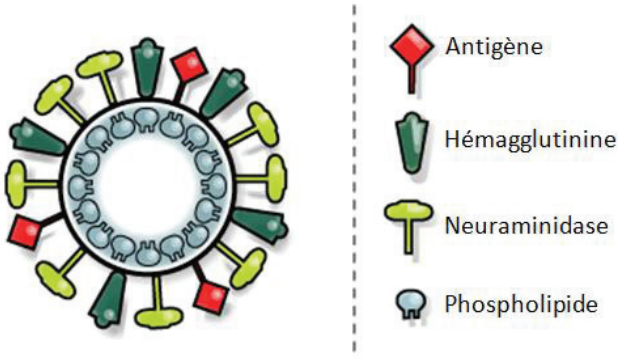


Figure 2.2 - Les différents composants d'un virosome (Source : Crucell patented virosome technology)

2.1.5. Adjuvants à base de saponine : ISCOMs

Les complexes immunostimulants (ISCOMs) sont des nanoparticules (NPs ~ 40 nm) composées de saponine extraite de l'écorce d'un arbre Sud-Américain, le *Quillaja saponaria* (Quil A), et formulées avec du cholestérol, des phospholipides, et l'Ag vaccinal. Les Ag n'ont pas besoin d'être incorporés dans ou à la surface des NPs, la plupart des utilisations se faisant en mixant l'Ag libre avec les NPs (ex. ISCOMATRIX™)[130].

De nombreuses études ont montré une très bonne efficacité des ISCOMs lors d'utilisation par voie systémique avec l'induction de LT cytotoxiques à activité antivirale[131]. Ces complexes ont, de plus, été démontrés comme étant de très bons systèmes de délivrance pour des immunisations par voie muqueuse nasale dans des études de développement ou d'amélioration des vaccins anti-grippe et anti-hépatite B[132, 133]. L'administration par voie orale d'ISCOMs s'est aussi montrée efficace mais nécessitant des doses importantes et répétées[134].

Aucun mécanisme d'action des ISCOMs n'a été clairement identifié jusqu'à présent ; cependant, il semblerait que ces complexes augmentent la prise en charge de l'Ag, prolongent sa rétention par les DCs dans les ganglions lymphatiques, induisent l'activation des DCs et des titres en Ac élevés ainsi qu'une cross-présentation antigénique orientant la réponse vers une réponse T-CD8^{+}[130, 131]. Les ISCOMs semblent déstabiliser la membrane endosomale des CPAs, permettant une libération de l'Ag dans le cytoplasme et favorisant ainsi les mécanismes de cross-présentation par les DCs[135].

Bien que les ISCOMs soient de puissants inducteurs des Th, ils n'orientent pas la réponse d'un côté ou de l'autre. Contrairement à la majorité des autres adjuvants, les ISCOMs stimulent des

réponses T à la fois $CD4^+$ et $CD8^+$ chez l'Homme et l'animal[131]. Dans toutes ces études, il a été démontré une bonne innocuité et tolérance des ISCOMs chez l'Homme aussi bien par voie systémique que par voie muqueuse. Malgré ces observations, l'utilisation de ces vecteurs chez l'Homme semble compromise du fait que certaines saponines sont toxiques à forte concentration[136].

2.1.6. Microparticules et nanoparticules de polymères

Les nano- et microparticules sont des colloïdes, très souvent sphériques, de 10 à 1000 nm et de 1 à 100 μm, respectivement. Toujours dans une optique d'amélioration de délivrance et de présentation d'Ag, les nano- et microparticules représentent une alternative intéressante, et notamment dans l'élaboration de vaccins muqueux. L'étude des particules de polymère en vaccination a commencé avec les microparticules (MPs), mais l'utilisation des nanoparticules (NPs) est en plein essor, puisqu'elles sont capturées plus facilement dans les compartiments intracellulaires que les MPs et qu'elles pénètrent les couches muqueuses[137].

Les NPs peuvent être divisées en deux catégories : les nanosphères et les nanocapsules. Les premières sont des particules présentant une matrice de polymère, pouvant être poreuse, les secondes sont des vésicules avec un coeur liquide entouré par une membrane de polymère[138]. Le polymère doit répondre aux exigences de la biocompatibilité et de la bioélimination auxquelles peut s'ajouter la biodégradabilité. Nous décrivons ici les principaux systèmes étudiés comme adjuvants, à base de polymères naturels et synthétiques.

Polymères naturels

Les polymères naturels particulièrement utilisés pour l'élaboration de NPs vecteur de vaccination sont typiquement des polysaccharides : chitosane et dextrane, et dans une moindre mesure les β-glucanes et les mannanes.

Le chitosane est un polysaccharide linéaire, non toxique et biodégradable, comprenant des motifs D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine, liés par des liaisons glycosidiques *β*-(1-4) (Figure 2.3)[139].

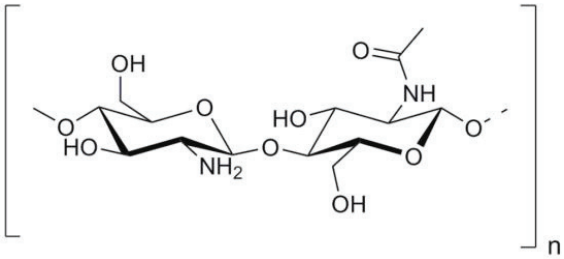


Figure 2.3 - Structure chimiques du chitosane.

Le chitosane est produit par hydrolyse enzymatique ou chimique des groupes N-acétyl de la chitine ou désacétylation. La chitine est retrouvée en grande quantité dans la cuticule des

arthropodes : insectes, arachnides, crustacées. La principale source reste les exosquelettes de crevette. La chitine est alors déminéralisée par traitement à l'acide chlorhydrique, puis déprotéinée en présence de soude ou de potasse, pour être éventuellement décolorée par un agent oxydant tel que le permanganate de potassium. Le chitosane est dégradé *in vivo* par des enzymes telles que le lysozyme et la chitosanase, en oligomères puis en résidus N-glucosamine, endogène au corps humain. Cependant la biocompatibilité et biodégradabilité restent dépendantes de plusieurs facteurs tel le degré de déacétylation, où au-delà de 70 % le chitosane est peu dégradé[139]. L'utilisation du chitosane est intéressante pour ses propriétés reconnues de muco-adhésion, d'augmentation de la perméabilité des muqueuses au niveau des cellules épithéliales et de diminution de la vitesse d'élimination par les cils des muqueuses[140]. Le chitosane peut être associé à de l'ADN ou à des sous-unités de pathogènes pour former soit des complexes, soit des NPs, favorisant leur capture par les CPAs et induisant une immunité protectrice muqueuse[140].

L'association du chitosane chargé positivement au sulfate de dextrane chargé négativement permet d'obtenir des complexes poly(électrolytes) dans des conditions douces, dans lesquels (ou à la surface desquels) peuvent être associés des peptides et/ou des protéines pour aboutir à des vecteurs efficaces de ces biomolécules[141]. Bachelder *et al.* ont transformé les fonctions hydroxyl du dextrane en acétale, pour aboutir à un polymère hydrophobe et pH sensible, qui a été utilisé pour la préparation de MPs, dans lesquelles peut être encapsulé l'Imiquimod (ligand du TLR7)[142]. Ce dernier encapsulé dans la MP induit une immunostimulation plus importante que sous sa forme libre. La même équipe a exploité la *click chemistry azide-alcyne* pour synthétiser des particules de dextrane acétale fonctionnalisées en surface par du D-mannose et encapsulant en leur cœur une protéine antigénique[143]. Ces particules mannosylées améliorent la présentation de l'Ag par les DCs *via* le CMH-I, en comparaison avec les particules non mannosylées.

Les β-glucanes contiennent généralement des chaînes de β-D-glucose liées en β-(1-3), qui peuvent présenter des greffages de glucane en β-(1-6)[144]. La distribution et la taille des chaînes sont dépendantes de la source biologique. Ils sont facilement purifiables, présentent une faible variabilité moléculaire, sont stables sur une large gamme de pH et de température, ont une charge neutre en solution aqueuse et présentent un temps de demi-vie long en raison de l'absence de β-glucanase chez les vertébrés, ni de β-hydrolase chez l'Homme. Des particules de β-glucanes sont obtenues par une série d'extractions acido-basiques de la paroi des levures. La fraction β-glucanes (1-3) est insoluble dans l'eau et forme alors des particules. Une protéine peut même être encapsulée dans ces particules ou peut être adsorbée à leur surface[145]. Les β-glucanes ne provoquent pas de réponses allergiques et n'induisent pas d'Ac inhibiteurs ou compétitifs anti-β-glucane chez les mammifères[146]. Ils sont considérés comme présentant un bon profil d'innocuité par la FDA. Plusieurs récepteurs sont associés à la reconnaissance de ce type de polysaccharide, tels que le lactosylcéramide, les récepteurs des LDL ("low-density lipoproteins"), les TLR2 et TLR6, la Dectine-1 chez la souris, homologue du récepteur β-glucane chez l'Homme.

Cependant, pour être complètement efficace, il peut être nécessaire de les associer à des vecteurs comme par exemple les émulsanes, composés de trois sucres aminés : D-galactosamine, acide D-galactosaminouronique et l'hexose de didéoxydiamino, dans les travaux de Castro *et al.*[146].

Les mannanes sont des polyoses retrouvés naturellement à la surface de bactéries et de champignons. Ils sont intéressants puisqu'ils se lient au DC-SIGN, au TLR4 des DCs et aux récepteurs au mannose des cellules de l'immunité. Leur interaction avec ces récepteurs permet de déclencher et d'augmenter la réponse Th1[147].

Le mannane est souvent associé soit à des Ags[148] soit à des lipides pour former des particules solides de lipide afin de favoriser le ciblage des DCs et des macrophages[149]. Tang *et al.* ont démontré qu'en fonction de l'oxydation ou de la réduction du mannane, la réponse peut être orientée Th1 ou Th2 et ils ont associé le mannane à des vaccins pour l'immunothérapie de cancers[150].

Polymères synthétiques

Les polymères synthétiques possèdent plusieurs avantages par rapport aux polymères naturels, tels qu'une très bonne reproductibilité des lots, des coûts de préparation restreints et des propriétés ajustables *via* des modes de synthèse généralement bien contrôlés et l'absence d'épitopes potentiellement antigéniques ou allergisants, qui peuvent être présents dans les polymères naturels, même après purification, lors de l'utilisation de dérivés animaux ou végétaux[151]. Les polyesters aliphatiques, les polyanhydrides[152] et les poly(acides aminés) constituent les trois grandes familles de polymères synthétiques utilisés pour la vaccination[153].

Les polyesters aliphatiques destinés à être utilisés chez l'Homme comprennent entre autres les poly(ε-caprolactone) (PCL), les acides poly(acides lactiques) (PLA), les poly(acides glycoliques) (PGA) et les copolymères acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) (Figure 2.4).

Nous nous intéressons ici uniquement à ces polyesters et plus particulièrement aux particules de PLA et de PLGA, qui sont les plus reportées pour le développement de nouvelles formulations vaccinales et permettent l'encapsulation ou l'adsorption en surface d'Ags, de peptides ou encore d'ADN vaccinaux[154].

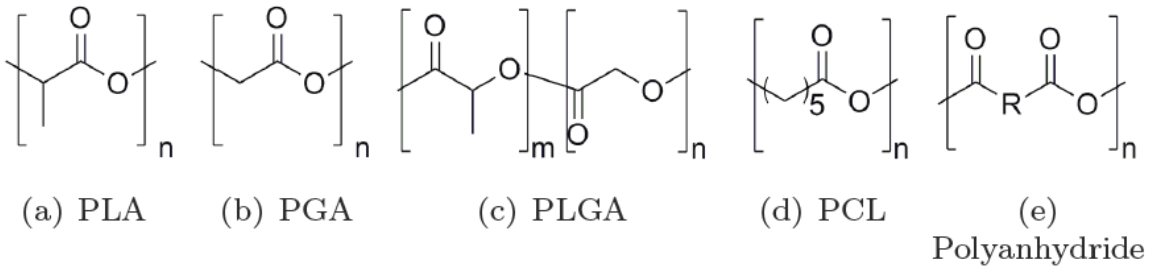


Figure 2.4 - Structures chimiques du poly(acide lactique) (PLA), acide polyglycolique (PGA), acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), poly(α-caprolactone) (PCL), polyanhydride et cyano acrylate de poly(alkyl) (PACA).

Plusieurs méthodes permettent d'accéder à des NPs et MPs de PLA/PLGA. Elles sont dépendantes du caractère hydrophobe/hydrophile du principe actif (ici l'Ag ou un ligand)

(i) Si l'Ag est hydrophobe (ce qui est plutôt rare), il sera encapsulé au sein de la matrice de polymère grâce à la formation de particules suivant des méthodes de précipitation/évaporation de solvant, d'émulsion (huile dans l'eau)/évaporation de solvant ou encore de dialyse.

(ii) Si l'Ag est hydrophile, la méthode de choix pour son encapsulation est celle de la double émulsion (water-in-oil-in-water)[155]. L'adsorption d'Ag (ou ligands) sur les particules est une approche possible pour les différentes méthodes reportées ci-dessus[156].

Les deux premiers polymères ont été homologués pour une utilisation chez l'Homme (ex. fils de sutures et stents biorésorbables, implants et vis osseuses). Ces particules peuvent protéger l'Ag de la dégradation et permettent des interactions facilitées avec l'épithélium muqueux. Leur prise en charge par les cellules M favorise le ciblage de PPs intestinales après administration par voie orale[157, 158] et sont aussi potentiellement efficaces par voie nasale et peuvent donc être utilisées comme vecteurs pour des immunisations par voies muqueuses[159]. De plus, il a été démontré que des particules d'une taille appropriée sont prises en charge de manière efficace par les CPAs telles que les DCs *in vitro* et *in vivo*[160].

Des études précliniques par voie parentérale ont montré que ces NPs peuvent induire des taux d'Ac sériques comparables à ceux induits avec l'Alum ou le MF59[156, 161]. Des essais cliniques ont aussi été réalisés pour véhiculer un vaccin oral par des microparticules de PLG[162]. Pour une délivrance par voie nasale ou orale, des polymères bio-adhésifs ont été développés et ont pour propriétés de retenir la formulation vaccinale au niveau des tissus le plus longtemps possible[157].

Biocompatibilité et biodégradabilité

Les profils de biocompatibilité et de biodégradabilité du PLA et du PLGA sont bien connus puisqu'utilisés depuis de nombreuses années en tant que matériaux de suture résorbable (commercialisation du premier produit à base de PLGA en 1970) et de système de délivrance de principes actifs[163]. Ils sont approuvés par la FDA[164] et environ 12 produits à base de microsphères ou d'implants de PLGA sont commercialisés par 10 compagnies différentes à travers le monde[165].

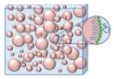
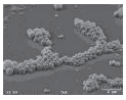
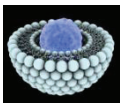
Les PLA/PLGA sont biodégradables par hydrolyse *in vitro* et *in vivo* des fonctions esters en résidus acide lactique et/ou acide glycolique, qui sont intégrés dans le cycle cellulaire de Krebs pour être potentiellement éliminés en CO_2. La fonction cellulaire n'est pas transformée suite à la prise en charge d'acides lactiques et glycoliques, tant que leur apparition et donc la vitesse de dégradation du polymère reste modérée.

Les particules de PLGA, inférieures à 300 microns, soit toutes les particules à usage pharmaceutique, subissent une dégradation homogène au cœur et en surface, par érosion en masse des sphères[166]. De nombreux facteurs influencent la vitesse de dégradation de ces particules

de PLA/PLGA tels que le ratio de monomères LA/GA, la morphologie du polymère (cristallin *versus* amorphe) la dimension des particules, la masse molaire, etc[167].

L'augmentation du ratio LA/GA du PLGA utilisé pour l'élaboration de particules améliore leur longévité en raison d'une liaison ester glycolique plus sensible à l'hydrolyse[168]. De même l'utilisation de poly(L-lactide) au lieu de poly(D,L-lactide) provoque une dégradation plus lente, en raison de la cristallinité du poly(L-lactide), qui rend plus difficile la pénétration de l'eau au sein de la matrice polymérique et diminue par conséquent la vitesse d'hydrolyse.

Tableau 2.1 - Nanovecteurs et systèmes de délivrance communément employés dans les études de vaccins muqueux.

	Type de vecteur		Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Refs
	**Emulsions**	Eau dans huile	- Th1	- Relargage progressif de l'Ag	- Réactogènes	169, 170
		Huile dans eau	- Th2			
	**VLP et IRIVs**		- Humorale	- Pas de génome viral - Hautement immunogène - Très bonne prise en charge	- Formulé par technologie recombinante	170, 171
	**Polymères synthétiques**	PLA/PLGA	- Protéines - Peptides - Composés hydrophobes	- Relargage contrôlé - Stables - Biocompatibles - Surface fonctionnalisable	- Difficultés d'adsorbtion de molécules chargées négativement (ADN, ARN)	170, 171, 172
		PEI	- Plasmides ADN	- Transfection efficace	- Cytotoxique	173
	**Liposomes**		- Molécules hydrophobes et hydrophiles - Protéines - ADN	- Surface fonctionnalisable - Non toxique - Encapsulation d'Ag divers	- Faible rendement d'encapsulation - Peu stable	120
	**ISCOMs**		- Th1 + Th2	- Bonne prise en charge - Cross-présentation	- Toxique à forte dose	131

Abréviations : VLP, Virus-Like Particles ; IRIVs, Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virosomes ; ISCOMs, complexes immunostimulants ; PLGA, poly(acide lactique coglycolique) ; PLA, poly(acide lactique) ; PEI, polyethylenimine.

2.2. MOLECULES IMMUNOSTIMULANTES

Les molécules immunostimulantes, à l'inverse des systèmes de délivrance, vont directement agir sur le système immunitaire afin de potentialiser la réponse vis-à-vis d'Ags donnés. Des ligands mimant les PAMPs et ciblant ainsi les PRRs sont de plus en plus étudiés par la communauté scientifique. Les PRRs intra- et extracellulaires sont ainsi subdivisés en quatre groupes principaux : TLRs, NLRs, CLRs et RLRs[104]. En fonction du récepteur stimulé, les DCs produisent et sécrètent différentes cytokines qui vont influer sur le type de réponse immunitaire.

Les TLRs représentent la majorité des PRRs étudiés pour le développement de nouveaux adjuvants efficaces[174]. Les TLRs peuvent être divisés en deux groupes : les récepteurs de surface (TLR 1, 2, 4, 5, 6) et les récepteurs intracellulaires présents au niveau des endosomes (TLR 3, 7,

8, 9) (Figure 2.5). Les TLRs de surface reconnaissent principalement les pathogènes de type bactériens, mais aussi les mycètes et certains virus enveloppés. Les lipoprotéines bactériennes sont reconnues par les hétérodimères TLR1/2 (triacyl lipoprotéines) et TLR2/6 (diacyl lipoprotéines).

L'idée étant d'utiliser des ligands naturels ou synthétiques ciblant les PRRs ou les récepteurs cytokiniques, un certain nombre de ces molécules sont actuellement au stade de développement préclinique et clinique pour de multiples applications et font l'objet de nombreuses recherches afin de mieux comprendre leurs mécanismes adjuvants.

Dans cette classe, nous regrouperons les ligands de PRRs, les cytokines, les saponines ainsi que les endotoxines bactériennes.

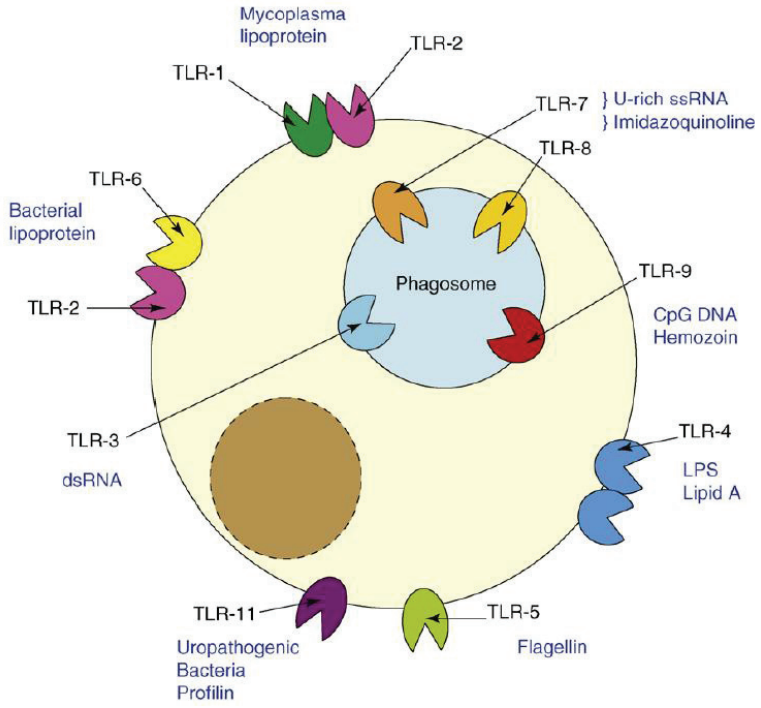


Figure 2.5 - TLRs et ligands[175]. Les TLRs sont présents sous forme monomérique ou hétérodimérique à la surface de certaines cellules (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10, 11) ou à l'intérieur des phagolysosomes (TLR3, 7, 8, 9) au niveau desquels ils vont détecter certains composés microbiens.

2.2.1. Toxines bactériennes et dérivés

Deux toxines bactériennes sont identifiées depuis de nombreuses années comme des adjuvants muqueux puissants : la toxine cholérique (CT) de *Vibrio cholerae* et l'entérotoxine d'*Escherichia coli* (LT). Ces toxines sont composées d'une sous-unité A possédant une activité enzymatique (ADP-ribosyltransférase) et une sous-unité B, formée de cinq monomères identiques et responsables de la fixation sur les membranes cellulaires. CT et LT sont utilisées comme « gold standards » dans les expérimentations mesurant l'efficacité adjuvante de nouvelles molécules. Lors d'administrations par voie orale, ces molécules ont montré de fortes et persistantes réponses

systémiques et muqueuses vis-à-vis de certains Ags, permettant de réduire la concentration et le nombre d'administrations[176].

Cependant, leur toxicité limite leur utilisation chez l'Homme[177]. Des formes détoxifiées de CT et LT, inhibant leur activité ADP-ribosyltransférase, ont été produites par mutagénèse, telles que la sous-unité B non-toxique (CTB) seule ou conjuguée avec le CpG[178, 179] ou encore, le mutant détoxifié de la LT tel que LTK63[180]. Ces molécules conservent leur activité adjuvante lorsqu'elles sont administrées par voie nasale, mais l'ADP-ribosyltransférase semble être indispensable à leur activité adjuvante par voie orale. Cependant, l'administration nasale des dérivés de LT et CT n'est pas conseillée du fait d'un risque de fixation au niveau des nerfs olfactifs pouvant entrainer des paralysies faciales (Bell's Palsy)[181]. Ce phénomène a notamment été observé pour un vaccin commercialisé en Suisse en 2001, le NasalFlu® (Berna), un vaccin nasal à base de virosomes vectorisant des Ags grippaux co-administrés avec de la LT comme adjuvant muqueux. Il fût retiré du marché après la déclaration de nombreux cas Bell's Palsy[182].

Les études menées actuellement sur ces toxines se restreignent à une utilisation par voie parentérale ne démontrant pas de potentialisation des réponses immunitaires muqueuses[183] ; ou par voie muqueuse orale ou nasale n'induisant que des réponses systémiques[184].

D'autres dérivés de ces toxines semblent prometteurs, avec notamment une mutation au niveau de la région A1 se fixant à la sous-unité A2 permettant de conserver l'activité enzymatique. Lors d'essais cliniques, le mutant LTR192G et récemment, le LTR192G/L211A (double mutant), ont été démontrés efficaces en tant qu'adjuvants muqueux. Des études sont en cours, afin de préciser leurs fonctions adjuvantes.

Un autre dérivé de la CT a aussi été développé il y a quelques années, la CTA1-DD. Il s'agit d'une protéine de fusion composée de la sous-unité A1 de la CT ainsi qu'une molécule de ciblage des LB dérivée de la protéine A de *Staphylococcus aureus*[185]. Cette protéine conserve l'activité enzymatique de la sous-unité A de la CT sans son domaine de fixation. Son efficacité et son innocuité en tant qu'adjuvant muqueux ont été démontrées par différentes voies dans des modèles murins et primates, et n'a montré aucune interaction avec le système nerveux après administration par voie nasale[132]. De plus, aucune réaction inflammatoire n'a été observée au niveau du site d'administration faisant de CTA1-DD un adjuvant vaccinal non-inflammatoire potentiellement intéressant. De nombreuses études ont testé son pouvoir en tant qu'adjuvant muqueux et ont démontré qu'il était comparable à la CT et à la LT sans aucune toxicité. Après administration par voie nasale, rectale ou parentérale chez la souris, la CTA1-DD augmente de manière efficace la réponse immune : IgA au niveau muqueux, IgG sériques et réponses T $CD4^+$ et CTL dans différents tissus[186].

CTA1-DD représente donc une nouvelle génération d'adjuvants qui nécessite des recherches plus approfondies pour des applications humaines.

2.2.2. Ligands du TLR3 et RLR

La découverte du fait que les ARN viraux doubles brins (ARNdb) sont des activateurs puissants de l'immunité innée fut un point clé dans la compréhension des mécanismes de défense de l'hôte contre les infections virales[187]. Des analogues synthétiques des ARNdb (ex. Poly I:C - polyinosinic:polycytidylic acid) ont été utilisés comme adjuvants dans de nombreuses études et peuvent agir *via* deux types de PRRs[188, 189]. Les ARNdb viraux ou synthétiques activent le TLR3 au niveau endosomal[187] ou *via* les ARN hélicases cytosoliques, telles que RIG-1 (retinoic acid-inducible gene-1) et MDA-5 (melanoma differenciation associated gene 5)[190].

L'activation du TLR3 dans les DCs induit la production d'IL-2 et d'IFNs de type I ainsi qu'une augmentation de l'expression du CMH-II et de la cross-présentation[191]. La stimulation du MDA-5, permet une stimulation de la production d'IFNs de type I essentiellement par les cellules non-hématopoïétiques. Les IFNs de type I jouent un rôle important dans l'induction des réponses T et B *via* divers mécanismes incluant l'activation des DCs, des cellules NK (Natural Killer) et des cellules T[188]. De nombreux analogues synthétiques d'ARNdb (Poly I:C, Poly ICLC et Poly$IC_{12}U$) ont été utilisés comme adjuvant co-administré avec des Ags solubles, des formulations ciblant les DCs ou encore, des vaccins viraux inactivés[189, 192, 193]. En effet, le Poly I:C active à la fois le TLR3 et le MDA, alors que le Poly IU active uniquement le TLR3. L'activation combinée du TLR3 et du MDA-5 optimise l'augmentation et la durabilité de la réponse Th1/$CD8^+$ en comparaison avec les deux voies séparées. Cela met en évidence le potentiel du Poly I:C à activer les DCs par l'intermédiaire du TLR3 ainsi que la production d'IFNs de type I par l'intermédiaire de l'activation du récepteur MDA-5[188].

2.2.3. Ligands TLR4 : MPL®

Les lipopolysaccharides (LPS) bactériens sont depuis longtemps considérés comme des composés adjuvants très puissants, mais leur activité pyrogénique les a exclus de toute utilisation chez l'Homme. Les travaux de Ribi en 1982 ont permis le développement de dérivés du LPS moins toxiques pour arriver finalement à un dérivé détoxifié, le monophosphoryl lipid A (MPL®)[194]. Le MPL® coformulé avec l'Ag vaccinal et l'Alum (AS04) est aujourd'hui utilisé dans des vaccins parentéraux homologués chez l'Homme tel que HBV (Fendrix®) et papillomavirus (Cervarix®). Il s'agit du seul adjuvant TLR dépendant homologué chez l'Homme et il a été démontré comme étant à la fois sûr et efficace permettant de déclencher des réponses immunitaires protectrices aux niveaux systémique et muqueux[195]. Le MPL®, combiné avec des systèmes de délivrance, a aussi été utilisé comme adjuvant muqueux par voies nasale, orale et rectale[127, 196, 197].

Le LPS et le MPL® sont spécifiquement reconnus par le TLR4, le MPL® déclenche la voie de signalisation *via* TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β) et MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), cette dernière entraînant une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, principalement de TNFα[198]. Le MPL® formulé

sur les particules d'Alum (AS04) est une combinaison stimulant à la fois la réponse humorale (caractéristique de l'Alum) mais aussi, une forte réponse Th1 (caractéristique du MPL®), l'activité adjuvante de la combinaison étant principalement attribuée au MPL®, l'Alum permettant de prolonger cet effet[110].

2.2.4. Ligands TLR5

La flagelline bactérienne est connue depuis longtemps comme un Ag T-indépendant, mais des études récentes sur la flagelline de nombreuses espèces bactériennes la définissent comme étant un ligand du récepteur TLR5, en faisant un adjuvant potentiellement intéressant[199] (Figure 2.6). Il a été démontré très récemment que l'administration par voie orale de flagelline chez la souris, entraînait la production d'IL-23 par les DCs intestinales, contribuant à l'augmentation de la réponse immunitaire innée muqueuse[200]. L'administration intranasale chez la souris d'un vaccin anti-grippe inactivé adjuvanté avec de la flagelline a aussi permis d'augmenter les réponses immunitaires muqueuses protégeant les souris d'une infection létale[201]. Il a, de plus, été démontré que l'administration intranasale de flagelline est capable d'induire l'élimination de *S. pneumoniae* au niveau des poumons, par induction de l'infiltration de neutrophiles au niveau des muqueuses respiratoires et l'expression d'IL-6, de TNFα et de chimiokines[202].

Des études ont aussi montré que l'IL-17 et l'IL-22 contribuaient aux réactions de défenses au niveau des muqueuses[203, 204]. Ces cytokines aident à la mise en place de l'immunité innée par stimulation des cellules épithéliales, induisant la production de molécules de défense et de réparation tissulaire. Van Maele *et al*. ont ainsi observé que la flagelline était capable d'induire une production rapide de ces cytokines au niveau des organes lymphoïdes, de l'intestin et des poumons chez la souris, et serait donc essentielle pour la mise en place des défenses précoces contre les agents pathogènes[205].

Bien que la flagelline en elle-même puisse être utilisée comme adjuvant par co-administration avec un Ag, les recherches actuelles tendent à mettre au point des protéines de fusion de l'Ag vaccinal avec la flagelline[206]. Contrairement aux autres agonistes TLRs, la flagelline induit une orientation à la fois Th1 et Th2 de la réponse, plutôt qu'une simple réponse Th1[206] ainsi que l'induction d'Ac dirigés contre la protéine de fusion[207]. La flagelline bactérienne peut aussi agir *via* l'inflammasome contenant NLRC4 (IPAF)[208], cependant, il n'a pas été défini clairement que cette voie d'activation contribuait au pouvoir adjuvant de la flagelline.

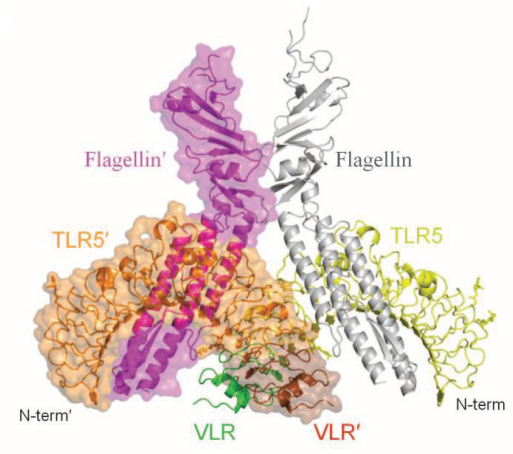


Figure 2.6 - Interaction entre une molécule de flagelline et deux récepteurs TLR5[199].

2.2.5. Ligands TLR7 et TLR8

Les ARN simples brins (ARNsb) riches en guanosine et en uridine ont tout d'abord été identifiés comme agonistes des TLR7 et 8[209]. Cependant, du fait que les ARNsb sont rapidement dégradés par les RNases extracellulaires, les utiliser libres en tant qu'adjuvants s'avérait difficile. De nombreux composés synthétiques ont donc été développés comme inducteurs d'IFN de type I, tel que les imidazoquinolines (imiquimod, TLR7 & resiquimod (R848), TLR7/8), déjà utilisés chez l'Homme pour le traitement de certaines maladies de peau, ainsi que des analogues de la guanosine et de l'adénosine qui ont été décrits comme activateurs des TLR7, 8 ou les deux[210]. Les récepteurs TLR7 et TLR8 sont exclusivement exprimés au niveau endosomal et agissent *via* MyD88[211]. L'utilisation de l'imiquimod par voie vaginale chez le macaque a montré l'induction de la production d'IFNα et d'autres molécules antivirales au niveau de la muqueuse cervicovaginale des animaux traités, ainsi qu'une infiltration massive de cellules mononucléées telles que des lymphocytes $CD4^+$ et des DCs[212].

L'activation du TLR7 et du TLR8 chez les DCs plasmacytoïdes (pDCs) humaines et les mDCs (souris) augmente respectivement l'expression des molécules de costimulation ainsi que la production d'IFN de type I et d'IL-12[213]. Un bi-agoniste TLR7/8 pourrait être plus efficace qu'un mono-agoniste, permettant d'activer les différents sous types de DCs ainsi que les cellules B, afin d'induire la production optimale de cytokines pour orienter vers une réponse Th1, induire des mécanismes de cross-présentation, ainsi que la production d'Ac. Les agonistes TLR7 et TLR8 n'ont qu'une faible activité adjuvante lorsqu'ils sont seulement mélangés avec l'Ag, leur activité peut cependant être amplifiée par formulation ou conjugaison avec l'Ag[214].

Des différences importantes existent cependant entre la souris et l'Homme, notamment au niveau de l'expression tissulaire des TLR7 et 8. Dans les deux espèces, le TLR7 est exprimé par les cellules B, les neutrophiles et les pDCs ; cependant, chez la souris, le TLR7 est exprimé par les macrophages, les DCs et les T $CD8^-$, mais pas les T $CD8^+$[215]. Le TLR8 est exprimé par les monocytes ainsi que les DCs myéloïdes chez l'Homme, alors qu'il n'est pas fonctionnel dans ces

cellules chez la souris[216]. Il faut donc garder à l'esprit ces divergences lors des études expérimentales.

2.2.6. Ligands TLR9 : CpG-ODN et ADN formulé

Le TLR9 est le seul PRR endosomal (LB et pDCs) spécifique de l'ADN et permet ainsi de médier de fortes réponses antibactériennes et antivirales[217]. En effet, à l'inverse de l'ADN des mammifères, les ADN bactériens ne sont pas méthylés et sont riches en dinucléotides CpG (sites CG : cytosine-guanine). Les séquences contenant des motifs CpG sont donc préférentiellement reconnues et possèdent des propriétés immunostimulantes[218]. Des bases (18-25) oligodéoxynucléotides (ODN) synthétiques avec des motifs CpG optimisés (CpG-ODN) ont été largement étudiées comme adjuvants, à la fois sous forme soluble ou formulées dans des nanoparticules[219] ou des VLP[220]. Ces motifs ont été étudiés comme adjuvants systémiques et muqueux dans de nombreux modèles animaux mais aussi chez l'Homme[221].

Les motifs CpG-ODN augmentent les réponses Ac et polarisent fortement la réponse de type Th1 puis progressivement Th2, ainsi que la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Lorsqu'ils sont utilisés comme adjuvants vaccinaux, les CpG-ODNs augmentent l'action des CPAs professionnelles ainsi que les réponses humorales et cellulaires. Des études précliniques indiquent que ces motifs améliorent l'activité des vaccins avec lesquels ils sont coadministrés contre des maladies infectieuses et des cancers et des essais cliniques démontrent une bonne innocuité[221].

Aujourd'hui, le principal challenge est donc le développement de nouvelles molécules adjuvantes capables d'initier des réponses muqueuses que ce soit après administration systémique ou muqueuse. Une leçon importante à retenir à partir de l'étude des vaccins atténués est qu'une activation multiple de PRRs serait plus efficace que l'activation d'une seule voie[222]. Des études *in vitro* réalisées avec des combinaisons de ligands TLRs supportent cette hypothèse et suggèrent que des combinaisons pourraient être très favorables au développement d'adjuvants muqueux (ou inducteurs d'une immunité muqueuse) efficaces[223].

Tableau 2.2 - Adjuvants utilisés dans des vaccins dirigés contre des infections à tropisme muqueux (adapté de Rappuoli *et al.*[224])

Nom de l'adjuvant (année de licence)	Classe	Composition	Vaccins (maladie)	Orientation de la réponse immune
Adjuvants homologués pour usage chez l'Homme				
Alum (1924)	Sels minéraux	Phosphate d'aluminium ou hydroxyde d'aluminium	Nombreux : DTP, Hépatite A, papillomavirus, …	Ac, Th2
MF59® (Novartis - 1997)	Emulsion d'huile dans l'eau	Squalène, polysorbate 80, sorbitan trioleate	Fluad® (grippe saisonnière), Focetria® (grippe pandémique), …	Ac, Th1 + Th2
AS03 (GSK - 2009)	Emulsion d'huile dans l'eau	Squalène, Tween 80, α-tocophérol	Pandemrix® (grippe pandémique), Prepandrix® (grippe pré-pandémique)	Ac, Th1 + Th2
Virosomes (Berna Biotech - 2000)	Liposomes	Lipides, hémagglutinine	Inflexal (grippe saisonnière), Epaxal® (hépatite A)	Ac, Th1 + Th2, cross-présentation
AS04 (GSK - 2005)	Agoniste TLR4 adsorbé sur Alum	Hydroxyde d'aluminium + MPL®	Cervarix (HPV)	Ac, Th1
Adjuvants en phases cliniques non-homologués chez l'Homme				
CpG 7909, CpG 1018	Agoniste TLR9	CpG-ODN seul ou combiné à l'Alum/émulsion	Streptococcus pneumoniae (Nasale), ETEC (Orale)	Ac, Th1, $CD8^+$ T cells, NK
Imidazoquinolines	Agonistes TLR7 et/ou TLR8	Molécules organiques	Pré-clinique (VIH)	Ac, Th1, $CD8^+$ T cells (conjugués)
Poly-IC	Agoniste TLR3/MDA5	Analogues ARN double brin	-	Ac, Th1, $CD8^+$ T cells , NK
Pam3Cys	Agoniste TLR2	Lipopeptide bactériens	-	Ac, Th1, NK
Flagelline	Agoniste TLR5	Protéine bactérienne liée à l'antigène	Grippe (Nasale)	Ac, Th1 + Th2
AF03	Emulsion d'huile dans l'eau	Squalène, Montane 80, Eumulgin B1 PH	-	
Nanoparticules	Microsphères	PLA, PLGA, Chitosane …	-	Ac, Th1 + Th2, cross-présentation
AS01	Combinaison	Liposome, MPL®, saponine	Phase I (VIH)	Ac, Th1
AS02	Combinaison	Emulsion, MPL®, saponine	-	Ac, Th1
CAF01	Combinaison	Liposome, DDA, TDB	-	Ac, Th1, Th17
IC31	Combinaison	Oligonucléotide, peptides cationiques	-	Ac, Th1, $CD8^+$ T cells
ISCOMs & ISCOMATRIX™	Combinaison	Saponine, cholestérol, dipalmitoylphosphatidylcholine	Pré-clinique (grippe, HSV, HIV, …)	Ac, Th1 + Th2, $CD8^+$ T cells

Les réponses immunes sont basées sur des résultats obtenus lors d'études chez l'Homme et la souris. Ces résultats peuvent donc être limités à une seule des deux espèces dans certains cas.

2.3. RECEPTEURS NODs ET ADJUVANTICITE

Ces dix dernières années ont été les témoins de l'identification d'une nouvelle classe de PRRs, les NLRs (Nucleotide-binding and oligomerization domain (Nod)-like receptor (NLR) family). Cette

nouvelle famille a reçu une attention considérable, puisqu'elle a démontré sa capacité à déclencher des réponses inflammatoires contre des agents pathogènes.

2.3.1. Structure et distribution

Chez l'Homme, la famille des NLRs est composée de 22 protéines, et il y a au moins 34 gènes codants des NLRs chez la souris[225]. Une des sous-familles de NLRs est composée des récepteurs Nod1 et Nod2 qui sont définis par une structure en trois parties composées (i) d'un domaine C-terminal LRR (Leucine-Rich Repeat) qui va détecter les PAMPs ; (ii) d'un domaine central NACHT qui permet l'auto-oligomérisation durant l'activation ; et (iii) d'un domaine variable N-terminal responsable des interactions protéine-protéine, appelé CARD (Caspase Recruitment Domain) et nécessaire pour l'activation de la voie du NF-κB (Nuclear Factor-κB)[226] (Fig. 2.7).

Nod1 et Nod2 sont principalement exprimés par deux types de cellules qui sont fortement exposées ou interagissent avec les micro-organismes : les CPAs et les cellules épithéliales. A la fois chez l'Homme et chez la souris, les CPAs telles que les macrophages et les DCs expriment Nod1 et Nod2, alors que les autres cellules hématopoïétiques, telles que les LT et les LB n'exprimeraient pas ces récepteurs[227, 228], bien que certaines études plus récentes semblent démontrer le contraire[229, 230]. Cependant, il faut noter que l'expression du récepteur Nod2 au niveau épithélial semble limitée aux cellules de Paneth, qui sont localisées à la base des cryptes intestinales[231].

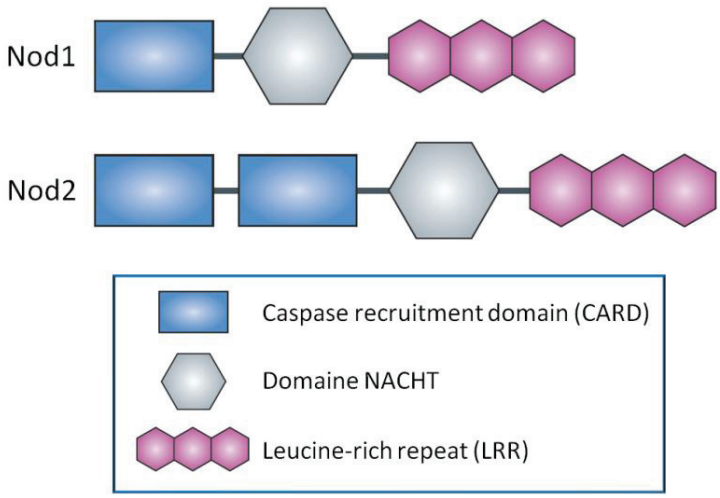


Figure 2.7 – Structure des récepteurs Nod1 et Nod2 (adapté de Geddes *et al.*[232]).

2.3.2. Ligands des récepteurs Nods et activation

Nod1 et Nod2 sont des récepteurs intra-cytoplasmiques qui vont détecter des motifs présents dans le peptidoglycane (PGN) bactérien[233]. Nod2 détecte les motifs MDP (muramyl dipeptide) qui sont communs aux bactéries Gram+ et Gram-[234]. Le récepteur Nod1, quant à lui, détecte les motifs γ-D-Glu-*meso*-DAP (diaminopimelic acid – iE-DAP) qui sont principalement retrouvés dans le PGN des bactéries Gram- et dans quelques Gram+[234, 235] (Fig. 2.8). Un relargage constant

de ligands de Nod1 et Nod2 par les bactéries du fait d'un remodelage permanent du PGN durant la multiplication bactérienne, permet au système immunitaire de « surveiller » son environnement. Les motifs DAP et MDP sont délivrés, au niveau intracellulaire soit par les bactéries envahissant les cellules, soit par des canaux (pannexine, PepT1/PepT2 ou par endocytose) pour ensuite être détectés par les récepteurs Nods[236]. Des transporteurs de type SLC15A4 sont aussi capables de transporter les motifs microbiens dans le cytoplasme après endocytose[237].

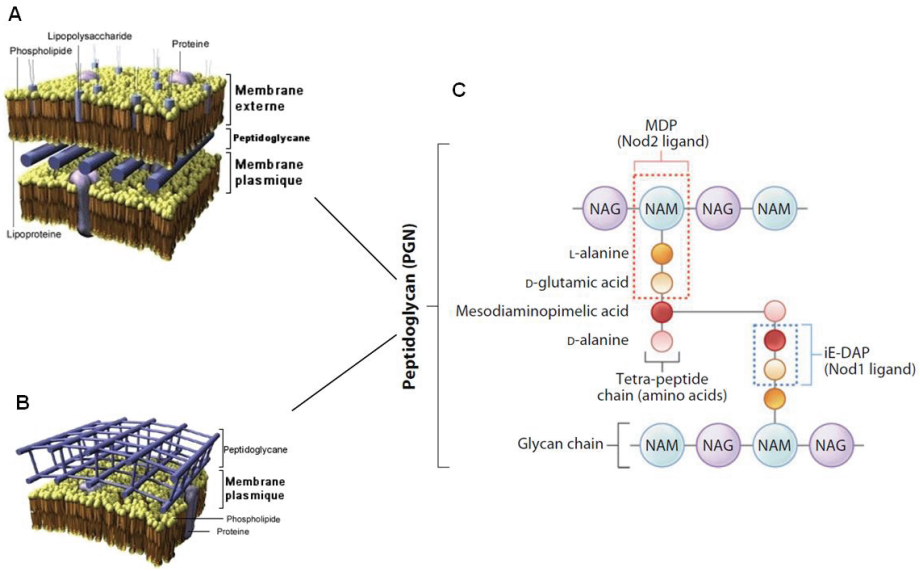


Figure 2.8 – Peptidoglycane et ligands Nod1 et Nod2 (adapté de Chen *et al.*[226]). A) Paroi bactérienne Gram négatif. B) Paroi bactérienne Gram positif. C) Motifs minimums requis pour l'activation des récepteurs Nods. Abréviations : iE-DAP, D-γ-glutyamyl-meso-DAP ; MDP, muramyl dipeptide.

L'activation des récepteurs Nod1 et Nod2 entraîne donc l'activation de la voie du NF-κB. En effet, ces récepteurs signalent *via* RIP2 (receptor-interacting serine-threonine kinase 2 ; aussi connue sous le nom de RICK) et cIAPs (cellular inhibitors of apoptosis 1 and 2)[238]. Il va y avoir polyubiquination de RIP2 après interaction CARD-CARD avec les récepteurs Nods[239]. RIP2 va conduire à l'ubiquitination de NEMO (NF-κB essential modulator) qui va permettre le recrutement de TAK1 conduisant à la phosphorylation de la sous-unité IκKβ de NEMO qui va résulter en la dégradation de la sous-unité IκKα. Une étape clé qui va permettre la translocation nucléaire du NF-κB[240]. Le NF-κB va ensuite induire la transcription de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines telles que TNFα, IL-6, IL-8 ou IL-1β qui sont importantes pour la stimulation et le recrutement de cellules effectrices pour la défense de l'hôte (Figure 2.9).

La stimulation de Nod1 et Nod2 entraîne aussi l'activation de la voie des MAPKs (mitogenactivated protein kinase) incluant p38, ERK (Extracellular signal-Regulated protein Kinase) et JNK (c-Jun N-terminal Kinase)[241]. Contrairement à la voie du NF-κB, les évènements moléculaires qui conduisent à l'activation de cette voie ne sont pas bien définis, mais impliquent des molécules similaires, telles que RIP2 et TAK1.

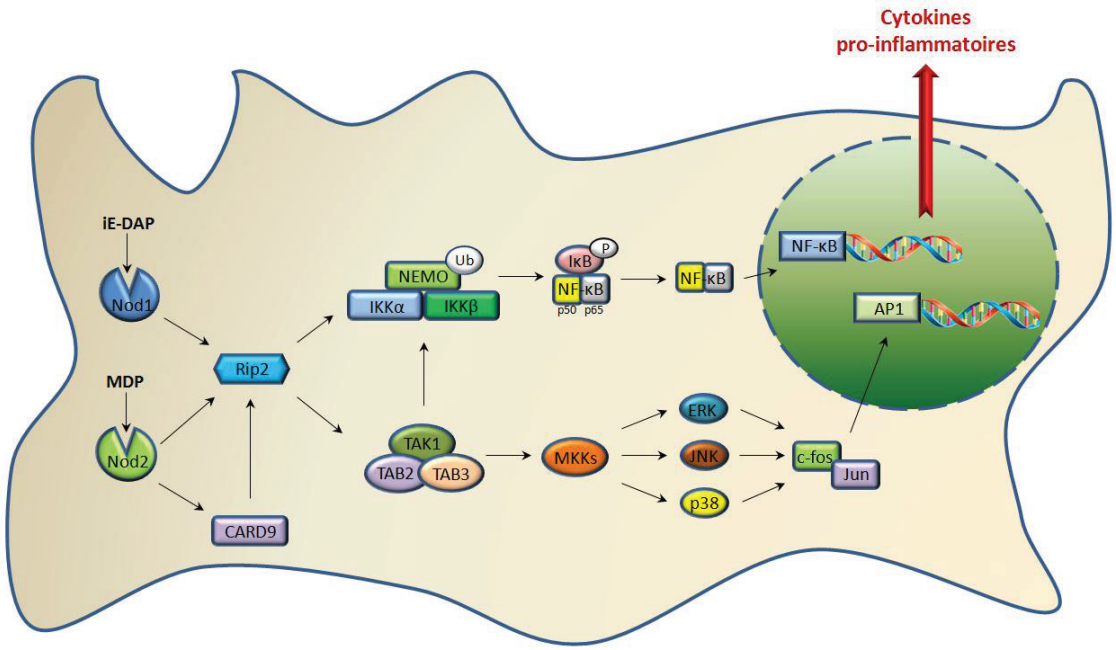


Figure 2.9 - Cascade d'activation de la voie des récepteurs Nods[239, 240, 241].

2.3.3. Réponses biologiques à l'activation de la voie des Nods

La conséquence de l'activation des voies du NF-κB et des MAPKs est une augmentation de la transcription et donc de la production de médiateurs de l'inflammation, incluant des cytokines, des molécules chimio-attractantes, des molécules d'adhésion et des enzymes (iNOS, Cox-2, etc.). Pour Nod1 en particulier, qui est exprimé par les cellules épithéliales et mésothéliales, sa stimulation peut induire la production de chimiokines et le recrutement de cellules effectrices de l'immunité dont les polynucléaires neutrophiles (PNN) *in vivo*[242]. Tout aussi importante, l'augmentation de la production de peptides antimicrobiens, spécialement par les cellules épithéliales, est dépendante de l'activation de la voie du NF-κB par Nod1 et Nod2. Une perturbation de cette fonction peut entrainer une pathologie inflammatoire intestinale, telle que la maladie de Crohn[243].

Lors d'essais *in vitro*, il a été démontré que des ligands synthétiques Nod1 et Nod2 pouvaient agir de manière synergique avec des ligands TLRs et induire l'expression de cytokines par des monocytes[244, 245, 246]. Des résultats similaires ont été mis en évidence avec des DCs et notamment sur la production d'IL-12, cytokine primordiale dans la polarisation Th1[247, 248] et d'IL-1β[249].

Outre de nombreuses études *in vitro*, des études ont aussi montré l'intérêt de la stimulation des récepteurs Nods dans des essais vaccinaux *in vivo*. En effet, la voie d'activation de Nod1 est importante dans la coordination de la réponse adaptative par les LT et LB grâce à une synergie avec les TLR dans la présentation antigénique[250]. De même, Nod2 peut agir dans la mise en place de la réponse immune adaptative comme un adjuvant efficace pour la réponse T et la production d'Ac[251]. Cependant, seulement quelques études ont montré un effet adjuvant des ligands Nods par voie muqueuse. C'est notamment le cas de l'étude de Jackson *et al.* qui ont montré la

potentialisation de l'immunogénicité de VLP par le Murabutide (Nod2), administré par voie nasale chez la souris. Il ont ainsi réussi à induire des IgG et des IgA sériques, ainsi que dans les fèces, les lavements vaginaux et nasaux[252]. L'étude de Bal *et al.* appuie ces résultats, en montrant l'induction d'IgG sériques et d'IgA nasales après administration nasale et intradermique de particules de chitosan vectorisant du MDP (Nod2) et de l'ovalbumine[253].

L'intérêt de la stimulation des récepteurs Nods par voie orale est notamment démontré par l'induction de réponses immunitaires dépendantes de Nod1 et Nod2 lors d'infections bactériennes intestinales. Il a en effet été montré que des souris déficientent pour le récepteur Nod2, étaient davantage sensibles à une infection orale (mais pas systémique) par *Listeria monocytogenes*[254].

Il a aussi été démontré récemment par Cooney *et al.* que la stimulation du récepteur Nod2 induisait un mécanisme d'autophagie dans des DCs humaines, influençant la prise en charge de bactéries, ainsi que la présentation antigénique[255]. Ils démontrent, ainsi, que l'autophagie médiée par Nod2 est nécessaire pour la génération de réponses T $CD4^+$ dépendantes de l'expression du CMH-II par les DCs. Ils démontrent aussi que chez les personnes atteintes de la maladie de Crohn (possédant une mutation sur le récepteur Nod2, le rendant non fonctionnel) il y a un défaut dans l'induction de l'autophagie, de la prise en charge des bactéries et de la présentation antigénique pouvant entraîner la persistance des bactéries conduisant aux symptômes inflammatoires de la maladie. Cette caractéristique du récepteur Nod2 est très intéressante en vaccinologie, puisqu'elle pourrait théoriquement permettre d'accroître et d'améliorer la présentation d'un Ag co-administré avec un ligand Nod2.

L'ensemble de ces caractéristiques fait des récepteurs Nods des cibles très intéressantes pour d'éventuels adjuvants vaccinaux inducteurs de réponses immunitaires muqueuses.

2.2. CIBLAGE DES DCs ET VECTORISATION D'ANTIGENES/LIGANDS DE PRRs PAR DES SYSTEMES PARTICULAIRES

De manière conceptuelle, les vaccins particulaires miment la nature particulaire des pathogènes et notamment, les paramètres de taille (du nano- au micromètre), qui facilitent leur prise en charge par les CPAs. En effet, la taille des particules influe sur les mécanismes de prise en charge par les CPAs et sur la façon dont l'Ag véhiculé sera présenté.

De nombreuses études ont ainsi été menées, afin de définir le rôle de la taille des particules dans la phagocytose. Tabata et Ikada ont ainsi étudié la phagocytose de microsphères de polystyrène (0,5 – 4,6 µm) par des macrophages de souris et ont rapporté qu'une phagocytose maximale était observée pour des particules de taille intermédiaire (1,7 µm)[256]. Des conclusions similaires ont été rapportées par Rudt *et al.* pour des granulocytes *via* des mesures indirectes de la phagocytose de particules d'un diamètre de 85 nm à 3,2 µm[257].

Scott I. Simon et son équipe ont aussi étudié la prise en charge de microparticules de polystyrène (0,5 – 8 µm) par des neutrophiles et des leukocytes humains et ont mis en évidence que la phagocytose diminuait avec l'augmentation de la taille des particules[258].

De manière générale, les études les plus récentes indiquent que l'endocytose de particules par les CPAs telles que les macrophages et les DCs se fait de manière efficace pour des tailles allant de 150 nm à 4,5 µm[259, 260, 261]. L'internalisation des grosses particules se produit le plus souvent par phagocytose, l'internalisation non-spécifique de particules plus petites (> 1 µm) peut se produire par macropinocytose. Les NPs plus petites peuvent être internalisées par différentes voies, telles que l'endocytose cavéoline- et clathrine-dépendante mais aussi cavéoline- et clathrine-indépendante[262] (Figure 2.10).

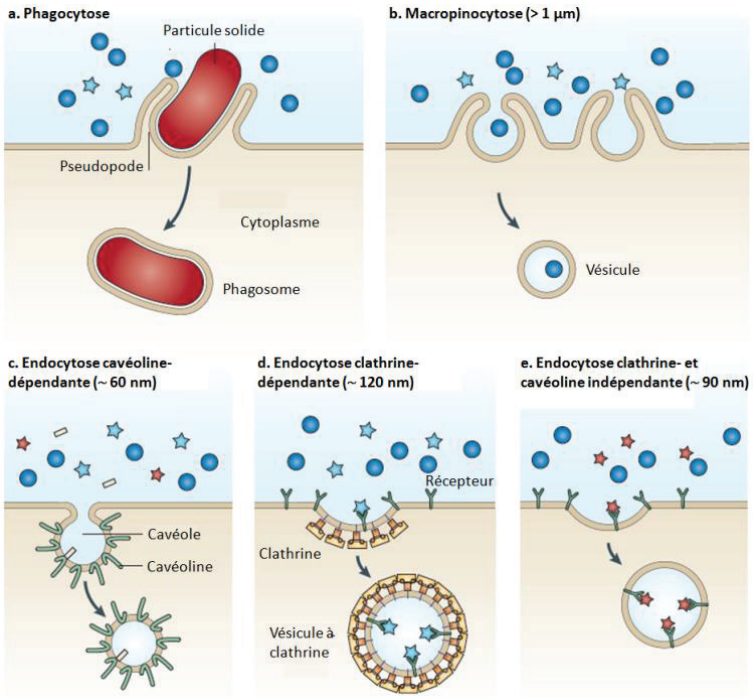


Figure 2.10 - Modes d'internalisation des particules en fonction de leur taille (adapté de Petros *et al.*[262]). Particules bleues (> 1 µm), étoiles bleues (~ 120 nm), étoiles rouges (~ 90 nm), rectangles jaunes (~ 60 nm).

Bien que la délivrance d'Ags sous forme particulaire améliore leur prise en charge et leur présentation par les DCs, la plupart des particules ne sont pas immunogènes par elles-mêmes. Cela offre la possibilité d'utiliser des molécules immunostimulantes qui pourraient permettre d'orienter/amplifier la réponse immunitaire[263]. Comme décrit précédemment, afin d'induire des réponses immunitaires optimales, il est crucial que les DCs, après prise en charge de l'Ag, subissent une activation et une maturation, afin de stimuler de manière efficace les réponses T. Des ligands mimant les PAMPs et ciblant ainsi les PRRs sont de plus en plus étudiés (voir section 2.2). De plus, l'incorporation de ligands TLR peut améliorer la phagocytose par les CPAs[264]. Des liposomes greffés avec des lipopeptides palmitoyl induiraient une augmentation des marqueurs de maturation à la surface des DCs *in vitro*[265]. Comme décrit dans la section 2.2, le MPLA (TLR4) a

été démontré comme moins toxique que le LPS et donc préférable pour l'utilisation en vaccinologie humaine. Le MPLA est en effet déjà utilisé en combinaison avec l'Alum (AS04), en tant qu'adjuvant dans les vaccins Cervarix® (HPV) et Fendrix (Hépatite B) (Tableau 2.2). De plus, des études ont aussi été menées sur l'incorporation de MPLA dans des particules de PLGA et des liposomes[266, 267]. Un autre composant bactérien, la flagelline (TLR5) est aussi utilisé comme adjuvant potentiel. Des peptides de la flagelline contenant un His-tag et incorporés dans des liposomes contenant un Ag tumoral, ont permis d'induire des réponses anti-tumorales aboutissant à une régression complète de tumeurs chez la souris[268]. L'avantage de la flagelline est qu'elle peut être co-intégrée en tant que protéine dans un vecteur particulaire ou intégrée grâce au His-tag dans des liposomes.

Les TLRs intracellulaires reconnaissent spécifiquement les acides nucléiques et sont d'une importance majeure dans la reconnaissance d'ADN ou d'ARN de virus et de bactéries intracellulaires. Il a été démontré que les motifs CpG (TLR9) pouvaient induire des réponses à médiation cellulaire *in vivo* lorsqu'ils sont incorporés dans des particules de PLGA[269], des liposomes[270] et d'autres microparticules[271]. Ces études ont montré une augmentation de la réponse Th1.

Actuellement, très peu d'études utilisant des ligands TLR7/8 ont été menées avec un vecteur particulaire. Johnston *et al.* ont démontré que la combinaison d'un ligand TLR7 avec des liposomes permettait d'augmenter la réponse cellulaire contre l'OVA dans un modèle murin[272]. Une autre étude a rapporté que la co-encapsulation de l'OVA et du polyU dans des microparticules de PLA-DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethyl-ammonium-propane) augmentait les titres en Ac et le nombre de LT sécréteurs d'IFNγ[273]. Pour finir, le poly I:C synthétique est très utilisé en tant qu'adjuvant potentiel, depuis qu'il a été démontré qu'il induisait une forte maturation des DCs[274, 275]. De plus, la combinaison du poly I:C avec des Ags encapsulés dans des particules polymériques[274] ou des liposomes[276] favorise une orientation Th1 de la réponse immunitaire.

Il est aussi intéressant de noter que la plupart des nano- ou microparticules peuvent être fonctionnalisées avec des ligands (lectines, intégrines, mannose, vitamines) ou des Ac dirigés contre des récepteurs de surface, afin de cibler spécifiquement des tissus ou des cellules[157, 262]. Les DCs expriment, en effet, des récepteurs lectine-like tels que les récepteurs au mannose DEC-205, MR/CD206 et DC-SIGN qui sont souvent considérés comme impliqués dans la phagocytose des pathogènes[277]. Il pourrait donc être intéressant de formuler des particules avec des Ac ou des ligands dirigés contre ces récepteurs, afin de favoriser leur prise en charge et ainsi délivrer de manière plus efficace l'Ag et/ou la molécule immunostimulante transporté(e). Ainsi l'utilisation de PLGA coatées avec un Ac humanisé hD1, améliore la présentation de l'Ag[278].

Malgré l'ensemble de ces observations, des questions subsistent encore concernant la co-délivrance de l'Ag et du composé immunostimulant. Certaines études tendent à montrer que la

co-délivrance de l'Ag et de la molécule immunostimulante par la même particule serait la formulation la plus efficace[279, 280], alors que d'autres indiquent que la co-délivrance par différentes particules serait plus efficient[281]. La question mérite encore d'être posée et dépend très probablement du type de système particulaire, de l'Ag, de la voie d'administration et bien sûr de la molécule immunostimulante.

2.4. CONCLUSIONS

Les systèmes particulaires de délivrance biodégradables à base de polymères synthétiques ou naturels offrent l'opportunité de contrôler la délivrance d'Ags et d'adjuvants. Ces NPs peuvent être préparées de différentes manières, allant de l'émulsion à différentes techniques induisant la précipitation du polymère après élimination des solvants par extraction, évaporation ou diffusion.

Les systèmes nanoparticulaires de délivrance utilisant le PLA/PLGA représentent un des systèmes les plus utilisés aujourd'hui en vaccination. Le PLA possède d'excellentes propriétés de relargage, d'excellents profiles en matière de toxicité et surtout il est homologué par l'US Food and Drug Administration (FDA)[164]. Ces types de particules ont été démontrés comme d'excellents vecteurs antigéniques capables d'induire des réponses immunitaires systémiques équivalentes ou supérieures à l'Alum ou le MF59 après administration parentérale dans divers modèles animaux. Ce type de particules améliore le passage des Ags à travers les muqueuses principalement par des mécanismes de transcytose *via* les cellules M au niveau intestinal et nasal[74, 158, 282]. Un des attributs majeur du PLA est la possibilité d'encapsuler ou d'adsorber un Ag ou une molécule immunostimulante dans ou à la surface des particules. Bien que l'administration la plus fréquente des NPs de PLA ait été par voie sous-cutanée ou intramusculaire, de nombreux groupes se sont orientés vers l'étude de la délivrance de ces particules par voie muqueuse et de nombreux efforts ont été réalisés, afin d'améliorer le passage des microsphères de PLA ou de PLGA à travers les différentes barrières muqueuses.

De manière générale, les systèmes de vectorisation ne présentent pas d'activité adjuvante intrinsèque. La majorité des polymères dont le PLA, le PLGA et le chitosan ont été utilisés dans de nombreuses formulations vaccinales pour leurs effets sur le relargage de l'Ag et l'adhésion aux surfaces muqueuses, mais ont très peu été étudiés pour leur capacité directe à stimuler les récepteurs de l'immunité innée. Des études ont cependant démontré que dans certains cas, les polymères utilisés pour élaborer ces NPs possèdent des activités immunostimulantes. Read *et al.* ont montré en effet que les particules de chitosan délivrées au niveau muqueux, étaient capable d'induire la production de cytokines, telles que l'IFNγ mais aussi des IgA et des IgG[283]. Récemment, Baaten *et al*. ont démontré que des NPs de chitine pouvaient stimuler la réponse immunitaire innée, après administration nasale *via* la production de TNFα, d'IFNγ et d'IL-6. Une autre étude récente a démontré que des particules de PLG et de polystyrène étaient capables

d'augmenter significativement la production d'IL-1β par des DCs de souris *via* l'activation de l'inflammasome[284].

Il faut noter que de manière générale, les particules de PLA ne possèdent pas d'activité immunostimulante intrinsèque et que l'utilisation de ligands des PRRs combinés à ces particules semble être une solution prometteuse afin de stimuler et/ou d'orienter la réponse immunitaire vis-à-vis d'un Ag cible.

3. IMMUNITE MUQUEUSE ET INFECTION PAR LE VIH-1 : APPLICATION AU DEVELOPPEMENT D'UN VACCIN INDUCTEUR DE REPONSES IMMUNITAIRES MUQUEUSES

L'épidémie de SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise) frappe désormais la totalité de la planète. On estime à 2,5 millions [2,2 millions – 2,8 millions] le nombre de personnes nouvellement infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en 2011, portant à environ 34 [31,4 – 35,9] millions de personnes vivant avec le VIH fin 2011. Cette même année, 1,7 million d'individus séropositifs sont décédés des suites de l'infection (UNAIDS, 2012). Pourtant, depuis le début de ce siècle, l'épidémie semble marquer le pas et le nombre de nouvelles infections par le virus diminue d'année en année (Figure 3.1). Ceci résulte de la combinaison de plusieurs facteurs, incluant les politiques de prévention mises en place, l'accès aux traitements antirétroviraux et la progression naturelle de l'épidémie. Cependant, en Afrique Subsaharienne, où l'épidémie est la plus sévère, presque 2/3 des patients concernés n'ont pas accès aux traitements disponibles, souvent du fait de l'absence de politique de santé publique volontaire et du prix trop élevé des médicaments pour les sociétés touchées.

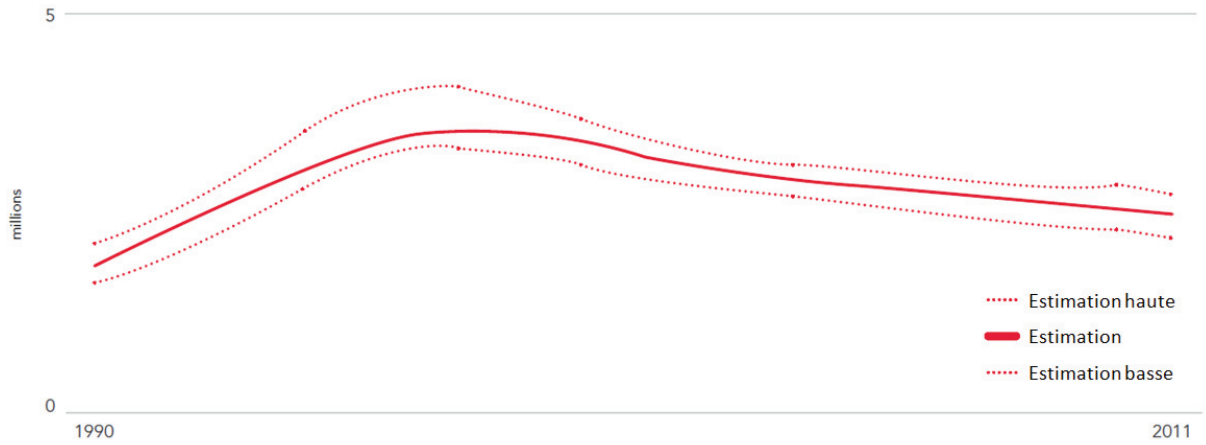


Figure 3.1 - Nombre de personnes nouvellement infectées par le VIH entre 1990 et fin 2011 (Source : UNAIDS, 2012)

Plus de trente millions de personnes sont déjà mortes depuis le début de l'épidémie. Le principal espoir d'endiguer la progression du virus demeure le développement d'un vaccin prophylactique efficace et à faible coût. Sa découverte représente un des défis médicaux majeurs de notre époque.

Le virus infecte les lymphocytes T $CD4^+$, les monocytes et les macrophages, il se multiplie activement et tue les lymphocytes activés, peu cytopathique pour les macrophages, et pas du tout pour les lymphocytes quiescents dans lesquels il persiste à l'état de provirus intégré. Sous trithérapie, le virus est éliminé du compartiment des cellules activées, mais persiste à l'état latent dans les cellules au repos (notamment les cellules mémoire). Une fois infecté, on ne peut plus éliminer le virus. Le vaccin doit donc permettre d'empêcher l'infection.

3.1. STRUCTURE ET CYCLE REPLICATIF DU VIH-1

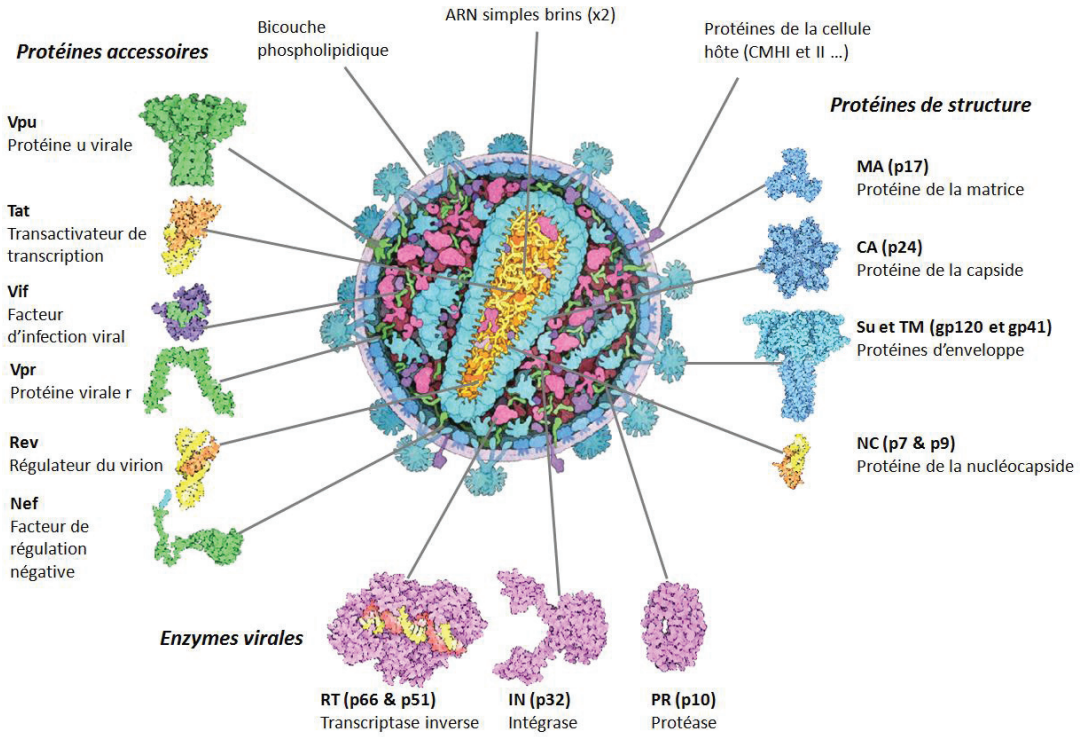


Figure 3.2 - Structure du VIH (Adapté de Protein Data Bank)

Le VIH fait partie de la famille des *Retroviridae*, sous-groupe lentivirus (évolution lente). Il s'agit d'un virus enveloppé à symétrie icosaédrique et de structure sphérique de 110 à 150 nm de diamètre (Figure 3.2). Il possède deux molécules d'ARN identiques associées aux protéines de nucléocapside (NC) et protégées par une capside (CA) conique constituée d'une protéine appelée p24, en référence à son poids moléculaire. La capside est associée *via* la protéine de matrice (MA) à une enveloppe membranaire qui la recouvre. Cette bicouche lipidique est dérivée de la membrane plasmique des cellules infectées, dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines (gp) d'enveloppe organisées en trimères et constituées de deux sous-unités : la gp120 extramembranaire et la gp41 transmembranaire. On considère que chaque particule virale contient en moyenne 5 000 monomères de capside, matrice et nucléocapside et une quinzaine de trimères d'enveloppe[285].

Outre le génome viral, la capside renferme certaines enzymes codées par le virus : protéase (PR), intégrase (IN), transcriptase inverse (RT) et les molécules Vif et Vpr (plus Vpx dans le cas du VIH-2). De nombreuses protéines cellulaires sont également incorporées à la surface ou à l'intérieur des particules virales[286].

3.1.1. Les protéines

De structure

Le gène *gag* code pour un précurseur p55 de 55 kiloDalton (kDa). Son clivage par la protéase virale PR durant l'assemblage permet la formation des protéines CA, MA, NC et de la protéine p6. Deux peptides de liaison, p2 et p1, sont également libérés.

L'enveloppe est synthétisée sous forme d'un précurseur de taille 160 kDa clivé par une endopeptidase cellulaire (protéase "furin like") durant sa migration vers la membrane. Cette protéolyse aboutit à la production de deux protéines, la gp120 (sous-unité de surface Su) et la gp41 (sous-unité transmembranaire TM). La gp120 permet l'interaction de la particule virale avec son récepteur CD4 (cluster de différenciation 4) et les co-récepteurs CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) ou CCR5 (C-C chemokine receptor type 5) des cellules cibles. La gp41 est à l'origine de la fusion entre les membranes virale et cellulaire.

Les enzymes

Les gènes *gag* et *pol* codent pour un précurseur Gag-Pol de 160 kD, synthétisé lorsque le ribosome procède à un décalage de phase à la fin de la synthèse du précurseur Gag. Plusieurs enzymes distinctes sont codées par le gène *pol* : la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. La protéase catalyse le clivage de Gag et Pol et la maturation du précurseur Gag. La transcriptase inverse est la polymérase ADN ARN-dépendante. Elle synthétise l'ADN à partir de l'ARN viral, tandis que son activité RNase H dégrade la matrice ARN une fois l'ADN synthétisé. L'intégrase catalyse l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte.

Régulatrices

Outre les protéines structurales et enzymatiques, le VIH-1 code pour deux protéines régulatrices : Tat (Transactivator of transcription) et Rev (Regulator of virion expression). Tat régule l'expression des gènes du VIH-1 au niveau transcriptionnel en se liant à TAR (Transactivation Response Region) qui est une structure secondaire en forme de boucle présente dans les LTR. La liaison de Tat à TAR active la transcription virale spécifique du VIH-1. Rev régule l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel en liant le RRE (Rev Response Element), séquence structurée présente dans le gène *env*, et en permettant l'export nucléaire des ARNm non épissés et de l'ARNg[287].

Auxiliaires

Enfin, contrairement aux rétrovirus simples, le VIH code pour des protéines auxiliaires, qui ne sont pas forcément nécessaires à la réplication cellulaire *in vitro* mais qui sont indispensables *in vivo*[288]. Il s'agit de Nef (Negative effector), Vif (Viral infectivity factor), Vpr (Viral protein r), Vpu

(Viral protein u) ainsi que Vpx (Viral protein x) dans le cas du VIH-2. La protéine Nef bloque l'apoptose cellulaire et réduit l'expression du récepteur CD4 et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II au niveau de la membrane cellulaire. Vif, Vpu et Vpx permettent au virus de contrer des facteurs de restriction de l'hôte : Vif inhibe l'activité antivirale de APOBEC3G[289], Vpu rend possible le relargage des virions à la surface des cellules infectées en inhibant la protéine Tetherin/BST2 et Vpx lève la restriction induite par la protéine SamHD1 dans certains types cellulaires[290]. Vpr induit un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2 et favorise l'infection des macrophages.

3.1.2. Cycle de réplication

Entrée du virus et intégration de l'ADN proviral

Le cycle réplicatif du VIH-1 (Figure 3.3) débute par l'attachement du virus à la surface des cellules. L'interaction de la gp120 avec le récepteur CD4 (1) conduit à un réarrangement de la gp120 qui expose les sites de liaison aux corécepteurs CCR5 ou CXCR4. L'interaction gp120-corécepteur induit un changement de conformation de la gp41, l'exposition de son peptide de fusion et son insertion dans la membrane plasmique. En se repliant, la gp41 provoque la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (2). Ceci conduit à l'entrée de la capside virale à l'intérieur du cytoplasme (3). La décapsidation de la particule induit la formation de complexes nucléoprotéiques viraux au sein desquels débute la transcription inverse. Ce processus aboutit à la formation d'une molécule linéaire d'ADN double brin, qui reste associée aux protéines virales MA, RT, IN, NC, Vpr, ainsi qu'à d'autres facteurs cellulaires, formant le complexe de pré-intégration (4). Le complexe est ensuite importé dans le noyau (5), l'activité enzymatique de l'IN catalyse alors une recombinaison qui provoque l'insertion de l'ADN viral (alors appelé provirus) au niveau de sites spécifiques de l'ADN cellulaire (6).

Traduction des protéines, transcription de l'ARNg et formation de particules

La transcription de l'ADN proviral est réalisée par l'ARN polymérase II cellulaire en coopération avec Tat, qui catalyse l'initiation et l'élongation de la transcription (7). Les transcrits viraux précoces épissés, codant pour les protéines Nef, Tat et Rev, sont exportés dans le cytoplasme (8). La protéine Rev, une fois traduite, est transloquée dans le noyau, lie les ARN non épissés (ARNg, ARNm codant pour Gag et Gag/Pol) et mono-épissés (ARN codant pour Env) et favorise leur export vers le cytoplasme (9). Ces ARN sont traduits en protéines de structure qui sont ensuite ciblées vers la membrane plasmique. La protéine d'enveloppe gp160 est synthétisée dans le réticulum endoplasmique et adressée à la membrane plasmique par la machinerie de sécrétion cellulaire. Lors de son transit dans l'appareil de Golgi, la gp160 est glycosylée puis clivée pour former des complexes matures gp41/gp120. La protéine Gag est traduite puis adressée vers les « lipid rafts » (régions de la membrane riches en cholestérol) où se trouvent les

glycoprotéines d'enveloppe (10). L'assemblage en particules des monomères de Gag active l'action enzymatique de la protéase (11). Celle-ci clive les monomères de Gag et Gag/Pol, permettant la production de particules virales matures et infectieuses (12 & 13).

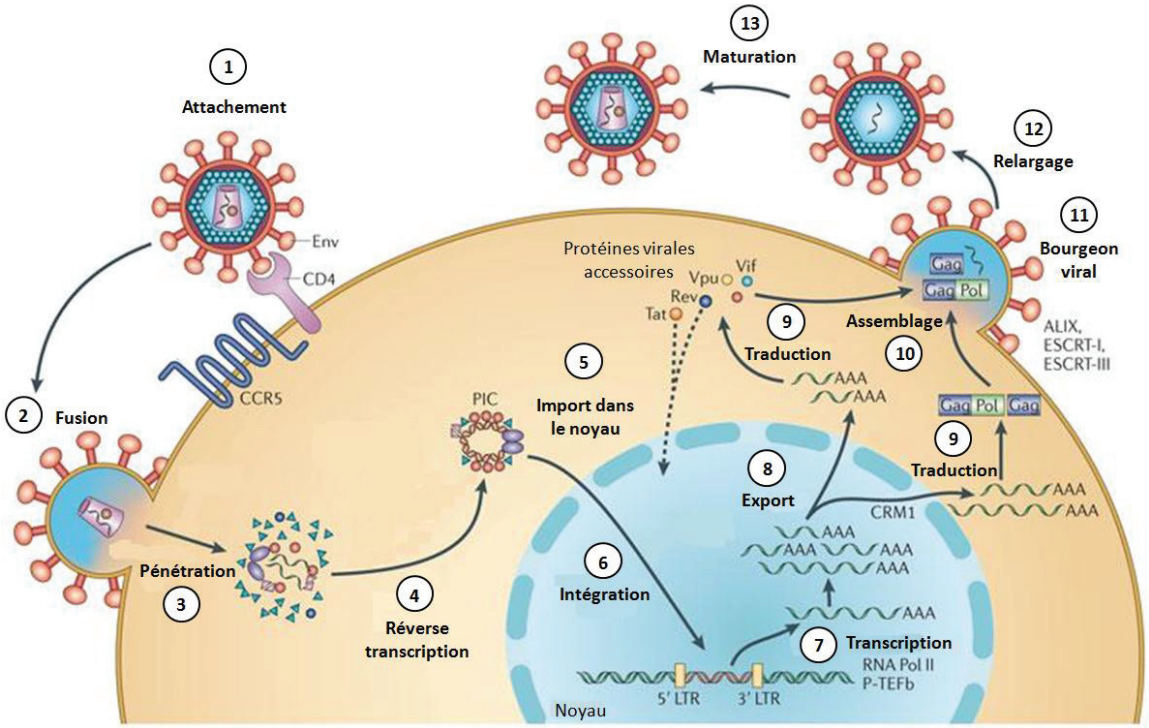


Figure 3.3 - Représentation du cycle de réplication virale du VIH-1 (adapté de Engelman *et al.*[291]).

3.2. LE SIDA, UNE MALADIE DES MUQUEUSES

Il existe plusieurs modes de transmission du VIH-1, dont l'importance relative varie considérablement avec le lieu géographique (Tableau 3.1). Ces modes de transmission sont :

- la transmission par voie sexuelle (rapport vaginal, anal et orogénital) ;

- la transmission par voie sanguine (transfusion et partage de seringue souillée) ;

- la transmission materno-fœtale (lors de la grossesse et/ou de l'accouchement).

La transmission lors des rapports hétérosexuels est aujourd'hui responsable de plus de 80 % des nouvelles infections dans le monde.

Tableau 3.1 - Probabilité de transmission du VIH-1 en fonction du site d'invasion[292].

Site initial de l'infection	Sub-localisation anatomique	Type d'épithélium	Liquide de transmission	Probabilité de transmission	Contribution aux cas de VIH dans le monde
Tractus génital féminin	Vagin	Pluristratifié, non-kératinisé			
	Ectocervicale	Pluristratifié, non-kératinisé	Sperme	1/200 – 1/2000	12,6 millions
	Endocervicale	Monostratifié			
Tractus génital masculin	Prépuce interne	Pluristratifié, légèrement kératinisé	Sécrétions cervico-vaginales et rectales et desquamation	1/700 – 1/3000	10,2 millions
	Urètre	Pluristratifié			
Tractus gastro-intestinal	Rectum	Monostratifié	Sperme	1/20 – 1/300	3,9 millions
	Tractus intestinal supérieur		Sperme, sang/lait maternel, sécrétions génitales	1/2500 1/5 – 1/10	1,5 millions 960 000
Placenta	Villosité choriales	Bi-stratifié (cyto- et syncytiotrophoblaste)	Sang maternel	1/10 – 1/20	480 000
Circulation sanguine			Sang	95/100 – 1/150	2,6 millions

Nous nous intéresserons dans cette partie exclusivement à la transmission par voie sexuelle.

3.2.1. Traversée de la barrière épithéliale

Lors d'un rapport sexuel, des particules virales (libres ou associées à des cellules infectées) sont retrouvées dans le sang, le sperme ou les sécrétions vaginales et à la surface de l'épithélium rectal de l'individu transmetteur[293]. Le virus pénètre dans l'organisme *via* l'épithélium muqueux du tractus génital (pluristratifié) ou du rectum (monostratifié), où débutera l'infection (Figure 3.4)[294].

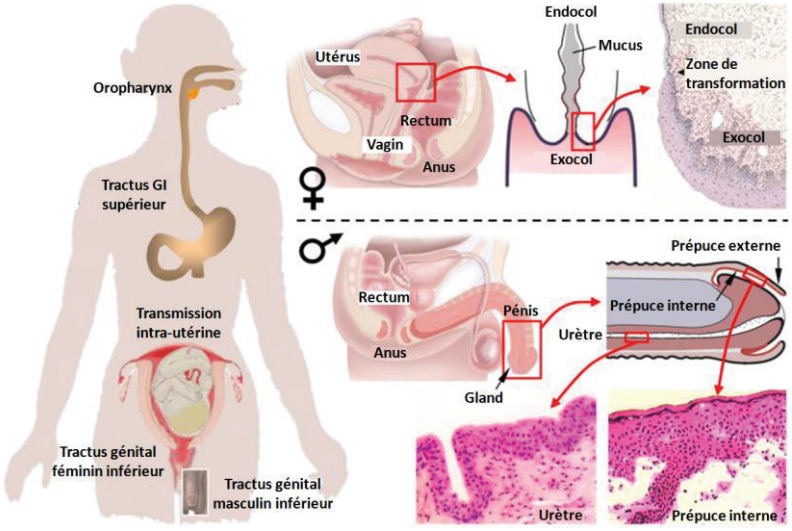


Figure 3.4 – Principaux sites d'invasions du VIH-1 (adapté de Hladik *et al.*[292]). Chez la femme, l'invasion virale se produit principalement *via* les zones non-kératinisées des épithéliums du vagin et de l'exocol ainsi que par l'épithélium monostratifié de l'endocol. Chez l'homme, l'invasion virale se produit essentiellement *via* les parties internes du prépuce ainsi que l'urètre. Les hommes sont aussi sujets à des infections *via* le rectum.

Dans les heures qui suivent une exposition au VIH-1, un nombre limité de virions traverse la barrière muqueuse pour établir une infection primaire[295] ; il a même été décrit que dans la majorité des cas, l'infection d'un individu est causée par un seul virus ou une seule cellule infectée, provoquant un phénomène d'entonnoir et de sélection de variants spécialisés dans l'infection d'un individu naïf[296]. La pénétration au niveau de l'épithélium des muqueuses, en temps normal faiblement pourvu de cellules cibles du virus, est facilitée par l'existence de lésions physiques et/ou la co-infection par un ou des germes sexuellement transmissibles. En effet, celles-ci peuvent notamment induire un enrichissement de la zone infectée en cellules immunitaires activées ($CD4^+$), cibles privilégiées du virus[297].

Le risque de transmission lors d'un rapport sexuel va dépendre de nombreux facteurs. La charge virale est directement corrélée au risque de transmission[298]. Dès lors, le premier facteur de risque est le stade d'évolution de la maladie de l'individu transmetteur, puisqu'elle conditionne directement la quantité de virus présents dans le sang et les sécrétions. D'autres facteurs entrent en jeu, comme la circoncision, l'infection par d'autres germes sexuellement transmissibles, la présence de sang ou de lésions au niveau des muqueuses sexuelles et le fait que la personne infectée suive un traitement antirétroviral.

Au-delà de ces facteurs, le risque dépendra aussi du type de relation sexuelle. En moyenne, la fréquence de transmission du virus de la femme vers l'homme lors d'un rapport hétérosexuel vaginal va être de 0,04 % et de 0,08 % de l'homme vers la femme. Ces valeurs sont multipliées par 20 lors d'un rapport anal[292]. Il n'existe pas de réelles statistiques concernant le risque de transmission lors d'un rapport oro-génital mais des cas de transmission ont été rapportés[299].

Dans l'immense majorité des cas, l'infection est initiée par des souches dites « R5 », qui utilisent les récepteurs CD4 et CCR-5. Les premières cellules cibles sont les lymphocytes T $CD4^+$ et $CCR\text{-}5^+$ (lymphocytes mémoire des compartiments sous-muqueux et ganglionnaires). L'atteinte des lymphocytes T circulants ($CD4^+$, $CXCR\text{-}4^+$) ne survient que plus tard. Elle favorise l'émergence de variants viraux dits « X4 ».

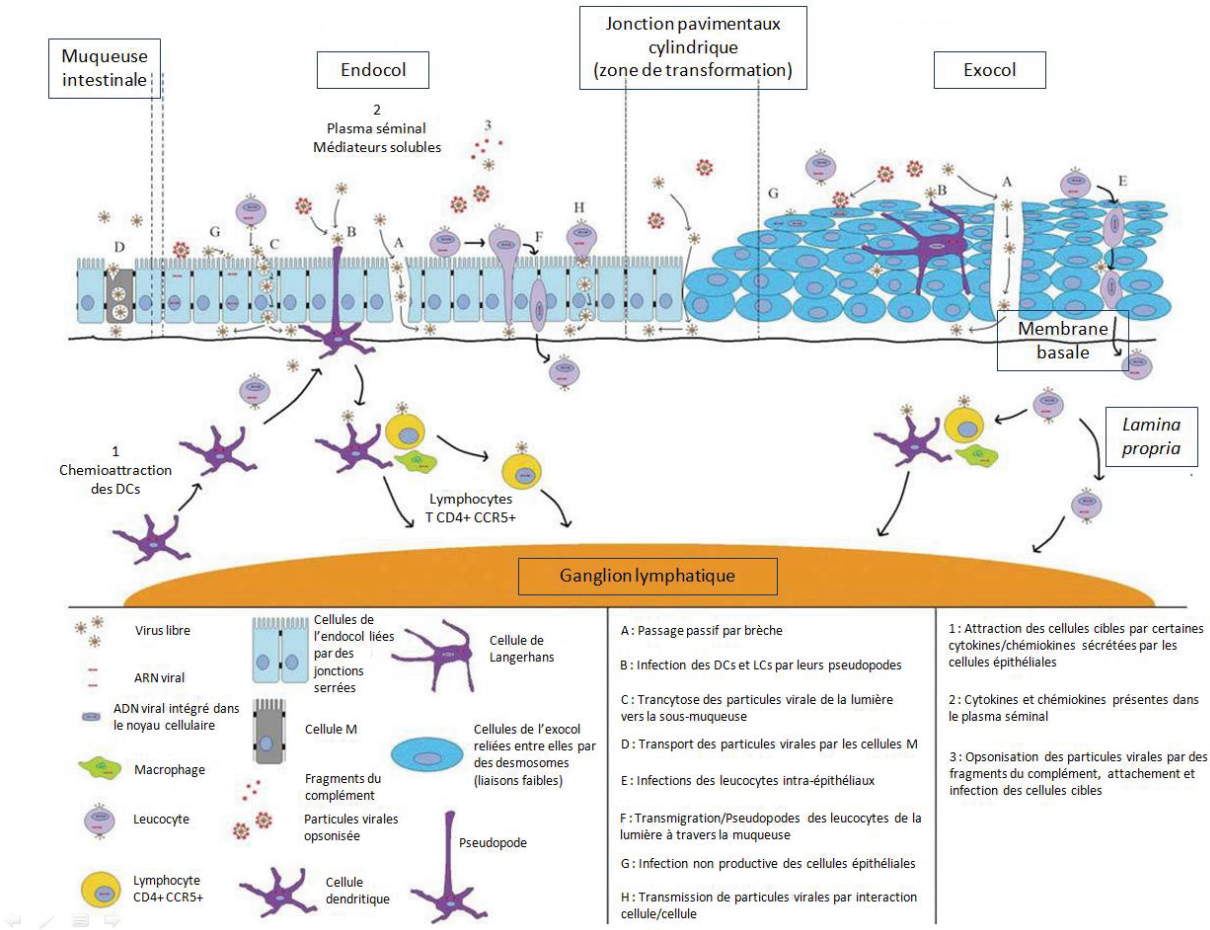


Figure 3.5 - Transmission du VIH à travers une muqueuse mono et pluristratifiée[300].

3.2.2. Etablissement des réservoirs viraux

A partir d'une petite population de cellules infectées, l'infection connait une expansion locale pendant la première semaine de l'infection puis devient systémique[294]. L'infection aiguë est ainsi caractérisée par l'établissement précoce de réservoirs viraux[301] et de l'explosion de la réplication virale résultant en la destruction rapide et massive des lymphocytes T $CD4^+$ de la muqueuse intestinale[302]. Les dommages causés ainsi dans la muqueuse gastro-intestinale conduisent à une invasion bactérienne et à une inflammation chronique[303], prémices de la mise en place d'une immunodéficience progressive.

Les tissus lymphoïdes périphériques tels que les ganglions lymphatiques axillaires et inguinaux, drainant respectivement les bras et les jambes, ainsi que la rate, ont longtemps été considérés comme les sites majeurs de la réplication du VIH/SIV[304]. De nombreuses données indiquent aussi que le GALT, qui contient des sites inducteurs de l'immunité (PPs et ganglions mésentériques), ainsi que des sites effecteurs (LP), est aussi un tissu prédominant dans la réplication précoce du virus et représente un réservoir important[305]. Du fait que la muqueuse intestinale représente le réservoir principal pour la réplication du VIH, les stratégies vaccinales doivent être capables d'induire des Ac ainsi que des réponses cellulaires au niveau de cette muqueuse.

3.3. L'INTESTIN : RESERVOIR DU VIH-1

Lorsque la trithérapie est apparue au milieu des années 1990, il a initialement été conclu qu'un traitement prolongé pourrait permettre d'éliminer le virus. Depuis, il a été prouvé que, dans certaines conditions, le virus peut persister des années même en présence d'antirétroviraux. On parle, dans ce cas, de réservoirs viraux. Les lymphocytes T mémoire constituent majoritairement ces réservoirs. Les lymphocytes T activés sont très sensibles à l'infection par le VIH-1 et sont généralement détruits rapidement, soit par les effets du virus, soit par la réponse immunitaire. Cependant, certaines cellules peuvent être infectées et retourner à l'état de repos, sous la forme de lymphocytes mémoire[306] et le virus peut être réactivé lors d'une interruption de la trithérapie. Cette latence est due à plusieurs facteurs : faible stock de nucléotides, facteurs de transcription (NF-κB) exclus du noyau à l'état de repos ou encore l'incapacité d'importer l'ADN viral dans le noyau[307]. Ces réservoirs sont extrêmement stables et des études ont estimé la demi-vie de ces cellules à 44 mois. Dans ces conditions, il faudrait plus de 73 années de thérapie pour éradiquer les virus de ces réservoirs. Ainsi, quelle que soit la voie d'infection par le VIH-1 : sexuelle à travers les muqueuses génitales, rectales ou orales ; par contamination sanguine, ou verticale mère-enfant, le VIH-1 s'établit et se réplique rapidement dans les organes lymphoïdes associés aux muqueuses qui servent de réservoir pour le virus[308].

Le tractus gastro-intestinal constitue le compartiment immunitaire le plus important de l'organisme, et les lymphocytes T associés à l'épithélium de l'intestin grêle représentent au moins 60 % des cellules T de l'organisme humain. Par rapport aux lymphocytes circulants, ou présents dans les ganglions lymphatiques, une majorité de ces lymphocytes $CD4^+$ expriment le co-récepteur CCR5, à un taux très important, de même que le co-récepteur CXCR4. Le VIH-1 se répliquant plus facilement dans les lymphocytes activés, le tractus intestinal constitue donc un site privilégié de réplication virale[309]. De plus, ce compartiment contient énormément de lymphocytes T $CD4^+$ mémoire dont on vient de voir qu'ils constituent le principal réservoir cellulaire du VIH-1[310]. La persistance de l'infection par le VIH dans les muqueuses intestinales a également été démontrée par l'observation de la réponse immune cytotoxique de l'hôte. Ainsi chez les macaques chroniquement infectés par le SIV (Virus de l'Immunodéficience Simienne), l'activité VIH-spécifique des cellules T cytotoxiques est nettement supérieure dans les muqueuses intestinales que dans le sang ou les ganglions lymphatiques[311].

Récemment, il a été décrit que la glycoprotéine d'enveloppe gp120 se liait spécifiquement à l'intégrine α4β7 présente à la surface des lymphocytes T $CD4^+$ muqueux[312]. L'intégrine α4β7 apparaît dans un complexe avec le récepteur CD4 à la surface des lymphocytes permettant la capture des virions. L'interaction gp120/α4β7 jouerait un rôle crucial durant les phases précoces de l'infection intestinale. C'est plus précisément, une courte partie de la boucle V2 (présente sur la gp120) qui reconnaîtrait la chaîne alpha-4 de l'intégrine sur les cellules hôtes[313]. A chaque fois, et bien que la gp120 soit extrêmement variable, la séquence Leu-Asp-Val est toujours conservée

suggérant que cette interaction fournit un avantage sélectif au virus. L'affinité de la gp120 pour α4β7 semble être un mécanisme important pour le VIH-1 permettant de cibler les cellules activées critiques pour la propagation et la diffusion du virus.

3.4. CORRELATS DE PROTECTION

Dans la perspective de développer un vaccin efficace contre le SIDA, de nombreuses études se sont intéressées aux déterminants naturels de protection, qu'ils soient contre l'infection par le virus ou contre le développement de la maladie. La caractérisation de ces corrélats de protection est la première étape de la conception rationnelle d'un vaccin.

Actuellement, aucun marqueur biologique n'a été clairement défini comme corrélant avec un contrôle de la réplication virale. La recherche de ce dernier est d'une importance cruciale pour le développement d'un vaccin prophylactique ou thérapeutique.

De nombreuses études ont fait état d'individus appelés ENI (Exposés Non Infectés) qui demeurent séronégatifs malgré une exposition répétée au VIH. La communauté scientifique s'est intéressée aux ENI lorsque le journal *Lancet* a publié une étude décennale sur l'incidence de l'infection par le VIH-1 au sein d'une cohorte de 424 prostituées à Nairobi au Kenya. Les résultats de cette étude ont montré que 14 % des prostituées étaient restées séronégatives après trois années de pratiques à risque[314]. Cette étude, porteuse de l'espoir d'identifier un facteur génétique ou immunologique lié à la protection contre le virus, a entraîné une vague de publications portant sur d'autres cohortes similaires. Cependant, l'interprétation des résultats s'est avérée délicate puisque la protection observée pouvait être causée par une combinaison de facteurs[315], être efficace uniquement pendant des périodes limitées[316], ou simplement être due à une exposition insuffisante. Ce dernier point est particulièrement plausible considérant le faible taux de transmission du virus par voie sexuelle. Cependant, plusieurs paramètres génétiques et immunitaires retrouvés chez les ENI ont été associés aux protections observées.

De nombreux groupes de recherche se sont aussi concentrés sur les sujets infectés qui contrôlent (tout ou en partie) leur charge virale sans HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) tels que les LTS (Long Term Survivors), LTNP (Long Term Non-Progressors) et les EC (Elite Controllers) pour le développement de vaccins thérapeutiques. Pour certains LTNP, il a été démontré que le virus lui-même était la raison de la non-progression due à une délétion dans le gène *nef* qui influençait négativement sur la réplication virale[317]. En terme de vaccination, il est plus important de se concentrer sur les facteurs de protection de l'hôte afin de développer un vaccin inducteur d'une protection efficace.

3.4.1. Résistance naturelle et facteurs génétiques de l'hôte

Des études ont mis en évidence plusieurs facteurs génétiques de résistance à l'infection, à commencer par une délétion de 32 paires de bases dans le gène du corécepteur CCR5 (CCR5Δ32). Les personnes hétérozygotes (5 à 15 % des individus européens) et surtout les personnes homozygotes sont relativement protégées de l'infection par le virus[318]. Cette protection est suffisante pour qu'une greffe de cellules souches hématopoïétiques homozygotes pour le CCR5Δ32 chez un patient séropositif lui ait permis de développer un contrôle total de sa charge virale, y compris après l'interruption du traitement antirétroviral[319].

Certaines molécules intracellulaires, exprimées par l'hôte, peuvent (au moins en partie) protéger contre l'infection cellulaire ou le relargage du virus. Les facteurs de restriction les plus importants identifiés aujourd'hui sont APOBC3G (et APOBEC3F), TRIM5α et la tétherine. APOBEC3G est une cytokine déaminase qui incorpore une adénosine à la place d'une guanosine durant la synthèse de l'ADN viral, résultant en un ADN proviral défectueux[320]. De plus, APOBEC3G induit une cytotoxicité médiée par les NK qui peuvent ainsi lyser efficacement les cellules infectées par le VIH dont l'expression du CMH-I à la surface des cellules est inhibée par le virus[321]. Les individus exprimant une forte quantité d'APOBEC3G présentent une charge virale plus faible lors de la phase aiguë de l'infection[322]. TRIM5α se fixe à la capside virale, bloquant la réplication précoce[323]. La tétherine interfère sur le relargage des virions par induction de l'attachement des virions les uns aux autres et à la membrane de la cellule hôte[324].

Certains polymorphismes des molécules du HLA (Human Leucocyte Antigen) ainsi que les récepteurs des lymphocytes T et/ou NK peuvent affecter la réponse cellulaire anti-VIH. Il a été démontré dans différentes cohortes que les molécules HLA B*27, B*57 et B*58 sont associées à un meilleur contrôle du VIH-1 et à une progression plus lente de la maladie[325, 326]. La molécule HLA B*57 joue aussi un rôle dans la réponse immune innée protectrice, agissant comme un ligand naturel inhibant les KIRs (Killer Ig-like Receptors). Une activité accrue de ces cellules NK et l'augmentation de l'expression de leurs récepteurs KIR3DS1 et KIR3DL1 ont été associées à un risque réduit d'infection dans une cohorte de consommateurs de drogues par injection intraveineuse[327, 328].

3.4.2. Corrélats immunitaires

Plusieurs groupes ont mis en évidence des réponses immunitaires adaptatives contre le VIH chez des ENI, qu'elles soient cellulaires ou humorales[329, 330] et notamment des IgA neutralisantes muqueuses[331, 332, 333].

Les IgA sont en effet la première ligne de défense immunitaire contre un grand nombre d'infections virales s'initiant au niveau des surfaces muqueuses. Les mécanismes par lesquels les IgA muqueuses sont induites et comment la reconnaissance des pathogènes par le système

immunitaire inné induit des commutations de classes vers cet isotype sont actuellement très étudiés et permettront d'obtenir des informations cruciales pour le développement d'un vaccin anti-VIH efficace[334].

Il y a actuellement un regain d'intérêt pour le rôle potentiel des IgA muqueuses dans la protection contre le VIH-1. De récentes études chez le primate non-humain menées par l'équipe de Morgane Bomsel, indiquent que la préexistence d'Ac dirigés contre la gp41 et en particulier d'IgA, induites par immunisations nasale et intramusculaire (virosomes), pourraient avoir un rôle important dans les mécanismes de protection[129].

Après exposition au virus, il existe une fenêtre étroite de vulnérabilité de ce dernier qui pourrait permettre aux Ac inhibiteurs au niveau des surfaces muqueuses d'agir[335]. La présence d'Ac anti-VIH-1 au niveau de ces muqueuses au moment de la transmission du virus pourrait permettre de le bloquer. Les mécanismes par lesquels les Ac pourraient empêcher le passage du VIH-1 à travers la barrière muqueuse incluent la neutralisation direct du virus, l'agrégation virale, l'inhibition de la transcytose, la neutralisation intra-épithéliale, la phagocytose et la neutralisation médiée par le récepteur Fc (cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac – ADCC)[336, 337]. L'induction d'Ac muqueux dirigés contre Env pourrait donc être une solution.

En effet, des titres élevés en IgA neutralisantes on été détectés au niveau des surfaces muqueuses de certains ENI[338]. De plus, dans de nombreux modèles de transmission, une immunisation passive avec des Ac monoclonaux neutralisants au niveau muqueux, ont permis de protéger des macaques d'une infection[339, 340].

L'essai clinique RV144 a permis d'induire une protection estimée à 31,2 %. Des études menées sur les corrélats de protection semblent indiquer que la présence de titres élevés en IgG sériques dirigées contre les régions variables 1 et 2 (V1V2) des protéines d'enveloppe du VIH-1 est corrélée avec une diminution significative de l'infection. En revanche, la présence d'IgA sériques dirigées contre Env est corrélée directement avec une augmentation de l'infection[341].

Cependant, aucun rôle des IgA dimériques muqueuses n'a pu être évalué du fait qu'aucun prélèvement muqueux n'a été réalisé.

A l'inverse, une fois que l'infection est établie, les Ac neutralisants semblent être incapables de contrôler la propagation du virus[342]. Afin d'éliminer les cellules infectées, de fortes réponses T $CD8^+$ semblent être primordiales. La plupart des individus infectés (excepté les « rapid progressors ») montrent en effet de fortes réponses T $CD8^+$ en réaction au premier pic de virémie, résultant en une baisse de la charge virale lors de l'infection précoce. Malheureusement, dans la plupart des cas (excepté pour les EC), ces réponses ne sont pas capables de maintenir un contrôle total, principalement dû à l'échappement immunitaire[343] et à l'activation d'une immunité chronique[344], finissant par aboutir à un épuisement en cellules T[345]. A l'inverse, chez les EC, la réponse T $CD8^+$ spécifique du VIH préserve ses fonctions et de nouvelles réponses $CD8^+$ peuvent

survenir contre l'échappement des variants viraux[325]. De plus, une forte affinité des récepteurs des cellules T pour les complexes CMH-I-épitope a été démontrée comme induisant des LT $CD8^+$ polyfonctionnels induisant ainsi la lyse des cellules cibles plus rapidement[346]. De plus, la présence de LT $CD8^+$ polyfonctionnels, qui ont la capacité d'exercer différentes fonctions effectrices (production d'IFNγ, TNFα, IL-2, MIP-1β, perforines et/ou granzymes) et de proliférer après exposition à un Ag de stimulation, ont été associés à des statuts « controllers »[347]. Une autre observation importante issue de l'étude de Geldmacher *et al.* a rapporté que les réponses dirigées contre les épitopes Gag sont dominantes et potentiellement protectrices chez les LTNP et les EC[348].

Comme il a déjà été expliqué, la maturation et la différenciation des LT $CD8^+$ en cellules mémoire et effectrices sont aussi dépendantes des LTh $CD4^+$. Les LT $CD4^+$ restants, après une forte déplétion durant le stade aigu de l'infection, ont besoin d'être polyfonctionnels pour la production d'IFNγ et d'IL-2 afin de proliférer après stimulation antigénique[349] et fournir les signaux nécessaires aux CTL. Cette fonction Th1 est réduite chez les non-controllers[350].

Malheureusement, aucun de ces facteurs ne peut vraiment prédire une protection contre une infection par le VIH[351]. C'est pourquoi il semble souhaitable de conclure que l'ensemble de ces corrélats de protection (Tableau 3.2) doit être pris en compte dans la conception d'une thérapie anti-VIH. Cela inclut la préservation des LT $CD4^+$ et de la disponibilité d'une mémoire centrale et de LT $CD8^+$ mémoire avec une forte spécificité des régions hautement conservées.

Tableau 3.2 – Principaux corrélats de protections contre le VIH-1.

Niveau de protection	Corrélats de protections suggérés	Réfs
Facteurs viraux	Délétion dans *Nef*	317
Facteurs génétiques de l'hôte	CCR5 Δ32/Δ32	319
Facteurs de restriction de l'hôte	Facteur antiviral APOBEC3G	321
	Production de TRIM5α	323
	Augmentation de la tetherine	324
	HLA B*27, B*57, B*58	325
	KIR3DL1, KIR3DS1	327, 328
Réponse humorale	Ac neutralisants : IgA au niveau des surfaces muqueuses	331, 332, 333
Réponse cellulaire	LT polyfonctionnels	346
	Prolifération des LT $CD4^+$ et $CD8^+$	347
	Avidité des réponses T spécifiques du VIH	350

3.5. TRENTE ANS DE RECHERCHE VACCINALE ANTI-VIH-1

Malgré presque trente ans de recherche à travers le monde, le développement d'un vaccin anti-VIH-1 efficace et sans danger reste un défi majeur. Malgré les récentes avancées dans notre compréhension de la pathogénèse et de l'immunologie du VIH-1, de nombreux obstacles sont encore à franchir. Des prototypes de vaccins anti-VIH-1 dont le but était d'induire des réponses immunitaires humorales et cellulaires n'ont pas permis, jusqu'ici, de protéger de manière efficace contre l'infection lors d'essais cliniques. Les générations futures de candidats vaccins sont actuellement à différents stades de développements précliniques et cliniques, mais de nombreux

obstacles scientifiques sont encore à franchir. Ces difficultés comprennent la grande diversité du virus conduisant à la difficulté de générer en grande quantité des Ac neutralisants et des réponses cellulaires spécifiques efficaces.

3.5.1. Réponses immunitaires cellulaires et humorales anti-VIH-1

Les réponses immunitaires développées par l'hôte permettent un contrôle partiel de la réplication virale mais sont incapables d'éradiquer le virus. Des réponses T spécifiques du virus sont détectées de manière concomitante avec le contrôle de la virémie précoce[352], suggérant un rôle important de la réponse cellulaire ($CD8^+$) dans le contrôle de la réplication virale. Dans les infections chroniques, l'ampleur de la réponse cellulaire spécifique de Gag est inversement proportionnelle au niveau d'ARN viral[353]. De plus, le virus mute rapidement afin d'« échapper » à la réponse T $CD8^+$, démontrant la pression sélective exercée par cette réponse[354]. De plus, des études génétiques ont montré une association entre une augmentation de l'expression des allèles codant pour le CMH-I et une diminution du niveau d'ARN viral[355].

D'autres données permettent de mettre en évidence l'importance de la réponse cellulaire antivirale, notamment chez le Macaque rhésus. Lors d'infection par le SIV, la déplétion des lymphocytes $CD8^+$ a supprimé le contrôle de la réplication virale à la fois en phase aiguë et chronique[356]. Toujours chez le Macaque, il a été démontré que les stratégies vaccinales capables d'induire des réponses cellulaires puissantes permettaient de réduire la charge virale après challenge par le SIV[357, 358]. Toutefois, une des limitations les plus importantes de l'induction de réponses cellulaires est le fait qu'elles ne permettent pas de prévenir la contamination, bien que des contrôles efficaces de l'infection au niveau des muqueuses aient été obtenus dans certains essais[359].

L'importance de la réponse immunitaire humorale dans le contrôle de la réplication du VIH-1 est beaucoup moins claire. Des réponses Ac sont rapidement détectées chez des individus infectés, mais les Ac neutralisants n'apparaissent que plus tardivement[360]. Des études récentes ont commencé à révéler les nombreuses stratégies utilisées par les virus pour échapper à la réponse Ac. Une fraction importante des Ac dirigés contre le VIH-1 cible des débris viraux tels que la glycoprotéine d'enveloppe (Env) gp120 monomérique plutôt que les trimères d'Env à la surface des virions[361]. Ces glycoprotéines sont aussi très largement glycosylées, formant ainsi un « bouclier glycanique » masquant de nombreux épitopes potentiellement neutralisants[362].

Le site de fixation (hautement conservé) au CD4 est aussi une cible de choix pour les Ac neutralisants[363] mais est dissimulé dans une poche hydrophobe[364]. De plus, le site de fixation au CXCR4/CCR5 ainsi que les épitopes clés de la région externe de la gp41 ne sont accessibles que transitoirement pendant le processus de fusion membranaire[365]. De plus, le virus peut rapidement échapper aux Ac neutralisants grâce à des mutations au niveau du bouclier glycanique[366].

Malgré ces nombreuses difficultés, de nombreux Ac monoclonaux ont montré une capacité à neutraliser de larges gammes d'isolats viraux[367]. Ces Ac ciblent le site de fixation au CD4, les glucides à la surface de la gp120 ainsi que la région externe de la gp41[368]. Cependant, ces types d'Ac sont très difficiles à induire par vaccination, sans doute dû à une inaccessibilité ou une exposition trop transitoire des épitopes clés ainsi que la possible induction d'une tolérance[369]. Cependant, certains individus infectés chroniquement par le VIH-1, présentent naturellement des titres en Ac neutralisants élevés spécifiques du site de fixation au CD4 ainsi que des épitopes de surface du virus[363, 370] prouvant une induction possible de ce type d'Ac.

Le développement d'Ag permettant l'induction d'Ac neutralisants reste un problème non résolu dans le développement d'un vaccin anti-VIH-1. Des études chez le Macaque rhésus ont pourtant montré que l'administration (intraveineuse ou vaginale) de fortes doses d'Ac monoclonaux (2F5 and 2G12) spécifiques des gp de surface, pouvaient bloquer la transmission du SHIV[371, 372] suggérant le potentiel d'un vaccin capable d'induire de tels Ac. Il est donc couramment admis qu'un immunogène capable d'induire ce type de réponses Ac neutralisantes est nécessaire pour bloquer une infection par le VIH-1.

3.5.2. Essais cliniques et vaccins anti-VIH-1

Le but d'un vaccin anti-VIH doit être de prévenir l'infection ou de réduire la charge virale après l'infection. Un vaccin idéal devrait permettre de bloquer complètement l'infection et d'induire une immunité neutralisante. Bien qu'un tel vaccin soit optimal, ce degré de protection n'est bien souvent jamais atteint par la majorité des vaccins déjà homologués pour un usage humain. En effet, la plupart des vaccins antiviraux fonctionnent en contrôlant la réplication virale prévenant ainsi le développement de la maladie. Il semblerait donc plus réaliste de développer un vaccin anti-VIH « suboptimal » permettant un simple contrôle immunitaire (même partiel) de la réplication virale après infection. Un tel contrôle a déjà été démontré dans certaines études précliniques de vaccins inducteurs de réponse T, induisant une réduction du pic viral et de la charge virale finale après infection.

De plus, la charge virale représentant un des facteurs principaux et déterminant de la transmission du VIH-1[298], il est tout à fait concevable qu'un vaccin inducteur d'une protection partielle puisse avoir un impact sur l'épidémie.

Depuis le premier essai clinique en 1987 d'un vaccin basé sur l'utilisation d'une gp160 recombinante, plus de 150 candidats vaccins ont été testés. Ceux-ci reflètent trois phases successives de stratégies de vaccination, incluant tout d'abord les approches pour stimuler la synthèse d'Ac neutralisants, puis ciblant l'immunité cellulaire pour enfin se concentrer sur une combinaison de réponses cellulaires et humorales[373]. Actuellement, seuls six essais testant quatre stratégies distinctes ont été poursuivis jusqu'en phase IIb ou III, phases d'essai d'efficacité (Tableau 3.3). Les deux premiers, Vax 003 et Vax 004, testant la capacité protectrice de la

vaccination avec des monomères recombinants de gp120, n'ont pas pu protéger les volontaires vaccinés[374, 375]. Si aucune formulation vaccinale n'a démontré suffisamment d'efficacité pour espérer être commercialisée, plusieurs informations ont été apportées par les derniers essais cliniques réalisés.

Tableau 3.3 – Principales études cliniques vaccinales anti-VIH-1.

Concept vaccinal	Développeur	Etude	Statut	Réfs
Gp120 monomérique (B/B, B/E)	VaxGen	VAX 003, VAX 004 (phase III)	Complété en 2003	374
rAd5-Gag/Pol/Nef	Merck	HVTN 502 STEP, HVTN 503 Phambili (phase IIb)	Stoppé en 2007	376
ALVAC (vCP1521) prime, gp120 (B/E) boost	Sanofi, VaxGen (GSID)	RV144 (phase III)	Complété en 2009	377
ADN prime, rAd5 boost Gag/Pol/EnvA/EnvB/EnvC	NIH VRC	HVTN 505 (phase II)	Débuté en 2009	378

L'essai vaccinal STEP

En 2007, les premiers résultats d'un test d'efficacité évaluant un vecteur adénovirus de type 5 (Ad5) trivalent non réplicatif, particulièrement conçu pour induire des réponses cellulaires, ont montré l'incapacité du vaccin à protéger contre l'infection ou permettre un contrôle de la charge virale post-infectieuse[376]. Contre toute attente, les analyses qui ont suivi ont montré que les hommes vaccinés non circoncis et séropositifs pour l'Ad5 avant la vaccination ont présenté un risque plus élevé de contracter l'infection par le VIH-1 que le groupe ayant reçu un placebo (Figure 3.6). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette observation, avec notamment l'augmentation du homing des lymphocytes T $CD4^+$ au niveau des muqueuses, offrant ainsi un plus grand nombre de cibles au virus[379] mais aucun n'a été clairement démontré chez les participants de l'essai[380]. Ce travail, en plus de souligner les limites du modèle SHIV qui n'avait pas prédit l'échec de la stratégie, démontre l'importance d'étudier le rôle de pré-immunité contre les vecteurs lors des futurs essais cliniques.

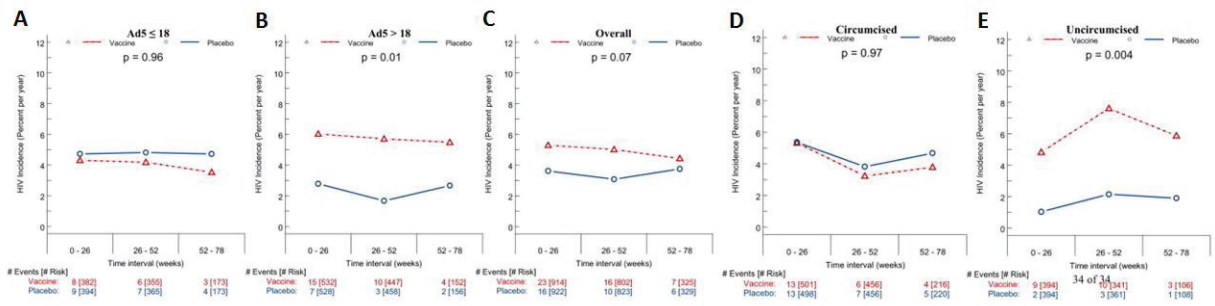


Figure 3.6 – Incidence du VIH à six mois d'intervalle chez des sujets vaccinés et ayant reçu un placebo lors de l'essai clinique STEP[376]. (A) Sujets avec des titres en Ac anti-Ad5 ≤ 18 ; (B) Ac anti-Ad5 > 18 ; (C) Tous groupes confondus ; (D) Hommes circoncis ; (E) Hommes non-circoncis.

L'essai vaccinal "Thaï" RV144

Le 24 septembre 2009, des scientifiques de l'armée américaine annonçaient pour la première fois avoir obtenu une protection partielle contre l'infection par le VIH lors d'un essai d'efficacité. Le vaccin utilisé lors de l'essai RV144 est en réalité une combinaison de deux vaccins différents qui ont précédemment été testés en phase II chez l'homme. Il s'agit des préparations ALVAC-HIV et AIDSVAX, administrées en *prime-boost*. L'ALVAC est un vecteur recombinant CanaryPox qui exprime les Ag Gag/Protéase de clade B (souche LAI) du VIH ainsi que l'enveloppe gp120 d'un virus de clade E associé à la partie transmembranaire de la gp41 de la souche LAI. AIDSVAX correspond aux protéines d'enveloppe gp120 de clade B et de clade E. L'efficacité modeste (31 %) annoncée après l'essai décroît avec le temps, et si la plupart des vaccinés ont développé des Ac contre le VIH, leur titre s'est effondré après 24 semaines[381]. Par ailleurs, le vaccin n'a eu aucun effet sur la charge virale des individus infectés[377].

Plus de trente groupes sont maintenant à la recherche de corrélats potentiels de protection immunitaire. Pour l'instant, des tests sur les lymphocytes circulants prélevés à différents temps après vaccination ont été réalisés sur un petit échantillon de volontaires. Ils ont porté d'une part sur les réponses cellulaires et d'autre part sur les réponses humorales et la production d'Ac contre les gp120B/E et la protéine p24 de la capside. Les tests ELISpot ont mis en évidence des différences significatives chez les individus protégés au niveau de la réponse IFN-γ des LT $CD4^+$ spécifique de l'enveloppe et de la lymphoprolifération après stimulation par les Ag gp120 et p24. Au contraire, les personnes vaccinées ne développent pas ou peu de réponse cellulaire anti-Gag et cette réponse ne semble pas associée à la protection observée. Par ailleurs, tous les vaccinés testés (99 %) ont produit des Ac anti-Env, et plus de la moitié des Ac anti-Gag, mais ceux-ci s'avèrent être des Ac peu actifs, loin de l'efficacité observée avec des Ac neutralisants. Finalement les premiers résultats obtenus soulignent surtout la faiblesse de l'immunogénicité du vaccin.

Un débat a suivi l'analyse statistique des résultats du test[382]. La valeur relativement élevée (0,04) de la *p*-value associée à la protection des vaccinés a amené la communauté scientifique à réévaluer l'utilisation des valeurs statistiques dans la recherche vaccinale et l'interprétation des populations sur lesquelles ont porté les calculs et leurs interprétations. Récemment, une étude a montré qu'il existait un risque de 22 % que le vaccin n'ait eu finalement aucune efficacité protectrice[383].

3.5.3. Développement de vaccins inducteurs d'anticorps neutralisants.

Le transfert passif d'Ac neutralisants s'avère capable de protéger efficacement le singe contre une infection expérimentale, y compris par voie vaginale. L'immunisation du chimpanzé avec la gp120 de souches de virus « X4 » induit des Ac neutralisants qui protègent l'animal contre une injection de virus homologue. Malheureusement, aucune préparation de VIH inactivé, sous-unité de gp120, gp120/gp41 ou virus recombinant, ne s'est avérée capable d'induire des Ac neutralisant

les isolats primaires du VIH-1, c'est-à-dire les souches de virus « R5 ». Les premiers essais de protection du singe contre SIV avec un vaccin inactivé ont été couronnés de succès, mais on s'est aperçu que la protection était médiée, non pas par des Ac neutralisants anti-SIV, mais par des Ac produits chez le singe en réponse aux xénoantigènes (en particulier molécules HLA classe II humain) empruntés à la cellule hôte et présents à la surface du virus, qu'on produisait alors en culture de lymphocytes humains. Le développement d'un vaccin se heurte donc pour l'instant à l'incapacité d'induire des anticorps neutralisants efficaces. Cela tient probablement à un problème de conformation des glycoprotéines virales et de présentation des épitopes de neutralisation à leur surface. Ces épitopes sont masqués, au moins en partie, par les molécules de sucres à la surface de la gp120, ainsi que par plusieurs boucles hypervariables. Certains épitopes sont masqués au sein de la glycoprotéine et ne deviennent exposés qu'après le changement de conformation que subit la molécule lors de son interaction avec le CD4. Enfin, on a récemment observé que plusieurs épitopes de neutralisation du VIH-1 présentent un important mimétisme avec les antigènes du soi. Pour contourner ces difficultés : l'emploi de gp120 trimérique délétée des boucles hypervariables, l'emploi de complexes gp120-CD4 ou encore d'hétérodimère gp120/gp41.

3.5.4. Développement de vaccins inducteurs de réponses cellulaires.

L'effort s'est porté depuis quelques années sur le développement de vaccins qui stimulent l'immunité cellulaire anti-VIH, et induisent notamment une réponse CD8. L'ADN plasmidique, les vecteurs viraux ou bactériens recombinants constituent de bons immunogènes chez la souris, mais le premier est d'une médiocre immunogénicité chez les primates. Cependant les vaccins vivants recombinants à base de vecteur pox (canarypox, variole aviaire, virus de la vaccine) n'induisent eux aussi que d'assez faibles réponses T. Le fait que ces vecteurs ne se multiplient que très peu ou pas du tout chez l'homme explique sans doute en partie leur faible immunogénicité. Celle-ci s'améliore lorsqu'on utilise une stratégie de « prime-boost », en les associant à une primovaccination avec de l'ADN ou avec un autre vecteur. Le plus prometteur des vecteurs en développement à l'heure actuelle est sans conteste l'Adénovirus[384] rendu non réplicatif : induction de réponses T anti-VIH chez plus de 50 % des volontaires.

L'obstacle auquel se trouvent confrontés les vaccins utilisant l'adénovirus comme vecteur est l'existence d'une forte immunité anti-vecteur dans la population. Pour contourner cette difficulté, il faut développer d'autres sérotypes d'adénovirus humains moins répandus. La possibilité d'utiliser des adénovirus du chimpanzé a aussi été évoquée[385].

Des études menées par l'équipe de Dan Barouch ont ainsi démontré que le contrôle de l'infection virale était médié par les LT $CD8^+$ chez le macaque et directement corrélé avec une réponse spécifique de l'Ag Gag, mais pas de Pol ou Env[357]. Ces résultats démontrent l'importance d'inclure l'Ag Gag dans un vaccin anti-VIH-1 potentiel.

3.5.5. Autres approches vaccinales anti-VIH-1.

Outre les divers vaccins décrits ci-dessus, qui visent à générer des réponses d'immunité cellulaire ou humorale dirigées contre les Ags constitutifs de la structure du virion, d'autres essais ont été entrepris pour générer des réponses dirigées contre les protéines de régulation du cycle viral telles que Tat, Nef, Rev, etc.

La majorité des infections par le VIH-1 a lieu par voie sexuelle. Les muqueuses génitale et rectale représentent la porte d'entrée du virus, qui est ensuite rapidement transporté à travers les muqueuses vers les ganglions d'où il gagne le tissu lymphoïde intestinal. La muqueuse gastro-intestinale est particulièrement riche en lymphocytes T CCR-5^+ et constitue le site de multiplication du virus. C'est donc au niveau des muqueuses génitale, rectale et intestinale, qu'il faudrait établir une première ligne de défense. Des essais chez le singe ont montré que l'immunisation par voie rectale avec un vaccin anti-SIV peptidique utilisant pour adjuvant une toxine, induisait de fortes réponses T au niveau intestinal et protégeait de manière significative. L'immunisation par voie soit nasale soit orale avec un vaccin vivant recombinant entraîne de même une bonne protection. Le développement de stratégies de vaccination visant à induire des réponses immunitaires au niveau des muqueuses est à privilégier.

Les individus homozygotes pour la mutation Δ32 CCR5 sont naturellement réfractaires à l'infection par le VIH-1. Certains immunologistes se sont inspirés de ces observations pour tenter de développer des vaccins anti-CCR-5.

3.5.6. Adjuvants et vaccins anti-VIH-1

En plus des adjuvants déjà utilisés dans les vaccins approuvés pour un usage chez l'Homme, de nombreux autres sont actuellement en essais précliniques ou cliniques. Choisir le meilleur adjuvant pour le développement d'un vaccin anti-VIH-1 est difficile car les corrélats de protection contre le virus n'ont pas encore été identifiés et donc quel type de réponse immunitaire doit être induit par un éventuel vaccin. Jusqu'ici, l'adjuvant de choix utilisé dans les essais cliniques les plus avancés d'un candidat vaccin anti-VIH-1 est l'Alum qui lorsqu'il est administré avec un antigène vaccinal induit principalement une réponse T $CD4^+$ et anticorps. L'Alum a été utilisé comme adjuvant dans les essais cliniques VAX003 et 004 de AIDSVAX, un candidat vaccin à base de gp120 mais qui n'a pas démontré d'efficacité protectrice. L'Alum a aussi été utilisé dans le boost AIDSVAX lors de l'essai RV144 en Thaïlande. Il n'y a pas eu d'utilisation d'adjuvant dans le prime ALVAC (vecteur canarypox) car les vecteurs viraux sont connus pour stimuler fortement la réponse immune par rapport à un antigène seul. Pour la même raison, aucun adjuvant n'a été utilisé dans l'essai du candidat vaccin à base d'adénovirus de sérotype 5 (Ad5) MRKAd5 utilisé lors de l'essai STEP.

Les prochains essais cliniques qui vont être menés en Afrique du sud, à la suite de l'essai RV144, utiliseront le MF59 de Novartis. Des études ont démontré que le MF59 était un inducteur plus

puissant des gènes inducteurs de réponses inflammatoires innées que l'Alum[386]. De plus, le MF59 permet de réduire la quantité d'Ag Env utilisée, par rapport à l'Alum, ce qui n'est pas négligeable lorsque l'on sait à quel point la production est difficile et donc l'antigène précieux.

Un adjuvant appelé PolyICLC (Hiltonol) – ARNdb ligand TLR3 et MDA5 – est actuellement utilisé dans l'essai clinique de phase I d'un candidat vaccin anti-VIH-1 appelé DCVax-001, mené par Sarah Schlesinger (et initié par Ralph Steinman) de l'université Rockefeller. Le vaccin est composé de la protéine Gag p24 fusionnée avec un Ac monoclonal spécifique du récepteur de surface des DCs, DEC-205 (CD205). Ce vaccin est censé permettre l'induction d'une endocytose directe des Ag par les DCs afin d'améliorer la présentation antigénique par les CMH-I et –II afin d'induire des réponses T $CD8^+$ et $CD4^+$. Le polyICLC est ajouté au vaccin afin d'augmenter son immunogénicité.

3.6. CONCLUSIONS

Au moment où je termine cette introduction, le mot-clef "HIV" renvoie vers plus de 250 000 publications dans la base de données Medline. Nous avons pu avoir au cours de cette présentation un aperçu très superficiel de l'ensemble des données accessibles concernant la compréhension de la pathologie du SIDA et les corrélats de protection connus.

Tout d'abord, si les traitements antirétroviraux semblent être l'arme la plus efficace pour lutter contre le développement du SIDA chez les individus infectés et la progression de l'épidémie, les projections les plus optimistes ne permettent pas d'espérer une disparition de l'épidémie par leur seule utilisation[387]. De plus, leur usage prophylactique commence à être étudié mais il soulève la question de l'émergence et de la transmission de variants résistants aux seuls traitements actuellement disponibles[388]. Ensuite, dans les différents modèles étudiés, un défaut d'expression d'un corécepteur CCR5 fonctionnel apparaît comme le meilleur corrélat de protection contre l'infection et contre la progression de la maladie. Dès lors, il n'est pas étonnant que le premier cas de guérison du SIDA ait été obtenu *via* la transplantation de cellules souches hématopoïétiques codant pour un corécepteur muté[389].

Malheureusement, la généralisation de ce type de thérapie n'est pas envisageable du fait de son coût élevé et des risques associés. Ainsi, malgré les échecs répétés, la découverte d'un vaccin prophylactique reste le meilleur espoir de lutte contre l'épidémie.

Pourquoi est-ce si difficile de développer un vaccin contre le VIH ?

De nombreuses raisons ont été avancées pour expliquer le constat d'échec actuel. L'extrême variabilité du virus, souvent proposée comme principale explication, ne peut, à elle seule, expliquer les difficultés rencontrées. En effet, de nombreux virus à ARN pour lesquels il existe des vaccins fonctionnels présentent le même taux de variabilité génétique. Mais surtout, la plupart des stratégies vaccinales développées contre le VIH ou le SIV n'ont de toute façon pas

réussi à protéger contre une épreuve par un virus de séquence homologue. De même, le fait que le virus cible le système immunitaire pour se propager est classiquement proposé comme obstacle à la recherche vaccinale. Ainsi, un vaccin devrait pouvoir préparer le système immunitaire à se défendre avant même l'arrivée du virus et la stimulation d'une immunité mémoire. Ce constat conduit à des stratégies cherchant à renforcer l'immunité innée, pour qu'elle soit capable de lutter efficacement contre le virus avant le dérèglement du système immunitaire. On peut néanmoins objecter que d'autres virus, parmi lesquels le virus de la rougeole, ont un tropisme pour les cellules du système immunitaire, possèdent des activités immunosuppressives et sont pourtant efficacement combattus par la vaccination.

L'absence de guérison spontanée du SIDA, indique qu'un vaccin efficace contre le SIDA pourrait ne pas stimuler des réponses immunitaires classiques. L'absence de connaissances précises des corrélats de protection contre l'infection et/ou la progression de la maladie semble alors au cœur des difficultés rencontrées depuis la découverte du VIH. Si le succès modeste de l'essai RV144 suggère qu'une combinaison de réponses immunitaires pourrait être associée à une protection chez l'homme, on ne connait pas encore sa nature ni de quelle manière elle pourrait être ciblée par la vaccination. Dès lors, les connaissances actuelles de l'immunopathologie du SIDA pourraient ne pas être suffisamment complètes pour envisager la conception rationnelle d'un vaccin ciblant une réponse immunitaire prédéfinie. Il devient donc capital d'imaginer des stratégies vaccinales originales à partir des données des modèles de protection déjà disponibles.

Les critères d'un vaccin efficace contre le VIH-1

De manière générale, un vaccin muqueux doit être capable d'induire des réponses immunitaires protectrices au niveau des muqueuses d'entrée et de réplication du virus : muqueuses génitale et intestinale. L'induction de ce type de réponses par voie parentérale est très intéressante mais l'induction directe par administration muqueuse est aussi une stratégie de plus en plus étudiée. Le vaccin muqueux idéal se doit :

- d'avoir une durée de demi-vie locale suffisante
- de faciliter la prise en charge de l'antigène par les cellules M présent dans le NALT, le GALT, et le BALT, afin de cibler les CPAs
- de faciliter la co-absorption de l'Ag et de l'adjuvant par les CPAs afin de stimuler l'immunité spécifique appropriée en générant des SIgA neutralisantes et/ou des CTL. Les SIgA pourront ainsi bloquer la colonisation, par l'agent pathogène, de l'épithélium et/ou empêcher l'attachement de toxines microbiennes sur les cellules épithéliales. Enfin les CTL pourront éliminer les cellules infectées et empêcher l'invasion microbienne.
- de libérer progressivement l'antigène pour augmenter le temps de présentation aux CPAs.

Il existe, en plus de ces derniers, de nombreux autres critères pour qu'un vaccin muqueux soit efficace contre le VIH.

- En utilisaant un immunogène issu de la glycoprotéine d'enveloppe de VIH comportant notamment les sites de liaison aux récepteurs d'entrée du virus (CD4, CXCR4, CCR5, α4β7) ainsi que la majorité des épitopes neutralisants connus (boucle V2-V3, MPER, etc.)[390].
- Nous avons précédemment vu que l'infection par le VIH implique une déplétion très rapide des LT $CD4^+$ dans les muqueuses intestinale, vaginale et rectale. Il semble donc évident qu'un candidat vaccin prophylactique muqueux devra agir rapidement pour préserver les réponses immunitaires et ainsi éviter la propagation du virus dans les muqueuses.
- Des études montrent que les candidats vaccins qui induisent de fortes réponses cellulaires muqueuses diminuent significativement la charge virale réduisant ainsi la progression du virus dans les muqueuses[391].
- Les ENI possèdent des taux importants de SIgA anti-VIH dans les sécrétions cervico-vaginales, dans la salive ou encore dans le lait maternel. L'activité neutralisante de ces IgA contre différents isolats primaires a été décrite suggérant un rôle probable de ces protéines dans la résistance observée à l'infection. De plus, des études réalisées au GIMAP de Saint- Etienne semblent montrer que la présence de SIgA dirigées contre l'enveloppe et notamment contre les boucles V1V2 est associée à la protection chez ces patients ENI. Sachant cela, le candidat vaccin doit être aussi capable d'induire un niveau suffisant d'Ac neutralisants afin d'empêcher la transmission du virus au niveau de la muqueuse vaginale et intestinale. Cependant, le taux d'Ac nécessaire à la prévention de la transmission vaginale du virus n'a pour l'instant pas pu être atteint dans les divers essais vaccinaux.

Depuis la découverte de la vaccination, presque toutes les avancées ont découlé d'une démarche purement empirique. L'étude du système immunitaire a néanmoins permis la conception rationnelle de certains vaccins. Pourtant, à l'instar des autres découvertes, il est probable que l'on trouve un vaccin fonctionnel contre le VIH bien avant de comprendre en détail son fonctionnement. Les travaux les plus récents réalisés sur un des vaccins les plus efficaces, le vaccin contre la fièvre jaune, illustrent à quel point les phénomènes de protection vaccinale peuvent être complexes[392]. D'après Emile Roux, un des fondateurs de l'Institut Pasteur, *"La science nous apparaît calme et triomphante quand elle est faite ; mais la science en formation n'est que contradiction et tourment, espoir et déception".* La découverte d'un vaccin contre le virus du SIDA ne dérogera probablement pas à cette règle.

PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE

Les stratégies de vaccination anti-VIH-1 visent à induire des réponses cellulaires, des réponses humorales ou les deux. En dehors de l'essai RV144, aucune de ces stratégies ne s'est révélée réellement efficace à ce jour. Les muqueuses constituant la principale porte d'entrée du VIH-1, il a été décrit que la présence d'anticorps (Ac) neutralisants au niveau de ces sites était un corrélat de protection important contre ce virus[367]. A l'inverse, une fois que l'infection à été établie, les Ac neutralisants semblent être incapables de contrôler la propagation du virus et de fortes réponses T $CD8^+$, notamment spécifiques de l'antigène (Ag) Gag, semblent aussi être primordiales afin de contrôler la réplication virale[347, 357].

L'induction par un vaccin de réponses humorales (IgG & IgA) neutralisantes et cellulaires au niveau systémique et des surfaces muqueuses semble donc une nécessité absolue dans le développement d'un vaccin anti-VIH-1 efficace.

L'induction de réponses muqueuses locales représente donc un défi majeur en vaccination au XXI^{ème} siècle. Si certains vaccins administrés par voies parentérales sont capables d'induire des réponses muqueuses, seuls sept vaccins possèdent une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) pour une vaccination muqueuse (orale et nasale)[55]. De même, si l'administration de vaccins par voies muqueuses semble être une stratégie prometteuse afin d'induire une immunité protectrice, elle reste difficile à mettre en œuvre, d'où la nécessité de trouver de nouvelles formulations/adjuvants capables d'y parvenir. Mon projet de thèse s'est orienté dans cette direction.

Les travaux précédents du laboratoire ont permis de concevoir un véhicule de vaccination polyfonctionnel, à base de nanoparticules (NPs) biodégradables de PLA vectorisant un ou plusieurs Ags adsorbés en surface. Après administration par voie sous-cutanée chez différents modèles animaux, ces formulations vaccinales induisent de fortes réponses humorales systémiques, comparables à celles induites par l'Alum ou le MF59[156, 161]. Cependant les réponses muqueuses restent faibles.

Par ailleurs, ces NPs peuvent être rendues fluorescentes après encapsulation de fluorophores lors de leur élaboration. Ceci a permis à l'équipe de documenter, chez la souris, que ce véhicule de vaccination pouvait traverser la barrière intestinale *via* les cellules M des Plaques de Peyer (PPs) avant d'atteindre les cellules dendritiques (DCs) et les lymphocytes B (LB) sous-épithéliaux[158].

Le fait de pouvoir encapsuler à façon des molécules hydrophobes nous a permis d'envisager d'utiliser des ligands de PRRs qui permettraient d'orienter l'induction d'une réponse muqueuse après administration de telles NPs. Nous avons ainsi retenu le ciblage des récepteurs Nod1 et Nod2 du fait de leur expression par les cellules présentatrices d'Ags (CPAs), les cellules épithéliales et les muqueuses.

L'objectif de ce travail de thèse est double :

I - Concevoir une stratégie de vaccination inductrice de réponses immunitaires muqueuses anti-VIH-1 en encapsulant des agonistes des récepteurs intracellulaires Nod1 et Nod2 et en formulant, à leur surface, un Ag modèle, la p24 (Gag) du VIH-1. Nous nous sommes aussi intéressés à une molécule chimérique ciblant à la fois le récepteur Nod2 et le TLR2.

II - Tester différentes voies d'administration afin d'amplifier les réponses immunitaires au niveau systémique et au niveau des muqueuses intestinales et vaginales (réservoirs et sites d'entrés du VIH-1) et étudier le transport des NPs dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

Notre approche expérimentale s'articule ainsi en trois étapes complémentaires :

1) La formulation et la caractérisation des NPs de PLA-Nod : il s'agit de définir des conditions physico-chimiques permettant de contrôler l'encapsulation des ligands Nod sans interférer avec l'adsorption de l'antigène Gag p24.

2) L'étude *in vitro* des propriétés fonctionnelles de ces NPs : en utilisant des MoDCs comme modèle d'étude, nous pouvons directement évaluer la capacité de relargage des ligands dans les cellules sentinelles de l'immunité et ainsi évaluer leur capacité fonctionnelle, notamment en utilisant des cellules dérivées de patients VIH^+. En parallèle, l'utilisation de modèles de muqueuse orale et d'épithélium intestinal reconstruits permet des études de transport relativement proche des conditions *in vivo*.

3) L'étude des réponses immunitaires *in vivo* : le modèle de souris BALB/c permet de concevoir des plans expérimentaux permettant l'étude de différents paramètres immunologiques avec une puissance statistique suffisante.

Cette stratégie expérimentale nous permet ainsi de tester quatre hypothèses :

- La plus-value de l'encapsulation des ligands Nod1 et Nod2 (article N°1) : en effet, s'il est déjà décrit que l'encapsulation d'un principe actif permet d'augmenter sa demi-vie et de réduire des effets potentiellement toxiques, le procédé d'encapsulation peut aussi altérer la fonction du ligand voire même le neutraliser.
- L'intérêt d'une administration par voie nasale, entérale ou sous-cutanée, vis-à-vis de la nécessité ou non de co-administrer ligand et Ag dans la même ou dans différentes particules (article N°2).
- Le potentiel immunostimulant d'une molécule chimérique Nod2/TLR2 (article N°3)
- Le transport muqueux et systémique des NPs dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (partie 4).

Les résultats des trois premières parties sont présentés sous forme d'articles scientifiques, ceux de la quatrième partie sont détaillés dans le corps du texte.

Résultats

1. Encapsulation de ligands des récepteurs Nod1 et Nod2 dans les nanoparticules de PLA et évaluation de leur potentiel immunostimulant *in vitro* et *in vivo*.

- Article N°1 : "Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties." J Control Release. 2013 Apr 10;167(1):60-7.

2. Utilisation de NPs de PLA pour l'induction de réponses immunitaires muqueuses et adjuvanticité par des agonistes des récepteurs Nod1 et Nod2.

- Article N°2 : "Delivery of encapsulated Nod ligands enhance their ability to induce mucosal immune responses against vaccine antigen" (En cours).

3. Evaluation du potentiel immunostimulant d'une molécule chimérique agoniste des récepteurs Nod2 et TLR2, *in vitro* et *in vivo*.

- Article N°3 : "Chimeric Nod2/TLR2 ligand augments antigen-specific immune responses elicited by a particulate vaccine vector." (En cours).

4. Transport et biodistribution des nanoparticules de PLA *in vitro* et *in vivo*.

RESULTATS 1 : ENCAPSULATION DE LIGANDS DES RECEPTEURS NOD1 ET NOD2 DANS LES NANOPARTICULES DE PLA ET EVALUATION DE LEUR POTENTIEL IMMUNOSTIMULANT IN VITRO ET IN VIVO.

Les cellules dendritiques (DCs) sont des éléments clés dans l'initiation des réponses immunitaires adaptatives et sont utilisées en immunothérapie dans de nombreux traitements contre les cancers et les maladies infectieuses[393]. Le ciblage de ces cellules est ainsi devenu une stratégie prioritaire pour orienter la qualité de la réponse immunitaire induite par un vaccin. Ainsi, l'utilisation de nano-systèmes de délivrance vectorisant des composants vaccinaux, incluant des Ags et des adjuvants, aux DCs *in vivo* est devenue une approche prometteuse pour améliorer la réponse immunitaire. Ainsi, le ciblage intracellulaire des récepteurs Nod1 et Nod2 présents dans les DCs et capable de déclencher les voies du NF-κB et des MAPKs conduisant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires après activation est une hypothèse intéressante.

Dans ce but, mon travail de thèse a consisté à mettre au point l'encapsulation dans des NPs de PLA, de deux ligands CL235 (Nod1) et CL365 (Nod2) dont nous avons pu disposer grâce à notre collaboration avec CAYLA-InvivoGen (Toulouse). Nous nous sommes par la suite intéressés au potentiel immunostimulant de ces ligands encapsulés en réalisant tout d'abord des essais *in vitro* sur des DCs humaines dérivées de monocytes (MoDCs). L'état de maturation des DCs a été évalué par l'expression de trois marqueurs de surface : les deux molécules de co-stimulation CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2), connues pour leur interaction avec le récepteur CD28 à la surface des LT naïfs et nécessaire au déclenchement du second signal permettant la survie des LT[394] et le marqueur CD83, exprimé de façon stable à la surface des DCs matures. La fonction biologique de ce dernier n'est pas encore tout à fait claire, même si certains avancent qu'il pourrait jouer un rôle dans les interactions cellule-cellule lors de la présentation de l'Ag[395].

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'encapsulation des ligands Nods dans les NPs de PLA permettait de potentialiser la maturation des DCs ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNFα, IFNγ, IL-1β et IFNα) par rapport aux ligands libres. Ces résultats ont pu être confirmés *in vivo* chez la souris, avec une potentialisation des réponses humorales anti-p24 (VIH-1) après immunisation par voie sous-cutanée.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus sont décrits dans l'article N°1, publié en janvier 2013 dans *Journal of Controlled Release*.

NANOMEDICINE

Journal of Controlled Release 167 (2013) 60–67

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Controlled Release

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jconrel

Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties

Vincent Pavot [a,b], Nicolas Rochereau [b], Charlotte Primard [a], Christian Genin [b], Eric Perouzel [c], Thierry Lioux [c], Stéphane Paul [b,1], Bernard Verrier [a,*,1]

[a] Institut de Biologie et Chimie des Protéines UMR 5305, CNRS/Université de Lyon, France
[b] Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, INSERM CIE3 Vaccinologie, Faculté de Médecine de Saint-Etienne, France
[c] CAYLA, InvivoGen, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 November 2012
Accepted 10 January 2013
Available online 23 January 2013

Keywords:
Nod receptor ligands
Poly(lactic acid) nanoparticles
Immunostimulation
Encapsulation
Dendritic cell maturation
Vaccin

ABSTRACT

Most successful vaccines are able to induce persistent antibody responses that can last a lifetime. Emerging evidences indicate that activation of immune cells through pattern recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptors (TLRs) or Nod-like receptors (NLRs) may be critical mechanisms. Among PRRs, the use of TLR ligands as adjuvants is already largely described whereas the use of NLRs ligands remains largely unexplored. As activation of intracytoplasmic NLRs is able to induce proinflammatory molecules, the added value of encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into Poly(Lactic Acid) (PLA) biodegradable nanocarriers to modulate their immune properties on human dendritic cells (DCs) maturation has been evaluated. Their ability to induce systemic immune responses in mice was also measured and compared to free ligands and the Alum adjuvant. Nod ligands encapsulated into PLA NPs were efficiently taken up by DCs and subsequently induced a strong up-regulation of maturation markers and the enhancement of proinflammatory cytokine secretion by DCs. Furthermore, co-injection of encapsulated Nod-ligands with PLA particles carrying Gag p24 HIV-1 antigen allowed a 100 fold increase in antibody responses in comparison to Alum. These results suggest that encapsulation of Nod ligands into PLA-NPs could be an effective way to improve vaccine efficiency.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Synthetic peptides and recombinant protein subunits are largely used as vaccine candidates, as they are less toxic than whole pathogens. Although these compounds offer advantages, they are often poorly immunogenic. Thus, it is necessary to enhance their immune responses by developing improved vaccine adjuvants [1], which are potent, safe and compatible with protein subunits and peptides [2]. Adjuvant may be defined as additives or vehicles that improve the adaptive immune response or stimulate the innate immune system in such a way that desired effectors or mediators are induced.

Over the last two decades, nanoparticle-based delivery systems have turned out to be promising vaccine vehicles. A variety of polymers exists from which nanoparticles (NPs) for drug delivery can be prepared. However, the most commonly studied polymers are poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and polylactide (PLA) [3]. These biodegradable, biocompatible polymers have been approved for human use (e.g., as sutures, bone implants and screws as well as implants for sustained drug delivery). They have been extensively studied for their use in the formulation of vaccine antigens (i.e., proteins, peptides, DNA) [4–7], a large body of literature being available that demonstrates the advantages of such nanoparticles for antigen delivery [8–10]. Indeed, these particles can be tailored to degrade over a range of rates and can act as a depot from which the encapsulated ligand is gradually released [3]. Additionally, PLA particles allow the encapsulation of hydrophobic molecules and may protect encapsulated antigens. Moreover, preclinical studies have shown that PLA nanoparticles can induce systemic antibody titers comparable to those of aluminium salts or MF59 [3,6,11].

The targeting of pattern recognition receptors (PRRs) by adjuvants is a very promising way to modulate immune responses. The use of Toll-like receptors (TLRs) ligands as adjuvant for vaccine administration is already largely described, but the use of nucleotide-binding and oligomerization domain (Nod)-like receptor (NLR) ligands is still under investigation [12,13]. Here we described the study of Nod1 and Nod2, two members of NLRs class. Whereas TLRs sense PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) in the extracellular space and endosomes, NLRs function exclusively as pathogen intracytoplasmic sensors [14]. This family of receptors recognizes microbial structures, such peptidoglycan (PGN) and flagellin, but also danger-associated molecules released by dead or dying cells [15]. Nod2 detects muramyl dipeptide (MDP) which is a motif common to Gram-positive and Gram-negative bacterial PGN [16]. In contrast, Nod1 especially detects the γ-D-Glu-mDAP (iE-DAP), which

* Corresponding author. Tel.: +33 72722636; fax: +33 72722604.
E-mail address: b.verrier@ibcp.fr (B. Verrier).
[1] These authors contributed equally to this work.

0168-3659/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.015

is a dipeptide present in the PGN of all Gram-negative and certain Gram-positive bacteria [17,18]. iE-DAP is the minimal motif recognized by the intracellular receptor Nod1.

Both iE-DAP and MDP must be intracellularly delivered either by bacteria that invade the cell or through other cellular uptake mechanisms (pannexin, PepT1/PepT2 or endocytosis) to be detected by Nod1 and Nod2 respectively [19]. Signalling downstream of Nod1 and Nod2 mainly results in the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and NF-κB signalling [20] resulting in the production of proinflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, TNF and IL-8) and chemokines (CCL5 and CXCL5) [21].

Nod1 and Nod2 are mainly expressed by antigen presenting cells (APCs) and epithelial cells that are highly exposed to and/or deal with microorganisms that express PGN. In both humans and mice, APCs such as macrophages and dendritic cells (DCs) highly express Nod1 and Nod2 [22], whereas other hematopoietic cells (such as T cells and B cells) do not express these PRRs [18].

In our study, a nanoparticle-based vaccine has been designed. A biodegradable synthetic polymer, Poly(Lactic Acid) (PLA), was used to prepare ~200 nm sized nanoparticles containing encapsulated Nod1 or Nod2 ligand with the possibility to adsorb HIV-1 Gag p24 antigen on their surface. Encapsulated Nod ligands have already been studied in different particulate models as liposomes or chitosan [23,24] but not so far, into PLA nanoparticles for tuning the maturation of DCs *in vitro* and for tuning immune response *in vivo*. We first characterized the physico-chemical properties of the particles and the encapsulated Nod ligands, and then we evaluated the *in vitro* ability of both encapsulated and free Nod ligands to induce dendritic cells maturation. Moreover, the mechanisms by which this maturation occurs have been studied. Finally, the immunogenicity of our adjuvanted vaccine has been evaluated in mice by measuring the specific humoral immune responses induced by subcutaneous co-administration of synthetic NPs coated with HIV-1 Gag p24 as antigen and Nod1 or Nod2 ligands encapsulated into different NPs, compared to standard Alum formulation.

2. Materials and methods

2.1. Nod receptor ligands

The Nod1 ligand CL235 [tetradecanoyl-δ-D-glutamyl-L)-meso-lanthionyl-(D)-alanine] is an acyl tripeptide containing meso-Lanthionine instead of meso-DAP amino acid. The Nod2 ligand CL365 [6-O-stearoyl-N-glycolyl-Murabutide] is an acyl Murabutide analog (Supplementary Fig. 1). These compounds, developed and manufactured by CAYLA-InvivoGen (Toulouse, France), have been selected for the ease of chemical synthesis and because the attachment to a hydrophobic acyl residue enhanced stimulation of Nod1 or Nod2 up to several hundred folds, as assessed by *in vitro* cell based assays.

2.2. PLA and HIV-1 Gag p24 antigen

Poly(D,L-lactic acid) (PLA50 Mn = 47,000 g/mol, molecular weight distribution Mw/Mn = 1.8) with a carboxylic end group was purchased from Anabior (Grenoble, France).

HIV-1 p24 antigen was produced and purified by PXTherapeutics (Protein'eXpert, Grenoble, France) from *Escherichia coli* BL21 DE3 strain and endotoxins were removed as previously described [11]. The purity of p24 was higher than 97% as assessed by silver nitrate stained reducing SDS-PAGE; with an endotoxin content lower than 5 EU/mg of p24 protein, as determined using the QCL-1000 Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) kit (BioWhittaker, Walkersville, Verviers, Belgique). The resulted recombinant p24 protein has a molecular weight of 26.9657 kDa and a theoretical pI of 5.92.

CellTrace™ BODIPY® TR methylester was obtained from Invitrogen (Invitrogen AG, Switzerland). All other reagents were of analytical grade and received from commercial sources.

2.3. Preparation of Nods- and fluorescent-PLA nanoparticles by nanoprecipitation and physico-chemical characterization

PLA nanoparticles were prepared by nanoprecipitation as previously described [7]. Briefly, the polymer was dissolved in acetone (polymer: acetone in a 2% w/v ratio), and this solution was added dropwise to an aqueous solution (ethanol/water; 40%/60%) under slow stirring. Organic solvents were then removed under reduced pressure at 30 °C.

For their encapsulation into PLA nanoparticles, Nod1, Nod2, or the fluorescent hydrophobic probe (CellTrace™ BODIPY®) were dissolved in acetone with the polymer (at a polymer:drug ratio of 1% w/w for the Nod ligands and 2% w/w for the fluorophore) and the nanoprecipitation was conducted in the same way.

The final PLA concentration was between 60 and 70 mg/ml, depending on the batch and was accurately measured by weighing the wet and dried materials.

Solvent was detected by gas chromatography from dissolved particle samples to the sensitivity limits of this method.

Nanoparticle average hydrodynamic diameter and size distribution (PSD or PI) were determined by photon correlation spectroscopy at 25 °C using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Highly diluted (1/250) colloidal dispersions in 1 mM NaCl solution were used and each value was the mean of three to five measurements. The electrophoretic mobilities were measured with the Zetasizer Nano ZS using the same highly diluted samples, at 25 °C, and were converted to Zeta (ζ) potentials according to Smoluchowski's equation [25]. The values were the mean of five independent measurements.

Particles observation by Scanning Electron Microscopy (SEM) was performed by deposing a drop of particles diluted in water on a Formvar-coated copper grid that was dried by evaporation. The grid was then sputtered with 20 nm of gold with the metallizer BaltecMED020 under vacuum prior observation (Hitachi S800, Centre Technologique des Microstructures, Lyon 1, Villeurbanne, France) (data on Supplementary Fig. 2.).

2.4. Determination of encapsulation efficiency of Nod1 and Nod2 ligands into nanoparticles

Ligand concentrations were estimated by using the HEK-Blue™-hNod reporter cell lines (InvivoGen) by monitoring the activation of the NF-κB pathway using a secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP). In the HEK-Blue™-hNod reporter cell line, the SEAP reporter gene is placed under the control of the IFN-β minimal promoter fused to five NF-κB and AP-1 binding sites into HEK293 cells. Stimulation with Nod ligands activates NF-κB and AP-1, which induce the production of SEAP. Level of SEAP can be easily quantified with a detection medium that turns purple/blue in the presence of alkaline phosphatase.

Nod ligand encapsulation efficiencies were obtained through determination of the amount of remaining free ligand in the supernatant after two successive centrifugations of the nanoparticle solution (10 min at 10,000 × *g*). The supernatants were added in 96-microwell plates (50,000 cells/well in duplicate) for 16 h in presence of a specific SEAP colour substrate (HEK-Blue™ Detection, InvivoGen). The absorbance of the samples was measured at 650 nm using a microplate reader (BioRad). Nod1 and Nod2 ligand solutions (respectively 0–0.8 μg/ml and 0–4 μg/ml) were initially assayed with HEK-Blue™-hNod Cells for establishing a calibration curve. The calibration curves were found to be linear with a correlation coefficient of $R^2 = 0.9971$ and $R^2 = 0.9992$ respectively. The encapsulation efficiencies of Nod ligands were calculated by the ratio of the ligand mass in nanoparticles over the total mass of ligand in the solution.

2.5. Preparation of p24-coated PLA nanoparticles

The p24 protein was diluted in 0.1 M PBS (phosphate buffered saline) at 200 μg/ml. Plain PLA nanoparticles were diluted at 5 mg/ml in PBS and the two solutions were added volume to volume. The adsorption reaction occurred within 2 h at room temperature, with moderate overhead stirring. Unbound p24 protein was collected in the supernatant by centrifugation at 10,000 ×g for 10 min and quantified by micro-Bradford assay according to the manufacturer's instruction. Nanoparticle sizes and ζ-potentials were determined using a Zetasizer Nano ZS as described in Section 2.2.

Endotoxin contents were assessed using EndoSafe test (Charles River) and were between 1 and 2 EU/ml (see Section 2.1 and Table 1). For our experiments, we used highly diluted formulations (about 1/200) which then reduced the endotoxin final concentration below 0.01 EU/ml clearly below the endotoxin limits for present licensed vaccines [26]. Sterility was also verified by spreading 20 μl of each vaccine formulation and sterile water as a negative control on LB agar without antibiotics in petri dishes, then by observation of those petri dishes after 24 and 48 h of incubation at 37 °C.

2.6. In vitro release studies

The *in vitro* release of p24 and Nod ligands from the PLA nanoparticles was carried out by incubating 6 mg of NPs in 1 ml of PBS at 37 °C. NPs were collected at predetermined times and centrifuged at 10,000 ×g for 10 min. The amount of p24 and Nod ligands released from the nanoparticles in the supernatant were quantified using a micro-Bradford test and stimulation of HEK-Blue™-hNod Cells respectively.

2.7. In vitro evaluation of the NF-κB pathway activation

Free or encapsulated Nod ligands were cultured with HEK-Blue™-hNod reporter cell lines (Nod1 or Nod2) at a final concentration of 0.3 μg/ml in 96-microwell plates (50,000 cells/well in duplicate). Activation of the NF-κB pathway was evaluated as previously described.

2.8. Time-lapse microscopy

Murine (H-2k) $CD8^+$ DC line (SRDC) derived from spleen primary DCs [27] were seeded in a 6-well plate (200,000 cells/well) and cultured in IMDM, supplemented with 5% heat-inactivated FCS, 100 U/ml penicillin/100 μg/ml streptomycin, 50 μM 2-β-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, for 18 h at 37 °C. Then about 9×10^{10} fluorescent PLA-NPs (2.35 ng of PLA/cell) were added and their uptake by SRDC was followed by video microscopy. The microscope and stage were enclosed within a heated (37 °C) chamber and cells were cultured in 5% CO_2 in air. One image per minute during 20 h was captured using a Zeiss Axiovert 100 M inverted fluorescence microscope equipped with a CCD CoolSNAP HQ monochrome digital camera (Photometrics), using a 20× objective lens. Captured images were analyzed using MetaMorph v6.0 software.

2.9. In vitro maturation of human monocyte derived DCs (MoDCs) and cytokine secretion

Monocytes were purified from peripheral human blood, obtained from EFS (Etablissement Français du Sang) by density gradient centrifugations using Ficoll-Paque™ plus and Percoll (GE Healthcare). Remaining erythrocytes, NK, B- and T- cells were then depleted by anti-glycophorin A, anti-CD56, anti-CD19 and anti-CD3 antibodies (Beckman Coulter) respectively, using Dynabeads® Pan Goat anti-mouse IgG (Invitrogen).

Purified monocytes (0.5×10^6 cell/ml) were then cultured in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), gentamycin (50 U/ml), 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin in the presence of 62.5 ng/ml of human interleukin-4 (IL-4) (R&D systems) and 75 ng/ml of human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Collaborative Biomedical Product-Bioscience) to differentiate into MoDCs. After 6 days, empty NPs, free, or encapsulated ligands (diluted in the cell culture medium at 5 μg/ml), were added to 1 million of differentiated MoDCs for 24 or 48 h and incubated at 37 °C, 5% CO_2. DCs only cultured in complete RPMI medium were used as a negative control of stimulation, and those cultured in the presence of 2.5 μg/ml of LPS were used as a positive control. DCs maturation was assessed by cell surface immunostaining using monoclonal antibodies against lineage markers and co-stimulatory molecules. Cells were stained with FITC-labeled anti-CD1a (dendritic cells marker), and PE-labeled anti-CD80, -CD83 or -CD86. The isotype controls were IgG1 and IgG2a (BD Pharmingen™). Cell viability after 48 h of incubation with NPs was assessed by propidium iodide incorporation, according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences). Ten thousand events were acquired by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) with a FACS canto I (Tour Inserm CERVI, Lyon), and the data were analyzed using the FlowJo software.

All the MoDCs culture supernatants were collected after 24 or 48 h and stored at −80 °C for further cytokine quantification. Expressions of TNFα, IL-6, IFNγ, IL-1β and IFNα were analyzed simultaneously using the Bio-Plex Pro™ assay (BioRad) according to the manufacturer's protocol.

2.10. Immunization protocol and sample collection

All mouse studies were conducted with the approval of the local ethics committee (CECCAPP, Lyon, registered by the French National Ethics Committee of Animal Experimentation (CNREEA) under no. 15), and in accordance with the guidelines for animal experiments. Eight-to-twelve week old BALB/c mice (Charles River Laboratories) were hosted at the PBES (Plateau de Biologie Expérimentale de la souris/Mice experimental biology facility) of the Ecole Normale Supérieure (ENS) of Lyon, and handled following the institutional guidelines. Mice were divided into 6 groups of 5 animals and were immunized with 10 μg of antigen-adsorbed PLA nanoparticles (PLA-p24) or Alum (Alum-p24) (suspended in 100 μl of PBS) subcutaneously at day 0 (D0) and D14. Imject® Alum (Pierce/ThermoScientific) was used to adsorb protein at a 1:1 volume ratio following the manufacturer's

Table 1
Characterization of the p24 adsorbed and Nod ligands encapsulated PLA nanoparticles prepared by nanoprecipitation. Sizes, size distribution (PDI), Zeta potential and loading levels are represented as mean ± SD from various batches prepared.

Formulation	Z-average size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	p24 loading efficiency (%)	Ligand encapsulation efficiency (%)	p24 (mg)/ PLA (g)	Ligand (mg)/ PLA (g)	Endotoxin content (EU/ml)
PLA	165 ± 12.0 (n = 7)	0.017 ± 0.001	−60 ± 4.5	–	–	–	–	1.72 ± 0.26
PLA-Nod1	163 ± 24.5 (n = 4)	0.069 ± 0.041	−63 ± 5.6	–	79.5 ± 5.84	–	8.0	1.58 ± 0.33
PLA-Nod2	209 ± 30.5 (n = 4)	0.114 ± 0.046	−68 ± 7.4	–	96.2 ± 1.79	–	9.6	1.37 ± 0.18
PLA-p24	227 ± 14.6 (n = 6)	0.062 ± 0.018	−34 ± 3.6	99 ± 1.0	–	40	–	1.64 ± 0.21

instructions. Two groups were immunized with Alum-p24 or PLA-p24 NPs alone (control groups). The other groups received 10 μg of free or encapsulated Nod ligands, co-delivered with p24-adsorbed particles. Mice were bled via the retro-orbital vein before (D0: pre-immune samples) and after immunizations (D14 and D28). The samples were heated at 37 °C for 30 min, then centrifuged twice at 16,000 ×*g* for 10 min and sera were stored at −20 °C for further analysis.

2.11. Detection of p24-specific IgG responses

Sera were tested for the presence of p24-specific IgG, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at D0, D14 and D28. Ninety-six-well Nunc maxisorp plates were coated with 100 μl of 1 μg/ml of p24 protein overnight at room temperature. p24 excess was eliminated and plates were blocked with 200 μl of 10% non-fat dry milk in PBS for 1 h at 37 °C to prevent non-specific binding of the antibodies. Plates were washed 3 times with PBS/0.05% Tween-20 using a Thermo Scientific autoplate washer. Serum samples from immunized mice at the indicated time points were serially diluted in Dulbecco's PBS (D-PBS) containing 1% of BSA. Then, 100 μl of each sample in duplicate were incubated on blocked plates for 1 h at 37 °C. Wells were washed and incubated 1 h at 37 °C with anti-mouse IgG–HRP (horseradish peroxidase) conjugate (1:10,000) from Southern Biotech. Plates were washed again, revealed using 100 μl per well of tetramethylbenzidine (TMB) substrate (BD Biosciences) and stopped using 1N H_2SO_4. The optical density (OD) at 450 nm with a correction at 630 nm was measured using a BioRad plate reading spectrophotometer.

2.12. Statistical data analyses

Analyses were performed using SigmaPot™ software, version 11.0. Statistical data analyses were performed using paired *t*-tests and an analysis of variance ANOVA with Bonferroni's posttest for comparison of pairs. Statistical significances were indicated on the figures. ***$P<0.001$, **$P<0.01$, *$P<0.05$.

3. Results

3.1. Efficient encapsulation of Nod ligands and adsorption of p24 on PLA nanoparticles

PLA-Nod formulations were prepared by nanoprecipitation (Table 1). The encapsulation of Nod ligands into PLA nanoparticles did not significantly change the physico-chemical properties of the particles as compared to the empty PLA NPs. As indicated by the low value of PDI the particles are very homogeneous in size (about 200 nm) and are highly negatively charged. The adsorption of p24 induced an increase of size around 20 to 30% without any significant effect on size-distribution (PDI slightly increased), and a modification of the NPs charge from −60 to −30 mV.

Using the protocol described in the *mat & meth* section, we achieved a p24 adsorption on empty NPs of 99% (±1) (40 mg/g of PLA) (Table 1).

The slight differences of size, PDI and ζ-potential between the batches of nanoparticles demonstrate the high reproducibility in the nanoprecipitation protocol.

In parallel, the amount of Nod ligand encapsulated was determined by analyzing the remaining free ligand in the supernatant. The encapsulation efficiency was 79.5% for CL235 (Nod1) and 96.2% for CL365 (Nod2) and the molecule mass per dry weight nanoparticles was equal to 8.0 and 9.6 mg/g of PLA respectively. These high values can be explained by the hydrophobic character of the two molecules (with respective partition coefficient Log $P_{octanol/water} = 1.22$ and 2.36), which favours the interactions with the hydrophobic PLA polymer.

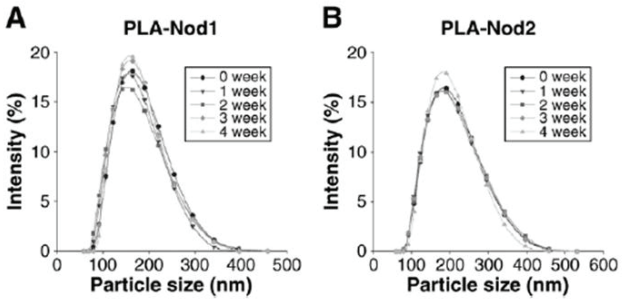


Fig. 1. Nod1 (A) and Nod2 (B)-encapsulated PLA NPs size stability in PBS at 4 °C. The hydrodynamic diameters were determined every week by photon correlation spectroscopy at 25 °C using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK).

3.2. Stability and in vitro release studies

The colloidal stability of the PLA-Nod1 and -Nod2 nanoparticles in PBS solution has been examined at 4 °C over a period of four weeks. As shown in Fig. 1, the size distribution did not change over this period of time, indicating that the NPs remained stable for at least four weeks. This stability could be explained by the highly negative surface charge of NPs, which prevents aggregation.

In vitro release of Nod ligands and p24 from PLA nanoparticles in PBS at 37 °C was evaluated over 12 h. Release profiles are shown in Fig. 2. As observed, about 0.5% and 2% of the total amount of Nod1 and Nod2 ligand (respectively) are released from the NPs during the first 3 h. The initial ligand release could be ascribed to the amount of molecules located close to NP surface as usually reported [28]. After approximately 4 h, the ligand release rates reach a plateau. The release amounts for Nod1 and Nod2 were respectively 0.5 and 2%. This may be related to the higher amount of Nod2 ligand loaded in the NPs and thus, presumably, near the interface, compared to Nod1 ligand.

No p24 release was observed during this time period.

3.3. Enhanced NF-κB pathway activation by Nod ligand encapsulations

To characterize the encapsulated Nod ligands regarding their biological function, their ability to activate the NF-κB signaling [20] was evaluated on HEK-Blue™-hNod reporter cell lines (Nod1 or Nod2). As shown in Fig. 3, the co-culture of free Nod ligands with HEK-Blue™-hNod reporter cell lines (Nod1 or Nod2) induces SEAP with a stronger effect of the Nod2 ligand. Encapsulation of the ligands into PLA-NPs enhanced the production of SEAP (by an amplification factor of 3 to 4—$P<0.01$), meaning an enhancement of the NF-κB pathway activation. Controls using admixed free Nod ligands and PLA-NPs did not induced any significant differences compared to free Nod ligands alone.

3.4. PLA-NPs are efficiently internalised by SRDCs

To analyze PLA NPs uptake by DCs, red fluorescent PLA nanoparticles were produced by incorporation of a specific fluorophore into the core of particles without any modification in the process of synthesis. The encapsulation of CellTrace™ BODIPY® (red) hydrophobic fluorophore by nanoprecipitation method into the core of PLA NPs lead to an encapsulation efficiency of about 98% (determined by HPLC). Colloidal properties of fluoNPs were preserved in comparison with blank PLA NPs (i.e., without any fluorophore). The mean hydrodynamic diameter of fluorescent particles was still about 200 nm, with a PDI below 0.1, indicating a homogenous size distribution.

The particles were added to the murine SRDCs cell line and observed by Time-Lapse microscopy for 20 h. The pictures confirmed the efficient uptake and intracellular localization of the PLA-NPs. After only 1 h, we observed an efficient uptake of the NPs by all the cells, as assessed by

NANOMEDICINE

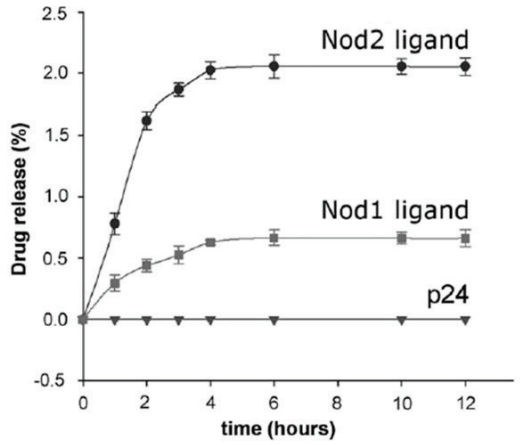


Fig. 2. *In vitro* release profiles of adsorbed-p24 (grey triangles), encapsulated-Nod1 ligand (grey squares) and encapsulated-Nod2 ligand (black spheres) from PLA nanoparticles over the time. The experiment was performed in PBS at 37 °C. Indicated values are means (SD); $n=3$.

the fluorescent signal associated with each cell. (Supplementary Fig. 3. and Time-Lapse Video).

3.5. Enhanced immunostimulatory efficiency of encapsulated Nod ligands

The maturation of DCs is one of the fundamental steps toward an effective immune response *in vivo*. For this reason, the encapsulated Nod ligands were characterized for their ability to stimulate human MoDCs maturation *in vitro*. The expression of the well known maturation marker CD83 and the costimulatory molecules CD80 and CD86 were measured.

Blood derived human monocytes were isolated and cultured in the presence of GM-CSF and IL-4 during 6 days to obtain immature DCs which showed typical spiky cell membrane projections, and were characterized by the expression of CD1a and a weak expression of CD80, CD83 and CD86. Cells were stimulated with Nod ligands encapsulated or not, and the impact on cell viability was investigated by propidium iodide labeling 48 h after stimulation. Untreated MoDCs and empty PLA NPs were used as reference for the immature state and MoDCs treated with LPS as control for maturated MoDCs. For 5 μg of ligands per 10^6 cells, a low cell death from 7% to 11% was observed after 48 h in comparison with the untreated cells (12%) (Supplementary Fig. 4).

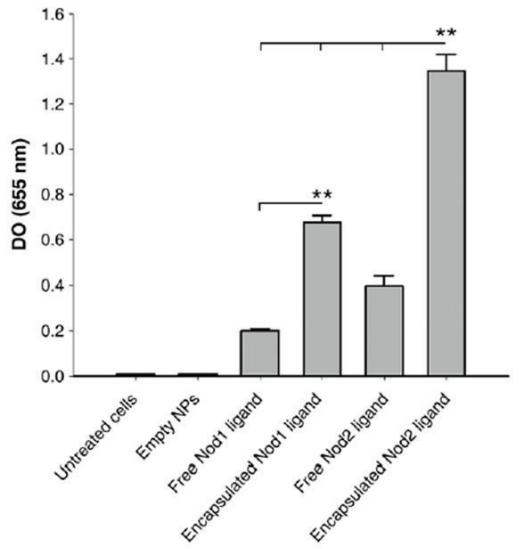


Fig. 3. *In vitro* evaluation of the NF-κB pathway activation by free or encapsulated Nod ligands with HEK-Blue™-hNod reporter cell lines. Those results revealed a higher activation of the NF-κB pathway by Nod2 ligand than Nod1. Moreover, encapsulations into PLA nanoparticles improved this effect. Mean (SD); $n=5$. Paired *t*-tests, $^{**}P<0.01$.

Expression of the cell surface markers CD80, CD83 and CD86 was assessed by immunofluorescence and flow cytometry 24 h post-stimulation. Empty NPs did not induce any DCs maturation, while all the markers were highly expressed on cells stimulated with free-delivered Nod1 or Nod2 ligands. The expression of these markers was significantly improved with encapsulated ligands (Fig. 4). Indeed, PLA-Nod1 NPs significantly increased the number of cells expressing CD80, CD83 and CD86 in comparison with free Nod1 ligand by 3.41%, 5.20% and 17.75% respectively. PLA-Nod2 NPs seem to be more efficient than PLA-Nod1 and significantly increased the number of mature DCs in comparison with free Nod2 ligand by 41.57%, 16.71% and 28.43% respectively. It should be noted that the cell SSC (Side SCatter) of cells incubated with NPs increased, which correlate with the DCs maturation and pointed out the uptake of the NPs by the DCs and the intracellular release of encapsulated Nod ligands, which activated those cells. In parallel to the expression of surface markers, the secretion of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-1β, TNFα, IFNγ and IFNα) was measured by multiplexing assay. In comparison to the Nod1, the free Nod2 ligand lead to a 2 fold increase in the secretion of the five cytokines by the MoDCs. The effect of those ligands was improved by their encapsulation into PLA nanoparticles. Indeed, a mean 3 fold increase in IL-6, TNFα, IFNγ and IFNα secretions was measured. In comparison with free ligands, PLA-Nod1 and PLA-Nod2 respectively induced 8 and 12 fold increases in the expression levels of IL-1β after 24 h of cell stimulation ($P<0.01$).

The maximum of effect was observed after 48 h of cells stimulation with PLA-Nod2, which induced a 300 fold increase of IL-1β expression compared to free ligand ($P<0.01$) (Fig. 5).

3.6. Encapsulations of Nod receptor ligands enhance humoral immune responses against HIV-1 p24 antigen

Prior studies demonstrated that PLA-NPs are potent adjuvant vehicles for systemic immunization [6,11]. According to the recent observations that delivery of antigens and TLR ligands in separate nanoparticles induce a stronger antibody response than the co-delivery by the same nanoparticle [29,30], we evaluated the immunostimulatory potential of free Nod ligands and PLA-NPs carrying Nod ligands (10 μg/animal) co-administrated with PLA nanoparticles carrying Gag p24 (HIV-1) in BALB/c mice.

As shown in Fig. 6, on day 14 (priming), no significant differences were observed between groups immunized with Alum-p24, PLA-p24 alone or co-administered with free Nod1/2 ligand, meaning that PLA-p24 is as efficient as Alum and that free Nod ligands induced the same level of anti-p24 IgG. However, encapsulation of Nod1 and Nod2 ligands into PLA NPs increased the antibody responses ($P<0.01$ and $P<0.001$ respectively) up to 100 times compared to the free ligands and to Alum-p24 and PLA-p24 alone. After boosting (day 28), PLA-p24 induced significantly higher IgG titers compared to Alum-p24 ($P<0.001$). Again, encapsulation of Nod ligands into PLA NPs allowed a significant rise (10 times) in the IgG responses compared to free ligands ($P<0.001$).

4. Discussion

The development of safe and efficient vaccines for cancer and infectious diseases remains a major goal in global public health. Particulate compounds, including biodegradable polymeric microparticles, emulsions, Alum, and calcium phosphate, are the most widely used vehicle adjuvants [31]. As an antigen delivery system, NPs have demonstrated to bear a large potential for the development of vaccines. Their benefits are manifold, ranging from the sustained delivery of antigens for extended periods of time over the potential to reduce the number of

V. Pavot et al. / Journal of Controlled Release 167 (2013) 60–67

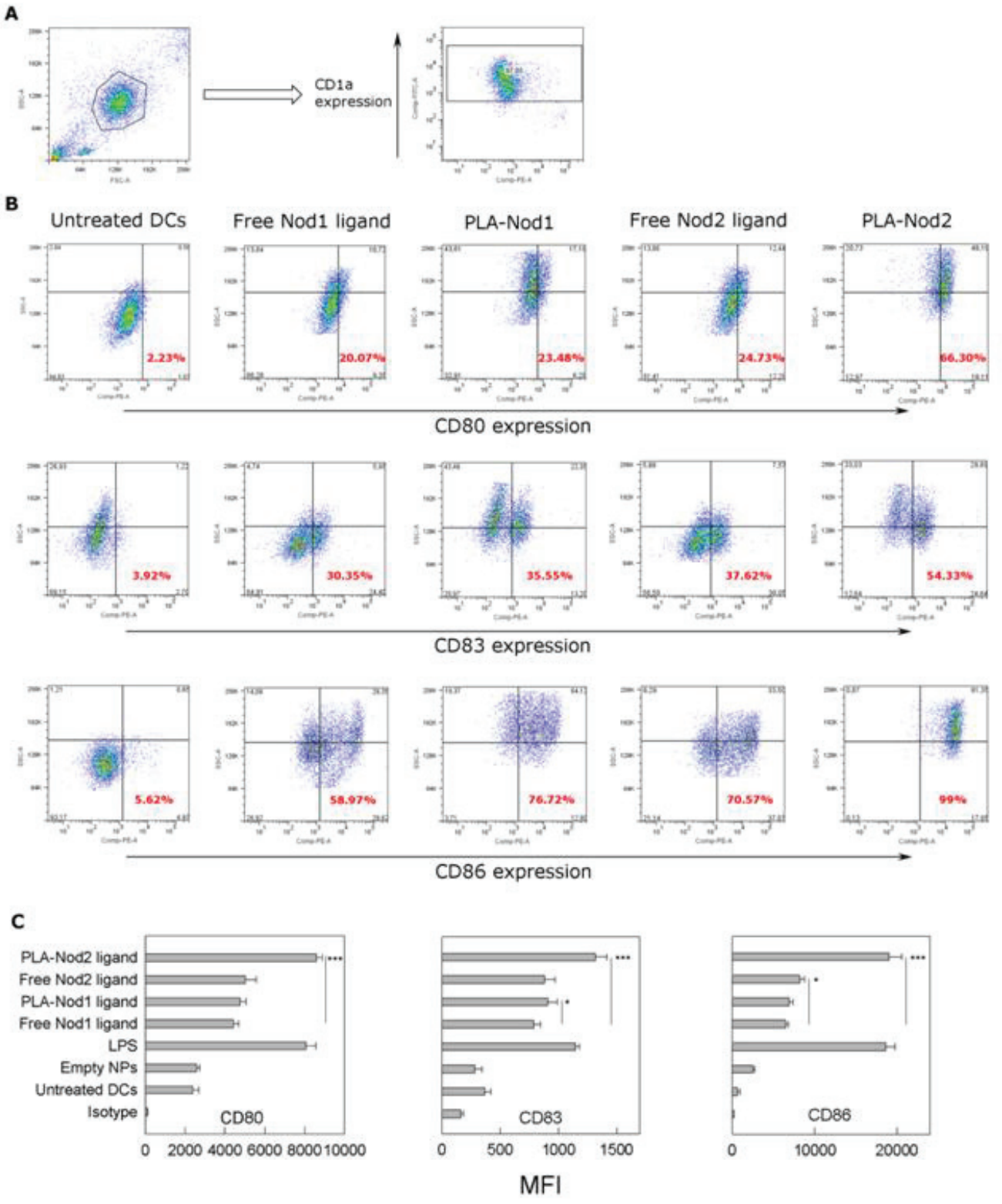


Fig. 4. Surface expression of maturation-related molecules by human MoDCs upon exposure to free or encapsulated Nod receptor ligands, determined by flow cytometry (Dot plot representation). One experiment out of 3 is shown. (A) Gated CD1a positive-DC population analyzed. (B) Phenotypes of MoDCs after 24 h of stimulation. (C) Mean surface expression of maturation marker CD83 and costimulatory molecules CD80 and CD86 by MoDCs upon exposure to free or encapsulated Nod ligands and comparison with LPS as positive control of maturation, and empty NPs and untreated DCs as negative controls. Means (SD); $n=3$. Paired t-tests, $^{**}P<0.01$.

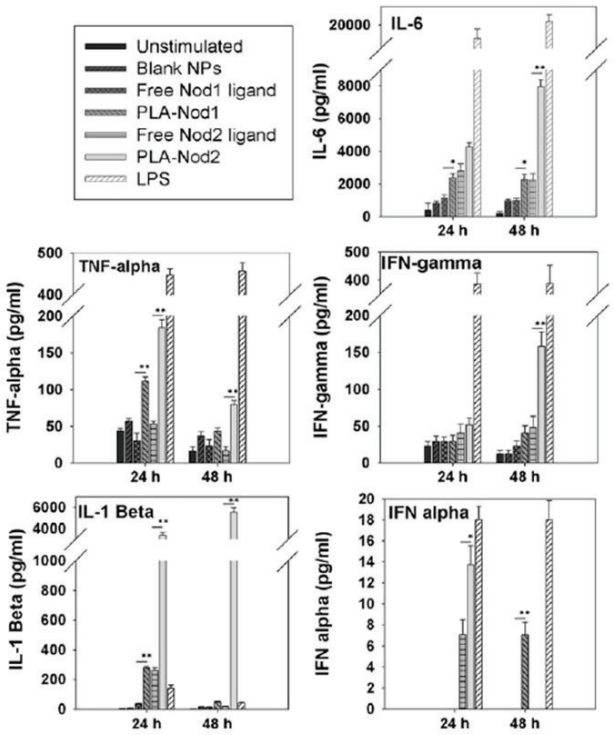


Fig. 5. Quantification by Bio-Plex Pro™ assay of cytokine secretion pattern of MoDCs treated with free or encapsulated Nod ligands *in vitro*. The supernatants of MoDCs were collected and the concentrations of IL-6, IL-1β, TNFα, IFNγ and IFNα were analyzed. LPS (2.5 μg/ml) was used as positive control. Means (SD); $n=2$. Paired *t*-tests, $^{**}P<0.01$, $^{*}P<0.05$.

booster injections, up to passive or active targeting of APCs through unspecific or receptor-mediated phagocytosis, respectively.

In the present work, the potential of Nod receptor agonists as adjuvants in a vaccine strategy based on a biodegradable particulate polymeric carrier in the nanoscale range have been investigated. We hypothesized that the intracellular fate of nanoparticles after endocytosis could favor cytoplasmic delivery of encapsulated ligands, increase the efficiency of Nod ligands delivery into intracellular compartments, and finally enhance their action. As illustrated by Table 1 and Fig. 1, we were able to demonstrate that the nanoprecipitation process allows high encapsulation yield and reproducibility as evidenced by the slight differences of size, PDI and ζ-potential between the batches of NPs.

Furthermore, we showed that the surfactant free nanoprecipitation process is versatile enough to permit both encapsulation of Nod1 or Nod2 ligand without loss of their immune properties.

Indeed, Nod receptor agonists encapsulated into PLA-NPs induced a high NF-κB pathway activation, which leads to the production of proinflammatory cytokines, especially IL-1β, *in vitro* by human dendritic cells, from which the expression pattern of co-stimulatory molecules and maturation marker were stimulated by encapsulated ligands. In this context, the Nod2 ligand was found to be more efficient than the Nod1 without any evidence of toxicity.

We demonstrated that encapsulation of Nod ligands into PLA nanoparticles improves their immuno-stimulatory properties, probably due to a reduced degradation in culture medium and an improved cellular uptake and delivery to the specific intracytoplasmic Nod receptors.

Wischke et al. [32] recently showed that PLGA microencapsulated Nod ligands (~5 μm) induce a dose-dependent maturation of human MoDCs to a proinflammatory phenotype with high levels of released cytokines. Our results confirm their observations, but in the nanoscale range (~200 nm). Consequently, this size-independent effect suggests that the endocytic pathway is not directly involved.

As Alum is widely used in human vaccination and some evidences point out the activation of inflammasome pathways and/or interferon response factor 3 (Irf3)-dependent mechanisms [33,34], these results prompted us to test whether these observations could be translated to an increase of systemic humoral immune responses with Nod receptor ligands. We compared free and encapsulated Nod ligands with Alum *in vivo*. Taking into account the recent data on the interest of co-administration of adjuvant and antigen by different particles than both in the same NPs [29,30], we tested in mice model the co-administration of p24 and Nod ligands by different PLA NPs by subcutaneous route.

The potential of Nod ligands combined to the PLA NPs as vaccine adjuvants for subcutaneous administration was further demonstrated by the significant increase of the IgG responses found in sera of immunized animals compared to free ligands and Alum. Therefore, those results show the suitability of the formulation to improve systemic humoral immunity. The precise mechanism through which Nod ligands loaded formulations are able to promote the induction of p24-specific antibodies is currently under investigations. The mode of action is likely the capability of Nod agonists to interact with and activate APCs leading to the up regulation of co-stimulatory, maturation molecules and proinflammatory cytokine profiles resulting in immune cell recruitment at the injection site. This action is improved by the encapsulation of those ligands into PLA-NPs, presumably due to a better uptake by *in vivo* APCs than free ligands. Moreover, it was recently showed that Nod2 stimulation induces autophagy in DCs, which influences the antigen presentation [35]. We are currently testing whether this mechanism is improved by Nod2 encapsulation, and if it affects the antigen presentation. Furthermore, as Nod receptors are present in APCs and are presented in the cells at mucosal sites [18,36] it could be interesting to evaluate if the immunization of mice with synthetic NPs coated with antigen and containing ligands which signal through Nod1 or Nod2 induces specific immune responses by different mucosal routes (e.g. oral, nasal, sublingual, etc.). Finally, those preliminary results open the way to interesting prospects using relevant HIV antigens for antibody-mediated immunity, as gp120, gp41 or gp140 as already published [7], to evaluate the protective capacities of such vaccine formulations, aspiring for a challenge model.

5. Conclusions

Our results clearly demonstrate that the nanoprecipitation process is very efficient to encapsulate Nod1 and Nod2 ligands into PLA nanoparticles without any loss of their immune properties. These formulations induced proinflammatory immune profiles *in vitro*

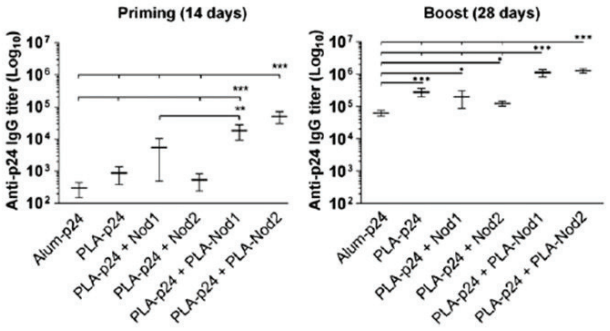


Fig. 6. Specific anti-p24 IgG titers at days 14 and 28 in sera of mice immunized with Alum-p24 or PLA-p24 and comparison to PLA-p24 co-administered with free or encapsulated Nod1 or Nod2 ligand. Animals ($n=5$ per group) received 2 administrations by subcutaneous route of 10 μg of p24 protein adsorbed to PLA nanoparticles co-delivered with 10 μg of Nod1 or Nod2 ligand. For each animal the IgG titer was determined individually and expressed as a mean ± SEM. ANOVA $^{***}P<0.001$, $^{**}P<0.01$, $^{*}P<0.05$.

exemplified by the secretion of IL-1β and a strong expression pattern of co-stimulatory molecules by DCs. Furthermore, these results are efficiently translated *in vivo*, as the subcutaneous co-administration of Nod ligand encapsulated into PLA NPs with the p24 antigen increases by two Logs the humoral immune responses.

Encapsulation of Nod receptor ligands into PLA nanoparticles has the potential to both increase vaccine efficiency and to lower the dose of those immunostimulant molecules compared to their free forms. Synergistic interactions between phagocytosis of NPs and Nod signalling are assumed to be key to this outcome. The cell biology of this crosstalk needs to be examined in more details and mucosal immune responses induced by those formulations need further investigations. Moreover, it should be interesting to test the co-administration of those Nod ligands with TLR ligands, and to compare different routes of administration.

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.015.

Acknowledgements

The authors would like to thank Astrid Calamel, Nadège Handké, Fabienne Jospin, Vincent Lahaye, Phil Lawrence, Sophie Legaz, Simon Megy, Perrine Mercier-Gouy, Séverine Munier and Thomas Trimaille for generous advice, assistance, and reagents. Elsa Luciani and Carole Farre are thanks for the particles observation by SEM.

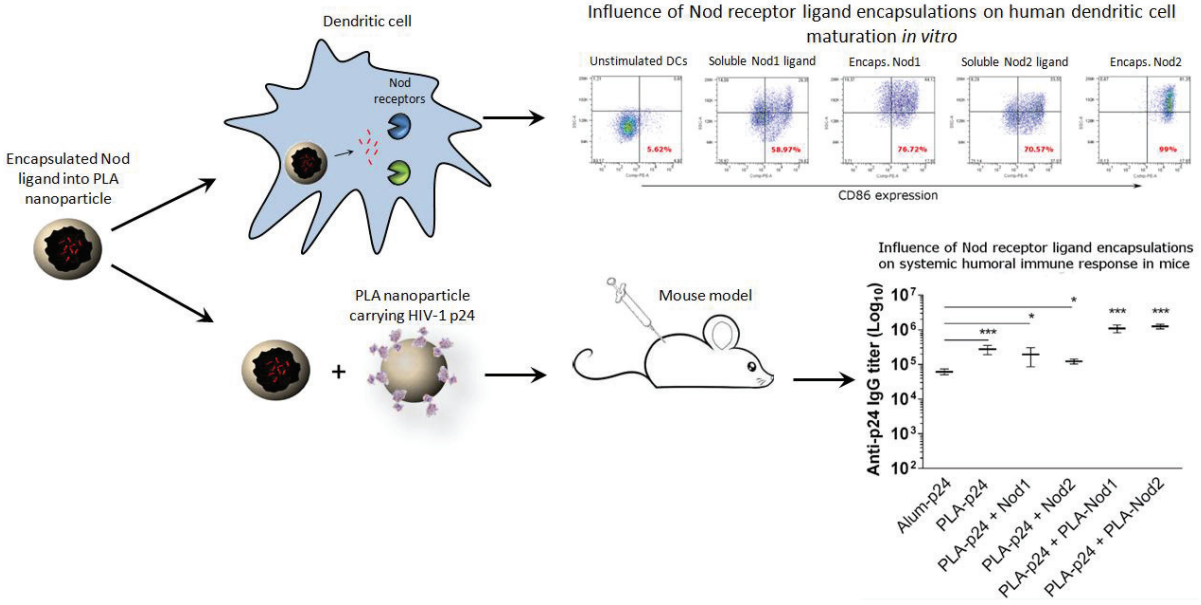
This work was funded by the ANR (French National Research Agency) through Euronanomed grant (iNanoDCs) and ANabio research projects, and PhD studentships from Région Rhône-Alpes and Fondation Recherche Médicale (FRM) to Vincent Pavot.

This work was also partially supported by grants from the two FP7 European grants (CutHIVac) and Aditec (no 280873). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

[1] R.L. Coffman, A. Sher, R.A. Seder, Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work, Immunity 33 (2010) 492–503.
[2] V.E. Schijns, Immunological concepts of vaccine adjuvant activity, Curr. Opin. Immunol. 12 (2000) 456–463.
[3] J. Panyam, V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, Adv. Drug Deliv. Rev. 55 (2003) 329–347.
[4] Q. Zhu, J. Talton, G. Zhang, T. Cunningham, Z. Wang, R.C. Waters, J. Kirk, B. Eppler, D.M. Klinman, Y. Sui, S. Gagnon, I.M. Belyakov, R.J. Mumper, J.A. Berzofsky, Large intestine-targeted, nanoparticle-releasing oral vaccine to control genitorectal viral infection, Nat. Med. 18 (2012) 1291–1296.
[5] C. Liard, S. Munier, M. Arias, A. Joulin-Giet, O. Bonduelle, D. Duffy, R.J. Shattock, B. Verrier, B. Combadiere, Targeting of HIV-p24 particle-based vaccine into differential skin layers induces distinct arms of the immune responses, Vaccine 29 (2011) 6379–6391.
[6] C. Guillon, K. Mayol, C. Terrat, C. Compagnon, C. Primard, M.H. Charles, T. Delair, S. Munier, B. Verrier, 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 (2007) 7491–7501.
[7] D. Lamalle-Bernard, S. Munier, C. Compagnon, M.H. Charles, V.S. Kalyanaraman, T. Delair, B. Verrier, Y. Ataman-Onal, Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity, J. Control. Release 115 (2006) 57–67.
[8] P. Johansen, Y. Men, H.P. Merkle, B. Gander, Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination, Eur. J. Pharm. Biopharm. 50 (2000) 129–146.
[9] H. Laroui, D.S. Wilson, G. Dalmasso, K. Salaita, N. Murthy, S.V. Sitaraman, D. Merlin, Nanomedicine in GI, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 300 (2011) G371–G383.
[10] B.N. Fredriksen, J. Grip, PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), Vaccine 30 (2012) 656–667.
[11] Y. Ataman-Onal, S. Munier, A. Ganee, C. Terrat, P.Y. Durand, N. Battail, F. Martinon, R. Le Grand, M.H. Charles, T. Delair, B. Verrier, 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 (2006) 175–185.
[12] T. Kawai, S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, Nat. Immunol. 11 (2010) 373–384.
[13] K. Geddes, J.G. Magalhaes, S.E. Girardin, Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors, Nat. Rev. Drug Discov. 8 (2009) 465–479.
[14] C. Wilkins, M. Gale Jr., Recognition of viruses by cytoplasmic sensors, Curr. Opin. Immunol. 22 (2010) 41–47.
[15] J.H. Fritz, R.L. Ferrero, D.J. Philpott, S.E. Girardin, Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease, Nat. Immunol. 7 (2006) 1250–1257.
[16] S.E. Girardin, I.G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D.J. Philpott, P.J. Sansonetti, Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection, J. Biol. Chem. 278 (2003) 8869–8872.
[17] S.E. Girardin, I.G. Boneca, L.A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M.K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A.J. Coyle, P.S. DiStefano, J. Bertin, P.J. Sansonetti, D.J. Philpott, Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan, Science 300 (2003) 1584–1587.
[18] M. Chamaillard, M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M.A. Valvano, S.J. Foster, T.W. Mak, G. Nunez, N. Inohara, An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid, Nat. Immunol. 4 (2003) 702–707.
[19] L. Charrier, D. Merlin, The oligopeptide transporter hPepT1: gateway to the innate immune response, Lab. Invest. 86 (2006) 538–546.
[20] T.D. Kanneganti, M. Lamkanfi, G. Nunez, Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease, Immunity 27 (2007) 549–559.
[21] L.A. Carneiro, J.G. Magalhaes, I. Tattoli, D.J. Philpott, L.H. Travassos, Nod-like proteins in inflammation and disease, J. Pathol. 214 (2008) 136–148.
[22] G. Chen, M.H. Shaw, Y.G. Kim, G. Nunez, NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease, Annu. Rev. Pathol. 4 (2009) 365–398.
[23] J. Mašek, E. Bartheldyová, P. Turánek-Knotigová, M. Skrabalová, Z. Korvasová, J. Plocková, S. Koudelka, P. Skodová, P. Kulich, M. Křupka, K. Zachová, L. Czerneková, M. Horynová, I. Kratochvílová, A.D. Miller, D. Zýka, J. Michálek, J. Vrbková, M. Sebela, M. Ledvina, M. Raška, J. Turánek, Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: preparation, structural study and immune response towards rHsp90, J. Control. Release 151 (2011) 193–201.
[24] S.M. Bal, B. Slütter, R. Verheul, J.A. Bouwstra, W. Jiskoot, Adjuvanted, antigen loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles for nasal and intradermal vaccination: adjuvant- and site-dependent immunogenicity in mice, Eur. J. Pharm. Sci. 45 (2012) 475–481.
[25] A. Sze, D. Erickson, L. Ren, D. Li, Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow, J. Colloid Interface Sci. 261 (2003) 402–410.
[26] L.A. Brito, M. Singh, Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research, J. Pharm. Sci. 100 (2011) 34–37.
[27] S. Ruiz, C. Beauvillain, M.N. Mevelec, P. Roingeard, P. Breton, D. Bout, I. Dimier-Poisson, 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 (2005) 1659–1671.
[28] K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, J. Control. Release 70 (2001) 1–20.
[29] J. Kazzaz, M. Singh, M. Ugozzoli, J. Chesko, E. Soenawan, D.T. O'Hagan, Encapsulation of the immune potentiators MPL and RC529 in PLG microparticles enhances their potency, J. Control. Release 110 (2006) 566–573.
[30] S.P. Kasturi, I. Skountzou, R.A. Albrecht, D. Koutsonanos, T. Hua, H.I. Nakaya, R. Ravindran, S. Stewart, M. Alam, M. Kwissa, F. Villinger, N. Murthy, J. Steel, J. Jacob, R.J. Hogan, A. García-Sastre, R. Compans, B. Pulendran, Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity, Nature 470 (2011) 543–547.
[31] A.S. McKee, M.W. Munks, P. Marrack, How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants, Immunity 27 (2007) 687–690.
[32] C. Wischke, S. Mathew, T. Roch, M. Frentsch, A. Lendlein, Potential of NOD receptor ligands as immunomodulators in particulate vaccine carriers, J. Control. Release 164 (2012) 299–306.
[33] S.C. Eisenbarth, O.R. Colegio, W. O'Connor, F.S. Sutterwala, R.A. Flavell, Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants, Nature 453 (2008) 1122–1126.
[34] T. Marichal, K. Ohata, D. Bedoret, C. Mesnil, C. Sabatel, K. Kobiyama, P. Lekeux, C. Coban, S. Akira, K.J. Ishii, F. Bureau, C.J. Desmet, DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity, Nat. Med. 17 (2011) 996–1002.
[35] R. Cooney, J. Baker, O. Brain, B. Danis, T. Pichulik, P. Allan, D.J. Ferguson, B.J. Campbell, D. Jewell, A. Simmons, NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation, Nat. Med. 16 (2010) 90–97.
[36] J.G. Kim, S.J. Lee, M.F. Kagnoff, Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors, Infect. Immun. 72 (2004) 1487–1495.

Résultats et discussion de l'article N°1



Dans cette étude, le potentiel d'agonistes des récepteurs Nod1 (CL235) et Nod2 (CL365) en tant qu'adjuvants a été exploré pour de futures stratégies vaccinales basées sur des systèmes de vectorisation particulaires à base de polymère.

Ce travail nous a ainsi permis de démontrer que l'encapsulation des deux principes actifs Nod1 et Nod2 :

- potentialisait l'effet de ces ligands *in vitro* sur des lignées rapportrices Nod1 et Nod2 (HEK-Blue™-Nod) ;
- induisait la potentialisation de la maturation *in vitro* de MoDCs humaines ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ;
- démontrait une meilleure activité du ligand Nod2 *in vitro* ;
- potentialisait la réponse humorale *in vivo*.

Par ailleurs, nous avons pu confirmer les travaux de Wischke *et al.* menés en 2012, montrant des résultats similaires avec des microparticules de PLGA (~ 5 µm). Nos résultats démontrent que ces observations sont aussi obtenues avec des NPs (~200 nm). Ils ne sont donc pas directement dus à la taille des particules et n'impliquent donc pas les mécanismes d'endocytoses. Nous avons de plus complété ces observations par des expériences *in vivo*.

Néanmoins, ce travail a soulevé de très nombreuses questions qui nous ont amenées à plusieurs hypothèses :
Quels mécanismes sont impliqués dans la potentialisation de l'action des ligands Nods et l'existance d'une différence d'action entre le ligand Nod1 et le Nod2 ?

- Une meilleure prise en charge par les CPAs, des ligands Nods encapsulés, favorisant ainsi un relargage plus important dans le milieu intracellulaire où sont présents les récepteurs Nods (Fig. 1).
- L'activation *in vivo* des récepteurs Nods engendrant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires favorisant le recrutement des cellules de l'immunité au niveau du site d'injection.
- L'encapsulation protège les ligands de la dégradation, *in vitro* mais surtout *in vivo*.
- Comme l'illustre la Figure 1, nous pouvons avancer l'hypothèse que les voies d'activation Nod1/Nod2 ne sont pas complètement identiques. Il est aussi possible qu'un relargage plus important puisse expliquer une meilleure action du ligand Nod2.

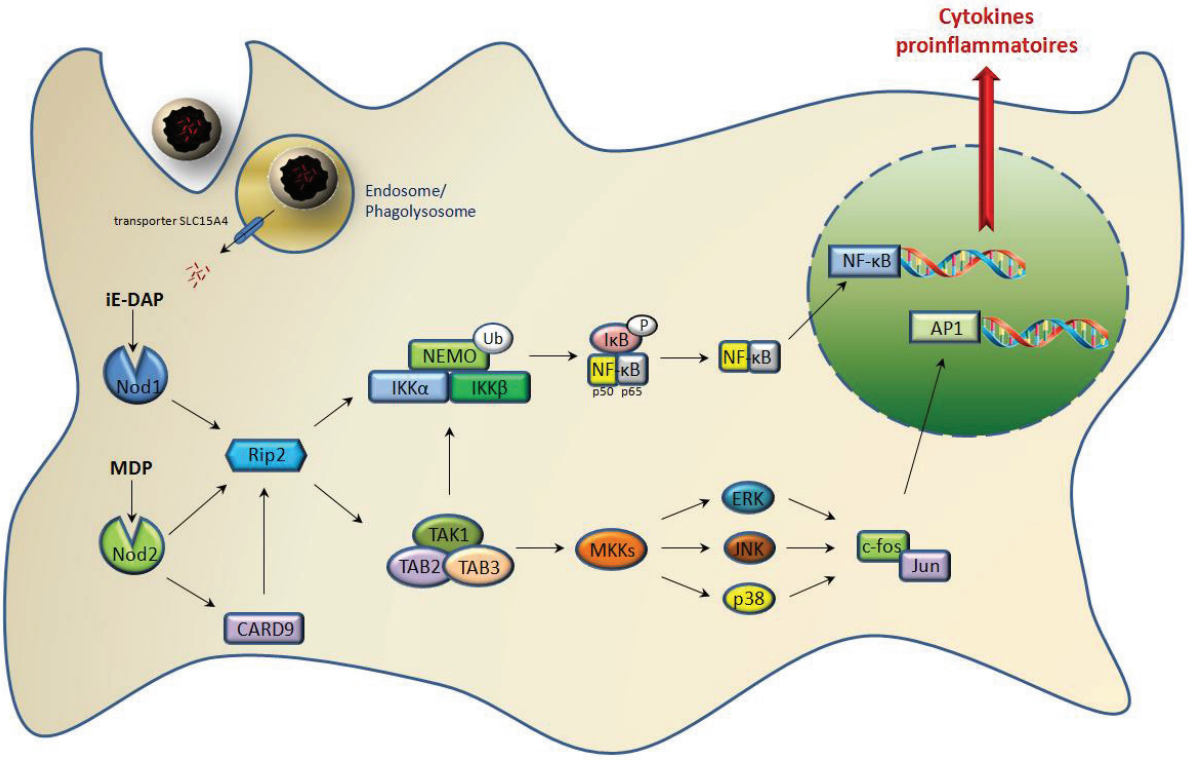


Figure 1 – Schématisation de la prise en charge des PLA-Nods par une DC et activation des récepteurs Nods et des cascades du NF-κB et des MAPKs.

Il est maintenant intéressant de se poser les questions suivantes : est-ce que l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et de cytokines permet une réelle activation/prolifération lymphocytaire ? Pouvons-nous améliorer la présentation antigénique *via* les modifications des cascades de régulations intracellulaires (CMH-II, cross-présentation, etc.) ? Est-ce que cette potentialisation peut se traduire par l'orientation sélective de la réponse immunitaire ? Pouvons-nous induire des réponses muqueuses ?

Par ailleurs, le travail ayant apporté une preuve de concept sur la possibilité de « nano-manipulation » des DCs par des PLA-Nods, est-ce que l'utilisation du « co-signalling » est nécessaire : doit-on co-délivrer le ligand et l'antigène dans la même particule ?

Nous avons ainsi poursuivi nos investigations *in vitro* sur un modèle de prolifération de lymphocytes autologues chez des patients VIH^+ et *in vivo* par l'étude de différentes formulations vaccinales administrées par voies parentérale ou muqueuses. Ces résultats sont exposés dans l'article N°2.

RESULTATS 2 : UTILISATION DE NPS DE PLA POUR L'INDUCTION DE REPONSES IMMUNITAIRES MUQUEUSES ET ETUDE DE L'EFFET ADJUVANT DE MOLECULES AGONISTES DES RECEPTEURS NOD1 ET NOD2

L'induction par un vaccin de réponses cellulaires et humorales (IgG & IgA) neutralisantes au niveau systémiques et muqueux (intestinales et vaginales), apparaît comme une nécessité absolue dans le développement d'un vaccin anti-VIH-1 efficace. Néanmoins, l'induction de réponses muqueuses locales représente un défi majeur en vaccination au XXIème siècle. Si de nombreux vaccins administrés par voies parentérales sont capables d'induire des réponses muqueuses (HPV, grippe, tuberculose), seuls sept vaccins possèdent une AMM pour une vaccination par voie muqueuse. Si l'administration de vaccins par ces voies semble être une stratégie prometteuse afin d'induire une immunité protectrice, elle reste difficile à mettre en œuvre, d'où la nécessité de trouver de nouvelles formulations/adjuvants capables d'y parvenir. Les résultats précédemment obtenus par Charlotte Primard et Nicolas Rochereau[158], ont permis de démontrer que les NPs de PLA pouvaient être utilisées comme vecteur d'adressage muqueux et donc potentiellement véhiculer un Ag vaccinal et une/des molécule(s) immunostimulante(s). Les NPs de PLA sont en effet prises en charge de manière efficace par les cellules M intestinales, spécialisées dans la capture d'Ags au niveau de la muqueuse. Après transcytose *via* les cellules M, les NPs sont ensuite internalisées par les DCs muqueuses et les lymphocytes B (LB) dans la région du dôme sub-épithélial des plaques de Peyer (PPs). La migration des DCs vers les zones riches en cellules T, pourrait ainsi permettre d'induire une réponse immunitaire adaptative efficace contre un Ag adsorbé.

Ces résultats étant encourageants pour l'induction d'une réponse immune *in vivo*, les particules vectorisant l'Ag protéique p24 de VIH-1 ont été précédemment testées pour leur capacité à induire des réponses humorales muqueuses. Les particules de PLA-p24 non adjuvantées ont ainsi été administrées par voie entérale, à l'aide d'une sonde de gavage, chez la souris, mais sans succès.

Ce faible pouvoir inducteur pouvait être expliqué par deux hypothèses : la protection de l'Ag qui restait insuffisante face à l'agressivité du milieu gastrique, ou le caractère immunologiquement inerte des particules de PLA, insuffisantes pour stimuler efficacement le système immunitaire associé aux muqueuses. L'adjuvantation des NPs *via* l'encapsulation de molécules immunostimulantes, pour une administration par voie muqueuse, a donc été envisagée. Différentes études ont en effet montré la capacité des NPs de PLA/PLGA transportant des ligands comme le macrophage-activating lipoprotein (MALP-2) pour le TLR2, le poly(I:C) pour le TLR3 ou le CpG ODN pour le TLR9, à induire des réponses synergiques antivirales après administrations entérales[396]. De nombreuses études se sont ainsi intéressées à la vectorisation de

ligands de TLRs alors que l'utilisation de ligands des récepteurs Nod1 et Nod2 reste encore peu étudiée en vaccinologie. Il a pourtant été démontré que ces récepteurs étaient exprimés par les CPAs mais aussi par les cellules épithéliales retrouvées au niveau des muqueuses. De plus, nous avons précédemment montré (article N°1) que l'encapsulation de ligands Nods permettait de potentialiser la maturation des DCs, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que les réponses humorales systémiques après administration sous-cutanée chez la souris. Nous avons ainsi décidé de nous intéresser au ciblage de ces récepteurs afin d'induire des réponses immunitaires muqueuses.

Préalablement, nous avons voulu vérifier *ex vivo* si la maturation des DCs, observée *in vitro* (article N°1), se traduisait par une capacité accrue à induire une prolifération lymphocytaire. Pour cela, nous avons bénéficié de l'expertise de l'équipe de Felipe Garcia (IDIBAPS – Barcelone) afin d'étudier la capacité proliférative de LT autologues humains (VIH^+) induite par des MoDCs préalablement chargées avec nos PLA-Nod-p24.

En se basant sur la littérature et sur l'ensemble des vaccins actuellement homologués pour un usage chez l'Homme, nous constatons que la question de l'administration du vaccin par voie muqueuse ou parentérale, afin d'induire des réponses muqueuses et systémiques, se pose encore. Durant cette partie de mon travail de thèse, j'ai ainsi évalué différents schémas vaccinaux basés sur l'administration de complexes NPs-Ag du VIH-1 et NPs-Nods, par voies muqueuses et parentérale dans le modèle murin BALB/c. Cette approche étant basée sur le ciblage des récepteurs Nod1 et Nod2, nous avons comparé l'administration de NPs-Ag et ligands Nods par voie entérale (gavages), par voie nasale ou par voie sous-cutanée.

Par ailleurs, nous nous sommes interrogés sur la nécessité ou non, de co-délivrer l'Ag et la molécule immunostimulante dans la même ou dans différentes particules. Dans ce but, les ligands Nod1 ou Nod2 ont été encapsulés dans des particules de PLA[397] et la protéine de capside p24 du VIH-1 a été adsorbée à la surface de la même ou de différentes particules, avant administration.

Nous avons ainsi pu montrer l'induction de fortes réponses systémiques par voie sous-cutanée ainsi qu'une forte transsudation des IgG vers les surfaces muqueuses, potentialisées par la présence des ligands Nods. Le ligand Nod2 a permis, par voie entérale, de déclencher des réponses locales intestinales et par voie nasale, des réponses humorales vaginales et sériques.

L'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans la publication N°2 en cours d'écriture.

Delivery of encapsulated Nod ligands enhance their ability to induce mucosal immune responses against vaccine antigen

Vincent Pavot[a,b], Nicolas Rochereau[b], Nuria Climent[c], Felipe Garcia[c], Christian Genin[b], Eric Perouzel[d], Thierry Lioux[d], Bernard Verrier[a,1], Stéphane Paul[b,1,*]

[a] Institut de Biologie et Chimie des Protéines UMR 5305 - CNRS/Université de Lyon, France

[b] Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes – INSERM CIE3 Vaccinologie, Faculté de Médecine de Saint-Etienne, France

[c] Hospital Clinic-IDIBAPS, HIVACAT, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain.

[d] CAYLA – InvivoGen – Toulouse, France

[1] These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author. Dr. Stéphane Paul Tel.: +33(0)477421467; fax: +33(0)477421486.

E-mail address: stephane.paul@univ-st-etienne.fr (S. Paul).

ABSTRACT

Successful vaccine development against HIV will likely require the induction of strong, long-lasting humoral and cellular immune responses in both the systemic and mucosal compartments. Most of the vaccines are poorly transported across the epithelial barrier and are mainly administered by parenteral route. Adjuvants are critical for the success of those subunit vaccines. Nanoparticle (NP) delivery systems for antigens and/or molecular danger signals are promising vehicle adjuvants and Nod-Like Receptors (NLRs) are considered as potential targets for vaccine adjuvants. In this work, Nod1 and Nod2 ligands were encapsulated into polylactic acid (PLA) colloidal biodegradable NPs, coated with HIV-1 Gag (p24). The strong ability of this new type of nanoparticulate vaccine to activate human dendritic cells has been first demonstrated in an *ex vivo* model of human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) from HIV-1 infected patients. Nod-encapsulated NPs induced cytokines and chemokines secretion by DCs and improved their ability to activate specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells *in vitro*.

The impact of Nod agonist encapsulations on the ability to induce systemic and mucosal humoral and cellular immune responses to Gag p24 antigen was then tested in mice after parenteral or mucosal administration. Encapsulated Nod1 and Nod2 agonists, co-delivered with Gag, enhanced p24 specific systemic and mucosal immune responses after subcutaneous, oral gavage or nasal administration.

Our results provide a rational approach for broader application of particulate vaccines and the use of encapsulated Nods receptor ligands as potent systemic and mucosal adjuvants.

Keywords: HIV; Nod receptor ligands; Nanoparticles; Mucosal immunity; Vaccines

1. Introduction

Development of a safe, effective, and affordable vaccine represents the best hope for containing the spread and consequences of Human Immunodeficiency Virus (HIV) epidemic worldwide. More than 80% of HIV-seropositive individuals acquired the infection through mucosal surfaces [1]; this strongly implies that HIV-specific immunity at mucosal sites is crucial for the control of infection in many individuals exposed to the virus. Effective vaccine against such infectious diseases will require B and T cell responses. Nowadays, live-attenuated vaccines are the only licensed formulation to elicit potent and sustained T cell responses in people. Live vaccines, however, may have limits to be used against HIV because of potential safety constraints. Hence, there is an urgent need to develop HIV-1 specific non live vaccine formulations capable of generating mucosal neutralizing antibodies and both T helper 1 (Th1) and CD8-T cell responses in humans.

Given that the gastrointestinal mucosa is the primary reservoir for HIV replication [2, 3] and genital mucosa are the principal virus entrance, vaccine strategies must be able to target the induction of HIV-specific antibody and T cell responses in the gut and genital mucosa.

Mucosal administration of vaccines is an important approach for the induction of appropriate immune responses to microbial and other environmental antigens in systemic sites and peripheral blood, as well as in most external mucosal surfaces. However, to date only a few vaccines have become available for mucosal use [4]. The lack of success in the development of an effective conventional vaccine against HIV-1 has focused attention on mucosal immunity. This is a rational move, since HIV is transmitted mostly by the mucosal route. Recently, a promising mucosal candidate vaccine against HIV-1 has shown that immunization of nonhuman primate females by both the intramuscular (i.m.) and intranasal routes with gp41-derived virosome-bound antigens elicited full protection against repeated SHIV vaginal challenges, whereas immunization by the i.m. route alone elicited protection in only 50% of the animals [5].

Oral delivery of vaccines is also an attractive mode of immunization because of its easy administration. In Peyer's patches (PPs), DCs are separated from the intestinal lumen by the follicle-associated epithelium (FAE). It allows transfer of pathogens/antigens in lymphoid tissue through Microfold (M) cells [6]. Antigens are then captured by DCs, causing their maturation and their migration to the intrafollicular areas [7]. Zhu *et al.* recently demonstrated functional immune compart-mentalization of the gut mucosa and developed a nanoparticle-releasing microparticle oral delivery system using poly(dl-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles carrying MALP-2, poly(I:C), and CpG ODN TLR ligands and demonstrated that it is an easy, non-invasive vaccination strategy effective against viral infection occurring through the rectal or vaginal mucosa [8].

Like Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT) in all mammalian species, rodent Nasal Associated Lymphoid Tissue (NALT) forms an epithelial smooth dome surface including M cells [9]. Therefore, intranasal vaccines delivered into the nostrils are an attractive mode of immunization. Indeed, the nasal mucosa is a practical site for vaccine administration by the absence of acidity, lack of abundant secreted enzymes and small mucosal surface area, which results in a low dose requirement of antigen. Furthermore, the nose is easily accessible, highly vascularized and can be used for the easy immunization of large population groups. It is well established that nasally administered vaccines can induce both mucosal and systemic immune-

responses, especially at the genital level if the antigen is adjuvanted [10, 11].

Those data have been confirmed after nasal immunization of both mice and humans against genital herpes [12], influenza [13] and HPV [14].
At the same time it should be emphasized that highly protective vaccines against a number of mucosal infections are administered by a parenteral rather than a mucosal route, and still convey strong protection, especially those that stimulate strong serum IgG antibodies that cross the mucosal epithelium by neonatal Fc receptor (FcRn)-mediated transport and perhaps transudation [15, 16].

As live vaccines may be limited for use against HIV-1, recombinant protein subunits and synthetic peptides are tested in a number of vaccines and offer advantages, such as reduced toxicity. However, these compounds are often poorly immunogenic when administered alone, especially when administered by mucosal routes. Consequently, another angle of investigation is to enhance the immune response to a specific antigen by developing improved vaccine adjuvants which are potent, safe and compatible with protein subunits and peptides [17].

Agonists of microbial pattern recognition receptors (PRRs) are promising new adjuvant candidates. The best-studied family of PRRs is the Toll-like receptor (TLR) family, which in mammals encodes membrane-spanning molecules with various specificities for pattern or danger-associated molecular patterns (PAMPs or DAMPs, respectively) [18]. More recently, another family of PRRs – named the nucleotide-binding and oligomerization domain (Nod)-like receptor (NLR) family – has received considerable attention. NLRs are a family of cytosolic PRRs that trigger inflammatory signaling, following detection of either PAMPs or DAMPs [19]. Within the Nod subfamily, Nod1 and Nod2 inclued one (for Nod1) or two (for Nod2) N-terminal Caspase Activating and Recruiting Domains (CARD), which connect these proteins to the NF-κB and MAP kinase signalling cascades, leading to the production of inflammatory cytokines [20, 21].

Nod2 is a cytosolic receptor for Muramyl DiPeptide (MDP), which is a component of the bacterial cell wall molecule peptidoglycan (PGN) [22]. In contrast, Nod1 especially detects DiAminoPimelic acid (iE-DAP)-type PGN that is found in all Gram-negative and in some Gram-positive bacteria [23, 24].

Not surprisingly, Nod receptors are mainly expressed by two cell types that are exposed to and/or deal with microorganisms: antigen presenting cells (APCs) and epithelial cells. In both humans and mice, APCs such as macrophages and DCs express Nod1 and Nod2 [25]. Most (but not all) intestinal epithelial cell lines and, more importantly, most primary epithelial cells express Nod1 [26, 27]. However, Nod2 expression seems to be limited to Paneth cells, which are located at the base of the intestinal crypts [28].

As Nod receptors are expressed in APCs at mucosal sites and because their activation is able to induce production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, we have evaluated whether the immunization of mice with synthetic NPs coated with HIV-1 Gag p24 and containing ligands that signal through Nod1 or Nod2 [29] induces specific humoral and cellular immune responses by comparing subcutaneous, oral and nasal routes. We previously provided evidences that encapsulation of Nod1 and Nod2 ligands into PLA NPs potentiate their immune properties *in vitro* and *in vivo* [29]. Additionally, PLA particles may offer protection to encapsulated antigens orally delivered and facilitate uptake by M cells to the PPs, thus serving as a vehicle for mucosal immunization [30-32]. Therefore, we designed ~200 nm sized NPs containing the Nod1 or Nod2 ligand and coated with HIV Gag p24. We then studied the ability of those formulations to induce cytokines and

chemokines secretion by DCs from HIV^+ patients and to improve their ability to activate specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells *in vitro*.

To our knowledge, PLA nanoparticles formulations containing p24 and Nod ligands have not been studied so far for tuning immune response by mucosal routes. Therefore, the aim of our study is to develop such systems and to provide evidences for their adjuvant potential by evaluating the stimulation of mucosal immune responses against HIV-1 p24 antigen. For each mouse, cellular and humoral responses were analyzed on splenocytes and in vaginal lavages, faeces and sera. Subcutaneous immunization of BALB/c mice with NPs containing Nod ligands induced high systemic immune responses and transudation of IgG to mucosal surfaces, whereas oral gavages and nasal administrations of Nod2 ligand adjuvanted formulations induced high IgA responses at the intestinal and vaginal level respectively.

2. Materials and methods

2.1. PLA, HIV-1 Gag p24 antigen and Nod receptor ligands.

Poly(D,L-lactic acid) (PLA50 Mn = 30,000 g/mol, molecular weight distribution Mw/Mn=1.7) with a carboxylic end group was purchased from Anabior (Grenoble, France).

HIV-1 p24 antigen was produced and purified from *Escherichia coli*, and endotoxins were removed as previously described [33]. The purity of p24 was higher than 97% with an endotoxin content lower than 5 EU/mg of p24 protein, as determined using the QCL-1000 Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) kit (BioWhittaker, Walkersville, Verviers, Belgique).

The Nod1 ligand CL235 [tetradecanoyl-δ-D-glutamyl-(L)-meso-lanthionyl-(D)-alanine] is an acyl tripeptide containing meso-Lanthionine instead of meso-DAP amino acid. The Nod2 ligand CL365 [6-O-stearoyl-N-glycolyl-Murabutide] is an acyl Murabutide analog. These compounds were selected for the ease of chemical synthesis and because the attachment to a hydrophobic acyl residue enhanced stimulation of Nod1 or Nod2 up to several hundred folds, *in vitro* cell based assays. These compounds were developed and manufactured by CAYLA-InvivoGen (Toulouse, France).

All other reagents were of analytical grade and received from commercial sources.

2.2. Preparation of PLA nanoparticles with encapsulated Nod1 or Nod2 ligand.

Nod ligands encapsulated into PLA nanoparticles were prepared by nanoprecipitation as previously described [29]. Briefly, the polymer and the Nod ligand (Nod1 or Nod2) were dissolved in acetone (polymer: acetone in a 2% w/v ratio and ligand: PLA concentration of 1% w/v), and this solution was added dropwise to an aqueous solution (ethanol/water) under slow stirring. Organic solvents were then removed under reduced pressure at 30 °C. No residual solvents were detected by gas chromatography from dissolved particle samples to the sensitivity limits of this method. Nanoparticle size and size distribution (PSD or PI) were determined by photon correlation spectroscopy at 25 °C using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Highly diluted colloidal dispersions in 1 mM NaCl solution were used and each value was the mean of three to five measurements.

Nod ligand encapsulation efficiency was obtained through determination of the amount of remaining free ligand in the supernatant after centrifugations of the nanoparticle solution (10 min at 10,000 x g). Supernatants were cultured with HEK-Blue™-hNod reporter cell lines (InvivoGen) in 96-microwell plates (50,000 cells/well in duplicate) to study the stimulation of Nod receptors (Nod1 or Nod2) by monitoring the activation of NF-κB pathway thanks

to a secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP). The SEAP reporter gene is placed under the control of the IFN-β minimal promoter fused to five NF-κB and AP-1 binding sites into HEK293 cells. Stimulation with a Nod ligand activates NF-κB and AP-1 which induces the production of SEAP. Level of SEAP can be easily determined with a detection medium that turns purple/blue in the presence of alkaline phosphatase. The absorbance of the samples was measured at 650 nm using a microplate reader (BioRad). Nod1 and Nod2 ligand solutions were initially assayed with HEK-Blue^{TM}-hNod Cells to plot the calibration curve. The encapsulation efficiency of Nod ligands was calculated by the ratio of the ligand mass in nanoparticles over the total mass of ligand in the recipe.

2.3. Preparation of p24-coated PLA nanoparticles

The p24 protein was diluted in PBS at 200 µg/ml. PLA nanoparticles (empty or Nod encapsulated) were diluted at a concentration of about 30 mg/ml in PBS (to reach a Nod concentration of 200 µg/ml) and 1 volume was added to 1 volume of the protein solution. The adsorption reaction was incubated for 2 hours at room temperature (RT), with moderate stirring end over head. Unbound p24 protein was collected in the supernatant by centrifugation at 10,000 g for 10 min and quantified by micro-Bradford assay according to the manufacturer's instruction for 96-microwell plates. The absorbance of the samples was measured at 595 nm using a Microplate reader. P24 solution was initially assayed on micro-Bradford for establishing a calibration curve. The calibration curve was found to be linear with a correlation coefficient of R^2 = 0.9926. Nanoparticle sizes were determined using a Zetasizer Nano ZS.

Endotoxin contents of the formulations were assessed using EndoSafe test (Charles River) and were < 5 EU/mg. Sterility was assessed on Petri dishes bacterial medium.

2.4. Activation of HIV-1-specific T lymphocytes by autologous MoDCs cultured with NP-Nods-p24.

Ethics Statement.

This study received the approval of the Committee of Ethics and Clinical Investigation of the Hospital Clinic Universitari (Barcelona, Spain). All the subjects participating in the study were recruited at the Service of Infectious Diseases & AIDS Unit of this Hospital and gave their informed written consent.

Study individuals.

Samples of EDTA-anticoagulated venous blood samples were obtained from asymptomatic HIV-1-infected patients with baseline $CD4^+$ T cell counts > 450 cells/mm^3, and plasma viral load < 10,000 HIV-1 RNA copies/ml.

Generation of MoDCs.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated immediately after venous extraction by using a standard Ficoll gradient. Cells were processed immediately after isolation. To obtain human monocytes, PBMC were incubated in plastic plates (2 h at 37 °C) in a humidified atmosphere with 5% CO_2 in MoDC medium (serum-free XVIVO-15 medium, Lonza, Maryland, USA) supplemented with 1% autologous serum, gentamicin (B/Braun Medical, Melsungen, Germany) and fungizone (amphotericin B, Bristol-MyersSquibb, Rueil-Malmaison, France) and 1 mM zidovudine (Retrovir from GlaxoSmithKline, Madrid, Spain) to avoid HIV infection. To obtain immature MoDCs, adherent cells were washed four times with pre-warmed MoDC medium and then cultured for 5 days in the presence of 1000 U/ml each of recombinant human IL-4 (Strathmann Biotec AG, Hamburg, Germany) and

recombinant human GM-CSF (Peprotech, London, UK) on days 0 and 2. The purity and immunophenotype were assessed by flow cytometry.

Proliferation assays, cytokines expression and uptake of Gag p24 antigen.

As a source of enriched T cells, we used fresh PBMC depleted of monocytes after plastic adherence, as indicated above for the generation of MoDCs. These monocyte-depleted lymphocytes were washed (3x) and resuspended in serum-free XVIVO-10 medium and labeled with CFSE following the instructions of the manufacturer (CellTrace CFSE cell proliferation kit, Molecular Probes, Paisley, UK). Autologous matured MoDCs ($6x10^4$ MoDC/well) were washed (4x) and resuspended in XVIVO-10 and co-cultured with autologous fresh CFSE-labeled lymphocytes ($2x10^5$ T-lymphocytes/well) in a final volume of 200 µl in XVIVO-10 medium supplemented with 1 mM zidovudine to impede possible replication of endogenous HIV-1. Stimulation with NPs-Nods (1 µg/ml), PLA NPs carrying recombinant HIV-1 p24 (1 µg/ml), and maturation of MoDCs were then performed for 48 h. The contribution of MoDCs alone and monocyte depleted PBMC (lymphocytes) alone was determined as negative controls of proliferation.

The co-cultures were done in triplicates at 37 °C in a humidified atmosphere of air with 5% CO_2. After 6–7 days, proliferating $CD4^+$ ($CD3^+$ $CD8^-$) and $CD8^+$ ($CD3^+$ $CD8^+$) T cells were determined by direct staining with mAbs conjugated with α-CD3-Per-CP and α-CD8-PE. Mouse Ig isotypes mAbs (from BD Biosciences) of unknown antigen specificity conjugated with PerCP or PE were used as negative control mAbs. The stained cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). T cell populations were selected by forward and side light-scatter parameters and sub-gated for CD4 or CD8 expression. Cells that proliferated after the co-culture had lower intensity of CFSE ($CFSE^{low}$) in comparison with basal conditions. p24 specific proliferation was expressed as the percentage of $CFSE^{low}$ cells after co-culture with MoDCs stimulated with encapsulated Nod1, Nod2-NPs carrying p24 antigen or pulsed with soluble p24 or NPs-p24 alone.

In parallel, the MoDCs culture supernatants were collected after 16 h and stored at -80 °C for further cytokine quantification. Expressions of IFNγ, IL2-R, MIP-1β (CCL4) and IL-6 were analyzed simultaneously using the Bio-Plex Pro™ assay (BioRad) according to the manufacturer's protocol.
Capture and immunophenotype were also studied. Immature MoDCs unpulsed or pulsed with p24, PLA-p24, PLA-Nod-p24 were cultured for 16 h in the absence of the maturation cocktail. The capture and immunophenotype of mature MoDCs were assessed by flow cytometry analysis as already reported [34]. MoDCs were stained with anti-CD1a as a DC marker mAb (red colour) and intracellular staining of p24 and nucleus was analyzed. As a negative control of ingestion, MoDC were pulsed with PLA-p24 (green colour) at 4 ºC. Capture of PLA-p24 was assessed by flow cytometry and fluorescence microscopy using anti-p24 staining.

2.5. Mice and vaccinations

Eight-to-twelve week old female BALB/c mice were purchased from Charles River Laboratories and were hosted at the Plateau de Biologie Expérimentale de la souris/Mice experimental biology facility (Ecole Normale Supérieure of Lyon, France), and handle following the institutional guidelines. All studies and procedures were approved by the Comité Rhône-Alpes d'Ethique pour l'Experimentation Animale (Lyon, France).

Mice were divided into 6 groups of 5 animals and oral gavages were performed by orogastric intubation with tube feeding. The tubing was introduced at a

fixed distance from the incisors to administrate vaccine formulation at the duodenum level. Immunizations consisted of three administrations of 200 µl at 1 week intervals, followed by a last booster immunization 2 weeks later. Ten micrograms of Nod encapsulated ligands were co-delivered with ten micrograms of p24 in the same or into different NPs and two groups were immunized with p24 alone or PLA-p24 NPs (control groups).

Mouse intranasal immunizations were performed using 12 µL (6 µl each nostril) of the vaccine complex in the nose under anesthesia with Ketamine/Xylazine. The mice were placed on their back until waking up (~ 30 min). Immunization and preparation protocols were performed the same way as the oral immunizations.

Heat-labile enterotoxin of *E. coli* (ET) already demonstrated efficiency after immunization by different mucosal routes [35-37], and was therefore used as a positive control (10 µg/mouse).

Subcutaneous administrations were performed in the leg at day 0 (D0), D14 and D28 and a volume of 100 µl of the same formulations as previously described was administered.

2.6. Blood, faeces and vaginal secretion recovery

Biological fluids were recovered before immunization (D0) and at D14, D28 and D34 to examine their Ab content. Serum samples were obtained from whole blood recovered by performing a small incision at the retro-orbital vein of the mice. Vaginal secretions were collected from mice injected with 50 µl of PBS (two times) placed in the vagina of the animal using an adapted pipette (Pipette M100, Gilson), and tips (CP100, Gilson). 5 µl of 25X Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) were then added to the vaginal lavages to protect Ig from degradation. Fresh faeces were also collected from each animal and diluted at 100 mg/ml with 1X Halt™ Protease Inhibitor Cocktail. Sera were then collected by centrifugation at 16,000 x g in a spin column and stored at -20 °C until use. Faeces and vaginal secretions were strongly mixed to dislocate and then centrifuged at 16,000 x g and stored at -20 °C until use.

The animals were euthanized after the last blood, vaginal lavages and faeces sampling for Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISpot) essays on spleens.

2.7. Detection of p24-specific IgG and IgA responses

Sera, vaginal lavages and faeces were tested for the presence of p24-specific IgG and IgA, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), for each sample (D0, D14, D28 and D34). Ninety-six-well Nunc maxisorp plates were coated with 100 µl of 1 µg/ml of p24 protein overnight at RT. P24 excess was eliminated and plates were blocked with 200 µl of 10% non-fat dry milk for 1 h at 37 °C to prevent non-specific binding of the antibodies. Plates were washed 3 times with PBS/0.05% Tween-20 using a Thermo Scientific auto plate washer. Serum samples from immunized mice at the indicated time points were serially diluted in DPBS/BSA 1%, vaginal washes were diluted at 1/10 in DPBS/BSA 1%, and faeces preparations at ½ in DPBS/BSA 2%. Then, 100 µl of each sample were incubated on blocked plates for 1 h at 37°C. Specific IgG and IgA detection antibodies were obtained from Southern Biotech. Wells were washed and incubated 1 h at 37 °C with anti-mouse IgG–HRP (horseradish peroxidase) conjugate (1:10,000) or anti-mouse IgA–HRP conjugate (1:10,000). Plates were washed and developed using 100 µl per well of tetramethylbenzidine (TMB) substrate (BD Biosciences) and stopped using 1N H_2SO_4. The optical density (OD) at 450 nm with a correction at 630 nm was measured using a BioRad plate reading spectrophotometer. To quantify IgG and IgA, plates were either coated with monoclonal anti-IgA/IgG

antibody (Mabtech), diluted to 2 µg/ml in PBS by adding 100 µl/well. Monoclonal murine IgG or IgA standard immunoglobulins (Mabtech) were used on each plate to quantify the murine anti-p24 specific antibodies.

2.8. Detection of p24-specific B cells by ELISpot into the spleen

ELISpot assays were performed with cells isolated from the spleens. ELISpot assay was made using ELISpot^{plus} kit for mouse IgA, according to the procedure provided by the manufacturer (Mabtech). Briefly, the p24 antigen is coated on the ELISpot plates provided (PVDF plates) and the p24-specific antibodies secreted by the B cells bind to the immobilized antigen. Spots are detected after addition of biotinylated anti-IgA followed by streptavidin-enzyme and substrate.

2.9. IFNγ ELISpot essays

This technique permits to evaluate the number of splenocytes producing IFNγ. At D34, spleens from immunized mice were removed in sterile conditions and passed through a 100 µm cell strainer in PBS to obtain a clean cell suspension. Then, 5 ml of each suspension were lay over 5 ml of Lympholyte®-M (Cedarlane®) for centrifugation 20 min at 1500 x g. Lympholyte®-M is a density separation medium specially designed for the isolation of viable lymphocytes from murine lymphoid cell suspension and permits to eliminate erythrocytes, dead cells and debris from murine spleen. Lymphocyte layers were carefully removed from the interface using a Pasteur pipette and transfered to a new centrifuge tube. The isolated cells were then diluted with complet αMEM medium and centrifuged at 500 x g for 10 min to pellet the lymphocytes. The lymphocytes were washed 3 times in medium before counting and resuspension at 3.10^6 splenocytes/ml in complet αMEM. The day before, 96-well MultiScreen HTS plates (Millipore, Saint-Quentin-Yvelines, France) were coated with 100 µl of anti-mouse IFNγ antibody (10 µg/ml; eBioscience) overnight at 4 °C, then washed three times with PBS and blocked for 3 h with complete αMEM at 37 °C. Purified spleen cells from individual mice (3×10^5/ well) were stimulated for 20 h at 37 °C, 5% CO2 with complete αMEM alone (negative control), or 20 µg/ml of the HIV-1 gag 9-mer peptides (AMQMLKETI, H-2Kd, Mata *et al*. [38]), or 20 µg/ml of the irrelevant HIV- 1 peptide QPK (QPKTACTNC, H-2Kd) [38], or 5 µg/ml of concanavalin A (positive control, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in triplicate wells. The cells were then removed and 200 µl/well of ice-

Table 1

Characterization of p24 adsorbed and Nod ligands encapsulated PLA nanoparticles prepared by nanoprecipitation. Sizes, size

Formulation	Z-average size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	p24 loading efficiency (%)	Ligand encapsulation efficiency (%)	p24 (mg)/ PLA (g)	Ligand (mg) / PLA (g)
PLA	175 ± 11.0	0.023 ± 0.001	- 60 ± 4.5	-	-	-	-
PLA-Nod1	168 ± 20.2	0.073 ± 0.021	- 63 ± 5.6	-	81.5 ± 6.3	-	8.2 ± 0.6
PLA-Nod2	219 ± 23.5	0.122 ± 0.027	- 68 ± 7.4	-	94.3 ± 2.3	-	9.5 ± 0.7
PLA-p24	223 ± 9.6	0.032 ± 0.022	- 34 ± 3.6	99 ± 1.0	-	10 ± 0.9	-
PLA-Nod1-p24	170 ± 3.4	0.118 ± 0.010	- 36 ± 5.3	95.2 ± 2.2	81.5 ± 6.3	9.3 ± 0.8	8.2 ± 0.6
PLA-Nod2-p24	251 ± 4.4	0.123 ± 0.042	- 33 ± 4.2	97.4 ± 2.1	94.3 ± 2.3	9.5 ± 0.5	9.5 ± 0.7

cold deionised water was added to lyse the remaining cells. Plates were incubated on ice for 10 min and washed six times with PBS containing 0.05% of Tween-20 and 1% of BSA (PBS-Tw-BSA), 0.1 µg/well of biotinylated anti-mouse IFNγ antibody (eBioscience) was added and incubated for 1 h at RT. After 6 washes with PBS-Tw-BSA, the wells were incubated for 1 h at RT with alkaline phosphatase-labelled extravidine (Sigma-Aldrich) and the enzyme activity was revealed by using the Bio-Rad alkaline phosphatase substrate kit (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). The spots corresponding to each cell secreting IFNγ were counted under microscope by using the KS ELISpot software (Zeiss, Germany). The background level was measured in wells containing splenocytes stimulated by the irrelevant peptide.

2.10. Statistical analyses

Analyses were performed using SigmaPot™ software, version 11.0. Statistical data analyses were performed using an analysis of variance ANOVA with Bonferroni's post test for comparison of pair. Statistical significances were indicated on the figures. $***P < 0.001$, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$.

3. Results

3.1. Characterization of PLA nanoparticles

Size and ζ-potential of Nod-encapsulated PLA nanoparticles were not significantly different from blank PLA NPs. HIV-1 p24 antigen was adsorbed on these NPs in PBS buffer. Size of the NPs was increased following p24 adsorption without significant effect on distribution (PDI slightly increased) (Table 1).

The ζ-potential was negative for each nanoparticle, ranging from -68 mV to -33 mV. The small differences in size and ζ-potential between the different batches of nanoparticles demonstrate the good reproducibility in the method of preparation used. In parallel, the quantity of Nod ligands encapsulated was determined by analyzing the remaining free ligand in the supernatant. The encapsulation efficiencies were about 81% (Nod1) and 94% (Nod2).

3.2. PLA-Nods pulsed MoDCs induced proliferation of autologous CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells from HIV$^+$ patients

The capacity of autologous MoDCs pulsed with PLA-Nods-p24 to induce HIV-1-specific CD4$^+$ and CD8$^+$ T-cell proliferation in fresh autologous lymphocytes of five asymptomatic HIV-infected patients was investigated. Soluble p24 and PLA-p24 were also used as controls.

As observed in Figure 1, p24 alone or PLA-p24 induced only a weak proliferation of both CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells, whereas encapsulated Nod ligands induced a significantly higher CD4 and CD8 T cell proliferation. Of note, the CD4$^+$ T proliferation induced by the PLA-Nod-p24 loaded MoDC was about two-fold higher than in CD8$^+$ T cells.

Moreover, as previously observed [29], the Nod2 ligand was more efficient than the Nod1.

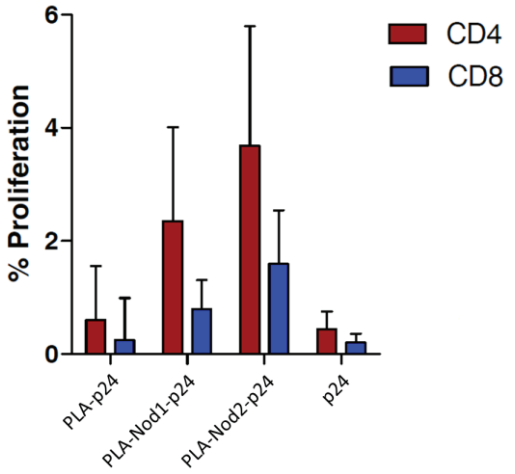


Fig. 1. HIV-1-specific T-cell proliferation induced by autologous MoDCs stimulated with PLA-Nods-p24. T cell proliferation in response to autologous MoDCs stimulated with NPs-Nods at 1 µg/6.10^4 MoDCs in a 6-day co-culture was assessed in triplicates using the CFSE proliferation assay. The % of CFSE^{low} cells in the CD3$^+$ CD8$^+$ and CD3$^+$ CD8$^-$ (CD4$^+$) gates responding to PLA-p24, PLA-Nod1-p24, PLA-Nod2-p24, and soluble HIV-1 p24-pulsed MoDCs are shown. Error bars represent the SD from the mean of 5 patients.

3.3. PLA-Nod2-p24 improves the secretion of cytokines and chemokines and increase the uptake capacity of MoDCs

Free p24 or PLA-p24 did not induce significant increase in the secretion of IL-6, IFNγ, IL-2R or MIP-1β compared to negative control XVIVO15 as observed by Luminex in MoDCs supernatant (Fig. 2). However, encapsulated Nod2 ligand carrying p24 induced a statistically significant increase in the secretion of those proinflammatory cytokines (IL-6 and IFNγ) and chemokines (IL-2R and MIP-1β) measured 16 h post-incubation ($P < 0.05$) compared to p24 or PLA-p24 pulsed MoDCs. Significant differences were observed between Nod1 and Nod2

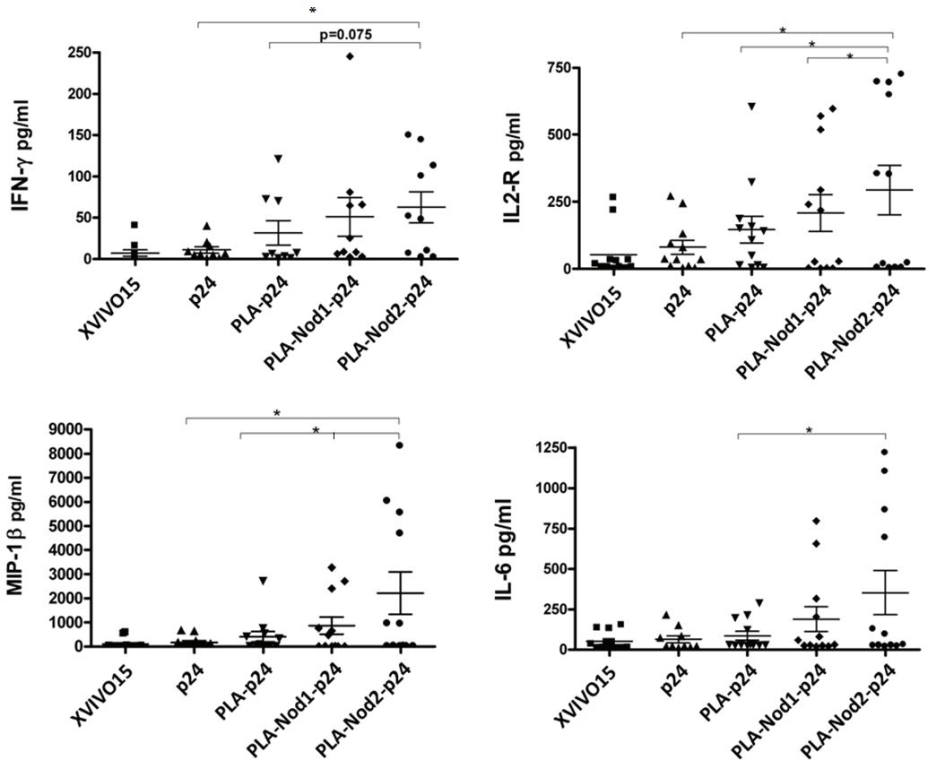
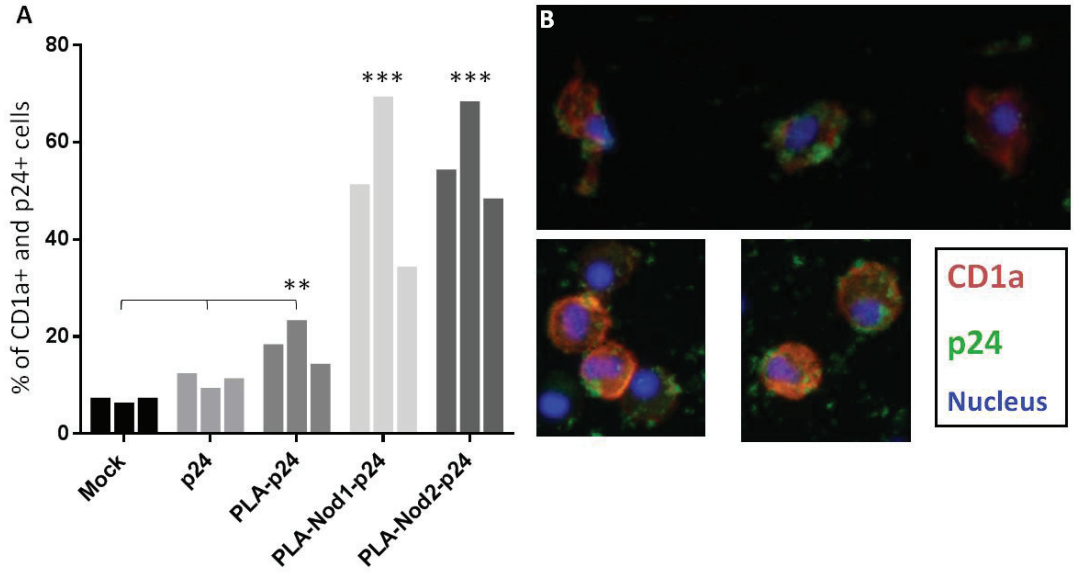


Fig. 2. Quantification by Bio-Plex Pro™ assay of cytokine secretion pattern of MoDCs treated with p24, PLA-p24 or encapsulated Nod ligands *in vitro*. The supernatants of MoDCs were collected and the concentrations of IFNγ, IL2-R, MIP-1β and IL-6 were analyzed. XVIVO15 medium was used as negative control. n = 12. Horizontal bars show the mean value ± SEM. ANOVA *$P < 0.05$.



Supplementary Fig. 1. Uptake of Gag p24 antigen by MoDCs. (A) Percentage of CD1a+ and p24+ MoDCs. In presence of Nod1 or Nod2 ligand, p24 uptake is improved. Results are expressed in percent and 3 different patients are represented. ANOVA **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$. (B) Immunoflorescent assay of MoDCs incubated with PLA-Nod2-p24.

formulations only for the IL-2R and MIP-1β, with a better effect of the PLA-Nod2-p24 ($P < 0.05$).

Regarding p24 uptake by MoDCs, adsorption on PLA nanoparticles increased significantly the p24 uptake ($P < 0.01$), which was even higher when adsorbed on PLA-Nod NPs compared to soluble antigen or adsorbed on blank PLA particles ($P < 0.001$), with no significant differences between Nod1 and Nod2 ligands (Supp. Fig. 1).

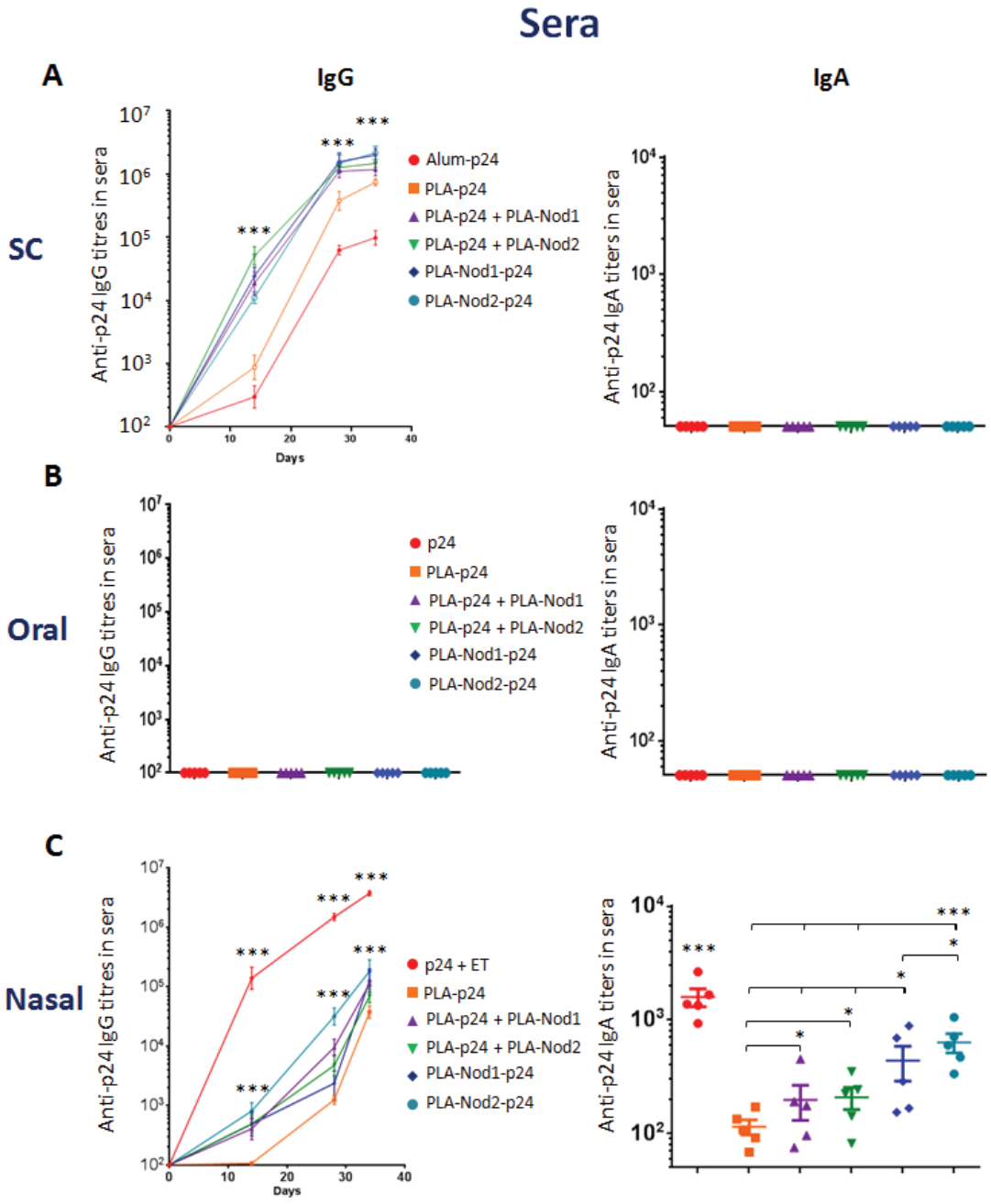


Fig. 3. p24-specific IgG and IgA responses in sera after administration of PLA NPs carrying Nod ligands and p24 into the same or different particles. (A) Subcutaneous route (SC). (B) Oral gavage. (C) Nasal route. Antibody concentrations were determined by ELISA on plates coated with purified p24. Sera were analyzed at D0, D14, D28 and D34. Only D34 is represented for IgA. SC route elicited high anti-p24 IgG titers improved with encapsulated Nod ligands, but no IgA. Nasal route was able to induce anti-p24 IgG and IgA, improved with co-encapsulated Nod2 ligand. Oral route did not induce any systemic immune response. Horizontal bars show the mean value ± SEM. ANOVA *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$.

3.4. Subcutaneous and nasal administration of PLA-Nod2-p24 induce high systemic humoral immune responses

We previously showed that subcutaneous co-administration of Gag p24 and Nod1 or Nod2 ligand by different PLA NPs enhanced the antibody response in sera in regards to free ligands [29]. Here, three routes of vaccine administration were compared. The effect of the co-delivery of the p24 and the Nod ligands into the same or different NPs on the systemic humoral immune responses was also evaluated.

As observed in Figure 3, subcutaneous and nasal, but not oral route, were able to induce high antibody responses in sera. Only the nasal route was able to induce p24-specific monomeric IgA in sera.

By subcutaneous route, PLA-p24 induced significantly higher IgG responses than Alum-p24 (up to 1 Log) and those responses were significantly improved by the co-administration of Nod ligands up to 2 Logs on D14 ($P < 0.001$). On day 28 and day 34, the IgG titers raised a plateau but formulations adjuvanted with PLA-Nods still showed better IgG responses than Alum or PLA-p24 alone ($P < 0.001$), without significant differences between Nod1/2 ligands neither co-delivery or co-administration.

By Nasal route, the ET adjuvanted p24 induced high IgG titers comparable to Nod adjuvanted formulations by subcutaneous route (titers ~ 10^6). Nod adjuvanted formulations induced higher IgG titers in sera than PLA-p24 alone ($P < 0.001$) and co-delivery of p24 and Nod2 ligand into the same particle induced the best IgG responses up to 1.5 Log more than PLA-p24 alone and 1 Log more than co-administration in different particles at D28 ($P < 0.001$). However, subcutaneous administrations of Nod adjuvanted formulations were more efficient than nasal route (IgG titers ~ 10^6 & 10^5 respectively). Nevertheless, nasal route induced high IgA titers in sera up to 2.10^3 with ET, whereas subcutaneous route failed. Nod adjuvanted formulations induced significantly higher IgA titers than PLA-p24 alone ($P < 0.05$) and the co-delivery of Nod2 ligand and p24 into the same particle was significantly the most efficient ($P < 0.05$).

3.5. Subcutaneous and nasal routes induce high rectal IgG whereas oral gavages induce high IgA responses

We compared the three routes of administration and the co-administration of the p24 and Nod ligands into the same or different NPs for the induction of rectal humoral immune responses. Subcutaneous (Nod adjuvanted formulations) and nasal immunizations (p24 + ET) induced high p24-specific IgG responses in faeces but no IgA (Fig. 4). Only the oral route was able to induce high IgA responses but weak IgG.

By subcutaneous route, neither Alum-p24 nor PLA-p24 were able to induce IgG in faeces. Only groups immunized with Nod adjuvanted formulations succeeded in significant IgG induction ($P < 0.001$) reaching about 2000 ng/g, but without any significant differences between Nod1 and Nod2, neither co-delivered into the same or different particle.

By nasal route, only the p24 adjuvanted with ET was able to induce high IgG responses in faeces compared to PLA-p24 alone or co-delivered with Nod ligands ($P < 0.001$), reaching about 4000 ng/g of p24-specific IgG, but no IgA.

By oral gavage, only Nod2 ligand adjuvanted formulations were able to induce IgA compared to p24, PLA-p24 and Nod1 ligand adjuvanted groups ($P < 0.05$). Co-administration of the Nod2 ligand and the p24 by different particles was the most efficient formulation compared to co-delivery into the same particle, rising ~ 100 ng/g of anti-p24 IgA ($P < 0.001$).

Moreover, ELISpots for analyzing p24 antigen specific IgA producing cells in the spleen were performed in mice immunized by oral route with PLA-p24 + PLA-Nod1 and PLA-p24 + PLA-Nod2 (Fig. 5.). Consistently with ELISA assays, group immunized with PLA-p24 + PLA-Nod2 showed significant levels of specific anti-p24 IgA producing B cells (~ 40 spots/10^6 cells) compared with PLA-

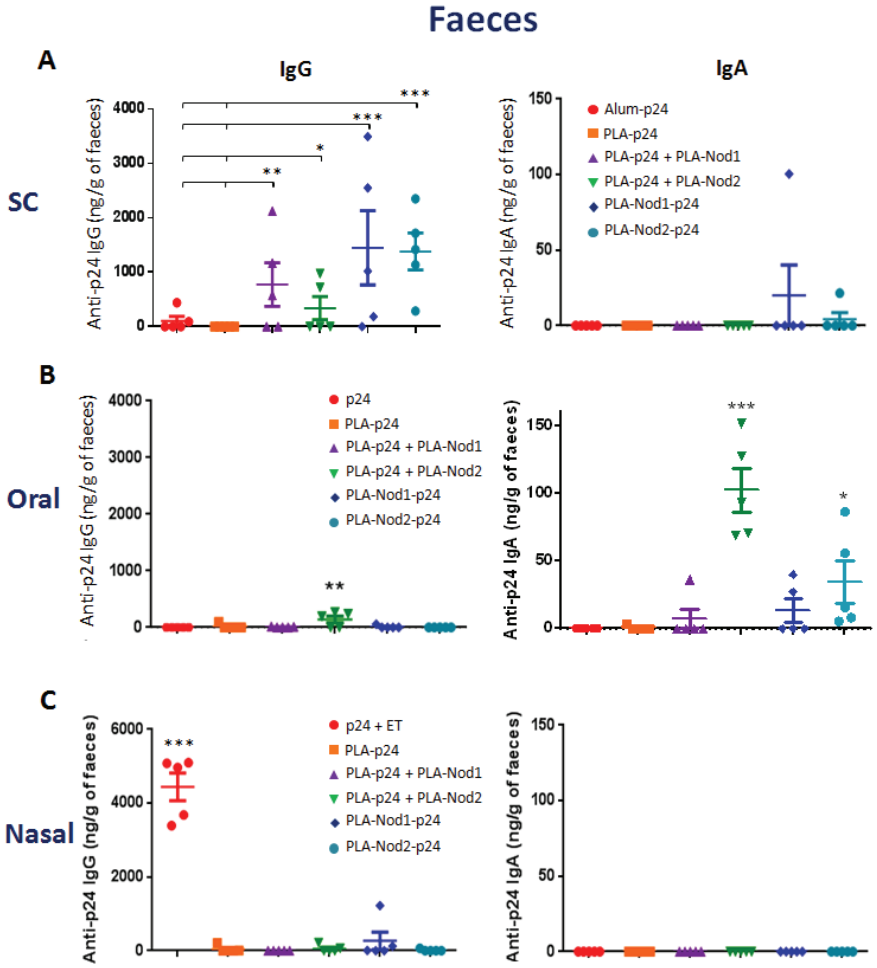


Fig. 4. p24-specific IgG and IgA responses in faeces after administration of PLA NPs carrying Nod ligands and p24 into the same or different particles. (A) Subcutaneous route (SC). (B) Oral gavage. (C) Nasal route. Antibody concentrations were determined by ELISA on plates coated with purified p24. IgG and IgA responses in faeces were analyzed at D34. SC route elicited high anti-p24 IgG responses improved with encapsulated Nod ligands, but no IgA. Oral co-delivery of the Nod2 and the p24 by different particles induced high IgA responses, but weak IgG. Only the p24-ET was able to induce IgG by nasal route, but no IgA. Horizontal bars show the mean value ± SEM. ANOVA *$P < 0.05$. **$P < 0.01$. ***$P < 0.001$.

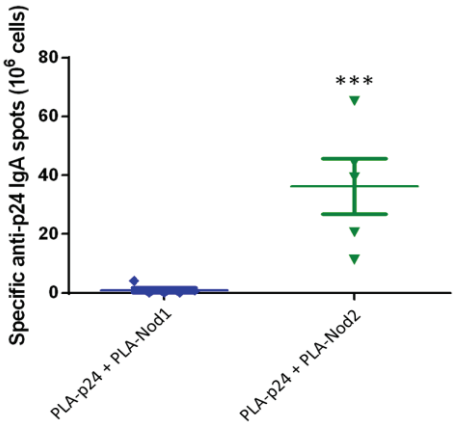


Fig. 5. ELISpots assay at day 34 on IgA producing cells in the spleen after oral administrations. Spleens were collected from mice immunized with PLA-p24 + PLA-Nod1 or PLA-p24 + PLA-Nod2. Assays were performed in pre-coated plates with p24 antigen. The group PLA-p24 + PLA-Nod2 show significant level of p24 specific IgA producing cells in spleens, compared to PLA-p24 + PLA-Nod1. Horizontal bars show the mean values ± SEM. ANOVA ***$P < 0.001$

p24 + PLA-Nod1. This is consistent with the high IgA responses in mucosal samples. These findings increase the significance of intestinal IgA results, since these locally generated p24 IgA^+ B cells may have migrated to the spleen.

3.6. Co-delivery of Nod2 ligand and p24 by nasal route induces high IgA responses in vaginal lavages

Finally, we compared the three routes of administration and the different formulations for the induction of vaginal humoral immune responses. As in faeces samples, only the subcutaneous and the nasal routes were able to induce high IgG responses in vaginal lavages (Fig. 6). However, by subcutaneous route, Alum-p24 failed to induce IgG whereas PLA-p24 induced significant anti-p24 IgG ($P < 0.01$) which was improved by the co-delivery of Nod2 ligand into the same or different particles ($P < 0.05$). By nasal route, only the ET adjuvanted formulations induced IgG in those samples.

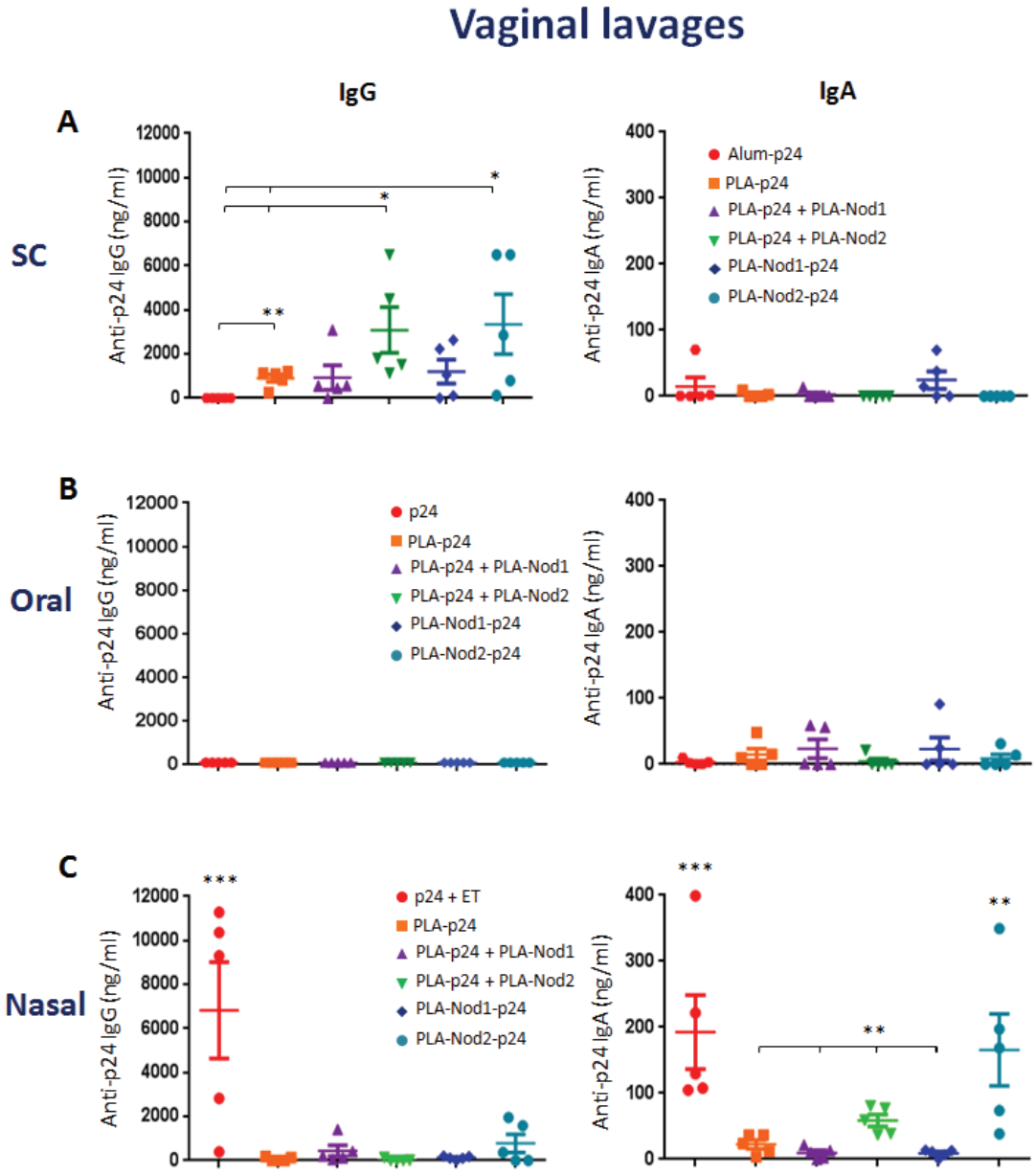


Fig. 6. p24-specific IgG and IgA responses in vaginal lavages after administration of PLA NPs carrying Nod ligands and p24 into the same or different particles. (A) Subcutaneous route (SC). (B) Oral gavage. (C) Nasal route. Antibody concentrations were determined by ELISA on plates coated with purified p24. IgG and IgA responses in vaginal lavages were analyzed at D34. SC route elicited high anti-p24 IgG responses improved with encapsulated Nod ligands, but no IgA. Co-delivery of the Nod2 ligand and the p24 by nasal route induced high IgA responses. Horizontal bars show the mean value ± SEM. ANOVA *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$.

Concerning IgA, only ET and Nod2 adjuvanted formulations induced this isotype and co-delivery of the Nod2 ligand and the p24 into the same particle was significantly most efficient ($P < 0.01$).

3.7. Co-delivery of p24 and Nod ligands by the same NP induce strong CD8-IFNγ specific immune responses

The induction of p24 specific IFNγ-producing CD8 T cells was investigated by a single-cell, *ex vivo* ELISpot assay (Fig. 7). By subcutaneous route, Alum-p24 and PLA-p24 failed to induce significant IFNγ levels, whereas co-delivery of the Nod2 ligand and the p24 by the same particle was highly efficient to promot significant AMQMKLETI-peptide specific IFNγ secretion by T cells ($P < 0.001$). In this group, 4/5 mice responded. The difference when Nod2 ligand was co-administered in different particles was not significant compared to PLA-p24 alone. By oral route, the co-delivery of the Nod1 ligand induced significantly higher responses than other formulations ($P < 0.05$) whereas the PLA-Nod2-p24 failed to reach significant IFNγ responses compared to PLA-p24 alone.

4. Discussion

An effective HIV-1 vaccine should target the induction of mucosal immune responses in the gut and in the vagina. Our previous studies have shown that PLA NPs are able to be transported across the intestinal epithelium underlying DC and B-cells present in the sub-epithelial dome [30]. Moreover, we previously showed that encapsulated Nod1 and Nod2 ligands are able to induce high DCs maturation and production of pro-inflammatory cytokines *in vitro* [29].

Data obtained in the present work provide new insights into the knowledge on the MoDC interactions from HIV-patients with NPs coated with HIV proteins, with the consequent stimulation of T-

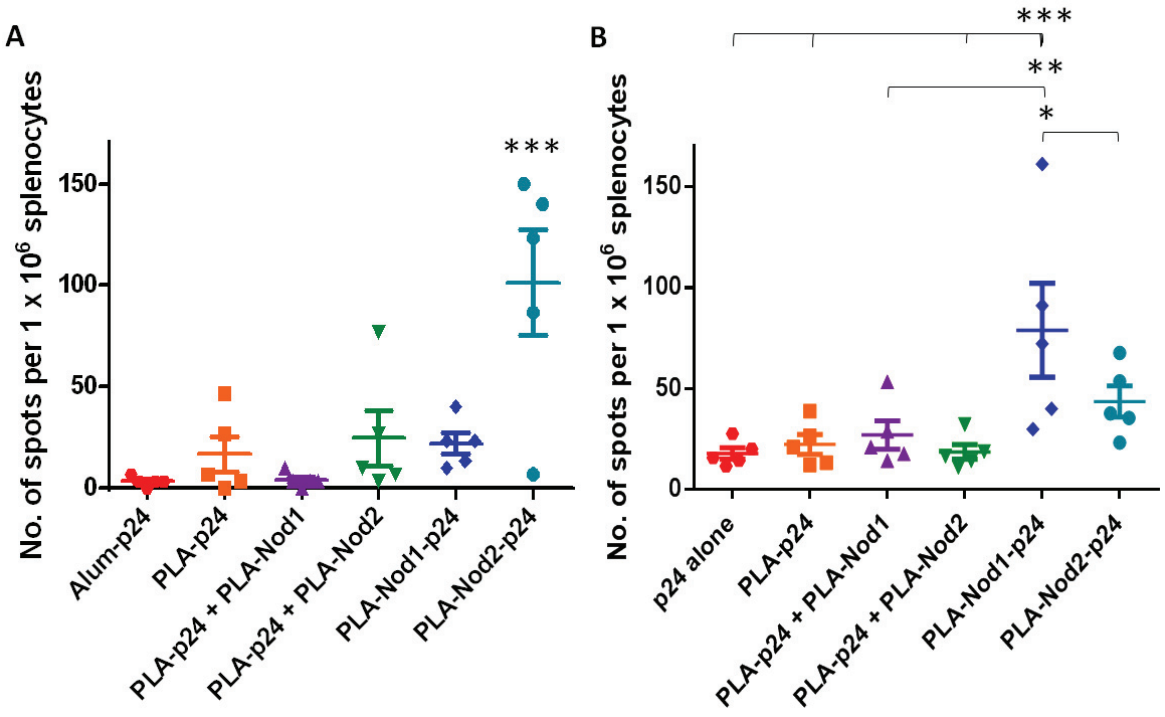


Fig. 7. Numbers of IFNγ secreting cells measured by ELISpot assay, following stimulation of splenocytes with AMQMKLETI peptide for 20 h. Spleens were collected at day 34 from mice immunized by (A) subcutaneous route and (B) oral gavage. The groups immunized with PLA-Nod2-p24 and PLA-Nod1-p24 show significant $CD8^+$ IFNγ responses compared to other groups (respectively). Horizontal bars show the mean values ± SEM. ANOVA ***$P < 0.001$, **$P < 0.01$, *$P < 0.05$.

cell mediated immune responses. MoDCs pulsed by Nod ligands induce high HIV-1-specific T-cell proliferation ($CD4^+$ & $CD8^+$) compared to p24 and PLA-p24 (Fig. 1), confirming an efficient activation of autologous T cells from HIV^+ patients. This effect was improved with the Nod2 ligand correlating with the increase of co-stimulatory molecules and cytokines expression observed in our previous paper [29]. Moreover, those results are probably due to a better antigen presentation by the MHC-II ($CD4^+$ T proliferation) correlating with autophagy induction by the Nod2 ligand as already reported by Cooney *et al.* [39]. The $CD8^+$ T proliferation might be due to the cross-presentation of the antigen by the MHC-I, induced by the Nod2 ligand [40].

We also noted the increase of the secretion of the chemokine MIP-1β (CCL4) induced by PLA-Nod2-p24 which is a chemoattractant for natural killer cells, monocytes and a variety of other immune cells [41] and a major HIV suppressive factor [42, 43].

However, MoDCs is not a mucosal model. It should be interesting to study the activity of those particles on $CD34^+$ progenitor-derived DCs inducing different DC subtypes, especially mucosal DCs.

In order to evaluate the induction of mucosal immune responses in mice, we compared three administration routes: subcutaneous, oral gavage and intranasal. Mice exhibited no abnormal clinical signs such as diarrhea or weight loss following administrations. As usually reported in the literature, PLA-p24 formulations induced systemic IgG after subcutaneous immunizations. Those responses were clearly improved with the co-administration of Nod1 and Nod2 ligands into the same or different particles, meaning a high immunostimulatory potency of encapsulated Nod ligands by this route, indifferently of the co-delivery way. Nasal route, but not the oral gavages, was also able to induce IgG but also IgA in sera, with a clear adjuvant effect of the ET and the Nod2 ligand co-delivered into the same particle than p24. Those results highlight the adjuvant properties of the Nod2 ligand co-delivered with an antigen by subcutaneous or nasal route. Those observations are probably due to an increase of the DCs maturation and cytokine secretions at the injection site leading to the recruitment of immune cells and a high antigen presentation due to autophagy mechanisms [39]. The presence of systemic IgA is probably due to the induction of IgA switch into B-cells in the NALT after nasal administration [44]. Moreover, the nasal administration of ET and the PLA-Nod2-p24 were able to induce high specific IgA in vaginal lavages. PLA-Nod2-p24 are probably taken up by the follicle-associated epithelium (FAE) overlaying the NALT, where DCs prime naive $CD4^+$ and/or $CD8^+$ T cells. Activated $CD4^+$ T cells differentiate into Th1, Th2 and Th17 cells, regulatory T cells and, importantly, T follicular helper (T_{FH}) cells. T_{FH} cells help the development of long-lived plasma cells and memory B cells through the germinal centre reaction. Intranasally administered ET and PLA-Nod2-p24 probably enhance immune responses mainly by augmenting the innate immune response through the upregulation of co-stimulatory molecule, chemokine and cytokine expression. Such molecules include CD80, CD86, IFNα as previously observed [29], but also B cell-activating factor (BAFF) and a proliferating-inducing ligand (APRIL). DCs are the main targets of most adjuvants, but follicular DCs (FDCs) may also be activated, as seen with the adjuvant CTA1-DD [45]. Then, memory B and T cells migrate to draining lymph nodes and the non-organized effector tissues, such as the genital tract [44].

However, nasally administered Nod2 ligand failed to induce IgG on those surfaces, whereas ET + p24 and Nods subcutaneous immunizations succeeded. Those results are probably due to the transudation and/or FcRn-mediated transport of the IgG from sera after high IgG titers induction [15].

Moreover, only the subcutaneous route and the nasal administration of ET + p24, succeed to induce high IgG responses in faecal pellets, also probably correlate to the induction of high IgG titers in sera. However, only the oral route was able to induce IgA in faeces, with a clear adjuvant effect of the Nod2 ligand co-delivered into different particles than p24. Those results are probably due to the high expression of the Nod2 receptor in intestinal mucosa and a higher effect of PLA-Nod2 alone on epithelial cells to express cytokines and chemokines (CCL2, CCL9, CCL20) [46], and probably to improve antigen presentation by those cells [47-49]. These results were confirmed by ELISpots analyzing p24 antigen-specific IgA producing cells in the spleen.

We have also provided evidence that co-delivery of Nod1 or Nod2 ligands into the same particle than p24 is able to induce high cellular immune responses after oral or subcutaneous administration respectively as observed by CD8 IFNγ ELISpots (Fig. 3). This might be due to the induction of antigen cross-presentation by DCs leading to presentation to $CD8^+$ T-cells [50]. Gu *et al*. have constructed a live coxsackievirus B4 recombinant, CVB4/p24, that expresses the Gag p24 sequence (HXB2) and assessed T cell responses after oral immunization of mice. Immunization with the recombinant resulted in strong systemic Gag p24-specific T cell responses as determined by the IFNγ ELISpot assay [51]. They also showed that oral but not intraperitoneal immunization induced $CD8^+$ T cells that produced IFNγ in response to the p24 CTL peptide. These data raise the importance of immunization route for the induction of a cellular response to HIV.

Our data are also in concordance with another study which shows that intranasal administration of HIV-1 Gag p37 DNA induce humoral immunity against the Gag antigen in serum and vaginal lavages [52].

These data indicate that the nasal co-delivery of HIV Ag with an adjuvant like Nod2 ligand may mainly be an increased efficacy to deliver a larger amount of p24 over the mucosa and to the APCs and thereby recruiting and enhancing the immunogenicity. This may be an advantage especially in individuals with small upper airways where an inflamed and even slightly swollen nasal tissue may inconvenient, unwanted and disturbing, such as in small children. However, it needs to be pointed out that the architecture of the nasal cavity of a mouse is very different from human so direct comparisons are not possible. Bergquist *et al*. have also shown that intranasal immunization induced higher levels of specific IgG in serum than other mucosal vaccination routes [53]. We find the same difference in anti-p24 IgG production between the nasal and oral administration. Moreover, Jackson *et al*. found the same mucosal and systemic responses after co-delivery of Murabutide (Nod2) with VLP by nasal route [54].

Taken together, these data suggest that the combination of oral and nasal approach with the Nod2 ligand would induce a strong immune response in intestine, vagina and serum.

It could be interesting to study *in vivo* and *in vitro* the secretion of cytokines such as BAFF and APRIL by different DC subtypes, but also CCL2, CCL9 and CCL20 by epithelial cells with the different formulations and the different routes and also the autophagy induction.

The ability of a candidate vaccine to induce mucosal antibody response as a first line of protection against HIV has important implications, i.e. on primary HIV infection. Mucosal antibodies could potentially neutralize free virus prior to host cell interactions, thus providing an important barrier to infection [55]. It could be interesting to immunize rabbits with PLA carrying Env antigen (gp41, gp120 or gp140) and encapsulated Nod ligands formulations

in order to test the neutralizing activity of antibodies induced by immune responses. The use of a immunogenic gp140 glycoprotein as antigen vaccine can induce strong neutralizing mucosal responses after systemic and mucosal administration [56, 57]. The T cell-mediated immunity is also a critical component of protection against mucosal pathogens so we also observed the polarization of a specific anti-p24 Th1 profile. Indeed, the enhancement of specific Gag lymphocyte secreting IFNγ may prove crucial, as both lines are essential for clearance of HIV virus from circulation [58]. Cell-mediated cytotoxicity in mucosa is associated with the clearance of virus at mucosal surfaces and may reduce virus-related pathogeneses [59]. For those reasons, cellular responses should be studied also in Peyer's patches and *lamina propria* sites in mice by specific cytotoxic T-cell (CTL) assays [38] as well as specific Th17 responses which could indicated a bypass of the immune tolerance which could be induced by mucosal route [60].

As recently shown by Zhu *et al*. it could be interesting to bypass the denaturing effects of digestive low pH and enzymatic destruction and to selectively deliver the particles to the lower gastrointestinal tract intact, by coating the PLA nanoparticle surface with methacrylate-based polymer Eudragit FS30D21, an anionic tripolymer comprising poly(methyl acrylate, methyl methacrylate, methacrylic acid) in a 7:3:1 ratio [8].

In conclusion, due to the experimental evidences and the observations made in the present study, the mucosal immunization with PLA-Nods used as mucosal adjuvant system can prove to be effective immunization against HIV-1. This may be possible not only because the natural routes of transmission are primarily through mucosal surfaces, but also due to more effective way of inducing a similar response at all the effector sites other than the site of stimulation thereby is more effective in controlling the virus. Indeed it is really important to induce neutralizing antibodies against HIV-1 in the vagina and the gut, which are natural routes of HIV transmission and reservoir. The use of Nod ligands as adjuvants for mucosal and parenteral vaccination could also be tested for other diseases such as certain autoimmune diseases or virus-induced cancers such as those induced by the HPV.

Acknowledgements

The authors would like to thank Astrid Calamel, Vincent Lahaye, Sophie Legaz, Perrine Mercier-Gouy and Séverine Munier for generous advice, assistance, and reagents.

This project was funded by iNanoDCs, Aditec, CutHIVac, Anabio and the Région Rhône-Alpes.
This work was funded by the ANR (French National Research Agency) through Euronanomed grant (iNanoDCs) and ANabio research projects, and a PhD studentship from Région Rhône-Alpes and FRM (Fondation Recherche Médicale) to Vincent Pavot.

This work was also partially supported by grants from the two FP7 european grants (CutHIVac) and Aditec (N° 280873). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

[1] Phillips DM, Zacharopoulos VR, Tan X, Pearce-Pratt R. Mechanisms of sexual transmission of HIV: does HIV infect intact epithelia? Trends in microbiology. 1994;2:454-8.
[2] Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. The Journal of experimental medicine. 2004;200:761-70.
[3] Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. The Journal of experimental medicine. 2004;200:749-59.
[4] Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B, Paul S. New insights in mucosal vaccine development. Vaccine. 2012;30:142-54.
[5] Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, Roger MG, et al. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting

nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. Immunity. 2011;34:269-80.
[6] Alpan O, Rudomen G, Matzinger P. The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses. Journal of immunology. 2001;166:4843-52.
[7] Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. Gut. 2003;52:1522-9.
[8] Zhu Q, Talton J, Zhang G, Cunningham T, Wang Z, Waters RC, et al. Large intestine-targeted, nanoparticle-releasing oral vaccine to control genitorectal viral infection. Nature medicine. 2012.
[9] Brandtzaeg P. Immunology of tonsils and adenoids: everything the ENT surgeon needs to know. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2003;67 Suppl 1:S69-76.
[10] Holmgren J, Svennerholm AM. Vaccines against mucosal infections. Current opinion in immunology. 2012;24:343-53.
[11] Czerkinsky C, Holmgren J. Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues. Current topics in microbiology and immunology. 2012;354:1-18.
[12] Wizel B, Persson J, Thorn K, Nagy E, Harandi AM. Nasal and skin delivery of IC31((R))-adjuvanted recombinant HSV-2 gD protein confers protection against genital herpes. Vaccine. 2012;30:4361-8.
[13] Fiore AE, Bridges CB, Cox NJ. Seasonal influenza vaccines. Current topics in microbiology and immunology. 2009;333:43-82.
[14] Revaz V, Zurbriggen R, Moser C, Schiller JT, Ponci F, Bobst M, et al. Humoral and cellular immune responses to airway immunization of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles and mucosal adjuvants. Antiviral research. 2007;76:75-85.
[15] Li Z, Palaniyandi S, Zeng R, Tuo W, Roopenian DC, Zhu X. Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108:4388-93.
[16] Kuo TT, Baker K, Yoshida M, Qiao SW, Aveson VG, Lencer WI, et al. Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics. Journal of clinical immunology. 2010;30:777-89.
[17] Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. Immunity. 2010;33:492-503.
[18] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity. 2011;34:637-50.
[19] Wilkins C, Gale M, Jr. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. Current opinion in immunology. 2010;22:41-7.
[20] Magalhaes JG, Lee J, Geddes K, Rubino S, Philpott DJ, Girardin SE. Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. European journal of immunology. 2011;41:1445-55.
[21] Inohara N, Koseki T, Lin J, del Peso L, Lucas PC, Chen FF, et al. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. The Journal of biological chemistry. 2000;275:27823-31.
[22] Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. The Journal of biological chemistry. 2003;278:8869-72.
[23] Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. Science. 2003;300:1584-7.
[24] Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. Nature immunology. 2003;4:702-7.
[25] Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. Nature reviews Immunology. 2003;3:371-82.
[26] Hisamatsu T, Suzuki M, Podolsky DK. Interferon-gamma augments CARD4/NOD1 gene and protein expression through interferon regulatory factor-1 in intestinal epithelial cells. The Journal of biological chemistry. 2003;278:32962-8.
[27] Kim JG, Lee SJ, Kagnoff MF. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. Infection and immunity. 2004;72:1487-95.
[28] Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. Gut. 2003;52:1591-7.
[29] Pavot V, Rochereau N, Primard C, Genin C, Perouzel E, Lioux T, et al. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2013;167:60-7.
[30] Primard C, Rochereau N, Luciani E, Genin C, Delair T, Paul S, et al. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. Biomaterials. 2010;31:6060-8.
[31] des Rieux A, Pourcelle V, Cani PD, Marchand-Brynaert J, Preat V. Targeted nanoparticles with novel non-peptidic ligands for oral delivery. Advanced drug delivery reviews. 2013.
[32] Fievez V, Plapied L, des Rieux A, Pourcelle V, Freichels H, Wascotte V, et al. Targeting nanoparticles to M cells with non-peptidic ligands for oral vaccination. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 2009;73:16-24.
[33] Ataman-Onal Y, Munier S, Ganee A, Terrat C, Durand PY, Battail N, et al. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2006;112:175-85.
[34] Climent N, Guerra S, Garcia F, Rovira C, Miralles L, Gomez CE, et al. Dendritic cells exposed to MVA-based HIV-1 vaccine induce highly functional HIV-1-specific CD8(+) T cell responses in HIV-1-infected individuals. PloS one. 2011;6:e19644.
[35] Soler E, Parez N, Passet B, Dubuquoy C, Riffault S, Pillot M, et al. Recombinant rotavirus inner core proteins produced in the milk of transgenic rabbits confer a high level of protection after intrarectal delivery. Vaccine. 2007;25:6373-80.
[36] Holmgren J, Czerkinsky C, Eriksson K, Mharandi A. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. Vaccine. 2003;21 Suppl 2:S89-95.

[37] Lu X, Clements JD, Katz JM. Mutant Escherichia coli heat-labile enterotoxin [LT(R192G)] enhances protective humoral and cellular immune responses to orally administered inactivated influenza vaccine. Vaccine. 2002;20:1019-29.
[38] Mata M, Travers PJ, Liu Q, Frankel FR, Paterson Y. The MHC class I-restricted immune response to HIV-gag in BALB/c mice selects a single epitope that does not have a predictable MHC-binding motif and binds to Kd through interactions between a glutamine at P3 and pocket D. Journal of immunology. 1998;161:2985-93.
[39] Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. Nature medicine. 2010;16:90-7.
[40] Asano J, Tada H, Onai N, Sato T, Horie Y, Fujimoto Y, et al. Nucleotide oligomerization binding domain-like receptor signaling enhances dendritic cell-mediated cross-priming in vivo. Journal of immunology. 2010;184:736-45.
[41] Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. Nature immunology. 2001;2:1126-32.
[42] Hudspeth K, Fogli M, Correia DV, Mikulak J, Roberto A, Della Bella S, et al. Engagement of NKp30 on Vdelta1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication. Blood. 2012;119:4013-6.
[43] Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. Science. 1995;270:1811-5.
[44] Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. Nature reviews Immunology. 2012;12:592-605.
[45] Mattsson J, Yrlid U, Stensson A, Schon K, Karlsson MC, Ravetch JV, et al. Complement activation and complement receptors on follicular dendritic cells are critical for the function of a targeted adjuvant. Journal of immunology. 2011;187:3641-52.
[46] Kim YG, Kamada N, Shaw MH, Warner N, Chen GY, Franchi L, et al. The Nod2 sensor promotes intestinal pathogen eradication via the chemokine CCL2-dependent recruitment of inflammatory monocytes. Immunity. 2011;34:769-80.
[47] Ito T, Tanabe H, Ayabe T, Ishikawa C, Inaba Y, Maemoto A, et al. Paneth cells regulate both chemotaxis of immature dendritic cells and cytokine production from epithelial cells. The Tohoku journal of experimental medicine. 2012;227:39-48.
[48] Campeau JL, Salim SY, Albert EJ, Hotte N, Madsen KL. Intestinal epithelial cells modulate antigen-presenting cell responses to bacterial DNA. Infection and immunity. 2012;80:2632-44.
[49] Mulder DJ, Pooni A, Mak N, Hurlbut DJ, Basta S, Justinich CJ. Antigen presentation and MHC class II expression by human esophageal epithelial cells: role in eosinophilic esophagitis. The American journal of pathology. 2011;178:744-53.
[50] Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. Nature reviews Immunology. 2012;12:557-69.
[51] Gu R, Shampang A, Nashar T, Patil M, Fuller DH, Ramsingh AI. Oral immunization with a live coxsackievirus/HIV recombinant induces gag p24-specific T cell responses. PloS one. 2010;5.
[52] Hinkula J, Hagbom M, Wahren B, Schroder U. Safety and immunogenicity, after nasal application of HIV-1 DNA gagp37 plasmid vaccine in young mice. Vaccine. 2008;26:5101-6.
[53] Bergquist C, Johansson EL, Lagergard T, Holmgren J, Rudin A. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. Infection and immunity. 1997;65:2676-84.
[54] Jackson EM, Herbst-Kralovetz MM. Intranasal vaccination with murabutide enhances humoral and mucosal immune responses to a virus-like particle vaccine. PloS one. 2012;7:e41529.
[55] Devito C, Hinkula J, Kaul R, Lopalco L, Bwayo JJ, Plummer F, et al. Mucosal and plasma IgA from HIV-exposed seronegative individuals neutralize a primary HIV-1 isolate. Aids. 2000;14:1917-20.
[56] Cranage MP, Fraser CA, Cope A, McKay PF, Seaman MS, Cole T, et al. Antibody responses after intravaginal immunisation with trimeric HIV-1 CN54 clade C gp140 in Carbopol gel are augmented by systemic priming or boosting with an adjuvanted formulation. Vaccine. 2011;29:1421-30.
[57] Curran RM, Donnelly L, Morrow RJ, Fraser C, Andrews G, Cranage M, et al. Vaginal delivery of the recombinant HIV-1 clade-C trimeric gp140 envelope protein CN54gp140 within novel rheologically structured vehicles elicits specific immune responses. Vaccine. 2009;27:6791-8.
[58] Stephenson KE, Li H, Walker BD, Michael NL, Barouch DH. Gag-specific cellular immunity determines in vitro viral inhibition and in vivo virologic control following simian immunodeficiency virus challenges of vaccinated rhesus monkeys. Journal of virology. 2012;86:9583-9.
[59] Munoz JL, McCarthy CA, Clark ME, Hall CB. Respiratory syncytial virus infection in C57BL/6 mice: clearance of virus from the lungs with virus-specific cytotoxic T cells. Journal of virology. 1991;65:4494-7.
[60] Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. Immunological reviews. 2008;226:160-71.

Résultats et discussion de l'article N°2

La majorité des infections débute par contact muqueux comme les infections gastro-intestinales, respiratoires, ou encore génitales (VIH). L'administration d'un vaccin doit donc permettre de stimuler une immunité protectrice dans des sites distants des sites inducteurs impliqués dans l'initiation de la réponse immunitaire et notamment au niveau des muqueuses génitales et intestinales dans le cas du VIH[398]. Un grand nombre de systèmes de vectorisation d'Ags pour des administrations systémiques et muqueuses a été évalué jusqu'à ce jour chez l'animal (complexes lipidiques enrobant les Ags, particules biodégradables, vecteurs viraux ou bactériens atténués[55]). Les résultats de notre précédente publication font part d'une augmentation de l'expression par les DCs, des molécules de co-stimulations CD80 et CD86 ainsi que de cytokines pro-inflammatoires par les ligands Nods encapsulés dans les particules de PLA[397].

Dans la présente étude, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'aspect fonctionnel de ces observations, en étudiant le potentiel d'induction de prolifération des lymphocytes T (LT). Nous avons ainsi pu démontrer que l'incubation de DCs de patients VIH^+ avec des PLA-Nod-p24, puis la mise en contact avec des LT autologues conduisait à une prolifération CD4 et CD8 potentialisée en présence des ligands, par rapport à la p24 ou aux PLA-p24 seules ; le ligand Nod2 étant plus efficace que le Nod1. Ces observations sont en accord avec les données recueillies dans notre précédente publication, corroborant l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulations et des cytokines pro-inflammatoires, avec l'induction d'une prolifération lymphocytaire autologue efficace grâce à l'induction des signaux 2 et 3 (survie et différentiation des lymphocytes, respectivement)[399]. Il est aussi possible que la présentation antigénique par le CMH-II ait été améliorée notamment par les mécanismes d'autophagie induits par la stimulation du récepteur Nod2 permettant ainsi d'améliorer le signal 1 responsable de l'activation des lymphocytes[255]. L'induction d'une prolifération des LT $CD8^+$ en présence du ligand Nod2 est probablement due à l'induction d'une cross-présentation de l'Ag par le CMH-I, comme précédemment observé par Asano *et al.*[400]. Cette prolifération lymphocytaire observée *in vitro* est une étape primordiale dans la mise en place d'une réponse immunitaire efficace *in vivo*.

Nous avons aussi pu montrer une augmentation de la production de la chimiokine MIP-1β (CCL4) par la formulation PLA-Nod2-p24, en comparaison à la p24 seule, formulée ou adjuvantée avec le ligand Nod1. Cette molécule étant chimio-attractante pour les NK et les monocytes (notamment), mais aussi un facteur majeur de suppression du VIH, il serait très intéressant de l'induire lors d'une vaccination aussi bien prophylactique que thérapeutique[401].

Un certain nombre de vaccins ont prouvé leur efficacité par voie muqueuse entérale ou nasale (choléra, polio, grippe, etc.), en permettant de déclencher des réponses humorales de forte amplitude au nivau local. La voie nasale possède cependant une caractéristique supplémentaire intéressante, celle d'induire des réponses immunitaires au niveau des muqueuses génitales[55]. Il faut cependant considérer le fait que beaucoup de vaccins engendrant des protections efficaces au niveau des muqueuses sont administrés par voie parentérale (HPV, diphtérie, tuberculose, etc.) plutôt que par voie muqueuse, et engendrent tout de même des protections efficaces, spécialement ceux induisant de forts taux d'IgG sériques capables de traverser les épithéliums muqueux (FcRn et transsudation).

Suite aux résultats précédemment obtenus (article N°1) et afin d'étudier l'induction de réponses immunes anti-VIH-1 systémiques et muqueuses, nous avons choisi d'utiliser les NPs de PLA vectorisant l'Ag p24 du VIH-1 et des ligands des récepteurs Nod1 et Nod2 par ces différentes voies.

En tant que contrôle positif par voie nasale, nous avons utilisé l'entérotoxine thermolabile d'*E.coli* (ET). En effet, cette toxine peut fortement potentialiser l'immunogénicité de certains Ags (protéines virales de la grippe[402]), s'il est lié ou simplement mélangé avec la toxine, à condition que l'Ag soit administré en même temps et dans la même muqueuse que cette dernière[403]. Cependant, cet adjuvant est considéré comme beaucoup trop toxique pour un usage humain[177]. Dans notre travail, nous n'avons pas observé de toxicité liée à l'utilisation de l'ET aux concentrations utilisées (10 µg/souris).

Le schéma ci-dessous illustre la stratégie expérimentale utilisée et le tableau ci-après, résume nos différents résultats.

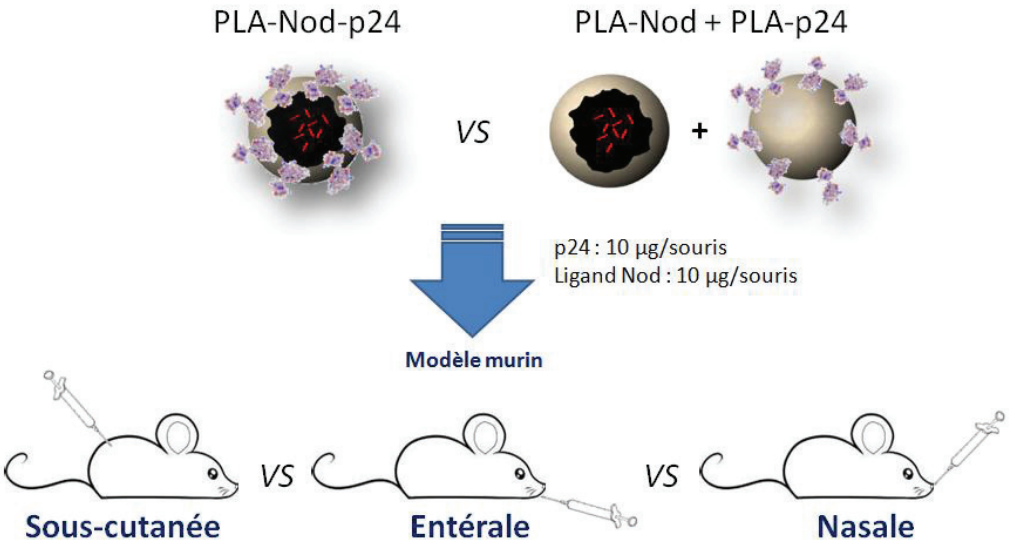


Tableau récapitulatif des résultats obtenus dans après administration des PLA-Nod par différentes voies.

ND = Non Déterminé.

			Alum/ET	PLA-p24	PLA-p24 + PLA-Nod1	PLA-p24 + PLA-Nod2	PLA-Nod1-p24	PLA-Nod2-p24
Sous-cutanée	Systémiques	*IgG*	++	+++	+++++	+++++	+++++	+++++
		IgA	-	-	-	-	-	-
	Vaginales	*IgG*	-	+	+	+++	+	+++
		IgA	-	-	-	-	+/-	-
	Rectales	*IgG*	-	-	+++	+++	+++++	+++++
		IgA	-	-	-	-	-	-
	Réponses cellulaires		-	+	-	+	+	++++
Entérale	Systémiques	*IgG*	-	-	-	-	-	-
		IgA	-	-	-	-	-	-
	Vaginales	*IgG*	-	-	-	-	-	-
		IgA	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	Rectales	*IgG*	++	-	-	++	-	-
		IgA	+++++	-	+	+++++	+	++
	Réponses cellulaires		+++	+	+	+	+++	++
Nasale	Systémiques	*IgG*	+++++	+	++	++	++	+++
		IgA	+++++	+/-	++	++	+++	++++
	Vaginales	*IgG*	+++++	-	-	-	-	+/-
		IgA	+++++	-	-	++	-	+++++
	Rectales	*IgG*	++++	-	-	-	+/-	-
		IgA	-	-	-	-	-	-
	Réponses cellulaires		ND	ND	ND	ND	ND	ND

Les voies sous-cutanée (SC) et nasale ont permis d'induire de fortes réponses systémiques contrairement à la voie entérale (article Fig. 3). Par voie SC, l'utilisation des NPs de PLA vectorisant l'Ag p24 a permis d'induire des réponses systémiques de type IgG statistiquement plus importantes que l'Alum (+ 1 Log) et la co-administration des ligands Nod1 ou Nod2 encapsulés a permis de potentialiser cette réponse (+ 2 Log). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre la co-administration et la co-délivrance de l'Ag et de la molécule immunostimulante. Par voie nasale, en revanche, la co-délivrance de l'Ag et du ligand Nod2 par la même particule a permis de potentialiser de manière significative la réponse IgG sériques. Cette réponse n'étant cependant pas aussi intense que celle générée par voie SC (- 1 Log). L'induction de tels titres en IgG sériques par voie SC a très probablement permis d'induire de fortes concentrations en IgG anti-p24 dans les lavements vaginaux, potentialisées par la présence du ligand Nod2. En revanche, les titres sériques probablement trop faibles, engendrés par voie nasale avec les ligands Nods, n'ont pas permis d'obtenir de réponses IgG notables au niveau de cette muqueuse. Il faut cependant noter que l'administration d'ET par voie nasale a engendré de fortes réponses IgG sériques

(équivalentes aux PLA-Nods par voie sous-cutanée) induisant de forts taux d'IgG vaginales. L'induction de ces fortes réponses IgG sériques induites par voies SC (ligands Nod) et nasales (ET) ont aussi permis d'obtenir de fortes concentrations en IgG dans les échantillons de fécès prélevés. Cependant, là encore, les immunisations par voie nasale avec les ligands Nods n'ont pas permis un passage suffisement important des IgG sériques au niveau rectal.

Concernant les réponses IgA anti-p24, seule la voie nasale a permis d'obtenir de forts titres au niveau sérique et particulièrement avec la formulation PLA-Nod2-p24 (article Fig. 3). Cette formulation, par cette voie, a de plus, permis d'obtenir de fortes concentrations en IgA dans les lavements vaginaux (Fig. 6). Les résultats que nous avons obtenus par voie nasale sont en corrélation avec une autre étude menée avec un ligand Nod2 (Murabutide) co-déliveré avec des VLP par la même voie[252]. Ces immunisations ont permis d'obtenir des titres en IgG et IgA sériques équivalents aux notres, ainsi que de fortes réponses vaginales. Ces fortes réponses IgA sont très probablement dues à une forte activation lymphocytaire par la co-délivrance du ligand Nod2 et de l'Ag suivie de la migration des plasmocytes à IgA, depuis le NALT, jusque dans ganglions lymphatiques drainants le tractus génital[45]. Ce mécanisme est très probablement dû à l'induction de l'intégrine α4β1 (VLA-4) à la surface des plasmocytes à IgA au niveau du NALT, permettant une reconnaissance de la molécule d'adhésion VCAM-1 au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux irriguant la muqueuse vaginale. De plus, l'expression de la chimiokine CCL28 au niveau de cette muqueuse a très certainement permis l'attraction de ces cellules exprimant le récepteur CCR10[54].

En revanche, ni la voie nasale, ni la voie SC, n'ont permis d'induire de telles IgA au niveau rectal (Fig. 4). En effet, seule la voie entérale y est parvenue. Par cette voie, l'adjonction du ligand Nod2 a permis d'amplifier cette réponse et plus particulièrement par co-administration dans des particules différentes de l'Ag. Les réponses en ELISpot B pour la quantification des plasmocytes spécifiques à IgA indiquent également que la stratégie vaccinale mise en place par voie entérale induit efficacement des LB mémoires en présence du ligand Nod2. L'efficacité du ligand Nod2 par voie entérale est très certainement due à la forte expression du récepteur par les cellules épithéliales et notamment les cellules de Paneth. En effet, ce ligand possède une forte capacité stimulatrice de la molécule chimio-attractante CCL2[404] et pourrait potentiellement induire la sécrétion de CCL9 et CCL20, spécifiques de certains monocytes et DCs muqueuses. Elles permettent ainsi l'attraction des cellules phagocytaires au niveau de la muqueuse, améliorant la présentation antigénique[27, 53], notamment par des mécanismes d'autophagie induits par la stimulation du Nod2[255]. Il est aussi possible que les mécanismes de homing soient améliorés grâce à l'induction de l'expression de CCL28 (mucosa-associated epithelial chemiokine), attirant spécifiquement les plasmocytes à IgA exprimant le CCR10 ; ou encore le CCL25 (abondamment produit au niveau de l'intestin

grêle) permettant d'attirer spécifiquement les LB et LT exprimant le récepteur CCR9[46]. De plus, il a été démontré que des cellules épithéliales d'œsophage humain étaient capables de présenter des Ag *via* le CMH-II[405]. Il est donc possible que ce phénomène soit retrouvé au niveau intestinal et soit amplifié par la stimulation des récepteurs Nod2 présents dans ces cellules, notamment par les mécanismes d'autophagie[255]. De plus, les cellules endothéliales expriment ce récepteur[406], il est donc possible qu'une stimulation de ce dernier puisse entraîner une augmentation de l'expression de l'adressine MAdCAM-1, permettant le homing au niveau de l'intestin, des plasmocytes à IgA ainsi que des LT $CD4^+$ et $CD8^+$ exprimant α4β7.

Il serait donc intéressant de tester ces hypothèses dans des modèles *in vitro* de cellules épithéliales intestinales en mesurant l'expression du CMH-II, des chimiokines CCL9, CCL20, CCL25 et CCL28, ainsi que l'expression de MAdCAM-1 par des cellules endothéliales après stimulation par les PLA-Nods. La stimulation de ces cellules est très probablement améliorée par l'encapsulation du ligand Nod2, sans Ag à la surface de la particule, expliquant une meilleure efficacité de la co-délivrance dans différentes particules. Il faut cependant noter qu'aucune réponse humorale n'a pu être mise en évidence au niveau sérique, probablement due à une trop faible immunogénicité de la formulation par cette voie.

Bergquist *et al*. ont montré que l'immunisation intranasale chez l'humain, induit des niveaux plus élevés d'IgG/IgA spécifiques dans le sérum que les autres voies de vaccination muqueuse[407]. Nous avons observé le même phénomène en comparant les voies nasale et entérale, même si seule la p24 + ET permet d'atteindre des titres en IgG similaires à la voie sous-cutanée obtenus avec les PLA-Nod. Seule la voie nasale a cependant été capable d'induire des IgA sériques dont la fonction n'est pas encore clairement établie.

L'étude des réponses immunitaires muqueuses chez l'Homme confirme des études plus anciennes chez le rongeur indiquant que l'utilisation de la voie nasale permet l'induction de réponses immunitaires optimales dans d'autres tissus muqueux distant et notamment génitaux[31, 201]. Nos données d'immunisations intranasales confirment ces observations, l'administration du complexe PLA-Nod2-p24 par le NALT induisant à la fois de fortes réponses sériques IgG et IgA anti-p24 ainsi que des réponses muqueuses de type IgA au niveau vaginal.

L'induction de réponses T $CD8^+$ est aussi un point important pour l'induction de réponses immunitaires protectrices contre un agent pathogène et plus spécialement contre un virus tel que le VIH. Stephenson *et al*. ont ainsi pu montrer chez le macaque, qu'une augmentation des lymphocytes sécréteurs d'IFNγ, spécifiques de l'Ag Gag, était cruciale pour l'élimination du virus[357]. Nous avons ainsi pu montrer l'induction de réponses cellulaires en ELISpots $CD8^+$ IFNγ par voie SC et entérale, avec la co-délivrance de l'Ag et du ligand Nod dans la

même particule. Cela étant probablement dû à l'induction d'une cross-présentation de l'Ag lorsque la cellule qui reçoit ce dernier, reçoit en même temps le ligand Nod, en comparaison à la co-administration dans différentes particules[408].

Nos données restent néanmoins préliminaires. Il serait intéressant d'approfondir les résultats *in vitro* en étudiant l'induction d'autophagie dans les MoDCs ainsi que la présentation antigénique induite, en co-délivrant l'Ag et les ligands Nods dans la même ou différentes particules. Il faudrait aussi étudier à plus long terme la mémoire immunologique induite par ces formulations en mesurant la persistance des LB mémoires dans le sang et la rate des souris immunisées, ainsi qu'en mesurant la persistance des taux d'Ac dans le sérum et les sécrétions.

Nous souhaitons également étudier la qualité fonctionnelle des Ac induits par la vaccination. Dans le cadre d'une vaccination anti-VIH, il est crucial de mesurer l'induction d'Ac neutralisants le VIH-1. Nous envisageons de réaliser de nouvelles expériences d'immunisations avec des PLA-Nods chez le lapin afin de pouvoir étudier l'efficacité de notre stratégie vaccinale dans l'induction de réponses neutralisantes. L'activité ADCC (Cytotoxicité Cellulaire Dépendante de l'Anticorps) et ADCVI (Antibody-Dependent Cell-mediated Virus Inhibition) de ces Ac sera également évaluée. Nous souhaitons également approfondir l'étude des réponses cellulaires induites. Nous avons en effet démontré la forte induction de réponses CD8 IFNγ lors de la co-délivrance de l'Ag et du ligand par la même particule. Il serait également particulières intéressant d'étudier l'induction de réponses CD8 cytotoxiques spécifiques à l'aide de marquages tétramères ainsi que le profil polyfonctionnel des LT par cytométrie en flux multiparamétrique. Les profils cytokiniques sériques et muqueux sont actuellement en cours d'analyse Luminex afin de déterminer le phénotypage Th1/Th2 (IL-12p70, IFNγ, TNFα & IL-4, IL-5, IL-10 respectivement). Enfin, nous souhaiterions également caractériser le phénotype local des lymphocytes après immunisation et notamment l'induction de lymphocytes Th17 intestinaux, après administration par voie muqueuse (ELISpot et luminex Th17 panel). Une étude a effectivement démontré qu'une immunisation intranasale avec de l'OVA induit une réponse immunitaire pro Th17. De plus les lymphocytes T $CD4^+$ activés montrent une augmentation de l'expression du récepteur de chimiokine CCR6, qui est un marqueur des cellules Th17 murines[409].

En conclusion, en raison des données expérimentales et des observations formulées dans la présente étude, l'immunisation par voie muqueuse avec des PLA-Nods utilisées comme vecteurs de convoyage muqueux et adjuvant, peut s'avérer efficace pour l'induction de réponses IgG/IgA systémiques (voie nasale) et d'IgA rectales/vaginales (voie entérique/nasale). De plus, nos données suggèrent que la combinaison d'une approche

entérale et nasale à l'aide de PLA-Nods permettrait d'induire une réponse immunitaire maximale au niveau sérique, intestinal et vaginal.

Si le ciblage des récepteurs Nod1 et Nod2, associé à une administration par voie muqueuse est une stratégie prometteuse pour l'induction de réponses muqueuses à large spectre, elle pourrait être améliorée en combinant, par exemple, des schémas de vaccinations hétérologues (muqueux + parentéral).

Néanmoins, la capacité adjuvante de molécules ciblant un seul et unique PRR peut être limitée. En effet, comme cela a pu être observé dans cette étude, une administration par voie parentérale avec des agonistes Nod n'a pas suffit pour induire des réponses IgA muqueuses et l'immunisation par voie orale n'a pas permis d'obtenir de réponses systémiques. Comme cela peut être observé lors d'une infection naturelle par un pathogène, plusieurs PRRs sont stimulés simultanément permettant la mise en place de réponses immunitaires efficaces. L'hypothèse d'utiliser une molécule ciblant à la fois un récepteur Nod et un TLR a donc été testée dans la partie suivante.

RESULTATS 3 : EVALUATION DU POTENTIEL IMMUNOSTIMULANT D'UNE MOLECULE CHIMERIQUE AGONISTE DES RECEPTEURS NOD2 ET TLR2, *IN VITRO* ET *IN VIVO*

Comme cela a précédemment été discuté, le ciblage des PRRs semble être une stratégie prometteuse dans le développement de nouveaux adjuvants inducteurs de réponses immunitaires muqueuses. Nous avons ainsi pu démontrer l'intérêt de l'utilisation de ligands des récepteurs Nod1 et Nod2 dans l'adjuvantation d'un vaccin nanoparticulaire inducteur de réponses muqueuses anti-VIH-1. Cependant, la capacité adjuvante de molécules ciblant un seul et unique PRR, peut être limitée et comme cela peut être observé lors d'infections naturelles par des pathogènes, plusieurs PRRs sont stimulés simultanément (PGN bactérien, ADN, etc.) permettant la mise en place de réponses immunitaires efficaces. Cela a aussi été démontré expérimentalement notamment par les équipes de B. Pulendran[281], H. Tada[248] et A. Uehara[410], montrant l'efficacité de la co-délivrance de plusieurs ligands de PRRs avec un Ag vaccinal. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée jusqu'ici à une utilisation combinée de deux ligands en une seule molécule que l'on appelera « chimérique ». Dans cette optique, nous avons développé avec la société InvivoGen, une molécule chimérique (CL429) regroupant un ligand du TLR2 et un ligand du récepteur Nod2. Le choix du ciblage de ces deux récepteurs a été fait d'une part pour des raisons techniques (il est plus aisé de synthétiser une molécule chimérique protéine-protéine, plutôt que protéine-ADN) et d'autre part afin de mimer un élément pathogène venant, dans un premier temps, stimuler un PRR de surface (le TLR2) et dans un second temps, après invasion de la cellule, un PRR intracellulaire (le Nod2).

Lors de cette étude, nous avons ainsi évalué le potentiel adjuvant de la molécule CL429 *in vitro* et *in vivo* en comparaison aux ligands TLR2 ou Nod2 seuls ou co-délivrés. Nous avons ainsi pu démontrer un effet additif de la co-délivrance des deux molécules et un effet synergique de la molécule chimérique, à la fois sur la maturation de MoDCs humaines *in vitro* et lors d'essais d'immunisations par voie sous-cutanée dans le modèle murin BALB/c.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans la publication N°3 en cours d'écriture.

Chimeric Nod2/TLR2 Ligand Augments Antigen-Specific Immune Responses Elicited by a Particulate Vaccine Vector

Vincent Pavot [a,b], Nicolas Rochereau [b], Julien Resseguier [a], Christian Genin [b], Eric Perouzel [c], Thierry Lioux [c], Stéphane Paul [b,1], Bernard Verrier [a,1,*]

[a] Institut de Biologie et Chimie des Protéines UMR 5305 - CNRS/Université de Lyon, France

[b] Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes – INSERM CIE3 Vaccinologie, Faculté de Médecine de Saint-Etienne, France

[c] CAYLA – InvivoGen – Toulouse, France

[1] These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author. Dr. Bernard Verrier Tel.: +33(0)72722636; fax: +33(0)72722604.

E-mail address: b.verrier@ibcp.fr (B. Verrier).

ABSTRACT

Toll-like receptor (TLR) ligands are critical activators of innate immunity and are being developed as vaccine adjuvants. However, their utility in conjunction with Nod-like receptor (NLR) agonists remains poorly studied. In this study, we evaluated the ability of a chimeric Nod2/TLR2 ligand with poly(lactic acid) (PLA) biodegradable nanocarriers co-delivery to enhance dendritic cells (DCs) maturation and both systemic and mucosal immune responses in mice.

The chimeric Nod2/TLR2 ligand induced synergic up-regulation of maturation markers, co-stimulatory molecules at the DCs surface and proinflammatory cytokines secretions compared to separate ligands. Furthermore, PLA nanoparticles carrying Gag p24 (HIV-1) coadministered with the chimera induced high Ag-specific IgA and IgG antibodie titers at systemic and mucosal sites in mice after subcutaneous immunizations.

These data demonstrate that TLR2 ligand associated with Nod2 ligand into the same molecule can modulate the immunogenicity of particulate vectors. Moreover, these findings point out the potential utility of chimeric molecules as adjuvants for vaccines to induce systemic and mucosal immune responses by systemic administration.

Keywords: Nod2 receptor ligand; TLR2 ligand; Dendritic cell maturation; poly(lactic acid) nanoparticles; Vaccine

1. Introduction

New directions in the vaccine field concern the improvement of immunogenic molecules and/or adjuvants. DNA, recombinant protein subunits or synthetic peptides are being tested in numerous vaccines and offer many advantages such as a reduced toxicity compared to live-attenuated pathogens. However, they often remain poorly immunogenic when administered alone, particularly to induce mucosal immune responses after parenteral administration. This is particularly true for vaccines based on synthetic peptides or recombinant proteins. Consequently, another angle of investigation is to enhance antigen-specific immune response by developing improved vaccine adjuvants [1, 2]. Although vaccination is considered one of the most effective medical interventions, research into vaccine adjuvants has largely been an empirical exercise. In particular, the host sensors and the mechanisms of action of these compounds have not been fully characterized.

Now, the discovery of the role of TLRs and NLRs in the action of certain adjuvants has provided new insights for vaccine development. These observations are particularly important with regard to the crosstalk between NLRs and TLRs that has been the subject of numerous investigations in recent years. TLRs are a family of Pattern Recognition Receptors (PRRs) that sense conserved motifs found in microbial pathogens. TLRs detect microbial infections and initiate immune defences against pathogens. An additional innate immune receptor family, the intracellular molecule carrying nucleotide-binding oligomerization domain (Nod) proteins, has recently been shown to recognize bacterial peptidoglycan breakdown products within the cytosol, in contrast with membrane bound TLR recognition [3]. Whereas TLR ligands are pyrogenic and crucial for the induction of inflammatory cytokines, NLR ligands have a poor capacity to trigger these pathways without a synergistic boost from TLR ligands *in vitro* [4-7]. Despite these apparently weak stimulatory properties, the presence of Nod1 [8] and Nod2 [9] ligands positively triggers the potential of some immune adjuvants including TLR ligands. Therefore, the interaction between NLRs and TLRs seems to be more crucial for adaptive immunity than previously appreciated. These observations open, an interesting new area of investigation for vaccine and adjuvant development, focusing on combinations of immunostimulatory agents that target different PRR pathways [10].

An extensive literature now exists about the role of co-stimulation of PRRs in the activation of immune cells [11, 12]. Freund's complete adjuvant, which contains killed mycobacterial cells, has been widely used as a powerful adjuvant to induce cell-mediated immunity, as well as to enhance humoral immunity against test antigens in laboratory animals. A series of studies on the mycobacterial component responsible for the unique adjuvant activity of Freund's complete adjuvant revealed that Wax D is the active entity, being composed of peptidoglycan (PGN), arabinogalactan, and mycolic acid, and thereafter the PGN moieties of various bacteria were revealed to also be active in this respect [13]. In the mid-1970s, the minimal essential structure of PGN for adjuvant activity was demonstrated to be muramyldipeptide (MDP; N-acetylmuramyl-l-alanyl-d-isoglutamine) [14]. MDP reproduced various bioactivities of PGN [15], although the activities of MDP were generally weaker than those of PGN, MDP was still scarcely active in some experiments. PGN activates macrophages via TLR2 [16, 17], whereas MDP lacks TLR2-agonistic activity. The intracellular Nod2 was revealed to be a receptor for MDP [18, 19]. Thereafter, another Nod family molecule, Nod1, was demonstrated to recognize a PGN motif containing meso-DAP [18, 20].

Furthermore, most bacteria possess various TLR ligands including PGN which can also be sensed by

Nod1 and/or Nod2 after their degradation by bacterial or host PGN-lytic enzymes. Therefore, in host innate immune responses to invading bacteria, dual signalling through extracellular TLR molecules and intracellular Nod molecules should lead to the synergistic activation of host cells. This hypothesis about this synergism between TLRs and Nods has been put under scrutiny. Uehara *et al*. found that Nod1 and Nod2 agonists, in combination with TLR agonists, synergistically induced production of PGN recognition proteins and β-defensin 2 in human oral epithelial cells via NF-κB [21]. In human DCs, synergistic T helper type 1 (Th1) responses were induced upon combined stimulations of synthetic Nod and TLR agonists [22]. Some reports have also shown synergies between Nod2 activation and several TLR ligands in cellular responses. Uehara *et al.* also demonstrated synergism between synthetic Nod agonists and TLR agonists: MDP (Nod2 agonist) and desmuramylpeptides such as FK156 and FK565 (Nod1 agonists) in combination with synthetic lipid A (TLR4 agonist), the synthetic lipopeptide Pam3CSSNA (TLR2 agonist), and bacterial CpG motif DNA (TLR9 agonist) synergistically induced IL-8 in human monocytic cells [6, 23].

In the peripheral blood, Nod2 is highly expressed in DCs as well as in monocytes and granulocytes [24]. We were particularly interested by the targeting of both TLR2 and Nod2. Indeed, TLR2 appears to have a special role in engagement on T cell polarization and differentiation [25] while Nod2 has a role in the production of proinflammatory cytokines [26].

DCs are the most potent professional antigen presenting cells (APCs) with a key function at this interface, since they can mediate, e.g., the stimulation of antigen specific T-helper cells. In addition to antigen presentation on MHC molecules, the modulation is usually executed through expression of co-stimulatory molecules such as CD80 or CD86 or through paracrine functions, which shape the subsequent immune response. Moreover, although the functions of CD83 and the dendritic cell lysosomal-associated membrane protein (DC-LAMP) are unclear, they are well known as DC maturation markers [27-29].

In this study, we have examined the potential synergistic effects of Nod2 and TLR2 agonist on the induction of DC maturation and pro-inflammatory cytokines secretion and the further immune responses shift toward Th1/Th2 development and mucosal immune responses. To realize our studies, chemically synthesized Nod2, TLR2, and chimeric Nod2/TLR2 ligands were used in different combinations, and their adjuvant effects were assessed.

2. Materials and Methods

2.1. Nod2, TLR2 receptor ligands and chimeric molecule Nod2/TLR2

These compounds have been developed and manufactured by CAYLA-InvivoGen (Toulouse, France).

2.2. PLA and HIV-1 Gag p24 antigen

Poly(D,L-lactic acid) (PLA50 Mn = 47,000 g/mol, molecular weight distribution Mw/Mn=1.8) with a carboxylic end group was purchased from Anabior (Grenoble, France).

HIV-1 p24 antigen was produced and purified by PX'Therapeutics (Protein'eXpert, Grenoble, France) from *Escherichia coli* BL21 DE3 strain and endotoxins were removed as previously described [30]. The purity of p24 was higher than 97% as assessed by silver nitrate stained reducing SDS-PAGE; with an endotoxin content lower than 5 EU/mg of p24 protein, as determined using the QCL-1000 Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) kit (BioWhittaker, Walkersville, Verviers, Belgique). The resulted recombinant p24 protein has a molecular weight of 26.9657 kDa and a theoretical pI of 5.92.

All other reagents were of analytical grade and received from commercial sources.

2.3. Preparation of p24-coated PLA nanoparticles

The p24 protein was diluted in 0.1 M PBS (phosphate buffered saline) at 200 µg/ml. PLA nanoparticles were diluted at 5 mg/ml in PBS and the two solutions were mixed volume to volume. The adsorption reaction occurred within 2 hours at room temperature, with moderate overhead stirring. Unbound p24 protein was collected by centrifugation at 10,000 xg for 10 min and quantified using the microBradford assay (Pierce, Bezons, France) according to the manufacturer's instructions.

Nanoparticle sizes and net surface charges were determined using a Zetasizer Nano ZS and endotoxin contents were assessed using EndoSafe test (Charles River) and were < 5 EU/ml.

2.4. In vitro maturation of human MoDCs and cytokine secretion

Monocytes were purified from peripheral human blood by density gradient centrifugations using Ficoll-Paque™ plus and Percoll (GE Healthcare). Remaining erythrocytes, NK, B- and T- cells were then depleted by anti-glycophorin A, anti-CD56, anti-CD19 and anti-CD3 antibodies (Beckman Coulter) respectively, using Dynabeads® Pan Goat anti-mouse IgG (Invitrogen).

Purified monocytes (0.5 x 10^6 cell/ml) were then cultured in RPMI medium in the presence of 62.5 ng/ml of IL-4 and 75 ng/ml of GM-CSF to differentiate into DCs as previously described [31]. After 6 days, Nod2, TLR2 or chimeric Nod2/TLR2 ligands (diluted in the cell culture medium at 10 nmol/ml), were added to 1 million of differentiated MoDCs for 24 or 48 h. DCs only cultured in complete RPMI medium were used as a negative control of stimulation, and those cultured in the presence of 2.5 µg/ml of LPS were used as a positive control. Cells were stained with FITC-labelled anti-CD1a (dendritic cells marker) and DCs maturation was assessed by cell immunostaining using PE-labeled monoclonal antibodies against the maturation marker CD83, co-stimulatory molecules (CD80, -86) and the major histocompatibility complex class-II (MHC-II) (BD Pharmingen™). As the DC-LAMP maturation marker is found within the limiting membrane of intracellular multi-lamellar bodies, known as MHC-II compartments in human mature DCs [27], fixation and permeabilization with Cytofix/Cytoperm and washing with Perm/Wash (both BD Biosciences) were performed before staining with Alexa 647-labeled anti DC-LAMP antibodies (Dendritics). The isotype controls were IgG1 and IgG2a (BD Pharmingen™).

Ten thousand events were acquired by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) with a FACS canto I (Tour Inserm CERVI – Lyon), and the data were analyzed using the FlowJo software.

All the MoDCs culture supernatants were collected after 24 or 48 h and stored at -80 °C for further cytokine quantifications. Expression of IL-12p70, TNFα, IL-6, IFNγ, IL-1β and IFNα was analyzed simultaneously using the Bio-Plex Pro™ assay (BioRad) according to the manufacturer's protocol.

2.5. Immunization of mice

Eight-to-twelve week-old female BALB/c mice were purchased from Charles River Laboratories and were hosted at the Plateau de Biologie Expérimentale de la souris/Mice experimental biology facility (Ecole Normale Supérieure of Lyon, France), and handle following the institutional guidelines. All studies and procedures were approved by the Comité Rhône-Alpes d'Ethique pour l'Experimentation Animale (Lyon, France).

Mice were divided in 5 groups of 5 animals and were immunized with 10 µg of antigen adsorbed on nanoparticles suspended in 100 µl of PBS subcutaneously at day 0 (D0), D14 and D28. 20 nmol of ligands (Nod2, TLR2, both or chimeric) were co-

administered and one group was immunized with PLA-p24 NPs alone (control groups).

Sera, vaginal lavages and faecal pellets were collected at D0, D14, D28 and D34. Serum samples were obtained from whole blood recovered by performing a small incision at the retro-orbital vein. Vaginal secretions were collected from mice injected with 50 µl of PBS (two times) placed in the vagina of the animal using an adapted pipette (Pipette M100, Gilson), and tips (CP100, Gilson). 5 µl of 25X Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) were then added to the vaginal lavages to protect immunoglobulins from degradation. Fresh faeces were also collected from each animal and diluted at 100 mg/ml with 1X Halt™ Protease Inhibitor Cocktail. Sera were then collected by centrifugation at 16,000 x g in a spin column and stored at -20 °C until use. Faeces and vaginal secretions were strongly mixed to dislocate and then centrifuged at 16,000 x g and stored at -20°C until use.

2.6. Quantification of p24 specific IgG/IgA in biological fluids

Sera, vaginal lavages and faeces were tested for the presence of p24-specific IgA, IgG, IgG1 and IgG2a, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at D0, D14, D28 and D34. Ninety-six-wells Nunc maxisorp plates were coated with 100 µl of 1 µg/ml of p24 protein overnight at room temperature. p24 excess was eliminated and plates were blocked

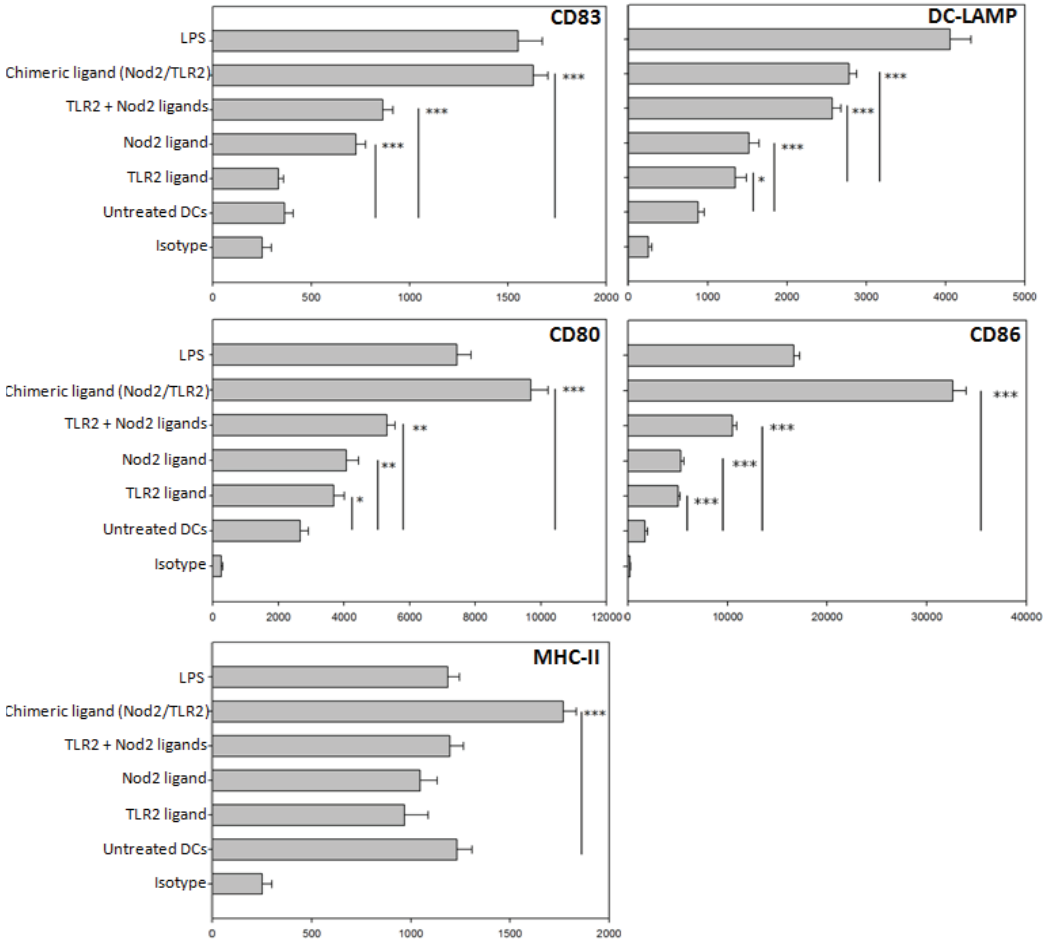


Fig. 1. Surface expression of maturation-related molecules by human MoDCs upon exposure to Nod2, TLR2 or chimeric Nod2/TLR2 ligands, determined by flow cytometry. Phenotypes of MoDCs after 24 h of stimulation and mean surface expression of maturation markers (CD83 and DC-LAMP), costimulatory molecules (CD80 and CD86), and MHC-II. Comparison with LPS as positive control of maturation, and untreated DCs as negative controls. Means (SD); n = 3. ANOVA *$P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

with 200 µl of 10% non-fat dry milk in PBS for 1 h at 37 °C to prevent non-specific binding of the antibodies. Plates were washed 3 times with PBS/0.05% Tween-20 using a Thermo Scientific autoplate washer. Serum samples from immunized mice at the indicated time points were serially diluted in Dulbeco's PBS (D-PBS) containing 1% of BSA. Then, 100 µl of each sample in duplicate were incubated on blocked plates for 1 h at 37 °C. Wells were washed and incubated 1 h at 37 °C with anti-mouse IgA, IgG, IgG1 or IgG2a–HRP (horseradish peroxidase) conjugate (1:10,000) from Southern Biotech. Plates were washed again, revealed using 100 µl per well of tetramethylbenzidine (TMB) substrate (BD Biosciences) and stopped using 1N H_2SO_4. The optical density (OD) at 450 nm with a correction at 630 nm was measured using a BioRad plate reading spectrophotometer. To quantify IgG and IgA, plates were either coated with monoclonal anti-IgA/IgG antibody (Mabtech), diluted to 2 µg/ml in PBS by adding 100 µl/well. Monoclonal murine IgG or IgA standard immunoglobulins (Mabtech) were used on each plate to quantify the murine anti-p24 specific antibodies.

2.7. Statistical analyses

Analyses were performed using SigmaPot™ software, version 11.0. Statistical data analyses were performed using an analysis of variance ANOVA with Bonferroni's post test for comparison of pairs. Statistical significance indicated on the figures. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05.

3. Results

3.1. Strongly enhanced immunostimulatory efficiency of Nod2/TLR2 chimeric ligand in vitro

Adjuvants and vaccine delivery systems address the interface between innate and adaptive immune responses, in which the extent and direction of innate immune activation determines the quality and magnitude of the resulting adaptive response. DCs play a major role at this interface, their maturation

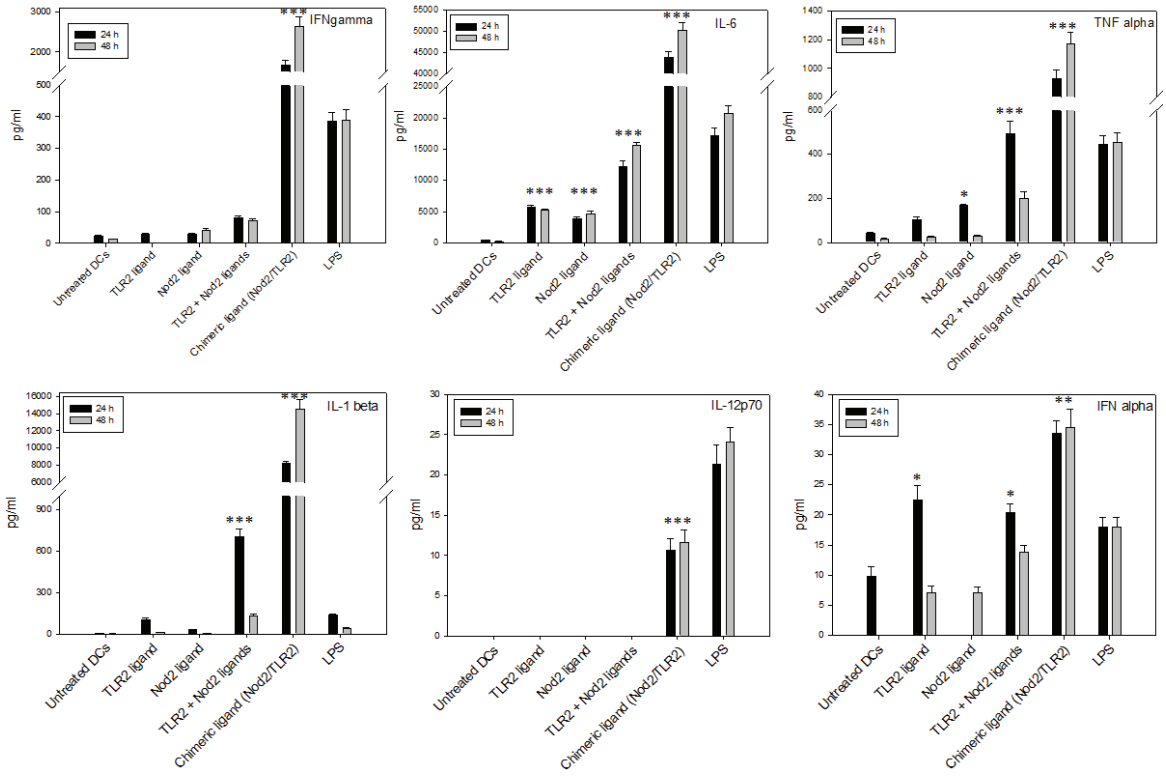


Fig. 2. Quantification by Bio-Plex ProTM assay of cytokine secretion pattern of MoDCs treated with Nod2, TLR2 or chimeric Nod2/TLR2 ligands *in vitro*. The supernatants of MoDCs were collected and the concentrations of IFNγ, IL-6, TNFα, IL-1β, IL12p70 and IFNα were analyzed. LPS (2.5 µg/ml) was used as positive control. Means (SD); n = 2. ANOVA ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05.

being correlated to the presentation of antigen fragments by MHC molecules, and to the expression of specific cell markers. Aiming to follow the adjuvant potential of Nod2 and/or TLR2 ligands to stimulate human DCs maturation *in vitro*, cell markers of this maturation (CD80, CD83, CD86, MHC-II and DC-LAMP) were quantified after ligand exposure of MoDCs as TLR2 and Nod2 receptors are both expressed by those cells [7].

Expression of the cell surface markers CD80, CD83, CD86, MHC-II and the intracellular DC-LAMP was assessed by flow cytometry 24 hours after equimolar ligand addition. As shown in Fig. 1, a statistically significant increase in the expression of CD80, CD86 and DC-LAMP ($P < 0.05$) was observed in MoDCs incubated with Nod2 or TLR2 ligand. CD83 expression was only statistically enhanced by Nod2 ligand ($P < 0.001$) while MHC-II amount was neither modified by Nod2 nor TLR2 ligands. The combination of those two ligands significantly increase the expression of CD86, CD80 and DC-LAMP markers ($P < 0.01$) in comparison to MoDC assays realized with one of these ligands. This result suggests a cumulative effect of these ligands. Surprisingly, and with the notable exception of DC-LAMP, the DC maturation markers expression were significantly increased ($P < 0.001$) by the use of the chimeric ligand containing both Nod2 and TLR2 ligand signatures, in comparison to mono-specific molecules. Moreover, this chimeric ligand is the only molecule able to increase the MHC-II expression.

DC maturation triggered by external signals is accompanied by the expression of different cytokines that will modulate the immune responses. For this reason, we have compared the impact of our different Nod2-TLR2 ligands in MoDCs culture assays on the production of different cytokines. The data obtained after 24 h and 48 h ligand exposures are shown in Figure 2 for IFNγ, IL-6, TNFα, IL-1β, IL12p70 and IFNα. In comparison to untreated cells, Nod2 or TLR2 ligands increase significantly the amount of IL-6 in MoDCs culture medium ($P < 0.001$) as well as TNFα and IFNα respectively ($P < 0.05$), their impact being more disparate for others cytokines. With both ligands, an additive effect was significantly detectable for IL-6, TNFα and IL-1ß ($P < 0.001$). Contrary to mono-specific ligands, the chimeric Nod2/TLR2 molecule synergistically increases (2 to 30 folds) the secretion of these cytokines ($P < 0.001$). It should be noted that with the exception of IL-12p70, studied cytokine concentrations are superior to those obtained with the positive control, LPS.

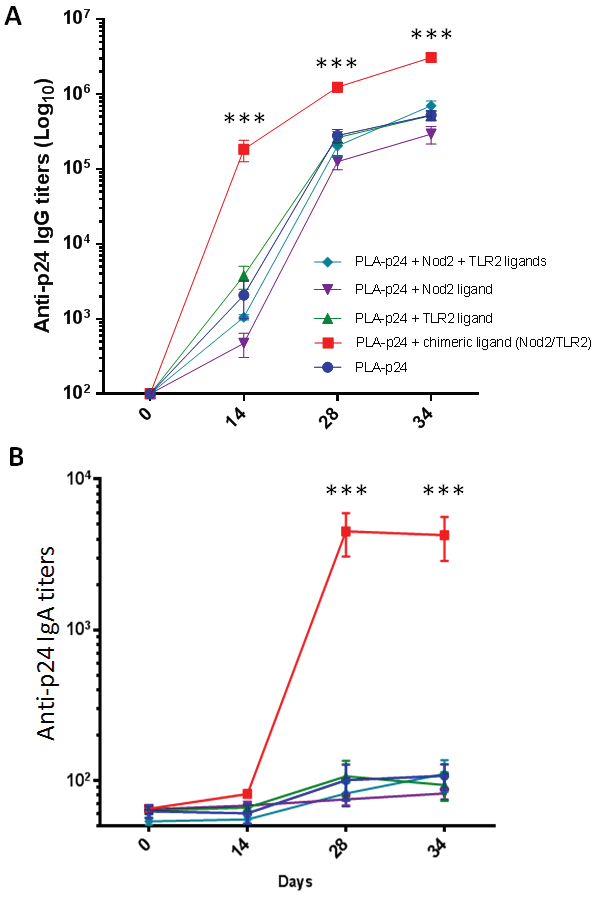


Fig. 3. Specific anti-p24 IgG (A) and IgA (B) titers in sera of mice immunized with PLA-p24 and comparison to PLA-p24 co-administered with chimeric ligand (Nod2/TLR2). Animals (n = 5 per group) received 3 administrations by subcutaneous route of 10 µg of p24 protein adsorbed to PLA nanoparticles co-delivered with 20 nmol of ligands. For each animal the IgG/IgA titers were determined individually and expressed as a mean ± SEM. ANOVA ***$P < 0.001$.

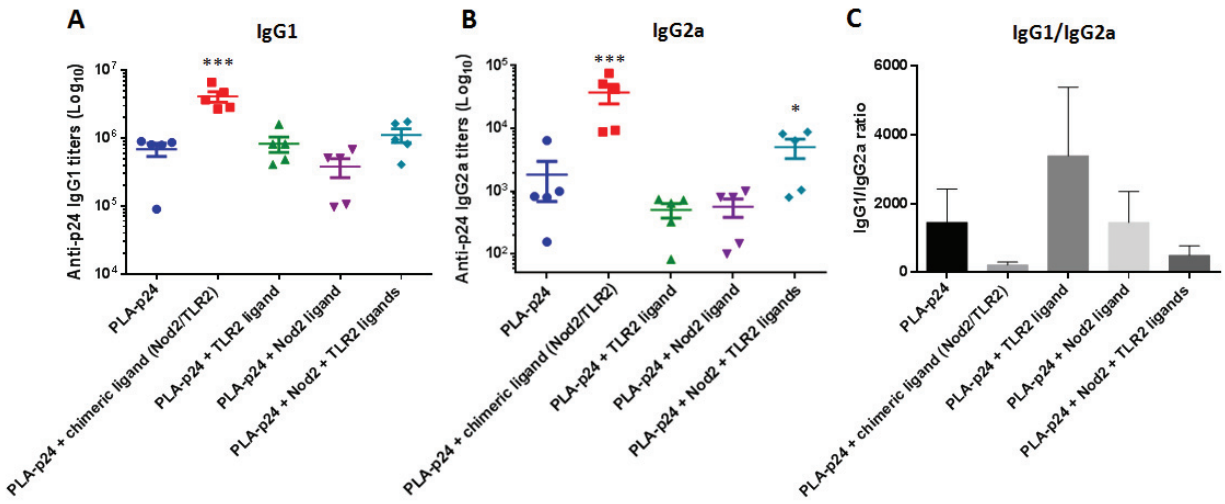


Fig. 4. Specific anti-p24 IgG1 (A), IgG2a (B) and IgG1/IgG2a ratio (C) in sera of mice immunized with PLA-p24 and comparison to PLA-p24 co-administered with chimeric ligand (Nod2/TLR2). Animals (n = 5 per group) received 3 administrations by subcutaneous route of 10 µg of p24 protein adsorbed to PLA nanoparticles co-delivered with 20 nmol of ligands. For each animal the IgG/IgA titer was determined individually and expressed as a mean ± SEM. ANOVA ***$P < 0.001$, **$P < 0.01$.

3.2. Nod2/TLR2 chimeric ligand enhances systemic and mucosal humoral immune responses against HIV-1 p24 antigen

We have previously validated the vaccinal potential of PLA nanoparticles used as antigen carrier. Here, PLA nanoparticles coated with Gag p24 (HIV-1) were evaluated for their immunostimulatory potential after subcutaneous co-administration in successive cycles (at days 0, 15 and 28) with our different Nod2/TLR2 ligands in BALB/c mice. At days 0, 14, 28 and 35, sera, vaginal lavages and faeces were collected and p24-specific IgG, IgG1, IgG2a, and IgA titers were determined.

As shown in Figure 3, only PLA-p24 co-administered with the chimeric Nod2/TLR2 ligand permits to significantly increase IgG and IgA titers. Hence, the chimeric ligand increased the anti-p24 IgG and IgA responses into sera up to 2 Logs at day 14 for IgG and 1 Log at days 28 and 34 for IgA ($P < 0.001$). No significant differences were observed in term of systemic anti-p24 responses between mouse groups immunized with PLA-p24 alone or co-administered with Nod2, TLR2 or TLR2 plus Nod2 ligands.

The predominantly IgG subclass was IgG1, a Th2-associated isotype, for all groups of mice (Fig. 4 A & B). IgG1 titer in the group of mice treated with the chimeric ligand was significantly higher ($P < 0.001$) than in other assays (Fig. 4A). A similar result was obtained for IgG2a (a Th1-associated isotype) except that the mouse group treated with both Nod2 and TLR2 ligands presents a significantly higher IgG2a titer than those injected without ligand adjuvant or with Nod2 or TLR2 ligands. The ratio IgG1/IgG2a was significantly decreased when PLA-P24 nanoparticles where co-administered with the chimeric or both Nod2 and TLR2 ligands (Fig. 4C). Mucosal immune responses were then analysed (Fig.5). The group of mice injected with the chimeric ligand present, in comparison to other assays, a significant increase of antibody responses (IgG and IgA) in faeces and vaginal lavages at day 34.

4. Discussion

DCs are the most potent APCs and the main activators of adaptive immunity. They use a wide variety of PRRs to detect PAMPs from invading pathogens. Activation of DCs by microbial or other inflammatory stimuli results in DC maturation, hallmarked by up-regulation of MHC-II and co-stimulatory molecules, and the release of pro-

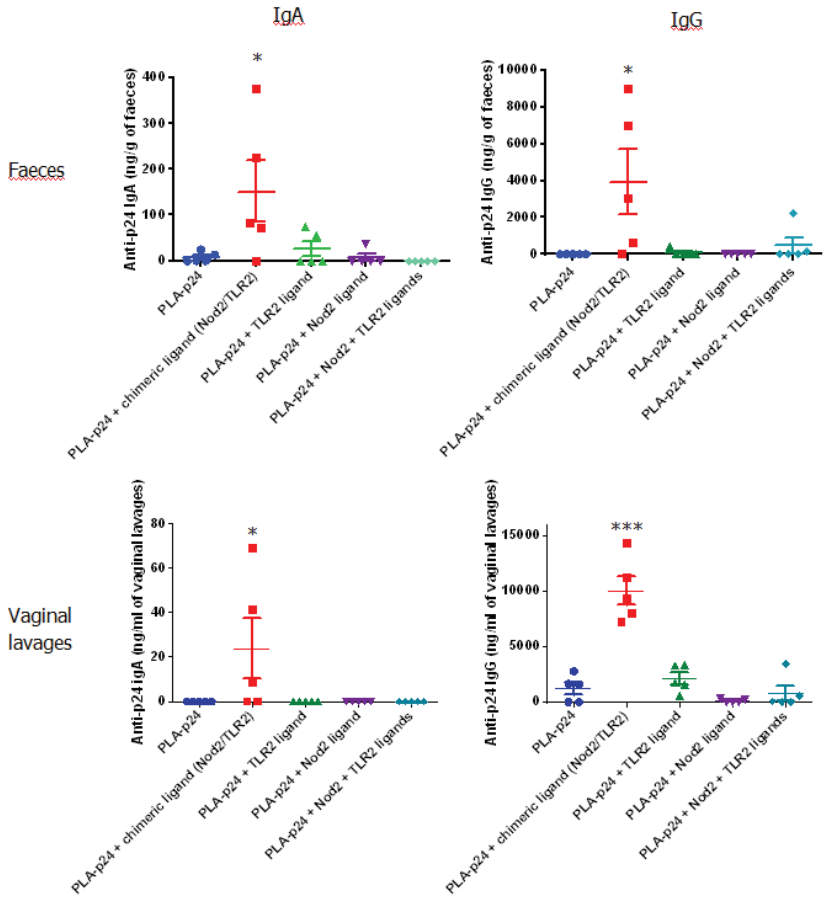


Fig. 5. Specific anti-p24 IgG, IgA in mucosal samples of mice immunized with PLA-p24 and comparison to PLA-p24 co-administered with chimeric ligand (Nod2/TLR2). Animals (n = 5 per group) received 3 administrations by subcutaneous route of 10 µg of p24 protein adsorbed to PLA nanoparticles co-delivered with 20 nmol of ligands. For each animal the IgG/IgA quantity was determined individually. ANOVA *P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001

inflammatory cytokines. As a further consequence of activation, DCs migrate into secondary lymphoid tissues and stimulate the activation and differentiation of distinct T helper cell subsets [32]. The nature of the stimuli and the class of the activated PRRs are crucial to the outcome of DC-induced T-cell responses.

Here, we have demonstrated that a chimeric molecule harbouring Nod2 and TLR2 agonist sequences is more efficient as activator of DCs maturation *in vitro* and of systemic anti-HIV-1 humoral immune responses after subcutaneous administrations than a mix of Nod2 and TLR2 ligands. Moreover, mice treated with this chimeric molecule were able to induce high systemic IgA and high humoral immune responses at intestinal and vaginal levels.

In vitro, the co-administration of Nod2 and TLR2 ligands weakly induced CD80, CD83 and CD86 expression in human DCs and no up regulation of the MHC-II expression. In contrast, we showed that the chimeric Nod2/TLR2 ligand induced high up-regulation of those markers.

IL-12p70 plays a pivotal function in the differentiation of naive $CD4^+$ T-cells into Th1 subtypes, leading to the production of IFNγ enhancing the production of IgG2a by B-cells [33]. IL-12p70 production by DCs *in vitro* is generally activated by CD40 ligand and IFNγ or with bacterial LPS [34-37]. Indeed, as shown in Figure 2, in our *in vitro* assay, MoDCs express IL-12p70 in the presence of LPS, while only the chimeric Nod2/TLR2 ligand was able to generate IL-12p70 production among the molecules used. In agreement to this result, LPS and furthermore

the chimeric ligand increase the secretion of IFNγ in these assays, in comparison to MoDCs maintained or not in the presence of Nod2 and/or TLR2 agonists. This Th1 orientation promoted by the chimeric ligand is also observed in mice after repeated subcutaneous injections in presence of PLA-p24 nanoparticles. Hence, the IgG2a titers in sera are significantly higher than other assays although the presence of both Nod2 and TLR2 agonists favour in a much lesser extent the production of this isotype in comparison to PLA-p24 used alone or with the Nod2 or the TLR2 ligands (Fig. 4). The later result is contradictory to the lack of IL-12p70 production by MoDCs with the two ligands, but might be due to the presence of an antigenic molecule and the mode of vaccination favouring a local inflammation. The Th1 orientation might also result of cross-presentation induction of p24 peptides by antigen presenting cells after Nod2 and TLR2 ligands exposure [40].

From our *in vitro* data the chimeric Nod2/TLR2 ligand also show a synergistic induction of IL-6, TNFα, IL-1β and IFNα in comparison to Nod2 and TLR2 ligands co-delivered separately (Fig. 2). Those results are in correlation with the *in vivo* observations. Indeed, the chimeric molecule appears to be more potent than the Nod2 and TLR2 ligand co-administered, inducing antibody responses that appear earlier and are of a greater magnitude. Only the chimeric ligand was able to induce specific antibody at distant mucosal sites following subcutaneous immunization. This effect is probably due to the induction of high IgG titers in sera leading to the transudation and/or FcRn transport to mucosal surfaces [38, 39]. The specific IgA responses at mucosal surfaces might be due to an efficient stimulation of B cells at mucosal levels or transport of seric IgA by the pIgR.

This is the first study to show that a chimeric Nod2/TLR2 ligand is an effective adjuvant to induce systemic and mucosal immune responses when delivered subcutaneously. The main mechanism might be the internalisation of the chimeric ligand after binding to the membrane TLR2 receptor and then activate the intracytoplasmic Nod2 receptor leading to the increase maturation of the DCs and a triggering of the TIRAP-MyD88-dependant pathway (TLR2), NF-κB and MKKs pathways (Nod2), leading to the proinflammatory cytokines production observed.

Moreover, as triggering of the TLR2 induces MyD88 dependant MKKs and NF-κB pathways leading to the production of pro-inflammatory cytokines and that Nod2 receptor stimulation leads to the activation of the same pathways *via* RIP2 and CARD9 (in a MyD88 independent way), our hypothesis is that there is a synergistic activation of the MKKs and NF-κB pathways when TLR2 and Nod2 are stimulated simultaneously into the same DC. This activation leads to the improved expression of maturation markers, co-stimulatory molecules and production of pro-inflammatory cytokines that we observed in DCs cultivated *in vitro*.

Consistent with knowledge that TLR2 and Nod2 pathways act synergistically on human B lymphocytes [40] and DCs [22] to induce immune responses, our data showed a significant enhancement of surface maturation markers expressions when TLR2 and Nod2 agonists are co-administered (Fig. 1), as well as for cytokines secretions (Fig. 2). Whereas it is admitted that both pathways activate NF-κB and AP1 signalization pathways, leading to immune stimulations, where the synergy takes place is still not fully understood. Recent discoveries point out the ser/thr kinase TAK1, involved in the TLR2 signalization pathways where TRAF6 activate TAK1 complex [41]. Furthermore, M. Hasegawa *et al*. [42] postulates that: Nod2 activation recruits RIP2 (also known as RICK) through CARDs domains; that leads to RIP2 poly-ubiquinylation on its K209 by E3s allowing recruitment of TAK1 complex, while its IM domain links NEMO (sequester of IKKβ); RIP2 then

activate TAK1 which activate pro-inflammatory cytokines secretion pathways.

However, the synergistic effect observed during TLR2 and Nod2 agonist co-administration does not last *in vitro* after 24 h on cytokines secretion from MoDCs which could explain the lack of immunoglobulin's production towards p24 *in vivo* (Fig. 3, 4 and 5). Further experiments should be conducted on the maturation level over time of MoDCs. Interestingly, the TLR2/Nod2 agonists chimera show a further enhancement of TLR2 and Nod2 agonists co-administration effects at 24 h and even more important past 48 h (Fig. 3). Those results match with IgG and IgA production toward p24 *in vivo* (Fig. 3, 4 and 5). This strong adjuvant effect could be explained by an improvement of Nod2 agonist uptake by APCs. Whereas TLR2 receptors are on the cell surface and so wide exposed to ligands, Nod2 receptors are within the cytoplasm and so exposed to few diffusing Nod2 agonists. We hypothesized that chimeras are uptaken through their TLR2 agonist domain in lipid raft and internalized within endosomes, as well as lipotechoic acid TLR2 ligand [43, 44], enabling more Nod2 ligands to enter the cells. How the Nod2 agonist domain of the chimera interacts with Nod2 receptor after endosomal internalization is still beyond our comprehension and requires further studies but the involvement of the SLC15A4 transporter seems to be crucial [45].

Those observations lead to improved immune responses *in vivo* after co-delivery of the chimeric Nod2/TLR2 ligand with PLA NPs carrying the HIV-1 Gag p24 antigen. This is probably due to the induction of inflammation at the injection site leading to the recruitment of APCs as macrophages and DCs. The latter able to uptake antigen carried by PLA NPs and then migrate to draining lymph nodes to present antigen to naive T cells. Moreover, up regulation of the MHC-II and also the co-stimulatory molecules (CD80 and CD86) improved the presentation to naive T cells (signal 1) and the co-stimulatory signals (signal 2) necessary to the activation and survival of the lymphocytes. The production of IL-12 by the DCs stimulated by the chimeric ligand orientates the differentiation of T-cells into Th1 cells leading to the Th1 orientation observed with the IgG1/IgG2a ratio decrease.

In our mouse model, three subcutaneous immunizations were enough to induce high levels of IgG and IgA in serum, faeces and vagina. It remains to be confirmed whether this immunization protocol with NP and chimeric Nod2/TLR2 ligand will work similarly in macaques or humans, or whether these Abs would be neutralizing using a more relevant Ag like gp41, gp120 or gp140. Moreover, it could be interesting to test different mucosal routes such as oral or intranasal administrations as Nod2 and TLR2 are expressed at those mucosal surfaces.

Therefore, further studies are warranted that assess homologous and heterologous immunization protocols to determine the feasibility of using this chimera, as effective adjuvant systems for HIV antigens, in the development of vaccine inducing systemic and mucosal immune responses in humans.

The generation of MyD88 (-/-) and TRIF (-/-) mice has been a critical breakthrough in the study of PRR mechanisms and their involvement in various processes, including vaccination. These mouse strains are commonly used as the first line of investigation to establish a PRR-dependent mechanism and could be used for further investigations of the chimeric Nod2/TLR2 activities.

5. Conclusions

The adjuvant effect of the chimeric ligand seen here may be due to the binding of the TLR2 ligand part of the chimera and then endocytosis and delivery to the Nod2 receptor into the intracytoplasmic compartment. Moreover, as triggering of the TLR2 induces MyD88 dependant MKKs and NF-κB

pathways leading to the production of pro-inflammatory cytokines and that Nod2 receptor stimulation leads to the activation of the same pathways via RIP2 and CARD9 (in a MyD88 independent way), our hypothesis is that there is a synergistic activation of the MKKs and NF-κB pathways when TLR2 and Nod2 are stimulated simultaneously into the same DC. This activation leads to the improved expression of maturation markers, co-stimulatory molecules and production of pro-inflammatory cytokines that we observed in DCs cultivated *in vitro*. Those observations lead to improved mucosal and systemic immune responses *in vivo* after subcutaneous co-delivery of the chimeric Nod2/TLR2 ligand with PLA NPs carrying the HIV-1 Gag p24 antigen meaning a potential new adjuvant to induce high mucosal immune responses.

Acknowledgements

The authors would like to thank Astrid Calamel, Jean-Yves Exposito, Vincent Lahaye, Sophie Legaz, Perrine Mercier-Gouy and Séverine Munier for generous advice, assistance, and reagents. This project was funded by iNanoDCs, Aditec, CutHIVac, Anabio and the Région Rhône-Alpes.

This work was funded by the ANR (French National Research Agency) through Euronanomed grant (iNanoDCs) and ANabio research projects, and a PhD studentship from Région Rhône-Alpes to Vincent Pavot.

This work was also partially supported by grants from the two FP7 european grants (CutHIVac) and Aditec (N° 280873). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

[1] A. Pashine, N.M. Valiante, J.B. Ulmer, Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants, Nat Med, 11 (2005) S63-68.

[2] V.E. Schijns, Immunological concepts of vaccine adjuvant activity, Curr Opin Immunol, 12 (2000) 456-463.

[3] M. Saleh, The machinery of Nod-like receptors: refining the paths to immunity and cell death, Immunol Rev, 243 (2011) 235-246.

[4] A. Uehara, Y. Fujimoto, K. Fukase, H. Takada, Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines, Mol Immunol, 44 (2007) 3100-3111.

[5] J.H. Fritz, S.E. Girardin, C. Fitting, C. Werts, D. Mengin-Lecreulx, M. Caroff, J.M. Cavaillon, D.J. Philpott, M. Adib-Conquy, Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists, Eur J Immunol, 35 (2005) 2459-2470.

[6] A. Uehara, S. Yang, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Kusumoto, K. Shibata, S. Sugawara, H. Takada, Muramyldipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramylpeptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture, Cell Microbiol, 7 (2005) 53-61.

[7] H. Tada, S. Aiba, K. Shibata, T. Ohteki, H. Takada, Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells, Infect Immun, 73 (2005) 7967-7976.

[8] J.H. Fritz, L. Le Bourhis, G. Sellge, J.G. Magalhaes, H. Fsihi, T.A. Kufer, C. Collins, J. Viala, R.L. Ferrero, S.E. Girardin, D.J. Philpott, Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity, Immunity, 26 (2007) 445-459.

[9] K.S. Kobayashi, M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez, R.A. Flavell, Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract, Science, 307 (2005) 731-734.

[10] R.S. Kornbluth, G.W. Stone, Immunostimulatory combinations: designing the next generation of vaccine adjuvants, Journal of leukocyte biology, 80 (2006) 1084-1102.

[11] T. Dzopalic, I. Rajkovic, A. Dragicevic, M. Colic, The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors, Immunol Res, 52 (2012) 20-33.

[12] O. Joffre, M.A. Nolte, R. Sporri, C. Reis e Sousa, Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity, Immunol Rev, 227 (2009) 234-247.

[13] D.E. Stewart-Tull, Freund's complete and incomplete adjuvants, preparation, and quality control standards for experimental laboratory animals use, Methods Mol Biol, 626 (2010) 59-72.

[14] F. Ellouz, A. Adam, R. Ciorbaru, E. Lederer, Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives, Biochem Biophys Res Commun, 59 (1974) 1317-1325.

[15] S. Kotani, H. Takada, [Immunopharmacological activities of bacterial cell walls and related synthetic compounds (muramyl peptides)], Yakugaku Zasshi, 103 (1983) 1-27.

[16] O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, S. Akira, Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components, Immunity, 11 (1999) 443-451.

[17] A. Yoshimura, E. Lien, R.R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski, D. Golenbock, Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2, Journal of immunology, 163 (1999) 1-5.

[18] S.E. Girardin, I.G. Boneca, L.A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M.K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A.J. Coyle, P.S. DiStefano, J. Bertin, P.J. Sansonetti, D.J. Philpott, Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan, Science, 300 (2003) 1584-1587.

[19] N. Inohara, Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, S.J. Foster, A.P. Moran, J.L. Fernandez-Luna, G. Nunez, Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through

NOD2. Implications for Crohn's disease, The Journal of biological chemistry, 278 (2003) 5509-5512.
[20] M. Chamaillard, M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M.A. Valvano, S.J. Foster, T.W. Mak, G. Nunez, N. Inohara, An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid, Nat Immunol, 4 (2003) 702-707.
[21] A. Uehara, H. Takada, Synergism between TLRs and NOD1/2 in oral epithelial cells, J Dent Res, 87 (2008) 682-686.
[22] H. Takada, A. Uehara, Enhancement of TLR-mediated innate immune responses by peptidoglycans through NOD signaling, Current pharmaceutical design, 12 (2006) 4163-4172.
[23] D.A. van Heel, S. Ghosh, M. Butler, K.A. Hunt, A.M. Lundberg, T. Ahmad, D.P. McGovern, C. Onnie, K. Negoro, S. Goldthorpe, B.M. Foxwell, C.G. Mathew, A. Forbes, D.P. Jewell, R.J. Playford, Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease, Lancet, 365 (2005) 1794-1796.
[24] O. Gutierrez, C. Pipaon, N. Inohara, A. Fontalba, Y. Ogura, F. Prosper, G. Nunez, J.L. Fernandez-Luna, Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation, The Journal of biological chemistry, 277 (2002) 41701-41705.
[25] S. Borrello, C. Nicolo, G. Delogu, F. Pandolfi, F. Ria, TLR2: a crossroads between infections and autoimmunity?, Int J Immunopathol Pharmacol, 24 (2011) 549-556.
[26] S.J. Rubino, T. Selvanantham, S.E. Girardin, D.J. Philpott, Nod-like receptors in the control of intestinal inflammation, Curr Opin Immunol, 24 (2012) 398-404.
[27] B. de Saint-Vis, J. Vincent, S. Vandenabeele, B. Vanbervliet, J.J. Pin, S. Ait-Yahia, S. Patel, M.G. Mattei, J. Banchereau, S. Zurawski, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque, A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment, Immunity, 9 (1998) 325-336.
[28] L.J. Zhou, T.F. Tedder, Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily, Journal of immunology, 154 (1995) 3821-3835.
[29] L.J. Zhou, R. Schwarting, H.M. Smith, T.F. Tedder, A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily, Journal of immunology, 149 (1992) 735-742.
[30] Y. Ataman-Onal, S. Munier, A. Ganee, C. Terrat, P.Y. Durand, N. Battail, F. Martinon, R. Le Grand, M.H. Charles, T. Delair, B. Verrier, 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 (2006) 175-185.
[31] V. Pavot, N. Rochereau, C. Primard, C. Genin, E. Perouzel, T. Lioux, S. Paul, B. Verrier, Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties, J Control Release, (2013).
[32] J. Banchereau, R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, Nature, 392 (1998) 245-252.
[33] S.E. Macatonia, N.A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C.S. Hsieh, J.A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K.M. Murphy, A. O'Garra, Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells, Journal of immunology, 154 (1995) 5071-5079.
[34] G.K. Koski, K. Kariko, S. Xu, D. Weissman, P.A. Cohen, B.J. Czerniecki, Cutting edge: innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells, Journal of immunology, 172 (2004) 3989-3993.
[35] P.J. Mosca, A.C. Hobeika, T.M. Clay, S.K. Nair, E.K. Thomas, M.A. Morse, H.K. Lyerly, A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment, Blood, 96 (2000) 3499-3504.
[36] P. Kalinski, J.H. Schuitemaker, C.M. Hilkens, E.A. Wierenga, M.L. Kapsenberg, Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells, Journal of immunology, 162 (1999) 3231-3236.
[37] A. Snijders, P. Kalinski, C.M. Hilkens, M.L. Kapsenberg, High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals, Int Immunol, 10 (1998) 1593-1598.
[38] Z. Li, S. Palaniyandi, R. Zeng, W. Tuo, D.C. Roopenian, X. Zhu, Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108 (2011) 4388-4393.
[39] T.T. Kuo, K. Baker, M. Yoshida, S.W. Qiao, V.G. Aveson, W.I. Lencer, R.S. Blumberg, Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics, Journal of clinical immunology, 30 (2010) 777-789.
[40] L.A. O'Neill, Synergism between NOD-like receptors and Toll-like receptors in human B lymphocytes, Journal of leukocyte biology, 89 (2011) 173-175.
[41] M. Landstrom, The TAK1-TRAF6 signalling pathway, The international journal of biochemistry & cell biology, 42 (2010) 585-589.
[42] M. Hasegawa, Y. Fujimoto, P.C. Lucas, H. Nakano, K. Fukase, G. Nunez, N. Inohara, A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation, The EMBO journal, 27 (2008) 373-383.
[43] M. Triantafilou, M. Manukyan, A. Mackie, S. Morath, T. Hartung, H. Heine, K. Triantafilou, Lipoteichoic acid and toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi are lipid raft-dependent, The Journal of biological chemistry, 279 (2004) 40882-40889.
[44] N.J. Nilsen, S. Deininger, U. Nonstad, F. Skjeldal, H. Husebye, D. Rodionov, S. von Aulock, T. Hartung, E. Lien, O. Bakke, T. Espevik, Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling: role of CD14 and CD36, Journal of leukocyte biology, 84 (2008) 280-291.
[45] J. Lee, I. Tattoli, K.A. Wojtal, S.R. Vavricka, D.J. Philpott, S.E. Girardin, pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling, The Journal of biological chemistry, 284 (2009) 23818-23829.

Résultats et discussion de l'article N°3

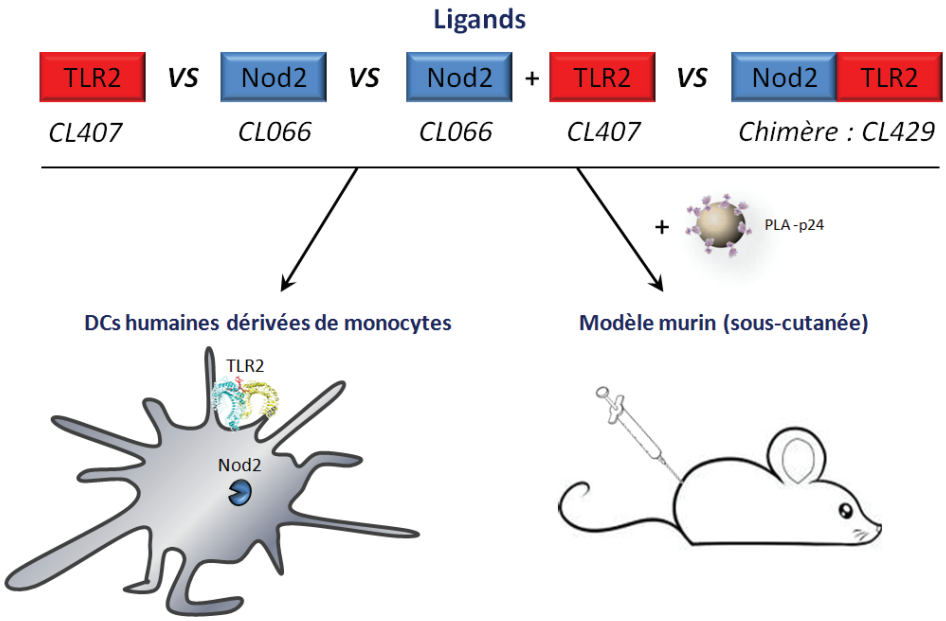


Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec la molécule chimèrique Nod2/TLR2, *in vitro* et *in vivo*. ND = Non Déterminé.

			PLA-p24	TLR2	Nod2	TLR2 + Nod2	Chimère Nod2/TLR2	LPS
***In vitro* (MoDCs)**	Marqueurs de maturation	*CD83*	ND	-	++	+++	+++++	+++++
		DC-LAMP	ND	++	++	++++	++++	+++++
		CD86	ND	+	+	++	+++++	+++
		CD80	ND	++	++	+++	+++++	++++
		CMH-II	ND	-	-	-	+++++	-
	Cytokines	*IFNγ*	ND	-	-	-	+++++	+
		Il-6	ND	+	+	++	+++++	++
		TNFα	ND	-	+	++	+++++	++
		IL-1ß	ND	-	-	+	+++++	-
		IL-12p70	ND	-	-	-	+++	+++++
		IFNα	ND	+++	-	+++	+++++	++
***In vivo* (Sous-cutanée)**	Systémiques	*IgG*	+++	+++	+++	+++	+++++	ND
		IgA	-	-	-	-	+++++	ND
	Lavements vaginaux	*IgG*	+	+	-	+/-	+++++	ND
		IgA	-	-	-	-	+++++	ND
	Fèces	*IgG*	-	-	-	-	+++++	ND
		IgA	-	+/-	-	-	+++++	ND
	Orientation Th1/Th2	*IgG1*	+++	+++	+++	+++	+++++	ND
		IgG2a	+	+	+	+++	+++++	ND
		Ratio	1800	3000	1800	400	200	ND

Nous montrons ici l'intérêt de cibler deux types de PRRs et que l'utilisation d'une molécule chimérique, en comparaison au ciblage séparé de ces récepteurs, est plus efficace en termes d'adjuvantation vaccinale.

Nous avons en effet montré, d'une part *in vitro*, que l'utilisation de ligands des récepteurs Nod2 et TLR2 utilisés en conjugaison permettait d'induire une maturation de DCs humaines avec un effet additif et que l'utilisation de la molécule chimérique Nod2/TLR2 (CL429) augmentait de manière synergique cette maturation. La molécule chimérique permet en effet d'induire une augmentation significative de l'expression des molécules de co-stimulations CD80 et CD86, du marqueur de maturation CD83 ainsi que du CMH-II, par rapport aux ligands utilisés seuls ou simplement co-administrés ($P < 0.001$). Nous nous sommes aussi intéressés à l'expression du marqueur intracellulaire DC-LAMP dont l'expression est strictement limitée aux DCs matures. Même si la fonction du DC-LAMP n'est pas encore élucidée, il pourrait jouer un rôle dans le processing des Ags par le CMH-II et pourrait orienter la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1. Une augmentation de l'expression de ce marqueur a été observée, toutefois sans différence significative entre l'utilisation de la molécule chimérique ou des deux ligands co-délivrés.

Lors de cette étude, nous avons mesuré en parallèle l'expression de cytokines proinflammatoires par les DCs. L'IL-6, l'IL-1β, le TNFα et l'IFNα sont des cytokines clés dans la régulation de l'inflammation aigüe et chronique et jouent un rôle de messager entre les cellules impliquées dans ce processus. L'IL-12p70 (aussi connue sous le nom de « natural killer cell stimulatory factor » ou de « cytotoxic lymphocyte maturation factor ») est une cytokine très importante dans l'induction de réponses immunitaires de types Th1. Cette cytokine est en effet capable de se lier à des récepteurs spécifiques de surface des NK et des LT, et de réguler ainsi le développement de ces populations cellulaires et stimuler la production d'IFNγ par les Th1[411]. L'IFNγ, quant à lui, est tout d'abord connu pour son activité antivirale. Cette cytokine exerce aussi une activité sur la prolifération des lymphocytes Th, l'immuno-régulation et l'inflammation. Elle est en effet capable d'induire la production d'autres cytokines, l'expression des molécules du CMH-I et -II et de molécules d'adhésions à la surface des leucocytes facilitant la diapédèse. Cette cytokine influence aussi la commutation de classe des immunoglobulines et leur sécrétion. Il a aussi été démontré par Moretto *et al*. que des souris dont les DCs ne produisent pas d'IFNγ étaient incapables de stimuler les IELs résultant en une prolifération de pathogènes au niveau de la muqueuse intestinale[412]. Cette cytokine possède donc une fonction importante dans la régulation des réponses immunitaires au niveau de la muqueuse intestinale.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'utilisation combinée des ligands Nod2 et TLR2 permet d'induire de manière additive, la production des cytokines IL-6, TNFα et IL-1β par

les DCs, par rapport à l'utilisation d'un seul des deux ligands. Nos données sur l'IL-6 et l'IL-1β sont en accord avec une étude récente menée par Timmermans *et al*. sur la stimulation *in vitro* de PBMCs avec diverses combinaisons d'un ligand Nod2 et de TLRs[245]. De plus, nous avons observé un effet synergique sur l'expression de ces cytokines avec la molécule chimérique. Cette dernière étant la seule à induire une production significative d'IFNγ, d'IFNα et d'IL-12p70.

L'augmentation de l'expression des marqueurs de maturations et de ces cytokines par les DCs, montre le potentiel de la co-stimulation des récepteurs TLR2 et Nod2 dans l'induction de la maturation de ces cellules, primordiale pour l'initiation d'une réponse immunitaire de qualité *in vivo*. En effet, l'induction de la production de forts taux d'IFNγ et d'IL-12p70 par les DCs stimulées avec la molécule chimérique, peut prédire une orientation Th1 de la réponse *in vivo*, même s'il faut garder en considérations les différences importantes entre un modèle *in vitro* humain et un modèle *in vivo* murin.

Afin de d'étudier l'effet de la molécule CL429 *in vivo*, nous sommes passés à une étude immunologique chez la souris, par voie sous-cutanée en co-administrant la molécule avec des NPs de PLA-p24. La voie sous-cutanée a été choisie dans cette étude afin d'étudier le potentiel immunostimulant de cette association de ligands sur l'induction de réponses systémiques et muqueuses. Nous avons mis en évidence que la seule co-administration des ligands TLR2 et Nod2 n'induisait aucun effet adjuvant aux concentrations utilisées (20 nmol/souris) et que, en revanche, la molécule chimérique était capable d'induire une forte augmentation de la réponse IgG anti-p24 au niveau sérique (+ 2 Log) et était la seule formulation à induire des IgA dans ces prélèvements, chose que je n'avais observée qu'avec une administration nasale jusqu'ici (Cf article N°2). De plus, l'addition de CL429 dans les formulations vaccinales administrées par voie sous-cutanée nous a permis d'obtenir des réponses immunitaires muqueuses très fortes (fèces et lavements vaginaux), à la fois en termes d'IgG et d'IgA anti-p24. Nous avons aussi observé une augmentation significative des titres en IgG2a, isotype Th1 avec la co-administration des ligands Nod2 et TLR2, amplifiés avec la molécule chimérique, indiquant une orientation Th1 de la réponse sans doute due à l'induction d'une cross-présentation des peptides p24 par les DCs[408]. L'induction d'IgG2a représente un point très intéressant du fait de l'implication des ces immunoglubulines dans les mécanismes d'ADCC et de recrutement des molécules du complément conduisant à une lyse des cellules potentiellement infectées. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus *in vitro* sur l'importante production d'IFNγ et d'IL12p70 par les DCs, cytokines connues pour induire cet isotype[413].

Il faut tout de même noter que le ratio IgG1/IgG2a reste élevé (~ 200) par rapport à des résultats obtenus par d'autres équipes avec des NPs de Yellow carnauba-wax-gp140, pouvant atteindre des ratios de 2[414].

L'ensemble de ces résultats tend à montrer un effet adjuvant clair de la molécule chimérique CL429 *in vivo* après administration sous-cutanée, aussi bien en termes de réponses systémiques que muqueuses. Ces effets étant probablement dûs à une stimulation efficace des CPAs (DCs dermiques, cellules de Langerhans, etc.) conduisant à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires étudiées *in vitro* et permettant le recrutement et la stimulation des cellules du système immunitaire au point d'injection. Les fortes réponses muqueuses pouvant s'expliquer par une transsudation et/ou un transport par le FcRn des IgG sériques[51, 52] et la forte présence d'IgA sans doute due à l'induction d'une commutation de classe au niveau systémique, même si le rôle de ces IgA sériques reste mal connu. Ces IgA sériques auraient ensuite pu être transportées au niveau des surfaces muqueuses par transsudation ou *via* le pIgR[50]. Il est aussi possible que les formulations contenant le CL429, aient permis de stimuler des réponses humorales locales au niveau des tissus muqueux, induisant des plasmocytes à IgA. Afin d'étudier cette hypothèse, nous prévoyons de réaliser des ELISpots B (IgG et IgA) et Th17 à partir des tissus muqueux (intestins et vagins) purifiés.

Une étude réalisée en 2011 par Liang *et al*. montre que la stimulation des plasmocytes circulants (humains) par un ligand TLR2 induit l'expression des récepteurs CCR9 et CCR10 ainsi que la production d'IgA. Ces résultats peuvent expliquer le homing des plasmocytes à IgA au niveau des muqueuses. De plus, cette stimulation a induit la production d'IgA dimériques (chaîne J) par des plasmocytes muqueux. La chaîne J étant primordiale pour le transport des IgA à travers la barrière muqueuse[415]. Nos résultats sont très probablement liés à ce phénomène.

L'hypothèse que nous avançons sur l'effet adjuvant de la molécule chimérique CL429 est, dans un premier temps une fixation au TLR2 situé à la surface des DCs, initiant une première cascade d'activation dépendante du MyD88, puis l'internalisation du complexe CL429-TLR2. Le ligand, délivré dans le milieu intracellulaire, se fixe au récepteur Nod2 conduisant au déclenchement de la cascade d'activation des Nods, venant renforcer la première. Ceci n'est encore qu'une hypothèse, mais semble tout à fait plausible et fait le parallèle avec une infection bactérienne/virale, qui va tout d'abord stimuler les récepteurs extracellulaire puis, après internalisation, les récepteurs intracellulaires. Un moyen de vérifier ce postulat serait de réaliser une co-adsorption des ligands TLR2 et Nod2 à la surface des particules de PLA. Les effets *in vitro* et *in vivo* devraient être équivalents à ceux de la chimère. Il pourrait aussi être intéressant d'encapsuler la molécule chimérique à l'intérieur des NPs de PLA afin d'évaluer une possible perte de fonctionalité du ligand, due à une non-stimulation

du TLR2, rendu inaccessible. Il serait aussi intéressant de réaliser *in vitro* l'inhibition des différentes voies d'activations (MyD88 et RIP2) grâce à des siRNA ou des miRNA afin d'analyser une potentielle perte d'activité de la molécule chimérique. L'utilisation de souris KO TLR2 et Nod2[416, 417] pourrait permettre d'appuyer ces résultats *in vivo*.

Cette molécule semble donc très prometteuse pour le développement de vaccins inducteurs de réponses muqueuses par voie parentérale. De nombreuses études sont encore nécessaires afin de mieux comprendre la mécanistique immunologique précise de l'efficacité de cette molécule et surtout sa toxicité potentielle, notamment en termes de réactions inflammatoires exacerbées, pouvant conduire à diverses pathologies. Il serait de plus intéressant de réaliser des immunisations par voies nasale et orale, afin d'identifier une potentielle activité adjuvante par voies muqueuses.

RESULTATS 4 : TRANSPORT ET BIODISTRIBUTION DES NANOPARTICULES DE PLA *IN VITRO* ET *IN VIVO*

4.1. INTRODUCTION

Notre objectif principal est d'induire une immunité muqueuse grâce à des particules de PLA vectorisant une protéine antigénique. En effet, les particules de polymères, tels que le PLA ou le PLGA sont des objets sphériques de taille submicronique et sont capables d'être prises en charge efficacement au niveau des muqueuses[158, 418]. Elles permettent donc d'une part de libérer progressivement l'Ag qu'elles contiennent, permettant d'envisager une administration muqueuse (Article N°2). D'autre part, les NPs de PLA favorisent la phagocytose par les CPAs de l'Ag qu'elles vectorisent[397]. Ces capacités de vectorisation et de biodégradabilité en font des candidats très intéressants pour le développement de vecteurs de vaccination inducteurs de réponses immunitaires muqueuses.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à la muqueuse intestinale qui constitue le compartiment le plus important du système immunitaire, à la muqueuse orale capable d'induire des réponses immunitaires génitales[91], mais aussi à l'administration parentérale par voie sous-cutanée et intradermique, plus classiquement utilisées en vaccination humaine et potentiellement capables d'induire des réponses muqueuses (cf. partie 1.3.1).

Pour bien comprendre les mécanismes d'action d'un adjuvant au niveau des muqueuses, il est important de comprendre comment ce dernier traverse les barrières épithéliales et comment il permet le passage de l'Ag co-délivré. Il convient également de comprendre avec quel(s) type(s) cellulaire(s) cet adjuvant interagit dans la muqueuse.

Dans ce but, nous avons pu bénéficier de nos collaborations avec Nicolas Rochereau (GIMAP de Saint-Etienne) et Odile Damour (Banque de tissus et de cellules – Hôpital E. Herriot de Lyon) afin d'avoir accès à des modèles d'épithéliums intestinaux associés aux follicules (FAE) et à des muqueuses orales reconstruits *in vitro* afin d'étudier le transport des NPs de PLA vectorisant un Ag vaccinal.

En plus de caractériser la capture des NPs par les cellules de la barrière épithéliale ou de la *lamina propria*, nous souhaitions étudier l'influence de l'environnement muqueux sur cette capture. L'étude de Primard *et al.*[158] a démontré un passage efficace des NPs de PLA au niveau des plaques de Peyer *via* les cellules M. Nous avons souhaité étudier un autre mode de prise en charge assuré par les DCs. Au niveau des villosités, les DCs sont en effet capables d'émettre des pseudopodes entre les cellules épithéliales afin de sonder les micro-organismes présents dans la lumière[34].

Pour cela, plutôt que des études *in vitro*, nous nous sommes concentrés sur des études réalisées *in vivo* chez la souris. Ce modèle animal, disponible au laboratoire PHTA de l'université Joseph-Fourier de Grenoble[34], présente l'avantage d'être bien caractérisé et de proposer des animaux

génétiquement modifiés comme la lignée de souris transgéniques CX3CR1^{GFP+}. Dans cette lignée, les cellules qui portent le récepteur à la chimiokine CX3CR1, expriment la protéine fluorescente verte GFP et notamment les DCs. Pour éviter la dilution des particules dans l'intestin, ce qui limiterait leur observation, la technique d'anse intestinale ou « ligated loop » a été utilisée[158].

Les voies parentérales restent à ce jour très intéressantes en termes d'immunogénicité systémique et muqueuse (partie 1.3.1). Nous nous sommes donc intéressés, dans cette étude, au transport des NPs de PLA au niveau des ganglions inguinaux (drainant la muqueuse vaginale), après injection sous-cutanée au niveau de l'aine. Nous avons aussi pu caractériser l'effet adjuvant des PLA-Nods-p24 après administration intradermique, sur la prolifération lymphocytaire dans les ganglions et plus particulièrement aux lymphocytes T folliculaires helper (T_{FH}). En effet, après injection intradermique, l'Ag est pris en charge par les DCs dermiques qui vont migrer dans les ganglions drainants où elles vont activer la différenciation des LT naïfs en T_{FH}. Ces derniers vont ensuite migrer dans les centres germinatifs où ils vont induire la différenciation des LB en stimulant l'expression de Bcl6 et en fournissant les signaux de survie (CD40L, IL-4, IL-21, PD-1 et BAFF) et de prolifération (CD40L et IL-21)[419]. Nous avons donc étudié l'augmentation du nombre de T_{FH} totaux dans les ganglions, ainsi que les T_{FH} présents dans les centres germinatifs (GC T_{FH}).

Ce travail nous a donc permis d'étudier la capacité des NPs de PLA à délivrer efficacement un Ag vaccinal dans différents modèles de muqueuses reconstruites *in vitro* et par voies parentérale et muqueuse *in vivo* afin de mieux comprendre les résultats observés au cours de mes travaux.

4.2. MATERIELS ET METHODES

4.2.1. Elaboration de nanoparticules de PLA fluorescentes

La mise au point de NPs fluorescentes par l'équipe, nous a permis de suivre *in vivo* et *in vitro* le devenir de ces dernières, notamment au niveau du transport et de leur prise en charge dans différents tissus ou cellules.

Pour une bonne incorporation du fluorophore dans le cœur hydrophobe des particules de PLA, les marqueurs fluorescents ont été sélectionnés en fonction de leurs propriétés d'hydrophobicité. L'équipe utilise aujourd'hui divers fluorophores en fonction de l'application désirée. Lors de ma thèse, je me suis essentiellement servi du fluorophore CellTrace™ BODIPY® TR methyl ester (Invitrogen) ayant une longueur d'onde d'émission dans le rouge (616 nm) (Figure 4.1).

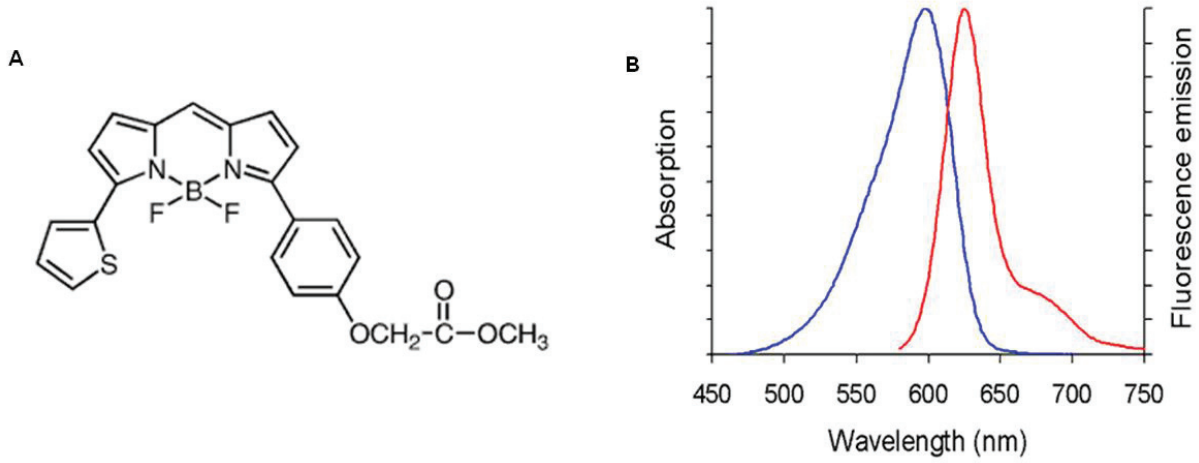


Figure 4.1 – Caractéristiques du CellTrace™ BODIPY® TR methyl ester. (A) Formule développée du CellTrace™ BODIPY® ; (B) Absorption et émission fluorescente du CellTrace™ BODIPY®.

L'élaboration des NPs de PLA fluorescentes a été réalisée comme précédemment décrit[158, 397]. Le PLA est dissout dans une solution d'acétone à 2 % w/v pendant une heure dans un flacon en verre bouché. Le fluorophore (0,2 % w/v PLA) est ajouté à cette solution, toujours sous agitation magnétique et incubé encore une heure pour homogénéisation. Le mélange PLA-acétone-fluorophore est ensuite coulé dans la phase aqueuse (60 % d'eau et 40 % d'éthanol). Les solvants sont ensuite évaporés sous vide. Pendant toute l'opération de dissolution du polymère avec le fluorophore et pendant l'évaporation des solvants, la solution est conservée à l'abri de la lumière.

Les particules fluorescentes sont ensuite conservées dans un flacon en verre brun à 4°C.

4.2.2. Modèle d'épithélium intestinal associé aux follicules (FAE) reconstruit in vitro

Plusieurs publications décrivent la reconstruction *in vitro* de FAE intestinaux humains simplifiés, incluant des cellules M et utilisant des lignées de cellules épithéliales intestinales[420]. Dans ce type de modèle, les cellules Caco-2 (lignée de cellules d'adénocarcinome colique humain qui présentent des caractéristiques d'entérocytes matures) sont cultivées sur des filtres permettant la formation d'une monocouche étanche et polarisée. L'apport dans le compartiment basolatéral de lymphocytes murins extraits de PP permet la différenciation d'entérocytes en cellules « M-like », reflétant ainsi partiellement la formation d'un épithélium intestinal. Plusieurs études ont montré que des co-cultures de monocouches de Caco-2 avec la lignée lymphocytaire B humaine Raji du côté basolatéral, amélioraient nettement la différenciation des Caco-2 en cellules M[421]. Néanmoins, un contact direct des Rajis au niveau basal des Caco-2 ne paraît pas obligatoire pour induire cette différenciation[422]. En plus des similitudes fonctionnelles, la co-culture de cellules « M-like » est comparable aux cellules M *in vivo* par la diminution de l'expression de la phosphatase alcaline et l'augmentation de l'expression du CA19.9 et de l'intégrine β1. Ce modèle a donc été couramment utilisé dans la littérature pour différents essais de transport[422, 423].

Etablissement du modèle de FAE reconstruit

La capacité de transport des NPs de PLA a été évaluée dans un modèle *in vitro* de FAE intestinal humain. Le modèle *in vitro* de FAE intestinal humain (Figure 4.2.) a déjà été reporté par Rieux *et al.* en 2007[424]. Des inserts inversés Transwell® en polycarbonate (12 wells, pore diameter of 3.0 µm, Corning) sont coatés avec du Matrigel™ (BD Biosciences), permettant d'obtenir une membrane matricielle préparée dans du DMEM à une concentration finale de 100 µg/ml après 1 heure à température ambiante. La solution de coating est éliminée et les Transwells® lavés avec 300 µl de DMEM. Les cellules Caco-2 (3.10^5) resuspendues dans 300 µl de DMEM complet sont déposées sur l'insert et incubées sur la nuit. Les inserts sont ensuite retournés et placés dans des plaques de culture 12-puits et incubés pendant neuf jours. Les cellules Raji B (5.10^5) en suspension dans le DMEM, sont ensuite ajoutées au niveau basolatéral des cellules Caco-2 et la co-culture incubée pendant cinq jours. Des mono-cultures de cellules Caco-2, mises en culture comme ci-dessus, sont utilisées comme contrôles. Enfin, les inserts sont retournés en plaque 6-puits et un tube de silicone (14 x 20 mm, Labomoderne) est placé au niveau du côté basolatéral de chaque insert.

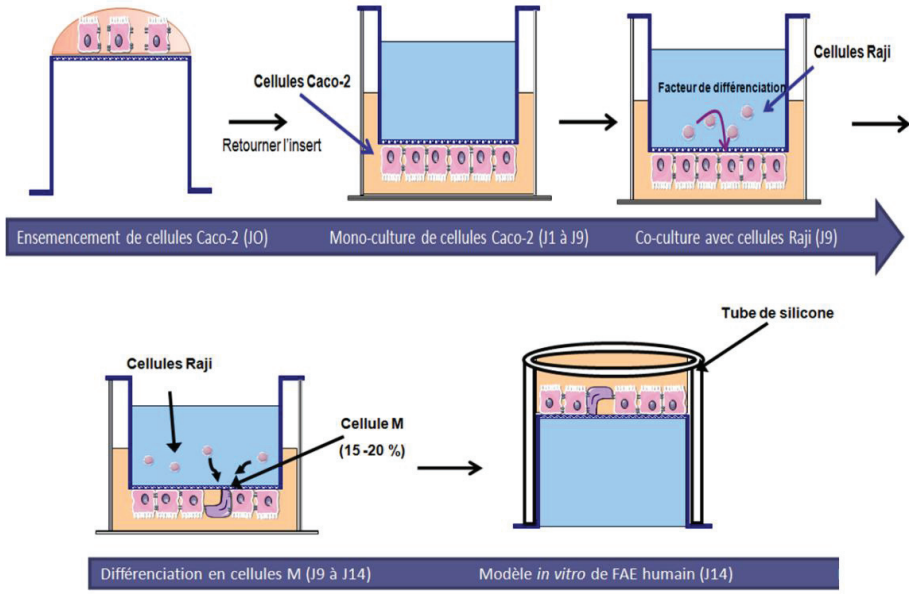


Figure 4.2. - Représentation schématique des différentes étapes permettant d'obtenir une mono-couche de cellules Caco-2 contenant des cellules M-like.

L'intégrité de la monocouche de cellules (co- et mono-culture) est ensuite contrôlée par mesure de la résistance trans-épithéliale (TEER) à l'aide d'une chambre Endohm™ tissue resistance (Endohm-12, World Precision Instruments) connectée à un Millicell®-ERS Ohmmeter (Millipore).

La résistance du milieu seul (9 Ω x cm^2) étant utilisée comme bruit de fond de la résistance et soustrait aux valeurs de TEER. La fonction de barrière des jonctions serrées a aussi été analysée par marquage avec du zonula occludens-1 (ZO-1).

La présence de cellules M a pu être mise en évidence par microscopie électronique en transmission (MET) et microscopie électronique à balayage (MEB). Les mono- et co-cultures sont lavées deux fois en HBSS et fixées dans du formaldéhyde 4 %. Des coupes des cellules en culture sur les filtres ont ensuite été faites pour des observations en MET. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope Hitachi H-800 et d'une Digital camera Hamamatsu AMT XR40. Concernant l'analyse en MEB, les échantillons ont été déshydratés, séchés et coatés avec de l'or. Les images de la monocouche ont été obtenues avec Thermo Noran Quest 2 L Hitachi S 3000N. L'aspect morphologique des cellules sans microvillosité (spécifique des cellules M) a été utilisé pour identifier et quantifier ces cellules en MEB. Les mono-cultures ont été utilisées comme contrôles. La caractérisation et la quantification des cellules M en co-culture a aussi été vérifiée par immuno-marquage. Les inserts ont été lavés en HBSS afin d'éliminer le milieu résiduel, incubés dans du paraformaldéhyde (PFA) 4 % pendant 30 min et saturés en PBS 5% FBS pendant 15 min à température ambiante. Les immuno-marquages ont été réalisés en utilisant une combinaison de GFP-IgA2, anti-humain ZO-1 mAb (InvitroGen) et un Ac souris anti-CA19.9 humain (Dako)[425]. Chaque réactif a été dilué au 1/100 et incubé 2 h à température ambiante. Après deux lavages, les inserts ont été séchés, montés avec du Fluoprep (BioMerieux) et observés en microscopie à fluorescence (Eclipse Ti, Nikon).

Transport des NPs dans le modèle de FAE intestinal reconstruit

Le transport des NPs fluorescentes (BODIPY) d'environ 200 nm de diamètre a été évalué en milieu HBSS. 2.10^{10} NPs nues ou coatées avec l'Ag p24 ou gp140 ont été déposées sur le côté apical de la muqueuse reconstruite (~ 400 µl) et les inserts incubés à 37°C pendant 90 min. Les milieux basolatéraux sont ensuite récupérés et le nombre de particules mesuré en cytométrie en flux (Facs Calibur, Becton Dickinson).

4.2.3. Muqueuse orale reconstruite (MOR) in vitro (collaboration : O. Damour & B. Kinikoglu)[426]

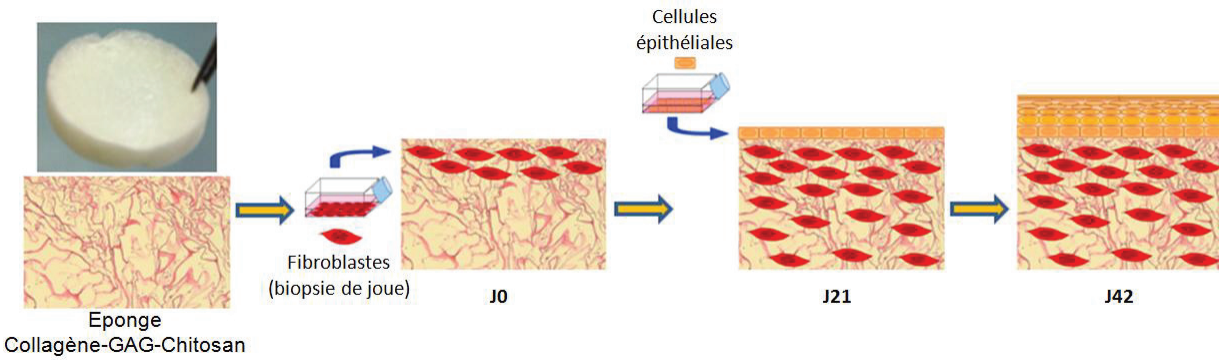


Figure 4.3 - Représentation schématique des différentes étapes permettant d'obtenir une muqueuse orale reconstruite.

Origine, isolation et culture des cellules épithéliales

Les cellules épithéliales ont été isolées à partir de biopsies de muqueuses orales humaines au niveau de la joue (non kératinisée). Les biopsies sont ensuite coupées en petits morceaux afin de faciliter l'action des enzymes utilisées par la suite. La séparation de l'épithélium et de la *lamina propria* est réalisée avec de la dispase (GIBCO), 10 mg/ml pendant 3 h à 4°C. Après séparation, l'épithélium est traité avec de la trypsine 0,5 g/l-EDTA 0,2 g/l pendant 20 min afin d'extraire les cellules. Les cellules épithéliales sont ensuite mises en culture à 8000 – 10 000 cellules/cm^2 sur des cellules fibroblastiques humaines (irradiées) dans un milieu spécial : DMEM-Ham-F12 2,78/1 (Sigma), 10 % FCS (Hyclone), 0,4 µg/ml hydrocortisone (Upjohn), 0,12 UI/ml insuline (Umuline, Lilly), 0,033 µg/ml sélénium (Laboratoire Aguettant), 0,4 µg/ml isoprenaline hydrochloride (Isuprel, Sterling Winthrop), 2×10^{-9} M tri iodo thyronine (Sigma), 10 ng/ml epidermal growth factor (Austral Biologicals), et antibiotiques. Les cellules sont ensuite mises en culture sur l'éponge après trois passages.

Origine, isolation et culture des fibroblastes

Les fibroblastes sont isolés à partir de la même biopsie que les cellules épithéliales. Après séparation de l'épithélium et de la *lamina propria*, l'isolation a été réalisée avec de la collagénase A (Roche Diagnostics), à 0,1 U/ml pendant 20 min à 37°C sous agitation. Le produit de digestion est ensuite passé à travers un filtre de 70 µm (BD Biosciences). Cette procédure est répétée six fois et le produit de digestion immédiatement placé en culture (mono-stratifée) à une densité de 10 000 cellules/cm^2 dans un milieu composé de DMEM, 10 % NCS (Newborn Calf Serum) et antibiotiques. Le milieu est changé tous les deux jours jusqu'à obtenir une culture à confluence. Les cellules sont ensuite resuspendues (trypsine-EDTA), amplifiées et mises en culture sur la matrice à P3.

Préparation de l'équivalent lamina propria

L'équivalent de la *lamina propria* (LP) consiste en une éponge constituée de Collagène-GlycosAminoGlycan (GAG)-chitosan (French patent 8708252, 1987. European patent 884101948, 1988. US patent PCT/FR/8800303;1989) dans laquelle les fibroblastes sont mis en culture. L'équivalent de LP est préparé par ajout de la suspension de fibroblastes à la surface de l'éponge ($2{,}5.10^5$/cm^2). L'ensemble est ensuite mis en culture pendant 21 jours dans un milieu composé de DMEM, 10 % FCS, 10 ng/ml epidermal growth factor, 50 µg/ml d'acide ascorbique (Bayer). Le milieu de culture est changé de manière journalière jusqu'à ensemencement des cellules épithéliales.

Préparation de la couche épithéliale de la muqueuse

Les cellules épithéliales sont ajoutées sur la LP équivalent à une concentration de $2{,}5.10^5$ cellules/cm^2. L'ensemble est ensuite cultivé de manière submergée dans le milieu des cellules épithéliales supplémenté avec 50 µg/ml d'acide ascorbique pendant sept jours. Ensuite, les muqueuses sont élevées en interface air-liquide pendant les quatorze derniers jours dans un nouveau milieu : DMEM-Ham-F12 2,2/1 (Sigma), 8 mg/ml BSA, 0,4 µg/ml hydrocortisone (Upjohn), 0,12 UI/ml insuline (Umuline, Lilly), 50 µg/ml d'acide ascorbique (Bayer), et antibiotiques.

Histologie

Les muqueuses sont fixées en PFA 4 % puis stockées en paraffine. Des coupes de 6 µm sont ensuite réalisées puis un marquage utilisant l'hématoxyline-phloxine-safran (HPS) est réalisé afin de distinguer les différentes structures : collagène (jaune orangé), cellules épithéliales (rose), cytoplasme (rose), noyaux (bleu).

Des observations en microscopie à fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un microscope Zeiss Axiovert 100 Minverted, afin d'observer la répartition des NPs-BODIPY-p24 dans la muqueuse. Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel MetaMorph v6.0.

Transport des NPs dans le modèle de MOR (Figure 4.4.)

Le transport des NPs fluorescentes (BODIPY) formulées avec de la p24 (~ 200 nm de diamètre) a été évalué. 2.10^{10} NPs ont été déposées sur le côté apical de la muqueuse reconstruite (~ 50 µl) et les inserts incubés à 37°C pendant 12h, 24h et 48h. Les milieux basolatéraux sont ensuite récupérés et le nombre de particules ayant traversé, évalué par ELISA anti-p24.

Nous avons, en parallèle, utilisé un gel de chitosane élaboré par Franck Gaudin, dans lequel les NPs de PLA ont été mises en suspension. Le chitosane est en effet connu pour sa capacité à ouvrir les jonctions serrées entre les cellules épithéliales[427]. Il semblait donc intéressant d'utiliser ces propriétés, afin de favoriser le passage des NPs de PLA au niveau de la muqueuse orale reconstruite.

Le gel de chitosane est élaboré par complexation polyelectrolyte, chitosane-sulfate de dextrane R= 2. Un millilitre de PLA-BODIPY-p24 est ensuite ajouté dans le gel et mis sous agitation pendant 15 min. Une évaporation au rotavapor est ensuite réalisée à 31°C pendant 7h avec diminution progressive de la pression de 250 mbar à 5 mbar.

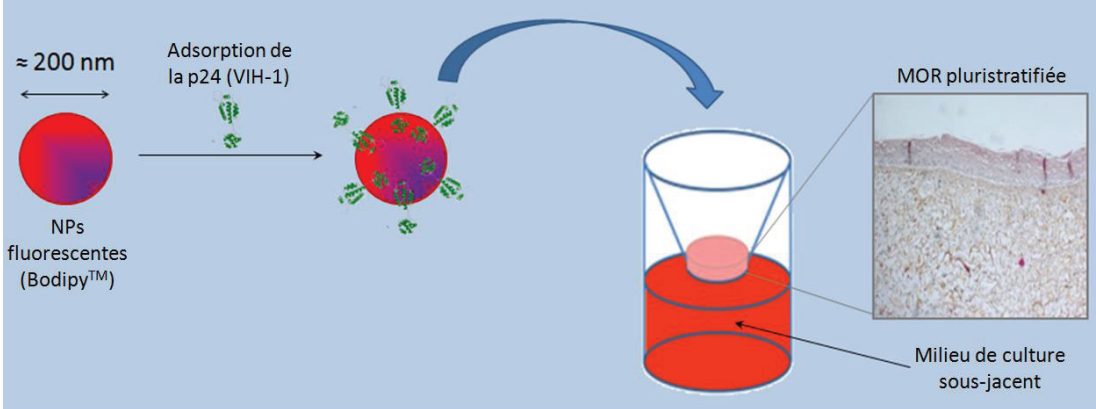


Figure 4.4. - Etude du transport des nanoparticules de PLA-p24 fluorescentes au travers d'une muqueuse orale reconstruite.

Dosage ELISA des NPs de PLA-p24

Les milieux de cultures sous-jacents des MOR sont récupérés et testés en ELISA anti-p24 afin de quantifier les NPs-p24 ayant traversé la MOR après 12h, 24h et 48h d'incubation.

Un millilitre des milieux de culture est centrifugé à 5000 x g afin de culotter les NPs potentiellement présentes. Les culots sont repris dans 220 µl de PBS et l'ELISA réalisé en déposant 100 µl/puits d'échantillon (en doublet).

Matériel :

Plaques 96 puits maxisorp, Nunc
Tween 20 Euromedex # 2001-B
BSA Sigma # A 3912
Anticorps Goat Anti-p24 3D10G9 et 23A5G4

Protocole :

Des plaques 96 puits (maxisorp, Nunc) sont incubées sur la nuit à température ambiante avec les Ac anti-p24 3D10G9 et 23A5G4 à 10 µg/ml chacun en PBS (100 µl/puits). Le lendemain, les plaques sont saturées avec 250 µl de PBS-sérum de cheval 10 % (incubation 1h à 37°C), puis lavées trois fois en PBS-tween 20 0,05 %.

Les sous-nageants de culture sont déposés purs (100 µl/puits) et les plaques sont incubées une heure à 37°C. Les plaques sont lavées trois fois en PBS-tween 20 0,05 %.

Les Ac de lapin anti-p24 biotinylés dilués au 1/50 en PBS-Tw-sérum de cheval 10% sont ensuite ajoutés (100 µl/puits) et les plaques sont mises à incuber 1h à 37°C.

Les plaques sont lavées à nouveau trois fois en PBS-tween. Le conjugué streptavidine-peroxydase (hrp) est ensuite ajouté (100 µl/puits) dilué au 1/20 000 en PBS-Tw-sérum de cheval 10 %. Ce dernier va se coupler à la biotine de l'Ac secondaire (incubation 30 min à 37°C). Les plaques sont lavées une dernière fois et le TMB, substrat de la peroxidase, est ajouté (100 µl/puits) et incubé

30 min à température ambiante dans l'obscurité. La révélation est stoppée avec l'ajout de 100 µl d'acide sulfurique 1N par puits. La densité optique est ensuite mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque à 450 nm par rapport à un filtre de référence de 620 nm.

En parallèle, une gamme de PLA-p24 est réalisée entre 0.06 ng/ml et 10 µg/ml (8 points), afin de pouvoir quantifier les NPs-p24 présentes dans le milieu de culture.

4.2.4. Biodistribution au niveau de la muqueuse intestinale in vivo

Animaux

Afin de pouvoir observer les cellules phagocytaires mononucléées intestinales potentiellement capables de détecter et de prendre en charge les NPs de PLA, nous avons utilisé des souris hétérozygotes pour le gène codant le récepteur à chimiokine CX3CR1 (*cx3cr1*) remplacé par l'ADNc de la GFP (Green Fluorescente Protéine)[428]. Dans ce modèle de souris (souche B6.129P-Cx3cr1^{tm1Litt}/J), l'expression de la GFP est sous le contrôle du promoteur CX3CR1 et par conséquent, les souris hétérozygotes (*cx3cr1*$^{GFP/+}$) expriment à la fois le récepteur et la GFP. L'expression de la GFP peut donc être utilisée pour identifier les cellules exprimant ce récepteur à chimiokines. Il a été démontré que la GFP et le CX3CR1 étaient exprimés par les monocytes circulants et par les cellules différenciées à partir de ces monocytes dans les tissus et notamment les DCs[429]. Le choix de l'utilisation d'une souche de souris hétérozygotes pour la GFP a été fait car les cellules de ces souris, contrairement aux homozygotes (*cx3cr1*$^{GFP/GFP}$), expriment le récepteur CX3CR1 et sont donc encore capables d'émettre des pseudopodes[430].

Les animaux sont hébergés au PBES à l'ENS de Lyon (http://www.ifr128.prd.fr/PBES.htm).

Protéine p24 et particules de PLA fluorescentes

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

Les particules de PLA fluorescentes (BODIPY®) coatées avec l'Ag Gag p24 sont élaborées de façon « stérile » : l'ensemble de la verrerie est prélavée à l'éthanol (*Matériel et Méthode* sections 4.2.1). Après élaboration, la stérilité des lots de particules est vérifiée en étalant à la flamme d'un bec bunzen environ 100 µl de particules sur une boîte de pétri contenant de l'agarose sans antibiotique. Une boîte sert de contrôle, sur laquelle du PBS stérile est étalé. Après 24h à l'étude à 37°C, on vérifie l'absence de micro-organisme. De plus, un dosage d'endotoxine peut être réalisé à partir du lot de particules (test LAL – Charles River).

Modèle d'anse intestinale in vivo

Les souris sont mises à jeun pendant une nuit, l'eau restant à disposition. Les souris sont hébergées pendant cette période dans une cage conventionnelle sur une grille rehausseur, afin qu'elles ne se nourrissent pas de leurs fèces.

Les souris sont anesthésiées par un mélange de kétamine-xylazine injecté en intrapéritonéal.

Protocole d'anesthésie : préparer un mélange 75 mg Kétamine (solution stock : 50 mg/ml) + 7,5 mg Xylazine (solution stock : 20 mg/ml) dans 3,125 ml NaCl 0,9 %. Contentionner l'animal et faire une injection en intrapéritonéale : (100µl pour une souris de 20 g ; soit 100 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine). L'animal est anesthésié au bout d'environ 5 min et l'anesthésie dure au moins une heure.

Préparation de l'anse intestinale : la souris est immobilisée sur une feuille de papier absorbant, et placée sous une lampe chauffante. Asperger l'abdomen avec de l'éthanol 70 %, faire une incision la plus petite possible sur la peau et le péritoine. Sortir environ 1,5 cm d'intestin, repérer une plaque de Peyer et ligaturer l'intestin de chaque côté de cette plaque avec du fil de suture (anse de 1 cm minimum, en évitant de casser les vaisseaux lymphatiques et sanguins). Injecter environ 100 µl de la solution de NPs fluorescentes coatées avec de la p24 et rentrer l'intestin dans l'abdomen. Suturer le péritoine, puis la peau (pose d'agrafes pour des cinétiques longues, pour que les souris ne déchirent pas les points de suture à leur réveil). Placer la souris sur un tapis chauffant à 37°C.

Pendant la durée de la chirurgie, nous veillerons à ne pas laisser les muqueuses de l'animal (intestins, yeux) se dessécher, en les humidifiant régulièrement par du PBS 1X.

En fin de cinétique, sacrifier les souris par dislocation cervicale. L'anse intestinale est prélevée, rincée en PBS, ouverte en deux longitudinalement et les villosités prélevées à l'aide d'une lame de scalpel en grattant délicatement la surface. Les villosités sont directement déposées sur une lame pour observation directe en microscopie à fluorescence.

4.2.5. Biodistribution des NPs au niveau des ganglions lymphatiques inguinaux in vivo

Animaux

Les mêmes souris CX3CR1$^{GFP/+}$ que dans la section 4.2.4. ont été utilisées pour ces expérimentations.

Protéine p24, particules de PLA fluorescentes et hydroxyde d'aluminium (Alum)

Les NPs fluorescentes coatées avec l'Ag p24 ont été préparées de la même manière que dans la section 4.2.4.

Afin d'étudier la biodégradabilité des NPs de PLA en comparaison à l'hydroxyde d'aluminium (Alum) nous avons injecté une souris avec une formulation d'Imject® Alum (Pierce/ThermoScientific) formulé avec de la p24 (ratio 1:1) (Cf article N°1).

Injection et prélèvement des ganglions lymphatiques inguinaux

Administration de 10 µg de p24 adsorbée à la surface des particules fluo (~ 180 nm) dans 100 µl de PBS en sous-cutanée au niveau de l'aine, à l'aide d'une seringue à insuline Terumo U-100. Les souris sont ensuite remises en cage pendant 48h avant d'effectuer les prélèvements.

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. La peau incisée est décollée et les ganglions lymphatiques inguinaux prélevés (Figure 4.5.). Les ganglions sont ensuite fixés en les plongeant dans une solution de PFA 3 % pendant deux heures à 4°C, puis sont inclus dans de l'OCT et congelés à -80°C.

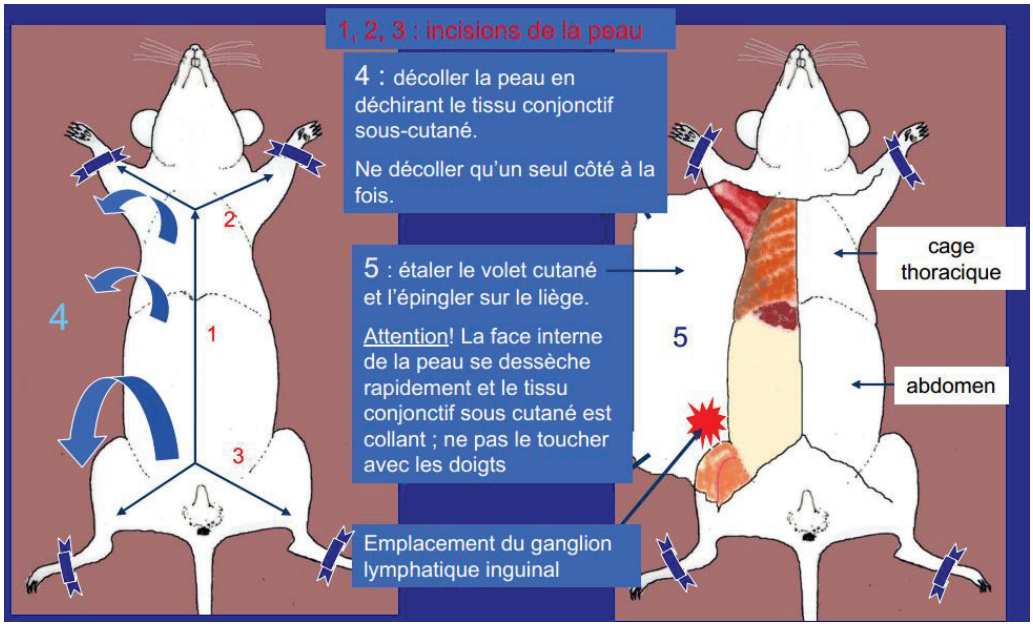


Figure 4.5. – Schéma représentatif des différentes étapes pour le prélèvement des ganglions inguinaux chez la souris.

Coupes des ganglions lymphatiques mésentériques au cryostat

Les ganglions sont fixés après prélèvement dans du PFA 3 % pendant deux heures à 4°C. Ils sont inclus dans du milieu de congélation OCT et congelés à -80°C. Ils sont ensuite conservés à cette température jusqu'aux coupes au cryostat.

Les cryocoupes ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica) réfrigéré à -20°C. Les coupes de 6 µm d'épaisseur sont déposées sur des lames superfrost (VWR) et conservées congelées jusqu'à l'observation en microscopie de fluorescence.

4.2.6. Administration intradermique des NPs de PLA-Nods (collaboration : C. Nuttens & B. Combadière – Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris)

Injection intradermique dans l'oreille (ID)

La solution est injectée avec une seringue à insuline (U-200) et un volume final de 20 µl par oreille. Une bulle d'injection se forme si l'administration est réussie. Trois souris par groupe sont injectées avec 10 µg de p24 adsorbée sur les particules de PLA-Nod (10 µg/souris). En parallèle, trois souris sont injectées avec du PBS (contrôle négatif) ou 40 µg de PLA-p24 (contrôle positif).

Prélèvements des ganglions et numération cellulaire

Les deux ganglions parotidiens (drainant les oreilles – Figure 4.6.) sont prélevés et broyés sur filtre dans un tube 50 ml Falcon. Les filtres sont ensuite lavés avec 10 ml de PBS-1 % SVF et les broyats centrifugés 5 min à 1000 x g et re-suspendus dans 1 ml de milieu (PBS-1 % SVF). Les cellules sont ensuite numérées en bleu trypan.

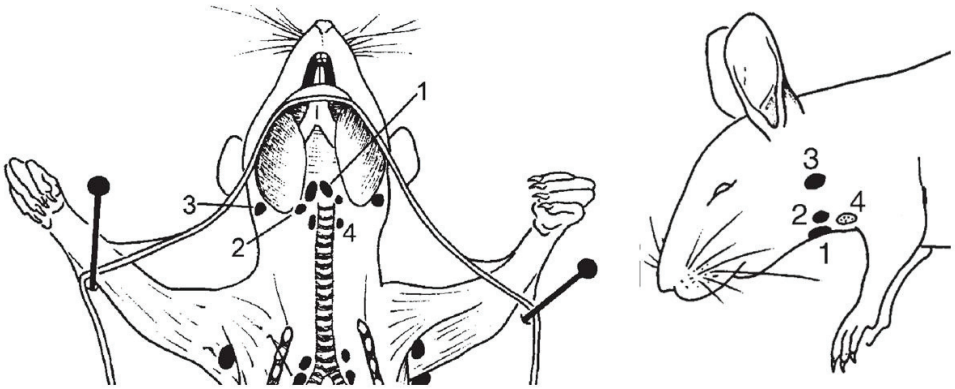


Figure 4.6. - Localisation des ganglions chez la souris. Ganglions lymphatiques (1) mandibulaires, (2) mandibulaires accessoires, (3) parotidiens, (4) cervicaux[431].

Polarization T folliculaire helper (T_{FH})

Après migration des DCs dans les ganglions drainants, ces dernières vont activer la différenciation des LT naïfs en T_{FH} qui vont migrer vers les centres germinatifs où ils vont induire la différenciation des LB. Nous nous sommes donc intéressés à l'augmentation du nombre de T_{FH} totaux ($CD4^+$; $CXCR5^+$; $PD1^+$) dans les ganglions, ainsi que les T_{FH} présents dans les centres germinatifs (GC T_{FH} : $CD4^+$; $CXCR5^+$; PD1hi).

Après sept jours post-injection, les ganglions sont prélevés et traités comme précédemment décrit. Les cellules sont ensuite marquées à l'aide d'anticorps anti-CD4, anti-CXCR5 et anti-PD1 afin de quantifier les lymphocytes T_{FH} et GC T_{FH} par analyses en cytométrie en flux.

4.3. RESULTATS

4.3.1. Epithélium intestinal associé aux follicules (FAE) reconstruit in vitro

Caractéristiques du modèle in vitro de FAE intestinal humain

Le modèle a été adapté par Nicolas Rochereau (GIMAP) comme décrit dans la section *Matériels et Méthodes* afin d'optimiser sa reproductibilité. Avant d'ajouter les lymphocytes B (lignée Raji), l'intégrité de la monocouche de cellules Caco-2 a été vérifiée par mesure de la TEER. Une diminution de la résistance est observée après cinq jours de co-culture indiquant une conversion des cellules Caco-2 en cellules M[432] (Figure 4.6. A) sans toutefois induire la détérioration des jonctions serrées, comme démontré par la préservation de l'immunomarquage ZO-1 (Figure 4.6. B) des mono- ou co-cultures.

Les cellules M présentent naturellement une bordure en brosse réduite du côté apical, ainsi qu'une membrane basolatérale invaginée, formant une poche dans laquelle les lymphocytes et les DCs viennent se loger *in vivo*[433]. Les observations en MET montrent que la mono-culture de cellules Caco-2 présente une bordure en brosse bien développée sur l'ensemble de la surface, alors qu'en co-culture avec les cellules Raji, des cellules M, caractérisées par un effacement des microvillosités, sont présentes (Figure 4.6. C). De plus, la présence de désmosomes entre les cellules M-like et les cellules voisines prouve leur origine entérocytaire (Figure 4.6. C). Des analyses en MEB ont permis d'observer dans les mono-cultures que toutes les cellules Caco-2 possèdent une bordure en brosse régulière, alors qu'en co-culture, approximativement 20 à 30 % des cellules Caco-2 présentent des microvillosités courtes et irrégulières (Figure 4.6. D)[421].

L'immunomarquage des cellules M-like humaines avec un Ac anti-CA19.9-PE et des entérocytes avec une léctine UEA-1-FITC (Ulex Europaeus Isoagglutinin I)[434] démontre un pourcentage de conversion similaire (Figure 4.6. E).

L'ensemble de ces données confirme que ce modèle *in vitro* de FAE intestinal humain permet une conversion efficace des cellules Caco-2 en cellules M-like (20-30 %) avec une excellente reproductibilité.

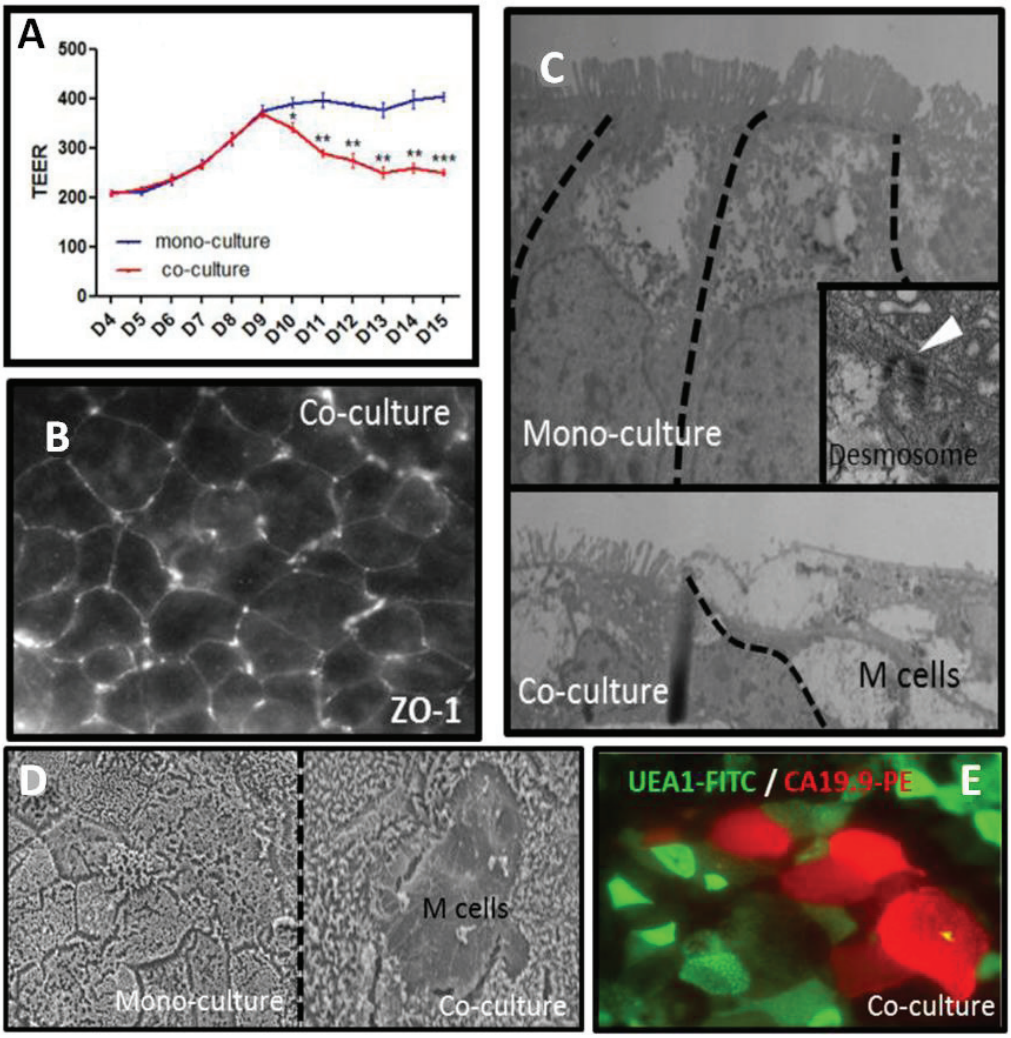


Figure 4.6. - Caractéristiques du modèle de FAE intestinal reconstruit *in vitro*. (A) La résistance trans-épithéliale (TEER) de la monocouche de cellules Caco-2 diminue progressivement pendant la conversion en cellules M-like. (B) La localisation par immunofluorescence de ZO-1 dans le modèle de co-culture montre l'intégrité des jonctions serrées entre les cellules (vue de dessus). (C) Indentification des cellules M-like par microscopie électronique en transmission (MET). Les mono-cultures présentent une forme en colonnes, ainsi qu'une bordure en brosse. En co-culture, des cellules M-like ont été identifiées par la disparition de leurs microvillosités au niveau de la surface apicale (vue de côté). (D) La présence de cellules M-like a été confirmée par microscopie électronique à balayage (MEB) par la disparition des microvillosités au niveau apical (vue de dessus). (E) Identification et localisation de cellules M-like et d'entérocytes par immunomarquage avec un Ac anti-CA19.9-PE et une lectine UEA-1-FITC respectivement (vue de dessus).

Les cellules M améliorent le passage des NPs de PLA au travers du modèle de FAE intestinal in vitro

Une des particularités des cellules M est leur capacité à transporter un large panel d'éléments depuis la lumière de la muqueuse jusque dans les follicules sous-jacents. Le transport des NPs de PLA (~ 200 nm) a été comparé entre mono- et co-culture. L'évaluation du transport a pu être réalisée par mesure de la quantité de NPs présentes dans le milieu de culture basolatéral. Comme montré dans la Figure 4.7., le transport des NPs de PLA blanches, coatées avec de la p24 ou de la gp140 au travers du FAE est significativement augmenté en présence de cellules M (x 3 en moyenne ; $P < 0{,}001$). En revanche, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre NPs blanches, -p24 ou -gp140.

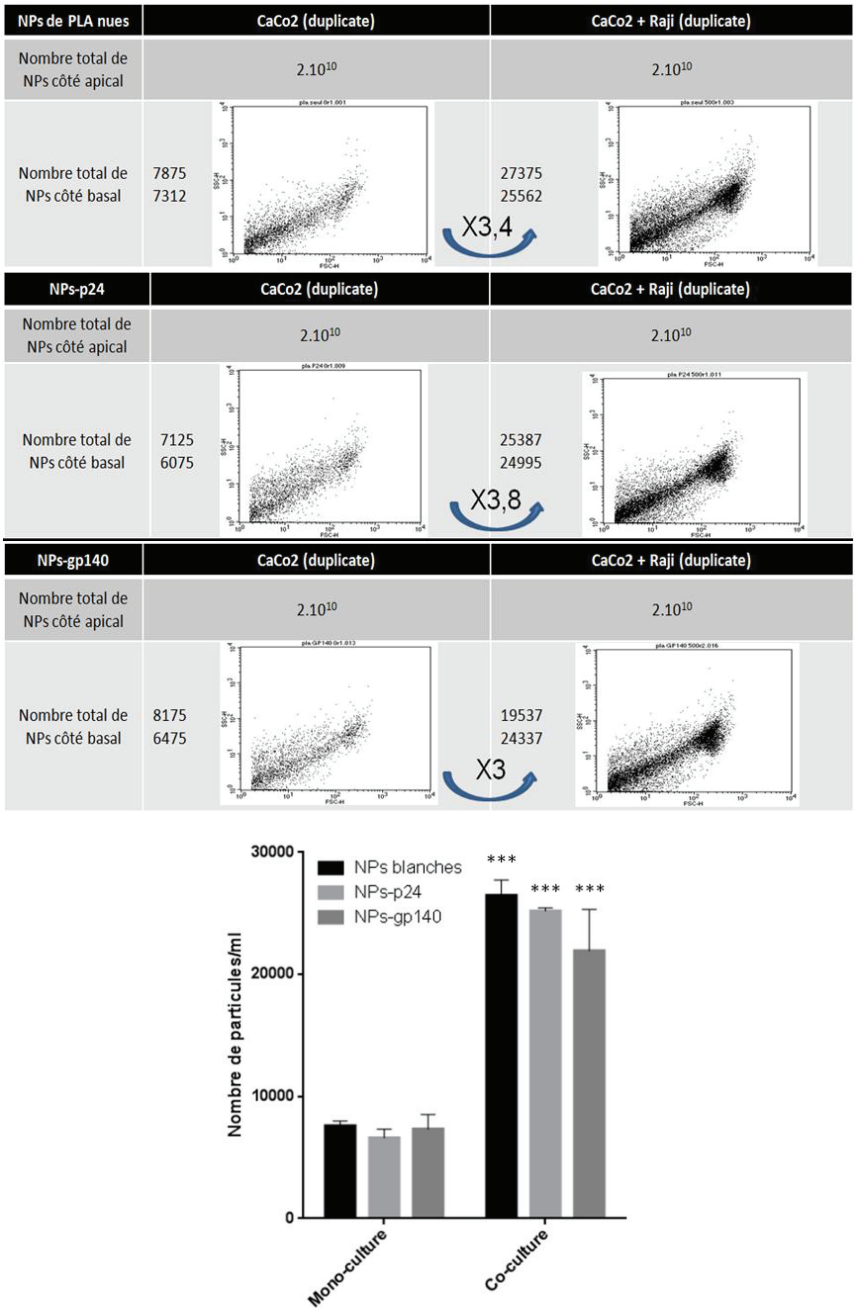


Figure 4.7. - Transport des NPs de PLA-BODIPY blanches, -p24 ou –gp140 à travers le modèle *in vitro* de FAE humaine contenant des cellules M-like. 2x10^{10} particules de PLA ont été ajoutées au pôle apical des cellules. Le transport sur mono- et co-culture a été réalisé pendant une incubation de 90 min à 37°C, et la concentration des particules transportées dans le milieu basal a été évaluée par cytométrie en flux (n = 3). (***P < 0,001).

4.3.2. Anse intestinale in vivo

Les NPs de PLA ne sont pas prises en charge au niveau des villosités intestinales par des mécanismes d'élongation de pseudopodes des DCs.

La prise en charge des NPs de PLA fluorescentes au niveau des villosités intestinales a été évaluée *in vivo* dans un modèle d'anse intestinale. Nous avons ainsi pu comparer des NPs-BODIPY formulées avec de la p24 ou sans, afin d'évaluer si la présence de cet Ag pouvait influer sur l'émission de pseudopodes par les DCs^{GFP+} situées dans les villosités.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les particules non formulées, restaient entre les villosités, sans pénétrer la muqueuse (Fig. 4.10. A). De plus, aucune formation de pseudopodes par les DCs n'a pu être mise en évidence (Fig. 4.10. B).

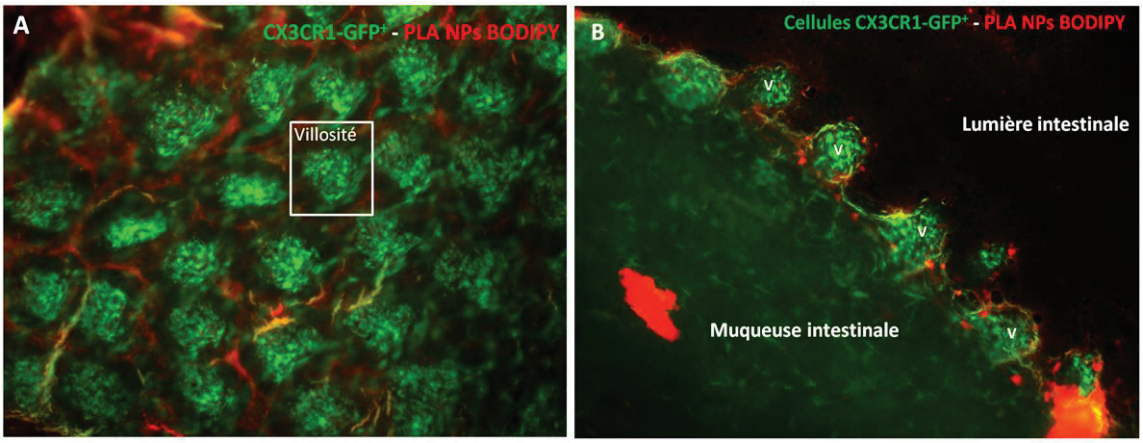


Figure 4.8. - Observations en microscopie à fluorescence de la muqueuse intestinale après incubation avec des NPs de PLA fluorescentes non formulées. (A) vue de dessus. (B) Vue de profile. Les particules semblent rester entre les villosités et aucune formation de pseudopodes n'a pu être observée. V = villosité

Les NPs formulées avec de la p24 montrent un comportement différent. En effet, nous pouvons observer sur la Figure 4.11. que les particules vont se localiser principalement au sommet des villosités sans toutefois induire l'émission de pseudopodes (Figure 4.12.).

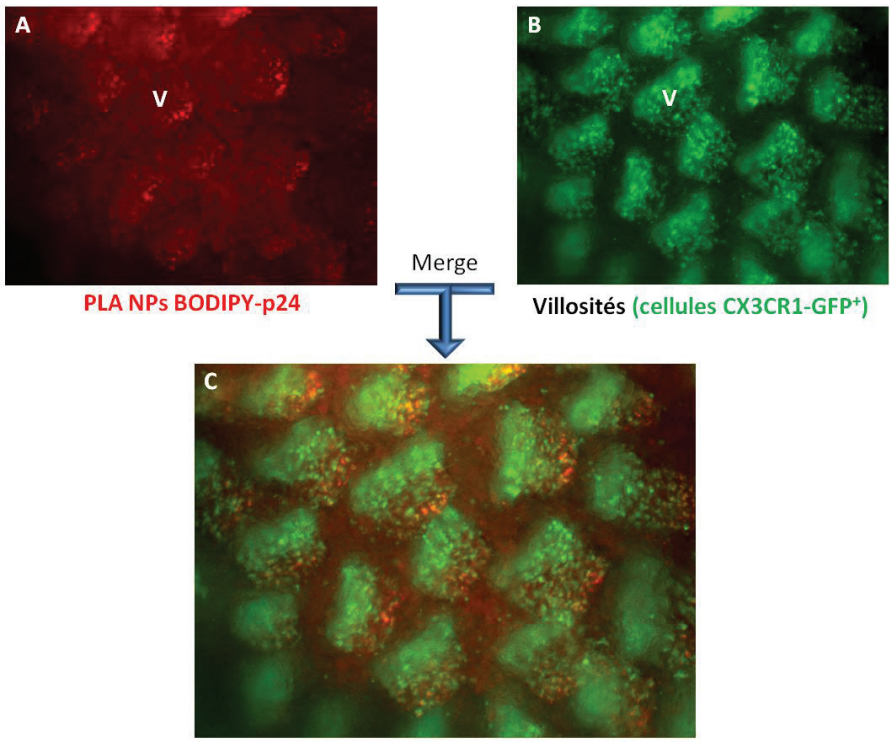


Figure 4.9. - Observations en microscopie à fluorescence de la muqueuse intestinale après incubation avec des NPs de PLA fluorescentes formulées avec de la p24 (vue de dessus). (A) Filtre rouge. (B) Filtre vert. (C) Superposition. Les particules s'accumulent au sommet des villosités, en revanche, aucune formation de pseudopodes n'a pu être observée. V = villosité.

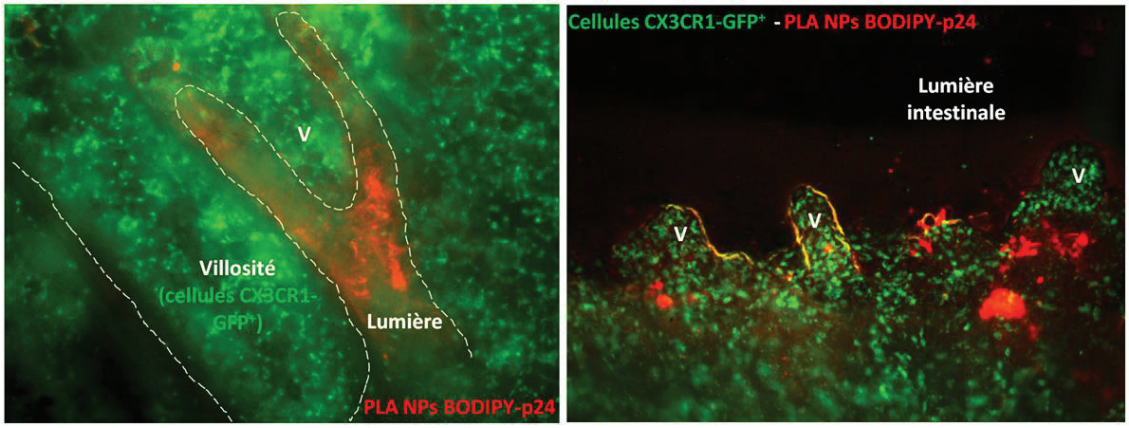


Figure 4.10. - Observations en microscopie à fluorescence de la muqueuse intestinale après incubation avec des NPs de PLA fluorescentes formulées avec de la p24 (vue de profile). Aucune formation de pseudopodes n'a pu être observée. V = villosité.

4.3.3. Muqueuse orale reconstruite (MOR) in vitro

Caractéristiques des gels de chitosane/PLA-BODIPY-p24

	Gel n°1	Gel n°2
p24	2,7 µg/ml	4,7 µg/ml
PLA	0.00994 %	0,019 %
Chitosane	1,5 %	1,42 %
NPs/ml	$2{,}75.10^{12}$	$5{,}2.10^{12}$

Transport des NPs de PLA au travers de la MOR

L'évaluation du transport a pu être réalisée par observation des coupes de MOR et par mesure de la quantité de NPs-BODIPY-p24 présentes dans le milieu de culture basolatéral, après différents temps d'incubation. Après 48h d'incubation, les muqueuses ont été récupérées et découpées au cryostat, afin d'observer la répartition des NPs-BODIPY-p24. Le marquage HPS permet de distinguer les différentes structures et de s'assurer du bon développement de la muqueuse en distinguant un nombre de couches de cellules épithéliales généralement entre 5 et 10 (Figure 4.8. A).

Les NPs de PLA fluorescentes sont retrouvées principalement au niveau de l'épiderme (flèches) (Figure 4.8. B). Il faut cependant noter que les particules étant très petites (~ 200 nm), nous ne visualisons, ici, que des amas particulaires, il se peut donc que certaines particules se trouvent au niveau de la *lamina propria* mais ne soient pas détectables en microscopie optique.

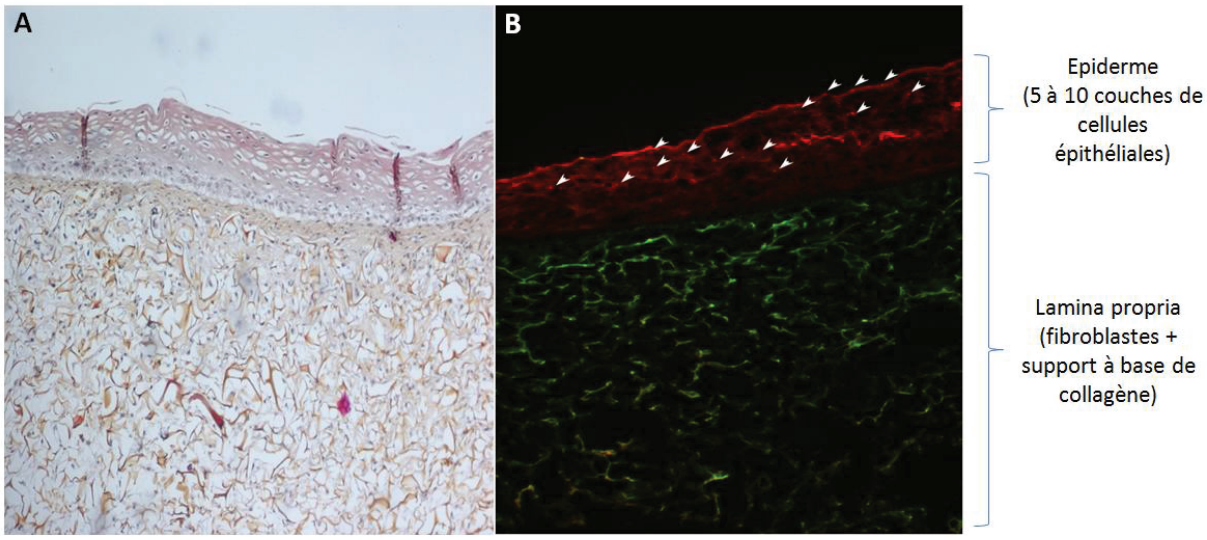


Figure 4.11. - Observation des MOR en microscopie après cryocoupes. (A) Des cryocoupes de 6 µm ont été réalisées, puis un marquage HPS est effectué, afin de distinguer les différentes structures. (B) Observation des cryocoupes en microscopie à fluorescence et localisation des NPs fluorescentes (flèches) dans l'épiderme principalement.

La quantification des NPs dans le milieu basolatéral par ELISA a permis de montrer qu'il y avait un passage des particules au travers de la muqueuse. Ce passage reste faible, environ une particule sur 10 000, mais augmente avec le temps (Fig. 4.9.).

En revanche, les NPs de PLA dispersées dans les gels de chitosan n'ont été, ni retrouvées dans la muqueuse, ni dans le milieu de culture.

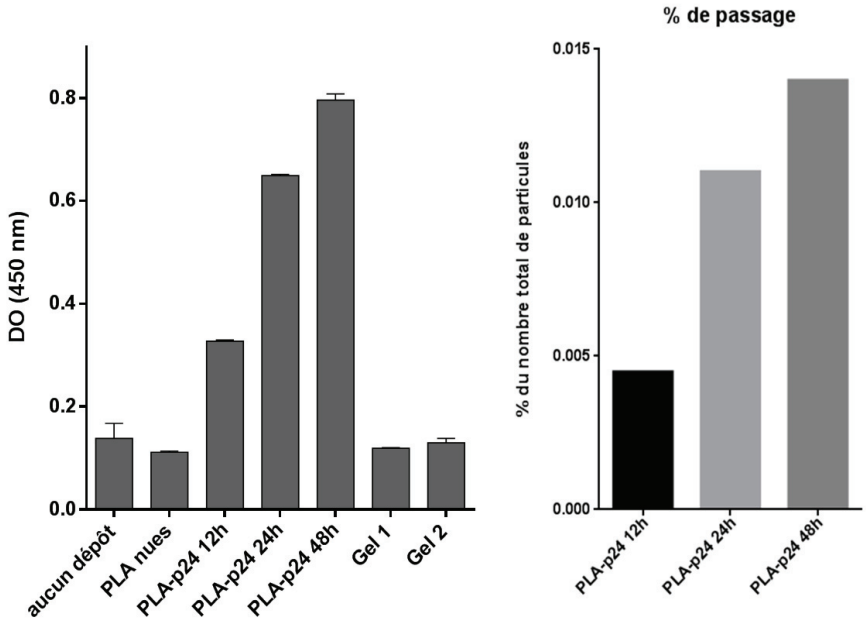


Figure 4.12. - Quantification du passage des NPs-BODIPY-p24 au travers du modèle de muqueuse orale reconstruite in vitro par ELISA. Le passage des particules augmente en fonction du temps mais reste faible, environ une particule sur 10 000 traverse la muqueuse de part en part. n = 2.

4.3.4. Biodistribution des NPs au niveau des ganglions lymphatiques inguinaux in vivo

Nous nous sommes ensuite intéressés au devenir des NPs de PLA après administration sous-cutanée au niveau de l'aine, chez la souris. Cent microlitres de NPs-BODIPY-p24 ont été administrés et les ganglions lymphatiques inguinaux prélevés après 48h.

L'observation des ganglions après cryocoupes nous a permis de mettre en évidence la présence de nombreuses particules. Ces particules ne sont cependant pas co-localisées avec les DCs^{GFP+} (Figure 4.13.), signifiant un transport de particules libres *via* le système lymphatique et/ou le sang.

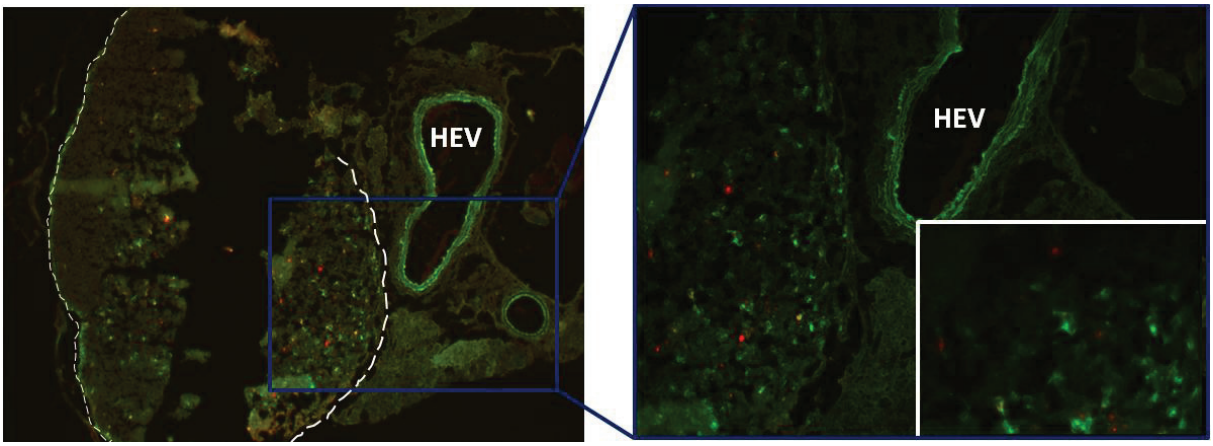


Figure 4.13. - Observations en microscopie à fluorescence d'une coupe de ganglion inguinal après administration sous-cutanée de NPs de PLA fluorescentes formulées avec de la p24. Des particules sont retrouvées en quantité importante sans toutefois, être co-localisées avec les DCs^{GFP+}.

Nous nous sommes aussi intéressés à la biodégradabilité des NPs de PLA en comparaison à l'Alum. Comme il est possible de le visualiser dans la Figure 4.13. la formulation de PLA-p24 possède une biodégradabilité beaucoup plus importante que l'Alum, démontrant une biocompatibilité plus intéressante.

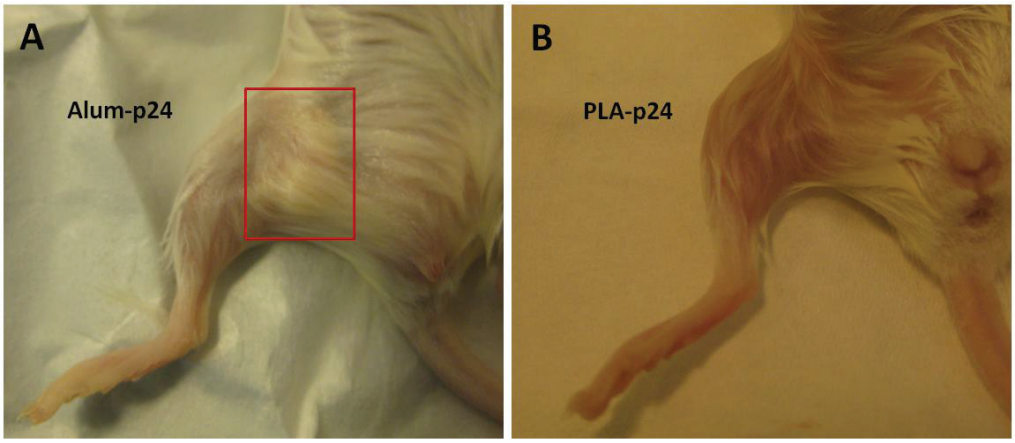


Figure 4.14. – Photos des sites d'injections une semaine après administration. (A) Alum-p24. (B) PLA-p24.

4.3.5. Administration intradermique des NPs de PLA-Nods

L'administration intradermique au niveau de l'oreille, de NPs de PLA-p24, induit une augmentation du nombre de cellules dans les ganglions parotidiens (drainant les oreilles), par rapport au groupe PBS (Figure 4.13.). Il est important de noter que la quantité de p24 administrée, influe sur le nombre de cellules finales dans les ganglions, une dose de 40 µg multipliant par deux le nombre de cellules par rapport à une dose de 10 µg. Elément intéressant, la formulation comprenant le ligand Nod2 co-délivré avec 10 µg de p24 induit une augmentation du nombre de cellules, équivalent à 40 µg de p24. Le ligand Nod1 ne présente aucun effet.

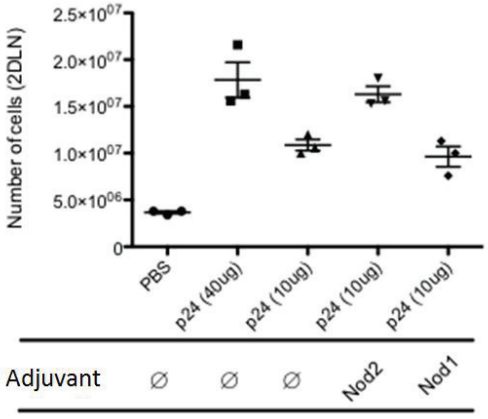


Figure 4.13. – Numération des cellules dans les ganglions parotidiens après injection intradermique de PLA-p24 adjuvantées ou non, avec des ligands Nods.

Là encore, l'administration de PLA-p24 induit une augmentation du nombre de lymphocytes T_{FH} et GC T_{FH} par rapport au groupe PBS (Figure 4.14.) et de façon dose dépendante. L'utilisation du ligand Nod2 semble induire une légère augmentation des T_{FH} par rapport aux groupes PLA-p24 seules ou adjuvantées avec le ligand Nod1. Il serait cependant intéressant de tester nos formulations sur un plus grand nombre de souris, afin de s'assurer de la significativité des résultats.

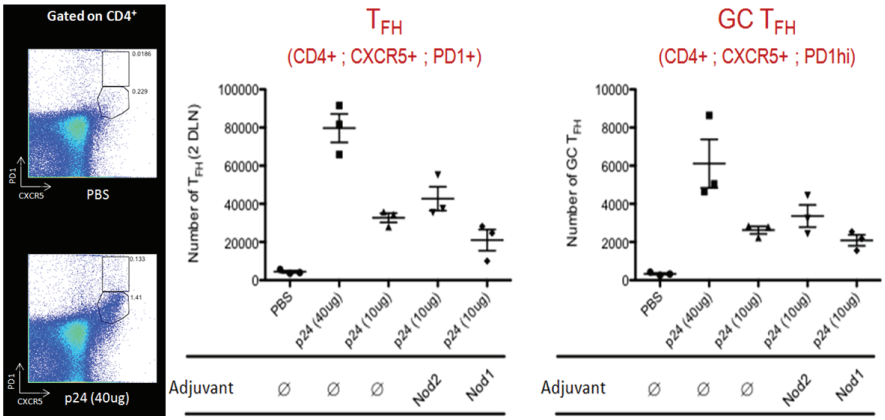


Figure 4.14. – Quantification des lymphocytes T_{FH} et GC T_{FH} dans les ganglions parotidiens après injection intradermique de PLA-p24 adjuvantées ou non, avec des ligands Nods.

4.4. DISCUSSION

La vectorisation d'Ags par voie muqueuse doit faire face à de nombreuses difficultés, que ce soit le transport de la particule en elle-même à travers la muqueuse, ou le maintien de l'intégrité de l'Ag tout au long du transport. En effet, l'Ag doit être protégé des dégradations enzymatiques ou chimiques et la particule doit limiter son élimination, ou sa dilution excessive. Elle doit également cibler les cellules susceptibles de capturer l'Ag : les cellules épithéliales ou les DCs et doit enfin, stimuler de façon appropriée l'immunité innée et spécifique, afin d'induire une immunité spécifique adaptée. Dans le cadre de la vaccination, l'Ag doit être protégé et associé aux particules tout au long de ce processus, tandis que les particules traversent l'ensemble de ces barrières physiques ou chimiques, pour être délivré intact aux CPAs. Une grande difficulté réside dans la capacité des particules à traverser ces différentes « couches » (mucus, barrières épithéliales et cellulaires) aux propriétés physico-chimiques très diverses. Les NPs conventionnelles sont capturées par le mucus grâce à des forces stériques ou adhésives[435]. En effet, les protéines muciniques qui constituent le réseau fibrillaire dense du mucus, sont capables de lier les particules par des liaisons hydrophobes *via* leurs domaines globulaires hydrophobes et par des liaisons électrostatiques, par l'intermédiaire des charges négatives des protéoglycanes[436].

Les particules doivent pénétrer dans ce réseau dense, notamment en y formant des liaisons avec les mucines pour atteindre les cellules épithéliales, sans être bloquées dans le mucus. Les paramètres qui régissent ce transport dans le mucus semblent principalement être la taille : les particules d'un diamètre de 300 nm sont ralenties par rapport aux particules de plus faible diamètre et le mucus semble être imperméable aux particules de taille micronique. La charge de surface des particules est également un paramètre important pour leur diffusion dans le mucus. Les particules mucoadhérentes, constituées de chitosane par exemple, portent des charges positives, capables de lier les protéoglycanes par des liaisons électrostatiques. Des liaisons trop importantes ne permettent pas aux particules d'atteindre les cellules épithéliales avant d'avoir été éliminées, entraînées par le flux du mucus. Il semblerait que les particules non chargées aient une meilleure diffusion au sein du mucus que les particules chargées, même négativement. Enfin, les particules dont la surface est hydrophile diffusent plus facilement dans le mucus que les particules hydrophobes comme les particules de poly(styrène)[435].

Nous avons ici souhaité évaluer la capacité d'un vaccin nanoparticulaire à délivrer des Ags vaccinaux du VIH-1 au niveau de différents modèles de muqueuses reconstruites *in vitro* et *in vivo* ainsi que par voies parentérales. Nous avons, dans un premier temps, élaboré des NPs de PLA fluorescentes en incorporant un fluorochrome, le BODIPY® Cell Trace (rouge) afin de pouvoir suivre ces NPs. Le procédé de nanoprécipitation nous a permis l'incorporation de ce fluorochrome de manière reproductible. Ce procédé ne modifie pas les caractéristiques physico-chimiques des NPs de PLA, comme la taille ou la polydispersité. En combinant l'utilisation du BODIPY hydrophobe et la méthode de nanoprécipitation, aucune fuite de fluorochrome n'a été

observée provenant des NPs de PLA fluorescentes. Par conséquent, la mesure de fluorescence observée dans les différents modèles provient des NPs fluorescentes transportées et non d'une fluorescence diffuse. Ces NPs ont été administrées dans un modèle *in vitro* de muqueuse intestinale, un modèle de muqueuse orale et *in vivo*, dans un modèle d'anse intestinale ligaturée et par voie sous-cutanée chez la souris.

Pour éviter l'élimination des particules par la clairance mucociliaire dans notre modèle d'anse intestinale, le diamètre moyen des nanoparticules de PLA a été choisi autour de 200 nm. Cette taille, combinée à la grande densité de charges négatives des PLA, a permis un transport rapide (15 min environ) à travers le mucus pour atteindre la barrière épithéliale dans l'étude de Primard *et al.*[158]. Notre choix dans la taille des particules a été influencé par les travaux de Lai *et al.* qui montrent que la taille des particules est un paramètre qui influence la diffusion de ces dernières dans le mucus. En effet, des NPs administrées dans différents tissus muqueux sont susceptibles d'être piégées par le mucus par des forces stériques ou adhésives[435]. Cette capacité à créer des interactions a été largement utilisée pour concevoir des particules mucoadhérentes destinées à l'administration de médicaments, par exemple. Cette capacité d'adhésion correspond difficilement à une application vaccinale dans laquelle l'Ag doit être administré avec les particules au niveau des DCs de la *lamina propria* ne devant pas être retenu dans le mucus. Dans cette étude sur la diffusion de différentes tailles de NPs (100, 200 et 500 nm), il a clairement été démontré qu'à l'inverse des particules de grandes tailles, les particules de 100 nm sont immobilisées par le mucus[437]. Les grosses particules (>300 nm) quant à elles, ont montré moins d'efficacité à franchir la barrière épithéliale que les petites particules (autour de 100 nm).

Dans un premier temps, un modèle *in vitro* de FAE intestinale incluant des cellules M « like » a été utilisé sur la base de l'étude de des Rieux *et al.*[421] et a ensuite été optimisé en termes de fonctionnalité et de reproductibilité par Nicolas Rochereau au GIMAP de Saint- Etienne. La relevance de ce modèle reste discutable car il est dépourvu de cellules productrices de mucus et donc, de mucus à la surface de l'épithélium. De plus, il est difficile, selon le clone de cellules Caco-2 utilisé, d'obtenir une monocouche étanche et sans dômes cellulaires[421]. Il nous a donc été indispensable, pour utiliser ce modèle, de réaliser toute les vérifications nécessaires, afin de valider la morphologie et les caractères physiologiques des cellules M-like (résultats présentés dans la Figure 1). L'optimisation du modèle a permis d'identifier certains facteurs pouvant être impliqués dans la différenciation des entérocytes en cellules M comme par exemple déterminer le stade cellulaire (phase exponentielle ou phase stationnaire) ou encore, le nombre de cellules Raji utilisées dans les cocultures. Enfin, la principale modification apportée dans notre modèle de FAE, réside dans le fait que la culture Caco2 a été réalisée sur le côté opposé du filtre, permettant d'avoir une reproductibilité très significative d'une expérience à l'autre.

Le rendement de différenciation en cellules M des modèles a été étudié à partir de données morphologiques par microscopie électronique à balayage et transmission. Dans les monocultures,

toutes les cellules semblent former une bordure en brosse régulière (caractéristique des entérocytes). Après co-culture, certaines cellules n'expriment plus de microvillis comme décrit pour les cellules M. Le taux de différenciation d'entérocytes en cellules M obtenu, oscille autour de 20 %. Ce taux est légèrement supérieur à celui observé chez l'homme (< 10 %[438]).

Grâce aux améliorations apportées, ce modèle nous a permis d'étudier l'efficacité du transport des NPs de PLA-BODIPY blanches ou formulées avec de la p24 ou de la gp140 présenté dans la Figure 2. Parallèlement, ce modèle *in vitro* nous a également permis d'étudier l'efficacité de passage des particules, médié par les cellules M. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la formulation des NPs de PLA avec la p24 ou la gp140 n'améliorait pas, ni ne diminuait, le passage des particules au travers du FAE intestinal. En revanche, la présence de cellules M potentialise de manière significative ce passage. Ces résultats corrèlent avec ceux déjà observés *in vivo* par Primard *et al*. démontrant un transport efficace des NPs de PLA au niveau des PPs chez la souris et que ce transport était médié principalement par les cellules M[158].

Parmi les nombreuses voies de vaccinations muqueuses actuellement à l'étude dans un grand nombre de laboratoires, la voie sublinguale montre un intérêt grandissant. Nous nous sommes donc intéressés à la capacité des NPs de PLA à transporter un Ag dans un modèle de muqueuse orale reconstruite *in vitro* en collaboration avec Odile Damour et Beste Kinikoglu de la banque de tissus et cellules de l'hôpital Edouard-Herriot de Lyon[426]. Ce modèle permet l'obtention d'une muqueuse orale humaine reconstruite non-kératinisée pluristratifiée mimant de manière très fidèle la muqueuse humaine d'origine. La co-culture successive de fibroblastes de *lamina propria* humaine et de cellules épithéliales orale isolées d'une région non-kératinisée de la cavité orale, sur une éponge de collagène-GAG-chitosan permet le développement d'un équivalent de *lamina propria* et d'un équivalent de muqueuse orale. Ce modèle nous a permis de montrer que les NPs de PLA étaient capables de pénétrer la muqueuse de manière efficace au niveau de l'épiderme mais aussi, de la traverser, mais de manière limitée. Ces observations démontrent le potentiel intéressant des NPs de PLA pour la délivrance d'Ags ou de composés au niveau de la muqueuse orale et particulièrement de la muqueuse sublinguale dans un but vaccinal. Il serait cependant intéressant d'améliorer le modèle de MOR d'un point de vue immunologique en y intégrant des cellules de Langerhans (LCs), afin d'étudier une possible prise en charge des NPs par ces dernières. Néanmoins, les obstacles techniques sont encore très importants, nos essais incorporant la lignée Mutz-1 dans ce modèle de muqueuse orale n'ayant pas été très concluants pour l'instant. De la même manière que pour le FAE intestinal reconstruit, il serait intéressant d'étudier le relargage de cytokines dans le milieu de culture après stimulation avec les NPs-Nods. En effet, les barrières épithéliales représentent les premières cellules en contact avec un pathogène/vaccin administré par voie muqueuse et leur rôle dans l'initiation d'une réponse immunitaire est donc primordial, concernant notamment la sécrétion de molécules chimio-

attractantes, telles que CCL9 et CCL20, spécifiques de certaines DCs, permettant ainsi l'attraction de ces cellules phagocytaires au point d'entrée des pathogènes dans la muqueuse[439].

Notre hypothèse concernant l'utilisation d'un gel de chitosane/particules dans le but d'ouvrir les jonctions serrées de la muqueuse et faciliter le passage de NPs, n'a pas été validée. En effet, aucune particule n'a pu traverser la muqueuse. Les NPs sont très probablement restées piégées à l'intérieur du gel sans pouvoir être relarguées. Une application plus mécanique, avec un massage par exemple, permettrait peut être d'améliorer ce relargage. Ceci étant tout à fait envisageable à mettre en œuvre sur la peau, cette technique reste très difficile sur un modèle de MOR *in vitro*, trop fragile.

In vivo, la prise en charge des NPs de PLA par la muqueuse intestinale semble limitée aux cellules M[158] et le mécanisme d'émission de pseudopodes par les DCs CX3CR1 ne semble pas impliqué. Ces observations sont très probablement dues à un manque de « signaux danger » en surfaces de particules. Cela peut présenter l'avantage de diminuer la prise en charge par les DCs CX3CR1^{high} productrices d'IL-10 induisant la prolifération des lymphocytes T_{reg} Foxp3^{+} responsables de la tolérance[103]. Au niveau des ganglions inguinaux, nous avons prévu, par la suite, de réaliser des marquages des différentes zones (centres germinatifs, zone B, zone T, etc.) afin d'identifier où les NPs se localisent préférentiellement et de réaliser des études en cytométrie après isolation et marquage des différents types cellulaires et ainsi analyser plus précisément la prise en charge de particules. Il serait aussi intéressant de réaliser des études de transport vers les ganglions, en fonction de la taille des particules. En effet, les vaisseaux lymphatiques périphériques possèdent un diamètre d'environ 10 – 60 µm alors qu'au niveau de la rate (sinusoïdes veineux), ils ne font plus que 150 à 200 nm. C'est pourquoi, seules les molécules de 20 à 200 nm peuvent efficacement pénétrer le système lymphatique et rejoindre les organes lymphoïdes directement, quelques heures après injection. Les particules plus grosses (200-500 nm) ne peuvent pénétrer le système lymphatique que si elles sont prises en charge par les DCs, mettant approximativement 24h pour arriver aux ganglions lymphatiques[440]. Les particules détectées au niveau des ganglions, dans cette expérience, n'étant pas colocalisées avec des DCs (vertes), il s'agit très probablement des particules libres inférieures à 200 nm (la taille moyenne utilisée étant de 180 nm).

La voie intradermique présente l'avantage de délivrer la formulation vaccinale directement dans le derme où de nombreuses DCs dermiques sont présentes, ainsi que des LCs au niveau de l'épiderme. Sept jours après administration de PLA-Nod2-p24, nous avons pu observer une augmentation significative du nombre de cellules totales dans les ganglions drainants les oreilles (Fig. 4.13) traduisant à la fois une augmentation de cellules ayant migrées, ainsi qu'une prolifération cellulaire au sein même des ganglions. Cet effet étant très probablement dû à une activation accrue en présence du ligand Nod2, des LT naïfs en T_{FH} et GC T_{FH} par les DCs ayant migré (Fig. 4.14). Ces observations sont particulièrement intéressantes dans l'optique du développement d'un adjuvant vaccinal permettant de diminuer les doses d'Ag administrées. Il

faudrait cependant mener des études plus approfondies sur l'induction de réponses immunitaires, lors de protocoles d'immunisations.

4.5. CONCLUSIONS

Les particules fluorescentes ont permis une étude préliminaire du comportement de notre candidat vaccin lorsqu'il était appliqué au niveau des muqueuses intestinales et orales ainsi que par voie sous-cutanée. Cette étude a fait appel à trois modèles biologiques : un FAE intestinal reconstruit, une MOR et *in vivo*, chez la souris. L'étude du passage des NPs de PLA-BODIPY au travers du modèle de FAE en présence ou non de cellules M, nous a permis de confirmer les cellules M comme voie de passage privilégiée des NPs vers la *lamina propria*. Au niveau de la MOR, le passage reste plus faible, même si de nombreuses particules ont été retrouvées au niveau de l'épiderme riche en LCs, prouvant une vectorisation efficace d'un Ag par les NPs de PLA et ouvrant un champ d'application à une délivrance vaccinale par voie sublinguale.

In vivo, dans le modèle d'anse intestinal, aucun mécanisme de prise en charge des NPs par émission de pseudopode n'a été mis en avant, restreignant *a priori* le passage des NPs de PLA au niveau de la muqueuse intestinale, aux cellules M comme précédemment démontré.

La voie intradermique présentant de nombreux avantages, nous avons ici pu montrer un effet adjuvant du ligand Nod2 par cette voie, même si de nombreuses études méritent encore d'être menées, afin d'approfondir les réponses immunitaires systémiques et muqueuses induites par cette voie.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Résumé des objectifs et résultats obtenus
2. Agonistes de PRRs et vaccination
3. Vacciner par voie muqueuse ou parentérale ?
4. Co-administration ou co-délivrance de l'antigène et du ligand ?
5. Amélioration du système d'adressage muqueux et de ciblage des DCs
6. Perspectives
7. Choix d'un immunogène relevant en vaccination anti-VIH-1
8. Les voies d'administrations muqueuses

1. Résumé des objectifs et résultats obtenus

L'objectif de mon travail de thèse était double :

I – Concevoir une stratégie de vaccination inductrice de réponses immunitaires muqueuses anti-VIH-1 en encapsulant des agonistes des récepteurs intracellulaires Nod1 et Nod2 et en formulant, à leur surface, un antigène modèle, la p24 du VIH-1. Nous nous sommes aussi intéressés à une molécule chimérique ciblant à la fois le récepteur Nod2 et le TLR2.

II – Tester différentes voies d'administration afin d'amplifier les réponses immunitaires au niveau systémique et au niveau des muqueuses intestinales et vaginales et étudier le transport des nanoparticules de PLA dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

Dans ce but, mon travail de thèse a consisté à mettre au point l'encapsulation dans des NPs de PLA, de deux ligands : CL235 (Nod1) et CL365 (Nod2) (InvivoGen). C'est ainsi que nous avons élaboré des NPs-Nods avec des taux d'encapsulation élevés (~ 85 %) (article N°1).

Nous avons mis en évidence que ces NPs de PLA, chargées ou non par ces ligands, étaient efficacement prises en charge par les DCs *in vitro*, confirmant leur potentiel de vectorisation pour un antigène (Ag) ou une molécule immunostimulante. Cette caractéristique a été confirmée par la capacité accrue des ligands Nods encapsulés, à induire la maturation de DCs humaines *in vitro* ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, par rapport aux ligands libres. Ces résultats ont pu être confirmés chez la souris, avec une potentialisation, par les ligands encapsulés, des réponses humorales systémiques anti-p24 après immunisation par voie sous-cutanée. Ces observations sont très probablement dues, à la fois à une meilleure prise en charge des ligands encapsulés par rapport aux ligands libres, mais aussi à une protection de ces derniers *in vitro* et *in vivo*. La délivrance, en plus grandes quantités, des ligands Nods au niveau des cellules présentatrices d'Ag (CPAs) *in vivo*, a très probablement permis une forte maturation et un relargage cytokinique favorisant le recrutement leucocytaire au niveau du site d'injection permettant l'initiation d'une forte réponse immunitaire spécifique de l'Ag co-délivré.

Nous avons souhaité, dans un second temps, étudier l'aspect fonctionnel de la maturation des DCs observée *in vitro*. Nous avons ainsi montré que l'incubation *ex vivo* de DCs de patients VIH^+ avec des PLA-p24, puis la mise en contact avec des lymphocytes T autologues, conduisait à une prolifération CD4 et CD8, potentialisée par l'encapsulation des ligands Nods (article N°2). Nous avons mis en évidence que le ligand Nod2 était plus efficace que le Nod1, induisant probablement (en plus des molécules co-stimulatrices et des cytokines) une meilleure présentation par le CMH-II (prolifération $CD4^+$) ainsi qu'une cross-présentation par le CMH-I (prolifération $CD8^+$). Ces observations sont en accord avec les données recueillies dans notre précédente publication, corroborant l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulations et des cytokines pro-inflammatoires, avec une prolifération lymphocytaire autologue efficace. Dans ce

modèle, les NPs de PLA-Nod2-p24 ont aussi réussi à augmenter significativement la sécrétion des cytokines IFNγ et IL-6 ainsi que des chimiokines IL-2R et MIP-1β. Ces différences entre ligands Nod1 et Nod2 peuvent être incombées à des niveaux d'expression différents par les DCs et/ou un relargage différent par les NPs.

Un des objectifs de cette thèse étant d'étudier l'induction de réponses immunitaires muqueuses et systémiques contre un Ag du VIH-1, nous avons ensuite réalisé des études *in vivo* de ces formulations en comparant différentes voies d'administration vaccinale. Nous avons ainsi effectué des immunisations par voie sous-cutanée (SC), nasale et par gavage chez la souris (BALB/c). Nous nous sommes aussi interrogés sur la nécessité de co-délivrer l'Ag et le ligand dans la même ou dans des particules différentes. Nous avons ainsi testé plusieurs formulations en co-administrant ou en co-délivrant l'Ag p24 (Gag VIH-1) et le ligand.

Nous avons pu mettre en évidence que les voies SC et nasale permettaient d'induire de fortes réponses systémiques contre l'Ag adsorbé, mais que seule la voie nasale engendrait des IgA dans les lavements vaginaux. La formulation PLA-Nod2-p24 s'est révélée être la plus efficace puisque capable d'induire, par voie nasale, de forts taux d'IgA vaginales (équivalents à l'entérotoxine (ET)) et d'IgG sériques. Par voie SC, de forts taux d'IgG sériques, vaginales et rectales ont été observés avec cette formulation. Par gavage, en revanche, c'est la co-administration du ligand Nod2 et de la p24 dans différentes particules qui a été la plus efficace, permettant d'obtenir de fortes réponses IgA rectales. Concernant les réponses cellulaires, là encore la co-délivrance du ligand Nod2 et de la p24 par voie SC a provoqué de fortes réponses CD8 IFNγ en ELISpots, alors que par voie entérale, le ligand Nod1 est significativement plus efficace.

Néanmoins, la capacité adjuvante de molécules ciblant un seul et unique PRR peut se révéler limitée, avec dans notre cas l'impossibilité d'induire des IgA muqueuses par voie SC. L'hypothèse d'utiliser une molécule ciblant à la fois le récepteur Nod2 et le TLR2 a donc été testée par la suite, en se basant sur divers travaux rapportant un effet coopératif de la stimulation de ces deux types de PRRs (article N°3)[245, 248, 410].

Cette étude nous a ainsi permis d'évaluer le potentiel adjuvant de la molécule chimérique CL429 (Nod2/TLR2) *in vitro* et *in vivo*, en comparaison aux ligands TLR2 ou Nod2 seuls ou co-délivrés (article N°3). Nous avons ainsi montré un effet additif de la co-délivrance des deux molécules et un effet synergique de la molécule chimérique, à la fois sur la maturation de MoDCs humaines *in vitro* et lors d'essais d'immunisation par voie SC dans le modèle murin BALB/c. En effet, nous avons mis en évidence la forte capacité de cette chimère à induire simultanément de fortes réponses systémiques et muqueuses (rectales et vaginales), en comparaison à la simple co-administration des ligands Nod2 et TLR2. Ainsi, parmi l'ensemble de formulations testées au cours de cette thèse, la molécule CL429 (Nod2/TLR2) est la seule à avoir induit des IgA sériques et muqueuses par voie SC. Les titres en IgA sériques sont supérieurs d'1 Log par rapport à ceux observés par voie nasale avec les PLA-Nod2-p24 (formulation la plus efficace par cette voie lors

de l'utilisation d'un seul agoniste). Des réponses IgA anti-p24 dans les fèces ont aussi pu être mises en évidence avec cette molécule hybride, atteignant des taux équivalents, voire supérieurs, à l'administration orale de la formulation PLA-p24 + PLA-Nod2 (formation la plus efficace par cette voie). Cette molécule a aussi permis d'induire des IgA vaginales mais à des taux moins importants que les formulations PLA-Nod2-p24 et ET + p24 par voie nasale (~ 30 *vs* 200 ng/ml respectivement). La voie nasale reste donc la voie privilégiée pour la stimulation de fortes réponses IgA vaginales, quelle que soit la formulation testée.

Néanmoins, on notera que les titres élevés en IgG sériques obtenus avec le CL429 ont permis de retrouver de fortes concentrations en IgG dans les prélèvements muqueux, supérieurs à ceux induits par la formulation PLA-Nod2-p24 par la même voie (SC). Ces résultats montrent l'intérêt d'utiliser ce nouveau type de molécule bi-fonctionnelle, capable de cibler et d'activer deux familles de PRR, l'un membranaire, l'autre cytoplasmique.

L'hypothèse que nous avançons sur l'effet adjuvant de la molécule chimérique est que, dans un premier temps, la fixation au TLR2 situé à la surface des DCs, initie une première cascade d'activation dépendante du MyD88. Dans un second temps, l'internalisation du complexe CL429-TLR2[441] permet de délivrer le ligand dans le milieu intracellulaire et sa fixation au récepteur Nod2. Cela conduit alors au déclenchement de la cascade d'activation des Nods venant renforcer la première. Ainsi, l'aspect synergie s'expliquerait par cette cascade d'activation séquentielle. Ceci n'est encore qu'une hypothèse mais semble tout à fait plausible et fait le parallèle avec une infection par un pathogène, qui va tout d'abord stimuler les PRRs extracellulaires puis, après internalisation, les PRRs intracellulaires.

Malgré une potentialisation de l'efficacité du ligand Nod2 encapsulé (*in vitro* et *in vivo*), la molécule chimérique libre présente une meilleure activité *in vivo* que la formulation PLA-Nod2-p24 par la même voie (SC). Ces résultats peuvent en partie être expliqués par les données de maturation des DCs *in vitro*. En effet, en comparant l'expression des marqueurs de maturation et la production de cytokines entre ces deux formulations (tableau ci-dessous : articles N°1 & 3), nous pouvons nous apercevoir de l'effet immunostimulant nettement supérieur de la chimère.

Tableau comparatif des PLA-Nod2 et de la chimère Nod2/TLR2 sur la stimulation *in vitro* de MoDCs humaines.

	CD80 (MFI)	CD83 (MFI)	CD86 (MFI)	IL-6 (pg/ml)	TNFα (pg/ml)	IL-1β (pg/ml)	IFNγ (pg/ml)	IFNα (pg/ml)
Chimère Nod2/TLR2	10 000	1600	30 000	45 000	1200	14 000	2500	35
PLA-Nod2	8000	1300	20 000	8000	200	6000	400	14

L'ensemble de ces observations confirment l'intérêt de vectoriser un ligand bi-fonctionnel, pouvant être co-adsorbé avec un Ag sur nos particules, plutôt qu'un ligand mono-fonctionnel. Pour étayer définitivement ces observations, il faudrait comparer les particules contenant la

chimère Nod2/TLR2, avec des billes contenant les ligands TLR2 et Nod2 de manière individualisée.

Nous avons ensuite voulu étudier si la présence de ligands Nods ou d'un Ag à la surface des particules pouvait modifier leur transport au niveau des muqueuses ou au niveau systémique. Pour répondre à cette question, nous avons d'abord testé cette hypothèse sur des modèles *in vitro* de muqueuse orale et d'épithélium intestinal reconstruits, mais aussi *in vivo*, chez la souris (résultats - partie 4).

L'étude du passage des NPs de PLA-BODIPY (blanches ou formulées avec deux Ag différents, p24 ou gp140) au travers du modèle de FAE en présence ou non de cellules M, nous a permis de confirmer que les cellules M étaient la voie de passage privilégié des NPs vers la *lamina propria*, comme précédemment décrit par Primard *et al.*[158] et que ce transport n'était pas affecté par la présence d'Ag à la surface des particules. De plus, *in vivo*, dans un modèle d'anse intestinale murin, aucun mécanisme de prise en charge des NPs par émission de pseudopode[34] n'a été mis en avant, restreignant *a priori* le passage des NPs de PLA aux cellules M. Néanmoins, ces observations méritent d'être confirmées, car nous ne pouvons par exclure que la nature de l'Ag adsorbé sur la particule de PLA, conditionne ou non l'induction de pseudopodes. Un chercheur du laboratoire de l'équipe d'accueil est actuellement en train de tester cette hypothèse en utilisant des fragments de collagène bactérien dans le but de fonctionnaliser les particules de PLA.

Une autre application de l'étude du transport des particules de PLA en présence d'Ags concerne leur application comme véhicule de vaccination par voie sublinguale, cette voie étant capable d'induire des réponses immunitaires systémiques et vaginales[91]. Nous avons ainsi souhaité étudier la capacité de nos nanovecteurs à transporter *in vitro* un Ag par cette voie. Ainsi, dans un modèle de muqueuse orale reconstruite (MOR), disponible dans notre unité de recherche, nous avons pu constater que le passage à travers ce type de muqueuse reste faible, même si de nombreuses particules ont été retrouvées au niveau de l'épiderme (résultats – partie 4). Cette zone étant très riche en cellules de Langerhans (LCs) *in vivo*, il conviendrait de réaliser de nouveau cette expérience après incorporation de telles cellules dans ce modèle, afin de confirmer l'intérêt des particules de PLA pour atteindre les LCs et initier ainsi, une réponse immunitaire efficace.

Par ailleurs, il faut considérer le fait que la voie sublinguale est aussi très utilisée en immunothérapie afin d'induire une tolérance vis-à-vis de certains allergènes et ne serait donc pas compatible avec le déclenchement de réponses immunitaires efficaces[442]. L'induction de telles réponses par cette voie repose donc, très probablement, sur l'utilisation d'adjuvants capables de stimuler/orienter la réponse immunitaire[94]. Dans cette optique, l'utilisation des ligands Nods ou d'un ligand chimérique tel que le CL429, est tout à fait envisageable.

2. Agonistes de PRRs et vaccination

De nombreuses études, avant la nôtre, démontrent l'intérêt de molécules ciblant les PRRs pour stimuler de réponses immunitaires muqueuses, dont principalement les TLRs. C'est notamment le cas du MPL (dérivé détoxifié du LPS)[194], qui est aujourd'hui le seul agoniste TLR homologué pour une utilisation chez l'Homme. Co-formulé avec l'Alum (AS04) et des VLP dans le vaccin Cervarix (papillomavirus) par voie IM, il entraîne de forts titres en IgG sériques neutralisantes, permettant une transsudation au niveau de la muqueuse vaginale, suffisante aux mécanismes de protection du vaccin[57, 195]. L'induction de telles réponses en vaccination anti-VIH serait très importante, vis-à-vis de réponses IgG protectrices au niveau des muqueuses vaginales et rectales. Ces observations sont à rapprocher des résultats que j'ai obtenus, concernant l'induction de réponses IgG anti-p24 après administration de la formulation PLA-Nod2-p24 par voie SC. Néanmoins, de nombreuses études montrent aussi l'importance des réponses IgA neutralisantes au niveau muqueux pour une vaccination anti-VIH efficace[129, 332]. Si nos travaux montrent que par voie SC, la formulation PLA-Nod2-p24 n'est pas capable de déclencher de telles réponses, la voie nasale permet *a contrario*, l'induction de fortes réponses IgA vaginales. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Jackson *et al.*[252], qui, avec du Murabutide (Nod2) par voie nasale, ont induit de fortes réponses IgA vaginales, cependant légèrement inférieures à celles retrouvées dans notre étude. En effet, si nous convertissons nos résultats, exprimés ng/ml, en titres, nous obtenons une moyenne de 250, contre environ 100 pour l'étude de Jackson. Cette étude montre aussi des réponses IgG et IgA sériques équivalentes aux nôtres (titres ~ 10^5 et 10^3 respectivement). Ils ont également obtenu des IgG vaginales et des IgA fécales, réponses que nous n'avons pas retrouvées de manière significative lors de nos expérimentations. Il faut cependant noter que ces titres restent très faibles (~10). En revanche, cette étude ne montre pas non plus de réponses IgG fécales. Lors d'un second protocole d'immunisations, Jackson *et al.* ont montré qu'en réalisant des prélèvements plus tardivement (112 jours contre 56 jours après la première immunisation), les réponses IgG sériques et IgA vaginales étaient améliorées, mais pas les IgA sériques. Ces observations devront être prises en compte pour de futurs essais d'immunisations avec nos formulations.

Par voie SC chez la souris, une des rares études à avoir été menée avec des ligands Nods est celle de Magalhaes *et al.*[251]. Cette étude a mis en évidence une polarisation Th2 (par mesure des IgG1) lors d'immunisations chez la souris, en combinant du MDP (Nod2) et de l'OVA. Nos données par cette même voie sont en accord avec ces observations, avec l'induction de forts titres en IgG totales. Nous montrons cependant de fortes réponses $CD8^+$ IFNγ lorsque l'Ag et le ligand Nod2 sont véhiculés par la même particule. Cette réponse n'a très certainement pas pu être mise en évidence dans l'étude de Magalhaes du fait d'une « simple » co-administration, comme nous l'avons montré avec les formulations PLA-p24 + PLA-Nod2. Cette étude a aussi mis en avant l'induction de réponses à la fois Th1 et Th2 lors de co-stimulation Nod2 et TLR2. En effet, lors

d'essais de stimulations de BMDCs (Bone marrow-derived DCs) de souris, ils ont pu observer un effet coopératif entre une stimulation Pam_3CSK_4 (TLR2) et MDP (Nod2) sur l'expression d'IL-6 et d'IL-12. Ces observations sont en accord avec l'étude que nous avons menée sur la molécule chimérique Nod2/TLR2 (article N°3) et les données de la littérature sur la stimulation de PBMC humains *in vitro*[245].

Par voie entérale (chez la souris) l'étude de Zhu *et al.*[418] a montré l'intérêt d'utiliser des microparticules de PLGA contenant plusieurs ligands TLRs (MALP-2, poly I:C et CpG ODN) et enrobées d'Eudragit FS30D, capables de relâcher les particules à un pH de 7,4, au niveau du gros intestin. Cette formulation permet ainsi d'augmenter la protection du vaccin et de favoriser sa délivrance et d'induire de fortes réponses IgA et IgG dans les tissus colorectaux (titres ~ 600) et dans les lavements vaginaux (~ 400). La réponse IgA rectale est sept fois supérieure à celle que nous avons obtenue avec notre formulation PLA-p24 + PLA-Nod2 (après conversion). De plus, nous n'avons pas pu induire de réponses vaginales par cette voie. Il faut cependant noter que cette étude ne montre pas non plus de réponses humorales systémiques. Il serait donc intéressant pour nous d'utiliser le même type de formulation-Eudragit, afin d'améliorer la protection des particules de PLA-Nod et ainsi analyser une potentielle amélioration de nos réponses par voie orale. On remarquera aussi, que par voie SC avec la molécule chimérique Nod2/TLR2 + PLA-p24 ou la formulation PLA-Nod2-p24, les réponses IgG muqueuses que nous avons obtenues sont nettement supérieures.

Concernant la vectorisation de ligands de PRRs, il a été montré *in vitro* que l'incorporation de ligands TLR (notamment TLR2) dans des systèmes particulaires, peut améliorer la phagocytose par des macrophages[264]. Les données recueillies lors de mes travaux ont permis de montrer que ce phénomène était aussi observé avec des particules vectorisant des ligands Nods (article N°2). De plus, des liposomes greffés avec des lipopeptides palmitoyl (TLR2), des ligands Nod1, Nod2 ou CpG (TLR9) encapsulés dans des microparticules de PLGA induisent une augmentation des marqueurs de maturation à la surface des DCs *in vitro*[265, 275, 443]. Nos résultats montrent que ces observations se retrouvent aussi avec les ligands Nod encapsulés dans des NPs de PLA (article N°1).

Il a aussi été montré que ces motifs CpG pouvaient entraîner des réponses à médiation cellulaire *in vivo* lorsqu'ils sont incorporés dans des particules de PLGA[269], des liposomes[270] et autres microparticules[271]. Nos résultats montrent que l'utilisation de PLA-Nod-Ag permet d'obtenir des résultats similaires par voie SC et entérale et que l'utilisation de la molécule chimérique induit des titres en IgG2a équivalents à l'étude de Demento (titres ~ 10^4-10^5)[269].

L'ensemble de ces comparaisons met clairement en évidence le potentiel des NPs de PLA vectorisant des ligands Nod, ainsi que la molécule chimérique Nod2/TLR2 à induire des réponses muqueuses. Il faut cependant noter que des formulations utilisant des vecteurs viraux (Adénovirus, pox, etc.)[384, 385] peuvent être plus efficaces, notamment pour l'induction de réponses

cellulaires dues à la production endogène de l'Ag et donc une présentation *via* le CMH-I. Les formulations particulaires vectorisant des agonistes Nod et/ou TLR restent tout de même des alternatives très intéressantes et pourraient pallier au problème de réponses cellulaires par des Ag non-réplicatifs, notamment en stimulant des mécanismes de cross-présentation[191, 400, 408].

3. Vacciner par voie parentérale ou muqueuse ?

Les vaccins contre le choléra et les rotavirus n'ont prouvé leur efficacité que par voie muqueuse (administration par voie orale), il semblerait donc que cette voie soit particulièrement intéressante[55]. D'un autre côté, il faut considérer le fait que beaucoup de vaccins engendrant des protections efficaces contre un grand nombre d'infections muqueuses sont administrés par voie parentérale (tuberculose, HPV, coqueluche, etc.) plutôt que par voie muqueuse. Ces derniers engendrent tout de même des protections efficaces, spécialement ceux induisant de forts taux d'IgG sériques capables de traverser l'épithélium muqueux[52, 195]. Ces deux observations illustrent bien le dilemme qui se pose lorsque nous devons tester et comparer différentes voies d'administration vaccinale, en l'absence d'un modèle de challenge simple, et la difficulté d'interprétation de nos travaux.

En effet, nos résultats montrent que l'utilisation de la formulation PLA-Nod2-p24 par voie SC a permis l'induction de titres élevés en IgG sériques (~ 10^6) qui ont pu être transportées au niveau des muqueuses intestinale et vaginales. Les mécanismes probablement impliqués sont la transsudation et/ou le transport *via* le FcRn depuis le côté apical des cellules épithéliales, jusque dans la lumière intestinale ou vaginale[51, 52].

Des titres en IgG sériques élevés par voie nasale avec l'ET, a révélé le même type d'observations au niveau des muqueuses, alors que des titres plus faibles (~ 10^5) obtenus avec la formulation PLA-Nod2-p24 (nasale) ou Alum-p24 (SC) n'ont pas permis de telles observations. Cela implique probablement un seuil limite auquel la concentration en IgG sériques n'est pas suffisante pour entraîner un tel transport muqueux.

L'une des caractéristiques intéressantes de la voie nasale est l'induction de réponses IgA au niveau des muqueuses génitales[45]. Nous avons confirmé ces données lors de ce travail. Il faut cependant noter que toutes les formulations testées n'ont pas été capables de déclencher de telles réponses. En effet, seules les formulations ET + p24 et PLA-Nod2-p24 y sont parvenues de manière significative. Ces importantes réponses IgA sont probablement dues à une forte activation lymphocytaire par la co-délivrance du ligand Nod2/ET et de l'Ag, suivie de la migration des plasmocytes à IgA, depuis le NALT, jusque dans les ganglions lymphatiques drainants le tractus génital et la muqueuse. Ce mécanisme est probablement dû à l'induction de l'intégrine α4β1 (VLA-4) à la surface des plasmocytes à IgA au niveau du NALT, permettant une reconnaissance de la molécule d'adhésion VCAM-1 au niveau des cellules endothéliales des

vaisseaux irriguant la muqueuse vaginale[54]. De plus, l'expression de la chimiokine CCL28 au niveau de cette muqueuse a très certainement permis l'attraction de ces cellules exprimant le récepteur CCR10, n'étant pas forcément restreinte à la muqueuse intestinale[54]. Il faut néanmoins noter que l'immunisation par voie SC avec la molécule chimérique Nod2/TLR2 a aussi donné lieu à ce type d'observations (avec un effet moindre cependant). Il est donc possible que l'administration de ce ligand par voie parentérale ait aussi permis l'expression d'α4β1 et du CCR10 par les plasmocytes à IgA, ce phénomène ayant déjà été mis en évidence par l'étude de Liang *et al.*[415]. De la même manière, la molécule chimérique a aussi provoqué de fortes réponses IgA rectales, équivalentes à celles observées par voie entérale avec la formulation PLA-p24 + PLA-Nod2. Dans ce cas, il est aussi possible que les mécanismes de homing soient améliorés grâce à l'induction de l'expression de CCL28 au niveau intestinal, attirant spécifiquement les plasmocytes à IgA exprimant le CCR10 ; ou encore la CCL25 (abondamment produite au niveau de l'intestin grêle) permettant d'attirer spécifiquement les LB et LT exprimant le récepteur CCR9.

Nous avons ainsi montré que des formulations utilisant le ligand Nod2 seul ne permettaient d'obtenir des réponses IgA rectales et vaginales que par voie muqueuse, alors que l'adjuvantation par une molécule ciblant à la fois le récepteur Nod2 et le TLR2 permettait d'obtenir ce type de réponse par voie parentérale.

Lors de protocoles de vaccination, le choix de la voie d'immunisation devra donc prendre en considération à la fois le type de réponse souhaitée, ainsi que le type d'adjuvant utilisé.

Au vu des ces résultats, les réponses muqueuses à large spectre pourraient être améliorées en combinant, par exemple, des schémas de vaccinations hétérologues (muqueux + parentéral). Ce type de protocole a d'ailleurs été mis en œuvre par l'équipe de Morgane Bomsel qui a évalué et montré chez le macaque, l'intérêt d'administrer une formulation vaccinale à la fois par voie muqueuse (nasale) et parentérale (intramusculaire), par rapport à une seule de deux voies[129].

4. Co-administration ou co-délivrance de l'antigène et du ligand ?

De nombreuses interrogations subsistent encore concernant la co-délivrance de l'Ag et du composé immunostimulant. Certaines études tendent à montrer que la co-délivrance de l'Ag et de la molécule immunostimulante par la même particule serait plus efficace, alors que d'autres indiquent que la co-délivrance par différentes particules serait plus efficiente.

Ainsi, dans l'étude de Katsuri *et al.*, ces derniers énoncent clairement que par voie SC, la co-délivrance de l'OVA (ovalbumine) et de ligands TLRs (MPL et R837) dans différentes particules est plus efficace que les trois molécules ensembles[281]. Ils parviennent ainsi à une différence de 2 Log dans les réponses IgG entre les deux formulations. Une autre étude a montré que des particules de nanolipoprotéines (NLP) véhiculant du MPLA ou du CpG ODN ainsi qu'un Ag grippal, permettait d'induire des titres en IgG 5 à 10 fois supérieurs à ceux obtenus en séparant

l'adjuvant de l'Ag[279]. Les résultats par voie SC obtenus dans mon travail n'ont montré aucune différence significative entre la co-délivrance et la co-administration des ligands Nods et de l'Ag. En revanche, par voie orale (co-administration) et nasale (co-délivrance), des différences ont été clairement mises en évidence.

Nos données semblent donc indiquer qu'il n'y a pas de réponse tranchée à cette question, du moins avec les ligands, l'Ag et le système particulaire utilisés dans nos études (article N°2).

5. Amélioration du Système d'adressage muqueux et de ciblage des DCs

Nos travaux confirment l'intérêt des NPs de PLA comme vecteur de convoyage muqueux pour une vaccination entérale ou nasale. Des données supplémentaires obtenues grâce au modèle de FAE, présenté dans l'article de Primard *et al.*[158], montrent que le transport de ces nanoparticules est un transport passif dû aux capacités perméables des cellules M. Ces cellules M étant à la fois présentes au niveau intestinal et nasal[444], le rationnel de cette étude a été d'utiliser ces caractéristiques afin de véhiculer la p24 et des ligands Nods au travers de ces muqueuses.

Il est aussi intéressant de noter que la plupart des nano- ou microparticules peuvent être fonctionnalisées avec des ligands (lectines, intégrines, mannose, vitamines) ou des Ac dirigés contre des récepteurs de surface, afin de cibler spécifiquement des tissus ou des cellules[157, 262].

En effet, les lectines sont les molécules les plus étudiées en matière de ciblage des cellules M. Parmi elles, la lectine *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1) a été adsorbée à la surface de NPs afin de cibler des résidus α-L-fucose, exprimés à la surface des cellules M. Ces complexes ont démontré une potentialisation du passage des NPs à travers la muqueuse intestinale chez la souris[445, 446]. Un problème se pose cependant du fait que la lectine UEA-1 n'est pas exprimée par les cellules M humaines. Une autre lectine a cependant été identifiée à la surface des cellules M humaines, le SLAA (Sialyl Lewis A Antigen – CA19-9) et représente donc un motif très intéressant afin de cibler ces cellules et un Ac anti-SLAA a pu être développé[17]. Il semblerait donc nécessaire de tester si son adsorption à la surface des NPs permet d'augmenter la prise en charge de ces dernières.

Les DCs expriment des récepteurs lectines-like tels que les récepteur mannoses DEC-205 et DC-SIGN qui sont souvent décrits comme étant impliqués dans la phagocytose des pathogènes[277]. La formulation des particules avec des Ac ou des motifs mannosilés, permettrait ainsi de favoriser leur prise en charge et ainsi de délivrer de manière plus efficace l'Ag et/ou la molécule immunostimulante transporté(e).

Outre le transport des NPs par les cellules M et l'activation des DCs, les entérocytes présentent aussi un intérêt majeur. Ces derniers expriment en effet des récepteurs Nod et sont capables de sécréter diverses chimiokines (CCL20, CCL9) et cytokines en réponses à des *stimuli*. Ces cellules expriment le récepteur F4 (F4R) spécifique de *fimbriae* bactériennes, ainsi que le TLR4.

L'utilisation de motifs de type *fimbriae* ou LPS adsorbés en surface de NPs, pourrait permettre un ciblage de ces cellules[447].

En parallèle de la fonctionnalisation des particules, les paramètres de taille peuvent aussi influencer le transport dans le mucus. Ainsi, les particules d'un diamètre de 300 nm sont ralenties par rapport aux particules de plus faible diamètre et le mucus semble être imperméable aux particules de taille micronique, ceci explique le choix d'une taille moyenne de 180 – 200 nm dans les travaux de thèse. La charge de surface des particules est également un paramètre important pour leur diffusion dans le mucus. Les particules muco-adhérentes, constituées de chitosane par exemple, portent des charges positives capables de lier les protéoglycanes par des liaisons électrostatiques. Des liaisons trop importantes ne permettent pas aux particules d'atteindre les cellules épithéliales avant d'avoir été éliminées, entraînées par le flux du mucus. Il semblerait que les particules non chargées aient une meilleure diffusion au sein du mucus que les particules chargées, même négativement. Enfin, les particules dont la surface est hydrophile diffusent plus facilement dans le mucus que les particules hydrophobes comme les particules de poly(styrène)[435]. Dans notre cas, on notera que les particules de PLA-Nod-p24 sont chargées négativement avec un potentiel zeta moyen d'environ -30 mV (article N°2).

6. Perspectives

Comme discuté précédemment, nos données illustrent l'intérêt des NPs biodégradables pour orienter la réponse immunitaire, sous réserve de l'adjonction de certains ligands de PRRs et de bien choisir la voie d'administration. Néanmoins, nos résultats ouvrent aussi de très larges perspectives, notamment vis-à-vis de la compréhension des mécanismes mis en jeu. Cette compréhension permettrait de mieux adapter le choix des ligands et des combinaisons de formulations possibles. Par exemple, il serait nécessaire d'approfondir les résultats *in vitro* obtenus sur les MoDCs, en étudiant notamment l'induction d'autophagie, mécanisme important dans la présentation antigénique et influencé par une stimulation Nod2[255]. De même, l'étude mécanistique des différences de présentation croisées, induites par le « loading » de l'Ag et des ligands Nods dans la même ou différentes particules, permettrait d'optimiser les ratios entre différentes particules, ou densité de l'Ag. Par ailleurs, l'étude du transport intracellulaire de chaque formulation permettrait peut-être de corréler transport et présentation antigénique. *In vivo*, nous pouvons aussi envisager d'étudier à plus long terme la mémoire immunologique induite par ces formulations en mesurant la persistance des LB mémoires dans le sang et la rate des souris immunisées ainsi qu'en mesurant la persistance des taux d'Ac dans le sérum et les sécrétions.

Un des aspects non abordé durant ce travail de thèse concerne les différences de qualité des Ac obtenus par les différentes stratégies vaccinales testées. En effet, de plus en plus de données indiquent que c'est la qualité de la réponse vaccinale qui fera un vaccin protecteur et non pas la quantité d'Ac induits. Ainsi, il serait nécessaire d'étudier si la qualité fonctionnelle des Ac induits

par nos formulations contenant des ligands Nods ou le ligand chimérique Nod2/TLR a été améliorée. Le cas de la vaccination VIH illustre bien l'importance de ce point avec la nécessité d'obtenir des Ac neutralisants à large spectre. L'activité ADCC (Cytotoxicité Cellulaire Dépendante de l'Anticorps) et ADCVI (Antibody-Dependent Cell-mediated Virus Inhibition) de ces Ac sera également à évaluer.

Nous aimerions également approfondir l'étude des réponses cellulaires ; nous avons en effet montré les forte réponses CD8 IFNγ lors de la co-délivrance de l'Ag et du ligand par la même particule. Il serait également particulièrement intéressant d'étudier l'induction de réponses CD8 cytotoxiques spécifiques à l'aide de marquages tétramères ainsi que le profil polyfonctionnel des LT par cytométrie en flux multiparamétrique. Les profils cytokiniques sériques et muqueux sont actuellement en cours d'analyse Luminex afin de déterminer le phénotypage Th1/Th2 (IL-12p70, IFNγ, TNFα & IL-4, IL-5, IL-10 respectivement). Enfin, nous espérons également caractériser le phénotype local des lymphocytes après immunisation et notamment, l'induction de lymphocytes Th17 intestinaux après administration par voie muqueuse (ELISpot et luminex Th17 panel). Une étude a effectivement démontré qu'une immunisation intranasale avec de l'OVA induit une réponse immunitaire pro Th17. De plus les lymphocytes T $CD4^+$ activés montrent une augmentation de l'expression du récepteur de chimiokine CCR6, qui est un marqueur des cellules Th17 murines[409].

7. Choix d'un immunogène pertinent en vaccination anti-VIH-1

Dans la mise en place de mon projet de thèse, nous avons choisi la protéine de capside p24 comme Ag modèle. En effet, notre équipe possède un très bon recul sur l'utilisation de cet Ag et sa vectorisation par les NPs de PLA. Cependant, le développement d'un vaccin prophylactique induisant des réponses muqueuses neutralisantes, réside dans le choix d'un immunogène capable d'imiter la conformation native de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1. En effet ce virus cache ses sites de liaison aux récepteurs dans des motifs cryptiques masqués par des boucles hypervariables des molécules de surface ou par des résidus glycanes[390]. Les glycoprotéines d'enveloppe sont responsables de la liaison avec les récepteurs de l'entrée virale et, par leur position à la surface du virus, sont des cibles idéales pour les Ac neutralisants. Des études ont montré que la gp120, par exemple, joue un rôle crucial durant les phases précoces de l'infection car elle peut se lier très spécifiquement aux lymphocytes T $CD4^+$ muqueux grâce à l'intégrine α4β7 présente à leur surface[312]. De plus, récemment, des Ac neutralisants à large spectre spécifiques de la gp120 ont été décrits dans la littérature[448, 449]. En effet, le PG9 et le PG16 peuvent reconnaitre à la fois les régions V1V2 de la gp120 ou des régions riches en glycans[450]. L'Ag gp41 est lui aussi un immunogène très intéressant pour plusieurs raisons. Il est très conservé au sein des différentes souches de VIH-1 et participe à la fusion virus/cellule. Le Z13, 2F5 et le 4E10 sont des Ac monoclonaux, ciblant la gp41, à large spectre de neutralisation, bien décrits dans la

littérature[129, 451]. Enfin des études ont montré que la gp140 permet d'induire de fortes réponses muqueuses neutralisantes après administration par voie systémique et muqueuse[452]. En effet, l'administration par voie vaginale chez la souris de la gp140 trimérique couplée à la transferrine permet d'induire en absence de molécules adjuvantes de forts taux IgG et d'IgA anti-gp140 systémiques et muqueux. L'ensemble de ces données indique clairement que les immunogènes les plus pertinents pour l'induction de réponses muqueuses neutralisantes doivent contenir la gp120 et une partie de la gp41. Dans cette optique, nous allons tester l'adsorption de la gp140 (hybride gp120/gp41 sans le domaine transmembranaire) sur les NPs de PLA-Nods afin d'immuniser des lapins et voir si ce type de stratégie permet d'induire des réponses neutralisantes au niveau des muqueuses. L'activité neutralisante des IgG et IgA présentes et purifiées à partir du sérum, des fèces ainsi que des lavages vaginaux, sera mesurée dans un test de neutralisation sur PBMCs infectés à l'aide de différents isolats primaires de type Tier1 et Tier2[453, 454]. Ce travail va être démarré par le laboratoire d'accueil à l'automne 2013, grâce à un financement Sidaction/Pierre Bergé, obtenu suite aux résultats préliminaires sur l'utilisation des PLA-Nod2.

8. Choix des voies d'administrations muqueuses et vaccination anti-VIH-1

Le problème de l'infection pandémique du VIH présente des défis supplémentaires en ce qui concerne, à la fois l'innocuité et l'efficacité des vaccins, en particulier pour les vaccins vivants atténués. Aussi, malgré les résultats très encourageants ontenus par la généralisation des traitements anti-rétroviraux, l'objectif de la recherche en 2013, reste la mise au point d'un vaccin VIH prophylactique permettant, en cas d'exposition au virus, de prévenir l'infection. Les avancées méthodologiques de cette dernière décennie permettent une meilleure compréhension du MALT et facilite le développement de nouvelles approches vaccinales, basées sur des administrations par voie muqueuse, même si des études sont toujours nécessaires pour déterminer quelle voie d'administration sera la plus prometteuse pour permettre une mémoire immunologique à long terme. De même, la physiopathologie de l'infection par le VIH ou le SIV, est de mieux en mieux connue et indépendamment de la voie de transmission, ces deux virus provoquent une déplétion rapide des cellules $CD4^+$ T auxiliaires au niveau des sites muqueux effecteurs de l'intestin et génito-urinaires. Ainsi, un vaccin efficace anti-VIH-1 devrait pouvoir éliminer le virus dans tous les sites muqueux effecteurs. Nos résultats montrent qu'un complexe PLA-p24 adjuvanté avec le ligand Nod2 est capable d'induire des réponses immunitaires efficaces dans le tractus gastro-intestinal par voie entérale et au niveau de la muqueuse vaginale par voie nasale. Nous avons aussi montré des réponses similaires par voie SC avec une molécule chimérique Nod2/TLR2. L'ensemble de ces deux observations suggère ainsi que la combinaison de deux voies d'administration, muqueuse et parentérale, associées avec l'emploi d'une molécule chimérique pourrait permettre d'induire des réponses immunitaires au niveau des tissus muqueux vaginaux et intestinaux, tissus cibles du VIH-1, tout en induisant de fortes réponses systémiques.

Bien que de telles approches aient déjà été décrites dans quelques études[129], des recherches utilisant des NPs et des ligands Nod n'ont pas encore été rapportées et sembleraient justifiées.

CONCLUSION GENERALE

Les progrès dans notre compréhension du système immunitaire permettent de mieux en mieux de comprendre comment il est possible de stimuler et/ou d'orienter les réponses B et T. Ces progrès ont vu naître une nouvelle stratégie d'adjuvantation ciblant des PRRs précis et ainsi ouvrir le champ au développement de vaccins de plus en plus efficaces et, notamment, inducteurs de réponses immunitaires protectrices muqueuses. Le grand nombre d'études actuellement menées dans ce domaine ainsi que l'homologation d'un premier adjuvant contenant un ligand TLR (AS04), indiquent qu'un grand nombre de vaccins sûrs et efficaces, contenant ces molécules, seront disponibles dans le futur.

Cette thèse s'est directement inscrite dans cette thématique en montrant le potentiel immunostimulant d'agonistes des récepteurs Nod1 et Nod2, vectorisés par un système particulaire biocompatible, pour l'induction de réponses immunitaires systémiques et muqueuses.

Il faut cependant rester vigilant et garder à l'esprit qu'un long chemin reste encore à parcourir avant de pouvoir procéder à des essais chez l'Homme. Il faut en effet être conscient que ce type de formulation peut engendrer des réactions inflammatoires pouvant potentiellement conduire à des chocs septiques. Ainsi, les systèmes particulaires pourraient permettre de diminuer les doses de ligands administrées, réduisant ainsi les effets secondaires de la molécule vectorisée. De plus, les voies muqueuses et notamment la voie entérale, pourrait s'avérer moins risquées qu'une administration parentérale, du fait d'une certaine tolérance.

Ce travail de thèse s'est basé sur des études *in vitro* sur des cellules humaines et sur des essais *in vivo* chez la souris. Pourrait-on imaginer les mêmes données chez l'Homme ? En effet, le système immunitaire humain, dans son ensemble, est très différent de ces modèles et les patterns d'expression des récepteurs Nods ne sont très probablement pas identiques à ceux de la souris. Les modes d'administration seraient aussi différents, alors que nous avons déposé des gouttes en intranasale chez la souris, il faudrait plutôt penser à une forme de spray pour un usage humain, comme le vaccin grippal Flumist™, ce qui impliquerait de tester de très nombreux paramètres, comme l'efficacité de la délivrance des particules et leur prise en charge. Il en est de même pour la voie orale, de très nombreux travaux seront nécessaires, afin d'optimiser la formulation finale d'un candidat vaccin sous unitaire, à base de particules et d'agonistes de PRRs. Néanmoins, même si le chemin est encore long, l'utilisation de particules biodégradables, de par leur potentiel de vectoriser de multiples adjuvants, permettra de concevoir une nouvelle génération de vaccins sous-unitaires, dénués de toxicité et ainsi plus acceptable par la société civile.

ANNEXE

Revue : “New Insights in Mucosal Vaccine Development.”

Vaccine. 2012 Jan 5;30(2):142-54.

Vaccine 30 (2012) 142–154

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Review

New insights in mucosal vaccine development

Vincent Pavot[a,1], Nicolas Rochereau[b,1], Christian Genin[b], Bernard Verrier[a], Stéphane Paul[b,*]

[a] Institut de Biologie et Chimie des Protéines, FRE 3310 CNRS University of Lyon 1, IFR128 Biosciences Lyon-Gerland, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07, France
[b] Université de Lyon, Université Jean Monnet de Saint-Etienne, GIMAP, EA3064, F-42023 Saint-Etienne, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 May 2011
Received in revised form 25 October 2011
Accepted 1 November 2011
Available online 12 November 2011

Keywords:
Vaccines
Mucosal
Routes
Antigen
Delivery

ABSTRACT

Mucosal surfaces are the major entrance for infectious pathogens and therefore mucosal immune responses serve as a first line of defence. Most current immunization procedures are obtained by parenteral injection and only few vaccines are administered by mucosal route, because of its low efficiency. However, targeting of mucosal compartments to induce protective immunity at both mucosal sites and systemic level represents a great challenge. Major efforts are made to develop new mucosal candidate vaccines by selecting appropriate antigens with high immunogenicity, designing new mucosal routes of administration and selecting immune-stimulatory adjuvant molecules. The aim of mucosal vaccines is to induce broad potent protective immunity by specific neutralizing antibodies at mucosal surfaces and by induction of cellular immunity. Moreover, an efficient mucosal vaccine would make immunization procedures easier and be better suited for mass administration. This review focuses on contemporary developments of mucosal vaccination approaches using different routes of administration.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction 142
   1.1. Registered human mucosal vaccines (Table 1) 143
2. Mucosal routes of immunization 145
   2.1. Oral delivery of vaccines (Table 2) 145
   2.2. Other oral routes (Table 4) 147
   2.3. Nasal delivery of vaccines (Table 3) 147
   2.4. Vaginal delivery of vaccines (Table 4) 149
   2.5. Other vaccine mucosal routes (Table 4) 150
3. Conclusions 151
   Acknowledgements 151
   References 151

1. Introduction

The epithelial lining of mucus membranes covers an area of several hundred square metres in an adult. Mucosal surfaces are mainly represented by the gastrointestinal, the respiratory and the urogenital tracts and therefore are vulnerable to infection by pathogenic microorganisms. Mucosal surfaces are protected from external attacks by physicochemical defence mechanisms, innate and adaptive mucosal immune systems which are designed to distinguish antigens that enter the body through mucosal surfaces from those introduced directly into the bloodstream. The mucosal immune system can principally be divided into inductive and effector sites. Antigens are sampled from mucosal surfaces either through collaboration with professional antigen-presenting dendritic cells (APCs), or by producing a specialized epithelial phenotype, the M cell and then stimulate cognate naive T and B lymphocytes [1]. Epithelial barriers on mucosal surfaces at different sites in the body differ dramatically in their cellular organization, and antigen sampling strategies at diverse mucosal sites are adapted accordingly. Multilayered squamous epithelia line the oral cavity, pharynx, esophagus and urethra whereas the intestinal mucosa is covered by only a single cell layer, and the airway and vaginal lining varies from pseudo-stratified to simple epithelium. These diverse epithelia are not impenetrable barriers, but rather are cell assemblies that control cross-talk between the lumen and the lamina propria using multiple antigen sampling strategies. In stratified and pseudo-stratified epithelia, antigen-processing

* Corresponding author. Tel.: +33 477828975.
E-mail address: stephane.paul@chu-st-etienne.fr (S. Paul).
[1] The first two authors contribute equally to the work.

0264-410X/$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.vaccine.2011.11.003

dendritic cells serve as motile "scouts" that move into the epithelium, obtain samples of luminal antigens, and migrate back to local or distant organized lymphoid tissues. In simple intestinal and airway epithelia whose intercellular spaces are sealed by tight junctions, specialized epithelial M cells deliver samples of foreign material by transepithelial transport from the lumen to organized lymphoid tissues within the mucosa [2,3].

At the immune effector sites level, such as *Lamina propria* (LP), where the effector cells locally controlling foreign agents, secretory antibodies are induced, especially secretory IgA (SIgA) but also IgM. IgA is the major isotype in secretions, the most important being those of the epithelium lining the intestinal and respiratory tracts whereas IgG is the principal isotype in the blood and extracellular fluid [4]. IgG effectively opsonises pathogens for engulfment by phagocytes and activates the complement system. In contrast IgA is a less potent opsonin and a weak activator of complement. IgA operates mainly on epithelial surfaces where complement and phagocytes are absent, and therefore IgA function chiefly as a neutralizing antibody. Animal viruses or bacteria infect cells or host by binding to a particular cell-surface receptor, often a cell-type-specific protein that determines which cells they can infect (virus) or cell-surface molecules called adhesions that enable them to bind the surface of host cells (bacteria). Antibodies against those patterns can inhibit these adhesive reactions and prevent infection. IgA antibodies secreted onto the mucosal surfaces of the intestinal, respiratory, and reproductive tracts are particularly important in preventing infection by inhibiting the adhesion of bacteria, viruses, or other pathogens to the epithelial cells lining these surfaces [5]. The adhesion of bacteria to cells within tissues can also contribute to pathogenesis, and IgG can protect from damage as IgA protect at mucosal surfaces.

IgA-secreting plasma cells are found predominantly in the LP. At this level, IgA can be transported across the epithelium to its external surface and are secreted as a dimeric IgA molecule associated with a single J chain. This polymeric form of IgA can be endocytosed at the basolateral surface by the poly-Ig receptor (pIgR), then transcytosed and finally secreted into the lumen, where it can combine with antigen to form immune complexes. The extracellular portion of the pIgR still attached to the Fc region of the dimeric IgA may help to protect it from degradation [6]. The neonatal Fc Receptor (FcRn) plays also a role in mucosal immunity during the passive delivery of IgG from mother to young via the placenta or the intestinal route. In adult, it can also transport IgG across mucosal surfaces to confer resistance to intestinal pathogens and therefore use to deliver antigens fused with an IgG Fc fragment through mucosal surfaces [7].

Mucosal associated lymphoid tissue (MALT) is the principal mucosal inductive site where immune responses are initiated. LP is considered to be an effector site which is also important for expansion and terminal differentiation of B cells. MALT comprises approximately 80% of immune cells in the body and is the largest lymphoid system in mammals [8]. It has three major functions: (1) the protection of mucosal surfaces against colonization and invasion by microbial pathogens, (2) the prevention of the internalization of commensal bacteria or antigens as non-degraded proteins derived from food and environment, and (3) induction of tolerance against innocuous soluble substances, as well as commensal bacteria. Mucosal effector sites are formed by a surface epithelium with a concentration of intraepithelial T lymphocytes (IEL) and secretory antibodies (especially SIgA). Sub-epithelial compartment, or chorion, is an effector site where pile up effector cells (NK-like cells, macrophages, B and T cells). Antigen presenting cells (APC) including dendritic cells (DCs), sentinels of the immune system, are also present in the mucosal lymphoid tissue, to detect foreign agents.

It should be notified that mucosa are naturally highly exposed to huge amount of antigens every days so different regulation mechanisms exist in a manner that does not result in untoward immune reactions. Those mechanisms are called immune tolerance and depend of the dose of antigen: anergy/deletion (high dose) or regulatory T-cell (Treg) induction (low dose). It has been shown in mice that tolerance to oral antigen requires CD8+ T cells for local suppression of IgA responses [9]. In contrast, recognition of foreign agents as pathogens requires the recognition of pathogens-associated molecular patterns (PAMPs), like LPS or flagellin. PAMPs are danger signals which are recognized by pathogen recognition receptors (PRRs) like Toll-like receptors (TLR) or Nod-like receptors (NLR) expressed by cells of the innate immune system and present in quantities at mucosal sites both in animal models and in humans. The role and the high expression of NOD1 receptor have been described in lungs during asthma [10] and in intestinal mucosa for inflammatory bowel diseases (IBD) [11]. NOD2 receptor is also involved in IBD and expressed on the intestinal mucosa of Crohn patients [12]. TLR7 expression has been described in the human intestinal mucosa as TLR4 has been shown to be expressed at the genital level.

It's now well described that local mucosal immune responses are important for protection against diseases which occur mainly by those routes. Topical application of a vaccine may be necessary to induce a protective immunity. In some cases, systemic IgG are sufficient to protect against occurring mucosal infections such as poliovirus. Mucosal vaccines could induce in certain conditions with the use of appropriate adjuvants, both systemic IgG, protective SIgA and CTL responses against pathogens [13]. By the migration of IgA antibody-secreting cells (ASCs), local mucosal immunization could lead to antigen-specific IgA production at distant mucosal sites [14]. In contrast, traditional injected vaccines are generally poor inducers of mucosal immunity and are therefore less effective against infections at mucosal sites [4,15]. In a practical way, they are easily administered (e.g. oral route), and therefore more accessible to developing countries. As soluble antigens are not efficiently uptake when administered by mucosal routes, and generally induce immune tolerance, mucosal immunization requires adjuvants and/or efficient carrying vehicles as delivery systems. The ideal mucosal vaccine should: (1) preserve vaccine antigens from enzymatic or chemical degradation (2) limit their elimination or excessive dilution in organism, (3) facilitate the preferential uptake of antigen by specialized NALT/GALT/BALT M cells in order to target APC, dendritic cells or epithelial cells, (4) facilitate the co-uptake of both antigen and adjuvant to APCs in order to stimulate appropriate specific immunity as neutralizing SIgA and/or helper and cytotoxic T lymphocytes. Secretory antibodies may block the colonization of the mucosal epithelium by pathogens or prevent attachment of microbial toxins on epithelial cells, and then cytotoxic T cells could eliminate infected cells and prevent microbial invasion.

This review focuses on new vaccinal approaches using different mucosal routes to induce appropriate mucosal and systemic immune responses. At first, we describe the different mucosal vaccines that are currently used in clinical practice and then we will develop different approaches to improve the effectiveness of mucosal vaccination.

1.1. Registered human mucosal vaccines (Table 1)

Only seven vaccines are routinely administered mucosally to humans. They target five of the main enteric pathogens (Table 1): poliomyelitis, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, rotavirus, and influenza whereas vaccines are still lacking against the two other most important causes of enteric diseases, enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and Shigella.

Poliomyelitis is due to poliovirus which enters the organism through oral route and cross the intestinal epithelial lining through M cells and enterocytes. In approximately 0.1–2% of cases, the virus

Table 1
Licensed vaccines against mucosal infections.

Infection	Vaccines	Route of immunization	Commercial name/producer	Reference
Poliomyelitis	Inactivated polio vaccine	Subcutaneous/intramuscular	Salk vaccine	[16]
	Live attenuated polio vaccine	Oral	Many	[18–20]
Cholera	Cholera toxin B subunit & inactivated *V. cholerae* 01 whole cells	Oral	Dukoral (SBL Vaccin)	[21,24]
	Live attenuated *V. cholerae* 01 strain (CVD 103.HgR)	Oral	Orochol (Bern, SSVI)	[25–27]
Typhoid	Vi polysacharide	Subcutaneous/intramuscular	typhimVi (Aventis)	[28,29]
	Ty21a live attenuated vaccine	Oral	Vivotif (Bern, SSVI)	[30]
Rotavirus	Live attenuated monovalent human rotavirus strain	Oral	RotaRix (GSK)	[24,35,36]
	Pentavalent live vaccine	Oral	RotaTeq (Merck)	[37,38]
Influenza	Live attenuated cold-adapted influenza virus reassortant strains	Nasal	Flumist (MedImmune)	[40,41]

invades the nervous system and causes total paralysis in a matter of hours. Two vaccines have been developed against poliomyelitis: the injectable inactivated polio vaccine (IPV) and the oral polio vaccine (OPV). The first one was developed by Jonas Salk in 1952, containing the three serotypes inactivated by formalin [16]. Since 1978, the eIPV form (enhanced) is used for vaccination. This vaccine is administered subcutaneously or intramuscularly three times, and provides systemic immunity that protects vaccinated people. However, the intestinal mucosal response remains low, and this vaccine therefore is not sufficient to prevent the spread of the virus through fecal-oral route. The oral polio vaccine (OPV) is the main type of the classical oral-mucosal vaccines and there is no vaccine that is more amenable to mass immunization. Indeed, it requires only the installation of few drops into the subject's mouth, at whatever age. OPV is a live-attenuated vaccine developed by Sabin [17] and produced by passage of the virus through non-human cells at a sub-physiological temperature, which produces spontaneous mutations into the viral genome. Three doses of live-attenuated OPV induce systemic and mucosal-neutralizing antibodies against the three poliovirus types in more than 95% of recipients. OPV produces a local SIgA immune response in the intestine, the primary site of wild poliovirus entry, which helps to prevent infection against wild type virus in endemic areas [18]. OPV induces also antibodies production in the blood that will protect against myelitis by preventing the spread of poliovirus to the nervous system [19]. This vaccine has also served as a useful tool for elucidating fundamental aspects of mucosal immunity in humans [20]. Today, OPV is recommended for routine immunization in the United States. IPV produces less gastrointestinal immunity than does OPV, and primarily acts by preventing the virus from entering the nervous system. In regions without wild-type poliovirus, inactivated polio vaccine is the vaccine of choice because of the reduced risk of exposure and the continued occurrence of vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) after oral polio vaccine (approximately 1 of 2.5 million OPV doses) [18]. In regions with higher incidence of polio, and thus a different relative risk between efficacy and reversion of the vaccine to a virulent form, live-attenuated vaccine is still used.

V. cholerae causes severe diseases and exerts its powerful diarrheagenic effect via the intoxication of enterocytes with the cholera toxin (CT). Only two serogroups express the CT: O1 and O139. Despite attempts to injectable cholera vaccines, which did not induce significant gut mucosal immune responses, two improved oral cholera vaccines have become available but none in the USA. The most widely used is Dukoral™, which is given by mouth. Each dose contains approximately 2.5×10^{10} inactivated *V. cholerae* O1 of Inaba and Ogawa serotypes (classical & El Tor biotypes) and the recombinant non-toxic B-subunit of cholera toxin (CTB). Dukoral™ has been proved to be safe and stable with a large efficacy and effectiveness [21]. A second non-living cholera vaccine, Shanchol™ was recently licensed in India [22,23] and contains killed-whole-cell *V. cholerae* O139 and O1 and is not combined with CTB.

Protection is essentially mediated by local production of antitoxin and antibacterial SIgA antibodies in the gut [24]. Today, it is available in over 60 countries. The second internationally licensed oral cholera vaccine is the live attenuated vaccine CVD 103-HgR, containing a genetically manipulated classical *V. cholerae* O1 Inaba strain with a deletion in the gene encoding the cholera toxin [25]. The vaccine has been proved to be safe and to generate immune responses (blood IgG and IgA antitoxin) in more than 72% of healthy volunteers from industrialized countries [26]. Unfortunately, its efficacy has not been demonstrated in clinical trials on a large scale in endemic areas (Indonesia), perhaps due to antigenic dose too low and too weak to affect cholera during the study period [27]. Originally registered in Switzerland, it is currently not available. Despite oral cholera whole-cell killed vaccines (Dukoral™) can provide significant protection, further efforts are still required to provide more effective protection of young children.

Typhoid fever is a serious systemic infection, caused by the enteric pathogen *Salmonella enterica* serovar Typhi, a highly virulent and invasive enteric bacterium and characterized by persisting high fever. Two new-generation of typhoid vaccines have replaced the old, reactogenic inactivated whole-cell vaccine used in the past. These new-generation vaccines – live, oral Ty21a and injectable Vi polysaccharide – have been shown in large-scale clinical trials to be safe and efficacious, and are internationally licensed for people aged >2 years [28]. The Vi capsular polysaccharide vaccine (ViCPS) is the most generally used vaccines recommended by the World Health Organisation (WHO). This vaccine is injected either under the skin or into a muscle at least seven days before travelling to the typhoid-affected area. Typhim Vi™ (Sanofi-Aventis) is well tolerated and is assumed to protect by way of serum antibodies [29]. The mucosal licensed vaccine against typhoid fever is the orally administered live attenuated Ty2 strain of *S. typhi*. It was developed in the early 1970s in which multiple genes, including the genes responsible for the production of Vi, have been mutated chemically. Ty21a is well tolerated and two formulations were licensed: enteric-coated capsules and a liquid formulation. In two trials in school-aged children in Chile, the enteric-coated capsule version was found to be 33.2% protective after 36 months, 67% after 3 years and 62% after 7 years, whereas the liquid formulation was 77% protective after 3 years and equally protective after 7 years of observation [30,31]. Those studies demonstrated that the formulation, the number and the spacing between the doses administered influence the level of protection. It has been shown that oral immunization with Ty21a induces mucosal bacterial antigens specific sIgA and systemic IgG against the O polysaccharide. Moreover, Kantele et al., shown that oral, but not parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that all bear the $\alpha 4\beta 7$ which guides the lymphocytes to home to the gut mucosa [32]. Those responses are responsive for the protective effect of the oral vaccine.

Rotaviruses together with ETEC are the leading cause of severe diarrhea among infants and young children. Each year, more than

Table 2
Oral delivery of vaccines.

Delivery strategies	Examples	Responses	Model	Reference
PLA or PLGA nanoparticles	PLG-encapsulated CS6 antigen from *E. coli*	– IgA antibody-secreting cell responses ↗ – Serum IgG responses ↗	Human	[50]
	Lotus tetragonolobus from Winged or Asparagus pea anchored PLGA nanoparticles	– Mucosal and systemic response ↗	Mouse	[76]
Liposomes	Plasmid DNA pRc/CMV HBS encoding the small region of hepatitis B surface antigen (HBsAg) into Lipodine liposomes	– IgA responses ↗	Mouse	[53]
	L-BLP25 (liposomal formulation of BP25 lipopeptide, MPL® and three lipids)	– Median survival time of 4.4 months longer	Human	[55]
Bacterial ghost	*Escherichia coli* O157:H7 bacteria ghosts	– Cellular and humoral immunity ↗	Mouse	[58]
Plant lectins/adjuvants	Mistletoe lectin 1, tomato lectin, *Phaseolus vulgaris*, wheat germ agglutinin (WGA), and *Ulex europaeus 1*	– Serum and mucosal antibody responses ↗	Mouse	[67,68]
	Rice-based vaccine that expressed cholera toxin B subunit	– Production of specific serum IgG and IgA antibody after three intra nasal or oral doses ↗	Mouse	[65]
Transgenic plants (bioreactors)	Plant-based rotavirus VP6	– High titers of anti-VP6 mucosal IgA and serum IgG ↗	Mouse	[62]
	Recombinant LT-B in transgenic corn	– Both serum IgG anti-LT and numbers of specific antibody secreting cells ↗	Human	[63]

↗: Increase.

500,000 children die from diarrheal disease caused by rotavirus [33]. Most rotavirus strains belong to one of five antigenic groups. A quadrivalent vaccine based on a Rhesus monkey rotavirus strain equipped with human rotavirus genes was licensed for a short time (RotaShield™), but it was discovered that the vaccine may have contributed to an increased risk for intussusceptions, or bowel obstruction, in one of every 12,000 vaccinated infants [34]. Today, two oral vaccines are licensed: Rotarix™ (GlaxoSmithKline) and Rotateq™ (Merck). The first one is a human, live attenuated rotavirus vaccine containing a rotavirus strain of G1P specificity. Rotarix™ is indicated for the prevention of rotavirus gastroenteritis caused by G1 and non-G1 types (G3, G4, and G9) when administered as a 2-doses series in infants and children. This vaccine has shown good safety, and when tested in an efficacy trial in Brazil, Mexico and Venezuela, it conferred 61–92% protection against rotavirus hospitalizations [35]. The licensure of Rotarix™ is in process in the European Union [36]. The other oral attenuated vaccine (RotaTeq™) is also licensed in the United States, Canada, and other countries [37]. This is a pentavalent reassortant bovine-human vaccine generated to contain human rotavirus genes for each of the main rotavirus serotypes (P, G1, G2, G3 and G4). In Finnish infants, three doses of vaccine in different concentrations gave 58–74% protection against any rotavirus disease [38]. Intestinal IgA is probably the most important mechanism for long-term protection against rotaviruses and correlates of protection after vaccination may vary depending on the type of vaccine studied. For some heterologous vaccines, serum antibodies may not provide adequate correlates of protection; for homologous vaccines serum IgA may reflect antiviral immunity. Doubts exist concerning the importance of subtype immunity to rotaviruses and the lack of a clear understanding of the protective immunity is an important limitation of current vaccine development [39].

Influenza vaccines are available either by injection, flu shot of trivalent inactivated vaccine, or nasal spray of live attenuated influenza vaccine, Flumist™. Injectable vaccines work by induction of serum antibodies, mainly IgG, which prevent systemic spread of the pathogen and which may also, through transudation, exert a local protective effect at the mucosal surfaces of the lower respiratory tract. However, this vaccine induces poorly mucosal IgA antibodies and cell-mediated immunity. In contrast, Flumist™ may elicit a long-lasting, broader immune (humoral and cellular) response, which more closely resembles natural immunity [40]. Both mucosal and systemic immunity contribute to resistance to influenza infection and disease. Locally produced SIgA antibodies to virus surface hemagglutinin and neuraminidase are important for protection of the upper respiratory tract and corresponding serum IgG antibodies for protection of the lower respiratory tract and against viremia. Cell-mediated immunity, mainly against virus matrix and nucleoprotein antigens, does not protect against infection, but is important for clearance of viruses and recovery from illness. The nasal vaccine induces significantly higher local IgA antibodies in nasal washings and local cell-mediated immunity but less high serum antibody titers than the injectable vaccine. Despite these differences in immune responses, the two types of vaccine have comparable protective efficacy (60–90%), and in elderly people, their combined use may increase the efficacy compared with the use of either vaccine alone [40]. Flumist was the first and (as of 2007) the only live attenuated vaccine for influenza available outside of Europe using mucosal route. In September 2009, an intranasal vaccine Flumist™ for the novel H1N1 influenza virus was also approved in the United States [41].

To date the number of mucosal registered vaccines for human application remains very limited and are principally based on live attenuated pathogens and/or vectors, which contain their own danger signals and mechanisms of mucosal entry. However, there is a risk of reversion. Subunit vaccines could be a safe alternative but the hurdles are far more daunting than live attenuated vaccines. Many efforts are made to improve the immunogenicity and the safety of mucosal vaccine with a particular emphasis on the use of adjuvants but also and above in the use of new improved routes of administration.

2. Mucosal routes of immunization

2.1. Oral delivery of vaccines (Table 2)

Oral delivery of vaccines is an attractive mode of immunization because of its acceptability and its simplicity of administration. Indeed, as shown before, current internationally licensed mucosal vaccines are predominantly live-attenuated and are mostly administered by oral routes. The GALT play a central role in the induction of oral tolerance and immunity to infectious agents. In PP, DCs are separated from the intestinal lumen by the follicle-associated epithelium (FAE). It allows transfer of pathogens in lymphoid tissue through Microfold (M) cells [42]. Apical surface of M cells has little glycocalyx, presumably aiding antigen uptake, and the

basolateral membrane is heavily invaginated, both shortening the distance of cytoplasm to be traversed by antigens and accommodating the closely associated lymphoid cells. Antigen is then captured by DCs, causing their maturation and their migration to the intrafollicular areas [43]. M cells represent a potential portal for oral delivery of peptides and for mucosal vaccination, since they possess a high transcytotic capacity and are able to transport a broad range of materials. Although the mucosal immune system comprises several anatomically remote and functionally distinct compartments, it is firmly established that the oral ingestion of antigens induces humoral and cellular responses not only at the site of antigen exposure but also in other mucosal compartments [44]. This is due to the dissemination of antigen-sensitized precursor B and T lymphocytes from the inductive to the effector sites.

A lot of oral vaccine development studies are performed in animal models and it is very important to keep in mind that often animal model cannot be extrapolated to human. Indeed, size, number, distribution, and composition of Peyer's patches may vary depending on species or strain. For example, Peyer's patches are generally smaller in Fischer 344 rats than in Wistar rats [45]. Moreover, it is unknown whether human ILFs have properties similar to the murine counterparts. However, irregular lymphoid aggregates, which may have germinal centres (GCs) with follicular dendritic cells, are induced in chronic inflammatory bowel disease lesions [46] although the function of these ILF-like structures remains elusive [47]. Animal vaccines studies should take into account these differences.

Several strategies, shown in Table 2, including the use of biodegradable polymeric particles and liposome, have been tested. Antigens, adjuvants, and targeting molecules could be incorporated individually or in combination into these microparticles. These vehicles may thus act as immune-stimulants while preventing the degradation of immunogens by enzymes in the gastro-intestinal (GI) tract. These particulate formulations might also interact with M cells and release immunogens slowly, consequently promoting phagocytosis. As an example, PLA (poly(lactic acid)) or PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) nanoparticles are suitable protein carriers offering antigen protection, increased penetration across mucosal surface and controlled release of encapsulated antigen [48]. The efficacy of these microparticles has been tested in several animal studies and in a limited number of clinical trials. Interesting results were revealed in mouse model by their capacity to cross *in vivo* epithelial barriers or to be taken up by mucosal DCs [49]. In humans, oral delivery of PLG-encapsulated CS6 antigen from *E. coli* induces mucosal IgA responses. However, differences between immune responses that were generated by encapsulated and non-encapsulated antigen were not significantly different [50]. Further clinical studies are needed to assess the effectiveness of vector such as PLA or PLGA particles.

Oral delivery of DNA vaccines encoding various antigens has also been evaluated in various animal studies. The pitfall associated with this strategy is the low uptake of DNA from the intestinal tract, which consequently limits B and T cell immune responses [51]. It was also suggested that PLGA nanoparticles were promising carriers for plasmid DNA vaccine and might be used to vaccinate fish by oral approach. Indeed they showed that after oral administration, FITC-labeled PLGA nanoparticles were detected in blood of fish, and RNA containing major capsid protein (MCP) gene information existed in various tissues of fish 10–90 days [52]. Another study has incorporated plasmid DNA pRc/CMV HBS encoding the small region of hepatitis B surface antigen (HBsAg) into Lipodine liposomes. They showed that, after oral immunization of mice, the complex revealed that secreted IgA responses against the encoded HBsAg were substantially higher after dosing with 100 μg liposome-entrapped DNA compared to naked DNA [53]. However, clinical experience has been mixed. Serum antibody titres after oral delivery of liposome-encapsulated tetanus toxoid (TT) or diphtheria toxin (DT) to humans were variable and were lower than those observed for animals [54]. In contrast, the use of L-BLP25 (also known as Stimuvax®, a lyophilized, liposomal formulation of BP25 lipopeptide, MPL® and three lipids) into clinical studies demonstrate a well-tolerated profile and elicits a cellular immune response in patients with lung cancer [55].

Recombinant or attenuated strains of various bacteria such as *Salmonella*, *E. coli*, or *Listeria*, have been also used as vectors to deliver antigens into the GALT [56,57]. These vectors not only target the DNA or peptide vaccine construct to APC, but also provide a strong danger signal, acting as natural adjuvants, thereby promoting efficient maturation and activation of dendritic cells [58]. However, immune responses against the vectors eventually predominated over time [59] and glycosylated antigens cannot be produced in bacteria. A large competing population of bacteria importantly diminishes the chances of colonization and subsequent induction of a vigorous immune response. Oral delivery of live attenuated recombinant viruses such as adenoviruses, poxviruses, influenza, herpes viruses, and polioviruses encoding specific antigens has been also tested in several oral vaccine studies. While these viral vectors showed promising results, pre-existing immunity to these viruses may prevent their ability to deliver desired antigens. Moreover, live vaccines, in theory, carry a risk of virulence, and occasionally, they have other vaccine-associated effects. For example, oral polio vaccine contains a live attenuated poliovirus, which can infect the gastrointestinal tract and, subsequently, generate adequate immune protection into the host. The use of this vaccine was discontinued in the United States because of rare cases of vaccine-associated paralytic polio [60]. Today, it was replaced by inactivated poliovirus vaccine. Another live vaccine, RotaShield (Wyeth Ayerst) was also recalled owing to vaccine-related intussusceptions [61].

Despite considerable effort, oral immunization is still limited by several issues that are specific to this route. Typically, the doses that are required to elicit an immune response through the oral route are substantially higher (by up to 100-fold) than those that are required when using injection. This raises the crucial issue of the cost of immunization. Furthermore, oral immunization with non-living vaccines requires the use of carriers and adjuvants, and the safety of exposing the sensitive gastrointestinal tract to these compounds remains to be carefully studied. A completely different solution to this issue has been offered by transgenic plants which can be used as bioreactors for the production of mucosal delivery of protective antigens. This technology shows great promise to simplify and decrease the cost of vaccine delivery. This approach has yielded encouraging results in animals after oral administration of plant-based rotavirus VP6 which induces antigen-specific IgAs, IgGs and passive protection in mice [62]. The same type of approach has also been described in humans after oral administration of recombinant LT-B in transgenic corn [63]. In this study, 78% of volunteers developed rises in both serum IgG anti-LT and numbers of specific antibody secreting cells after vaccination and 44% of volunteers also developed stool IgA.

Furthermore, strong adjuvants such as bacterial enterotoxins (cholera toxin (CT); heat-labile *E. coli* enterotoxin (LT)) have also been successfully used for oral immunization in mice. CT is known to be endocytosed and transported by M cells and delivered into the subepithelial dome region, thereby stimulating immature DCs [64]. Recently, a rice-based vaccine that expressed cholera toxin B subunit is an effective long-term cold chain-free oral vaccine that induces CTB-specific SIgA-mediated longstanding protection against *V. cholerae* – or LT – ETEC-induced diarrhea [65]. However, toxicity of these enterotoxins limits their applications and that's probably why no studies in humans have been reported.

The ability of lectins to activate the immune system may be also exploited for oral administration. Lectins must enhance intestinal absorption by attaching to M cells in PP. For example, *Ulex europaeus 1* (UEA1), a lectin specific for α-L-fucose residues, binds almost exclusively to the surface of mouse Peyer's patch M cells [66]. Plant lectins have been demonstrated to be strong mucosal immunogens, stimulating systemic and mucosal antibody responses after oral or intranasal delivery. Mistletoe lectin-1, tomato lectin, *Phaseolus vulgaris*, wheat germ agglutinin (WGA), and UEA1 stimulated the production of specific serum IgG and IgA antibody after three oral doses in a mouse model [67,68]. However, M cell glycosylation patterns are not common to all species, and it remains to be seen whether it can be used to effectively target human M cells [69]. Human M cells have proven to be largely anonymous, as it has been difficult to isolate enough of such cells for further characterization and functional evaluation. Specific receptor requirements for human M cells and its specific targeting remains an important challenge. M cell targeting in mouse may be achieved using M cell-specific lectins, toxins, or nanoparticles. Recently, the first specific monoclonal antibody (mAb NKM 16-2-4) targeting murine M cells; has been described [70]. They used this antibody as a carrier for M cell-targeted mucosal vaccine. Oral administration of tetanus toxoid or botulinum toxoid conjugated with NKM 16-2-4, together with the mucosal adjuvant cholera toxin, is able to induce high-level of antigen-specific serum IgG and mucosal IgA responses.

IgA also adhere to M cell apical membranes by reverse transcytosis, regardless of its antigen specificity [71]. This was first observed in suckling rabbits as a local accumulation of milk SIgA on M cells of Peyer's patches [72]. This observation suggested it might be possible to exploit IgA for M cell targeting. However, this would require that the foreign epitope be inserted without affecting the molecular folding of secretory component (SC) or the assembly and the function of SIgA. Also, the site of insertion must be surface-exposed, and the inserted epitope must be immunogenic. *Shigella flexneri* invasin B epitope has been inserted into SC, which, following reassociation with IgA was delivered orally to mice. This immunization elicits both a systemic and mucosal response against the inserted epitope, thereby suggesting that recombinant SC IgA complexes could serve as a mucosal vaccine delivery system [73].

Although oral vaccines have several attractive features, the limited numbers of approved oral vaccines attest to the challenges associated with mucosal vaccine design. Studies involving oral vaccine use have been limited due to several challenges, such as difficulties in the collection and processing of external secretions, a lack of standardized assays, the induction of tolerance, the stability of antigens in the harsh conditions of the GI tract, and the antigen–microbial interactions that are continuously occurring in the large intestine [74]. Five of six approved vaccines (Table 1) are live attenuated vaccines, which are administered via the same route as the natural infection route of the corresponding pathogen and closely mimic the original pathogen. Although live attenuated vaccines are generally very effective, they may induce more adverse reactions than subunit vaccines. Additionally, in contrast to inactivated vaccines, live attenuated vaccines carry the risk of reassortment with wild type pathogens, thereby regaining their pathogenicity and not all pathogens can be attenuated for live vaccines. Subunit vaccines, however, have the disadvantage of being less immunogenic and therefore require potent delivery systems [75].

2.2. Other oral routes (Table 4)

The potential of the oral mucosa route, including buccal (the cheek lining), sublingual (underside of the tongue), and gingival mucosa, for administering vaccines is gaining increased interest because of recent studies indicating that this route may favour induction of broadly disseminated mucosal and systemic immune responses [76,77] and may offer a safer alternative to nasal delivery vaccines. Moreover, vaccine formulations administered by this route are directly bring in the bloodstream without passing through the intestine or liver and thereby are not subject to the degradation or the tolerance associated with gastrointestinal administration. Sublingual administration of a variety of soluble, as well as particulate antigens, including live and killed bacteria and viruses, can evoke a broad spectrum of immune responses in mucosal and extra-mucosal tissues, ranging from secretory and systemic antibody responses to mucosal and systemic cytotoxic T-cell responses [78]. Nowadays, sublingual route is only use in human for allergen-specific immunotherapies [79] and there is no background about immune responses to vaccines by this route except in mice. Therefore, sublingual mouse mucosa has been studied and it has been shown that within 2 h after sublingual administration with cholera toxin (CT), significantly higher numbers of MHC class II + cells accumulated in the sublingual mucosa. In reconstitution experiments using OVA-specific CD4+ or CD8+ T cells, sublingual vaccination elicited strong Ag-specific T cell proliferation mainly in cervical lymph nodes (CLN) [80]. Cuburu et al. [77] have recently reported in mice that sublingual administration of human papillomavirus virus-like particles (VLPs) with or without the CT adjuvant induced HPV-neutralizing Abs in serum, virus-specific Abs in genital tissues and conferred protection against genital challenge with HPV pseudovirions. Those findings are very promising for the development of vaccines against sexually transmitted diseases (STD). Moreover, it was recently reported in mice that sublingual immunization with HIV-1 gp41 and a reverse transcriptase polypeptide coupled to the cholera toxin B subunit (CTB) induced gp41-specific IgA antibodies and antibody-secreting cells, as well as reverse transcriptase-specific CD8 T cells in the genital mucosa [81]. Furthermore, a recombinant Ad5-based HIV vaccine vector expressing HIV-Gag can induce antigen specific CTL responses in both the systemic and mucosal compartments following sublingual vaccination that are; at minimum, equivalent to responses induced following oral gavage vaccination. Those results illustrate the ability for Ad vectors expressing a TLR agonist to not only induce heightened innate immune responses, but also to circumvent pre-existing Ad5 immunity and improve the antigen specific T-cell responses in a sublingual model of vaccine delivery [82]. These findings underscore the potential of the sublingual mucosa to serve as a potent route of vaccine delivery for inducing protective genital antibody and cellular immune responses able to limit the genital transmission of HIV-1 or other STD in a prime-boost strategy. However, there are differences in the anatomy of sublingual tissue and organization between mice and humans (keratinized and non-keratinized, respectively); so, we have to keep in mind that this approach could not be translated to humans.

2.3. Nasal delivery of vaccines (Table 3)

NALT lies in the roof of the nasopharynx in large mammals, at the caudal end of the pharyngeal septum. In rodents, the tissues are paired and lie on either side of dorsal surface of the hard palate. The NALT is easily overlooked, because macroscopically it frequently appears similar to the surrounding nasopharyngeal epithelium. In some species, such as sheep and cattle, the tissue is characterized by furrowing, especially in young animals, whereas in other species it is only recognizable grossly through the underlying follicles giving the surface a granular appearance. This organ is the only site in the respiratory system of sheep and primates in which FAE takes up particulate antigens for presentation to underlying lymphocytes. Like GALT in all mammalian species, rodent NALT has a smooth surface of dome epithelium with M cells, while human palatine tonsils and adenoids have deep and branched antigen-retaining

Table 3
Nasal delivery of vaccines.

Delivery strategies	Examples	Responses	Model	Reference
Chitosan	Influenza, pertussis, and diphtheria	– Serum IgG responses similar to and secretory IgA levels ↗	Animals/Human (influenza)	[98]
	N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles	– Protection against the appropriate challenge	Mouse	[109]
	The nasal diphtheria vaccine with chitosan	– Systemic T cell responses ↗ – Antigen-specific IFN-gamma production ↗ – Th2-type responses ↗ – Protective levels of toxin-neutralizing antibodies ↗	Human	[99]
	Aminated gelatin microspheres (AGMS)	– Nasal absorption of insulin ↗	Rat	[110]
Cyclodextrins	Dimethyl-beta-cyclodextrin as adjuvants for nasally applied DT and TT	– Specific serum IgG titres ↗	Mouse	[85]
Liposomes	Liposomes incorporated insulin and coated with chitosan and carbapol	– Plasma glucose level up to 2 days ↘	Rat	[101]
Nanoparticles	Coated poly(anhydride) nanoparticles with either flagellin from *Salmonella enteritidis* or mannosamine	– Serum titers of IgG2a and IgG1 ↗ – TH1 and Th2 response ↗	Mouse	[111]
	Nanoencapsulated reporter plasmid (encoding β-galactosidase protein)	– Antibody levels ↗	Mouse	[112]
Modified vaccinia virus Ankara (MVA) vector	MVA expressing HIV-1 Env IIIB Ag	– Immune response to the HIV Ag ↗ – Mucosal CD8(+) T cell response in genital tissue and draining lymph nodes ↗ – Mucosal IgA and IgG Abs in vaginal washings ↗ – Specific secretion of beta-chemokines ↗	Mouse	[108]

↗: Increase. ↘: Decrease.

crypts with a reticular epithelium containing M cells [83]. This difference probably explains that germinal centres develop shortly after birth in human NALT as in the heavily microbe-exposed GALT, whereas rodent NALT requires infection or a danger signal. This is an intriguing species difference when it comes to induction of B-cell diversity and memory by vaccination via the nasal route [84]. Intranasal vaccines delivered into the nostrils are an attractive mode of immunization and the nasal mucosa is a practical site for vaccine administration because of the absence of acidity, lack of abundant secreted enzymes and small mucosal surface area that result in a low dose requirement of antigen. Furthermore, the nose is easily accessible, is highly vascularized, can be used for the easy immunization of large population groups. It is well established that nasally administered vaccines can induce both mucosal and systemic immune-responses, especially if the vaccine is based on attenuated live cells or if the antigen is adjuvanted by the use of an immunostimulator or a delivery system. This data were confirmed after nasal immunization of humans against diphtheria, tetanus [85], influenza [86] and infection with *Streptococcus mutans* [87]. In addition, it has been described in animal studies, potent responses in the respiratory and genital tracts could be induced by intranasal immunization, as a consequence of the common mucosal immune system [88,89]. The literature contains various examples of how intranasal vaccination can lead to a response at a distant mucosal site. For example, studies with cholera toxin B subunits showed that nasal mucosal immunization produced an exceptionally strong immune response in the respiratory and genito-vaginal tracts [90]. The optimized formulation and delivery system should be able to improve stability and retention of antigen in the nasal mucosa, increase uptake of antigen by the NALT and also potentially impart an adjuvant effect to the antigen without any toxic effect.

It is clear that the performance of a nasal vaccine can be greatly influenced by the physical nature of the antigen and the chosen delivery system. As shown in Table 3, different nasal vaccine systems in human and animal have been described either using live or attenuated whole cells, split cells, proteins or polysaccharides and with and without various adjuvants and delivery systems [91]. Different systems were shown to be efficient not only in mice but also in humans. Some of them have reached Phase I/II or Phase III clinical evaluation or are marketed. For example, FluMist™ (MedImmune Vaccines Inc.), a live influenza-virus vaccine, has already been approved by the Food and Drug Administration (United States) for intranasal administration. This vaccine has been studied in adults and children as young as 15 months for efficacy, immunogenicity, and safety. Among children the vaccine is safe, well tolerated, and up to 93% effective against culture-confirmed influenza [92]. Another study showed the safety and immunogenicity of a nasally administered vaccine comprising three monovalent inactivated influenza antigens associated with outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* (Proteosome) in normal, healthy adults. A positive and statistically significant antibody response was observed, in serum and in nasal secretions, to increasing dose for all three antigens [93]. Another live attenuated intranasal influenza vaccine, Nasalflu (Berna Biotech AG), was introduced in Switzerland in 2000. Although no serious adverse events were reported in prelicensure trials, during post licensure surveillance, Mutsch et al. showed the vaccine associated incidence of Bell's palsy, which was thought to originate from the use of *E. coli* LT as an adjuvant [94]. Efforts to develop other nasal vaccines, however, have continued to make progress.

Another approach to nasal vaccination involves the use of chitosan as a nasal vaccine delivery system. Chitosan is a linear polysaccharide biopolymer produced by deacetylation of chitin. Due to its biodegradability, biocompatibility and bioadhesive properties associated to a low toxicity, chitosan is widely used in intranasal formulations in animal studies. It is believed that it interacts with protein kinase C system and opens the tight junctions between epithelial cells [95], enhancing the transport of the drug across the membrane. Furthermore, chitosan may also protects the drug from enzymatic metabolism and sustains drug release, prolonging its effect [96]. But the normal mucociliary clearance time in healthy human's nose is about 20 min [97]. So for this strategy may be applicable to humans, it is important that the antigen should not release to a large extent before the antigen-loaded nanoparticles pass the nasal mucosal barrier during their residence in the nasal cavity. Chitosan has been tested with three different vaccines, namely for influenza, pertussis, and diphtheria in various animal models and in humans [98]. McNeela data

showed in humans that formulation of the nasal diphtheria vaccine with chitosan significantly augmented Th2-type responses, which correlated with protective levels of toxin-neutralizing antibodies in intranasally boosted individuals [99]. Chitosan has also been shown to improve the adjuvanticity of secondary immunomodulators like MDP, known to elicit cell-mediated immunity and CT subunit B, a potent mucosal adjuvant that induces strong humoral responses following nasally administered recombinant *Helicobacter pylori* urease in mice [100].

Liposomes, phospholipids vesicles composed by lipid bilayers enclosing one or more aqueous compartments and wherein drugs and other substances can be included, have been found to enhance nasal absorption of wide spectrum of antigens [101]. The adjuvanticity of liposomes is ascribed to their ability to accommodate multiple copies of antigenic epitopes, hence preferentially endocytosed by macrophages as well as their ability to protect the antigen within the biological environment and effects on the intracellular processing of antigen following uptake. Although this approach seems to be promising, it has some limitations in terms of sensitivity to host enzymes, instability on storage, and high cost of manufacture, which have encouraged the development of modified lipid-based vaccine delivery systems, such as ISCOMs, virosomes, proteosomes, proteoliposomes, and cochleates. Only virosomes and proteasomes have been tested in humans. Intranasal evaluation of virosomal influenza vaccines in a Phase I study showed that it was necessary to co-adjuvant with LT to obtain a humoral response comparable to that with parenteral vaccination [102]. Initial clinical study in healthy volunteers has shown intranasally administered proteosome-based influenza and shigella vaccines to be efficacious and well-tolerated [103]. These other modified lipid-based vaccine delivery systems offer a possible efficacious vaccine delivery system; however, there are reservations regarding toxicity and must be evaluated in humans.

In the last years, many efforts have been directed toward the enhancement of vaccine delivery by using polymeric nanoparticles as adjuvants or drug carriers for nasal immunization, in which the active substance is dissolved, entrapped, encapsulated, adsorbed or chemically attached [104]. Nanoparticles are probably taken up by M-cells in the nasal associated lymphoid tissue and, therefore, transported into the lymphatic system and blood stream [104]. Nanoparticles may offer several advantages due to their small size, but only the smallest nanoparticles penetrate the mucosal membrane by paracellular route and in a limited quantity because the size of the tight junctions. The efficacy of these nanoparticles to increase systemic and mucosal immune responses after intranasal administration is of interest to many groups. A lot of different studies (conducted largely in mice) indicated variable immune responses. In some cases, the serum IgG responses were increased when an antigen was administered in or on a microparticle, however, other cases, a decreased or unchanged response was found. Importantly, only in a few instances were mucosal IgA responses increased through an encapsulation strategy as compared to the administered free antigen [105].

Modified vaccinia virus Ankara (MVA) vector has also be used as mucosal vaccine. It is a highly attenuated strain of vaccinia virus that was developed towards the end of the campaign for the eradication of smallpox by Pr. A. Mayr in Germany. Recombinants based on the MVA vector were effective in inducing protective responses against different respiratory viruses, such as influenza and respiratory syncytial virus, following immunization via mucosal routes [106,107]. Gherardi et al. shown that intranasally inoculation of MVA expressing HIV-1 Env IIIB Ag induced a significant immune response to the HIV Ag [108].

To be effective following intranasal delivery, the formulation should ensure stability of the antigen, retain long enough time for the antigen to interact with the lymphatic system, stimulate both the innate and cellular systems with or without the use of safe efficacious adjuvants, by targeting specific parts of the immune cells, and provide long-term immunity against the pathogen. The critical issue in the selection of an adjuvant and/or delivery system for a viable human nasal vaccine is that it not only induces the required immune responses, but most of all also maintains the integrity and the various functions of the whole nose avoiding reactogenicity. Hence, it is of great importance that one considers carefully the choice of an absorption enhancer for a nasally delivered drug that is not readily absorbed especially in terms of potential nasal and systemic toxicity. Intranasal vaccines delivered into the nostrils are an attractive mode of immunization but we have to keep in mind that there are risks of passing into the brain through olfactory nerves and could induce important side effects.

2.4. Vaginal delivery of vaccines (Table 4)

Many pathogens are transmitted sexually through the genital tract (e.g., human immunodeficiency virus (HIV), human papillomavirus (HPV), *Chlamydia*, *Neisseria gonorrhoea* and herpes simplex virus). Protective mucosal immune response against sexually transmitted infections (STIs) should be triggered in vaginal mucosa.

Compared with the intestinal mucosa, mucosal surfaces of the female genital tracts are separated from the outside world by distinct epithelial cell layers and types of mucus that are inhabited by unique microflora and use distinct innate and adaptive effector mechanisms. In the genital mucosa, various innate immune cells provide defence against invading pathogens and epithelial cells are active participant in mucosal defence. There function as sensors that detect dangerous microbial component through PRRs which are essential for the generation of effective adaptive immune response to pathogens. Specific immune cells are also present in genital mucosa that provide immune protection as intraepithelial γδ T cells, macrophages, Langerhans cells (LCs) and submucosal DCs which are present in type II epithelia of the vaginal canals. In the uterus, specialized natural killer (NK) cells and regulatory T cells contribute to antiviral defences. After infection, neutrophils, monocytes, plasmacytoid DCs (pDCs) and NK cells are mobilized to the vaginal tissue. At later time point, antigen-specific T and B cells enter the tissue to provide pathogen-specific immune defence. In the steady state, LCs in the epithelium and DCs in the submucosa are highly phagocytic and express several PRRs that can recognize a wide array of microorganisms. After pathogen recognition through PRRs, DCs and LCs undergo a maturation program and migrate to the draining lymph nodes to prime naive T and B cells.

An important characteristic of the genital mucosal adaptive immune response is the local production and secretion of dimeric or SIgA antibodies that are resistant to degradation in the protease-rich external environments of mucosal surfaces. IgG as well as SIgA, could play a significant role in blocking infection by sexually transmitted pathogens at this site. Large numbers of IgG-secreting plasma cells are present in the female genital tracts of macaques and humans [109], and high concentrations of IgG and IgA have been measured in human cervical and vaginal secretions [110,111]. However, the vaginal mucosa is characterized by the absence of histologically demonstrable MALT. Priming occurs exclusively in the draining lymph nodes. The human vaginal canal is drained by several lymph nodes, including the common iliac, interiliac, external iliac and inguinal femoral lymph nodes.

For viruses that undergo rapid mutation, such as HIV-1, it has been shown that a large dose of vaginally administered gp120-specific monoclonal antibodies prevented vaginal SHIV transmission in macaques [112]. Many vaccine approaches have been tested but to date, none of these has proven to be successful in preventing HIV-1 infection in humans, despite inducing

Table 4
Other vaccine mucosal routes.

Other routes	Characteristics	Examples	Model	Reference
Sublingual	Antigen diffuses into the connective tissue and enters the venous circulation	HIV-1 gp41 and a reverse transcriptase polypeptide coupled to the cholera toxin B subunit	Mouse	[81]
		A recombinant adenovirus [E1-] Ad5-based HIV vaccine vector expressing HIV-Gag	Mouse	[82]
Aerosol	Simplified logistics, reduced cost per dose delivered, and greater safety/permits use of greater antigen volumes, and allows easier monitoring of results/achieve mass and rapid immunization	Live, attenuated EZ measles	Human	[122]
Ocular	Generate ocular mucosal immunity	Heat-killed HSV/HSV-based subunit vaccines	Mouse	[124]
		Recombinant HSV-2 glycoproteins B and D in MF59 emulsion	Rabbit	[125]
Vaginal	Local production and secretion of dimeric or SIgA antibodies/absence of histologically demonstrable MALT/drained by several lymph nodes	Polyanion PRO 2000 coated with HIV-1 envelope glycoprotein	Mouse/Rabbit	[113]
		Rheologically structured vehicle coated with an HIV-1 envelope glycoprotein	Rabbit	[114]
		Vaginal DNA vaccination using a needle-free jet injector	Rabbit	[115]
		CpG ODN in combination with glycoprotein D of herpes simplex virus type 2	Mouse	[119]

robust levels of antibody or cell-mediated immunity. Recently, vaginal immunization of polyanion PRO 2000 coated with HIV-1 envelope glycoprotein resulted in significantly increased titres of Env-specific mucosal IgA and IgG in mice and rabbits, compared to Env alone, revealing modest but significant PRO 2000 mucosal adjuvant activity for [113]. The polyanion PRO 2000 is safe for human vaginal application, and thus may represent a potential formulating agent for vaginal delivery of experimental vaccine immunogens. Rheologically structured vehicle (RSV) gels may be also developed as delivery systems for vaginal mucosal vaccination with an HIV-1 envelope glycoprotein. Indeed, vaginal administration to rabbits induced both systemic IgG and mucosal IgG/IgA in genital tract secretions [114]. RSVs could be a viable delivery modality for vaginal immunization but need to be evaluated in humans.

Vaginal DNA vaccination using a needle-free jet injector is a promising approach for the prevention and treatment of mucosal infectious diseases. Mucosal gene transfection efficiency of a non-needle jet injector for daily insulin injection at the skin and vagina levels could be an attractive approach. Intravaginal immunization in rabbits promotes vaginal IgA secretion and IFN-gamma mRNA expression in blood lymphocytes, to a degree significantly higher than needle-syringe injection [115]. Jet injection has been tested subcutaneously in several human clinical trials [116] and is already produced commercially for daily injection of insulin and growth hormone. However, no needle-free jet injection into the vaginal mucosa has been previously reported into human trials.

The estradiol-induced mucus barrier may be a novel approach to prevent exposure to antigens delivered intravaginally. Estradiol, which induces an estrus-like state, has been shown to prevented CD8(+) T cell priming during intravaginal immunization of mice [117]. Furthermore, it has been demonstrate that estradiol prevented antigen loading of vaginal antigen presenting cells (APCs) after intravaginal immunization of mice [118].

CpG-containing oligodeoxynucleotide could be used for induction of chemokine responses in the genital tract mucosa and also as a vaginal adjuvant in combination with an antigen for induction of antigen-specific immune responses. A single intravaginal administration of CpG ODN in combination with glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 in mice stimulates a rapid and potent chemokine response both in the vagina and/or the genital lymph nodes [119]. These findings highlight the value of CpG ODN as a potent mucosal adjuvant for the induction of protective Th1-tilted immune responses against genital herpes and justify further investigation of the use of CpG ODN for the development of mucosal vaccines against other sexually transmitted pathogens, such as HIV.

Despite several advantages, as compared to systemic injections, the delivery of vaccines by genitals routes has not been shown to be very practical in human trials. Indeed, it is cumbersome to administer a mucosal vaccine through the genital tract, as the immunological features of the female reproductive tract, in particular, alter dramatically in response to hormonal fluctuations during the menstrual cycle [110]. In addition, female genital tracts lack inductive mucosal sites analogous to intestinal Peyer's patches. Recently, a study compared the protective activity resulting from immunization of mice via intranasal, intravaginal or subcutaneous routes with an adjuvanted HPV type 16 E7 polypeptide vaccine. They demonstrate that only subcutaneous immunization induced complete regression of already established genital tumors [120].

2.5. Other vaccine mucosal routes (Table 4)

Additional mucosal routes, including pulmonary and ocular administration of vaccines, have also been attempted in several cases.

Aerosol vaccination, which best follows the natural route of many infections, aims to deliver vaccine at various levels of the bronchial tree, including the alveoli and may first leads to development of immunity at the portal of entry, and may also induce a more generalized defence. Compared with injections, the aerosol method has simplified logistics, reduced cost per dose delivered, and greater safety. Indeed, the recommended optimal way of introducing an aerosol vaccine is nasal breathing, which is more suitable for geriatric and pediatric populations, permits use of greater antigen volumes, and allows easier monitoring of results. It was shown in human that aerosol immunization is at least equivalent to injections of measles, rubella and mumps (MMR) vaccines in eliciting high levels of protection for at least 1 year following revaccination [121]. Bellanti et al. immunized Mexican school children against measles and they shown that serum and nasal IgG and IgA antibody responses were stimulated following immunization with live, attenuated Edmonston-Zagreb (EZ) measles vaccine administered either by aerosol or subcutaneous routes but these responses were significantly greater by the aerosol compared to the subcutaneous route [122]. Although some basic information are still lacking, aerosol immunization has already been used successfully in large populations and has therefore passed the phase of initial feasibility evaluation.

Ocular immunization has been attempted in rabbits against infection with herpes simplex virus (HSV). This was motivated by the strong need to generate ocular mucosal immunity to HSV,

which commonly infects the eye in addition to other sites. The combined efficacy of heat-killed herpes vaccine and acyclovir inoculated by intraocular route generated effective mucosal immunity to HSV and permitted to protect all animals [123,124].

Another study shown ocular vaccination provided better protection than systemic vaccination against eye disease following ocular HSV-1 infection. Indeed, periocular vaccination with recombinant HSV-2 glycoproteins B and D in MF59 emulsion provided significant protection against conjunctivitis and iritis, while ocular vaccination with a non neurovirulent strain of HSV-1 provided significant protection against conjunctivitis, iritis, epithelial keratitis, and corneal clouding. Systemic vaccination with either HSV-1 KOS or gB2/gD2 in MF59 did not provide significant protection against any of four parameters [125]. However, ocular routes have been less well studied as generalized methods for immunization than have other mucosal routes, but recent developments in cellular and molecular immunology of the ocular mucosal immune system may help in the design of more effective and optimal immunization strategies against ocular pathogens.

As the vaginal mucosa is characterized by the absence of histologically demonstrable MALT, it should be interesting to deliver antigens in the anorectal canal where they could be processed by the local MALT, which underlies the type I epithelium, and by the inguinal lymph node, which drains the lower rectum and anus. Live vaccine vectors and adjuvants that cannot be used orally or nasally might be safe and effective if administered by the rectal route, however, this possibility warrants testing in human studies and rectal route is limited by acceptability and immunogenicity issues.

3. Conclusions

Currently, there are few mucosal vaccines in use, due to the poor efficiency of new strategies. A common theme that has emerged is that the natural immunity that develops following infection with mucosal transmitted diseases provides minimal protection against secondary challenges with a heterologous pathogen. Thus, a vaccine may need to elicit a different type of immune response altogether to achieve protection in the immunized hosts.

However, the ineffective protection afforded by traditional injected vaccines against a large number of pathogens (HIV, malaria, tuberculosis, etc.) has led to active research and development of alternative routes of immunization, such as the mucosal route.

The development of safe and effective mucosal adjuvants remains a particular priority for non-replicating mucosal vaccines. These would offer the potential to induce vaccine specific responses at the mucosal portals of pathogen entry. So it is necessary to develop non-toxic and effective adjuvants which could permit the use of low immunogenic non-replicating antigens when administered by mucosal routes. Moreover, the use of an adjuvant competent for mucosal administration could permit targeting of mucosal immune cells and generate the desired immune response. A comparison of the advantages and limitations of various methods of mucosal immunization makes it evident that there is no one superior method but there is a drawback that they share: the fact that there is a lack of control in terms of dose that is delivered (as opposed to systemic administered) to each individual and it is an important problem during the vaccines studies.

The choice of any given route of mucosal vaccination and the selection of appropriate adjuvants and formulations will affect vaccine design, process and manufacturing issues. Much work remains to be done, but current research continues to clarify the concepts and provide the tools that are needed to exploit the full potential of mucosal vaccines. However, those researches are by a majority done on animal models and it is very important to keep in mind that often those models cannot be extrapolate to human due to the very significant differences in anatomy, physiology and immunogenicity. The NALT, sublingual and genital epithelia of rodents have significant differences to that of humans. For example, the vaginal mucosa of rodents is a keratinized tissue, so it is not a good model for human (vaginal mucosa with nonkeratinized surface) and will tend to be less permeable and more resistant to damage [126]. TLR expression patterns are different; rodents constitutively make dimeric IgA irrespective of the route of immunization, while humans make mIgA and dIgA. These differences are critical in determining the value of different experimental data and even if sometime mucosal vaccinations give interesting results in animals, it requires verification before they can be considered as promising. Indeed it is often seen that approaches that work well in rodent species fail to work in non-human primates or humans. New mucosal vaccines should be tested in human subjects, but must take into account the genetic background of the host, the intestinal microflora diversity and diet, all parameters which could influence the vaccine safety and effectiveness. Indeed, some mucosal vaccines, such as oral polio, cholera or typhoid vaccines are less effective in developing nation than industrialized countries. To explore the impact of environmental factors in relation to mucosal responses to vaccines administered by different routes, studies should be conducted with licensed vaccines; both killed and live bacterial and viral vaccines (e.g., OPV and IPV). Use of animal models could be helpful in exploring the influence of these factors on mucosal immune responsiveness to antigens and adjuvants administered by these different routes.

The antigens and adjuvants vectorization is a very interesting field for mucosal delivery vaccines, then the formulation of antigens in various particulate delivery systems for mucosal administration may be advantageous in the following ways: (i) protection of the antigen from mucosal enzymes; (ii) facilitating the preferential uptake of encapsulated antigen by specialized NALT/GALT/BALT M cells; (iii) sustained release of antigen to increase the presentation time of antigen to APC; (iv) possible increase in retention time at the site of administration by bioadhesion; (v) co-presentation of antigen and adjuvant to APCs, and (vi) induction of cell-mediated immune response by modifying presentation of antigen to APCs [127,128,49]. To conclude, rational antigen selection, adjuvants to angle protective immune responses, efficient vectors to target APCs and appropriate administration routes should permit to develop efficient mucosal vaccines.

Acknowledgements

V. Pavot and N. Rochereau were supported by a fellowship from the Région Rhône-Alpes (cluster 10 d'infectiologie) and by SIDACTION. S. Paul and B. Verrier are members of the Europrise network and their works is funded by FP6 (Europrise) and FP7 grants (Cuthivac).

References

[1] Shreedhar VK, Kelsall BL, Neutra MR. Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. Infection and Immunity 2003;71(January (1)):504–9.
[2] Miller CJ, McChesney M, Moore PF. Langerhans cells, macrophages and lymphocyte subsets in the cervix and vagina of rhesus macaques. Laboratory Investigation A Journal of Technical Methods and Pathology 1992;67(November (5)):628–34.
[3] Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. Science (New York, NY) 2005;307(January (5707)):254–8.
[4] Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. Annual Review of Microbiology 1997;51:311–40.
[5] Kaetzel CS, Robinson JK, Chintalacharuvu KR, Vaerman JP, Lamm ME. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for

IgA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1991;88(October (19)):8796–800.
[6] Mostov KE. Transepithelial transport of immunoglobulins. Annual Review of Immunology 1994;12:63–84.
[7] Ghetie V, Ward ES. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. Annual Review of Immunology 2000;18:739–66.
[8] Cesta MF. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. Toxicologic Pathology 2006;34(5):599–608.
[9] Grdic D, Hörnquist E, Kjerrulf M, Lycke NY. Lack of local suppression in orally tolerant CD8-deficient mice reveals a critical regulatory role of CD8+ T cells in the normal gut mucosa. Journal of Immunology (Baltimore, MD: 1950) 1998;160(January (2)):754–62.
[10] Hysi P, Kabesch M, Moffatt MF, Schedel M, Carr D, Zhang Y, et al. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. Human Molecular Genetics 2005;14(April (7)):935–41.
[11] McGovern DPB, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. Human Molecular Genetics 2005;14(May (10)):1245–50.
[12] Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411(May (6837)):603–6.
[13] Yuki Y, Kiyono H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. Reviews in Medical Virology 2003;13(October (5)):293–310.
[14] Kunkel EJ, Butcher EC. Plasma-cell homing. Nature Reviews Immunology 2003;3(October (10)):822–9.
[15] Levine MM. Immunization against bacterial diseases of the intestine. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 2000;31(October (4)):336–55.
[16] Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. Annual Review of Microbiology 2005;59:587–635.
[17] Sabin AB. Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. Journal of Infectious Diseases 1985;151(March (3)):420–36.
[18] Committee on Infectious Diseases. Poliomyelitis prevention: recommendations for use of inactivated poliovirus vaccine and live oral poliovirus vaccine. Pediatrics 1997;99(February (2)):300–5.
[19] McBean AM, Thoms ML, Johnson RH, Gadless BR, MacDonald B, Nerhood L, et al. A comparison of the serologic responses to oral and injectable trivalent poliovirus vaccines. Reviews of Infectious Diseases 1984;6(June):S552–5.
[20] Zhaori G, Sun M, Ogra PL. Characteristics of the immune response to poliovirus virion polypeptides after immunization with live or inactivated polio vaccines. Journal of Infectious Diseases 1988;158(July (1)):160–5.
[21] Ali M, Emch M, von Seidlein L, Yunus M, Sack DA, Rao M, et al. Herd immunity conferred by killed oral cholera vaccines in Bangladesh: a reanalysis. Lancet 2005;366(July (9479)):44–9.
[22] Sur D, Lopez AL, Kanungo S, Paisley A, Manna B, Ali M, et al. Efficacy and safety of a modified killed-whole-cell oral cholera vaccine in India: an interim analysis of a cluster-randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 2009;374(November (9702)): 1694–702.
[23] Kanungo S, Paisley A, Lopez AL, Bhattacharya M, Manna B, Kim DR, et al. Immune responses following one and two doses of the reformulated, bivalent, killed, whole-cell, oral cholera vaccine among adults and children in Kolkata, India: a randomized, placebo-controlled trial. Vaccine 2009;27(November (49)):6887–93.
[24] Olsson L, Parment PA. Present and future cholera vaccines. Expert Review of Vaccines 2006;5(December (6)):751–2.
[25] Cholera vaccines: WHO position paper. Relevé Épidémiologique Hebdomadaire/Section D'hygiène Du Secrétariat De La Société Des Nations = Weekly Epidemiological Record/Health Section of the Secretariat of the League of Nations 2010;85(March (13)):117–28.
[26] Tacket CO, Cohen MB, Wasserman SS, Losonsky G, Livio S, Kotloff K, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentered trial of the efficacy of a single dose of live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in preventing cholera following challenge with *Vibrio cholerae* O1 El tor inaba three months after vaccination. Infection and Immunity 1999;67(December (12)):6341–5.
[27] Richie EE, Punjabi NH, Sidharta YY, Peetosutan KK, Sukandar MM, Wasserman SS, et al. Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. Vaccine 2000;18(May (22)):2399–410.
[28] Typhoid vaccines: WHO position paper. Relevé Épidémiologique Hebdomadaire/Section D'hygiène Du Secrétariat De La Société Des Nations = Weekly Epidemiological Record/Health Section of the Secretariat of the League of Nations 2008;83(February (6)):49–59.
[29] Khan MI, Ochiai RL, Clemens JD. Population impact of Vi capsular polysaccharide vaccine. Expert Review of Vaccines 2010;9(May (5)):485–96.
[30] Levine MM. Use of vaccines for the prevention of typhoid fever. Indian Pediatrics 2003;40(November (11)):1029–34.
[31] Levine MM, Ferreccio C, Cryz S, Ortiz E. Comparison of enteric-coated capsules and liquid formulation of Ty21a typhoid vaccine in randomised controlled field trial. Lancet 1990;336(October (8720)):891–4.
[32] Kantele A, Kantele JM, Savilahti E, Westerholm M, Arvilommi H, Lazarovits A, et al. Homing potentials of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation: oral, but not parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that all bear homing receptors directing them to the gut. Journal of Immunology (Baltimore, MD: 1950) 1997;158(January (2)):574–9.
[33] Rotavirus vaccines. Relevé Épidémiologique Hebdomadaire/Section D'hygiène Du Secrétariat De La Société Des Nations = Weekly Epidemiological Record/Health Section of the Secretariat of the League of Nations 2007;82(August (32)):285–95.
[34] Svennerholm AM, Steele D. Microbial-gut interactions in health and disease. Progress in enteric vaccine development. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology 2004;18(April (2)):421–45.
[35] Linhares AC, Ruiz-Palacios GM, Guerrero ML, Salinas B, Perez-Schael I, Clemens SAC, et al. A short report on highlights of world-wide development of RIX4414: a Latin American experience. Vaccine 2006;24(May (18)):3784–5.
[36] Vesikari T, Giaquinto C, Huppertz H-I. Clinical trials of rotavirus vaccines in Europe. Pediatric Infectious Disease Journal 2006;25(January (1)):S42–7.
[37] Goveia MG, Nelson CB, Ciarlet M. RotaTeq: progress toward developing world access. Journal of Infectious Diseases 2010;202(September):S87–92.
[38] Vesikari T, Clark HF, Offit PA, Dallas MJ, DiStefano DJ, Goveia MG, et al. Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants. Vaccine 2006;24(May (22)):4821–9.
[39] Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. Vaccine 2006;24(April (15)):2718–31.
[40] Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. Scandinavian Journal of Immunology 2004;59(January (1)):1–15.
[41] Update on influenza A (H1N1) 2009 monovalent vaccines. MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report 2009;58(October (39)):1100–1.
[42] Alpan O, Rudomen G, Matzinger P. The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses. Journal of Immunology (Baltimore, MD: 1950) 2001;166(April (8)):4843–52.
[43] Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. Gut 2003;52(October (10)):1522–9.
[44] Azizi A, Ghunaim H, Diaz-Mitoma F, Mestecky J. Mucosal HIV vaccines: a holy grail or a dud? Vaccine 2010;28(May (24)):4015–26.
[45] Bruder MC, Spanhaak S, Bruijntjes JP, Michielsen CP, Vos JG, Kuper CF. Intestinal T lymphocytes of different rat strains in immunotoxicity. Toxicologic Pathology 1999;27(April (2)):171–9.
[46] Carlsen HS, Baekkevold ES, Johansen F-E, Haraldsen G, Brandtzaeg P. B cell attracting chemokine 1 (CXCL13) and its receptor CXCR5 are expressed in normal and aberrant gut associated lymphoid tissue. Gut 2002;51(September (3)):364–71.
[47] Brandtzaeg P, Carlsen HS, Halstensen TS. The B-cell system in inflammatory bowel disease. Advances in Experimental Medicine and Biology 2006;579:149–67.
[48] Samstein RM, Perica K, Balderrama F, Look M, Fahmy TM. The use of deoxycholic acid to enhance the oral bioavailability of biodegradable nanoparticles. Biomaterials 2008;29(February (6)):703–8.
[49] Primard C, Rochereau N, Luciani E, Genin C, Delair T, Paul S, et al. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. Biomaterials 2010;31(August (23)):6060–8.
[50] Katz DE, DeLorimier AJ, Wolf MK, Hall ER, Cassels FJ, van Hamont JE, et al. Oral immunization of adult volunteers with microencapsulated enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CS6 antigen. Vaccine 2003;21(January (5–6)):341–6.
[51] Forsman A, Ushameckis D, Bindra A, Yun Z, Blomberg J. Uptake of amplifiable fragments of retrotransposon DNA from the human alimentary tract. Molecular Genetics and Genomics: MGG 2003;270(December (4)):362–8.
[52] Tian J, Yu J. Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as candidate DNA vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against lymphocystis disease virus. Fish and Shellfish Immunology 2010;November.
[53] Perrie Y, Obrenovic M, McCarthy D, Gregoriadis G. Liposome (Lipodine)-mediated DNA vaccination by the oral route. Journal of Liposome Research 2002;12(May (1–2)):185–97.
[54] Mirchamsy H, Manhouri H, Hamedi M, Ahourai P, Fateh G, Hamzeloo Z. Stimulating role of toxoids-laden liposomes in oral immunization against diphtheria and tetanus infections. Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization 1996;24(December (4)):343–50.
[55] Butts C, Murray N, Maksymiuk A, Goss G, Marshall E, Soulières D, et al. Randomized phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIIB and IV non-small-cell lung cancer. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology 2005;23(September (27)):6674–81.
[56] Hall LJ, Clare S, Pickard D, Clark SO, Kelly DLF, El Ghany MA, et al. Characterisation of a live *Salmonella* vaccine stably expressing the Mycobacterium tuberculosis Ag85B–ESAT6 fusion protein. Vaccine 2009;27(November (49)):6894–904.
[57] Boyer JD, Robinson TM, Maciag PC, Peng X, Johnson RS, Pavlakis G, et al. DNA prime Listeria boost induces a cellular immune response to SIV antigens in the rhesus macaque model that is capable of limited suppression of SIV239 viral replication. Virology 2005;333(March (1)):88–101.
[58] Mayr UB, Haller C, Haidinger W, Atrasheuskaya A, Bukin E, Lubitz W, et al. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157:H7

bacterial ghosts protects mice against lethal challenge. Infection and Immunity 2005;73(August (8)):4810–7.
[59] Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. Nature Reviews Microbiology 2008;6(May (5)):349–62.
[60] Alexander LN, Seward JF, Santibanez TA, Pallansch MA, Kew OM, Prevots DR, et al. Vaccine policy changes and epidemiology of poliomyelitis in the United States. JAMA: The Journal of the American Medical Association 2004;292(October (14)):1696–701.
[61] Suspension of rotavirus vaccine after reports of intussusception – United States 1999. MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report 2004;53(September (34)):786–9.
[62] Zhou B, Zhang Y, Wang X, Dong J, Wang B, Han C, et al. Oral administration of plant-based rotavirus VP6 induces antigen-specific IgAs, IgGs and passive protection in mice. Vaccine 2010;28(August (37)):6021–7.
[63] Tacket CO, Pasetti MF, Edelman R, Howard JA, Streatfield S. Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. Vaccine 2004;22(October (31–32)):4385–9.
[64] Anosova NG, Chabot S, Shreedhar V, Borawski JA, Dickinson BL, Neutra MR. Cholera toxin, *E. coli* heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. Mucosal Immunology 2008;1(January (1)):59–67.
[65] Tokuhara D, Yuki Y, Nochi T, Kodama T, Mejima M, Kurokawa S, et al. Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010;107(May (19)):8794–9.
[66] Gupta PN, Vyas SP. Investigation of lectinized liposomes as M-cell targeted carrier-adjuvant for mucosal immunization. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2011;82(January (1)):118–25.
[67] Lavelle EC, Grant G, Pfuller U, O'Hagan DT. Immunological implications of the use of plant lectins for drug and vaccine targeting to the gastrointestinal tract. Journal of Drug Targeting 2004;12(February (2)):89–95.
[68] Lavelle EC, Grant G, Pusztai A, Pfüller U, O'Hagan DT. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. Immunology 2000;99(January (1)):30–7.
[69] Giannasca PJ, Giannasca KT, Leichtner AM, Neutra MR. Human intestinal M cells display the sialyl Lewis A antigen. Infection and Immunity 1999;67(February (2)):946–53.
[70] Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim D-Y, et al. A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. Journal of Experimental Medicine 2007;204(November (12)):2789–96.
[71] Mantis NJ, Cheung MC, Chintalacharuvu KR, Rey J, Corthésy B, Neutra MR. Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. Journal of Immunology (Baltimore, MD: 1950) 2002;169(August (4)):1844–51.
[72] Roy MJ, Varvayanis M. Development of dome epithelium in gut-associated lymphoid tissues: association of IgA with M cells. Cell and Tissue Research 1987;248(June (3)):645–51.
[73] Corthésy B, Kaufmann M, Phalipon A, Peitsch M, Neutra MR, Kraehenbuhl JP. A pathogen-specific epitope inserted into recombinant secretory immunoglobulin A is immunogenic by the oral route. Journal of Biological Chemistry 1996;271(December (52)):33670–7.
[74] Czerkinsky C, Holmgren J. Enteric vaccines for the developing world: a challenge for mucosal immunology. Mucosal Immunology 2009;2(July (4)):284–7.
[75] Favre D, Viret J-F. Biosafety evaluation of recombinant live oral bacterial vaccines in the context of European regulation. Vaccine 2006;24(May (18)):3856–64.
[76] Song J-H, Nguyen HH, Cuburu N, Horimoto T, Ko S-Y, Park S-H, et al. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008;105(February (5)):1644–9.
[77] Cuburu N, Kweon M-N, Hervouet C, Cha H-R, Pang Y-YS, Holmgren J, et al. Sublingual immunization with nonreplicating antigens induces antibody-forming cells and cytotoxic T cells in the female genital tract mucosa and protects against genital papillomavirus infection. Journal of Immunology (Baltimore, MD: 1950) 2009;183(December (12)):7851–9.
[78] Cuburu N, Kweon M-N, Song J-H, Hervouet C, Luci C, Sun J-B, et al. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. Vaccine 2007;25(December (51)):8598–610.
[79] Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Van Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. Allergy 2006;61(February (2)):151–65.
[80] Song J-H, Kim J-I, Kwon H-J, Shim D-H, Parajuli N, Cuburu N, et al. CCR7-CCL19/CCL21-regulated dendritic cells are responsible for effectiveness of sublingual vaccination. Journal of Immunology (Baltimore, MD: 1950) 2009;182(June (11)):6851–60.
[81] Hervouet C, Luci C, Cuburu N, Cremel M, Bekri S, Vimeux L, et al. Sublingual immunization with an HIV subunit vaccine induces antibodies and cytotoxic T cells in the mouse female genital tract. Vaccine 2010;28(August (34)):5582–90.
[82] Appledorn DM, Aldhamen YA, Godbehere S, Seregin SS, Amalfitano A. Sublingual administration of an Adenovirus based vaccine confirms TLR agonist activity in the oral cavity and elicits improved mucosal and systemic cell mediated responses against HIV antigens despite pre-existing Ad5 immunity. Clinical and Vaccine Immunology: CVI 2010;November.
[83] Brandtzaeg P. Immunology of tonsils and adenoids: everything the ENT surgeon needs to know. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 2003;67(December (Suppl. 1)):S69–76.
[84] Brandtzaeg P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. Vaccine 2007;25(July (30)):5467–84.
[85] Alpar HO, Eyles JE, Williamson ED, Somavarapu S. Intranasal vaccination against plague, tetanus and diphtheria. Advanced Drug Delivery Reviews 2001;51(September (1–3)):173–201.
[86] Fiore AE, Bridges CB, Cox NJ. Seasonal influenza vaccines. Current Topics in Microbiology and Immunology 2009;333:43–82.
[87] Childers NK, Li F, Dasanayake AP, Li Y, Kirk K, Michalek SM. Immune response in humans to a nasal boost with *Streptococcus mutans* antigens. Oral Microbiology and Immunology 2006;21(October (5)):309–13.
[88] Mestecky J, Raska M, Novak J, Alexander RC, Moldoveanu Z. Antibody-mediated protection and the mucosal immune system of the genital tract: relevance to vaccine design. Journal of Reproductive Immunology 2010;85(May (1)):81–5.
[89] Czerkinsky C, Holmgren J. Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues. Current Topics in Microbiology and Immunology 2010;November.
[90] Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. Nature Medicine 2005;11(April (4)):S45–53.
[91] Yuki Y, Kiyono H. Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery. Expert Review of Vaccines 2009;8(August (8)):1083–97.
[92] Rappuoli R, Del Giudice G, editors. Influenza vaccines for the future. Basel: Springer Basel; 2011.
[93] Langley JM, Halperin SA, McNeil S, Smith B, Jones T, Burt D, et al. Safety and immunogenicity of a Proteosome-trivalent inactivated influenza vaccine, given nasally to healthy adults. Vaccine 2006;24(March (10)):1601–8.
[94] Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. New England Journal of Medicine 2004;350(February (9)):896–903.
[95] Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. Advanced Drug Delivery Reviews 2010;62(January (1)):59–82.
[96] Gavini E, Rassu G, Haukvik T, Lanni C, Racchi M, Giunchedi P. Mucoadhesive microspheres for nasal administration of cyclodextrins. Journal of Drug Targeting 2009;17(February (2)):168–79.
[97] Illum L. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society 2003;87(February (1–3)):187–98.
[98] Illum L, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, Fisher AN, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. Advanced Drug Delivery Reviews 2001;51(September (1–3)):81–96.
[99] McNeela EA, Jabbal-Gill I, Illum L, Pizza M, Rappuoli R, Podda A, et al. Intranasal immunization with genetically detoxified diphtheria toxin induces T cell responses in humans: enhancement of Th2 responses and toxin-neutralizing antibodies by formulation with chitosan. Vaccine 2004;22(February (8)):909–14.
[100] Moschos SA, Bramwell VW, Somavarapu S, Alpar HO. Adjuvant synergy: the effects of nasal coadministration of adjuvants. Immunology and Cell Biology 2004;82(December (6)):628–37.
[101] Jain AK, Chalasani KB, Khar RK, Ahmed FJ, Diwan PV. Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery. Journal of Drug Targeting 2007;15(July (6)):417–27.
[102] Glück U, Gebbers JO, Glück R. Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without *Escherichia coli* heat-labile toxin in adult volunteers. Journal of Virology 1999;73(September (9)):7780–6.
[103] Treanor J, Nolan C, O'Brien D, Burt D, Lowell G, Linden J, et al. Intranasal administration of a proteosome-influenza vaccine is well-tolerated and induces serum and nasal secretion influenza antibodies in healthy human subjects. Vaccine 2006;24(January (3)):254–62.
[104] Csaba N, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Nanoparticles for nasal vaccination. Advanced Drug Delivery Reviews 2009;61(February (2)):140–57.
[105] Lemoine D, Deschuyteneer M, Hogge F, Préat V. Intranasal immunization against influenza virus using polymeric particles. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition 1999;10(8):805–25.
[106] Bender BS, Rowe CA, Taylor SF, Wyatt LS, Moss B, Small PA. Oral immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus protects mice against influenza. Journal of Virology 1996;70(September (9)):6418–24.
[107] Wyatt LS, Shors ST, Murphy BR, Moss B. Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. Vaccine 1996;14(October (15)):1451–8.
[108] Gherardi MM, Pérez-Jiménez E, Nájera JL, Esteban M. Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule. Journal of Immunology (Baltimore, MD: 1950) 2004;172(May (10)):6209–20.
[109] Eriksson K, Quiding-Järbrink M, Osek J, Möller A, Björk S, Holmgren J, et al. Specific-antibody-secreting cells in the rectums and genital tracts of nonhuman primates following vaccination. Infection and Immunity 1998;66(December (12)):5889–96.

[110] Kozlowski PA, Williams SB, Lynch RM, Flanigan TP, Patterson RR, Cu-Uvin S, et al. Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle. Journal of Immunology (Baltimore, MD: 1950) 2002;169(July (1)):566–74.
[111] Woof JM, Mestecky J. Mucosal immunoglobulins. Immunological Reviews 2005;206(August):64–82.
[112] Veazey RS, Shattock RJ, Pope M, Kirijan JC, Jones J, Hu Q, et al. Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120. Nature Medicine 2003;9(March (3)):343–6.
[113] Wegmann F, Krashias G, Lühn K, Laamanen K, Vieira S, Jeffs SA, et al. A novel strategy for inducing enhanced mucosal HIV-1 antibody responses in an anti-inflammatory environment. PloS One 2011;6(1):e15861.
[114] Curran RM, Donnelly L, Morrow RJ, Fraser C, Andrews G, Cranage M, et al. Vaginal delivery of the recombinant HIV-1 clade-C trimeric gp140 envelope protein CN54gp140 within novel rheologically structured vehicles elicits specific immune responses. Vaccine 2009;27(November (48)):6791–8.
[115] Kanazawa T, Takashima Y, Tamura T, Tsuchiya M, Shibata Y, Udagawa H, et al. Local gene expression and immune responses of vaginal DNA vaccination using a needle-free injector. International Journal of Pharmaceutics 2010;396(August (1–2)):11–6.
[116] Jackson LA, Austin G, Chen RT, Stout R, DeStefano F, Gorse GJ, et al. Safety and immunogenicity of varying dosages of trivalent inactivated influenza vaccine administered by needle-free jet injectors. Vaccine 2001;19(September (32)):4703–9.
[117] Seavey MM, Mosmann TR. Paternal antigen-bearing cells transferred during insemination do not stimulate anti-paternal CD8+ T cells: role of estradiol in locally inhibiting CD8+ T cell responses. Journal of Immunology (Baltimore, MD: 1950) 2006;177(December (11)):7567–78.
[118] Seavey MM, Mosmann TR. Estradiol-induced vaginal mucus inhibits antigen penetration and CD8(+) T cell priming in response to intravaginal immunization. Vaccine 2009;27(April (17)):2342–9.
[119] 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. Journal of Virology 2006;80(June (11)):5283–91.
[120] Decrausaz L, Domingos-Pereira S, Duc M, Bobst M, Romero P, Schiller JT, et al. Parenteral is more efficient than mucosal immunization to induce regression of human papillomavirus-associated genital tumors. International Journal of Cancer Journal International Du Cancer 2011;129(August (3)):762–72.
[121] Díaz-Ortega JL, Bennett JV, Castañeda D, Martinez D, de Castro JF. Antibody persistence in young adults 1 year after MMR immunization by aerosol or by subcutaneous route. Vaccine 2010;28(October (44)):7228–32.
[122] Bellanti JA, Zeligs BJ, Mendez-Inocencio J, García-Garcia ML, Islas-Romero R, Omidvar B, et al. Immunologic studies of specific mucosal and systemic immune responses in Mexican school children after booster aerosol or subcutaneous immunization with measles vaccine. Vaccine 2004;22(March (9–10)):1214–20.
[123] Pepose JS, Keadle TL, Morrison LA. Ocular herpes simplex: changing epidemiology, emerging disease patterns, and the potential of vaccine prevention and therapy. American Journal of Ophthalmology 2006;141(March (3)): 547.
[124] McGowin CL, Pyles RB. Mucosal treatments for herpes simplex virus: insights on targeted immunoprophylaxis and therapy. Future Microbiology 2010;5(January):15–22.
[125] Nesburn AB, Slanina S, Burke RL, Ghiasi H, Bahri S, Wechsler SL. Local periocular vaccination protects against eye disease more effectively than systemic vaccination following primary ocular herpes simplex virus infection in rabbits. Journal of Virology 1998;72(October (10)):7715–21.
[126] Squier CA, Mantz MJ, Schlievert PM, Davis CC. Porcine vagina ex vivo as a model for studying permeability and pathogenesis in mucosa. Journal of Pharmaceutical Sciences 2008;97(January (1)):9–21.
[127] Zeng G, Chen J, Zhong L, Wang R, Jiang L, Cai J, et al. NSOM- and AFM-based nanotechnology elucidates nano-structural and atomic-force features of a Y. pestis V immunogen-containing particle vaccine capable of eliciting robust response. Proteomics 2009;9(March (6)):1538–47.
[128] O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. Nature Reviews Drug Discovery 2003;2(September (9)):727–35.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scandinavian journal of immunology* 2009, **70**(6)**:** 505-515.

2. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annual review of immunology* 1996, **14:** 275-300.

3. Iwasaki A. Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. *Nature reviews Immunology* 2010, **10**(10)**:** 699-711.

4. Woodrow KA, Bennett KM, Lo DD. Mucosal vaccine design and delivery. *Annual review of biomedical engineering* 2012, **14:** 17-46.

5. Ouellette AJ. Paneth cell alpha-defensins in enteric innate immunity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2011, **68**(13)**:** 2215-2229.

6. Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* 2003, **21 Suppl 2:** S12-23.

7. Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal immunology* 2008, **1**(1)**:** 31-37.

8. Smith E. Book « principles of mucosal immunology » *Garland science* 2012**:** p.3.

9. Brandtzaeg P. Potential of nasopharynx-associated lymphoid tissue for vaccine responses in the airways. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011, **183**(12)**:** 1595-1604.

10. Van Kruiningen HJ, West AB, Freda BJ, Holmes KA. Distribution of Peyer's patches in the distal ileum. *Inflammatory bowel diseases* 2002, **8**(3)**:** 180-185.

11. Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends in immunology* 2004, **25**(11)**:** 570-577.

12. Brayden DJ, Jepson MA, Baird AW. Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug discovery today* 2005, **10**(17)**:** 1145-1157.

13. Jung C, Hugot JP, Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *International journal of inflammation* 2010, **2010:** 823710.

14. Ano Y, Sakudo A, Nakayama H, Onodera T. Uptake and dynamics of infectious prion protein in the intestine. *Protein and peptide letters* 2009, **16**(3)**:** 247-255.

15. Lo DD, Ling J, Eckelhoefer AH. M cell targeting by a Claudin 4 targeting peptide can enhance mucosal IgA responses. *BMC biotechnology* 2012, **12:** 7.

16. Tyrer PC, Ruth Foxwell A, Kyd JM, Otczyk DC, Cripps AW. Receptor mediated targeting of M-cells. *Vaccine* 2007, **25**(16)**:** 3204-3209.

17. Azizi A, Kumar A, Diaz-Mitoma F, Mestecky J. Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells. *PLoS pathogens* 2010, **6**(11)**:** e1001147.

18. Buda A, Sands C, Jepson MA. Use of fluorescence imaging to investigate the structure and function of intestinal M cells. *Advanced drug delivery reviews* 2005, **57**(1)**:** 123-134.

19. Mantis NJ, Wagner J. Analysis of adhesion molecules involved in leukocyte homing into the basolateral pockets of mouse Peyer's patch M cells. *Journal of drug targeting* 2004, **12**(2)**:** 79-87.

20. Jones BD, Ghori N, Falkow S. Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *The Journal of experimental medicine* 1994, **180**(1)**:** 15-23.

21. Perdomo OJ, Cavaillon JM, Huerre M, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti PJ. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *The Journal of experimental medicine* 1994, **180**(4)**:** 1307-1319.

22. Grutzkau A, Hanski C, Hahn H, Riecken EO. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by Yersinia enterocolitica and other enteroinvasive bacteria. *Gut* 1990, **31**(9)**:** 1011-1015.

23. Ohl ME, Miller SI. Salmonella: a model for bacterial pathogenesis. *Annual review of medicine* 2001, **52:** 259-274.

24. Donaldson DS, Kobayashi A, Ohno H, Yagita H, Williams IR, Mabbott NA. M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal immunology* 2012, **5**(2)**:** 216-225.

25. Zeitz M, Schieferdecker HL, Ullrich R, Jahn HU, James SP, Riecken EO. Phenotype and function of lamina propria T lymphocytes. *Immunologic research* 1991, **10**(3-4)**:** 199-206.

26. Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS immunology and medical microbiology* 2008, **52**(1)**:** 2-12.

27. Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(2)**:** 148-158.

28. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM*, et al.* Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature immunology* 2005, **6**(5)**:** 507-514.

29. Newberry RD, Lorenz RG. Organizing a mucosal defense. *Immunological reviews* 2005, **206:** 6-21.

30. Rochereau N, Verrier B, Pin JJ, Genin C, Paul S. Phenotypic localization of distinct DC subsets in mouse Peyer Patch. *Vaccine* 2011, **29**(20)**:** 3655-3661.

31. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine* 2005, **11**(4 Suppl)**:** S45-53.

32. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology* 2006, **24:** 99-146.

33. Steele L, Mayer L, Berin MC. Mucosal immunology of tolerance and allergy in the gastrointestinal tract. *Immunologic research* 2012, **54**(1-3)**:** 75-82.

34. Vallon-Eberhard A, Landsman L, Yogev N, Verrier B, Jung S. Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria. *Journal of immunology* 2006, **176**(4)**:** 2465-2469.

35. Parrott DM. The gut as a lymphoid organ. *Clinics in gastroenterology* 1976, **5**(2)**:** 211-228.

36. Lorenz RG, Newberry RD. Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004, **1029:** 44-57.

37. Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunological reviews* 2005, **206:** 32-63.

38. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature reviews Immunology* 2003, **3**(4)**:** 331-341.

39. Lefrancois L, Puddington L. Intestinal and pulmonary mucosal T cells: local heroes fight to maintain the status quo. *Annual review of immunology* 2006, **24:** 681-704.

40. Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nature immunology* 2001, **2**(11)**:** 997-1003.

41. Ruberti M, Fernandes LG, Simioni PU, Gabriel DL, Yamada AT, Tamashiro WM. Phenotypical and functional analysis of intraepithelial lymphocytes from small intestine of mice in oral tolerance. *Clinical & developmental immunology* 2012, **2012:** 208054.

42. Jenkinson SE, Whawell SA, Swales BM, Corps EM, Kilshaw PJ, Farthing PM. The alphaE(CD103)beta7 integrin interacts with oral and skin keratinocytes in an E-cadherin-independent manner*. *Immunology* 2011, **132**(2)**:** 188-196.

43. Ismail AS, Severson KM, Vaishnava S, Behrendt CL, Yu X, Benjamin JL*, et al.* Gammadelta intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(21)**:** 8743-8748.

44. Tschernig T, Pabst R. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 2000, **68**(1)**:** 1-8.

45. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nature reviews Immunology* 2012, **12**(8)**:** 592-605.

46. Fu H, Wang A, Mauro C, Marelli-Berg F. T lymphocyte trafficking: molecules and mechanisms. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2013, **18:** 422-440.

47. Gorfu G, Rivera-Nieves J, Ley K. Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Current molecular medicine* 2009, **9**(7)**:** 836-850.

48. Zeng R, Oderup C, Yuan R, Lee M, Habtezion A, Hadeiba H*, et al.* Retinoic acid regulates the development of a gut-homing precursor for intestinal dendritic cells. *Mucosal immunology* 2012.

49. Miles A, Liaskou E, Eksteen B, Lalor PF, Adams DH. CCL25 and CCL28 promote alpha4 beta7-integrin-dependent adhesion of lymphocytes to MAdCAM-1 under shear flow. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2008, **294**(5)**:** G1257-1267.

50. Johansen FE, Kaetzel CS. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal immunology* 2011, **4**(6)**:** 598-602.

51. Kuo TT, Aveson VG. Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. *mAbs* 2011, **3**(5)**:** 422-430.

52. Li Z, Palaniyandi S, Zeng R, Tuo W, Roopenian DC, Zhu X. Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(11)**:** 4388-4393.

53. Campeau JL, Salim SY, Albert EJ, Hotte N, Madsen KL. Intestinal epithelial cells modulate antigen-presenting cell responses to bacterial DNA. *Infection and immunity* 2012, **80**(8)**:** 2632-2644.

54. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal immunology* 2008, **1**(1)**:** 11-22.

55. Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B, Paul S. New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* 2012, **30**(2)**:** 142-154.

56. Rowland R, McShane H. Tuberculosis vaccines in clinical trials. *Expert review of vaccines* 2011, **10**(5)**:** 645-658.

57. Stanley M, Lowy DR, Frazer I. Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine* 2006, **24 Suppl 3:** S3/106-113.

58. Szarewski A. HPV vaccination and cervical cancer. *Current oncology reports* 2012, **14**(6)**:** 559-567.

59. Rynkiewicz D, Rathkopf M, Sim I, Waytes AT, Hopkins RJ, Giri L*, et al.* Marked enhancement of the immune response to BioThrax(R) (Anthrax Vaccine Adsorbed) by the TLR9 agonist CPG 7909 in healthy volunteers. *Vaccine* 2011, **29**(37)**:** 6313-6320.

60. Gajdos V, Soubeyrand B, Vidor E, Richard P, Boyer J, Sadorge C*, et al.* Immunogenicity and safety of combined adsorbed low-dose diphtheria, tetanus and inactivated poliovirus vaccine (REVAXIS ((R))) versus combined diphtheria, tetanus and inactivated poliovirus vaccine (DT Polio ((R))) given as a booster dose at 6 years of age. *Human vaccines* 2011, **7**(5)**:** 549-556.

61. Griffiths UK, Clark A, Gessner B, Miners A, Sanderson C, Sedyaningsih ER*, et al.* Dose-specific efficacy of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Epidemiology and infection* 2012, **140**(8)**:** 1343-1355.

62. WHO position paper on hepatitis A vaccines - June 2012. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 2012, **87**(28/29)**:** 261–276.

63. Rebmann T, Zelicoff A. Vaccination against influenza: role and limitations in pandemic intervention plans. *Expert review of vaccines* 2012, **11**(8)**:** 1009-1019.

64. Moss WJ, Griffin DE. Measles. *Lancet* 2012, **379**(9811)**:** 153-164.

65. Vipond C, Care R, Feavers IM. History of meningococcal vaccines and their serological correlates of protection. *Vaccine* 2012, **30 Suppl 2:** B10-17.

66. Kitchin NR. Review of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines in clinical development. *Expert review of vaccines* 2011, **10**(5)**:** 605-615.

67. Borrow R, Heath PT, Siegrist CA. Use of pneumococcal polysaccharide vaccine in children: what is the evidence? *Current opinion in infectious diseases* 2012, **25**(3)**:** 292-303.

68. Khan MI, Ochiai RL, Clemens JD. Population impact of Vi capsular polysaccharide vaccine. *Expert review of vaccines* 2010, **9**(5)**:** 485-496.

69. Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB. Cholera. *Lancet* 2012, **379**(9835)**:** 2466-2476.

70. Cholera vaccines: WHO position paper. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 2010, **85**(13)**:** 117-128.

71. De Vos B, Vesikari T, Linhares AC, Salinas B, Perez-Schael I, Ruiz-Palacios GM*, et al.* A rotavirus vaccine for prophylaxis of infants against rotavirus gastroenteritis. *The Pediatric infectious disease journal* 2004, **23**(10 Suppl)**:** S179-182.

72. Rotavirus vaccine and intussusception:report from an expert consultation. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 2011, **86**(30)**:** 317-321.

73. Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M, Esparza-Aguilar M, Johnson B, Gomez-Altamirano CM*, et al.* Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *The New England journal of medicine* 2010, **362**(4)**:** 299-305.

74. Rajapaksa TE, Bennett KM, Hamer M, Lytle C, Rodgers VG, Lo DD. Intranasal M cell uptake of nanoparticles is independently influenced by targeting ligands and buffer ionic strength. *The Journal of biological chemistry* 2010, **285**(31)**:** 23739-23746.

75. Belshe R, Lee MS, Walker RE, Stoddard J, Mendelman PM. Safety, immunogenicity and efficacy of intranasal, live attenuated influenza vaccine. *Expert review of vaccines* 2004, **3**(6)**:** 643-654.

76. Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scandinavian journal of immunology* 2004, **59**(1)**:** 1-15.

77. Who. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2006 influenza season. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 2005, **80**(40)**:** 342-347.

78. Zhaori G, Sun M, Ogra PL. Characteristics of the immune response to poliovirus virion polypeptides after immunization with live or inactivated polio vaccines. *The Journal of infectious diseases* 1988, **158**(1)**:** 160-165.

79. Hird TR, Grassly NC. Systematic review of mucosal immunity induced by oral and inactivated poliovirus vaccines against virus shedding following oral poliovirus challenge. *PLoS pathogens* 2012, **8**(4)**:** e1002599.

80. Polio vaccines and polio immunization in the pre-eradication era: WHO position paper. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 2010, **85**(23)**:** 213-228.

81. Typhoid vaccines: WHO position paper. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 2008, **83**(6)**:** 49-59.

82. Kantele A, Kantele JM, Savilahti E, Westerholm M, Arvilommi H, Lazarovits A*, et al.* Homing potentials of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation: oral, but not parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that all bear homing receptors directing them to the gut. *Journal of immunology* 1997, **158**(2)**:** 574-579.

83. Clemens J, Shin S, Sur D, Nair GB, Holmgren J. New-generation vaccines against cholera. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2011, **8**(12)**:** 701-710.

84. Ogra PL, Okayasu H, Czerkinsky C, Sutter RW. Mucosal immunity to poliovirus. *Expert review of vaccines* 2011, **10**(10)**:** 1389-1392.

85. Svennerholm AM, Hanson LA, Holmgren J, Jalil F, Lindblad BS, Khan SR*, et al.* Antibody responses to live and killed poliovirus vaccines in the milk of Pakistani and Swedish women. *The Journal of infectious diseases* 1981, **143**(5)**:** 707-711.

86. Czerkinsky C, Holmgren J. Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues. *Current topics in microbiology and immunology* 2012, **354:** 1-18.

87. Holmgren J, Svennerholm AM. Vaccines against mucosal infections. *Current opinion in immunology* 2012, **24**(3)**:** 343-353.

88. Castellino F, Galli G, Del Giudice G, Rappuoli R. Generating memory with vaccination. *European journal of immunology* 2009, **39**(8)**:** 2100-2105.

89. Khatib AM, Ali M, von Seidlein L, Kim DR, Hashim R, Reyburn R*, et al.* Effectiveness of an oral cholera vaccine in Zanzibar: findings from a mass vaccination campaign and observational cohort study. *The Lancet infectious diseases* 2012, **12**(11)**:** 837-844.

90. Gizurarson S. Anatomical and histological factors affecting intranasal drug and vaccine delivery. *Current drug delivery* 2012, **9**(6)**:** 566-582.

91. Czerkinsky C, Cuburu N, Kweon MN, Anjuere F, Holmgren J. Sublingual vaccination. *Human vaccines* 2011, **7**(1)**:** 110-114.

92. Anjuere F, Bekri S, Bihl F, Braud VM, Cuburu N, Czerkinsky C*, et al.* B cell and T cell immunity in the female genital tract: potential of distinct mucosal routes of vaccination and role of tissue-associated dendritic cells and natural killer cells. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012, **18 Suppl 5:** 117-122.

93. Song JH, Nguyen HH, Cuburu N, Horimoto T, Ko SY, Park SH*, et al.* Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(5)**:** 1644-1649.

94. Cuburu N, Kweon MN, Hervouet C, Cha HR, Pang YY, Holmgren J*, et al.* Sublingual immunization with nonreplicating antigens induces antibody-forming cells and cytotoxic T cells in the female genital tract mucosa and protects against genital papillomavirus infection. *Journal of immunology* 2009, **183**(12)**:** 7851-7859.

95. Raghavan S, Ostberg AK, Flach CF, Ekman A, Blomquist M, Czerkinsky C*, et al.* Sublingual immunization protects against Helicobacter pylori infection and induces T and B cell responses in the stomach. *Infection and immunity* 2010, **78**(10)**:** 4251-4260.

96. Cuburu N, Kweon MN, Song JH, Hervouet C, Luci C, Sun JB*, et al.* Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine* 2007, **25**(51)**:** 8598-8610.

97. Mestecky J, Russell MW, Elson CO. Perspectives on mucosal vaccines: is mucosal tolerance a barrier? *Journal of immunology* 2007, **179**(9)**:** 5633-5638.

98. Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunological reviews* 2011, **239**(1)**:** 178-196.

99. Goldszmid RS, Trinchieri G. The price of immunity. *Nature immunology* 2012, **13**(10)**:** 932-938.

100. Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annual review of immunology* 2012, **30:** 733-758.

101. Andersen MH, Sorensen RB, Schrama D, Svane IM, Becker JC, Thor Straten P. Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2008, **57**(11)**:** 1735-1743.

102. Appelberg R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends in microbiology* 2007, **15**(2)**:** 87-92.

103. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal immunology* 2012, **5**(3)**:** 232-239.

104. Demento SL, Siefert AL, Bandyopadhyay A, Sharp FA, Fahmy TM. Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines. *Trends in biotechnology* 2011, **29**(6)**:** 294-306.

105. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current opinion in immunology* 2009, **21**(1)**:** 23-29.

106. Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annual review of microbiology* 1997, **51:** 311-340.

107. Fierens K, Kool M. The mechanism of adjuvanticity of aluminium-containing formulas. *Current pharmaceutical design* 2012, **18**(16)**:** 2305-2313.

108. Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan DT*, et al.* Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 2011, **29**(9)**:** 1812-1823.

109. De Gregorio E, D'Oro U, Wack A. Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants. *Current opinion in immunology* 2009, **21**(3)**:** 339-345.

110. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H*, et al.* AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *Journal of immunology* 2009, **183**(10)**:** 6186-6197.

111. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008, **453**(7198)**:** 1122-1126.

112. Spreafico R, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. The controversial relationship between NLRP3, alum, danger signals and the next-generation adjuvants. *European journal of immunology* 2010, **40**(3)**:** 638-642.

113. Burgess MA, McIntyre PB. Vaccines and the cold chain: is it too hot ... or too cold? *The Medical journal of Australia* 1999, **171**(2)**:** 82.

114. Decroix N, Quan CP, Pamonsinlapatham P, Bouvet JP. Mucosal immunity induced by intramuscular administration of free peptides in-line with PADRE: IgA antibodies to the ELDKWA epitope of HIV gp41. *Scandinavian journal of immunology* 2002, **56**(1)**:** 59-65.

115. Garcon N, Vaughn DW, Didierlaurent AM. Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing alpha-tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert review of vaccines* 2012, **11**(3)**:** 349-366.

116. Seubert A, Monaci E, Pizza M, O'Hagan DT, Wack A. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *Journal of immunology* 2008, **180**(8)**:** 5402-5412.

117. Caproni E, Tritto E, Cortese M, Muzzi A, Mosca F, Monaci E*, et al.* MF59 and Pam3CSK4 boost adaptive responses to influenza subunit vaccine through an IFN type I-independent mechanism of action. *Journal of immunology* 2012, **188**(7)**:** 3088-3098.

118. Boyce TG, Hsu HH, Sannella EC, Coleman-Dockery SD, Baylis E, Zhu Y*, et al.* Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults. *Vaccine* 2000, **19**(2-3)**:** 217-226.

119. Gregoriadis G. Drug entrapment in liposomes. *FEBS letters* 1973, **36**(3)**:** 292-296.

120. De Temmerman ML, Rejman J, Demeester J, Irvine DJ, Gander B, De Smedt SC. Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug discovery today* 2011, **16**(13-14)**:** 569-582.

121. Uchida T. Development of a cytotoxic T-lymphocyte-based, broadly protective influenza vaccine. *Microbiology and immunology* 2011, **55**(1)**:** 19-27.

122. Agger EM, Rosenkrands I, Hansen J, Brahimi K, Vandahl BS, Aagaard C*, et al.* Cationic liposomes formulated with synthetic mycobacterial cordfactor (CAF01): a versatile adjuvant for vaccines with different immunological requirements. *PloS one* 2008, **3**(9)**:** e3116.

123. Christensen D, Foged C, Rosenkrands I, Lundberg CV, Andersen P, Agger EM*, et al.* CAF01 liposomes as a mucosal vaccine adjuvant: In vitro and in vivo investigations. *International journal of pharmaceutics* 2010, **390**(1)**:** 19-24.

124. Moser C, Amacker M, Zurbriggen R. Influenza virosomes as a vaccine adjuvant and carrier system. *Expert review of vaccines* 2011, **10**(4)**:** 437-446.

125. Durrer P, Gluck U, Spyr C, Lang AB, Zurbriggen R, Herzog C*, et al.* Mucosal antibody response induced with a nasal virosome-based influenza vaccine. *Vaccine* 2003, **21**(27-30)**:** 4328-4334.

126. Gluck R, Moser C, Metcalfe IC. Influenza virosomes as an efficient system for adjuvanted vaccine delivery. *Expert opinion on biological therapy* 2004, **4**(7)**:** 1139-1145.

127. Childers NK, Miller KL, Tong G, Llarena JC, Greenway T, Ulrich JT*, et al.* Adjuvant activity of monophosphoryl lipid A for nasal and oral immunization with soluble or liposome-associated antigen. *Infection and immunity* 2000, **68**(10)**:** 5509-5516.

128. Harokopakis E, Hajishengallis G, Michalek SM. Effectiveness of liposomes possessing surface-linked recombinant B subunit of cholera toxin as an oral antigen delivery system. *Infection and immunity* 1998, **66**(9)**:** 4299-4304.

129. Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, Roger MG*, et al.* Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity* 2011, **34**(2)**:** 269-280.

130. Morelli AB, Becher D, Koernig S, Silva A, Drane D, Maraskovsky E. ISCOMATRIX: a novel adjuvant for use in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases. *Journal of medical microbiology* 2012, **61**(Pt 7)**:** 935-943.

131. Wilson NS, Yang B, Morelli AB, Koernig S, Yang A, Loeser S*, et al.* ISCOMATRIX vaccines mediate CD8+ T-cell cross-priming by a MyD88-dependent signaling pathway. *Immunology and cell biology* 2012, **90**(5)**:** 540-552.

132. Eliasson DG, Helgeby A, Schon K, Nygren C, El-Bakkouri K, Fiers W*, et al.* A novel non-toxic combined CTA1-DD and ISCOMS adjuvant vector for effective mucosal immunization against influenza virus. *Vaccine* 2011, **29**(23)**:** 3951-3961.

133. Pandey RS, Dixit VK. Evaluation of ISCOM vaccines for mucosal immunization against hepatitis B. *Journal of drug targeting* 2010, **18**(4)**:** 282-291.

134. Drane D, Gittleson C, Boyle J, Maraskovsky E. ISCOMATRIX adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines. *Expert review of vaccines* 2007, **6**(5)**:** 761-772.

135. Duewell P, Kisser U, Heckelsmiller K, Hoves S, Stoitzner P, Koernig S*, et al.* ISCOMATRIX adjuvant combines immune activation with antigen delivery to dendritic cells in vivo leading to effective cross-priming of CD8+ T cells. *Journal of immunology* 2011, **187**(1)**:** 55-63.

136. Cox JC, Sjolander A, Barr IG. ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Advanced drug delivery reviews* 1998, **32**(3)**:** 247-271.

137. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced drug delivery reviews* 2003, **55**(3)**:** 329-347.

138. Couvreur, Hillaireau, Uchegbu, Schätzlein. Polymers in drug delivery - Chapter 8 *Pharmacology & toxicology* 2006.

139. Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceutical research* 2004, **21**(2)**:** 344-353.

140. Moschos SA, Bramwell VW, Somavarapu S, Alpar HO. Adjuvant synergy: the effects of nasal coadministration of adjuvants. *Immunology and cell biology* 2004, **82**(6)**:** 628-637.

141. Delair T. Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versatile nanocarriers of bioactive molecules. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2011, **78**(1)**:** 10-18.

142. Bachelder EM, Beaudette TT, Broaders KE, Frechet JM, Albrecht MT, Mateczun AJ*, et al.* In vitro analysis of acetalated dextran microparticles as a potent delivery platform for vaccine adjuvants. *Molecular pharmaceutics* 2010, **7**(3)**:** 826-835.

143. Cui L, Cohen JA, Broaders KE, Beaudette TT, Frechet JM. Mannosylated dextran nanoparticles: a pH-sensitive system engineered for immunomodulation through mannose targeting. *Bioconjugate chemistry* 2011, **22**(5)**:** 949-957.

144. Marciani DJ. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug discovery today* 2003, **8**(20)**:** 934-943.

145. Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Specht CA, Levitz SM. Robust stimulation of humoral and cellular immune responses following vaccination with antigen-loaded beta-glucan particles. *mBio* 2010, **1**(3).

146. Castro GR, Panilaitis B, Bora E, Kaplan DL. Controlled release biopolymers for enhancing the immune response. *Molecular pharmaceutics* 2007, **4**(1)**:** 33-46.

147. Avota E, Gulbins E, Schneider-Schaulies S. DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells. *PLoS pathogens* 2011, **7**(2)**:** e1001290.

148. Hamdy S, Haddadi A, Shayeganpour A, Samuel J, Lavasanifar A. Activation of antigen-specific T cell-responses by mannan-decorated PLGA nanoparticles. *Pharmaceutical research* 2011, **28**(9)**:** 2288-2301.

149. Yu W, Liu C, Liu Y, Zhang N, Xu W. Mannan-modified solid lipid nanoparticles for targeted gene delivery to alveolar macrophages. *Pharmaceutical research* 2010, **27**(8)**:** 1584-1596.

150. Tang CK, Sheng KC, Pouniotis D, Esparon S, Son HY, Kim CW*, et al.* Oxidized and reduced mannan mediated MUC1 DNA immunization induce effective anti-tumor responses. *Vaccine* 2008, **26**(31)**:** 3827-3834.

151. Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Narasimhan B. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *Journal of pharmaceutical sciences* 2009, **98**(4)**:** 1278-1316.

152. Torres MP, Wilson-Welder JH, Lopac SK, Phanse Y, Carrillo-Conde B, Ramer-Tait AE*, et al.* Polyanhydride microparticles enhance dendritic cell antigen presentation and activation. *Acta biomaterialia* 2011, **7**(7)**:** 2857-2864.

153. Akagi T, Wang X, Uto T, Baba M, Akashi M. Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly(amino acid) derivatives. *Biomaterials* 2007, **28**(23)**:** 3427-3436.

154. Peek LJ, Middaugh CR, Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Advanced drug delivery reviews* 2008, **60**(8)**:** 915-928.

155. Gupta RK, Alroy J, Alonso MJ, Langer R, Siber GR. Chronic local tissue reactions, long-term immunogenicity and immunologic priming of mice and guinea pigs to tetanus toxoid encapsulated in biodegradable polymer microspheres composed of poly lactide-co-glycolide polymers. *Vaccine* 1997, **15**(16)**:** 1716-1723.

156. Lamalle-Bernard D, Munier S, Compagnon C, Charles MH, Kalyanaraman VS, Delair T*, et al.* Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2006, **115**(1)**:** 57-67.

157. des Rieux A, Pourcelle V, Cani PD, Marchand-Brynaert J, Preat V. Targeted nanoparticles with novel non-peptidic ligands for oral delivery. *Advanced drug delivery reviews* 2013.

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

159. Wendorf J, Singh M, Chesko J, Kazzaz J, Soewanan E, Ugozzoli M*, et al.* A practical approach to the use of nanoparticles for vaccine delivery. *Journal of pharmaceutical sciences* 2006, **95**(12)**:** 2738-2750.

160. Newman KD, Elamanchili P, Kwon GS, Samuel J. Uptake of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells in vivo. *Journal of biomedical materials research* 2002, **60**(3)**:** 480-486.

161. Guillon C, Mayol K, Terrat C, Compagnon C, Primard C, Charles MH*, et al.* 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* 2007, **25**(43)**:** 7491-7501.

162. Katz DE, DeLorimier AJ, Wolf MK, Hall ER, Cassels FJ, van Hamont JE*, et al.* Oral immunization of adult volunteers with microencapsulated enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) CS6 antigen. *Vaccine* 2003, **21**(5-6)**:** 341-346.

163. Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical research* 2002, **19**(6)**:** 715-728.

164. Silva JM, Videira M, Gaspar R, Preat V, Florindo HF. Immune system targeting by biodegradable nanoparticles for cancer vaccines. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2013.

165. Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Advanced drug delivery reviews* 2005, **57**(3)**:** 391-410.

166. Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials* 1995, **16**(4)**:** 305-311.

167. Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced drug delivery reviews* 1997, **28**(1)**:** 5-24.

168. Zweers ML, Engbers GH, Grijpma DW, Feijen J. In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide). *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2004, **100**(3)**:** 347-356.

169. Chadwick S, Kriegel C, Amiji M. Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Advanced drug delivery reviews* 2010, **62**(4-5)**:** 394-407.

170. Aguilar JC, Rodriguez EG. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 2007, **25**(19)**:** 3752-3762.

171. Sharma S, Mukkur TK, Benson HA, Chen Y. Pharmaceutical aspects of intranasal delivery of vaccines using particulate systems. *Journal of pharmaceutical sciences* 2009, **98**(3)**:** 812-843.

172. Lassalle V, Ferreira ML. PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation. *Macromolecular bioscience* 2007, **7**(6)**:** 767-783.

173. Wong K, Sun G, Zhang X, Dai H, Liu Y, He C*, et al.* PEI-g-chitosan, a novel gene delivery system with transfection efficiency comparable to polyethylenimine in vitro and after liver administration in vivo. *Bioconjugate chemistry* 2006, **17**(1)**:** 152-158.

174. Fujita Y, Taguchi H. Overview and outlook of Toll-like receptor ligand-antigen conjugate vaccines. *Therapeutic delivery* 2012, **3**(6)**:** 749-760.

175. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in immunology* 2009, **30**(1)**:** 23-32.

176. Rappuoli R, Pizza M, Douce G, Dougan G. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and Escherichia coli heat-labile enterotoxins. *Immunology today* 1999, **20**(11)**:** 493-500.

177. Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T*, et al.* Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *The New England journal of medicine* 2004, **350**(9)**:** 896-903.

178. Amorim JH, Diniz MO, Cariri FA, Rodrigues JF, Bizerra RS, Goncalves AJ*, et al.* Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine* 2012, **30**(5)**:** 837-845.

179. Adamsson J, Lindblad M, Lundqvist A, Kelly D, Holmgren J, Harandi AM. Novel immunostimulatory agent based on CpG oligodeoxynucleotide linked to the nontoxic B subunit of cholera toxin. *Journal of immunology* 2006, **176**(8)**:** 4902-4913.

180. Erume J, Partidos CD. Evaluation of the LTK63 adjuvant effect on cellular immune responses to measles virus nucleoprotein. *African health sciences* 2011, **11**(2)**:** 151-157.

181. Lewis DJ, Huo Z, Barnett S, Kromann I, Giemza R, Galiza E*, et al.* Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of Escherichia coli heat labile toxin. *PloS one* 2009, **4**(9)**:** e6999.

182. Huckriede A, Bungener L, Stegmann T, Daemen T, Medema J, Palache AM*, et al.* The virosome concept for influenza vaccines. *Vaccine* 2005, **23 Suppl 1:** S26-38.

183. Olvera-Gomez I, Hamilton SE, Xiao Z, Guimaraes CP, Ploegh HL, Hogquist KA*, et al.* Cholera toxin activates nonconventional adjuvant pathways that induce protective CD8 T-cell responses after epicutaneous vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(6)**:** 2072-2077.

184. Norton EB, Lawson LB, Mahdi Z, Freytag LC, Clements JD. The A subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin functions as a mucosal adjuvant and promotes IgG2a, IgA, and Th17 responses to vaccine antigens. *Infection and immunity* 2012, **80**(7)**:** 2426-2435.

185. Agren LC, Ekman L, Lowenadler B, Lycke NY. Genetically engineered nontoxic vaccine adjuvant that combines B cell targeting with immunomodulation by cholera toxin A1 subunit. *Journal of immunology* 1997, **158**(8)**:** 3936-3946.

186. Lycke N, Bemark M. Mucosal adjuvants and long-term memory development with special focus on CTA1-DD and other ADP-ribosylating toxins. *Mucosal immunology* 2010, **3**(6)**:** 556-566.

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

188. Longhi MP, Trumpfheller C, Idoyaga J, Caskey M, Matos I, Kluger C*, et al.* Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *The Journal of experimental medicine* 2009, **206**(7)**:** 1589-1602.

189. Stahl-Hennig C, Eisenblatter M, Jasny E, Rzehak T, Tenner-Racz K, Trumpfheller C*, et al.* Synthetic double-stranded RNAs are adjuvants for the induction of T helper 1 and humoral immune responses to human papillomavirus in rhesus macaques. *PLoS pathogens* 2009, **5**(4)**:** e1000373.

190. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K*, et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006, **441**(7089)**:** 101-105.

191. Davey GM, Wojtasiak M, Proietto AI, Carbone FR, Heath WR, Bedoui S. Cutting edge: priming of CD8 T cell immunity to herpes simplex virus type 1 requires cognate TLR3 expression in vivo. *Journal of immunology* 2010, **184**(5)**:** 2243-2246.

192. Gowen BB, Wong MH, Jung KH, Sanders AB, Mitchell WM, Alexopoulou L*, et al.* TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly(I:C12U), but not Poly(I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules. *Journal of immunology* 2007, **178**(8)**:** 5200-5208.

193. Trumpfheller C, Caskey M, Nchinda G, Longhi MP, Mizenina O, Huang Y*, et al.* The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(7)**:** 2574-2579.

194. Qureshi N, Takayama K, Ribi E. Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of Salmonella typhimurium. *The Journal of biological chemistry* 1982, **257**(19)**:** 11808-11815.

195. Di Mario S, Basevi V, Borsari S, Balduzzi S, Magrini N. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine. *The lancet oncology* 2012, **13**(2)**:** e50; author reply e50.

196. Sarti F, Perera G, Hintzen F, Kotti K, Karageorgiou V, Kammona O*, et al.* In vivo evidence of oral vaccination with PLGA nanoparticles containing the immunostimulant monophosphoryl lipid A. *Biomaterials* 2011, **32**(16)**:** 4052-4057.

197. Pinczewski J, Zhao J, Malkevitch N, Patterson LJ, Aldrich K, Alvord WG*, et al.* Enhanced immunity and protective efficacy against SIVmac251 intrarectal challenge following ad-SIV priming by multiple mucosal routes and gp120 boosting in MPL-SE. *Viral immunology* 2005, **18**(1)**:** 236-243.

198. Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* 2007, **316**(5831)**:** 1628-1632.

199. Yoon SI, Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL*, et al.* Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science* 2012, **335**(6070)**:** 859-864.

200. Kinnebrew MA, Buffie CG, Diehl GE, Zenewicz LA, Leiner I, Hohl TM*, et al.* Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* 2012, **36**(2)**:** 276-287.

201. Hong SH, Byun YH, Nguyen CT, Kim SY, Seong BL, Park S*, et al.* Intranasal administration of a flagellin-adjuvanted inactivated influenza vaccine enhances mucosal immune responses to protect mice against lethal infection. *Vaccine* 2012, **30**(2)**:** 466-474.

202. Munoz N, Van Maele L, Marques JM, Rial A, Sirard JC, Chabalgoity JA. Mucosal administration of flagellin protects mice from Streptococcus pneumoniae lung infection. *Infection and immunity* 2010, **78**(10)**:** 4226-4233.

203. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ*, et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *The Journal of experimental medicine* 2009, **206**(2)**:** 299-311.

204. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA*, et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature medicine* 2008, **14**(3)**:** 275-281.

205. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Songhet P, Dumoutier L, Ferrero I*, et al.* TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *Journal of immunology* 2010, **185**(2)**:** 1177-1185.

206. Huleatt JW, Jacobs AR, Tang J, Desai P, Kopp EB, Huang Y*, et al.* Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine* 2007, **25**(4)**:** 763-775.

207. McDonald WF, Huleatt JW, Foellmer HG, Hewitt D, Tang J, Desai P*, et al.* A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *The Journal of infectious diseases* 2007, **195**(11)**:** 1607-1617.

208. Miao EA, Warren SE. Innate immune detection of bacterial virulence factors via the NLRC4 inflammasome. *Journal of clinical immunology* 2010, **30**(4)**:** 502-506.

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

210. Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X*, et al.* Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *Journal of immunology* 2005, **174**(3)**:** 1259-1268.

211. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K*, et al.* Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature immunology* 2002, **3**(2)**:** 196-200.

212. Wang Y, Abel K, Lantz K, Krieg AM, McChesney MB, Miller CJ. The Toll-like receptor 7 (TLR7) agonist, imiquimod, and the TLR9 agonist, CpG ODN, induce antiviral cytokines and chemokines but do not prevent vaginal transmission of simian immunodeficiency virus when applied intravaginally to rhesus macaques. *Journal of virology* 2005, **79**(22)**:** 14355-14370.

213. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F*, et al.* Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal of experimental medicine* 2001, **194**(6)**:** 863-869.

214. Wille-Reece U, Flynn BJ, Lore K, Koup RA, Miles AP, Saul A*, et al.* Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(5)**:** 1249-1258.

215. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology* 2004, **5**(10)**:** 987-995.

216. Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H*, et al.* Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature immunology* 2002, **3**(6)**:** 499.

217. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010, **32**(3)**:** 305-315.

218. Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Muller T, Latz E*, et al.* The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 2008, **28**(3)**:** 315-323.

219. Marshall JD, Higgins D, Abbate C, Yee P, Teshima G, Ott G*, et al.* Polymyxin B enhances ISS-mediated immune responses across multiple species. *Cellular immunology* 2004, **229**(2)**:** 93-105.

220. Jennings GT, Bachmann MF. Immunodrugs: therapeutic VLP-based vaccines for chronic diseases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2009, **49:** 303-326.

221. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert review of vaccines* 2011, **10**(4)**:** 499-511.

222. Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R*, et al.* Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(2)**:** 413-424.

223. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(3)**:** 179-190.

224. Rappuoli R, Mandl CW, Black S, De Gregorio E. Vaccines for the twenty-first century society. *Nature reviews Immunology* 2011, **11**(12)**:** 865-872.

225. Kanneganti TD. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nature reviews Immunology* 2010, **10**(10)**:** 688-698.

226. Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annual review of pathology* 2009, **4:** 365-398.

227. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature reviews Immunology* 2003, **3**(5)**:** 371-382.

228. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(7)**:** 4812-4818.

229. O'Neill LA. Synergism between NOD-like receptors and Toll-like receptors in human B lymphocytes. *Journal of leukocyte biology* 2011, **89**(2)**:** 173-175.

230. Petterson T, Jendholm J, Mansson A, Bjartell A, Riesbeck K, Cardell LO. Effects of NOD-like receptors in human B lymphocytes and crosstalk between NOD1/NOD2 and Toll-like receptors. *Journal of leukocyte biology* 2011, **89**(2)**:** 177-187.

231. Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF*, et al.* Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003, **52**(11)**:** 1591-1597.

232. Geddes K, Magalhaes JG, Girardin SE. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nature reviews Drug discovery* 2009, **8**(6)**:** 465-479.

233. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature immunology* 2006, **7**(12)**:** 1250-1257.

234. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J*, et al.* Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003, **300**(5625)**:** 1584-1587.

235. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L*, et al.* An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology* 2003, **4**(7)**:** 702-707.

236. Charrier L, Merlin D. The oligopeptide transporter hPepT1: gateway to the innate immune response. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2006, **86**(6)**:** 538-546.

237. Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like receptors: sentinels at host membranes. *Current opinion in immunology* 2010, **22**(4)**:** 428-434.

238. Bertrand MJ, Doiron K, Labbe K, Korneluk RG, Barker PA, Saleh M. Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2. *Immunity* 2009, **30**(6)**:** 789-801.

239. Magalhaes JG, Lee J, Geddes K, Rubino S, Philpott DJ, Girardin SE. Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *European journal of immunology* 2011, **41**(5)**:** 1445-1455.

240. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development* 2012, **26**(3)**:** 203-234.

241. Park JH, Kim YG, McDonald C, Kanneganti TD, Hasegawa M, Body-Malapel M*, et al.* RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *Journal of immunology* 2007, **178**(4)**:** 2380-2386.

242. Park JH, Kim YG, Shaw M, Kanneganti TD, Fujimoto Y, Fukase K*, et al.* Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *Journal of immunology* 2007, **179**(1)**:** 514-521.

243. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M*, et al.* NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004, **53**(11)**:** 1658-1664.

244. Uehara A, Yang S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Shibata K*, et al.* Muramyldipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramylpeptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cellular microbiology* 2005, **7**(1)**:** 53-61.

245. Timmermans K, Plantinga TS, Kox M, Vaneker M, Scheffer GJ, Adema GJ*, et al.* Blueprints of signaling interactions between pattern recognition receptors: implications for the design of vaccine adjuvants. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2013, **20**(3)**:** 427-432.

246. Yang S, Tamai R, Akashi S, Takeuchi O, Akira S, Sugawara S*, et al.* Synergistic effect of muramyldipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infection and immunity* 2001, **69**(4)**:** 2045-2053.

247. Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreulx D, Caroff M*, et al.* Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *European journal of immunology* 2005, **35**(8)**:** 2459-2470.

248. Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infection and immunity* 2005, **73**(12)**:** 7967-7976.

249. Schwarz H, Posselt G, Wurm P, Ulbing M, Duschl A, Horejs-Hoeck J. TLR8 and NOD signaling synergistically induce the production of IL-1beta and IL-23 in monocyte-derived DCs and enhance the expression of the feedback inhibitor SOCS2. *Immunobiology* 2013, **218**(4)**:** 533-542.

250. Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA*, et al.* Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* 2007, **26**(4)**:** 445-459.

251. Magalhaes JG, Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Travassos LH, Selvanantham T*, et al.* Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *Journal of immunology* 2008, **181**(11)**:** 7925-7935.

252. Jackson EM, Herbst-Kralovetz MM. Intranasal vaccination with murabutide enhances humoral and mucosal immune responses to a virus-like particle vaccine. *PloS one* 2012, **7**(7)**:** e41529.

253. Bal SM, Slutter B, Verheul R, Bouwstra JA, Jiskoot W. Adjuvanted, antigen loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles for nasal and intradermal vaccination: adjuvant- and site-dependent immunogenicity in mice. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2012, **45**(4)**:** 475-481.

254. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G*, et al.* Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005, **307**(5710)**:** 731-734.

255. Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P*, et al.* NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature medicine* 2010, **16**(1)**:** 90-97.

256. Tabata Y, Ikada Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials* 1988, **9**(4)**:** 356-362.

257. Ruth. In vitro phagocytosis assay of nano-and microparticles by chemiluminescence III Uptake of differently sized surface-modified particles, and its correlation to particle properties and in vivo distribution.

258. Simon SI, Schmid-Schonbein GW. Biophysical aspects of microsphere engulfment by human neutrophils. *Biophysical journal* 1988, **53**(2)**:** 163-173.

259. Koppolu B, Zaharoff DA. The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells. *Biomaterials* 2013, **34**(9)**:** 2359-2369.

260. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 2010, **31**(13)**:** 3657-3666.

261. Kanchan V, Panda AK. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials* 2007, **28**(35)**:** 5344-5357.

262. Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature reviews Drug discovery* 2010, **9**(8)**:** 615-627.

263. De Koker S, Lambrecht BN, Willart MA, van Kooyk Y, Grooten J, Vervaet C*, et al.* Designing polymeric particles for antigen delivery. *Chemical Society reviews* 2011, **40**(1)**:** 320-339.

264. Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 2004, **304**(5673)**:** 1014-1018.

265. Espuelas S, Roth A, Thumann C, Frisch B, Schuber F. Effect of synthetic lipopeptides formulated in liposomes on the maturation of human dendritic cells. *Molecular immunology* 2005, **42**(6)**:** 721-729.

266. Vandepapeliere P, Horsmans Y, Moris P, Van Mechelen M, Janssens M, Koutsoukos M*, et al.* Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers. *Vaccine* 2008, **26**(10)**:** 1375-1386.

267. Kazzaz J, Singh M, Ugozzoli M, Chesko J, Soenawan E, O'Hagan DT. Encapsulation of the immune potentiators MPL and RC529 in PLG microparticles enhances their potency. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2006, **110**(3)**:** 566-573.

268. Faham A, Altin JG. Antigen-containing liposomes engrafted with flagellin-related peptides are effective vaccines that can induce potent antitumor immunity and immunotherapeutic effect. *Journal of immunology* 2010, **185**(3)**:** 1744-1754.

269. Demento SL, Bonafe N, Cui W, Kaech SM, Caplan MJ, Fikrig E*, et al.* TLR9-targeted biodegradable nanoparticles as immunization vectors protect against West Nile encephalitis. *Journal of immunology* 2010, **185**(5)**:** 2989-2997.

270. Li WM, Bally MB, Schutze-Redelmeier MP. Enhanced immune response to T-independent antigen by using CpG oligodeoxynucleotides encapsulated in liposomes. *Vaccine* 2001, **20**(1-2)**:** 148-157.

271. Singh M, Ott G, Kazzaz J, Ugozzoli M, Briones M, Donnelly J*, et al.* Cationic microparticles are an effective delivery system for immune stimulatory cpG DNA. *Pharmaceutical research* 2001, **18**(10)**:** 1476-1479.

272. Johnston D, Zaidi B, Bystryn JC. TLR7 imidazoquinoline ligand 3M-019 is a potent adjuvant for pure protein prototype vaccines. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2007, **56**(8)**:** 1133-1141.

273. Westwood A, Elvin SJ, Healey GD, Williamson ED, Eyles JE. Immunological responses after immunisation of mice with microparticles containing antigen and single stranded RNA (polyuridylic acid). *Vaccine* 2006, **24**(11)**:** 1736-1743.

274. De Haes W, De Koker S, Pollard C, Atkinson D, Vlieghe E, Hoste J*, et al.* Polyelectrolyte capsules-containing HIV-1 p24 and poly I:C modulate dendritic cells to stimulate HIV-1-specific immune responses. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2010, **18**(7)**:** 1408-1416.

275. Wischke C, Zimmermann J, Wessinger B, Schendler A, Borchert HH, Peters JH*, et al.* Poly(I:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation. *International journal of pharmaceutics* 2009, **365**(1-2)**:** 61-68.

276. Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A*, et al.* Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *Journal of immunology* 2006, **176**(12)**:** 7335-7345.

277. Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N*, et al.* The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *Journal of immunology* 2002, **168**(5)**:** 2118-2126.

278. Cruz LJ, Tacken PJ, Fokkink R, Joosten B, Stuart MC, Albericio F*, et al.* Targeted PLGA nano- but not microparticles specifically deliver antigen to human dendritic cells via DC-SIGN in vitro. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2010, **144**(2)**:** 118-126.

279. Fischer NO, Rasley A, Corzett M, Hwang MH, Hoeprich PD, Blanchette CD. Colocalized delivery of adjuvant and antigen using nanolipoprotein particles enhances the immune response to recombinant antigens. *Journal of the American Chemical Society* 2013, **135**(6)**:** 2044-2047.

280. Barhate G, Gautam M, Gairola S, Jadhav S, Pokharkar V. Quillaja saponaria extract as mucosal adjuvant with chitosan functionalized gold nanoparticles for mucosal vaccine delivery: stability and immunoefficiency studies. *International journal of pharmaceutics* 2013, **441**(1-2)**:** 636-642.

281. Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, Koutsonanos D, Hua T, Nakaya HI*, et al.* Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 2011, **470**(7335)**:** 543-547.

282. Thomas C, Rawat A, Hope-Weeks L, Ahsan F. Aerosolized PLA and PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. *Molecular pharmaceutics* 2011, **8**(2)**:** 405-415.

283. Read RC, Naylor SC, Potter CW, Bond J, Jabbal-Gill I, Fisher A*, et al.* Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. *Vaccine* 2005, **23**(35)**:** 4367-4374.

284. Sharp FA, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P*, et al.* Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(3)**:** 870-875.

285. Zhu P, Liu J, Bess J, Jr., Chertova E, Lifson JD, Grise H*, et al.* Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 2006, **441**(7095)**:** 847-852.

286. Chertova E, Chertov O, Coren LV, Roser JD, Trubey CM, Bess JW, Jr.*, et al.* Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *Journal of virology* 2006, **80**(18)**:** 9039-9052.

287. Zapp ML, Green MR. Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* 1989, **342**(6250)**:** 714-716.

288. Emerman M, Malim MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 1998, **280**(5371)**:** 1880-1884.

289. Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nature medicine* 2003, **9**(11)**:** 1404-1407.

290. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Segeral E*, et al.* SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 2011, **474**(7353)**:** 654-657.

291. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature reviews Microbiology* 2012, **10**(4)**:** 279-290.

292. Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nature reviews Immunology* 2008, **8**(6)**:** 447-457.

293. Coombs RW, Reichelderfer PS, Landay AL. Recent observations on HIV type-1 infection in the genital tract of men and women. *Aids* 2003, **17**(4)**:** 455-480.

294. Haase AT. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annual review of medicine* 2011, **62:** 127-139.

295. Abrahams MR, Anderson JA, Giorgi EE, Seoighe C, Mlisana K, Ping LH*, et al.* Quantitating the multiplicity of infection with human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. *Journal of virology* 2009, **83**(8)**:** 3556-3567.

296. Sagar M. HIV-1 transmission biology: selection and characteristics of infecting viruses. *The Journal of infectious diseases* 2010, **202 Suppl 2:** S289-296.

297. Li Q, Skinner PJ, Ha SJ, Duan L, Mattila TL, Hage A*, et al.* Visualizing antigen-specific and infected cells in situ predicts outcomes in early viral infection. *Science* 2009, **323**(5922)**:** 1726-1729.

298. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F*, et al.* Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *The New England journal of medicine* 2000, **342**(13)**:** 921-929.

299. Baggaley RF, White RG, Boily MC. Systematic review of orogenital HIV-1 transmission probabilities. *International journal of epidemiology* 2008, **37**(6)**:** 1255-1265.

300. Lawrence, Zimmer, Paul. Infection muqueuse par le virus VIH-1: mécanismes, conséquences, perspectives de vaccination. *Revue Francophone des Laboratoires* 2009**:** 45-54.

301. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T*, et al.* Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature medicine* 1999, **5**(5)**:** 512-517.

302. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y*, et al.* Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* 2005, **434**(7037)**:** 1148-1152.

303. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S*, et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature medicine* 2006, **12**(12)**:** 1365-1371.

304. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH*, et al.* HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993, **362**(6418)**:** 355-358.

305. Eisele E, Siliciano RF. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity* 2012, **37**(3)**:** 377-388.

306. Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nature medicine* 1995, **1**(12)**:** 1284-1290.

307. Zack JA, Haislip AM, Krogstad P, Chen IS. Incompletely reverse-transcribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle. *Journal of virology* 1992, **66**(3)**:** 1717-1725.

308. Yuki Y, Nochi T, Kiyono H. Progress towards an AIDS mucosal vaccine: an overview. *Tuberculosis* 2007, **87 Suppl 1:** S35-44.

309. Mestecky J, Moldoveanu Z, Smith PD, Hel Z, Alexander RC. Mucosal immunology of the genital and gastrointestinal tracts and HIV-1 infection. *Journal of reproductive immunology* 2009, **83**(1-2)**:** 196-200.

310. Brenchley JM, Douek DC. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal immunology* 2008, **1**(1)**:** 23-30.

311. Veazey R, Lackner A. The mucosal immune system and HIV-1 infection. *AIDS reviews* 2003, **5**(4)**:** 245-252.

312. Cicala C, Arthos J, Fauci AS. HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV. *Journal of translational medicine* 2011, **9 Suppl 1:** S2.

313. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D*, et al.* HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nature immunology* 2008, **9**(3)**:** 301-309.

314. Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, Bwayo JJ*, et al.* Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* 1996, **348**(9038)**:** 1347-1351.

315. Margolis L, Shattock R. Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved? *Nature reviews Microbiology* 2006, **4**(4)**:** 312-317.

316. Kaul R, Rowland-Jones SL, Kimani J, Dong T, Yang HB, Kiama P*, et al.* Late seroconversion in HIV-resistant Nairobi prostitutes despite pre-existing HIV-specific CD8+ responses. *The Journal of clinical investigation* 2001, **107**(3)**:** 341-349.

317. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ*, et al.* Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 1995, **270**(5238)**:** 988-991.

318. Trecarichi EM, Tumbarello M, de Gaetano Donati K, Tamburrini E, Cauda R, Brahe C*, et al.* Partial protective effect of CCR5-Delta 32 heterozygosity in a cohort of heterosexual Italian HIV-1 exposed uninfected individuals. *AIDS research and therapy* 2006, **3:** 22.

319. Allers K, Hutter G, Hofmann J, Loddenkemper C, Rieger K, Thiel E*, et al.* Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation. *Blood* 2011, **117**(10)**:** 2791-2799.

320. Chiu YL, Greene WC. Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases. *Trends in immunology* 2006, **27**(6)**:** 291-297.

321. Croxford JL, Gasser S. Damage control: how HIV survives the editor APOBEC3G. *Nature immunology* 2011, **12**(10)**:** 925-927.

322. Ulenga NK, Sarr AD, Thakore-Meloni S, Sankale JL, Eisen G, Kanki PJ. Relationship between human immunodeficiency type 1 infection and expression of human APOBEC3G and APOBEC3F. *The Journal of infectious diseases* 2008, **198**(4)**:** 486-492.

323. Johnson WE, Sawyer SL. Molecular evolution of the antiretroviral TRIM5 gene. *Immunogenetics* 2009, **61**(3)**:** 163-176.

324. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 2008, **451**(7177)**:** 425-430.

325. Bailey JR, Williams TM, Siliciano RF, Blankson JN. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(5)**:** 1357-1369.

326. Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S, *et al.* Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 2004, **432**(7018)**:** 769-775.

327. Ravet S, Scott-Algara D, Bonnet E, Tran HK, Tran T, Nguyen N, *et al.* Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood* 2007, **109**(10)**:** 4296-4305.

328. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, *et al.* Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nature genetics* 2007, **39**(6)**:** 733-740.

329. Bernard NF, Yannakis CM, Lee JS, Tsoukas CM. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T lymphocyte activity in HIV-exposed seronegative persons. *The Journal of infectious diseases* 1999, **179**(3)**:** 538-547.

330. Goh WC, Markee J, Akridge RE, Meldorf M, Musey L, Karchmer T, *et al.* Protection against human immunodeficiency virus type 1 infection in persons with repeated exposure: evidence for T cell immunity in the absence of inherited CCR5 coreceptor defects. *The Journal of infectious diseases* 1999, **179**(3)**:** 548-557.

331. Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, Arienti D, Zagliani A, Mwangi FM, *et al.* HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *Aids* 1999, **13**(1)**:** 23-29.

332. Choi RY, Levinson P, Guthrie BL, Lohman-Payne B, Bosire R, Liu AY, *et al.* Cervicovaginal HIV-1-neutralizing immunoglobulin A detected among HIV-1-exposed seronegative female partners in HIV-1-discordant couples. *Aids* 2012, **26**(17)**:** 2155-2163.

333. Devito C, Broliden K, Kaul R, Svensson L, Johansen K, Kiama P, *et al.* Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *Journal of immunology* 2000, **165**(9)**:** 5170-5176.

334. Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nature reviews Immunology* 2008, **8**(6)**:** 421-434.

335. Shapiro SZ. HIV Vaccine Development: Strategies for Preclinical and Clinical Investigation. *AIDS research and human retroviruses* 2013.

336. Tomaras GD, Haynes BF. Strategies for eliciting HIV-1 inhibitory antibodies. *Current opinion in HIV and AIDS* 2010, **5**(5)**:** 421-427.

337. McElrath MJ, Haynes BF. Induction of immunity to human immunodeficiency virus type-1 by vaccination. *Immunity* 2010, **33**(4)**:** 542-554.

338. Yu X, Duval M, Lewis C, Gawron MA, Wang R, Posner MR, *et al.* Impact of IgA constant domain on HIV-1 neutralizing function of monoclonal antibody F425A1g8. *Journal of immunology* 2013, **190**(1)**:** 205-210.

339. Moldt B, Rakasz EG, Schultz N, Chan-Hui PY, Swiderek K, Weisgrau KL, *et al.* Highly potent HIV-specific antibody neutralization in vitro translates into effective protection against mucosal SHIV challenge in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(46)**:** 18921-18925.

340. Burton DR, Hessell AJ, Keele BF, Klasse PJ, Ketas TA, Moldt B, *et al.* Limited or no protection by weakly or nonneutralizing antibodies against vaginal SHIV challenge of macaques compared with a strongly neutralizing antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(27)**:** 11181-11186.

341. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, *et al.* Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *The New England journal of medicine* 2012, **366**(14)**:** 1275-1286.

342. Gupta P, Balachandran R, Ho M, Enrico A, Rinaldo C. Cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the presence of azidothymidine and neutralizing antibody. *Journal of virology* 1989, **63**(5)**:** 2361-2365.

343. Bernardin F, Kong D, Peddada L, Baxter-Lowe LA, Delwart E. Human immunodeficiency virus mutations during the first month of infection are preferentially found in known cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Journal of virology* 2005, **79**(17)**:** 11523-11528.

344. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006, **443**(7109)**:** 350-354.

345. El-Far M, Halwani R, Said E, Trautmann L, Doroudchi M, Janbazian L, *et al.* T-cell exhaustion in HIV infection. *Current HIV/AIDS reports* 2008, **5**(1)**:** 13-19.

346. Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, Moris A, *et al.* Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* 2009, **113**(25)**:** 6351-6360.

347. Hersperger AR, Migueles SA, Betts MR, Connors M. Qualitative features of the HIV-specific CD8+ T-cell response associated with immunologic control. *Current opinion in HIV and AIDS* 2011, **6**(3)**:** 169-173.

348. Geldmacher C, Currier JR, Herrmann E, Haule A, Kuta E, McCutchan F*, et al.* CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients. *Journal of virology* 2007, **81**(5)**:** 2440-2448.

349. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA*, et al.* Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997, **278**(5342)**:** 1447-1450.

350. Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* 2004, **103**(3)**:** 966-972.

351. Makedonas G, Betts MR. Living in a house of cards: re-evaluating CD8+ T-cell immune correlates against HIV. *Immunological reviews* 2011, **239**(1)**:** 109-124.

352. Goonetilleke N, Liu MK, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, Ganusov VV*, et al.* The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 2009, **206**(6)**:** 1253-1272.

353. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E*, et al.* CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nature medicine* 2007, **13**(1)**:** 46-53.

354. Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M*, et al.* Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* 2009, **458**(7238)**:** 641-645.

355. Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M*, et al.* A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* 2007, **317**(5840)**:** 944-947.

356. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA*, et al.* Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 1999, **283**(5403)**:** 857-860.

357. Stephenson KE, Li H, Walker BD, Michael NL, Barouch DH. Gag-specific cellular immunity determines in vitro viral inhibition and in vivo virologic control following simian immunodeficiency virus challenges of vaccinated rhesus monkeys. *Journal of virology* 2012, **86**(18)**:** 9583-9589.

358. Liu J, O'Brien KL, Lynch DM, Simmons NL, La Porte A, Riggs AM*, et al.* Immune control of an SIV challenge by a T-cell-based vaccine in rhesus monkeys. *Nature* 2009, **457**(7225)**:** 87-91.

359. Hansen SG, Vieville C, Whizin N, Coyne-Johnson L, Siess DC, Drummond DD*, et al.* Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nature medicine* 2009, **15**(3)**:** 293-299.

360. Bonsignori M, Alam SM, Liao HX, Verkoczy L, Tomaras GD, Haynes BF*, et al.* HIV-1 antibodies from infection and vaccination: insights for guiding vaccine design. *Trends in microbiology* 2012, **20**(11)**:** 532-539.

361. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA*, et al.* The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 1998, **393**(6686)**:** 705-711.

362. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998, **393**(6686)**:** 648-659.

363. Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J*, et al.* Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 2009, **458**(7238)**:** 636-640.

364. Zhou T, Xu L, Dey B, Hessell AJ, Van Ryk D, Xiang SH*, et al.* Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* 2007, **445**(7129)**:** 732-737.

365. Frey G, Peng H, Rits-Volloch S, Morelli M, Cheng Y, Chen B. A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 targeted by broadly neutralizing antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(10)**:** 3739-3744.

366. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X*, et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003, **422**(6929)**:** 307-312.

367. Walker LM, Burton DR. Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. *Current opinion in immunology* 2010, **22**(3)**:** 358-366.

368. Pejchal R, Doores KJ, Walker LM, Khayat R, Huang PS, Wang SK*, et al.* A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield. *Science* 2011, **334**(6059)**:** 1097-1103.

369. Corti D, Lanzavecchia A. Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annual review of immunology* 2013, **31:** 705-742.

370. Li Y, Svehla K, Louder MK, Wycuff D, Phogat S, Tang M, *et al.* Analysis of neutralization specificities in polyclonal sera derived from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *Journal of virology* 2009, **83**(2)**:** 1045-1059.

371. Hessell AJ, Poignard P, Hunter M, Hangartner L, Tehrani DM, Bleeker WK, *et al.* Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. *Nature medicine* 2009, **15**(8)**:** 951-954.

372. Hessell AJ, Rakasz EG, Poignard P, Hangartner L, Landucci G, Forthal DN, *et al.* Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS pathogens* 2009, **5**(5)**:** e1000433.

373. Esparza J, Osmanov S. HIV vaccines: a global perspective. *Current molecular medicine* 2003, **3**(3)**:** 183-193.

374. Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF, *et al.* Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* 2005, **191**(5)**:** 654-665.

375. Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, van Griensven F, *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *The Journal of infectious diseases* 2006, **194**(12)**:** 1661-1671.

376. Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, Li D, *et al.* Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 2008, **372**(9653)**:** 1881-1893.

377. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, *et al.* Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *The New England journal of medicine* 2009, **361**(23)**:** 2209-2220.

378. McEnery R. HVTN 505 trial expanded to see if vaccine candidates can block HIV acquisition. *IAVI report : newsletter on international AIDS vaccine research* 2011, **15**(4)**:** 17.

379. Benlahrech A, Harris J, Meiser A, Papagatsias T, Hornig J, Hayes P, *et al.* Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(47)**:** 19940-19945.

380. O'Brien KL, Liu J, King SL, Sun YH, Schmitz JE, Lifton MA, *et al.* Adenovirus-specific immunity after immunization with an Ad5 HIV-1 vaccine candidate in humans. *Nature medicine* 2009, **15**(8)**:** 873-875.

381. Watkins DI. Update on progress in HIV vaccine development. *Topics in antiviral medicine* 2012, **20**(2)**:** 30-31.

382. Cohen J. HIV/AIDS research. Beyond Thailand: making sense of a qualified AIDS vaccine "success". *Science* 2009, **326**(5953)**:** 652-653.

383. Gilbert PB, Berger JO, Stablein D, Becker S, Essex M, Hammer SM, *et al.* Statistical interpretation of the RV144 HIV vaccine efficacy trial in Thailand: a case study for statistical issues in efficacy trials. *The Journal of infectious diseases* 2011, **203**(7)**:** 969-975.

384. Barouch DH, Liu J, Li H, Maxfield LF, Abbink P, Lynch DM, *et al.* Vaccine protection against acquisition of neutralization-resistant SIV challenges in rhesus monkeys. *Nature* 2012, **482**(7383)**:** 89-93.

385. Penaloza-MacMaster P, Provine NM, Ra J, Borducchi EN, McNally A, Simmons NL, *et al.* Alternative serotype adenovirus vaccine vectors elicit memory T cells with enhanced anamnestic capacity compared to Ad5 vectors. *Journal of virology* 2013, **87**(3)**:** 1373-1384.

386. Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, *et al.* Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(30)**:** 10501-10506.

387. Granich RM, Gilks CF, Dye C, De Cock KM, Williams BG. Universal voluntary HIV testing with immediate antiretroviral therapy as a strategy for elimination of HIV transmission: a mathematical model. *Lancet* 2009, **373**(9657)**:** 48-57.

388. Milloy MJ, Wood E. Transmitted antiretroviral-resistant HIV: a coming anarchy? *The Lancet infectious diseases* 2011, **11**(5)**:** 336-337.

389. Hutter G, Ganepola S. Eradication of HIV by transplantation of CCR5-deficient hematopoietic stem cells. *TheScientificWorldJournal* 2011, **11:** 1068-1076.

390. Girard MP, Bansal GP. HIV/AIDS vaccines: a need for new concepts? *International reviews of immunology* 2008, **27**(6)**:** 447-471.

391. Genesca M. Characterization of an effective CTL response against HIV and SIV infections. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, **2011:** 103924.

392. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D*, et al.* Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nature immunology* 2009, **10**(1)**:** 116-125.

393. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews Cancer* 2012, **12**(4)**:** 265-277.

394. Sugamura K, Ishii N, Weinberg AD. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nature reviews Immunology* 2004, **4**(6)**:** 420-431.

395. Fujimoto Y, Tedder TF. CD83: a regulatory molecule of the immune system with great potential for therapeutic application. *Journal of medical and dental sciences* 2006, **53**(2)**:** 85-91.

396. Zhu Q, Egelston C, Gagnon S, Sui Y, Belyakov IM, Klinman DM*, et al.* Using 3 TLR ligands as a combination adjuvant induces qualitative changes in T cell responses needed for antiviral protection in mice. *The Journal of clinical investigation* 2010, **120**(2)**:** 607-616.

397. Pavot V, Rochereau N, Primard C, Genin C, Perouzel E, Lioux T*, et al.* Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2013, **167**(1)**:** 60-67.

398. Fujkuyama Y, Tokuhara D, Kataoka K, Gilbert RS, McGhee JR, Yuki Y*, et al.* Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity. *Expert review of vaccines* 2012, **11**(3)**:** 367-379.

399. Olive D. [Lymphocyte coreceptors]. *Medecine sciences : M/S* 2006, **22**(12)**:** 1069-1074.

400. Asano J, Tada H, Onai N, Sato T, Horie Y, Fujimoto Y*, et al.* Nucleotide oligomerization binding domain-like receptor signaling enhances dendritic cell-mediated cross-priming in vivo. *Journal of immunology* 2010, **184**(2)**:** 736-745.

401. Hudspeth K, Fogli M, Correia DV, Mikulak J, Roberto A, Della Bella S*, et al.* Engagement of NKp30 on Vdelta1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication. *Blood* 2012, **119**(17)**:** 4013-4016.

402. Lu X, Clements JD, Katz JM. Mutant Escherichia coli heat-labile enterotoxin [LT(R192G)] enhances protective humoral and cellular immune responses to orally administered inactivated influenza vaccine. *Vaccine* 2002, **20**(7-8)**:** 1019-1029.

403. Holmgren J, Czerkinsky C, Eriksson K, Mharandi A. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* 2003, **21 Suppl 2:** S89-95.

404. Kim YG, Kamada N, Shaw MH, Warner N, Chen GY, Franchi L*, et al.* The Nod2 sensor promotes intestinal pathogen eradication via the chemokine CCL2-dependent recruitment of inflammatory monocytes. *Immunity* 2011, **34**(5)**:** 769-780.

405. Mulder DJ, Pooni A, Mak N, Hurlbut DJ, Basta S, Justinich CJ. Antigen presentation and MHC class II expression by human esophageal epithelial cells: role in eosinophilic esophagitis. *The American journal of pathology* 2011, **178**(2)**:** 744-753.

406. Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttorp N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thrombosis and haemostasis* 2009, **102**(6)**:** 1103-1109.

407. Bergquist C, Johansson EL, Lagergard T, Holmgren J, Rudin A. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infection and immunity* 1997, **65**(7)**:** 2676-2684.

408. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews Immunology* 2012, **12**(8)**:** 557-569.

409. Zygmunt BM, Rharbaoui F, Groebe L, Guzman CA. Intranasal immunization promotes th17 immune responses. *Journal of immunology* 2009, **183**(11)**:** 6933-6938.

410. Uehara A, Takada H. Synergism between TLRs and NOD1/2 in oral epithelial cells. *Journal of dental research* 2008, **87**(7)**:** 682-686.

411. Muller-Berghaus J, Kern K, Paschen A, Nguyen XD, Kluter H, Morahan G*, et al.* Deficient IL-12p70 secretion by dendritic cells based on IL12B promoter genotype. *Genes and immunity* 2004, **5**(5)**:** 431-434.

412. Moretto MM, Weiss LM, Combe CL, Khan IA. IFN-gamma-producing dendritic cells are important for priming of gut intraepithelial lymphocyte response against intracellular parasitic infection. *Journal of immunology* 2007, **179**(4)**:** 2485-2492.

413. Bossie A, Vitetta ES. IFN-gamma enhances secretion of IgG2a from IgG2a-committed LPS-stimulated murine B cells: implications for the role of IFN-gamma in class switching. *Cellular immunology* 1991, **135**(1)**:** 95-104.

414. Arias MA, Loxley A, Eatmon C, Van Roey G, Fairhurst D, Mitchnick M*, et al.* Carnauba wax nanoparticles enhance strong systemic and mucosal cellular and humoral immune responses to HIV-gp140 antigen. *Vaccine* 2011, **29**(6)**:** 1258-1269.

415. Liang Y, Hasturk H, Elliot J, Noronha A, Liu X, Wetzler LM*, et al.* Toll-like receptor 2 induces mucosal homing receptor expression and IgA production by human B cells. *Clinical immunology* 2011, **138**(1)**:** 33-40.

416. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T*, et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999, **11**(4)**:** 443-451.

417. Rosenzweig HL, Galster K, Vance EE, Ensign-Lewis J, Nunez G, Davey MP*, et al.* NOD2 deficiency results in increased susceptibility to peptidoglycan-induced uveitis in mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011, **52**(7)**:** 4106-4112.

418. Zhu Q, Talton J, Zhang G, Cunningham T, Wang Z, Waters RC*, et al.* Large intestine-targeted, nanoparticle-releasing oral vaccine to control genitorectal viral infection. *Nature medicine* 2012.

419. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annual review of immunology* 2011, **29:** 621-663.

420. Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 1997, **277**(5328)**:** 949-952.

421. des Rieux A, Fievez V, Theate I, Mast J, Preat V, Schneider YJ. An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2007, **30**(5)**:** 380-391.

422. Gullberg E, Leonard M, Karlsson J, Hopkins AM, Brayden D, Baird AW*, et al.* Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochemical and biophysical research communications* 2000, **279**(3)**:** 808-813.

423. van der Lubben IM, van Opdorp FA, Hengeveld MR, Onderwater JJ, Koerten HK, Verhoef JC*, et al.* Transport of chitosan microparticles for mucosal vaccine delivery in a human intestinal M-cell model. *Journal of drug targeting* 2002, **10**(6)**:** 449-456.

424. des Rieux A, Fievez V, Momtaz M, Detrembleur C, Alonso-Sande M, Van Gelder J*, et al.* Helodermin-loaded nanoparticles: characterization and transport across an in vitro model of the follicle-associated epithelium. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2007, **118**(3)**:** 294-302.

425. Wong NA, Herriot M, Rae F. An immunohistochemical study and review of potential markers of human intestinal M cells. *European journal of histochemistry : EJH* 2003, **47**(2)**:** 143-150.

426. Kinikoglu B, Auxenfans C, Pierrillas P, Justin V, Breton P, Burillon C*, et al.* Reconstruction of a full-thickness collagen-based human oral mucosal equivalent. *Biomaterials* 2009, **30**(32)**:** 6418-6425.

427. Hsu LW, Lee PL, Chen CT, Mi FL, Juang JH, Hwang SM*, et al.* Elucidating the signaling mechanism of an epithelial tight-junction opening induced by chitosan. *Biomaterials* 2012, **33**(26)**:** 6254-6263.

428. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A*, et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology* 2000, **20**(11)**:** 4106-4114.

429. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003, **19**(1)**:** 71-82.

430. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA*, et al.* CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005, **307**(5707)**:** 254-258.

431. Van den Broeck W, Derore A, Simoens P. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice. *Journal of immunological methods* 2006, **312**(1-2)**:** 12-19.

432. des Rieux A, Ragnarsson EG, Gullberg E, Preat V, Schneider YJ, Artursson P. Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2005, **25**(4-5)**:** 455-465.

433. Weltzin R, Lucia-Jandris P, Michetti P, Fields BN, Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *The Journal of cell biology* 1989, **108**(5)**:** 1673-1685.

434. Gabor F, Stangl M, Wirth M. Lectin-mediated bioadhesion: binding characteristics of plant lectins on the enterocyte-like cell lines Caco-2, HT-29 and HCT-8. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 1998, **55**(2-3)**:** 131-142.

435. Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced drug delivery reviews* 2009, **61**(2)**:** 158-171.

436. Cone RA. Barrier properties of mucus. *Advanced drug delivery reviews* 2009, **61**(2)**:** 75-85.

437. Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, Man ST, Wang YY, Cone R*, et al.* Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(5)**:** 1482-1487.

438. Owen RL, Ermak TH. Structural specializations for antigen uptake and processing in the digestive tract. *Springer seminars in immunopathology* 1990, **12**(2-3)**:** 139-152.

439. Kato A, Schleimer RP. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Current opinion in immunology* 2007, **19**(6)**:** 711-720.

440. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2012, **161**(2)**:** 505-522.

441. Triantafilou M, Manukyan M, Mackie A, Morath S, Hartung T, Heine H*, et al.* Lipoteichoic acid and toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi are lipid raft-dependent. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(39)**:** 40882-40889.

442. Moingeon P, Mascarell L. Induction of tolerance via the sublingual route: mechanisms and applications. *Clinical & developmental immunology* 2012, **2012:** 623474.

443. Wischke C, Mathew S, Roch T, Frentsch M, Lendlein A. Potential of NOD receptor ligands as immunomodulators in particulate vaccine carriers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2012, **164**(3)**:** 299-306.

444. Kim DY, Sato A, Fukuyama S, Sagara H, Nagatake T, Kong IG*, et al.* The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *Journal of immunology* 2011, **186**(7)**:** 4253-4262.

445. Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, Mishra N, Vyas SP. M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *Journal of drug targeting* 2007, **15**(10)**:** 701-713.

446. Gupta PN, Vyas SP. Investigation of lectinized liposomes as M-cell targeted carrier-adjuvant for mucosal immunization. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2011, **82**(1)**:** 118-125.

447. Melkebeek V, Rasschaert K, Bellot P, Tilleman K, Favoreel H, Deforce D*, et al.* Targeting aminopeptidase N, a newly identified receptor for F4ac fimbriae, enhances the intestinal mucosal immune response. *Mucosal immunology* 2012, **5**(6)**:** 635-645.

448. Cohen J. AIDS research. Novel antibody response may explain HIV vaccine success. *Science* 2011, **333**(6049)**:** 1560.

449. McLellan JS, Pancera M, Carrico C, Gorman J, Julien JP, Khayat R*, et al.* Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* 2011, **480**(7377)**:** 336-343.

450. Julien JP, Lee JH, Cupo A, Murin CD, Derking R, Hoffenberg S*, et al.* Asymmetric recognition of the HIV-1 trimer by broadly neutralizing antibody PG9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, **110**(11)**:** 4351-4356.

451. Gach JS, Leaman DP, Zwick MB. Targeting HIV-1 gp41 in close proximity to the membrane using antibody and other molecules. *Current topics in medicinal chemistry* 2011, **11**(24)**:** 2997-3021.

452. Yang G, Holl TM, Liu Y, Li Y, Lu X, Nicely NI*, et al.* Identification of autoantigens recognized by the 2F5 and 4E10 broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *The Journal of experimental medicine* 2013, **210**(2)**:** 241-256.

453. Heyndrickx L, Heath A, Sheik-Khalil E, Alcami J, Bongertz V, Jansson M*, et al.* International network for comparison of HIV neutralization assays: the NeutNet report II. *PloS one* 2012, **7**(5)**:** e36438.

454. Ren W, Mumbauer A, Gettie A, Seaman MS, Russell-Lodrigue K, Blanchard J*, et al.* Generation of Lineage-Related, Mucosally Transmissible Subtype C R5 SHIVs Capable of AIDS Development, Induction of Neurological Disease and Coreceptor Switching in Rhesus Macaques. *Journal of virology* 2013.