



HAL
open science

Conception, caractérisation et évaluation *in vivo* d'un vaccin nanoparticulaire anti-VIH et optimisation de sa biodisponibilité par un hydrogel thermosensible

Capucine Phelip

► To cite this version:

Capucine Phelip. Conception, caractérisation et évaluation *in vivo* d'un vaccin nanoparticulaire anti-VIH et optimisation de sa biodisponibilité par un hydrogel thermosensible. Vaccinologie. Université de Lyon, 2018. Français. ⟨NNT : 2018LYSE1280⟩. ⟨tel-03081166⟩

HAL Id: tel-03081166

<https://theses.hal.science/tel-03081166v1>

Submitted on 18 Dec 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



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1280

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé)

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie, biologie, santé

Discipline : Vaccinologie et Nanomédecine

Soutenue publiquement le 11/12/2018, par :

Capucine Phelip

Conception, caractérisation et évaluation *in vivo* d'un vaccin nanoparticulaire anti-VIH et optimisation de sa biodisponibilité par un hydrogel thermosensible

Devant le jury composé de :

Briançon, S.	Professeure des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1	Présidente du jury
Moog, C.	Directrice de Recherche, Université de Strasbourg	Rapporteuse
Bellier, B.	Professeur des Universités, Sorbonne	Rapporteur
Brand, D.	Professeur des Universités, Université de Tours	Rapporteur
Ladavière, C.	Directrice de Recherche, Université Claude Bernard Lyon 1	Examinatrice
Guillon, C.	Chargé de Recherche, Université Claude Bernard Lyon 1	Invité
Verrier, B.	Directeur de Recherche, Université Claude Bernard Lyon 1	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Ces travaux ont été réalisés sous la supervision de Dr. Bernard Verrier, dans l'équipe « Vecteurs colloïdaux et transport tissulaire » faisant partie de l'UMR 5305 – LBTI (Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique) à l'IBCP :

Institut de Biologie et Chimie des Protéines
7, passage du Vercors
69007 LYON

Je dédie ce travail à Alexandre, parti bien trop tôt. Tu es malheureusement la preuve que la recherche doit continuer.

Je dédie ce travail à ma famille, et plus particulièrement à Mathieu. Depuis plus de 10 ans tu nous montres que grâce à la volonté et l'humour, les obstacles n'existent pas.

Enfin, je dédie ce travail à Bastien pour ton soutien et tes encouragements tout au long de ces années.

Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pu être réalisé sans le financement qui m'a été attribué par l'ANRS (France REcherche Nord&Sud Sida-hiv Hépatites).

Je tiens à remercier le Dr. Christiane Moog, le Pr. Bertrand Bellier et le Pr. Denys Brand qui m'ont fait l'honneur de rapporter ces travaux de thèse. Un grand merci pour vos commentaires judicieux. Je remercie également le Dr. Catherine Ladavière et le Dr. Christophe Guillon d'avoir fait partie du jury de soutenance, et le Pr. Stéphanie Briançon pour avoir accepté de présider ce jury. Enfin je remercie Dr. Christophe Guillon et le Pr. Pascal Poignard pour leurs remarques constructives lors de mes comités de thèse.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr. Bernard Verrier, pour l'entière confiance qu'il m'a accordée dès mon arrivée. Je le remercie pour son soutien et sa bienveillance tout au long de la thèse, et de m'avoir permis de terminer ma thèse dans les meilleures conditions. Merci pour l'autonomie et les moyens qui m'ont été donnés pour mener à bien les différents projets, pour toutes les collaborations et la possibilité de présenter mes travaux à de nombreux congrès tout autour du monde ! Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, ces quatre années ont été une expérience très enrichissante et pleine d'intérêt.

Je remercie l'équipe Verrier pour la bonne ambiance qui règne et qui a contribué à rendre très agréables tous les moments passés au laboratoire. J'ai cette chance d'avoir toujours eu plaisir à venir au labo, et d'évoluer dans une équipe où l'entraide est de mise ! Vous êtes trop nombreux pour que l'on vous cite tous ! Un merci particulier à Céline C, Céline LG, Alix et Myriam, pour les manip, les pauses et tous les moments en dehors du laboratoire. Un merci aussi aux anciennes doctorantes Anne-Sophie et Sophie !

Merci également aux stagiaires que j'ai eu le plaisir d'accompagner : Joffrey, Amélie, Tiphaine, Chiarastella et Fanny. J'ai beaucoup appris de votre encadrement.

Résumé

L'ensemble des connaissances actuelles indique qu'il est nécessaire d'induire une réponse immunitaire à large spectre et notamment des anticorps multifonctionnels pour protéger de l'infection par le VIH. Les approches vaccinales traditionnelles n'étant pas capables d'induire d'anticorps neutralisants à large spectre (bnAbs) suffisamment puissants contre le VIH-1, de nombreuses stratégies vaccinales sont étudiées afin d'induire ces bnAbs. À ce jour, les avancées majeures pour l'induction des bnAbs concernent le développement de (i) glycoprotéines d'enveloppe optimisées comme immunogène, (ii) vecteurs qui transportent et présentent l'immunogène de manière efficace et (iii) la forme galénique qui permettrait d'augmenter la durabilité de la réponse protectrice. Dans ce contexte, l'objectif de ce doctorat est d'évaluer les réponses immunitaires induites par des nanoparticules biodégradables fonctionnalisées avec des glycoprotéines d'enveloppe du VIH et d'optimiser la libération prolongée de l'immunogène.

La première partie de l'étude concerne la mise au point et la caractérisation de l'adsorption de plusieurs glycoprotéines d'enveloppe du VIH à la surface des nanoparticules biodégradables. Nous avons démontré l'intérêt de l'adsorption pour l'induction d'une réponse immunitaire systémique.

Des études récentes ont montré l'intérêt d'augmenter la libération prolongée des immunogènes afin d'induire une forte et longue réponse immunitaire. Dans ce but, nous avons étudié l'induction des réponses immunitaires induites par l'administration des nanoparticules biodégradables incorporées dans un hydrogel thermosensible biocompatible. Pour finir, nous avons étudié la biodistribution naturelle des nanoparticules après administration par voie systémique ou muqueuse.

Mots-clés : VIH, Env, vaccin, nanoparticules biodégradables, libération prolongée, hydrogel thermosensible, biodistribution

Abstract

Current knowledge indicates that it is necessary to induce a broad-spectrum immune response including multifunctional antibodies to protect against HIV infection. As traditional vaccine approaches are not able to induce sufficiently potent broad neutralizing antibodies (bnAbs) against HIV-1, many vaccine strategies are being studied to induce these bnAbs. To date, major advances in the induction of bnAbs have involved the development of (i) optimized envelope glycoproteins as immunogens, (ii) vectors that efficiently transport, and (iii) the dosage form that would increase the sustainability of the protective response. In this context, the objective of this PhD is to evaluate the immune responses induced by biodegradable nanoparticles functionalized with HIV envelope glycoproteins and to optimize the prolonged release of the immunogen.

The first part of the study concerns the development and characterization of the adsorption of several HIV envelope glycoproteins on the surface of biodegradable nanoparticles. We have demonstrated the interest of adsorption for the induction of a systemic immune response.

Recent studies have shown the benefit of increasing the sustained release of immunogens in order to induce a strong and long-lasting immune response. In this purpose, we investigated the induction of immune responses induced by the administration of biodegradable nanoparticles incorporated into a biocompatible thermosensitive hydrogel.

Finally, we studied the natural biodistribution of nanoparticles after systemic or mucosal administration.

Key words: HIV, Env, vaccine, biodegradable nanoparticles, sustained release, thermosensitive hydrogel, biodistribution

Table des matières

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	25
I. LES VACCINS ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE.....	26
1.1 Rappel historique de l'évolution des vaccins	26
<i>a. Généralisation de la vaccination avec les premiers vaccins atténués</i>	26
<i>b. L'essor des vaccins atténués et inactivés</i>	27
<i>c. Les vaccins modernes</i>	28
<i>d. Vaccins inactivés</i>	29
<i>e. Vaccins sous-unitaires</i>	29
<i>f. Vaccin recombinants</i>	30
1.2 Les réponses du système immunitaire	31
<i>a. Systèmes immunitaires inné et adaptatif</i>	31
<i>b. Les acteurs du système immunitaire</i>	33
1.3 Les différentes phases de la réponse immunitaire	37
<i>a. La phase d'identification du pathogène</i>	37
<i>b. La phase effectrice</i>	40
<i>c. La phase de régulation : les lymphocytes T régulateurs</i>	43
<i>d. La phase de mémoire immunologique</i>	44
1.4 Cas de la vaccination muqueuse	47
<i>a. Vaccination muqueuse par voie parentérale</i>	48
<i>b. Vaccination muqueuse par voie muqueuse</i>	49
II. LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE ET LA VACCINATION	51
2.1. Généralités sur le VIH	51
<i>a. Epidémiologie mondiale du VIH</i>	51
<i>b. Origine zoonotique du VIH</i>	52
<i>c. Classification du VIH</i>	53
2.2. Génome et protéines virales	54
2.3. Cycle de réplication	56
2.4. Pathogenèse du VIH	57
<i>a. La phase de primo-infection</i>	57
<i>b. Phase de latence clinique ou asymptomatique</i>	59
<i>c. Phase symptomatique aboutissant au stade SIDA</i>	59
2.5. Patients dits « non classiques »	59
2.6. Prophylaxie Pré-Exposition : PrEP	60
<i>a. Bénéfices de la PrEP</i>	60
<i>b. Contraintes de la PrEP</i>	61

2.7. Défis du développement d'un vaccin contre le VIH	62
2.8. Etat des lieux des essais cliniques vaccinaux anti-VIH	64
<i>a. Historique des essais d'efficacité</i>	64
<i>b. Anticorps neutralisants et glycoprotéines d'Env</i>	67
2.9. Les différentes protéines d'Env utilisées comme immunogènes	68
<i>a. gp160</i>	68
<i>b. gp150</i>	68
<i>c. gp140 SOSIP et non SOSIP</i>	69
<i>d. gp120 monomérique</i>	69
<i>e. gp41</i>	70
<i>f. Immunogènes stimulants les lignées germinales</i>	70
<i>g. Immunogènes ciblant le site de liaison du CD4</i>	70
2.10. Historique du développement des SOSIP	73
2.11. Les immunogènes de la matrice et de la capsid	77
III. NANOMEDECINE ET SYSTEMES DE DELIVRANCE APPLIQUEES A LA VACCINATION	79
3.1. Les nanoparticules polymériques en vaccination	79
3.2. Les particules de poly(acide lactique) (NP PLA)	80
3.3. Système de délivrance : Hydrogels	82
PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE	87
RESULTATS	89
I. Adsorption de la BG505 SOSIP du VIH-1 sur les particules de PLA et évaluation in vivo de la réponse immunitaire induite	90
1.1. Optimisation de l'adsorption de la BG505 SOSIP sur les NP de PLA	90
<i>a. Synthèse des nanoparticules de PLA</i>	90
<i>b. Caractérisation physico-chimiques des nanoparticules de PLA</i>	91
<i>c. Mise au point de l'adsorption des glycoprotéines d'Env</i>	91
<i>d. Adsorption de la BG505 SOSIP sur les nanoparticules de PLA</i>	91
<i>e. Protocole définitif de l'adsorption de la BG505 SOSIP sur les NP de PLA</i>	94
1.2. Antigenicité de la BG505 SOSIP sur les NP de PLA – Article	95
1.3. Evaluation des réponses immunitaires induites par l'injection des NP-BG505 SOSIP	118
<i>a. Protocole d'immunisation</i>	118
<i>b. Prélèvements de sang, fèces et lavements vaginaux</i>	119
<i>c. Détection des anticorps anti-BG505 SOSIP et mesure de l'avidité des anticorps</i>	120
1.4. Résultats	120
<i>a. Induction d'une longue réponse immunitaire systémique, aussi forte que l'AddaVax</i>	120
<i>b. Réponse immunitaire systémique aussi forte que l'AddaVax mais meilleure avidité des anticorps</i>	121
<i>c. Absence de réponse muqueuse</i>	122

1.5. Conclusion	123
II. Etude de la biodistribution in vivo des particules de PLA en tomographie selon leurs voies d'administration	124
2.1. Matériel et Méthodes	125
<i>a. Préparation des nanoparticules fluorescentes</i>	125
<i>b. Administration des formulations aux animaux</i>	125
<i>c. Suivi des particules par tomographie optique de fluorescence</i>	126
2.2. Résultats	126
<i>a. Particules fluorescentes</i>	126
<i>b. Biodistribution après administration sous-cutanée</i>	127
<i>c. Biodistribution après administration intra-veineuse</i>	128
<i>d. Biodistribution après administration intra-nasale</i>	129
<i>e. Biodistribution après administration par gavage</i>	129
2.3. Discussion	130
2.4. Conclusion	131
III. Développement d'un gel thermosensible contenant des particules de PLA : caractérisations in vitro et évaluation de leur potentiel immunostimulant in vivo contre l'antigène p24	132
CONCLUSION - PERSPECTIVES	151
I. Conclusion.....	152
II. Perspectives	158
ANNEXES	161
I. Adsorption de différentes glycoprotéines du VIH-1 sur les NP de PLA	162
1.1. Adsorption de la gp140 et évaluation in vivo	162
<i>a. Caractérisations des PLA(NOD2)-gp140</i>	163
<i>b. Etude de la réponse immunitaire à long terme in vivo</i>	164
1.2. Adsorption de la gp41 et évaluation in vivo	166
<i>a. Caractérisations des PLA-gp41</i>	167
<i>b. Stabilité des PLA-gp41intCys</i>	169
<i>c. Etude de la réponse immunitaire in vivo</i>	170
1.3. Conclusion et perspectives	171
II. Comparaison des pouvoirs adjuvants des micelles et des NP de PLA	172
2.1. Les micelles	172
2.2. Les nanoparticules polymériques	173
2.3. Les nanoparticules de PLA et les micelles	173
2.4. Comparaison de la synthèse des micelles et des NPs de PLA	175
2.5. Comparaison de la biodistribution des micelles et des NPs	176
<i>a. Préparation des nanoparticules fluorescentes</i>	176

<i>b. Préparation des micelles fluorescentes</i>	177
<i>c. Suivi des particules par tomographie optique de fluorescence</i>	177
2.6. Résultats	177
<i>a. Caractérisations des formulations fluorescentes</i>	177
<i>b. Biodistribution après administration sous-cutanée</i>	178
<i>c. Comparaison de la biodistribution des formulations fluorescentes</i>	180
2.7. Evaluation des réponses immunitaires induites par les micelles et les NPs	181
<i>a. Protocole d'immunisation</i>	181
<i>b. Prélèvements de sang et traitement des échantillons</i>	182
<i>c. Détection des IgG anti-p24 et analyse de l'avidité des IgG</i>	182
<i>d. Caractérisation physico-chimiques des formulations</i>	183
<i>e. Evaluation des réponses immunitaires in vivo</i>	183
<i>f. Avidité des IgG anti-p24</i>	184
<i>g. Cas spécifique des micelles</i>	185
2.8. Conclusion	187
Annexe 3	189
Utilisation de la p17 comme immunogène induisant des réponses immunitaires anti-gp41	189
Article	189
Annexe 4	214
Intérêt des particules polymériques pour la vaccination et le ciblage des ganglions.....	214
Revue.....	214
REFERENCES	230

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant les différents acteurs des réponses immunitaires innée et adaptative. Adapté de Dranoff ¹⁹	32
Figure 2 : Réponses immunitaires primaire et secondaire face à un même antigène (en semaines). La seconde réponse immunitaire est toujours plus rapide et plus forte grâce à la présence des lymphocytes mémoires. ...	33
Figure 3 : Représentation des cellules immunitaires issues des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes.....	34
Figure 4: Représentation des différents isotypes d'immunoglobulines. Janeway 2008.	36
Figure 5: Rôles des effecteurs T dans les réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale. Adapté de Janeway 2008.....	41
Figure 6 : Résumé du principe de la vaccination par l'activation du système immunitaire. Adapté de Gutjahr et Phelip ⁴¹	46
Figure 7 : Estimation du nombre d'adultes et d'enfants infectés par le VIH en 2017 (ONUSIDA 2018).....	51
Figure 8 : Cascade du dépistage et du traitement du VIH au niveau mondial en 2016. De gauche à droite : connaissance du statut VIH, couverture du traitement et suppression de la charge virale. Données ONUSIDA 2017.	52
Figure 9 : Représentation de la distribution mondiale des sous-types de CRFs du VIH-1 du groupe M.....	53
Figure 10 : Organisation du génome du virus VIH-1.	54
Figure 11 : Structure du VIH (Adapté de Protein Data Bank).	54
Figure 12 : Représentation du cycle de réplication virale du VIH-1.	56
Figure 13 : Evolution de la charge virale (CV) du VIH et du nombre de CD4 pendant l'infection au VIH après la transmission (à gauche) sous traitement antirétroviral (ARV, à droite).	58
Figure 14 : Nombre de participants recrutés en 2018 pour les essais cliniques vaccinaux. Adapté de AVAC, Mai 2018.	64
Figure 15 : Chronologie des essais d'efficacité des candidats vaccins depuis 2014 et prévus jusqu'à 2019. Adapté de AVAC, Mai 2018.	66
Figure 16 : Représentation schématique de la glycoprotéine d'Env du VIH-1 et des régions ciblées par les anticorps neutralisants.....	67
Figure 17 : Liste des essais cliniques en cours ou à venir ciblant la glycoprotéine d'enveloppe de VIH pour le développement d'un vaccin prophylactique. Adapté de AVAC, Mai 2018.	72
Figure 18 : Représentation linéaire des protéines Env BG505 gp160, SOSIP.664 gp140, SOSIP.664-D7324 gp140 et gp120-D7324.....	74
Figure 19 : Représentation schématique de Pr55 Gag et ses domaines constitutifs.	77
Figure 21 : Structure chimique du poly(acide lactique)	81
Figure 22 : Mécanisme de transition d'état proposé pour les solutions aqueuses thermogélifiantes de poloxamer. Adapté de Dumortier <i>et al.</i> 2006.	83
Figure 23 : Illustration de la synthèse des nanoparticules par nanoprécipitation.....	90
Figure 24 : Optimisation de l'adsorption de la bg505 sosip sur les np de pla.....	94
Figure 25 : Protocole d'immunisation des souris cb6f1 pour évaluer les réponses immunitaires induites par l'injection de np-bg505 sosip.	119
Figure 26 : Réponse immunitaire longue durée après 3 injections sous-cutanée.	121
Figure 27 : Avidité des anti-IgG BG505 SOSIP induits par les formulations d'intérêt à J63.	122
Figure 28 : Absence de réponse muqueuse anti-IgG et anti-IgA BG505 SOSIP	123
Figure 29 : Biodistribution des particules dans l'organisme des souris à différents temps post-injection après administration sous-cutanée. (A) Exemple d'une souris représentative des 5 animaux analysés. (B) Quantité de DiR moyenne dans l'organisme des souris en fonction du temps	128
Figure 30 : Biodistribution des particules dans l'organisme des souris à différents temps post-injection après administration intra-veineuse. (A) Exemple d'une souris représentative des 5 animaux analysés. (B) Quantité de DiR moyenne dans l'organisme des souris en fonction du temps	128

Figure 31 : Biodistribution des particules dans l'organisme des souris à différents temps post-injection après administration intra-nasale. (A) Exemple d'une souris représentative des 5 animaux analysés. (B) Quantité de DiR moyenne dans l'organisme des souris en fonction du temps	129
Figure 32 : Biodistribution des souris à différents temps post-injection après gavage. (A-C) Images corps entier à 0h, 6h et 24h. (D-E) Images des fèces à 6h et 24h. (F) Quantité de DiR moyenne dans l'organisme des souris en fonction du temps.....	130
Figure 33 : Caractéristiques de la formulation PLA(NOD2)-gp140.....	164
Figure 34 : Analyse de la réponse immunitaire après injections des formulations sur 18 semaines.	166
Figure 35 : Alignement des séquences de la gp41 (HXB2, Consensus B, gp41_Cons_B), de la gp41intCys et de la gp41 S30. Alignement fait avec l'outil de bioinformatique PRALINE.....	167
Figure 36 : Suivi des formulations sur 30 jours à +4°C.	168
Figure 37 : Etude de stabilité des formulations PLA-gp41intCys sur 2 mois à +4°C.	169
Figure 38 : Analyse des titres sériques IgG anti-p24 et anti-gp41 sur 95 jours.....	171
Figure 39 : Comparaison de la synthèse des micelles et des nps de pla	175
Figure 40 : Biodistribution des micelles dans l'organisme des souris à différents temps post-injection après administration sous-cutanée. Les valeurs en pmol correspondent à la zone d'injection.	179
Figure 41 : Biodistribution des particules dans l'organisme des souris à différents temps post-injection après administration sous-cutanée. Les valeurs en pmol correspondent à la zone d'injection.....	179
Figure 42 : Cinétique de fluorescence et ratio du signal au site d'injection par rapport au signal corps entier après injection sous-cutanée des formulations fluorescentes	180
Figure 43 : Protocole d'immunisation des souris CB6F1	181
Figure 44 : Titres d'IgG anti-p24 induits par nos formulations sur le long terme	184
Figure 45 : Pourcentage d'avidité des IgG anti-p24 à J365	185
Figure 46 : Titres d'IgG anti-p24 induits par nos formulations, cas spécifique des micelles et des groupes contrôles	186
Figure 47 : Ratio des sous-types IgG1/IgG2a induits par les micelles	186

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques principales des différents types de vaccins. La innocuité d'un vaccin est inversement proportionnelle à l'immunogénicité de ce vaccin.....	31
Tableau 2 : Liste non exhaustive représentant la majorité des formes des glycoprotéines d'enveloppe (Env) de HIV utilisées pour les immunisations.	71
Tableau 3 : Intérêt des nanoparticules en vaccination et Influence de leur forme, taille et charge. Adapté de Hotaling <i>et al.</i> ¹⁵⁰	80
Tableau 4 : Caractéristiques structurales des poloxamers 188 et 407.....	84
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des formulations testées pour la mise au point de l'adsorption de la BG505 SOSIP sur les NP de PLA	93
Tableau 6: Voies d'administration testées et volumes administrés	126
Tableau 7 : Caractéristiques principales des micelles et des nanoparticules après synthèse.	176
Tableau 8 : Caractérisation physico-chimiques des particules et micelles après formulation de la p24.....	183

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile
ADCC : « Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity »
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
Ag : Antigène
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ARV : Anti-RétroViraux
BCG : Bilié de Calmette et Guérin
BCR : Récepteur Cellules B
bnAbs : Anticorps neutralisants à large spectre
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : CytoMegaloVirus
CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène
CTL : Cellules T cytotoxique
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
CSL : Cellule Souche Lymphoïde
CSM : Cellule Souche Myéloïde
Cellules NK : cellules « Natural Killer »
CV : Charge Virale
DC : Cellule Dendritique
DLS : Diffusion Dynamique de la lumière
EBV : Virus d'Epstein-Barr
EC : « Elite Controllers » du VIH
ENI : Exposés Non-Infectés
eOD : ingénierie du domaine externe (engineered outer domain)
FDA : Federal Drug Administration
HHV : Virus de l'herpès Humain
HPV : Virus du Papillome Humain
HSH : Hommes ayant des rapports Sexuels avec des Hommes
IFN : Interféron
IDR : Région ImmunoDominante
Ig : Immunoglobuline
IL : InterLeukine
IP : Indice de Polydispersité
LB : Lymphocyte B
LBm : Lymphocyte B mémoire

LT : Lymphocyte T
LTm : Lymphocyte T mémoire
MST : « MicroScale Thermophoresis »
nAbs : Anticorps neutralisants
NKR : Récepteur « Natural Killer »
NLR : Récepteur de type NOD (NOD-like receptor)
nnAbs : Anticorps non-neutralisants
NP(s) : Nanoparticule(s)
OMS : Organisation Mondiale pour la Santé
PAMP : « Pathogen Associated Molecular Pattern »
PEO : PolyoxyEthylène
PIC : Complexe de Pré-Intégration
PLA : poly(acide lactique)
PLA-b-PNVP : PLA et poly(N-vinylpyrrolidone)
pnnAb : Anticorps non-neutralisants protecteurs
PNH : Primate Non-Humain
PPO : PolyoxyPropylène
PrEP : Prophylaxie Pré-Exposition
PRR : « Pathogen Recognition Receptor »
RSV : Virus Respiratoire Syncytial
RT : Transcriptase Inverse
SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SIV : Virus de l'Immunodéficiency Simienne
TAR : Traitement Anti-Rétroviral
TCR : Récepteur Cellules T
Tier : Classification des souches de VIH
TLR : Récepteur de type Toll (Toll-like Receptor)
Th : T « helper »
Treg : T régulateur
TNF : Facteur de Nécrose Tumorale
VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine
VLP : Particules pseudo-virales

Liste des publications

Articles

Accepté

1. Verrier B, Paul S, Terrat C, Bastide L, Ensinas A, **Phelip C**, Chanut B, Bulens-Grassigny L, Jospin F, Guillon C. Exploiting natural cross-reactivity between human immunodeficiency virus (HIV)-1 p17 protein and anti-gp41 2F5 antibody to induce HIV-1 neutralizing responses in vivo. *Frontiers in Immunology*. 2017

Soumis

2. **Phelip C**, Lamrayah M, Perasso C, Coiffier C, Lacroix C, Dzikowski M, Colomb E, Salmon D, Verrier B. Injectable thermosensitive hydrogel containing biodegradable nanoparticles enhances avidity of humoral responses after one single injection. *Journal of Controlled Release*. 2018

En cours de correction par nos partenaires étrangers

3. Zimmer B, Kuttenger C, **Phelip C**, Fischer T, Gabele A, Grassmann V, Entzian C, Schmidt S, Plach M, Verrier B, Peterhoff D, Schubert T, Wagner R. Studying HIV-Envelope protein interactions with increasing antigen complexity using MicroScale Thermophoresis.

Revue

4. Gutjahr, A*, **Phelip C***, Coolen AL, Monge C, Boisgard AS, Paul S, Verrier B. Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines*. 2016.

* : Co-1er auteurs

Liste des communications

2014

HIV For Prevention (HIVR4P) 2014, Cape Town, Afrique du Sud ([scholarship](#)). *Chimeric Nod2/TLR2 Ligand amplifies HIV-1 Gag p24-Specific Mucosal and systemic Immune Responses after sub cutaneous immunization in mice*

2015

ICMI 2015, Berlin, Allemagne. *NOD2 Ligand Induces Long Lasting Immunity and Amplifies Mucosal and Systemic Immune Responses after sub cutaneous immunization in mice*

Université des Jeunes Chercheurs Sidaction 2015, Carry-le-Rouet, France ([scholarship](#)). *Développement d'un vaccin contre le VIH utilisant des nanoparticules biodégradables stimulant les mécanismes de l'immunité innée*

Nano Conference 2015, Paris, France. *NOD2 Ligand Induces Long Lasting Immunity and Amplifies Mucosal and Systemic Immune Responses after sub cutaneous immunization.*

CUT'HIVAC 2015, Florence, Italie. *NOD2 Ligand Induces Long Lasting Immunity and Amplifies Mucosal and Systemic Immune Responses after sub cutaneous immunization in mice.*

2016

Journée Scientifique Sidaction 2016, Paris, France ([scholarship](#)). *Induction d'une réponse immunitaire à long terme et amplification des réponses immunitaires muqueuses et systémiques après vaccination sous-cutanée par le ligand NOD2 chez la souris.*

French American Doctoral Exchange Seminar (FADEx) 2016, Grenoble, France ([scholarship](#)). *NOD2 Ligand Induces Long Lasting Immunity and Amplifies Mucosal and Systemic Immune Responses after sub cutaneous immunization in mice.*

HIVR4P 2016, Chicago, Etats-Unis ([scholarship](#)). *Exploiting natural cross-reactivity between HIV-1 p17 protein and anti-gp41 2F5 antibody to induce neutralizing responses in vivo.*

2017

Symposium de Vaccinologie, Lyon, France. *Use of encapsulated NOD2 ligands for increasing germinal centers and enhancing HIV humoral responses.*

International AIDS Society (IAS) 2017, Paris, France ([scholarship](#)). *Use of encapsulated NOD2 ligands for increasing germinal centers and enhancing HIV humoral responses.*

2018

HIVR4P 2018, Madrid, Espagne. *Use of encapsulated TLR7 ligand for increasing germinal centers and inducing long lasting HIV-1 humoral responses against Env*

Etude Bibliographique

1. Les vaccins et le système immunitaire
2. Le VIH et la vaccination anti-VIH
3. Nanomédecine et systèmes de délivrance appliqués à la vaccination

I. LES VACCINS ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE

1.1. Rappel historique de l'évolution des vaccins

a. Généralisation de la vaccination avec les premiers vaccins atténués

Dès la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle, la microbiologie est en plein essor, en particulier avec la théorie décrite par Louis Pasteur en France. D'après cette théorie, les maladies infectieuses sont causées par des micro-organismes invisibles à l'œil nu. Dès lors, de nombreux scientifiques recherchent les microbes responsables des maladies infectieuses connues de l'époque.

Pasteur mène ses recherches sur le choléra aviaire et parvient à isoler la bactérie virulente en 1878. Sur le modèle de Jenner, il tente d'induire une protection contre la bactérie en l'inoculant à des poules. Après le vieillissement des cultures bactériennes, les poules ne présentent que de légers symptômes et survivent à l'inoculation de ces bactéries. De plus, ces poules résistent ensuite à l'administration de bactéries fraîches. Il en déduit que l'exposition des bactéries à l'oxygène est capable d'atténuer leur virulence ¹.

Lors de ses travaux sur le bacille du charbon (anthrax), il étudie l'effet de traitements physiques tels que l'exposition à la chaleur mais aussi de traitements chimiques comme l'acide. Il démontre que l'inoculation de bacilles atténués à la chaleur à des moutons les protège contre une infection avec des bacilles frais.

La notion de vaccination est alors généralisée à l'administration de n'importe quel micro-organisme dans le but d'induire une immunité et de prévenir une maladie infectieuse ou ses séquelles. Les vaccins mis au point par Pasteur sont qualifiés de « vivants atténués ». Ils sont en effet composés d'un pathogène entier dont la virulence a été diminuée. Le pathogène vivant est capable de se multiplier dans l'hôte et d'infecter ses cellules avec pour autant peu ou pas de symptômes, grâce au processus d'atténuation.

Suite à la mise au point de ses deux vaccins vétérinaires (choléra aviaire en 1879 et charbon des moutons en 1881), Pasteur s'intéresse à la rage, maladie qui touche aussi l'homme.

La difficulté de l'étude de la rage provient principalement qu'il est impossible d'observer les virus avec les microscopes de l'époque, et de les isoler pour les cultiver comme les bactéries.

Etude bibliographique - Les vaccins et le système immunitaire

La rage touchant le système nerveux, Pasteur réalise des prélèvements de cerveaux de chiens enragés et s'en sert pour inoculer des lapins. Il effectue un grand nombre de transferts d'un lapin à un autre jusqu'à observer une atténuation du virus. Après cela, il isole les moelles épinières de ces lapins infectés et supprime leur virulence au contact de l'air. L'injection de ces moelles à des chiens enragés empêche la maladie de se déclarer.

En 1885, l'occasion se présente de tester ce vaccin chez l'Homme. Joseph Meister, âgé de 9 ans, a été mordu par un chien enragé. L'enfant reçoit par injection plusieurs inoculations de la suspension de moelle de lapin enragé, broyée et atténuée. Suite à ce traitement, l'enfant ne développe pas la rage. Pour conclure sur l'efficacité de son vaccin, Pasteur injecte à l'enfant vacciné une souche virulente de la rage². Ce succès illustre la découverte du premier vaccin atténué humain.

b. L'essor des vaccins atténués et inactivés

En 1882, Koch met en évidence la bactérie responsable de la tuberculose et tente de développer un vaccin. Sous l'influence de Pasteur, Calmette et Guérin réalisent une centaine de cultures successives du bacille tuberculeux bovin dans de la bile de bœuf, afin de réduire la virulence de la bactérie et la rendre inoffensive.

Ce bacille bovin atténué, suffisamment proche du bacille responsable de la tuberculose humaine, est donc utilisé comme vaccin pour prévenir la tuberculose chez l'homme : le BCG (Bilié de Calmette et Guérin) qui est toujours d'actualité. Le concept d'atténuation va inspirer de nombreux chercheurs et permettre le développement d'autres vaccins, par exemple contre la fièvre typhoïde, le choléra ou la peste.

A la même période, Roux découvre que la diphtérie est causée non pas par une bactérie (bacille de Löffler-Klebs) mais par la toxine qu'elle libère. En parallèle, Kitasato cultive la bactérie tétanique, causant également le tétanos par l'intermédiaire de toxines ciblant le système nerveux central. En 1890, Kitasato et Behring travaillent ensemble sur ces toxines et découvrent que le sérum de lapins immunisés avec les toxines contient des antitoxines capables de protéger d'autres animaux³. Grâce à cette découverte, Behring reçoit en 1901 le premier prix Nobel de médecine.

C'est le début de la sérothérapie, qui consiste à administrer du sérum provenant d'animaux immunisés afin de protéger contre la diphtérie et le tétanos. La mise au point d'un vaccin est

rendue délicate par le manque de stabilité des toxines atténuées, qui peuvent retrouver leur toxicité.

En 1923, Ramon décrit l'inactivation des toxines par un traitement au formaldéhyde, qui sont utilisées par Glenny pour produire des vaccins contre la diphtérie et le tétanos⁴. Dans le cas où l'immunogénicité de la toxine est réduite de manière trop importante par le traitement, des sels d'aluminium sont ajoutés comme adjuvants.

En 1918, l'Europe est frappée par une épidémie de grippe très contagieuse, qui s'étendra rapidement dans le monde entier. Sa virulence est telle qu'elle fait entre 50 et 100 millions de victimes dans le monde en moins de 2 ans, plus que la Première Guerre mondiale. Le virus de la grippe sera identifié chez le porc par Schope en 1931, et il sera ensuite isolé chez l'humain et propagé dans des furets. En 1935, Smith démontre que le virus peut être cultivé dans des œufs embryonnés. Le russe Smorodintseff propose un premier vaccin en 1936, qu'il a obtenu en atténuant le virus par 30 passages successifs dans des œufs⁵. L'année 1949 constitue un tournant dans la recherche de nouveaux vaccins, avec la possibilité de cultiver des virus *in vitro*.

Un vaccin inactivé contre la poliomyélite a notamment été développé en 1952 par Salk⁶. Dans le cas du vaccin inactivé, par traitement au formaldéhyde, le pathogène est détruit et est donc incapable de se multiplier. La destruction du pathogène est néanmoins suffisamment douce pour que sa structure globale soit conservée, et qu'il ne perde pas toute son immunogénicité. Dans les années suivantes, des vaccins atténués contre la rougeole⁷, les oreillons⁸ et la rubéole⁷ furent également développés.

c. Les vaccins modernes

Le développement des vaccins atténués a permis de contrôler un grand nombre de pathogènes et de protéger efficacement les populations contre les épidémies associées. L'utilisation du pathogène entier vivant rend le vaccin très efficace car il stimule fortement notre système immunitaire qui met en place des défenses robustes et durables. Cependant, ce pathogène vivant peut se répliquer dans l'organisme et est transmissible par contagion, donc peut continuer de se propager.

En outre, le procédé d'atténuation manque de contrôle car la quantité de mutations requises pour que le pathogène soit suffisamment atténué afin de ne pas provoquer de symptômes sans pour autant perdre toute son immunogénicité est souvent mal définie⁹.

Considérant le taux de mutations élevé et rapide de la plupart des virus, il n'est pas exclu que le pathogène recouvre sa virulence après injection dans l'organisme. Un exemple marquant est le cas du premier vaccin développé contre la poliomyélite (vaccin atténué), qui a provoqué une maladie paralysante chez 1 enfant sur 750 000 après la vaccination¹⁰. Ce vaccin fût remplacé par l'actuel vaccin inactivé, plus sûr car le pathogène est tué et ne peut donc pas se répliquer ni recouvrer sa virulence.

d. Vaccins inactivés

Les vaccins inactivés sont donc accessibles à tous, y compris les individus immunodéprimés qui ne peuvent pas recevoir de vaccins vivants atténués. Du fait de leur plus grande innocuité, les vaccins inactivés perdent en immunogénicité à cause des traitements (formaldéhyde, chaleur). Pour être efficace, il faut donc augmenter les doses ainsi que le nombre d'injections. Néanmoins, le développement des vaccins inactivés connût également quelques échecs.

Dans les années 1960, un essai clinique fût mené sur de jeunes enfants afin de tester un vaccin inactivé contre le virus respiratoire syncytial (RSV), virus très contagieux qui touche les nourrissons de moins de 2 ans et cause des infections respiratoires. Environ 9 mois après le début de l'essai clinique, les enfants vaccinés furent touchés par une épidémie de RSV, mettant en évidence le manque d'efficacité du vaccin. En outre, ils développèrent des complications respiratoires associées à une forme sévère du RSV à cause du vaccin, les enfants non vaccinés étant atteints par la forme habituelle du RSV¹¹. De ce fait, et grâce aux progrès réalisés en biologie moléculaire et en immunologie, une nouvelle classe de vaccins plus sûrs a été développée : les vaccins à sous-unités.

e. Vaccins sous-unitaires

Les vaccins à sous-unités, à l'inverse des vaccins entiers atténués ou inactivés ne contiennent qu'une fraction du pathogène, généralement une protéine ou peptide appelé antigène. Cette fraction du pathogène doit être sélectionnée en fonction de la pathogénèse et des mécanismes immunologiques impliqués lors d'une infection, de sorte que cet antigène soit reconnu par le système immunitaire et capable de déclencher des réponses immunitaires adaptées. Les antigènes peuvent être extraits et purifiés directement à partir des pathogènes, mais ce sont des procédures coûteuses et risquées¹².

f. Vaccin recombinants

D'autres méthodes, dites recombinantes, ont alors été développées pour produire les antigènes désirés à l'aide d'hôtes vivants servant de systèmes d'expression. Le gène impliqué dans la production de la protéine antigénique au sein du pathogène est isolé et inséré dans l'ADN de l'hôte, à savoir des cellules de bactéries, levures, mammifères ou insectes. La machinerie cellulaire est ainsi utilisée pour produire et sécréter l'antigène en grandes quantités¹³.

Ce procédé a été utilisé pour mettre au point le premier vaccin recombinant en 1986 contre l'hépatite B. L'antigène de surface du virus ainsi produit par des levures s'assemble pour former des particules d'apparence similaire au virus, d'où le nom de virus-like particles (VLP)¹⁴. Cette structure confère à la protéine antigénique une grande immunogénicité.

Sur le même principe, un vaccin contre le papillomavirus humain a été développé dans les années 2000 en se servant de levures ou de cellules d'insectes pour produire la protéine virale de capsid L1^{15,16}. Cette protéine est capable d'auto-assemblage et peut former des VLP.

Les vaccins à sous-unités présentent des avantages certains par rapport aux vaccins atténués et inactivés, tels qu'une plus grande innocuité, un meilleur contrôle qualité, un moindre coût de production, la possibilité de cibler des réponses immunitaires envers un épitope précis du pathogène, ainsi que des conditions de conservation facilitées¹⁷. En contrepartie, de tels vaccins sont bien moins immunogènes et nécessitent d'être associés à des adjuvants¹⁸. Les vaccins contre l'hépatite B et le HPV sont par exemple combinés avec des sels d'aluminium. Les différentes classes de vaccins sont comparées dans le Tableau 1.

Type de Vaccin	Immunogénicité	Innocuité	Exemples
Vaccin vivant atténué	Forte Dose faible Réponses humorale et cellulaire Protection longue durée	Faible Risque d'infection Effets secondaires	Rage Rougeole Oreillons Rubéole
Vaccin tué inactivé Vaccin anatoxine	Moyenne Dose élevée Réponses humorale et cellulaire Protection longue durée	Moyenne Faible risque d'infection Effets secondaires	Coqueluche Polyomélite Diphtérie Tétanos
Vaccin à sous-unités	Faible Dose élevée Réponse humorale seule	Forte Aucun risque d'infection Peu d'effets secondaires	Hépatite B HPV

TABLEAU 1 : CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DES DIFFERENTS TYPES DE VACCINS. L'INNOCUITE D'UN VACCIN EST INVERSEMENT PROPORTIONNELLE A L'IMMUNOGENICITE DE CE VACCIN.

1.2 Les réponses du système immunitaire

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

a. Systèmes immunitaires inné et adaptatif

Le corps humain est constitué de plusieurs barrières qui bloquent l'entrée des micro-organismes étrangers. La peau constitue une première barrière physique imperméable aux particules solides et liquides. Les voies d'entrées du corps humain, telles que la bouche, sont tapissées de muqueuses et contiennent des fluides antiseptiques comme la salive. De plus, l'intestin est colonisé par une flore bactérienne commensale, qui entre en compétition avec les éventuelles bactéries étrangères et les empêche de se développer. Au niveau de l'ensemble de ces barrières (peau, muqueuses) se situent des cellules du système immunitaire inné, qui constituent notre première ligne de défense contre les agents infectieux. Les cellules immunitaires innées identifient l'intrus en reconnaissant des motifs particuliers présents à la

surface d'un grand nombre de micro-organismes et le détruisent. Cette réponse immunitaire innée est opérationnelle en quelques heures contre une grande variété de pathogènes, mais n'est pas spécifique. En parallèle de la réponse immunitaire innée, la phase adaptative peut être déclenchée mais avec un décalage de quelques jours comparé à la réponse innée (Figure 1).

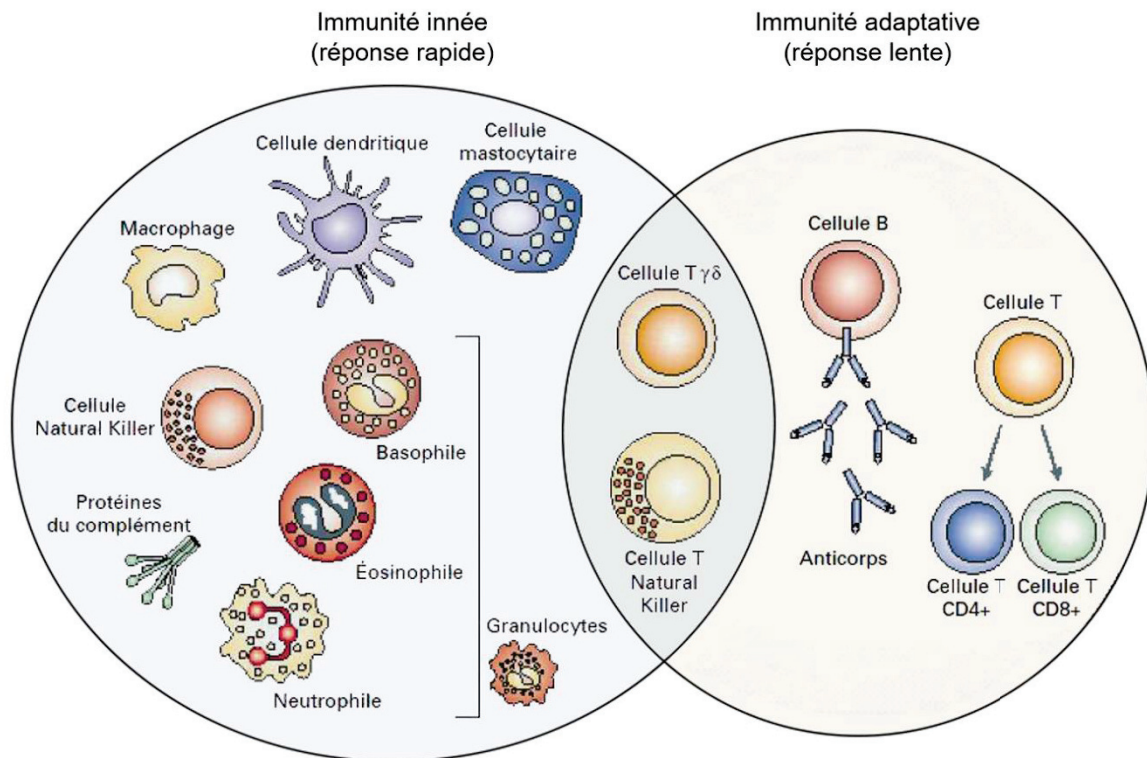


FIGURE 1 : SCHEMA REPRESENTANT LES DIFFERENTS ACTEURS DES REPONSES IMMUNITAIRES INNEE ET ADAPTATIVE. ADAPTE DE DRANOFF ¹⁹.

Après avoir capturé le pathogène, les cellules dendritiques migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques qui sont le siège du système immunitaire adaptatif, afin d'instruire les cellules professionnelles de la nature du pathogène. En réponse, ces cellules se différencient en cellules spécifiques du pathogène et se multiplient en grand nombre dans le but de neutraliser complètement le pathogène. La réponse immunitaire adaptative intervient donc en second lieu et nécessite quelques jours pour être opérationnelle, mais est plus efficace car hautement spécifique du pathogène.

Une fois le pathogène éliminé, le système immunitaire adaptatif garde en mémoire des cellules immunitaires spécifiques qui pourront être sollicitées lors d'une nouvelle infection par le même pathogène. Ces cellules mémoire interviendront beaucoup plus rapidement et avec

Etude bibliographique - Les vaccins et le système immunitaire

une intensité telle que le pathogène pourra être neutralisé et éliminé avant d'avoir pu se multiplier et provoquer des symptômes.

Le principe du vaccin repose sur l'existence de cette mémoire immunitaire. Ainsi, le vaccin mime une première infection par un pathogène pour que le système immunitaire adaptatif soit éduqué et développe des défenses efficaces et spécifiques qu'il garde en mémoire en cas de future infection (Figure 2).

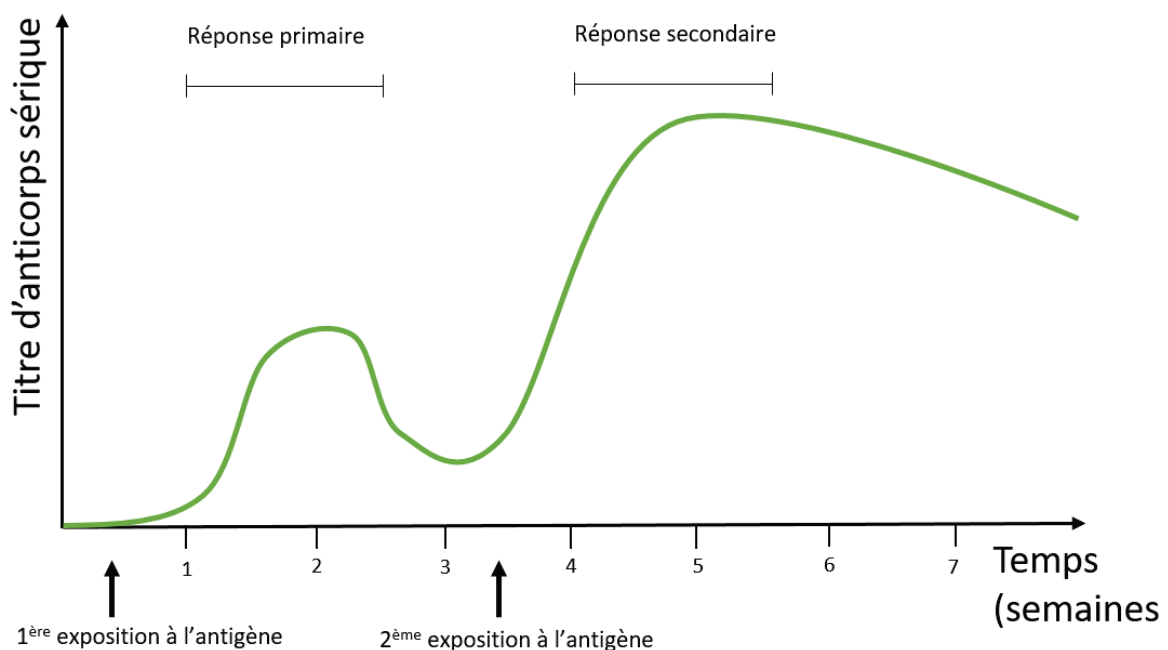


FIGURE 2 : REPONSES IMMUNITAIRES PRIMAIRE ET SECONDAIRE FACE A UN MEME ANTIGENE (EN SEMAINES). LA SECONDE REPONSE IMMUNITAIRE EST TOUJOURS PLUS RAPIDE ET PLUS FORTE GRACE A LA PRESENCE DES LYMPHOCYTES MEMOIRES.

b. Les acteurs du système immunitaire

Toutes les cellules immunitaires proviennent de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes situées dans la moelle osseuse. Ces cellules souches donnent naissance aux progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes (Figure 3).

La famille des lymphoïdes comprend les cellules NK (« natural killer ») ainsi que les lymphocytes B et T.

La famille des myéloïdes comprend les érythrocytes (globules rouges), les mégacaryocytes qui produisent les plaquettes, les cellules dendritiques, les granulocytes et

les monocytes. Ces derniers se différencient finalement en macrophages après migration du sang vers les tissus²⁰.

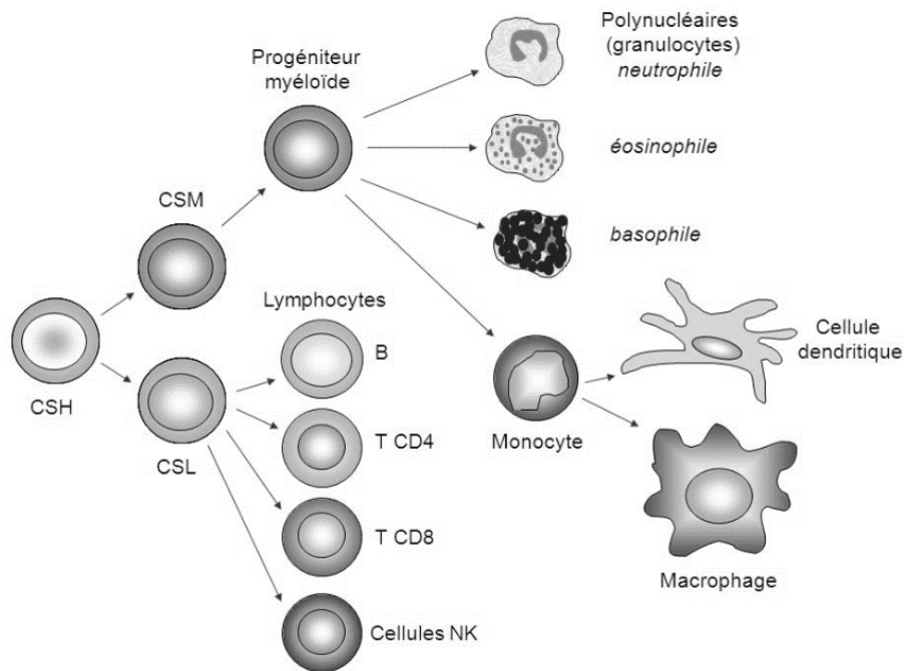


FIGURE 3 : REPRESENTATION DES CELLULES IMMUNITAIRES ISSUES DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES PLURIPOTENTES.

CSH: Cellules souches hématopoïétiques, CSM : Cellules souches myéloïdes, CSL : Cellules souches lymphoïdes.
Adapté de Lim *et al.* 2013.

Les macrophages

Les macrophages sont des cellules phagocytaires présentes en grand nombre dans les tissus. Leur fonction principale est l'élimination des corps étrangers et cellules mortes par phagocytose. En cela, les macrophages contribuent au maintien de l'homéostasie des tissus en détruisant les cellules mortes. D'autre part, ce sont des acteurs de l'immunité innée capables d'identifier les pathogènes et de les éliminer de manière non spécifique. De plus, les macrophages participent à la réaction inflammatoire associée à une infection en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires²¹.

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CD) sont ainsi nommées en raison des dendrites formées par leur membrane. Ces cellules présentes dans les tissus et circulant dans la lymphe ont pour principale fonction la présentation d'antigènes exogènes ou endogènes aux cellules de

l'immunité adaptative²². La famille des CD contient plusieurs sous-populations de cellules. Les CD myéloïdes ont une forte capacité migratoire et sont spécialisées dans la présentation de l'antigène. Lorsqu'elles sont immatures, elles ont une activité phagocytaire élevée et une fois activées sécrètent activement des cytokines. Les CD plasmacytoïdes diffèrent des myéloïdes par leur durée de vie plus longue. Ces cellules sont spécialisées dans la réponse aux infections virales par la production massive de cytokines²³. Parmi les CD on trouve également les cellules de Langerhans, localisées dans l'épiderme et les épithéliums des bronches et muqueuses.

Les lymphocytes

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

Les cellules « Natural Killer » NK sont des cellules lymphoïdes qui n'expriment pas de récepteurs spécifiques d'un antigène, à la différence des lymphocytes B et T, et qui font partie de l'immunité innée. Elles ont la capacité de reconnaître des cellules anormales (par exemple des cellules tumorales) par des récepteurs membranaires (NKR) et de les éliminer, d'où leur nom « Natural Killer »²⁴.

D'autre part, elles expriment à leur surface des récepteurs pour les immunoglobulines qui peuvent fixer des anticorps et ainsi doter la cellule NK d'un module de reconnaissance spécifique d'antigènes.

Leur cytoplasme renferme des granules contenant des protéines cytotoxiques qu'elles sécrètent lorsqu'elles sont activées. Les cellules NK contrôlent la réplication des virus en identifiant les cellules infectées et en éliminant les réservoirs viraux en attendant que l'immunité adaptative soit mise en place.

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

Le BCR exprimé par les LB peut être sécrété sous forme soluble : ce sont les anticorps. Le BCR reconnaît des antigènes de différentes natures (protéines, sucres, lipides ou molécules

inorganiques), sous forme circulante ou exprimé à la surface des pathogènes. Les anticorps fixent les antigènes pour faciliter leur élimination. Ce sont des molécules hétérodimériques constituées d'une chaîne lourde (H) et d'une chaîne légère (L) qui sont organisées en domaines. Ces deux chaînes sont constituées d'une région amine terminale dite domaine variable (V). L'association VH-VL forme le site d'interaction avec l'antigène qui garantit la reconnaissance de chaque antigène par un anticorps spécifique.

Il existe 9 types de chaîne H, regroupés en 5 classes d'anticorps (Figure 4). Les IgM sont les premiers anticorps produits lors d'une infection. Sous forme de pentamère, les IgM ont un grand nombre de sites spécifiques ce qui favorise leur fixation à l'antigène. Les IgG, produites dans un second temps et plus affines, constituent la majorité des anticorps circulants (~75 %). Les IgG comprennent plusieurs sous-classes, qui sont chez la souris les IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 et chez l'Homme les IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Les IgA sont principalement présentes dans les muqueuses et contribuent à empêcher les pathogènes de se fixer aux cellules épithéliales. Enfin, les IgD et IgE sont beaucoup plus faiblement représentées. Les IgD participent à l'activation des LB tandis que les IgE sont efficaces contre les parasites et sont présentes en excès dans le cas d'allergies. La commutation isotypique permet aux LB la synthèse d'une classe d'anticorps à une autre. Lors du changement de classe, seule la région constante est modifiée. La région variable est conservée, ce qui n'affecte pas la spécificité de l'anticorps à l'antigène. L'anticorps fixera donc toujours le même antigène mais n'interagira pas avec les mêmes fonctions.

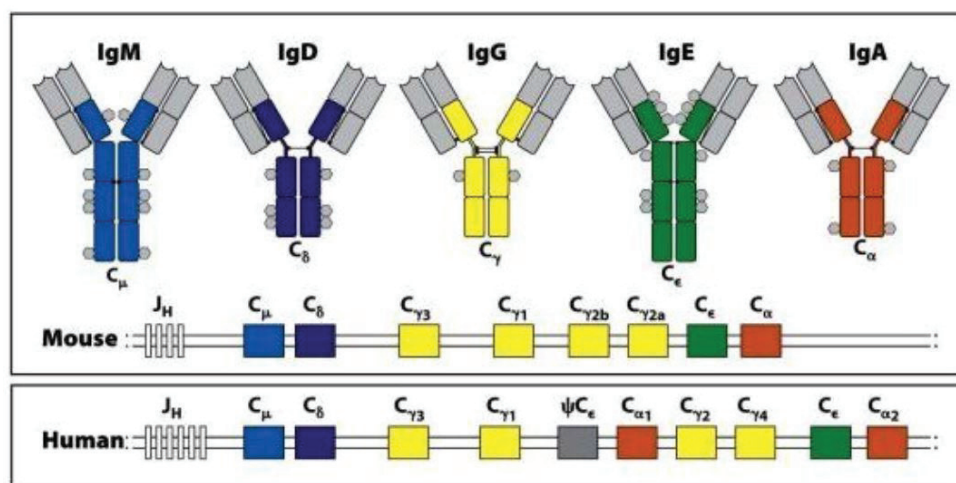


FIGURE 4: REPRESENTATION DES DIFFERENTS ISOTYPES D'IMMUNOGLOBULINES. JANEWAY 2008.

Les LT expriment à leur surface un TCR qui reconnaît l'antigène lorsqu'il est présenté sous forme de peptides par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)²⁵. En général, les LT sont incapables de se lier à des antigènes solubles et dans leur forme native. L'expression de molécules accessoires CD8 ou CD4 conditionne l'association du TCR à une molécule CMH de classe I ou de classe II respectivement. Chaque chaîne du TCR est constituée d'une région V et d'une région C qui comporte une partie transmembranaire assurant son expression à la surface du LT.

1.3 Les différentes phases de la réponse immunitaire

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

a. La phase d'identification du pathogène

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

Les macrophages identifient les pathogènes extracellulaires

Lorsqu'un pathogène pénètre le corps humain, il est rapidement repéré par les macrophages. Ce sont les premières cellules sur le lieu d'une infection qui capturent et éliminent les micro-organismes qu'elles rencontrent. Les macrophages sont capables de distinguer un pathogène des éléments du corps humain grâce à des motifs moléculaires présents sur leur membrane (PAMP = pathogen associated molecular pattern). Ces motifs sont communs à un grand nombre de micro-organismes et sont particulièrement conservés²¹. Ce sont donc d'excellentes

cibles pour les cellules immunitaires qui possèdent des récepteurs spécifiques de ces motifs (PRR = pathogen recognition receptor). Une fois le pathogène identifié, sa capture par le macrophage est favorisée par l'action du complément.

En plus de leur activité phagocytaire, les macrophages induisent une réaction inflammatoire en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-12 et des chimiokines. Ces signaux permettent de recruter et d'activer d'autres cellules immunitaires sur le lieu d'une infection et facilitent leur migration en rendant les vaisseaux proches du lieu de l'infection perméables²⁶.

Les cellules NK identifient les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires

Lorsqu'une cellule est infectée par un virus, son fonctionnement va être dérégulé. Bien qu'elles passent inaperçues des macrophages, les cellules NK disposent des récepteurs nécessaires à l'identification de ces cellules infectées. Bien que non spécifiques, les cellules NK sont capables de reconnaître les cellules infectées ou anormales, notamment parce que celles-ci expriment peu ou plus le CMH-I en raison d'une altération par le virus. De plus, les cellules infectées sécrètent des cytokines, en particulier l'IFN- α et l'IFN- β , qui activent considérablement les cellules NK. Dans certains cas, des anticorps peuvent se fixer à la surface de cellules infectées, que les cellules NK vont mieux reconnaître par l'intermédiaire de la région constante des anticorps. Ce processus est nommé ADCC (pour « antibody-dependant cellular cytotoxicity ») car l'activité cytotoxique des cellules NK repose sur la présence d'anticorps à la surface de cellules cibles. Les macrophages participent également à l'activation des cellules NK par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et le TNF- α . Une fois fixées aux cellules infectées, les cellules NK libèrent des granules cytotoxiques contenant des granzymes et perforines qui vont perforer la membrane cellulaire et induire l'apoptose²⁷. Par leur action, les cellules NK empêchent le virus de se répliquer trop rapidement et stabilisent la charge virale en attendant les acteurs de l'immunité adaptative, en particulier les LT cytotoxiques capables d'éliminer spécifiquement les cellules infectées.

La présentation de l'antigène par les cellules dendritiques

En parallèle de leur activité phagocytaire, les CD assurent une fonction essentielle dans le lien entre l'immunité innée et adaptative : la présentation d'antigènes aux LT naïfs. Les CD circulent dans tout l'organisme par le sang et la lymphe et peuvent résider au sein des tissus.

Etude bibliographique - Les vaccins et le système immunitaire

Comme les macrophages, elles capturent continuellement les antigènes endogènes ou exogènes rencontrés²⁸. Cependant, les CD doivent recevoir un signal de danger au moment où l'antigène est capturé pour initier la réponse immunitaire adaptative. Ces signaux de danger sont les PAMP qui activent des PRR comme pour les macrophages. Cette activation induit la maturation des CD, dont le phénotype varie selon le pathogène rencontré. De cette manière, les CD pourront orienter la réponse induite par les LT afin qu'elle soit adaptée à la nature du pathogène détecté²⁹. En l'absence de signal de danger, les CD envoient un message de tolérance envers l'antigène capturé.

La maturation des CD implique leur migration dans les ganglions lymphatiques où sont localisés les lymphocytes naïfs, leur circulation étant favorisée par l'inflammation générée par les macrophages ayant pour effet d'augmenter le flux de la lymphe³⁰. Les CD subissent également des changements au niveau de leur structure et fonctions. Les CD matures développent notamment des dendrites et perdent leurs propriétés d'adhésion afin d'augmenter leur mobilité. Les molécules du CMH-II migrent du réticulum endoplasmique vers l'endosome pour être chargées avec un peptide antigénique et aller le présenter sur la membrane cellulaire. Ainsi, les CD matures expriment fortement le CMH-II, de même que les marqueurs de costimulation CD80 et CD86. La présentation de l'antigène s'accompagne également de la sécrétion de cytokines spécifiques qui participent à la polarisation de la réponse des LT en fonction de la nature du pathogène capturé³¹. Le CMH-II est exprimé uniquement par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), qui comptent les CD, les macrophages et les LB. Ce sont donc les seules cellules capables de présenter un antigène issu de la dégradation d'un pathogène extracellulaire.

A l'inverse du CMH-II, les molécules du CMH-I présentent principalement des peptides issus de protéines endogènes. Il peut s'agir de protéines provenant du cytosol dont la fonction est achevée, ou bien de protéines produites par des gènes viraux utilisant la machinerie de la cellule infectée, ou encore de protéines sécrétées par des pathogènes intracellulaires. Le protéasome dégrade les protéines en peptides qui sont ensuite transportés vers le réticulum endoplasmique pour être chargés sur les molécules du CMH-I avant d'être présentés à la surface de la cellule. Le CMH-I étant exprimé par toutes les cellules, n'importe quelle cellule infectée par un pathogène intracellulaire peut le signaler en présentant un peptide antigénique sur son CMH-I³². Cependant, il peut arriver qu'un pathogène capturé par une

cellule dendritique soit présenté sur le CMH-I plutôt que le CMH-II, ce que l'on appelle la présentation croisée. Bien que les mécanismes mis en jeu soient encore mal compris, il semblerait que ces antigènes exogènes puissent s'échapper de l'endosome pour atteindre le cytosol et être traités de la même manière que les antigènes endogènes. Cet échappement endosomal pourrait être lié à l'action de transporteurs membranaires³². Dans le cas d'antigènes particulaires, leur internalisation dans des phagosomes pourrait retarder le processus d'acidification induisant leur dégradation peptidique et ainsi leur permettre de conserver leur intégrité et fuir vers le cytosol³³.

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

b. La phase effectrice

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

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

Les LT auxiliaires se distinguent par l'expression du marqueur CD4 et jouent un rôle central dans l'immunité adaptative en orchestrant la réponse immunitaire. Les LT auxiliaires matures provenant du thymus sont naïfs tant qu'ils n'ont pas rencontré l'antigène pour lequel ils sont spécifiques. Cet antigène leur est présenté par les CD sur le CMH-II, ce qui induit leur activation. Afin qu'un LT auxiliaire soit correctement activé, un triple signal est nécessaire. Le TCR et le marqueur CD4 exprimés par le LT se lient respectivement à l'antigène peptidique et au CMH-II exprimés par la CD³⁴.

A cela s'ajoute un co-signal entre le marqueur CD28 exprimé sur le LT et le marqueur CD80 ou CD86 exprimé par la CD activée. Après stimulation, le LT auxiliaire sécrète massivement la cytokine IL-2, ce qui lui permet de se multiplier pour générer des clones identiques à lui-même et spécifiques de l'antigène, qui se différencient en une classe de LT effecteurs. Les 3 classes

principales sont nommées Th1, Th2 et Th17 (pour T « helper » = auxiliaire en anglais). Ces voies de différenciation orientent la réponse immunitaire selon la nature du pathogène. Le phénotype Th1 est induit par la production d'IL-12 par les CD et favorisé par la sécrétion d'IFN- γ par les cellules T et NK lorsque celles-ci identifient des cellules infectées par un pathogène intracellulaire. Les cellules Th1 participent à l'immunité cellulaire en sécrétant massivement l'IFN- γ qui induit l'activation des macrophages et la stimulation de l'activité cytolytique des LT cytotoxiques^{35,36}. De même, la différenciation des LT auxiliaires en Th2 est induite majoritairement par la cytokine IL-4, sécrétée par les CD. Les cellules Th2 prennent part dans l'immunité humorale en stimulant la prolifération des LB et en induisant la commutation isotypique des anticorps spécifiques de l'antigène, par la sécrétion des cytokines IL-4 et IL-13^{35,36}. Ces anticorps sont nécessaires pour neutraliser les pathogènes extracellulaires. Enfin, le phénotype Th17 est induit par la production majoritairement d'IL-6 par les CD. Les cellules Th17 ont un rôle pro-inflammatoire en faveur de la réponse immunitaire, qui permet de maintenir la barrière muqueuse et inhibe l'activité des LT régulateurs, par leur production d'IL-17 et d'IL-23^{35,36}. Le rôle des effecteurs T est résumé dans la figure 5.






	Cellules T cytotoxique	Cellules CD4 Th1	Cellules CD4 Th2	Cellules CD4 Th17	Cellules CD4 régulatrices
Effecteurs des cellules T					
Principales fonctions dans la réponse adaptative	Tuent les cellules infectées	Activent les macrophages infectés Aident les cellules B pour produire des anticorps	Aident les cellules B pour produire des anticorps	Augmentent la réponse neutrophile	Suppriment les réponses T
Pathogènes visés	Virus (grippe, rage, vaccine) Quelques bactéries intracellulaires	Microbes qui persistent dans les vésicules des macrophages (Leishmania, Listeria,..) Bactérie extracellulaire	Parasites	Bactéries extracellulaires	

FIGURE 5: ROLES DES EFFECTEURS T DANS LES REPONSES IMMUNITAIRES A MEDIATION CELLULAIRE ET HUMORALE. ADAPTE DE JANEWAY 2008

L'activation des lymphocytes B : la réponse immunitaire humorale

En parallèle de l'activation des LT auxiliaires par les CD, les LB ont eux aussi la capacité de reconnaître l'antigène par leur BCR. En effet, ce récepteur est une immunoglobuline membranaire qui peut se fixer à l'antigène natif sous sa forme circulante. Celui-ci est alors internalisé puis traité de la même manière que le font les CD pour être finalement présenté sur le CMH-II exprimé à la surface des LB³⁷.

A ce stade, les LB ne sont toujours pas activés car ils requièrent la participation des LT auxiliaires. Pour cela, les LB vont présenter leur antigène aux LT auxiliaires qui ont été préalablement activés contre le même antigène. En plus de la reconnaissance de l'antigène, les LT auxiliaires délivrent un signal supplémentaire aux LB en fixant le marqueur de surface CD40 grâce à leur ligand de surface CD1³⁸. Ce co-signal de stimulation, couplé à la sécrétion de cytokines, induit la prolifération des LB et leur différenciation en plasmocytes. Ces cellules sécrètent des anticorps spécifiques de l'antigène, qui sont en fait des versions sécrétoires du BCR ayant reconnu l'antigène.

L'activation des LB par les LT auxiliaires induit également la commutation isotypique permettant de sécréter différentes classes d'anticorps : les IgM et IgD produites en premier lieu sont remplacées par des IgG, IgA et IgE, d'une plus grande affinité envers l'antigène. Les cytokines sécrétées par les LT auxiliaires durant la phase d'activation des LB orientent la commutation isotypique. En particulier chez la souris, une cellule Th1 sécrétant de l'IFN- γ privilégie la production d'IgG2a tandis qu'une cellule Th2, par sa sécrétion d'IL4, induit la production d'IgG1 et IgA³⁷. Les anticorps produits, selon leur classe, agissent de différentes manières sur le pathogène. La neutralisation consiste à fixer le pathogène avec un grand nombre d'anticorps afin de l'empêcher d'entrer en contact avec les cellules. Les pathogènes ainsi recouverts d'anticorps, par le processus d'opsonisation, sont également plus facilement phagocytés ou endocytés par les cellules exprimant des récepteurs spécifiques des régions constantes des immunoglobulines (macrophages, CD et LB). En particulier, certains pathogènes ne portent pas de PAMP et sont donc invisibles des macrophages. Grâce à l'action de ces anticorps spécifiques, les macrophages peuvent identifier ces pathogènes et les détruire.

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

Les anticorps sont certes très efficaces pour éliminer les pathogènes circulants mais leur contribution contre des pathogènes intracellulaires est limitée. L'élimination des pathogènes intracellulaires comme les virus nécessite de détruire les cellules infectées par ces pathogènes car elles constituent des réservoirs viraux et permettent aux virus de se répliquer. Bien que les cellules NK puissent identifier les cellules infectées et les détruire grâce à la fixation des anticorps, cette fonction est limitée par la nécessité que l'antigène reconnu par les anticorps soit exprimé à la surface des cellules cibles. Les lymphocytes T cytotoxiques exprimant la molécule accessoire CD8 ont un spectre de reconnaissance d'antigène plus large constitué de petits peptides (9-10 acides aminés) présentés par les molécules de CMH-I³⁹. Dans la plupart des cas, l'activation des LT cytotoxiques est favorisée par la participation des LT auxiliaires activés.

Lorsqu'ils sont activés, les LT cytotoxiques sont capables de reconnaître directement l'antigène peptidique présenté à la surface d'une cellule infectée via son CMH-I, sans co-signal. Pour cela, les LT cytotoxiques activés quittent les ganglions lymphatiques pour rejoindre la circulation sanguine et les tissus, en particulier le lieu d'une infection. Les lymphocytes se fixent localement et traversent plus aisément la paroi des vaisseaux sanguins. Ils sont ensuite guidés jusqu'au lieu exact de l'infection par un gradient de chimiokines sécrétées par les macrophages. Les LT cytotoxiques vont alors passer en revue les cellules qu'ils rencontrent en se fixant de manière non spécifique à leur surface. Cette liaison est faible jusqu'à ce que le TCR d'un LT cytotoxique reconnaisse spécifiquement l'antigène contre lequel il a été activé. Le lien entre le LT cytotoxique et la cellule cible est alors renforcé, ce qui laisse le temps au LT de relarguer des protéines cytotoxiques (granzymes et perforines) au point de contact entre les deux cellules. Ce processus rapide permet aux LT cytotoxiques de cribler efficacement les différentes cellules présentes sur le lieu d'une infection afin de détruire les cellules cibles infectées.

c. La phase de régulation : les lymphocytes T régulateurs

Si les LT CD4 décrits précédemment ont pour but d'activer d'autres cellules afin de d'induire une réponse immunitaire spécifique, il en existe d'autres dont la fonction est d'inhiber cette réponse immunitaire. Les LT régulateurs ou Treg contrôlent la réponse immunitaire afin d'éviter qu'elle ne s'emballe, ce qui pourrait causer des maladies auto-immunes. Les Treg sont

soit produits directement dans le thymus (Treg thymiques), soit différenciés à partir d'un LT auxiliaire naïf (Treg périphériques). Ils expriment tous deux le facteur de transcription FoxP3 ainsi que les marqueurs de surface CD4 et CD25. FoxP3 empêche la production d'IL-2 nécessaire à la prolifération des LT. Même en l'absence d'infection, les CD capturent les antigènes du soi ainsi que les micro-organismes commensaux pour les présenter aux LT auxiliaires. Cependant, en l'absence de signal pro-inflammatoire, les CD ne sont pas activées et produisent seulement la cytokine TGF- β . Celle-ci inhibe la prolifération des LT auxiliaires et leur différenciation en Th1, Th2 ou Th17 pour favoriser la différenciation en Treg. Ce processus induit une tolérance envers les antigènes présentés par les CD³⁶. En revanche, au début d'une infection les CD sécrètent fortement de l'IL-6, ce qui en l'absence d'IL-4 et IL-12, induit la différenciation des LT auxiliaires en Th17 plutôt que Th1 ou Th2.

C'est la balance entre les IL-6 et TGF- β sécrétés qui induit la différenciation des LT auxiliaires en Th17 ou Treg. Dans le cas où des Treg sont générés, ceux-ci sécrètent de l'IL-10 et le TGF- β qui auront un rôle immunosuppresseur³⁵. En particulier, l'IL-10 peut bloquer la production de cytokines de la part des LT ainsi que l'activité des CD. Quant au TGF- β , il bloque également la prolifération des LT ainsi que leur capacité à détruire leurs cellules cibles.

Cependant, ces cytokines n'ont pas toujours un effet immunosuppresseur. En effet, cela dépend des cellules qui les consomment. Certaines cytokines activent des cellules mais en inhibent d'autres. Tout est une question d'équilibre et de balance entre ces différents facteurs. Par exemple, l'IFN- γ induit la différenciation des LT auxiliaires en Th1 mais inhibe la signalisation vers Th2 ou Th17. De même, l'IL-4 favorise la maturation des Th2 tout en inhibant Th17.

d. La phase de mémoire immunologique

Lorsqu'une infection est sous contrôle et que le pathogène est éliminé, les cellules immunitaires effectrices meurent car leur durée de vie est courte. Seules demeurent des cellules mémoires (environ 5 %), dont la demi-vie peut se compter en années, qui garantissent la protection en cas de réexposition au même pathogène⁴⁰. Ces cellules mémoires sont issues de LB et T effecteurs qui se sont différenciés pendant l'infection. Grâce à ces cellules, une deuxième exposition à un agent infectieux donné génère une réponse immunitaire plus rapide et plus forte. Si le pathogène est réintroduit en faible quantité, les anticorps restants peuvent le neutraliser sans aide supplémentaire.

Etude bibliographique - Les vaccins et le système immunitaire

La haute affinité des anticorps leur permet de reconnaître très rapidement et efficacement le pathogène et de le fixer pour permettre aux cellules phagocytaires de l'éliminer. Dans le cas où le pathogène est présent en large quantité, une réponse secondaire des LB est générée. Les LB mémoires (LBm) ont été sélectionnés parmi les LB effecteurs ayant la meilleure affinité avec l'antigène. Cette haute affinité est la conséquence d'hypermutations somatiques ayant lieu dans les centres germinaux des ganglions lymphatiques. Ce phénomène est amplifié par la répétition de l'exposition au pathogène.

Ainsi, les LBm capturent efficacement le pathogène pour aller le présenter aux LT auxiliaires. Cette étape est également favorisée par la surexpression du CMH-II et de molécules co-stimulatoires.

L'activation qui en résulte conduit à une forte prolifération et différenciation de ces cellules, dont le nombre peut aller jusqu'à 100 fois le niveau basal. Ces anticorps, produits en plus grande quantité que lors d'une première infection, seront d'autant plus efficaces pour neutraliser et participer à l'élimination du pathogène. De la même manière, les LT mémoires (LTm) spécifiques de l'antigène persistent après infection en quantité 100 à 1000 fois supérieure au niveau basal avant infection. Ces LTm sont plus susceptibles d'être restimulés par l'antigène que les LT naïfs.

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

Etude bibliographique - Les vaccins et le système immunitaire

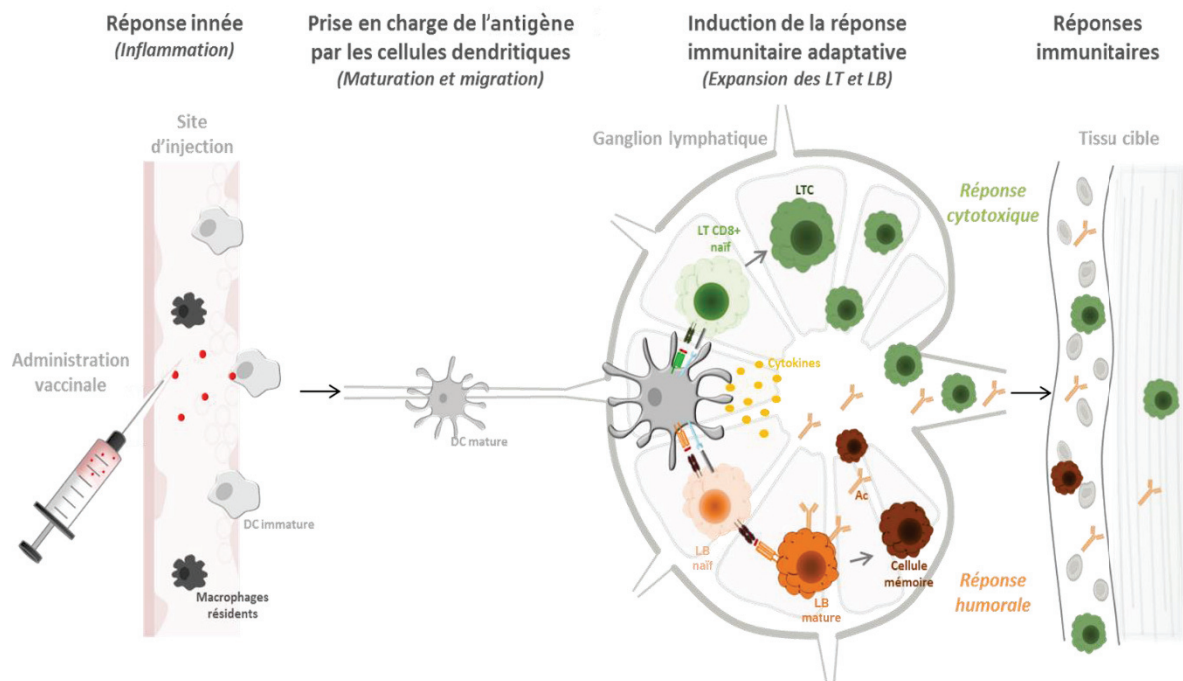


FIGURE 6 : RESUME DU PRINCIPE DE LA VACCINATION PAR L'ACTIVATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE. ADAPTE DE GUTJAHN ET PHELIP⁴¹.

Le principe de la vaccination prophylactique repose sur l'existence-même des cellules mémoires induites lors d'une réponse immunitaire. En effet, elle a pour but de simuler une première exposition à un pathogène donné, de manière inoffensive, afin de générer une réponse immunitaire suffisamment importante dont la mémoire sera capable de protéger dans le futur en cas d'infection productive par le pathogène. Lors d'une première exposition à un pathogène, la réponse immunitaire adaptative est induite après plusieurs jours voire semaines avec une intensité modérée. Grâce à la génération de cellules immunitaires mémoires spécifiques, en cas de réexposition au même pathogène, une réponse immunitaire adaptative beaucoup plus intense est mise en place en un temps réduit (quelques heures à quelques jours). Cette réponse adaptative secondaire intervient suffisamment rapidement pour neutraliser le pathogène avant que la maladie ne se déclare et que les premiers symptômes apparaissent. Grâce à la vaccination qui présente une version inoffensive d'un pathogène donné, le patient est protégé en cas d'exposition avec le pathogène réel (Figure 6).

1.4 Cas de la vaccination muqueuse

Les muqueuses constituent la principale voie d'entrée des pathogènes. Un grand nombre de décès causés par des maladies infectieuses sont dus à un nombre limité de pathologies (pneumonie, tuberculose, diarrhées, malaria et SIDA). Pour la plupart de ces infections, le premier contact entre le pathogène et l'hôte a lieu au niveau des surfaces muqueuses, spécifiquement les muqueuses nasales, oropharyngées, respiratoires, gastrointestinales et urogénitales. Un vaccin idéal induirait non seulement une réponse immunitaire systémique mais aussi muqueuse, incluant la production de lymphocytes effecteurs et d'anticorps capables d'interférer avec l'adhésion microbienne, de neutraliser les toxines bactériennes et même d'inactiver le pathogène. L'induction de réponses immunitaires au niveau des muqueuses est donc un enjeu majeur en vaccinologie.

Les vaccins muqueux rencontrent un obstacle à travers le mécanisme de tolérance muqueuse qui peut inhiber leur effet. Le système immunitaire muqueux a développé des propriétés de tolérance immunologique permettant de ne pas répondre aux antigènes non pathogènes présents dans l'environnement. Ce phénomène, appelé « tolérance orale » quand il est induit par les intestins, implique la délétion de cellules réactives ou anergie (haute dose d'antigène), mais aussi l'activation de lymphocytes T régulateurs (Treg, faible dose d'antigène). Il évite à l'organisme de diriger des réponses immunitaires contre des antigènes non dangereux, comme ceux présents dans l'alimentation ⁴².

Ce mécanisme de tolérance orale est induit en plusieurs étapes. Les antigènes intestinaux peuvent passer vers le GALT à travers les cellules M, puis être collectés par les CD. Ces cellules dendritiques CD103+ muqueuses transportent les antigènes microbiens et alimentaires et sont conditionnées à l'induction des Treg dans les ganglions lymphatiques mésentériques ⁴³. De faibles doses d'antigène induisent la stimulation des Treg alors que des doses élevées résultent en une anergie ou délétion des cellules réactives. Les Treg pourront empêcher la prolifération de LT effecteurs, permettant la tolérance aux antigènes non dangereux.

Le mécanisme de tolérance a été un obstacle au développement de vaccins muqueux, notamment pour l'administration de protéines recombinantes ne présentant pas de signaux de danger contrairement aux vecteurs vivants. Ce phénomène s'applique à la fois aux

réponses T et B. Comme décrit précédemment, le mécanisme de tolérance dépend le plus souvent de la dose et du temps de délivrance des antigènes : une faible dose administrée sur une longue période ou une très forte dose qui submerge le système immunitaire peut induire ce phénomène ⁴⁴. Pour ces raisons, lors de l'utilisation de systèmes de délivrance, la cinétique de relargage de l'antigène doit être soigneusement analysée et choisie en vaccination muqueuse.

a. Vaccination muqueuse par voie parentérale

Un paradigme actuel en vaccination est que les vaccins non-réplicatifs délivrés par voie parentérale n'induisent pas de réponses immunitaires dans les tissus muqueux. Cependant, ce concept a été contesté par des données expérimentales et cliniques, même si la vaccination par voie muqueuse reste le moyen le plus étudié pour l'induction d'une réponse immunitaire muqueuse. Dès 1973, la présence d'IgG a été observée dans les lavements vaginaux de femmes immunisées par voie intramusculaire avec un vaccin inactivé contre le virus de la polio ⁴⁵. Des IgG, IgM et IgA anti-grippe ont été retrouvées dans la salive d'individus vaccinés avec le vaccin antigrippal trivalent fragmenté ⁴⁶. Des IgG et IgA ont été observées dans les sécrétions cervicales d'adolescentes vaccinées avec un vaccin contre HPV à base de VLP ⁴⁷.

Des données chez le primate ont confirmé ces informations. Il a été observé que la vaccination de macaques avec une protéine de la membrane externe de *Chlamydia trachomatis* induit la production d'IgA et IgG antigène-spécifiques dans les fèces, la salive, les larmes et les lavements vaginaux après administration parentérale ⁴⁸. De nombreuses études chez le primate non-humain avec des antigènes dérivés du VIH ou du VIS (virus de l'immunodéficience simienne), ont démontré l'induction d'une réponse immunitaire muqueuse après vaccination parentérale ⁴⁹.

La vaccination parentérale pour l'induction de réponses immunitaires muqueuses est donc envisageable, même si les mécanismes précis impliqués lors de ce type de réponse restent peu élucidés. Une meilleure compréhension de ces phénomènes permettra certainement le développement de vaccins efficaces induisant de fortes réponses muqueuses après immunisation parentérale.

b. Vaccination muqueuse par voie muqueuse

La vaccination par voie muqueuse peut induire des réponses immunitaires antigène-spécifiques cellulaires et humorales, à la fois dans les compartiments systémiques et muqueux. La vaccination par cette voie présente de nombreux intérêts, notamment consistant les méthodes de production et l'aspect réglementaire. Par exemple, les vaccins utilisés par voie orale ne nécessitent pas une purification poussée des produits bactériens qui sont déjà présents en grand nombre dans les intestins, contrairement aux vaccins injectés par voie parentérale qui doivent avoir une pureté élevée. De plus, les vaccins muqueux sont adaptés à la vaccination de masse puisqu'ils n'impliquent pas de risque de dissémination de maladies par des aiguilles contaminées. La facilité d'administration et la possibilité d'être délivrée par un personnel sans formation médicale sont aussi des avantages de la vaccination par voie muqueuse ⁵⁰.

Cependant, un faible nombre de vaccins muqueux sont aujourd'hui approuvés pour un usage chez l'Homme.

La compartimentation du système immunitaire muqueux contraint le choix des voies d'administrations pour l'induction d'une réponse dans un compartiment choisi ⁵¹.

L'immunisation par voie orale induit une forte sécrétion d'IgA dans l'intestin grêle, la partie haute du côlon et les glandes mammaires et salivaires, tandis que l'administration par voie rectale induit une forte réponse dans le côlon mais pas dans les autres compartiments. Une administration vaginale protège au niveau local. Il est intéressant de noter que l'administration de vaccins par voie nasale induit non seulement une forte réponse dans les sécrétions locales (salive et sécrétions nasales) et les voies aériennes supérieures, mais aussi au niveau vaginal. Cette propriété présente un intérêt pour la protection contre les maladies sexuellement transmissibles.

La plupart des vaccins muqueux homologués pour un usage chez l'homme sont administrés par voie orale. Le développement de vaccins intranasaux est également approuvé, et aujourd'hui de nombreuses voies d'administrations sont à l'étude, comme l'inhalation d'aérosols, les voies intra vaginales, rectales et sublinguales. La vaccination par voie orale est un vrai défi, non seulement à cause de la dégradation des antigènes dans l'environnement intestinal, mais aussi à cause du phénomène de tolérance qui protège l'organisme contre les réponses immunitaires non souhaitées contre des antigènes non pathogènes. Une des

stratégies actuellement très étudiée pour la vaccination par voie orale est l'utilisation de nano- et micro-particules biodégradables qui ont la capacité de protéger l'antigène ou des molécules immunostimulantes⁵² et de cibler les muqueuses.

L'avantage de la vaccination intranasale est l'induction de réponses immunitaires au niveau local mais également au niveau pulmonaire et vaginal. Cette propriété a été étudiée dans le cadre de la vaccination contre le VIH où une réponse immunitaire protectrice au niveau d'un des sites d'entrée du virus est souhaitée. La vaccination intranasale de macaques avec la protéine gp41 de l'enveloppe du VIH couplée à un virosome a conduit à une forte réponse IgA protectrice dans le tractus génital, prévenant la transmission de l'infection⁵³. Cependant, des cas de paralysie du nerf facial (Bell's Palsy) ont été observés lors d'une étude clinique de phase I pour la vaccination intranasale contre la grippe⁵⁴. Ces formulations étaient adjuvantées avec la HLT (Heat Labile Enterotoxin) qui semble avoir la capacité de se fixer aux nerfs olfactifs. Bien qu'efficace pour l'induction de réponses immunitaires muqueuses, l'administration par voie intranasale doit être utilisée avec précaution.

II. LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE ET LA VACCINATION

2.1. Généralités sur le VIH

a. Epidémiologie mondiale du VIH

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), l'agent étiologique responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), a été décrit pour la première fois en 1983⁵⁵. Le VIH se transmet par voies sexuelles, sanguine ou encore de la mère à l'enfant lors de l'accouchement ou de l'allaitement. Depuis le début de l'épidémie, 77,3 millions [59,9 millions - 100 millions] de personnes ont été infectées par le VIH et 35,4 millions [25,0 millions - 49,9 millions] de personnes sont décédées des suites de maladies liées au SIDA, soit plus de la moitié. Le VIH est, avec la Grippe Espagnole, la pandémie la plus meurtrière de l'histoire récente : elle a tué plus de gens que lors de la Première Guerre mondiale. Grâce à une prise de conscience collective et par les politiques de santé publique mises en place, le nombre de nouvelles infections dues au VIH et le nombre de morts dus au SIDA ont diminué d'année en année. A titre indicatif, en 2009 il y a eu 2,6 millions de personnes nouvellement infectées et 1,8 million de morts dus au SIDA. En 2017, il a été estimé que 1,8 million [1,4 million - 2,4 millions] de personnes sont nouvellement infectées par le VIH et 940 000 [670 000 - 1,3 million] de personnes sont décédées de maladies liées au SIDA en 2017 (UNAIDS, 2018).

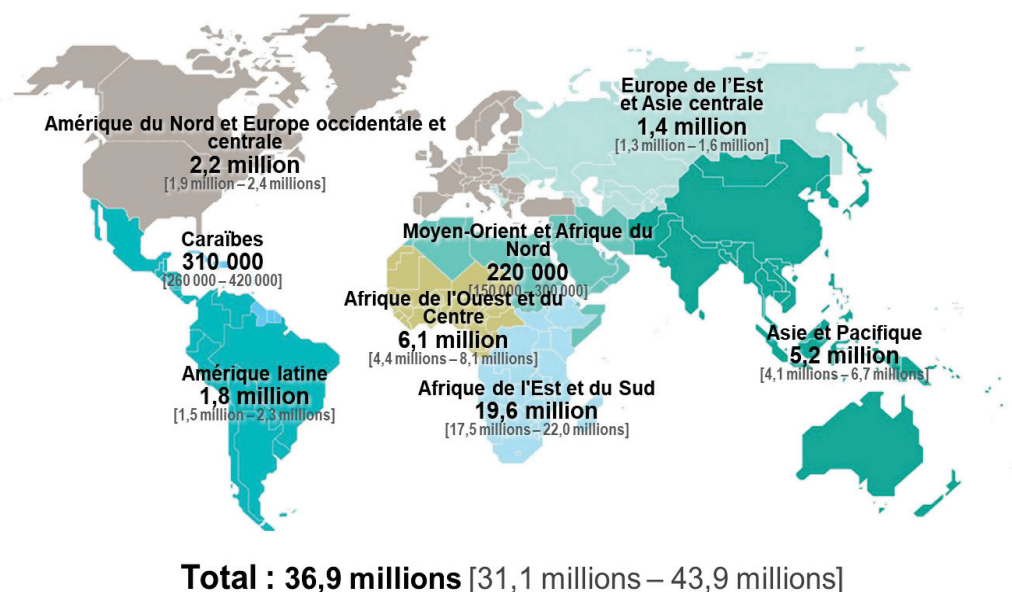


FIGURE 7 : ESTIMATION DU NOMBRE D'ADULTES ET D'ENFANTS INFECTÉS PAR LE VIH EN 2017 (ONUSIDA 2018)

Depuis la découverte du VIH, de nombreux anti-rétroviraux (ARV) ont été développés et ont permis d'augmenter la qualité et l'espérance de vie de millions de personnes infectées. A la fin de l'année 2017, on estime que parmi les 36,9 millions de personnes vivant avec le VIH, seulement un peu moins de 60 % (21,7 millions) de ces personnes ont accès à la thérapie ARV. Pourtant on estime que 75 % des personnes ayant le VIH connaissent leur statut sérologique (Figure 8). Même s'il y a une prise de conscience collective, que les traitements sont plus accessibles, qu'ils induisent moins d'effets secondaires et qu'ils permettent de diminuer le nombre d'infections, la propagation de ce virus est encore loin d'être éradiquée. En effet, à cause des différentes discriminations que le VIH apporte, beaucoup de personnes ne souhaitent pas se faire dépister et/ou ne souhaitent pas suivre de traitement afin de « cacher » leur statut sérologique.

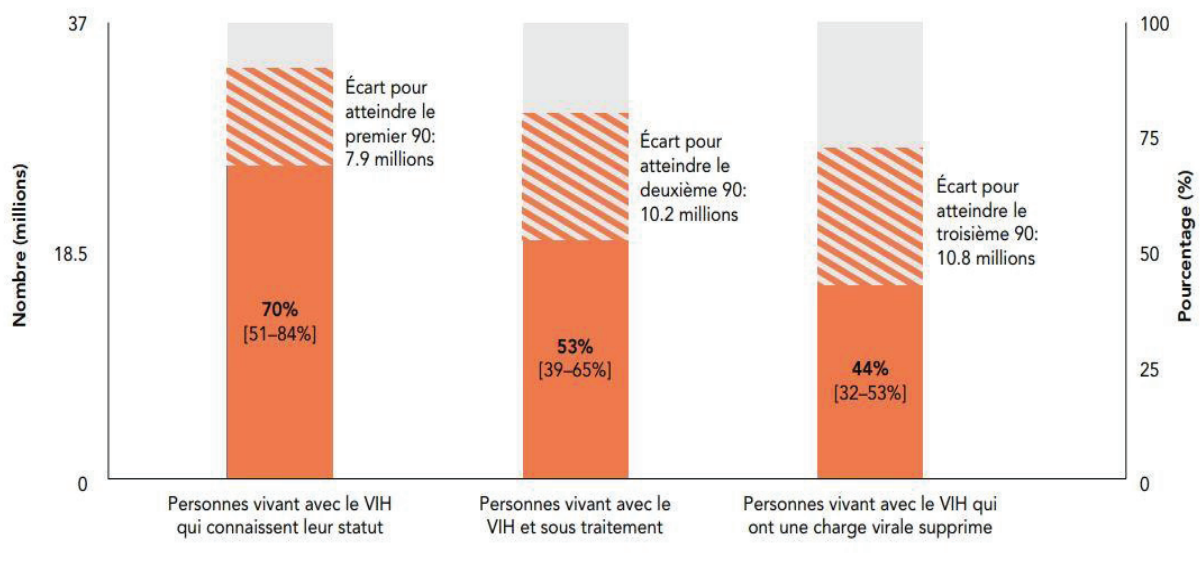


FIGURE 8 : CASCADE DU DEPISTAGE ET DU TRAITEMENT DU VIH AU NIVEAU MONDIAL EN 2016. DE GAUCHE A DROITE : CONNAISSANCE DU STATUT VIH, COUVERTURE DU TRAITEMENT ET SUPPRESSION DE LA CHARGE VIRALE. DONNEES ONUSIDA 2017.

b. Origine zoonotique du VIH

Le VIH est un rétrovirus de la classe des lentivirus, subdivisé en deux types : le VIH-1 et le VIH-2. Le VIH-1 est à l'origine de la pandémie, le VIH-2 induit une progression plus lente vers le stade SIDA, et il touche principalement l'Afrique de l'ouest. Ces deux virus dérivent de la transmission inter-espèces du Simian Immunodeficiency Virus (SIV) du singe à l'Homme. La transmission inter-espèce a eu lieu notamment par la chasse de viande de brousse (viande

d'animaux sauvages, tels que les macaques et les chimpanzés), ou lorsque le singe était gardé comme animal de compagnie. Dans tous les cas, suite à une morsure ou une blessure, les personnes pouvaient être en contact avec des fluides et des fèces contaminés.

Un échantillon de sang prélevé en 1959 au Congo, ainsi que ceux de nombreux patients présentant des maladies rares ont été conservés jusqu'en 1980 et ont révélé que les premiers cas documentés de la maladie se trouvaient en Afrique Centrale.

c. Classification du VIH

L'analyse des séquences du VIH a mis en évidence une forte variabilité génétique permettant la distinction en 4 groupes différents : le groupe majoritaire M (pour « Main »), le groupe O (Outlier), le groupe N (Non-M, Non-O) et le groupe P. Le groupe M, qui représente 90 % des infections, est subdivisé en 9 sous-types : A,B,C,D,F,G,H,J, et K (Figure 9). Cette diversité a pour origine un taux de mutations important provoqué principalement par deux facteurs. Le premier concerne la transcriptase inverse (RT) qui n'a pas la capacité à corriger ses erreurs lors de la synthèse du brin d'ADN à partir de l'ARN viral. Le taux d'erreur a été estimé entre 1/1700 et 1/7500, ce qui se traduit par environ 1 à 5 erreurs par copie d'ADN viral ^{56,57}. Le deuxième facteur est la possibilité de recombinaison génétique aléatoire entre deux virus infectant simultanément une même cellule, la transmission ultérieure entraînant de nombreuses formes recombinantes circulantes.

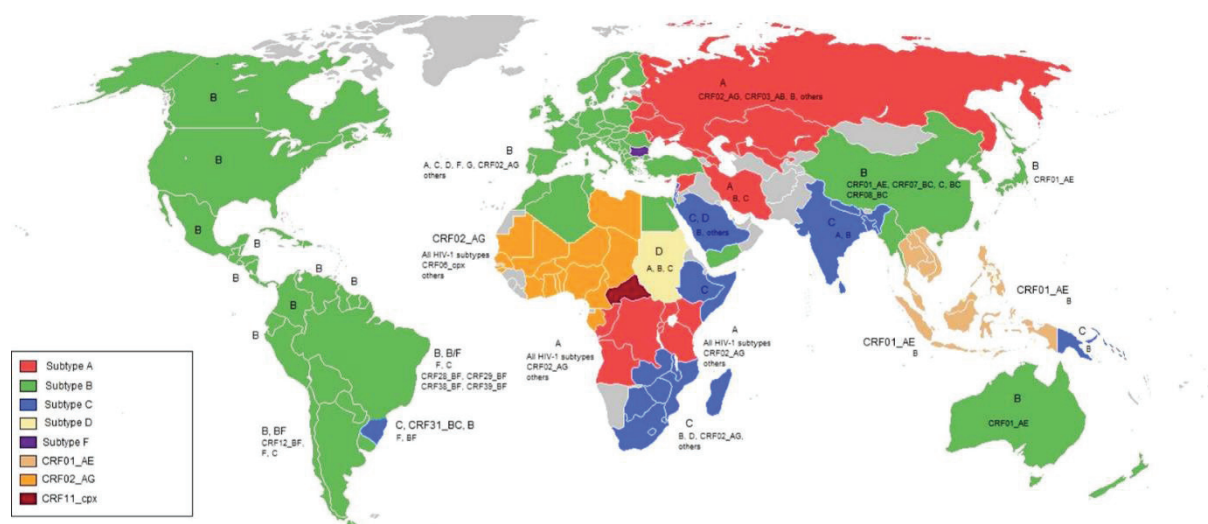


FIGURE 9 : REPRESENTATION DE LA DISTRIBUTION MONDIALE DES SOUS-TYPES DE CRFS DU VIH-1 DU GROUPE M

2.2. Génome et protéines virales

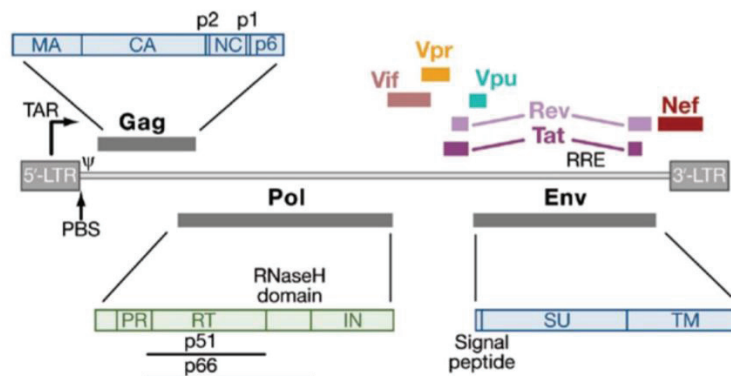


FIGURE 10 : ORGANISATION DU GENOME DU VIRUS VIH-1.

Le génome de 9,5kb se compose de deux LTR encadrant 9 gènes codants pour les protéines de structure (Gag, Pol et Env), des protéines régulatrices (Tat et Rev) et des protéines auxiliaires (Nef, Vif, Vpr et Vpu). Schéma issu des archives Cell Press.

Le génome viral de 9,5 Kb contient 3 gènes caractéristiques des rétrovirus (*gag*, *pol*, *env*), 2 gènes codant des protéines régulatrices (*tat* et *rev*) et 3 pour des protéines accessoires impliquées dans l'infectiosité du virus (Nef, Vif, Vpr, Vpu) (Figure 10).

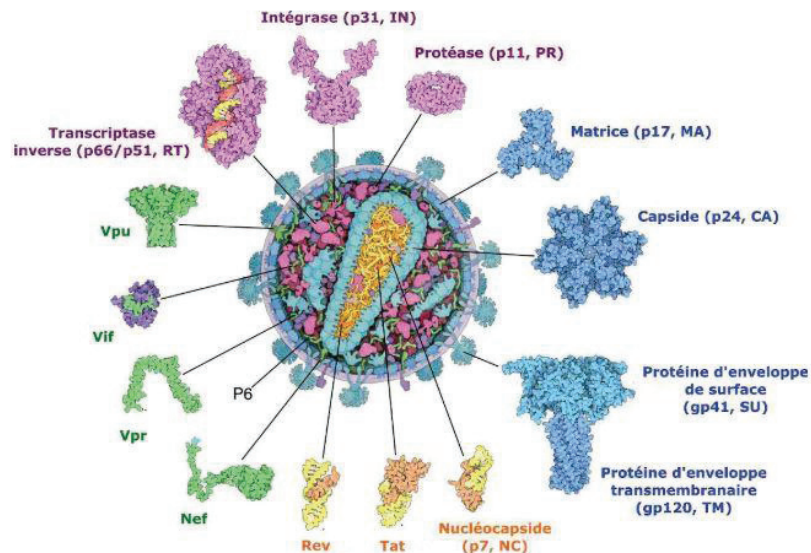


FIGURE 11 : STRUCTURE DU VIH (ADAPTE DE PROTEIN DATA BANK).

Le génome ARN du VIH est représenté en jaune pâle. Les protéines structurales sont colorées en bleu, ainsi que les glycoprotéines d'enveloppe. Les protéines enzymatiques sont colorées en violet, avec la transcriptase inverse (RT), qui synthétise l'ADNc (rouge) à partir de l'ARN viral. Les protéines accessoires sont en vert. Enfin les protéines encapsidées avec l'ARN viral sont en orange : les protéines régulatrices Tat et Rev (orange foncé), ainsi que la protéine de la nucléocapside (orange pâle).

Etude bibliographique - Le VIH et la vaccination

La particule virale du VIH a une forme sphérique avec un diamètre d'environ 100nm. Elle est composée d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrés des trimères des glycoprotéines gp120 (en surface) et gp41 (transmembranaire). Ces glycoprotéines sont issues du clivage par une protéase cellulaire, de type furine, du précurseur gp160 codé par le gène *env*. Une description plus précise de la conformation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH sera développée dans le paragraphe « 1.2.9 Les différentes protéines d'Env utilisées comme immunogènes ».

La partie interne de la particule virale est tapissée par la protéine p17, constituant la matrice. Cette dernière contient la capsid, constituée de la protéine p24, et renfermant deux copies d'ARN viral simple brin à polarité positive. Les protéines de la capsid et de la matrice sont issues du clivage du précurseur polypeptidique Pr55 codé par le gène *gag*. Le génome viral est associé à la nucléocapsid composée de la protéine p7, et aux protéines nécessaires à sa réplication dont la RT, l'intégrase et la protéase⁵⁸ (Figure 11).

2.3. Cycle de réplication

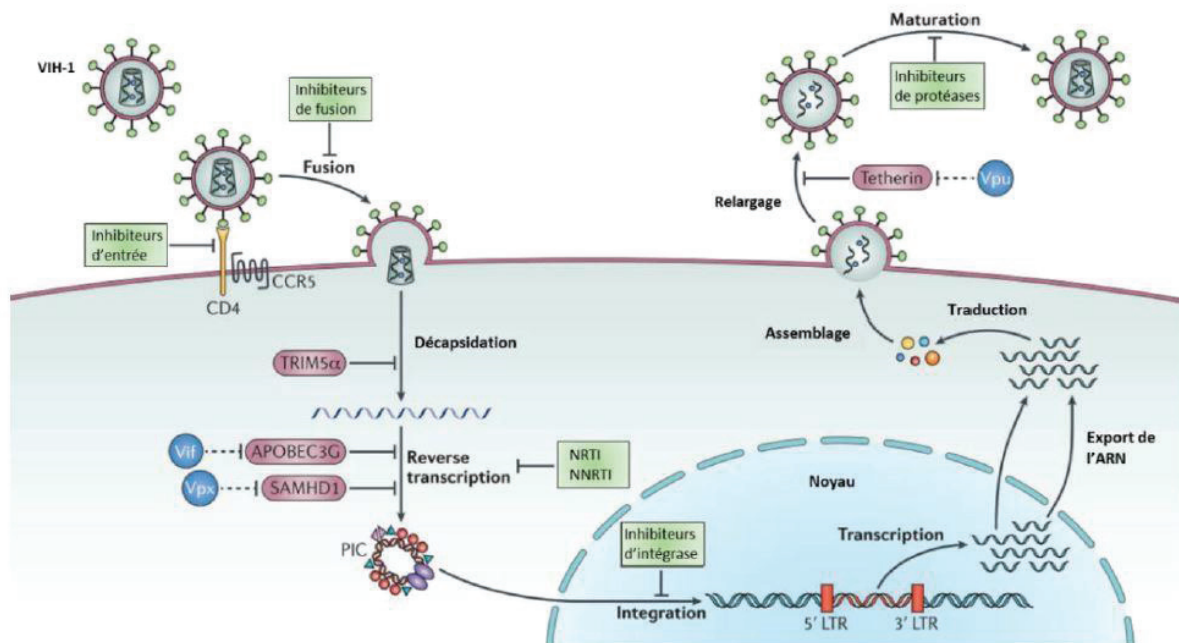


FIGURE 12 : REPRESENTATION DU CYCLE DE REPLICATION VIRALE DU VIH-1.

Le cycle de réplication se divise en plusieurs étapes qui sont : la liaison du virus au récepteur CD4 et au corécepteur, la fusion avec la membrane de la cellule hôte, la décapsidation permettant la libération du génome viral et des protéines dans le cytoplasme, la transcription inverse de l'ARN en ADNc, la formation du complexe de pré-intégration (PIC) et la translocation de ce dernier vers le noyau, l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte et sa transcription en ARN, l'export des ARN viraux dans le cytoplasme et leur traduction en protéines, la migration de ces derniers à la surface de la membrane cellulaire, l'assemblage et le bourgeonnement des nouveaux virions et la maturation de ces derniers en nouveaux virus. Les familles des principaux antirétroviraux sont présentées en vert. (Adapté de Barré-Sinoussi *et al.*⁵⁹)

Lors de l'infection (Figure 12), la glycoprotéine gp120 va reconnaître la molécule CD4 à la surface de la cellule cible avec une forte affinité. Cette reconnaissance va induire un changement de conformation de la glycoprotéine gp41, permettant ainsi son interaction avec le corécepteur CCR5 ou CXCR4. Il s'en suit une fusion des membranes virale et cellulaire aboutissant à la libération du génome et des protéines virales dans le cytoplasme de la cellule cible. Après la décapsidation, l'ARN viral est rétrotranscrit par la transcriptase inverse (RT) en ADN complémentaire double brin (ADNc). Le complexe de pré-intégration (PIC) formé est ensuite transporté dans le noyau et l'ADN viral est intégré au sein du génome de l'hôte par l'intégrase (IN). Le provirus est ensuite transcrit en molécules d'ARN messenger (ARNm) qui seront exportées dans le cytoplasme et traduites en protéines de structure. 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. L'assemblage en particules des monomères de Gag active l'action enzymatique de la protéase (PR). Celle-ci clive les monomères de Gag et Gag/Pol, permettant la production de particules virales matures et infectieuses.

2.4. Pathogenèse du VIH

Le VIH se transmet principalement de façon horizontale par voie sexuelle, cette voie de contamination représente à elle seule 80% des transmissions (sperme, sécrétions vaginales). Les deux autres voies de transmission se font par la voie sanguine (transfusion ou partage de seringues contaminées) ; et de façon verticale de la mère à l'enfant (grossesse, accouchement ou allaitement). Schématiquement, plus la charge virale est élevée dans le liquide contaminant, plus le risque de transmission est important. C'est notamment sur ce corrélat que se basent les nouvelles stratégies de Prophylaxie Pré-Exposition (PrEP) développées dans le paragraphe « 1.2.6. Prophylaxie Pré-Exposition : PrEP ».

a. La phase de primo-infection

La phase de primo-infection correspond aux premières semaines qui suivent l'entrée du virus dans l'organisme. Dans les cas les plus communs de transmission sexuelle, le VIH traverse l'épithélium de la muqueuse génitale ou rectale en quelques heures. De façon paradoxale, la mise en place de la réponse immunitaire va fournir au virus les cellules cibles lui permettant sa réplication au niveau local. Ainsi, le VIH va se multiplier intensivement dans les lymphocytes T CD4+ activés qui affluent, produisant environ 10^9 à 10^{10} virus par jour, et détruisant une quantité à peu près équivalente de lymphocytes T CD4+. Cette déplétion massive et précoce en lymphocytes T CD4+ concerne surtout les compartiments muqueux, et principalement le GALT (gut-associated lymphoid tissue, Tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale). Pendant cette phase qui est dite « d'éclipse » et qui dure une dizaine de jours, la charge virale (CV) plasmatique est indétectable ⁶⁰.

Etude bibliographique - Le VIH et la vaccination

Deux à six semaines après la contamination, le virus va migrer vers les ganglions lymphatiques, puis disséminer vers les organes lymphoïdes. Cela se traduit par une augmentation très rapide de la CV plasmatique, pouvant aller jusqu'à 10^7 copies/mL, et une diminution transitoire des lymphocytes T CD4+ sanguins (Figure 13). A ce moment, la présence de l'antigène viral p24 est détectable avec un test ELISA de quatrième génération, avant que les anticorps ne soient déjà présents. Cette phase dite « aiguë » de l'infection, s'accompagne dans 50 à 60% des cas de manifestations cliniques non spécifiques, correspondant généralement à un syndrome pseudo-grippal. A la fin de cette phase, du fait de la mise en place de la réponse immunitaire cellulaire et de l'épuisement des cellules cibles activées, on observe une chute considérable de la virémie ($< 1\ 000$ copies/mL) et inversement, le taux de lymphocytes T CD4+ augmente. Les réservoirs viraux sont constitués dès la primo-infection, avec l'intégration du virus dans le génome des cellules hôtes. Cette phase instaure aussi une activation immunitaire ou inflammation chronique associée au VIH dont les effets délétères pour de nombreux organes (cœur, os, vaisseaux, reins) sont à l'origine de différentes co-morbidités liées au VIH.

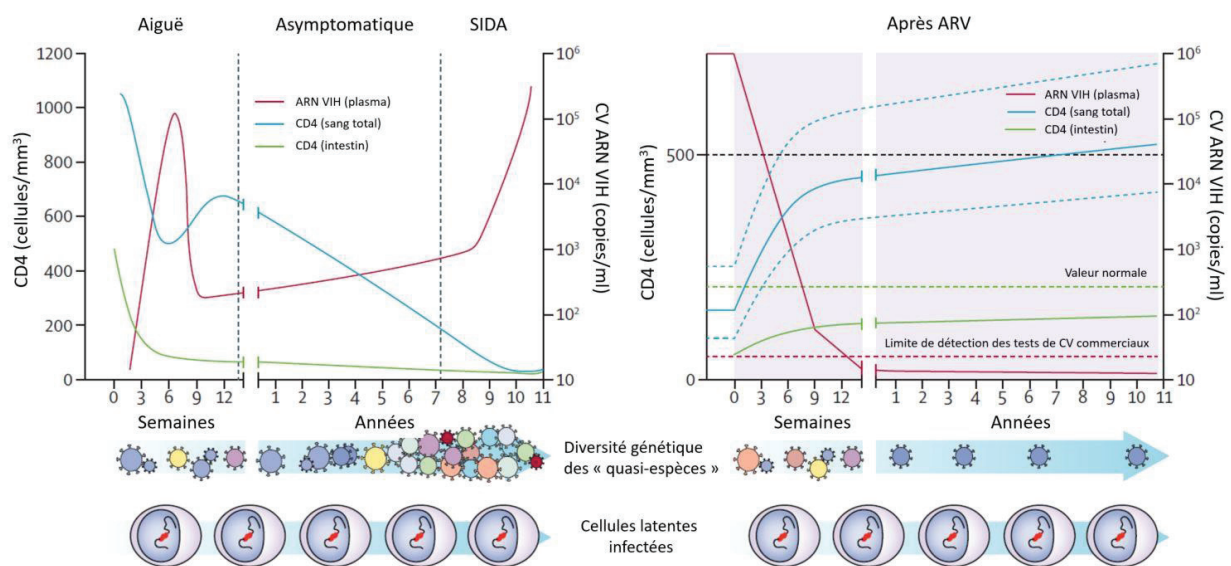


FIGURE 13 : EVOLUTION DE LA CHARGE VIRALE (CV) DU VIH ET DU NOMBRE DE CD4 PENDANT L'INFECTION AU VIH APRES LA TRANSMISSION (A GAUCHE) SOUS TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL (ARV, A DROITE).

En l'absence d'ARV, plus la CV est élevée, plus la destruction lymphocytaire est intense et plus le passage du stade asymptomatique vers le stade SIDA sera rapide. Inversement, en présence d'ARV, plus la CV est faible, plus la reconstitution immunitaire est renforcée, avec une diminution des résistances et moins de progression de la maladie. La mesure de la CV plasmatique permet d'estimer la progression de la maladie et constitue un marqueur précoce et prédictif de l'évolution clinique. Adapté de Maartens *et al.* ⁶¹

b. Phase de latence clinique ou asymptomatique

Environ 12 semaines après l'infection, la mise en place de la réponse immunitaire cellulaire provoque l'entrée dans la phase de latence clinique, souvent asymptomatique et pouvant durer entre 2 et 12 ans. Pendant cette phase, la réplication virale est inhibée par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CD8) qui détruisent les cellules cibles infectées, et les anticorps anti-VIH qui limitent la fixation du VIH aux CD4. Cette phase est caractérisée par une augmentation constante ou légèrement progressive de la CV plasmatique, généralement de < 1 000 à > 100 000 copies/mL.⁶⁰ La valeur de CD4 initialement stable, voire proche de la normale (~ 1000 cellules/mm³) va progressivement diminuer (environ 50-100 cellules/mm³ par an). Ils sont continuellement renouvelés jusqu'à l'altération des organes lymphoïdes, rompant ainsi l'équilibre précaire qui s'était créé entre la réplication virale et la réponse immunitaire.

c. Phase symptomatique aboutissant au stade SIDA

Ce stade correspond à l'augmentation de la CV plasmatique et à l'effondrement du système immunitaire (CD4 < 200 cellules/mm³). L'infection symptomatique est caractérisée par des maladies opportunistes mineures (candidose orale) ou majeures (pneumocystose, toxoplasmose, tuberculose, CMV...). Elle peut aussi entraîner des maladies tumorales (sarcome de Kaposi lié à HHV-8, lymphome B lié à EBV), ainsi que des encéphalopathies à VIH. L'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) a élaboré une classification clinique en 4 stades de l'infection à VIH (stade 1 pour asymptomatique, puis stades 2, 3 et 4 en fonction de la gravité des maladies). En l'absence de traitement antirétroviral (TAR), l'évolution naturelle de l'infection à VIH aboutit au décès de quasiment tous les patients, en moyenne 8 à 10 ans après la primo-infection.

2.5. Patients dits « non classiques »

En parallèle des patients qui ont une pathogénèse dite classique, deux groupes d'individus ont montré des propriétés intéressantes suite à leur contact avec le VIH.

Le premier sous-groupe concerne des personnes séronégatives malgré l'exposition répétée au virus. Ces personnes, nommées Exposés Non Infectés (ENI), ont été décrites pour la première fois au Kenya. Cette étude concernait des prostituées qui étaient restées séronégatives pour 14% d'entre elles, après trois ans de pratiques à risque⁶².

Le deuxième groupe concernent les patients appelés «contrôleurs du VIH» (elite controllers en anglais) qui contrôlent l'infection en l'absence de TAR sur une très longue période : ils contrôlent naturellement la réplication du virus et maintiennent un niveau de CD4 élevé ^{63,64}. Ces patients HIV controllers pourraient représenter un état de « guérison fonctionnelle » de l'infection par le VIH. Ils correspondent à moins d'1% des personnes infectées par le VIH.

La connaissance des mécanismes permettant le contrôle prolongé de la réplication du VIH est un enjeu majeur dans le développement des stratégies thérapeutiques et prophylactiques. Des données obtenues dans la cohorte française des patients HIV controllers mettent en évidence le rôle d'une forte réponse lymphocytaire TCD8 anti-VIH spécifique et polyfonctionnelle, capable d'éliminer les cellules infectées chez un grand nombre de patients. Plusieurs points restent à l'étude : les mécanismes qui conduisent au contrôle du virus chez les patients qui n'ont pas une forte réponse TCD8, ainsi que l'évolution clinique et immunovirologique à long terme de ces patients.

2.6. Prophylaxie Pré-Exposition : PrEP

Grâce aux avancées sur la recherche des ARV, les personnes infectées suivant le traitement ont un risque quasi nul d'atteindre le stade SIDA. Les combinaisons actuelles d'ARV agissent à différentes étapes du cycle répliatif, et le traitement est plus efficace en trithérapie afin d'éviter l'apparition de mutants. Bien que la trithérapie permette de diminuer la charge virale jusqu'à la rendre indétectable, cela n'est toujours pas une stratégie curative à cause des réservoirs latents du VIH.

Cependant, la trithérapie a montré un bénéfice important dans les stratégies de prévention. En effet, comme dit précédemment, il a été démontré que plus la charge virale est basse, moins il y a de risques de transmission. A partir de ces résultats des essais cliniques ont été mis en place pour tester la Prophylaxie Pré-Exposition, PrEP.

a. Bénéfices de la PrEP

La PrEP consiste à proposer un traitement antirétroviral de manière préventive à des personnes non infectées par le VIH. Le médicament utilisé dans la plupart des essais de PrEP est le Truvada[®]. C'est la combinaison de deux antirétroviraux hautement actifs contre le VIH :

l'emtricitabine et le ténofovir disoproxil fumarate connus pour leur efficacité et leur faible toxicité dans le traitement des personnes vivant avec le VIH. Les antirétroviraux administrés bloquent la réplication du VIH et empêchent ainsi le virus d'infecter les cellules. Ils empêchent, en cas d'exposition, une contamination par le VIH mais pas par les autres IST.

Plusieurs villes ont testé ces programmes de prévention, principalement aux Etats-Unis et en Europe : Paris est ainsi la première capitale européenne à avoir lancé en 2012 un programme visant à diminuer les nouvelles infections dans les groupes les plus à risque. Ces progrès dans la prévention reposent sur des essais cliniques, et en particulier sur les résultats de deux études : PROUD, réalisée en Angleterre, et l'essai franco-canadien ANRS IPERGAY1 mené avec l'association AIDES. Ce dernier est un essai de PrEP "à la demande", la PrEP est prise au moment de l'exposition aux risques sexuels. Il a été mené chez des hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH) séronégatifs ayant déclaré des comportements à risque dans les six mois précédant l'inclusion. Cet essai a connu plusieurs phases. Lancée en 2012, la première phase d'ANRS IPERGAY a été réalisée en double aveugle (la moitié du groupe a pris par voie orale le Truvada®, au moment des rapports sexuels, l'autre un placebo). Elle a montré que pris au moment des périodes d'activité sexuelle, le Truvada® diminuait de 86 % le risque d'être infecté par le VIH ⁶⁵. Dans sa seconde et dernière phase : tous les participants de l'étude ont reçu le Truvada®, afin de s'assurer du maintien du bénéfice de la PrEP "à la demande" et de sa tolérance sur une plus longue période et vérifier également son impact sur les comportements sexuels. Cette nouvelle étude, ANRS PREVENIR, a débuté en mai 2017. En mai 2018 il y avait 1435 volontaires, parmi ceux-ci 44% prennent la PrEP quotidiennement et 53% à la demande. A ce jour, il n'a été observé aucun cas d'infection par le VIH, ni chez les personnes prenant la PrEP de manière continue ni chez celles ayant choisi le schéma de prise à la demande.

b. Contraintes de la PrEP

Depuis juillet 2017, des génériques de la combinaison sont disponibles et les personnes sous PrEP peuvent en bénéficier. Malheureusement, certains patients se sont vus délivrer le générique du ténofovir seul, à la place du générique de la combinaison (Truvada®). L'efficacité préventive de la prise de cette seule molécule n'a pas été démontrée pour l'instant, et son utilisation dans le cadre de la PrEP pourrait potentiellement exposer un utilisateur. Dans

d'autres cas isolés, ce sont même des molécules différentes qui ont été délivrées au patient, comme le darunavir et l'abacavir (pour laquelle une réaction d'hypersensibilité potentielle est connue). Ces substitutions ne semblent s'être produites que pour des combinaisons prescrites dans le cadre de la PrEP, et non pas chez des personnes vivant avec le VIH. Heureusement ces erreurs semblent exceptionnelles.

Le problème majeur de la PrEP réside dans l'observance du traitement. En effet, deux recherches (Voice et Fem-PrEP) n'ont pas réussi à démontrer l'efficacité de plusieurs schémas de PrEP chez des femmes d'Afrique australe, car la majorité d'entre elles n'avaient pas suivi les indications, voire n'avaient pas pris le traitement ⁶⁶.

De plus, le fait de prendre des ARV pendant de longues années s'accompagne de comorbidités plus fréquentes : infarctus du myocarde, en raison d'une fréquence accrue de facteurs de risque cardio-vasculaire, cancers, diabète, complications rénales, ostéoporose et ostéonécrose aseptique...

Un autre paramètre à prendre en compte est la généralisation de la PrEP. En effet, aucune étude comparative adéquate et bien contrôlée n'a été menée chez des femmes enceintes. A ce jour, il est recommandé que les femmes enceintes ne prennent du Truvada[®] que si les bienfaits potentiels sont supérieurs aux risques potentiels pour le fœtus. Si une personne non infectée tombe enceinte durant son traitement par Truvada[®] en PrEP, il faudra étudier attentivement la situation pour savoir si l'utilisation de Truvada[®] doit être poursuivie, en tenant compte du risque potentiellement accru d'infection par le VIH-1 durant la grossesse.

Au vu de ces effets secondaires, de l'affaiblissement du corps à cause d'un traitement antirétroviral sur de longues années, et du fait que ce n'est pas généralisable à l'ensemble de la population la PrEP est une bonne alternative temporaire, mais possède certaines limites.

2.7. Défis du développement d'un vaccin contre le VIH

Le développement d'un vaccin anti-VIH-1 fait face à de nombreux défis, dont (i) le cycle de vie du virus qui favorise l'établissement rapide d'infections chroniques difficiles à éliminer, (ii) la grande diversité et la structure de la glycoprotéine d'enveloppe limitant la capacité à produire des anticorps neutralisants à large spectre, et (iii) le tropisme du virus pour les cellules T helpers facilitant l'infection, la propagation et la persistance du virus dans l'organisme ⁶⁷.

Etude bibliographique - Le VIH et la vaccination

Un tel vaccin doit être capable d'induire une immunité durable, de prévenir de l'infection, de réduire la réplication du virus et de la transmission virale. Depuis presque 30 ans, de nombreux candidats vaccins ont été développés. Ils incluent des vaccins vivants atténués, des vaccins inactivés, des VLPs (*Virus-like Particles*), des vaccins ADN, des vaccins sous-unitaires, des vaccins à base de vecteurs viraux ⁶⁸.

Cependant, un seul essai clinique chez l'homme a permis d'observer un niveau de protection, certes modeste, mais statistiquement significatif : l'essai RV144. L'essai RV144 a été supervisé par l'armée américaine et le ministère thaïlandais de la santé publique et il offrait la première et unique protection (31,2%) d'un vaccin anti-VIH ⁶⁹.

En plus de la réponse anticorps dont on connaît désormais l'efficacité préventive chez l'animal, la réponse T-spécifique contribue également à contrôler l'infection par le VIH-1. Il a été notamment observé lors de la primo-infection que la chute de la réplication virale coïncide avec l'apparition des CTL (Cellules T cytotoxiques). La déplétion des CTL chez le singe infecté de manière aiguë ou chronique par un SIV induit une augmentation de la charge virale. De plus, de la même façon que les anticorps neutralisants, les CTL induisent une pression de sélection qui favorise l'émergence de nouveaux variants viraux. En effet, les CTL réussissent à contrôler la réplication virale des premiers virions mais ils montrent des difficultés à contrôler les variants produits dans le temps ⁷⁰. C'est pourquoi les recherches sur un vaccin préventif contre le VIH sont également orientées vers une réponse T cytotoxique neutralisante ⁷¹.

2.8. Etat des lieux des essais cliniques vaccinaux anti-VIH

Les essais d'efficacité ont été de loin les étapes les plus importantes pour le développement d'un vaccin contre le VIH. En mai 2018, on estimait à presque 10 000 volontaires recrutés pour la seule année 2018 (Figure 14). Ce chiffre n'inclut donc pas les essais clôturés, mais bien les essais en cours, qui pour certains ont débuté en 2016/2017.

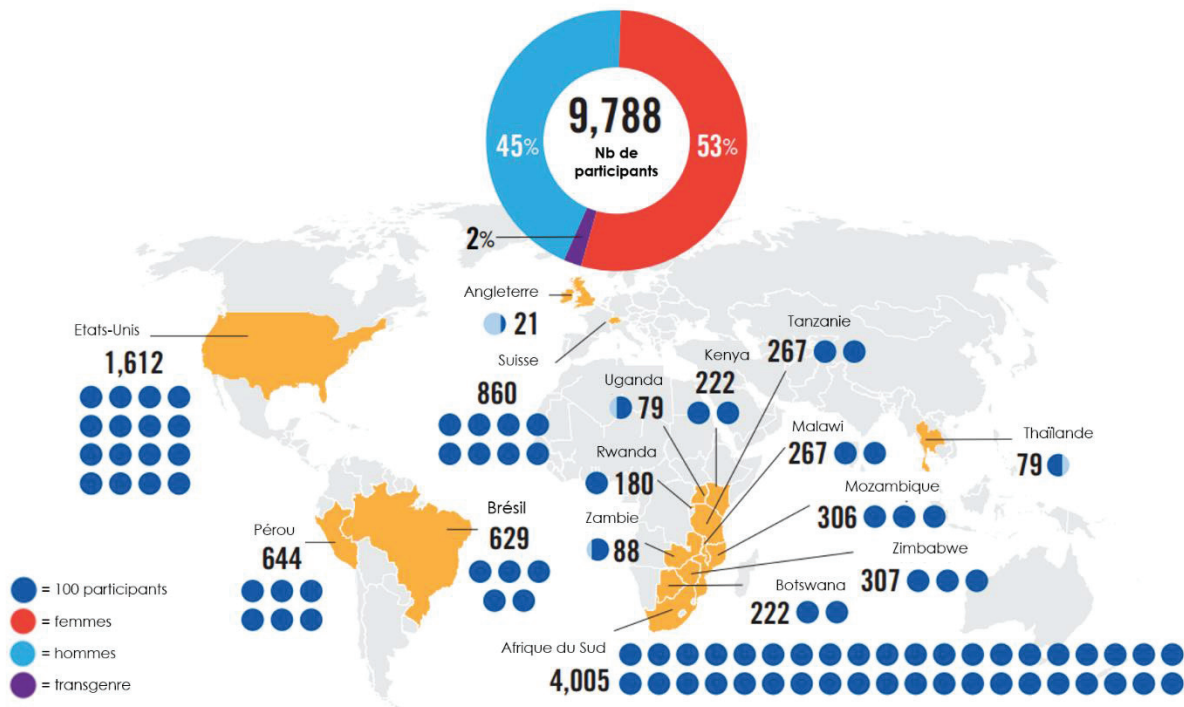


FIGURE 14 : NOMBRE DE PARTICIPANTS RECRUTES EN 2018 POUR LES ESSAIS CLINIQUES VACCINAUX. ADAPTE DE AVAC, MAI 2018.

a. Historique des essais d'efficacité

Les deux premiers essais, l'un chez les couples discordants aux États-Unis et l'autre chez les toxicomanes par voie intraveineuse en Thaïlande, ont testé un vaccin de type protéique sous-unitaire avec la gp120 recombinante dans le but d'induire des anticorps protecteurs^{72,73}. Malheureusement, la glycoprotéine d'Env gp120 n'a pas réussi à protéger l'une ou l'autre des populations à haut risque.

STEP et Phambili

Deux autres essais, aujourd'hui terminés, ont utilisé l'adénovirus n°5 (Ad5) vectorisant des protéines internes de HIV (Gag, Pol et Nef) afin d'évaluer l'augmentation des lymphocytes T CD8+ cytotoxique (CTL). Ces essais, appelés STEP et Phambili, ont été réalisés chez des hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH) aux États-Unis et chez des couples hétérosexuels en Afrique du Sud. Les deux essais ont été arrêtés précocement par leur comité de surveillance car il a été observé une incidence plus élevée à l'infection au VIH chez les vaccinés que les participants non vaccinés ^{74,75}. L'hypothèse la plus largement acceptée pour ces échecs était que les cellules T CD4 + stimulées par le vecteur Ad5 ont servi de cibles préférentielles pour l'infection ⁷⁶.

RV144

Le 5ème essai achevé, RV144, est un essai communautaire de 16 000 participants en Thaïlande. Pour cet essai, la primo-immunisation a été réalisée avec un vecteur recombinant dérivé du poxvirus (ALVAC) suivi d'un rappel avec la gp120 associée à l'adjuvant standard Alum. Cet essai, en utilisant la même glycoprotéine gp120 qui avait été utilisée dans le premier essai thaïlandais visant à tester la protéine gp120 seule, a permis d'induire une protection de 31,2% ⁶⁹. Il est intéressant de noter que le candidat vaccin semble avoir atteint un taux de protection de 60,5% au cours des six premiers mois, mais cette protection temporaire s'est atténuée avec la contraction rapide de la réponse anticorps ⁷⁷. Des analyses des lymphocytes T CD4 + ont révélé que ces lymphocytes T induits par le vaccin RV144 étaient relativement peu sensibles à l'infection par le VIH ⁷⁶, phénomène qui a probablement contribué à son potentiel de protection. Ces résultats encourageants ont permis d'identifier certains corrélats de protection tels que la présence d'anticorps IgG dirigés contre les régions variables V1/V2, et à l'inverse la présence d'anticorps IgA sériques anti-gp120 est associée au taux d'infection ^{78,79}.

HVTN702 et HVNT705

Il y a actuellement deux essais d'efficacité en cours se déroulant en Afrique du Sud (HVTN 702 et HVTN 705). L'essai HVTN 702 teste les conditions utilisées dans l'essai thaïlandais RV144, mais avec des immunogènes clade C (sous-type présent en Afrique du Sud). Le deuxième essai

Etude bibliographique - Le VIH et la vaccination

en cours, HVTN 705, teste quatre séquences de vecteurs mosaïques Ad26 suivies d'un rappel avec la gp140 trimérique (Figure 15). Tous les immunogènes utilisés à ce jour ont été bien tolérés avec une réactogénicité locale légère à modérée et un effet secondaire systémique limité.

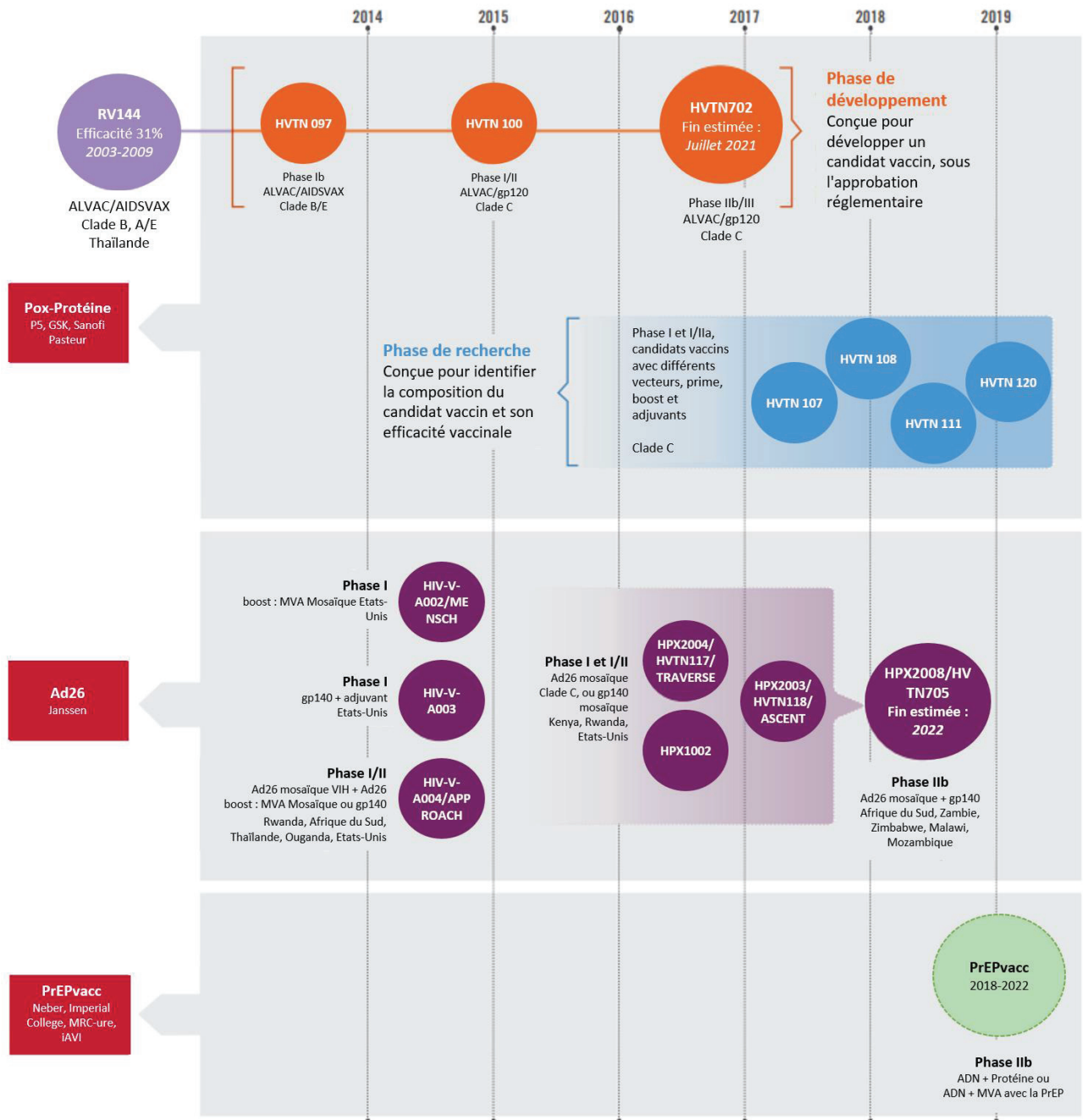


FIGURE 15 : CHRONOLOGIE DES ESSAIS D'EFFICACITE DES CANDIDATS VACCINS DEPUIS 2014 ET PREVUS JUSQU'A 2019. ADAPTE DE AVAC, MAI 2018.

b. Anticorps neutralisants et glycoprotéines d'Env

L'ensemble des connaissances actuelles indique qu'il est nécessaire d'induire des anticorps multifonctionnels à large spectre pour protéger de l'infection par le VIH. Les approches vaccinales traditionnelles n'étant pas capables d'induire d'anticorps neutralisants à large spectre (bnAbs) suffisamment puissants contre le VIH-1, de nombreuses stratégies vaccinales sont étudiées afin d'induire ces bnAbs (Figure 16). À ce jour, les avancées majeures pour l'induction des bnAbs concernent le développement de différentes glycoprotéines d'enveloppe.

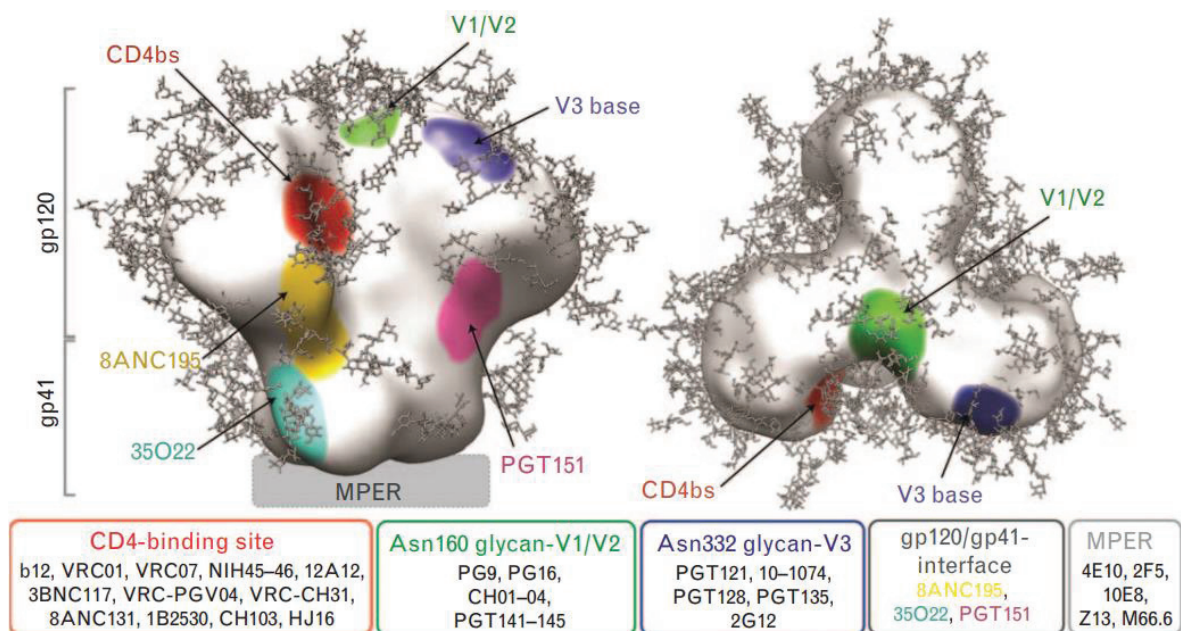


FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA GLYCOPROTEINE D'ENV DU VIH-1 ET DES REGIONS CIBLEES PAR LES ANTICORPS NEUTRALISANTS.

La localisation des épitopes est établie selon un code couleur correspondant aux différents site de vulnérabilité de l'enveloppe virale : le site de liaison au CD4 en rouge, la région V1/V2 en vert, le supersite site de la région V3 en bleu, la région MPER en gris, et l'interface gp120/gp41 (8ANC195, PGT151, 35O22). Les chaînes de glycanes sont représentées en gris, selon leur position sur la BG505 SOSIP Env⁸⁰.

2.9. Les différentes protéines d'Env utilisées comme immunogènes

a. gp160

La gp160 trimérique correspond à la forme native de Env. Elle a été exprimée sur des particules pseudo-virales (VLP) et sur les membranes plasmiques de cellules infectées par un vecteur ou transfectées par l'ADN. Elle est utilisée pour présenter au système immunitaire les formes de liaison aux récepteurs conformationnellement intactes d'Env. La gp160, est une protéine transmembranaire qui subit une dénaturation lorsqu'elle est purifiée et peut être toxique pour les cellules eucaryotes et ne pas être stable dans les vecteurs viraux. Cependant, lorsqu'elle est exprimée par l'ADN, elle amorce des réponses de Tier-1 et transitoirement des réponses de Tier-1b et Tier-2^{81,82}. Pour rappel, quatre sous-groupe de virus sont définis⁸³ : les virus de Tier 1A qui ont une sensibilité élevée, ceux de Tier 1B ont sensibilité supérieure à la moyenne, les Tier 2 ont une sensibilité modérée, et les Tier 3 ont une faible sensibilité à la neutralisation par les anticorps. Lors du développement d'un vaccin nous cherchons à développer des réponses neutralisantes contre des virus au moins de Tier 2.

La réponse immunitaire déclenchée par la gp160 est en grande partie due à la gp41, notamment la région immunodominante (IDR) de la gp41⁸⁴, une zone très conservée qui permet l'action d'anticorps non-neutralisants protecteurs (pnnAb)⁸⁵⁻⁸⁷. L'IDR est une cible privilégiée car il y a peu de mutations susceptibles de favoriser l'évasion⁸⁸.

b. gp150

La gp150 trimérique, est une forme tronquée de la gp160 à son extrémité C-terminale. La gp150 est transmembranaire et c'est la seconde forme la plus proche de la forme native d'Env pour induire des bnAb et des pnnAb. La troncature élimine les séquences toxiques permettant sa production dans des vecteurs viraux stables⁸⁹. La troncature améliore également la présentation de trimères Env sur les VLP et les membranes plasmiques en raison de la délétion des domaines d'endocytose⁹⁰. Comme la gp160, la gp150 induit des nAbs hétérologues de tier-1 mais avec un faible titre, ainsi que des tier-1b et tier-2 de façon transitoire^{81,82}. De même, comme la forme native de la gp160, la réponse immunitaire est largement due à la gp41 et son IDR.

c. gp140 SOSIP et non SOSIP

Les gp140 SOSIP sont des formes trimériques clivées et stabilisées par un pont disulfure, elles présentent les formes de liaison au récepteur de la gp120 de façon native^{91,92}. Les SOSIP sont une avancée majeure dans le développement d'immunogènes pertinents pour la vaccination contre le VIH car c'est la seule forme de protéine purifiée qui conserve une forme de liaison de CD4 native d'Env. Les SOSIP sont produites dans des cellules en culture et purifiées pour être utilisées comme immunogènes protéiques. Les gp140 non SOSIP sont également utilisées comme immunogènes. Les tentatives de stabilisation des formes Env de gp140 non SOSIP, en supprimant le site de clivage entre la gp120 et la gp41, peuvent entraîner des glycoprotéines d'Env ayant perdu leur structure native⁹³. Des études ont récemment mis en évidence le potentiel des SOSIP dans les essais vaccinaux. Sanders et coll. ont immunisé des lapins avec des trimères de BG505 SOSIP.664 dont le variant BG505 est un virus de tier-2. Tous les lapins ont développé une réponse nAbs contre le virus autologue BG505 mais également contre des virus hétérologues tier-1^{94,95}.

Les SOSIP induisent des nAbs hétérologues de tier-1, ainsi que des nAbs homologues de tier-1b et tier-2 tandis que les trimères non SOSIP stimulent principalement les réponses hétérologues de tier-1 et des pnnAb⁹⁶.

d. gp120 monomérique

Dans différents essais vaccinaux les monomères de gp120 ont induit des nAbs de tier-1 et dirigés contre la boucle V3. Du fait d'une mauvaise liaison au CD4 soluble, la gp120 n'a pas été efficace pour déclencher des anticorps bloquants les CD4 sur les Env natives. L'un des corrélats de protection qui a été déterminé lors de l'essai RV144 était la présence d'anticorps dirigés contre la boucle V1V2 de la gp120, qui, dans cette étude, semblait avoir été provoqués principalement par un composant particulier de la gp120 bivalente⁹⁷. La plupart des gp120 ne permettent pas d'induire des Ab contre la boucle V1V2⁸². Cependant, la gp120 induit systématiquement des Ab contre la région C1 de Env, qui est une cible pour les ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps)⁹⁷. De ce fait, la gp120 est généralement utilisée pour stimuler les réponses déjà enclenchées lors d'une primo-immunisation avec de l'ADN ou des vecteurs. Toutefois, un essai clinique a quand même été initié avec la gp120, mais sous forme pentavalente. Cet essai a montré une certaine protection attribuée au pnnAb⁹⁸.

e. gp41

Récemment, un vaccin exposant les épitopes du peptide de fusion de la gp41 s'est distingué en étant le premier à augmenter le nombre de bnAb chez des PNH⁹⁹. Lors de cette expérience, le peptide de fusion était administré avant de faire des rappels avec la BG505.SOSIP. Ils ont pu mettre en évidence que les vaccins à base d'épitopes peuvent induire des anticorps neutralisants contre cet épitope et que l'extrémité N-Term du peptide de fusion est un site prometteur pour un futur vaccin contre HIV.







f. Immunogènes stimulants les lignées germinales

En partenariat avec l'iAVI, des travaux sont en cours pour mettre au point un candidat vaccin conçu de manière à induire des précurseurs de lignées germinales. L'idée développée est que si un anticorps neutralise le virus, il faut concevoir le vaccin pour qu'il développe cet anticorps. C'est le principe de la « vaccinologie inverse ». Le groupe de Burton a utilisé, après analyse *in vitro*, un immunogène ciblant la lignée germinale basé sur la région du domaine externe de la gp120 du VIH. Cette stratégie a été nommée « ingénierie du domaine externe », ou eOD (engineered outer domain). Grâce au ciblage de la lignée germinale et aux hypermutations somatiques, une large population de cellules B mémoires sera mise en place et pourra être restimulée plus tard¹⁰⁰. Cet immunogène s'auto-assemble en nanoparticules, l'eOD-GT8 60 mer, et un essai clinique en phase I a débuté en juin 2018 pour tester sa sécurité, sa tolérabilité et son immunogénicité sur 48 volontaires adultes sains (séronégatifs)¹⁰¹. La capacité du candidat vaccin à amplifier le réservoir de cellules B capables de produire des anticorps de la lignée germinale contre le site de liaison du CD4, va être évaluée.

g. Immunogènes ciblant le site de liaison du CD4

Une autre approche pour déclencher les bnAb contre le site de liaison du CD4 est d'utiliser des Env de virus qui ont infecté et déclenché des bnAb chez des patients. Un des patients le plus étudié est un individu sud-africain (CH0505) qui a été suivi du moment de l'infection jusqu'au développement de bnAb contre le site de liaison du CD4. Ce virus de clade C a été utilisé sur des VLPs afin d'observer si la vaccination a pu reproduire la génération des nAb autologues survenus lors de l'infection naturelle du patient CH0505^{102,103}.

Etude bibliographique - Le VIH et la vaccination

Formes de Env		Ag caractéristiques	nAb	Commentaires
gp160 trimérique native		<ul style="list-style-type: none"> Expose les épitopes conformationnels reconnus par les bnAb Induit des réponse à long terme gp41-dominante 	tier-1, 1b et 2, tier-2 homologue	<ul style="list-style-type: none"> Utilisée comme primo-immunisation
gp150 trimérique tronquée en C-Term		<ul style="list-style-type: none"> La troncation en C-term peut perturber la conformation de Env Induit des réponses à long terme gp41-dominante 	tier-1, 1b et 2, tier-2 autologue	<ul style="list-style-type: none"> Utilisée comme primo-immunisation ou comme rappel
gp140 trimérique SOSIP ou non-SOSIP		<ul style="list-style-type: none"> Trimère stabilisé qui permet une exposition conformationnelle des épitopes reconnus par les bnAb Diminue l'exposition de V3 L'intégrité des épitopes natifs de la gp140 non-SOSIP dépend spécifiquement de la gp140. 	tier-1 tier-2 autologue	<ul style="list-style-type: none"> Utilisée en protéine purifiée ou exprimée par des vecteurs T/F SOSIPs chez le PNH induit des nAb homologue Le trimère non-SOSIP utiliser chez le PNH induit une réponse nnAbs
gp120		<ul style="list-style-type: none"> Monomère du domaine de liaison au récepteur Induits des fortes réponses V3, souvent pas de réponse V1/V2 Fixation au récepteur CD4 mais n'induit pas de nAb contre le CD4b 	tier-1	<ul style="list-style-type: none"> Utilisée en protéine purifiée ou exprimée par des vecteurs Peut augmenter la réponse nnAb
Immunogène ciblant la lignée germinale		<ul style="list-style-type: none"> Initie la lignée des bnAb Pilote les lignées initiées 	tier-1, 1b, tier-2 homologue chez le PNH, tier-2 dans les modèles murins	<ul style="list-style-type: none"> Utilisé comme protéine purifiée Utilisé comme nanoparticules multimérique Beaucoup de recherche dans ce domaine actuellement
gp41 peptide		Le peptide de fusion induit des bnAb chez le PNH	tier-1, 1b et tier-2 hétérologue chez le PNH	<ul style="list-style-type: none"> Utilisé comme support peptidique dans les stratégies de primo-immunisation /rappel avec SOSIP Utilisé avec les virosomes

TABEAU 2 : LISTE NON EXHAUSTIVE REPRESENTANT LA MAJORITE DES FORMES DES GLYCOPROTEINES D'ENVELOPPE (ENV) DE HIV UTILISEES POUR LES IMMUNISATIONS.

pnnAb : anticorps non-neutralisants protecteurs ; nnAb : Anticorps non-neutralisants ; nAb : Anticorps neutralisants ; bnAb : Anticorps neutralisants à large spectre ; PNH : Primate Non-Humain. Double ligne noire : membrane plasmique ou virale ; V3 : boucle variable 3 de la gp120 de HIV ; V1V2 : boucles variables 1 et 2 qui forment l'apex de Env de HIV ; T/F : virus de variant unique, appelé virus « transmis/fondateur » lors d'une infection ; SOSIP : glycoprotéine d'Env avec un pont disulfure (SOS) et une mutation (Isoleucine-Proline ; IP) qui stabilise le trimère clivé de gp140. Quatre sous-groupe de virus sont définis⁸³ : Tier 1A sensibilité élevée, Tier 1B sensibilité supérieure à la moyenne, Tier 2 modérée, Tier 3 faible sensibilité à la neutralisation par les anticorps. Adapté de Robinson, 2018⁶⁷.

Etude bibliographique - Le VIH et la vaccination

Les nouvelles idées de stratégies d'immunisation reposent sur le fait de combiner ces deux types d'immunogènes en (i) stimulant les anticorps de la lignée germinale, par des immunogènes type eOD, puis (ii) immuniser avec des trimères naïfs, type SOSIP dans un deuxième temps, ce qui favoriserait la mutation et l'évolution des anticorps jusqu'à ce qu'ils neutralisent largement.

La liste des essais cliniques en cours ciblant la glycoprotéine d'Env du VIH est résumé Figure 17.

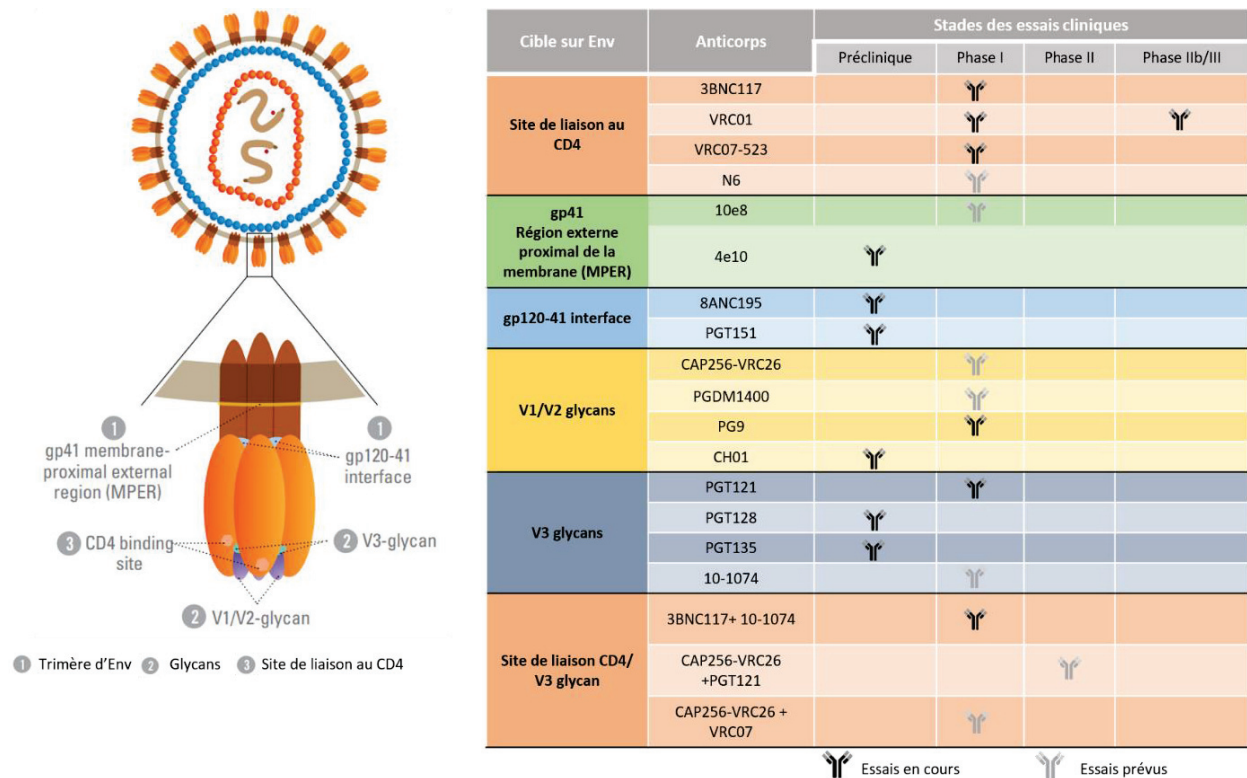


FIGURE 17 : LISTE DES ESSAIS CLINIQUES EN COURS OU A VENIR CIBLANT LA GLYCOPROTEINE D'ENVELOPPE DE VIH POUR LE DEVELOPPEMENT D'UN VACCIN PROPHYLACTIQUE. ADAPTE DE AVAC, MAI 2018.

2.10. Historique du développement des SOSIP

La glycoprotéine d'Env du VIH est la seule protéine virale exposée et, par conséquent, la cible principale des anticorps fonctionnels contre le virus. Env est fortement glycosylée, « masquant » sa détection par le système immunitaire, elle est instable, en constante mutation, et change de forme pour se fixer et infecter les cellules humaines⁹². En utilisant les stratégies classiques de vaccin sous-unitaire avec la glycoprotéine d'Env monomérique, de forts taux d'anticorps ont été obtenus, mais sans neutralisation efficace. D'après plusieurs études, cela est dû au fait que les sous-unités monomériques ne possédaient pas la conformation native du trimère d'Env^{104,105}.

Pour contourner ce problème, un travail d'optimisation de la glycoprotéine d'Env a été fait afin d'obtenir une forme stable du trimère Env. Des mutations ont été introduites, notamment un pont disulfure entre la gp120 et la gp41 (SOS)^{106,107}. En 2002, Sanders et Moore ont développé un trimère d'Env stabilisé appelé gp140 SOSIP¹⁰⁸. Cependant, cette gp140 SOSIP n'a pas été aussi stable qu'attendu.

En 2006, le protocole G, projet recrutant 1 800 volontaires séropositifs en bonne santé dans sept pays d'Afrique, Thaïlande, Australie, Royaume-Uni et aux Etats-Unis, a montré qu'un petit sous-groupe d'individus infectés par le VIH était capable de générer des anticorps neutralisants (nAbs), et cela a permis la découverte, dans un premier temps, de trois anticorps neutralisants : le PG9, le PG16 et le VRC01^{109,110}.

Le nombre d'anticorps neutralisants isolés a atteint en 2016 plusieurs dizaines¹¹¹. Certains de ces anticorps se sont avérés plus efficaces pour neutraliser plusieurs isolats du VIH lors de tests en laboratoire, et ont été nommés anticorps neutralisants à large spectre (bnAbs). En caractérisant génétiquement ces anticorps, il a été déterminé les zones où se fixent ces anticorps au VIH, ce qui a permis d'établir une « carte » des cibles d'anticorps sur le virus qui pourraient être exploitées dans le cas du développement d'un candidat vaccin.

Le nombre réel de bnAbs est difficile à déterminer, mais cinq régions principales d'Env sont reconnues par les bnAbs. Ces cinq régions comprennent le site de liaison du CD4 du VIH, le sommet V1 à V2, le site V3 glycan, la région proximale membranaire et la région interface gp120 / gp41¹¹².

Grâce à la découverte de tous les bnAbs, la structure cristallographique du trimère a pu être déterminée et cela a permis de comprendre comment le stabiliser.

En 2013, Moore, Sanders et leurs équipes ont stabilisé la protéine Env du VIH dans une conformation native, en supprimant une chaîne de 15 acides aminés de leur construction SOSIP précédente et en analysant les protéines Env de nombreux isolats (Figure 18). La nouvelle gp140 stabilisée est nommée BG505 SOSIP, elle est dérivée d'un virus clade A, isolé chez un nouveau-né kenyan qui a par la suite développé des bnAbs⁹¹. Dans des études *in vivo* chez des lapins et des primates non-humains (PNH), la BG505 SOSIP ainsi que la B41 SOSIP.664 (virus fondateur de clade B), ont induit des anticorps neutralisants contre le virus autologue (*i.e* même souche que la séquence utilisée pour synthétiser la SOSIP)⁹⁵. C'était la première fois qu'un antigène montrait une capacité à provoquer une réponse en anticorps neutralisants forte et cohérente contre un virus autologue de Tier 2. Cela a constitué le point de départ pour la conception de vaccins itératifs afin de faire face au problème de la diversité du VIH.

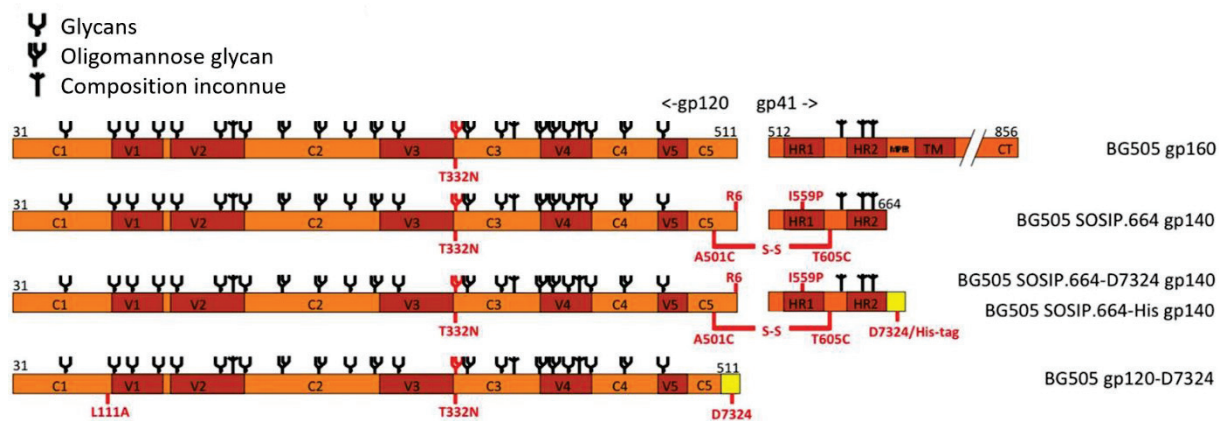


FIGURE 18 : REPRESENTATION LINEAIRE DES PROTEINES ENV BG505 GP160, SOSIP.664 GP140, SOSIP.664-D7324 GP140 ET GP120-D7324.

Les modifications par rapport à la séquence BG505 gp160 originale sont indiquées en rouge. Les modifications suivantes ont été apportées à la séquence d'acides aminés BG505 de type sauvage: (i) les domaines transmembranaire (TM) de la gp41 et la queue cytoplasmique (CT) ont été supprimés pour créer une gp140 soluble; (ii) les substitutions A501C et T605C ont été effectuées pour former une liaison disulfure entre la gp120 et la gp41; (iii) la substitution I559P a été effectuée pour favoriser la trimérisation; (iv) un site de clivage optimal (RRRRRR; R6) remplace le site naturel, REKR; (v) la troncature du MPER à partir du résidu-664 empêche l'agrégation; (vi) la substitution T332N facilite la liaison des bnAbs en fonction du glycan-N332. Les sous-domaines Env sont indiqués : 5 domaines conservés (C1-C5); 5 domaines variables (V1-V5); l'heptade se répète 1 et 2 (HR1, HR2); la région externe proximale de la membrane (MPER); le domaine transmembranaire (TM); et la queue cytoplasmique (CT). Les affectations des glycanes dans Env sont basées sur des études antérieures utilisant gp120, mais peuvent être différentes pour l'Env trimérique. Adaptée de Sanders *et al.* 2013

Etude bibliographique - Le VIH et la vaccination

Aujourd'hui, il existe des dizaines de ces trimères stables, dont certains sont déjà en cours ou en préparation pour des essais cliniques. Un essai de phase I aux États-Unis et au Kenya fera appel à un vaccin utilisant la protéine gp140 BG505 SOSIP.664 comme antigène, avec un adjuvant composé d'un lipide monophosphoryl et d'un immunostimulant exclusif QS-21. Cet essai de phase I est initié par GlaxoSmithKline (GSK).

Deux SOSIP stabilisées doivent entrer en phase I d'essais début 2019, et six autres candidats devraient suivre en 2019 et 2020. Sept de ces huit candidats viennent du laboratoire de Sanders à Amsterdam, l'autre de Shattock ⁹².

Comme souvent, le VIH présente des défis uniques et le développement des bnAbs ne fait pas exception. Tout d'abord, ils se développent rarement - seulement chez environ 20% des individus infectés - et seulement après des années d'exposition au virus en constante mutation. Les anticorps neutralisant largement le VIH sont fortement mutés par suite de plusieurs cycles d'un processus appelé hypermutation somatique. C'est grâce à ce processus que les anticorps accumulent les mutations qui leur permettent de mieux se lier et neutraliser le VIH.

Mais les bnAbs hautement mutés ne sont généralement pas capables de se lier au VIH natif, ce qui crée un autre défi pour les chercheurs de vaccins. Le défi consiste à stimuler les soi-disant anticorps de la lignée germinale qui peuvent se lier au VIH natif, puis à les guider à travers les processus de mutation nécessaires pour devenir des bnAbs. La pensée actuelle est que cela peut nécessiter une vaccination avec une série d'immunogènes, chacun destiné à faciliter l'évolution des anticorps de la lignée germinale vers des anticorps largement neutralisants et, si possible, plus rapidement que ce qui se produit lors de l'infection naturelle.

Pour cela, l'équipe de Haynes tente de recréer le processus de développement des bnAbs en immunisant séquentiellement des volontaires avec quatre gp120 du VIH isolées chez un individu infecté par le VIH, qui a développé des bnAbs, avec l'adjuvant lipidique GLA-SE. Un essai de phase I, connu sous le nom de HVTN 115, recrute actuellement des volontaires pour administrer ce candidat multi-Env appelé CH505 ou EnvSeq-1. La première partie de l'étude vise à trouver la dose optimale de la protéine Env. Dans la seconde partie de l'étude, les chercheurs administreront l'ensemble des Envs séquentielles pour voir si le processus de développement de bnAbs est déclenché. Cet essai recrute des volontaires non infectés et

Etude bibliographique - Le VIH et la vaccination

cherchera aussi à déterminer si l'ajout d'un candidat vaccin ADN, ADN Mosaic-Tre Env, peut améliorer la réponse immunitaire.

Le groupe de Haynes mène également des essais comparant le CH505 produit par transfection stable à celui produit par transfection transitoire, qui est une méthode plus rapide de fabrication d'un vaccin, afin de déterminer si les réponses immunitaires induites sont similaires.

2.11. Les immunogènes de la matrice et de la capside

Les protéines de capside n'étant pas exposées à la surface des virions, peu d'études ont exploré les réponses anticorps induites par l'immunisation avec ces protéines, ni étudié leur potentiel d'inhibition de l'infection VIH.

La protéine précurseur du VIH-1 Gag Pr55, ainsi que les protéines p17 et p24 résultant du clivage du Gag Pr55 par la protéase virale (Figure 19), sont potentiellement de bons candidats pour le développement de vaccin sous-unitaire. La Pr55 est exprimée dans divers systèmes cellulaires et peut s'assembler puis traverser la membrane plasmique pour former des particules de type virus (VLP) très immunogènes^{113,114}. Ces VLP sont non infectieuses et morphologiquement similaires aux particules immatures du VIH et elles stimulent de puissantes réponses cellulaires et humorales. De plus, les VLP sont hautement immunogènes et induisent des réponses Th1 à faible dose¹¹⁴; elles sont relativement stables et peuvent être administrées sans danger aux animaux et à l'Homme¹¹⁵. Il est important de noter que la p17 et la p24 contiennent ensemble la plus forte densité d'épitopes cytotoxiques de lymphocytes T (CTL) du protéome du VIH-1^{116,117}.

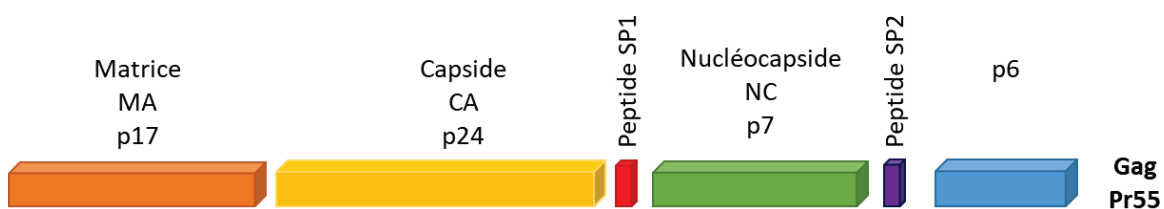


FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE PR55 GAG ET SES DOMAINES CONSTITUTIFS.

Les positions de la matrice myristoylé (MA), capside (CA), nucléocapside (NC), la p6 et les peptides SP1, SP2 au sein du Pr55 Gag non clivé sont indiquées.

Il a été observé que de larges réponses CTL ciblant Gag ont été associées à une faible charge virale chez les personnes infectées par le VIH¹¹⁸⁻¹²⁰, et l'induction des réponses CTL contre Gag pourrait conduire à l'élimination des cellules infectées par le VIH-1 et aider à contrôler la dissémination virale¹²¹. La p17 facilite les associations intra-membranaires nécessaires à l'assemblage et à la libération du virion¹²² et elle participe aussi au transport du complexe de pré-intégration virale dans le noyau¹²³. Il a été montré que les réponses en anticorps contre la sous-unité p17 de Gag pourraient bloquer les effets pathogènes de la p17 extracellulaire^{124,125}.

Etude bibliographique - Le VIH et la vaccination

Il a été montré qu'une réactivité croisée entre p17 et gp41 peut se produire ¹²⁶, et que l'entrée virale pouvait être neutralisée par des anticorps dirigés contre la p17 ¹²⁷. En effet, la séquence de la p17 ELDKWRK, correspond à une fraction de l'épitope d'un anticorps anti-p17 qui neutralise l'entrée du VIH ¹²⁷, le bnAb 2F5, dirigé contre la sous-unité d'enveloppe gp41 du VIH ^{128,129}. Cet anticorps 2F5 reconnaît un épitope ayant la séquence ELDKWAS dans la région externe proximale de la membrane (MPER) de la gp41 ¹²⁹.

Ce pentapeptide, ELDKW, est retrouvé chez la p17 et dans le MPER de la gp41, et il est reconnu par les anticorps neutralisants ciblant ces deux épitopes.

L'intérêt de l'utilisation de la p17 comme immunogène induisant des réponses immunitaires anti-gp41, ainsi que l'optimisation de cet immunogène par des mutations est présenté dans l'article Verrier, Paul, Terrat, Bastide, Ensinas, Phelip *et al.* ¹³⁰

Concernant l'utilisation de la p24, il a été montré que le risque de stade SIDA est augmenté chez les individus présentant des titres décroissants d'anticorps p24 ¹³¹⁻¹³⁴, suggérant que des titres élevés en anticorps anti-p24 pourraient être nécessaires pour maintenir un état sans symptôme.

III. NANOMEDECINE ET SYSTEMES DE DELIVRANCE APPLIQUES A LA VACCINATION

3.1. Les nanoparticules polymériques en vaccination

Les nanoparticules (NP) polymériques sont des systèmes colloïdaux de taille submicronique de polymères naturels ou synthétiques. Les NP polymériques sont fréquemment utilisées comme vecteurs de médicaments, protéines, peptides et acides nucléiques, en raison de leur grande biodisponibilité, de leur libération contrôlée, de leurs propriétés biodégradables et biocompatibles et de leur faible toxicité^{135,136}.

Les NP polymériques sont stables et ont une capacité d'encapsulation et/ou d'adsorption élevée, ce qui réduit le nombre de doses dans l'administration d'un vaccin¹³⁷. En effet, les antigènes peuvent être encapsulés ou adsorbés à l'intérieur ou à la surface des NP. Il a été démontré que l'adsorption de l'antigène à la surface des NP permettait d'induire d'une réponse immunitaire efficace et durable^{138,139}. Les NP polymériques peuvent facilement incorporer des biomolécules hydrophiles et hydrophobes¹⁴⁰. Dans les liposomes, les antigènes hydrophiles ne s'incorporent pas, conduisant à une faible efficacité de chargement et à une fuite rapide des antigènes. En outre, les liposomes ont montré une faible stabilité lors de la conservation par rapport aux NP polymériques biodégradables¹⁴¹⁻¹⁴⁴.

Dans le cas de la vaccination contre différents pathogènes, dont le VIH, il est connu que l'administration de protéines ou de peptides libres n'induit pas de réponse immunitaire suffisante pour protéger. Cela est dû à cause de leur biodisponibilité limitée, de leur courte demi-vie *in vivo* et de leur non-diffusion à travers certaines barrières biologiques. De plus, la dégradation rapide, notamment par des nucléases et des protéases, et l'élimination des antigènes solubles imposent la nécessité d'injections répétées pour atteindre des niveaux efficaces^{145,146}. Pour surmonter cette dégradation, les antigènes peuvent être encapsulés et/ou adsorbés sur des vecteurs nanoparticulaires et sont ainsi protégés contre la dégradation enzymatique prématurée. Ces nanovecteurs modulent donc la libération d'antigène en assurant une administration continue et prolongée pendant une longue période aux CPA grâce à l'effet dépôt, évitant l'utilisation de plusieurs administrations¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

Parmi les particules polymériques, nous avons choisi de sélectionner un polymère déjà approuvé par la FDA afin de réduire les risques de toxicité et d'effets secondaires. Quatre

polymères synthétiques correspondent à ce jour à ce critère : la poly(ϵ -caprolactone) (PCL), le poly(acide lactique co-glycolique) (PLGA), le poly(acide glycole) (PGA) et le poly(acide lactique) (PLA). Parmi ces polymères, le choix du laboratoire s’est porté sur le PLA, car la synthèse des NP ne nécessite pas l’utilisation de solvants toxiques et dont le temps de dégradation est long (1 à 2 ans), permettant ainsi une libération prolongée.

Ce type de particules et leur intérêt en vaccination sont décrits dans une revue, présentée en annexe, que nous avons publiée dans le journal *Vaccines* en 2016⁴¹. Une vue d’ensemble des propriétés des nanoparticules en vaccination en fonction de leur forme, de leur taille, et de leur charge est proposée tableau 3.











Forme			Taille			Charge/hydrophobicité			
									
Sphérique	Ovale	Rugueuse	< 200 nm	200 nm - 3 µm	> 3 µm	Chargée	Neutre	Hydrophile	Hydrophobe
Reconnaissance rapide, phagocytose	Reconnaissance lente, phagocytose	Reconnu le plus rapidement, phagocytose	< 20 nm filtré par les reins	< 1.5 µm ne bouche pas les capillaires sanguins	Bouche les capillaires sanguins	Phagocytose augmente avec la charge	Diminue la phagocytose	Diminue l'adsorption des protéines	Augmente l'adsorption des protéines
Dégradation rapide, une fois internalisée	Dégradation lente une fois internalisée	Dégradation rapide une fois internalisée	> 100 nm accumulée dans la rate, foie et lymphes	> 500 nm les plus prises en charges par les phagocytes	Phagocytose lente	Adsorption différentielle des protéines	Diffusion efficace à travers les membranes muqueuses	Augmente le temps de circulation	Diminue le temps de circulation
			20-100 nm temps de circulation long	Cross-présentation augmentée Faible dégradation lysosomale	Filtration foie et reins avec effets toxiques Reste dans les tissus	Augmente l'interaction avec les cellules		Diminue la phagocytose	Augmente la phagocytose

TABLEAU 3 : INTERET DES NANOPARTICULES EN VACCINATION ET INFLUENCE DE LEUR FORME, TAILLE ET CHARGE. ADAPTE DE HOTALING ET AL.¹⁵⁰

3.2. Les particules de poly(acide lactique) (NP PLA)

Bien que les vecteurs viraux soient considérés comme plus efficaces, les véhicules non viraux reçoivent de plus en plus d’attention car ils sont plus sûrs, plus polyvalents, et possèdent une facilité de préparation et d’amélioration. Dans ce contexte, des études confirment la valeur ajoutée des particules en tant que système de transport, capable d’induire une réponse immunitaire puissante.

Le PLA est un polymère hydrophobe et biodégradable par hydrolyse *in vitro* et *in vivo* des fonctions esters en résidus d’acide lactique (Figure 20), qui sont intégrés dans le cycle cellulaire de Krebs pour être potentiellement éliminés en CO₂. Le profil de biocompatibilité et de biodégradabilité du PLA est bien connu puisqu’il est utilisé depuis de nombreuses années en tant que matériaux de suture résorbable et de système de délivrance de principes actifs.

La fonction cellulaire n'est pas transformée suite à la prise en charge d'acides lactiques, tant que leur apparition et donc la vitesse de dégradation du polymère reste modérée.

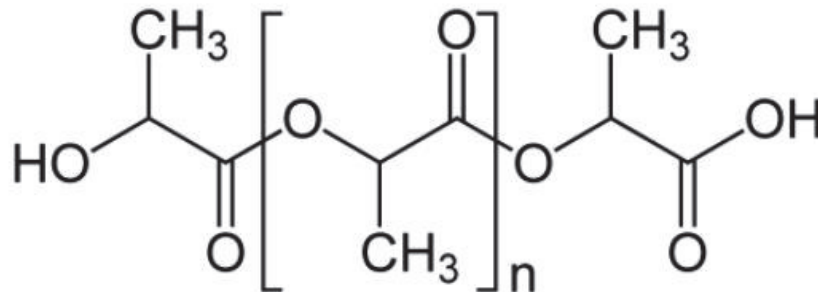


FIGURE 20 : STRUCTURE CHIMIQUE DU POLY(ACIDE LACTIQUE)

De nombreux facteurs influencent la vitesse de dégradation de ces particules de PLA tels que le ratio de monomères LA, la morphologie du polymère (cristallin *versus* amorphe) la dimension des particules, la masse molaire, etc ¹⁵¹. 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 ¹⁵².

Les particules ayant une taille comprise entre 20 et 200 nm sont de préférence adsorbées par les cellules dendritiques, par l'intermédiaire d'un mécanisme de pinocytose, tandis que les macrophages absorbent des particules plus grandes, de 0,5 à 5µm, par macropinocytose ou phagocytose ⁴¹. Les particules plus petites (20-200 nm) ont été trouvées dans des CPA des ganglions lymphatiques, ce qui suggère un drainage libre vers les lymphocytes.

Les particules à base de PLA sont largement étudiées en tant qu'outil vaccinal par leur capacité à libérer de façon prolongée des antigènes et/ou des adjuvants tout en étant dégradées à plus ou moins long terme par l'organisme, évitant les risques d'accumulation. De plus, ces particules sont capables de délivrer des peptides et des protéines à des tissus spécifiques et d'aider les CPA à déclencher une forte réponse immunitaire ¹⁵³⁻¹⁵⁵.

Les particules de PLA permettent une présentation vers le CMH-II et une libération prolongée de l'antigène. Ces particules de PLA ont été largement décrites pour leur intérêt en vaccination contre des pathogènes tels que *Bacillus anthracis* ¹⁵⁶, VIH ^{41,157-162}, *Clostridium tetani* ¹⁶³⁻¹⁶⁵, Influenza ¹⁶⁶, ou le virus de l'hépatite B ¹⁶⁷.

3.3. Système de délivrance : Hydrogels

Les hydrogels sont parmi les matériaux les plus utilisés pour obtenir des formes pharmaceutiques à libération contrôlée d'un médicament. Ils sont formés par des polymères hydrophiles qui vont retenir les molécules d'eau et se gonfler, formant des réseaux tridimensionnels (réseaux 3D). Cette réticulation des chaînes de polymères peut se produire par la formation de liaisons covalentes, hydrogène, d'interactions de Van der Waals ou pour des raisons physiques ¹⁶⁸.

Du fait de leur contenu important en eau, les hydrogels présentent des propriétés analogues à celles des tissus biologiques, et plus particulièrement des matrices extracellulaires, ce qui leur confère *a priori* un bon potentiel de biocompatibilité ^{169,170}.

L'application la plus classique de cette propriété des hydrogels permet la formulation de produits dit « gélifiants *in situ* » qui se présentent (i) sous la forme d'une solution hors condition physiologique et (ii) qui réticule en réponse aux conditions physiologiques du site d'administration afin de former une inclusion semi-solide ¹⁷¹. Cette inclusion de matériel semi-solide et biocompatible peut ensuite, selon ses caractéristiques physicochimiques, servir différents objectifs, notamment (i) une action physique (*e.g.*, séparation de tissus, maintien d'une cavité, obstruction à une circulation) ¹⁷²⁻¹⁷⁴ ou (ii) une action chimique (*e.g.*, relargage contrôlé d'actif) ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Une combinaison de ces deux actions est également possible ¹⁷⁸. La capacité de gélification *in situ* en réponse à la température est particulièrement intéressante car elle permet de proposer des formulations liquides à température ambiante dont la manipulation (*e.g.*, prélèvement, transfert) et l'administration (*e.g.*, injection, étalement) seront facilitées tout en formant une surface de contact optimale avec le tissu au site d'administration. L'augmentation de viscosité concomitante à l'administration permet d'assurer un temps de résidence prolongé, accompagné de propriétés de relargage modulables ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. De plus les composés enchâssés dans la structure polymérique sont protégés de la dégradation enzymatique en condition physiologique ce qui améliore leur stabilité, particulièrement celle des composés peptidiques.

Les poloxamers

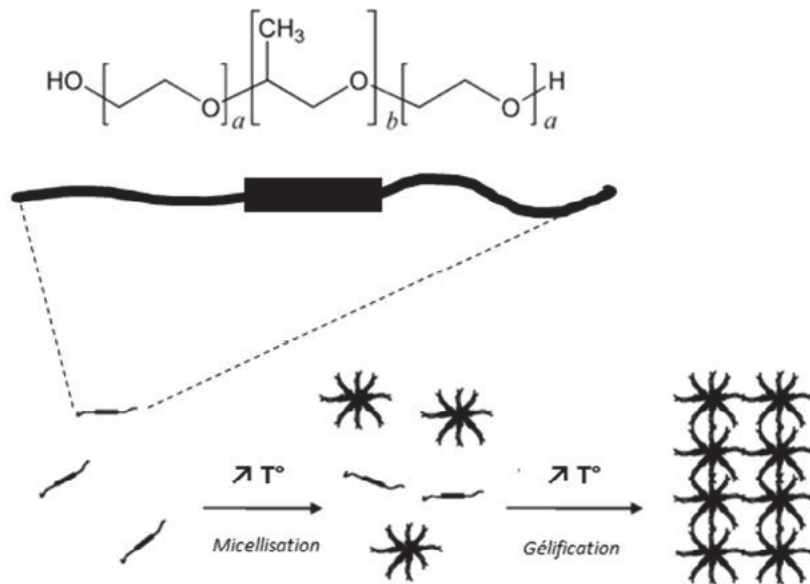
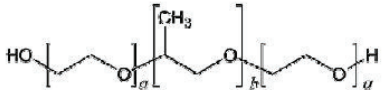


FIGURE 21 : MECANISME DE TRANSITION D'ETAT PROPOSE POUR LES SOLUTIONS AQUEUSES THERMOGELIFIANTES DE POLOXAMER. ADAPTE DE DUMORTIER ET AL. 2006.

Les poloxamers sont des polymères amphiphiles formant des solutions aqueuses thermogélifiantes par réticulation de type physique. Cette réticulation étant, de fait, réversible, les hydrogels de poloxamers sont qualifiés de thermoréversibles. Ces polymères, développés dans les années 1970¹⁷⁹, font l'objet de nombreuses publications et d'applications variées, notamment dans le domaine de la santé. De plus, l'existence d'une monographie générale à la Pharmacopée Européenne facilite leurs applications pharmacotechniques et cliniques.

Structurellement, les poloxamers sont des copolymères linéaires triblocs formés d'un bloc polyoxypropylène central (PPO) flanqué de deux blocs de polyoxyéthylène (PEO). Le bloc PPO, exhibant des résidus méthyls, confère à la partie centrale de la molécule de poloxamer des propriétés hydrophobes tandis que les blocs PEO latéraux sont relativement hydrophiles. En solution aqueuse, les molécules de poloxamer forment, du fait de leurs propriétés amphiphiles des structures de type micelle. L'augmentation de la température, favorisant les interactions polymère-polymère au détriment des interactions eau-polymère (*i.e.*, liaisons hydrogène), provoque l'agrégation des micelles sous forme d'un hydrogel thermoréversible

(figure 21). Il existe plusieurs types de poloxamers qui se différencient par le nombre de répétitions (i) d'oxyéthylène et (ii) d'oxypropylène dans leurs chaînes PEO et PPO, respectivement. Afin de distinguer les poloxamers, on leur attribue un numéro à trois chiffres dont (i) les deux premiers forment un nombre qui multiplié par 100 donne le poids moléculaire moyen du bloc PPO et (ii) le dernier multiplié par 10 donne le pourcentage massique de la molécule représenté par les blocs PEO. Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur les poloxamers 407 et 188, qui sont les plus largement décrits et utilisés dans des applications relatives à la santé humaine. Le tableau 4 détaille les caractéristiques structurales de ces deux poloxamers en particulier.

	<i>a</i>	<i>b</i>	Masse moléculaire moyenne (<i>g.mol⁻¹</i>)
	Poloxamer 188	80	27
Poloxamer 407	101	56	9840 - 14600

TABEAU 4 : CARACTERISTIQUES STRUCTURELLES DES POLOXAMERS 188 ET 407

Le poloxamer P407 exerce une modulation significative de la fonction immunitaire et favorise l'action de nombreux antigènes. Le mécanisme reste inconnu, mais des études ont émis l'hypothèse que le gel de poloxamer augmente la biodisponibilité de l'antigène grâce à ses caractéristiques thermoréversible et de promotion de la stabilité ¹⁸⁰. De plus, une action immunomodulatrice spécifique a été démontrée dans de nombreuses études.

Les poloxamers présentent des propriétés qui en font des produits très intéressants en galénique ¹⁸¹. Leur nature amphiphile leur confère d'excellentes capacités de solubilisation vis-à-vis d'un grand nombre d'actifs. Cette propriété est mise à profit pour les formulations dont le volume d'administration est limité ¹⁸⁰.

Parallèlement, les propriétés bioadhésives des poloxamers, peuvent être exploitées pour augmenter le temps de résidence des formulations au site d'action. L'effet concomitant des deux propriétés précitées conduit à une amélioration de la biodisponibilité ¹⁸⁰. De plus les poloxamers sont largement reconnus pour leurs propriétés de relargage modulables ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Afin d'optimiser ces propriétés galéniques intéressantes, la tendance actuelle montre une

complexification des systèmes galéniques proposés avec notamment (i) le mélange de poloxamers entre eux ou avec d'autres polymères afin d'optimiser les propriétés rhéologiques des formulations ^{182,183} et (ii) l'inclusion de transporteurs (liposomes, particules) permettant d'améliorer le contrôle du relargage et le ciblage thérapeutique ^{170,171,184}.

Au cours des dernières années, la conception de systèmes innovants d'administration de médicaments à base de polymères par l'application de la gélification *in situ* a reçu une attention considérable. Cet intérêt a également été suscité par les avantages que présentent ces systèmes par rapport aux systèmes classiques d'administration de médicaments.

La formation *in situ* d'un hydrogel polymère présente l'avantage d'une action prolongée, d'une fréquence d'administration réduite, de la possibilité de solubiliser des principes actifs peu solubles ou hydrophobes, de l'administration de macromolécules biologiques labiles (hormones, protéines et gènes ¹⁸⁵).

PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE

L'ensemble des connaissances actuelles indique qu'il est nécessaire d'induire une réponse immunitaire à large spectre et notamment des anticorps multifonctionnels pour protéger de l'infection par le VIH. Les approches vaccinales traditionnelles n'étant pas capables d'induire des anticorps neutralisants à large spectre (bnAbs) suffisamment puissants contre le VIH-1, de nombreuses stratégies vaccinales sont étudiées afin d'induire ces bnAbs. À ce jour, les avancées majeures pour l'induction des bnAbs concernent le développement des (i) glycoprotéines d'enveloppe optimisées comme immunogène, (ii) vecteurs qui transportent et présentent l'immunogène de manière efficace et (iii) la forme galénique qui permettrait d'augmenter la durabilité de la réponse protectrice.

Les particules à base d'acide poly-lactique sont largement étudiées en tant qu'outil vaccinal pour leur capacité à libérer de façon prolongée des antigènes et/ou des adjuvants tout en étant dégradées à plus ou moins long terme par l'organisme, évitant les risques d'accumulation. De plus, ces particules sont capables de délivrer des peptides et des protéines à des tissus spécifiques et d'aider les CPA à déclencher une forte réponse immunitaire ¹⁵³⁻¹⁵⁵. Les travaux précédents du laboratoire ont permis de concevoir un véhicule de vaccination polyfonctionnel, à base de particules 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 les adjuvants standards, l'Alum ou le MF59 ^{158,159}.

La formation *in situ* d'un hydrogel polymérique présente l'avantage d'une action prolongée, d'une fréquence d'administration réduite, de l'administration de macromolécules biologiques labiles (hormones, protéines et gènes ¹⁸⁵). Le poloxamer P407 exerce une modulation significative de la fonction immunitaire et favorise l'action de nombreux antigènes. Le mécanisme reste inconnu, mais des études ont émis l'hypothèse que le gel de poloxamer augmente la biodisponibilité de l'antigène grâce à ses caractéristiques thermoréversible et de promotion de la stabilité ¹⁸⁰.

L'objectif de ce travail a été triple :

1. Concevoir une stratégie de vaccination inductrice de réponses immunitaires anti-VIH-1, en formulant différentes glycoprotéines d'Env du VIH-1 à la surface des particules de PLA (gp41, gp140 et gp140 BG505 SOSIP).
2. D'augmenter le pouvoir adjuvant des particules biodégradables par un gel thermoréversible biocompatible. Ce travail a été fait avec un antigène modèle, la p24 (Gag) du VIH-1 afin d'établir la preuve de concept.
3. D'évaluer la biodistribution des particules de PLA par tomographie optique de fluorescence sur un organisme entier, selon la voie d'administration. Il est logique de s'attendre à une biodistribution différentielle en fonction de la voie d'administration. Cependant, jusqu'à récemment, les techniques d'analyses nécessitaient une mise à mort à chaque temps de cinétique et le prélèvement d'organes. Il était donc impossible de suivre sur le même animal la biodistribution au cours du temps, et d'acquérir des résultats sur le corps en entier. Pour ce travail nous avons utilisé des particules fluorescentes et suivi dans le modèle murin la biodistribution et la dégradation des particules dans le temps.

Cette stratégie expérimentale nous permet ainsi de tester plusieurs hypothèses :

- La plus-value de l'adsorption des glycoprotéines d'Env : même s'il a été montré par l'équipe ou dans la bibliographie que l'adsorption des immunogènes permettait d'induire une plus forte réponse immunitaire que la forme libre, il est nécessaire de valider ce concept pour chaque nouvelle formulation. En effet, l'adsorption des immunogènes sur les particules peut potentiellement « cacher » les épitopes induisant les réponses immunitaires souhaitées. Et ceci est d'autant plus vrai avec les glycoprotéines d'Env qui sont des protéines complexes.
- La valeur ajoutée de l'utilisation de particules contenues dans un gel thermoréversible : l'effet dépôt des particules est bien connu, mais il est important de développer une forme vaccinale qui nécessite un relargage prolongé afin d'avoir le moins d'immunisations possibles et donc une bonne couverture vaccinale par la population.
- L'influence de la voie d'administration : afin de développer un vaccin efficace et protecteur il est primordial de connaître la biodistribution naturelle des particules de PLA.

Résultats

- 1. Adsorption de la BG505 SOSIP du VIH-1 sur les particules de PLA et évaluation *in vivo* de la réponse immunitaire induite**
Article 3 - en cours de rédaction - en collaboration avec l'équipe fournissant la BG505 SOSIP
Expérience NHP en cours - Résultats finaux en juillet 2019
- 2. Etude de la biodistribution *in vivo* des particules de PLA en tomographie selon leurs voies d'administration**
- 3. Développement d'un gel thermosensible contenant des particules de PLA : caractérisations *in vitro* et évaluation de leur potentiel immunostimulant *in vivo* contre l'antigène p24**
Article 2 - Soumis

I. Adsorption de la BG505 SOSIP du VIH-1 sur les particules de PLA et évaluation *in vivo* de la réponse immunitaire induite

1.1. Optimisation de l'adsorption de la BG505 SOSIP sur les NP de PLA

a. Synthèse des nanoparticules de PLA

Les particules sont synthétisées par la méthode de nanoprecipitation¹⁸⁶, une méthode sans tensio-actif. Cette synthèse nécessite l'utilisation de deux phases miscibles : une phase organique dans laquelle le PLA est soluble, et une phase aqueuse dans laquelle il précipite. Le polymère est dissous en acétone (ratio polymère/acétone à 2% m/v) et la solution est placée dans une ampoule à décanter (Figure 22). Une solution aqueuse composée d'un mélange eau/éthanol est placée dans un ballon en verre sous agitation magnétique fixée à 250 RPM. La phase organique est coulée goutte à goutte dans la phase aqueuse. Les solvants (acétone et éthanol) sont éliminés sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 30°C. La dispersion colloïdale finale dans le ballon est composée de NP de PLA dans l'eau.

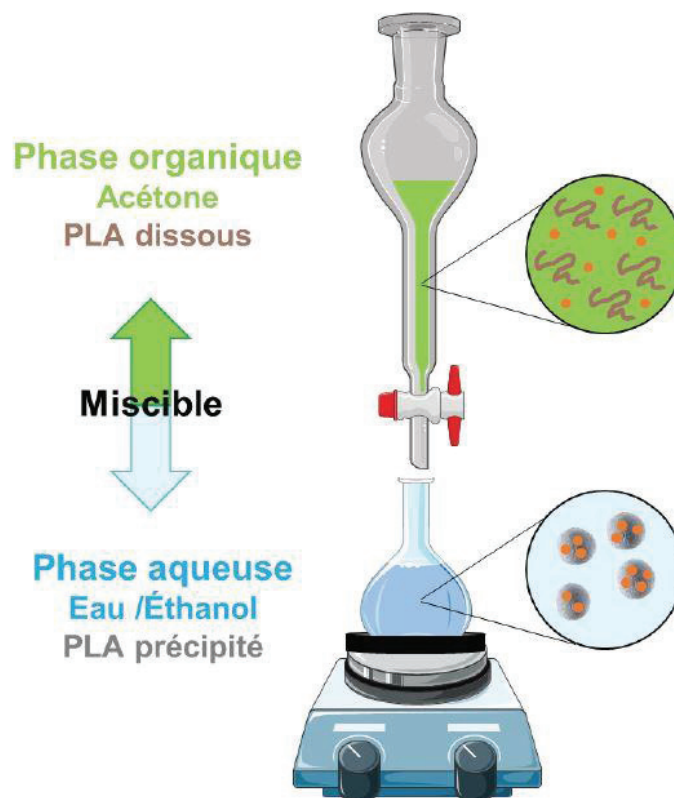


FIGURE 22 : ILLUSTRATION DE LA SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES PAR NANOPRECIPITATION

b. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules de PLA

Le taux de solide, correspondant à la concentration massique de la solution de particules, est calculé par la pesée, en triplicat, de 100 µL de particules en suspension puis sèches (après une nuit dans une étuve à 56°C).

Le diamètre hydrodynamique et l'indice de polydispersité des particules sont déterminés à 25°C par diffusion dynamique de la lumière dans une solution de particules diluées dans 1 mM de NaCl par un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument). Cet appareil est équipé d'un laser He/Ne opérant à 633 nm permettant de déterminer le diamètre des particules en suspension. Quatre mesures indépendantes sont réalisées pour obtenir les valeurs moyennes de diamètre hydrodynamique et d'indice de polydispersité.

c. Mise au point de l'adsorption des glycoprotéines d'Env

Avant d'utiliser la BG505 SOSIP, j'ai travaillé avec différentes glycoprotéines d'enveloppe qui sont la gp140 CN54 (Polymun) et deux gp41 (fournies Wilfried Weissenhorn et Christiane Moog). J'ai optimisé le protocole d'adsorption avec ces glycoprotéines avant de travailler avec la BG505 SOSIP. Le travail fait avec la gp140 et les gp41 est présenté en annexe. La mise au point faite sur ces deux types de glycoprotéines, qui ont un poids moléculaire et un nombre de glycosylation très différents, m'a permis d'appréhender plus rapidement l'adsorption de la BG505 SOSIP.

d. Adsorption de la BG505 SOSIP sur les nanoparticules de PLA

Depuis de nombreuses années nous travaillons dans l'équipe d'accueil sur les nanoparticules de PLA et sur leur fonctionnalisation avec différents immunogènes à leur surface. Les protocoles d'adsorption à la surface des particules sont largement maîtrisés mais ont besoin d'être adaptés à chaque immunogène de par les caractéristiques physico-chimiques propres à chacun. Pour la mise au point de l'adsorption avec la BG505 SOSIP je me suis donc appuyée sur les résultats obtenus avec les différentes glycoprotéines d'Env. Pour cela, j'ai analysé plusieurs conditions qui sont résumées dans le tableau 5. J'ai travaillé avec différentes concentrations de NP de PLA (2 mg/mL, 1 mg/mL et 0,5 mg/mL), qui avaient des tailles initiales différentes (200 nm, 186 nm et 137 nm), ainsi que différentes concentrations de BG505 SOSIP (100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL et 25 µg/mL).

Résultats - Adsorption de la BG505 SOSIP du VIH-1 sur les particules de PLA

Les critères définis comme primordiaux pour valider une formulation après adsorption sont :

(i) une augmentation modeste de la taille des NP, (ii) un indice de polydispersité faible (inférieur à 0,2) et (iii) un pourcentage d'adsorption le plus élevée possible.

Concentration NP (mg/mL)	Concentration SOSIP (µg/mL)	Taille NP avant adsorption (nm)	Durée adsorption	Taille NP après adsorption (nm)	Indice de Polydispersité	Potentiel Zêta (mV)	Pourcentage d'adsorption (%)	Rendement absorption (mg/g)
2	100	137	2h	153	0,13	-47,8	48,6	3,11
			2h	180	0,17	-47,1	45,2	8,34
	100	137	2h	186	0,19	-44,2	60,2	13,04
			2h	241	0,35	-47	54,0	8,73
1	75	186	1h	214	0,30	-48,2	63,5	11,62
			2h	765	0,56	-49,5	63,5	11,84
	50	200	2h	1211	0,62	-49,2	64,0	11,93
			2h	191	0,24	-48,4	37,3	3,31
	25	137	2h	162	0,14	-51	47,3	3,2
			2h	150	0,11	-51,7	74,9	3,33
0,5	100	137	1h	146	0,12	-51,2	52,4	2,27
			2h	230	0,23	-40,3	51,4	18,94
	75	137	2h	1193	0,65	-32	51,0	16,5
			1h	746	0,66	-37,3	63,6	23,26
	50	137	2h	347	0,43	-45,8	31,7	5,62
			2h	211	0,25	-48,6	40,5	5,48
	25	137	2h	152	0,13	-51,3	78,4	6,98
			1h	159	0,14	-50,9	49,7	4,31

TABLEAU 4 : TABLEAU RECAPITULATIF DES FORMULATIONS TESTEES LORS DE LA MISE AU POINT DE L'ADSORPTION DE LA BG505 SUR LES NP DE PLA

Résultats - Adsorption de la BG505 SOSIP du VIH-1 sur les particules de PLA

Si l'on regarde plus précisément les résultats obtenus, Tableau 4 et Figure 23 :

- La taille des NP après adsorption est plus petite avec 1 mg/mL de PLA
- L'indice de polydispersité est plus faible avec 1 mg/mL de PLA
- Le pourcentage d'adsorption est plus élevé avec 1 mg/mL de PLA
- Le rendement d'adsorption est meilleur lorsque la BG505 SOSIP est à 100 µg/mL

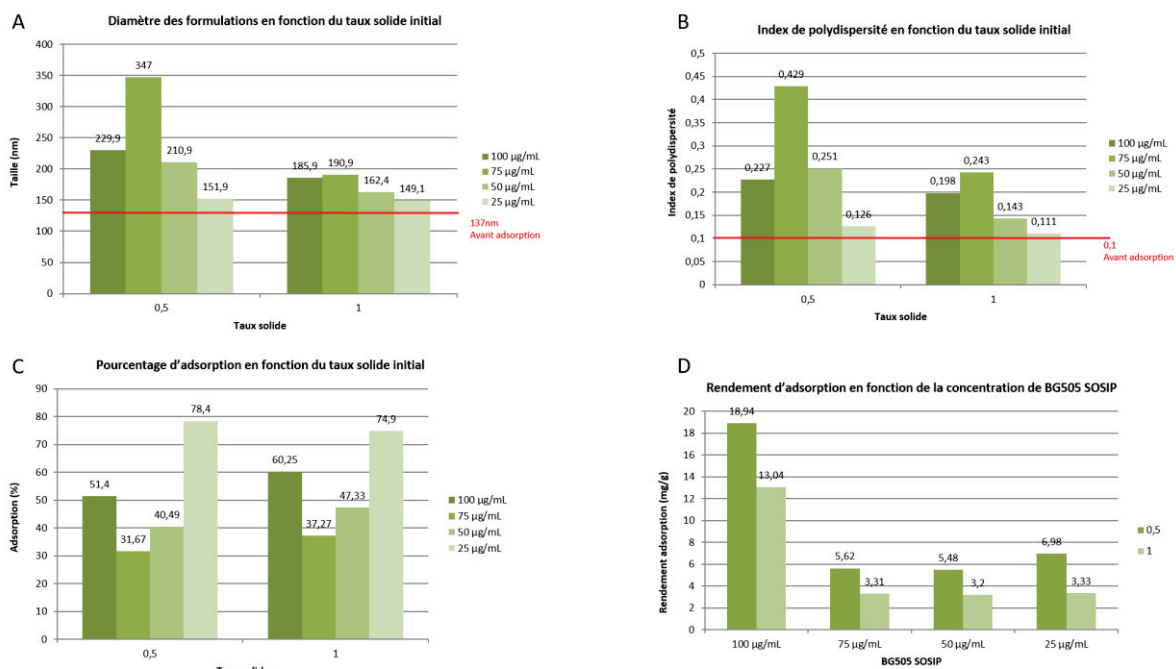


FIGURE 23 : OPTIMISATION DE L'ADSORPTION DE LA BG505 SOSIP SUR LES NP DE PLA

Au vu de ces résultats, nous avons choisi de formuler pour la suite de nos expériences avec 100 µg/mL de BG505 SOSIP et 1 mg/mL de PLA. Il est important de noter que ces valeurs sont les concentrations initiales lors de la formulation.

e. Protocole définitif de l'adsorption de la BG505 SOSIP sur les NP de PLA

La BG505-SOSIP est diluée à 100 µg/mL et les NP de PLA à 1 mg/mL dans du PBS 1X. Les solutions de protéines et de particules sont mélangées volume à volume et incubées deux heures à température ambiante sous agitation. 350 µL de solution sont centrifugés deux fois 10 minutes à 10 000 x g pour déterminer la quantité de protéine non attachée aux particules par dosage µ-BCA (ThermoFisher). L'absorbance des échantillons est mesurée à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La taille des particules, l'indice de polydispersité ainsi que le potentiel Zêta après adsorption (NP-BG505 SOSIP) sont mesurés à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Les particules et la BG505 SOSIP étant diluées volume à volume lors

du processus d'adsorption nous obtenons des formulations avec des concentrations finales de 0,5 mg/mL de PLA et 50 µg/mL de BG505 SOSIP.

Au vu de tous ces résultats, qui ne sont pas tous représentés ici, nous avons pu mettre au point un processus simple et reproductible d'adsorption de la BG505 SOSIP sur les NP de PLA. Il est important de rappeler que la BG505 SOSIP a un haut poids moléculaire (346 kD) et un fort taux de glycosylation, c'est donc une glycoprotéine d'Env très complexe à adsorber.

1.2. Antigénicité de la BG505 SOSIP sur les NP de PLA – Article

Nous avons accès à la BG505 SOSIP grâce à une collaboration développée avec le Pr. Ralf Wagner, en Allemagne. L'équipe de Ralf Wagner produit et purifie la BG505 SOSIP. Avec cette collaboration nous avons pu mettre au point les adsorptions, comme décrit précédemment, et nous avons cherché à déterminer l'antigénicité de la BG505 SOSIP après adsorption. En effet, même si nous avons obtenu des formulations reproductibles, avec un pourcentage d'adsorption de l'ordre 60%, il est important de connaître les épitopes exposés et de savoir si la structure « native-like » de la BG505 SOSIP est conservée. L'équipe de Ralf Wagner travaille sur la production de glycoprotéines d'Env et de leurs caractérisations, notamment par MicroScale Thermophoresis (MST), qui est une technique puissante et bien établie pour l'analyse des interactions moléculaires ¹⁸⁷. La technique de MST permet de mesurer les constantes d'affinité et offre plusieurs avantages, notamment une faible consommation d'échantillons, une acquisition rapide des données, aucune limitation de la taille des molécules et la capacité de mesurer les affinités en solution ¹⁸⁸. L'ensemble des résultats obtenus grâce à cette collaboration est en cours de soumission.

Studying HIV-Envelope protein interactions with increasing antigen complexity using MicroScale

Thermophoresis

Authors: Benjamin Zimmer¹, Corinna Kuttenger², Capucine Phelip⁴, Tobias Fischer¹, Anna Gabele¹, Veronika Grassmann¹, Clemens Entzian², Saskia Schmidt², Maximilian G. Plach², Bernard Verrier⁴, David Peterhoff¹, Thomas Schubert^{2#}, Ralf Wagner^{1,3#}

¹Universitätsklinikum Regensburg

²2bind GmbH, Regensburg

#corresponding authors:

- Ralf Wagner, Universitätsklinikum Regensburg, Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg Germany

- Thomas Schubert, 2bind GmbH, Am BioPark 11, 93053 Regensburg, Germany, email: schubert@2bind.de

Running Head: "MicroScale Thermophoresis in Vaccine Characterization"

Abstract

The crucial step in developing an effective HIV-1 vaccine is the ability of the vaccine to induce a protective antibody response. However, the induction of neutralizing antibodies against circulating HIV (Tier 2 viruses) by active immunization using soluble monomeric gp120 or non-cleaved gp140 ("pseudotrimers") Env proteins in all human vaccine efficacy trials failed to induce Tier 2 neutralizing Ab responses. Novel approaches use nanoparticles to increase the protective response. It is, however, essential that the antigenicity profile of Env immunogens is preserved, when presented on the surface of nanoparticles. Furthermore, it is reasonable to test if Env immunogens - soluble or nanoparticle-presented - retain their antigenicity profile in physiological conditions, such as serum. Therefore, powerful technologies are required, allowing for characterization of complex antibody-antigen interactions, ideally also under close-to-native conditions. Using a five-member Env/V3 chimeric model library and the monoclonal antibody 447-52D, we demonstrate that MicroScale Thermophoresis (MST) fulfills these requirements and is a potent biophysical method to characterize interactions between broad neutralizing antibodies (bNAbs) and Env proteins presented at different complexities.

Key Words: binding assay; dissociation constant; Antibody-Antigen interactions; MicroScale thermophoresis; ELISA, binding affinity, HIV, Envelope protein

1. Introduction

Today, various methods are available for the affinity analysis of interacting molecules, thereby providing information on binding mechanisms and binding kinetics. These include enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), allowing for measuring equilibrium binding affinity, and surface plasmon resonance (SPR) or biolayer interferometry (BLI) based approaches, which are additionally able to measure binding kinetics. Furthermore, calorimetric methods measure the reaction enthalpy and thereby provide information about dissociation constants and stoichiometry (for example isothermal titration calorimetry (ITC)). This study focuses on MicroScale Thermophoresis (MST), which represents a powerful and well-established technique for the analysis of molecular interactions (PMC1750914). MST measures affinity constants in the binding equilibrium and provides several further advantages, including low sample consumption, fast data acquisition, no limitation in respect to molecule size, and the ability to measure affinities in solution and under native-like conditions, such as serum (PMC3148787).

The optical based in solution method MST utilizes the physical phenomenon of thermophoresis, which describes the directed movement of molecules in a temperature gradient, which is in this case established by an infrared laser (see Fig. 1A). Thermophoresis depends on molecule size, charge, and the hydration shell. Since at least one of these parameters is affected by the binding of an interaction partner, this technique can be used to distinguish unbound and bound states and hence determine the equilibrium binding affinities of molecular interaction partners at microliter scale (PMID:22130996 PMID:28986788). As a detection prerequisite, molecules either have to be fluorescently labeled or intrinsically fluorescent, such as proteins with one or several tryptophan residues. Fluorescence within the observation window is monitored over time (see Fig. 1B). Initial fluorescence is typically monitored over five seconds before laser activation. Switching on the laser initializes a steep drop of the fluorescence signal, reflecting temperature dependent changes in the quantum yield of the fluorophore. After this phase, called Temperature Jump or T-Jump, thermophoresis forces molecules to leave the observation window, leading to a decrease of

overall fluorescence until thermophoresis is counterbalanced by mass diffusion. Thermophoresis is terminated upon deactivation of the laser. Ultimately, back-diffusion of molecules and reverse T-Jump result in increase of fluorescence in the observation window. In a typical MST experiment, a serial dilution of the ligand is prepared and mixed with a constant concentration of labeled target molecule to establish different ratios of the binding partners. The samples are loaded into capillaries and analyzed in the instrument by subsequent scanning of each capillary. The resulting movement profiles (MST time traces) of the different ratios of interaction partners are plotted in one graph (see Fig. 1C). Plotting the corrected normalized fluorescence (ΔF_{norm}) against ligand concentrations and subsequent curve fitting results in binding graphs and corresponding affinity values (see Fig. 1D). As an example, the interaction analysis of 447-52D to the gp120 Env/V3 chimera HXB2 in buffer is shown in Fig. 1C and D.

Since MST has the potential to measure interactions starting from small molecules up to big complexes and further, as well as to analyze interactions under native-like conditions, we considered MST to be an interesting technique for the analysis of HIV envelope glycoprotein (Env) vaccine candidates. Induction of a protective antibody response against the viral envelope glycoprotein (Env) is considered a crucial step in developing of an effective HIV-1 vaccine (PMC5389599). The viral Env protein is a trimer of heterodimers and the only viral component present on the surface of HIV-1 virions. Therefore, it is the sole target for a neutralizing antibody response. Env is expressed as an extensively glycosylated gp160 precursor polypeptide that is proteolytically cleaved into non-covalently linked gp120/gp41 subunits by serin proteases of the Furin family. Three gp120/gp41 protomers assemble into a functional Env trimer, a metastable complex mediating host cell entry by a series of complex receptor-triggered conformational changes (PMC5299501, PMC4586835). The metastability of Env together with high sequence variability, extensive glycosylation and conformational masking are part of the HIV immune evasion strategy to overcome the humoral immune response in infected individuals (PMC4586835, PMC5538809, PMC4584300). However, during the course of infection, a large proportion of infected individuals develop neutralizing antibodies with some degree of cross-reactivity and up to 15-30% develop cross-protective broadly neutralizing antibodies (bNAbs), some with the capacity to neutralize up to 80-90% of viruses (PMC4380704). BNAbs typically arise 3 years or longer after infection and often exhibit one or more unusual features like high levels of somatic hypermutation in complementary determining regions (CDRs), long heavy-chain third CDRs (HCDR3s) and polyreactivity (PMC3126191, PMC4042313), as a result of co-evolution between humoral immune response and viral escape (PMC4249098, PMC4068799). To date, a large number of bNAbs have been identified and high resolution crystal and cryo-electron microscopy enabled the identification of different, often quaternary-structure depending bNAb target sites, including the membrane-proximal external region (MPER), CD4 binding site, gp41-gp120 interface, apex of variable loop 2 (V2), base of variable loop 3 (V3) with associated glycans and the glycosylated outer domain (OD-glycan) (PMCS454186, PMC4834917,

PMC4437463). In passive immunization studies with nonhuman primates (NHP), bNAbs provided complete protection from infection (PMC2674935, PMC115078), however, up to date, all human vaccine efficacy trials failed to induce neutralizing antibody responses against circulating HIV (Tier2) viruses after active immunization (PMC3371689, PMID:20192810). However, most of the early vaccine trials were performed with soluble monomeric gp120 or non-cleaved gp140 ("pseudotrimers") Env proteins, which are now known to present non-neutralizing epitopes usually hidden in the functional trimer spike or are not able to present quaternary-structure-dependent epitopes. Since the failure to induce Tier 2 NAb responses has been associated with the difficulty to present critical epitopes in the context of the native Env spike, stabilized gp140 trimers presenting a native-like conformation became increasingly important in HIV-vaccine design (PMC5299501, PMC5483234). One of the main features of these native-like trimers is their high thermostability. Moreover, they fulfill the desired property of binding bNAbs, while they show no or reduced binding to non-neutralizing antibodies, as determined by different biophysical and biochemical assays (ELISA, SPR, BLI, ITC) (PMC3777863, PMC4067080, PMC4580201, PMC5299501).

Furthermore, with the intention to elicit more durable and broader neutralizing Ab responses, Env immunogens have been presented on different kinds of nanoparticles (e.g. liposomes, virus-like particles (VLPs), poly(lactic acid) particles (PLAs)). Depending on the type, nanoparticles can offer several advantages, like enhanced B-cell activation by crosslinking B-cell receptors, T-cell priming by enhanced uptake of antigens into T-cells or incorporation of immunostimulatory adjuvants (PMID:28422790 PMID:25529572). However, presenting Env immunogens to the surface of nanoparticles – depending on the method used for nanoparticle decoration - can influence the antigenic profile, which has therefore to be analyzed. Furthermore, it is reasonable to analyze the impact of close-to-native conditions (such as serum) on the antigenicity profile of soluble or nanoparticle-presented Env immunogens. Answering these complex questions requires powerful technologies that allow the investigation of complex antibody-antigen interactions, ideally also under close-to-native conditions. With the intention to explore if MST can meet the requirements described above, we performed a comprehensive and detailed analysis of Env-antibody interactions under increasing degrees of complexity. As model systems, we used a previously described Env/V3 chimeric library, based on the C-clade isolate 96ZM651 with substituted V3 loops of the isolates MN, HXB2, CDC42, RF and SF33. It has been shown that the Env variants of this library (further referred to as Env/V3 chimeras) bind with distinct binding affinities to the V3-directed mAb 447-52D, making them a valuable tool for the investigation of antibody-Env interactions (PMCID: PMC5627598). The Env/V3 chimeras, produced as soluble proteins (gp120 monomers and gp140 trimers) and VLP (HIV-1 Gag)-presented gp145 Env molecules as an example for nanoparticles, were used to establish MST assay setups that enable affinity measurement of the interaction between 447-52D and the different Env/V3 chimera antigen formats. Furthermore, we evaluated the

capacity of MST to measure under native-like conditions by repeating measurements in presence of 50% human serum. To be able to benchmark MST, the state-of-the-art technology ELISA was included in the study.

In summary, we successfully established several MST assay setups that enable affinity measurement of the interaction between the mAb 447-52D and the different Env/V3 chimera antigen formats, in absence or presence of 50% serum. Thereby, MST provides the advantages of small sample consumption and fast assay development. When compared to ELISA results, we were able to show that the overall affinity ranking measured by MST and ELISA is consistent and transferable from gp120 monomers to gp140 trimers. Further, our study highlights that MST is capable to determine the interaction between 447-52D and VLP-presented high- and low affinity binding Env molecules. Notably, the capacity of MST to determine affinity data in presence of 50% serum makes the method a valuable tool for the investigation of future Env vaccine candidates.

2. Materials and Methods

Env constructs

The Env/V3 model library consisted of 5 previously described gp145 Env/V3 chimeras (PMCID: PMC5627598), based on the 96ZM651 Env (GenBank, # AF286224) with exchanged V3 regions (MN, RF, CDC42, HXB2, SF33) (PMC4184847, PMID:11177395). Gp140 constructs were generated by deleting the transmembrane domain via PCR. Additionally, gp140 constructs were engineered to contain a Flag/His-tag at the C-terminus of gp41 by adding amino-acid sequence SGGGGSDYKDDDDKHHHHHH and the stop codon. Furthermore, the Furin cleavage site was altered from REKR to REKS to prevent cleavage. For gp120 constructs, gp41 was deleted by PCR, respectively. The constructs were re-cloned into the pQL13 vector by golden gate cloning (PMCID: PMC5627598, PMC4184847). The previously described BG505 SOSIP.664 gp140 (PMC3777863) was engineered to contain a His-tag at the C-terminus of gp41 ectodomain (gp41_{ECTO}) by adding amino-acid sequence GSHHHHHH and the stop codon. Finally the construct was cloned into pDNA5/FRT/TO expression vector (ThermoFisher SCIENTIFIC, # V652020). All constructs were verified by Sanger sequencing.

Protein expression and Purification

Env proteins were expressed in 293F cells (FreeStyle™ 293-F cells, # R79007), transiently transfected with env genes using polyethyleneimine (PEI), (Polysciences, # 23966), essentially as described elsewhere (PMID:16600625). In case of BG505 SOSIP.664 the *furin* gene was cotransfected at a 3:1 *env:furin* ratio to confer proper gp120-gp41_{ECTO} cleavage. 72h after transfection, Env proteins were purified from culture supernatants using affinity columns containing Ni-sepharose for purification of gp140 (GE Healthcare Life Sciences, # 17-5248-01) or agarose bound *Galanthus nivalis* lectin (GNL), (Vector laboratories, # AL-1243) for purification of gp120 proteins. For gp140 purification, culture supernatants were loaded onto Ni-sepharose columns at a constant flow rate of 1 ml/min, followed by washing with buffer PBS, 0.5 M NaCl, 0.03 M imidazole, pH 7.4. Env proteins were eluted with PBS, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole, pH 7.4 and subsequently concentrated using 100 kDa Amicon® Ultra-15 centrifugal filters (Merck, # UFC910024). Gp120

proteins were purified in a similar way with the exceptions of using a GNL column with corresponding buffers for washing (PBS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) and elution (PBS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 M methyl- α -D-glucopyranoside) and 30 kDa Amicon® Ultra-4 centrifugal filters (Merck, # UFC803024) for concentration. Affinity purified proteins were loaded on a HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare Life Sciences, # 17116701) size exclusion chromatography (SEC) column, with running buffer PBS for gp140 trimers or HBS-EP (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % (v/v) Surfactant P20) for gp120 monomers, to separate the different oligomerization states of the proteins. Gp140 trimer or gp120 monomer containing fractions were pooled, concentrated with 30 kDa Amicon® Ultra-4 centrifugal filters (Merck, # UFC803024) and stored at -80 °C. Protein concentrations were determined by photometric quantification (UV 280 nm) using a NanoDrop ND-1000 photometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). Extinction factors and molecular weights of gp120 monomers and gp140 trimers were calculated based on the corresponding amino acid sequences, using ExpASY protParam tool (PMID:22661580).

Blue native PAGE

Env proteins were analyzed using Blue Native (BN) PAGE. Briefly, 3 μ g of proteins mixed with 2x loading dye (100 mM MOPS, 100 mM Tris-HCl, pH 7.7, 40 % glycerol, 0.2 % Coomassie Blue) were directly loaded on precast SERVAGel™ N 4-16, Vertical Native Gels 4-16 % (SERVA, # 43253) and PAGEs were performed in the indicated running buffers for 2 h at 200 V (anode buffer: 50 mM Bis Tris-HCl pH 7.0, cathode buffer: 50 mM Tricine, 15mM Bis Tris), followed by Coomassie blue staining.

Env antibodies

Monoclonal antibodies (MAbs) 447-52D (PMID:7678279) (# AB014), 2F5 (PMID:7520721) (# AB001), 4E10 (PMID:7520721) (# AB004), 2G12 (PMID:7520721) (# AB002) and 5F3 (PMID:7520721) (# AB010) were purchased from Polymun Scientific, Klosterneuburg, Austria. MAbs 10E8 (PMC4854285), VRC01 (PMC2965066), PGT145 (PMC3393110), PGT151 (PMC4057017) and F105 (PMID:1710248) were produced by transfecting 293F cells with the corresponding heavy and light chain genes (both in CMVR expression vectors (NIH, # 12035, # 12036)) in a 1:1 ratio, using PEI transfection. 5 days post-transfection, the supernatant was harvested, sterile filtered and directly loaded on a 1ml HiTrap rProtein A FF column (GE Healthcare Life Sciences, # 17-5079-01). After washing with PBS, elution was performed with 0.1 M glycine pH 3.2, followed by neutralization with 1 M Tris-HCl pH 9. In case of PGT145 purification, elution buffer additionally contained 0.1 M fructose. Purified MAbs were buffer exchanged to PBS or buffer (0.1 M NaHCO₃ + 0.5 M NaCl, pH 8.3, for PGT145 only) using PD-10 columns (GE Healthcare Life Sciences, # 17085101). Antibody concentrations were determined by photometric quantification (UV 280 nm) using a NanoDrop ND-1000 photometer. For MST and ELISAs, antibody concentrations were recorded in nM with the assumption that the molecular mass of an average IgG molecule is approximately 150 kDa.

VLP production

VLPs were produced by transient co-transfection of FreeStyle™ 293-F cells with plasmids encoding an optimized HIV-1 Gag (Quelle jogi) and cleavage competent gp145 versions of the Env/V3 chimeras in a *gag-env* ratio of 2:1. VLP containing supernatants were cleared from cells by centrifugation for 15 min at 3000 *g* and 4 °C. Supernatants were loaded on a 30 % (w/w) sucrose in PBS cushion and ultra-centrifuged for 2h at 100,000 *g* and 4 °C. The pellet was resuspended in PBS overnight at 4 °C and loaded onto a 10 to 50 % (w/w) sucrose in PBS gradient (2.5h at 100,000 *g* and 4 °C) to separate VLPs, according to their density. 22 fractions of 550µl each were collected and analyzed for their density and for co-banding of Gag and Env (Western Blot). VLP containing fractions were pooled and stored at -80 °C. Env concentrations in VLP preparations were determined by semi-quantitative slot blot titration.

SDS PAGE, Western Blot and Slot blot analysis

SDS PAGE, Western Blots and Slot blot analysis were essentially performed as described elsewhere (PMC4256929). For Env detection, blots were probed with an anti-gp41 cocktail consisting of human MAbs 10E8, 2F5, 4E10 and 5F3, each at 1 µg/ml. P24/p55 was detected using monoclonal mouse IgG1 antibody CB-13/5 (mouse hybridoma cell line, clone CB-13/5 (PMID:8576571)) (1:1000). Polyclonal horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-human (Dako, # P0214) and rabbit anti-mouse IgG (Dako, # P0260) served as secondary antibodies (1:2000, each).

Protein labeling for MST binding assays and serum ELISAs

For MST, mAbs 447-52D, 2G12, PGT145, PGT151, VRC01 and F105 were labeled with the fluorescent dye Alexa Fluor™ 647 (ThermoFisher SCIENTIFIC, # A20186) according to the manufacturer's protocol. VLPs were labeled using Monolith™ Protein Labeling Kit RED-NHS (NanoTemper Technologies, # MO-L001) according to the manufacturer's protocol, except for Step B. Here, 10 µl of VLPs were mixed with 190 µl of 10.9 µM DY-647P1-NHS-Ester (Dyomics, # 647P1-01) in PBS pH 7.4, 2.6 % DMSO. The labeling mixture was incubated in the dark for 30 min at RT. After labeling, VLPs were eluted into HBS-EP buffer (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % (v/v) Surfactant P20). For serum ELISAs, mAbs 447-52D, 2G12, PGT145, PGT151, VRC01 and F105 were biotinylated using EZ-Link-NHS-LC-Biotin reagent (ThermoFisher SCIENTIFIC, # 21336). Briefly, EZ-Link-NHS-LC-Biotin was dissolved in dimethylformamide to a final concentration of 10 mM. Biotin reagent was added in a 75 molar excess to the antibody in PBS and the mix was incubated for 1h at RT. After incubation, buffer was exchanged to PBS by using NAP-5 gel filtration columns (GE Healthcare Life Sciences, # 17-0853-01) and antibody concentration was determined by using a NanoDrop ND-1000 photometer.

Fluorescent MicroScale Thermophoresis binding assay

All MicroScale Thermophoresis (MST) binding experiments were performed in premium coated glass capillaries on a Monolith NT.115 pico device (NanoTemper Technologies, Munich, Germany) at 25 °C under conditions described in Table 1A for measurements in buffer and Table 1B for measurements in 50 % serum (Sigma-Aldrich, # H4522). Briefly, the fluorescently labeled interaction partner was used at a constant concentration in reaction buffer, while the

other interaction partner was used as titrant. Data (MST-on time, Thermophoresis and Temperature-Jump) resulting in an optimal signal to noise ratio were analyzed using NT Analysis software (version 1.5.41, NanoTemper Technologies). In order to calculate the fraction bound ratio, the corrected normalized fluorescence ΔF_{norm} value of each point was divided by the amplitude of the fitted curve, resulting in values from 0 to 1 (0 = unbound, 1 = bound), processed with KaleidaGraph 4.5, and fitted using the K_D fit formula derived from the law of mass action. Error bars represent the standard error of the mean of (SEM) of *n* independent experiments.

ELISAs with Env/V3 chimeras

For ELISAs with monomeric gp120 and trimeric gp140 Env/V3 chimeras, Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96-well plates (ThermoFisher SCIENTIFIC, # 442404) were coated with 200 ng/well *Galanthus nivalis* lectin (GNL) (Sigma-Aldrich, # L8275) in PBS overnight at 4 °C. Wells were washed (PBS with 0.05 % Surfactant P20) and blocked with 5 % non-fat dry milk in PBS, containing 0.1 % Surfactant P20, for 2h at RT. Further, wells were incubated with 50 ng Env/well in PBS for 1h at RT. MAb 447-52D, diluted in PBS with 1 % (w/v) BSA, was titrated to the wells and incubated for 1h at RT. Antibody binding was detected by HRP-conjugated polyclonal rabbit anti-human antibody (Dako, # P0214), diluted in PBS with 1 % (w/v) BSA and incubated for 30 min at RT. Plates were developed with TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate, which was freshly prepared by mixing TMB A (30 mM tri-potassium citrate-monohydrate adjusted to pH 4.1 with 10 % (w/v) citric acid) and TMB B (0.24 % (w/v) TMB, 10 % (v/v) acetone, 90 % (v/v) ethanol, 80 mM H₂O₂) in a 20:1 ratio. The colorimetric reaction was stopped by adding 1 M H₂SO₄ and absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader (Model 680 - Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

His-capture and direct ELISAs with BG505 SOSIP.664 trimers

His-capture ELISAs with BG505 SOSIP.664 trimers were performed as described for ELISAs with Env/V3 chimeras, with the difference that Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96-well plates were coated with 100 ng/well 6x-His Epitope Tag Antibody (ThermoFisher SCIENTIFIC, # MA1-21315) for capturing of His-tagged BG505 SOSIP.664 trimers. In case of direct ELISAs, BG505 SOSIP.664 trimers were directly coated on Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96-well plates.

PLA and VLP ELISAs

PLA and VLP ELISAs were essentially performed as described for ELISAs with soluble Env/V3 chimeras. For PLA ELISAs, PLAs in PBS, containing a total amount of 50 ng BG505 SOSIP.664 were coated on Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96-well plates. In case of VLP ELISAs, VLPs in PBS, containing a total amount of 25 ng Env/well (calculation based on concentrations determined by slot blot titration), were coated and washing and blocking buffers did not contain Surfactant P20.

Serum ELISAs

Serum ELISAs of Env proteins and VLPs were performed as described for the respective ELISAs in buffer, with the difference that biotinylated mAbs in PBS were incubated in presence of 50 % human serum. Further, HRP-conjugated streptavidin (Roche, # 11 089 153 001) in PBS with 1 % (w/v) BSA was used for detection.

i-Particles®

i-Particles® purchased from Adjuvatis are poly(lactic acid) particles. The particles were prepared by nanoprecipitation method without any surfactant or stabilizer. For adsorption of BG505 SOSIP.664 trimers, the protein was diluted in DPBS (Gibco, Life technologies, # 14190-086) to final a concentration of 100 µg/ml and incubated with i-Particles® (10 mg/ml in DPBS) at a 1:1 v/v ratio. The adsorption reaction was incubated for 2 h at RT under moderate end-overhead stirring. To calculate the amount of adsorbed protein, unbound BG505 SOSIP.664 was collected in the supernatant by centrifugation at 10,000 g for 10 min and quantified by Micro BCA™ Protein Assay Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, # 23235). The absorbance of the samples was measured at 562 nm using a microplate reader (Multiskan™ FC, ThermoFisher SCIENTIFIC). For further characterization the hydrodynamic diameter and size distribution (polydispersity index) were determined by dynamic light scattering (DLS) measurement at a temperature of 25°C, and a scattering angle of 173° using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, UK). The formulations were diluted in 1 mM NaCl 0.33 µm filtered solution and each value was the mean of four independent measurements. The electrophoretic mobilities (zeta potential) were measured using the same equipment but at an angle of 12.8°. In summary, two batches of i-Particles® with adsorbed BG505 SOSIP.664 trimer were produced and the average hydrodynamic diameter of the two independent particle preparations was 175 ± 12 nm in size (average size of two batches of empty control particles: 136 ± 2 nm). The average polydispersity index of the BG505 SOSIP i-Particles® was 0.197 ± 0.028 (control particles: 0.091 ± 0.011), indicating a relatively homogeneous size distribution. The average zeta potential of BG505 SOSIP i-Particles® was -50 ± 5 mV (control particles: -45 ± 10) and the amount of BG505 SOSIP.664 trimers was calculated about around 47 ± 3 trimers per particle.

3. Results

The Env/V3 model system

To investigate antibody-Env interactions by MST, we used a model system consisting of 5 previously described Env/V3 chimeras and mAb 447-52D. The 5 Env/V3 chimeras are based on the backbone of the C-clade isolate 96ZM651, with the third variable domain (V3) substituted by the V3 loops of the isolates MN, HXB2, CDC42, RF and SF33 (see Fig. 2). It has been shown recently, that mAb 447-52D binds with distinct binding capacities to membrane-bound gp145 Env molecules in cytometer based titration assays. Furthermore, ELISA titrations have shown that the affinity ranking, with variant MN depicting the best binding, closely followed by HXB2 and CDC42, while variant RF exhibits only low binding and SF33 no binding, is transferable from membrane-bound to soluble gp140 versions of the Env/V3 chimeras (PMC5627598).

Purification of Env/V3 chimeras as soluble gp120 monomers, gp140 trimers and virus like particle presented gp145 Env

As versatile toolbox to investigate the capacity of MST to measure antibody-Env interactions on different levels of antigen complexity, we produced Env/V3 chimeras in different oligomerization states (gp120 monomers, gp140 trimers, see Fig. 2) as well as presented on VLPs (HIV-1

Gag VLPs exposing membrane-bound gp145 Env/V3 chimeras). Size exclusion profiles of soluble proteins with indicated monomer and trimer fractions are shown in Fig. 3. To control the quality of purified proteins a BN PAGE was performed (see Fig. 4). HIV-1 Gag VLPs with surface exposed Env/V3 chimeras were produced as described in the method section. The VLP preparations were analyzed for their Env concentration via slot blot titration (see Fig. 5A) and a final Western Blot analysis confirmed that Env/V3 chimeras were successfully incorporated into VLPs (see Fig. 5B).

MST analysis of the interaction between mAb 447-52D and soluble gp120 Env/V3 chimeras in buffer

We used the Env/V3 model library, existing as gp120 monomers, gp140 trimers and VLP-presented gp145 Env/V3 chimeras and the model antibody 447-52D to establish MST assay protocols for quantifying antibody-Env interactions with increasing complexity. First, we investigated the interaction between mAb 447-52D and gp120 Env/V3 chimeras in buffer (HBS-EP). For this experiment, the Alexa-647-labeled mAb 447-52D was kept at a constant concentration of 0.25 nM and gp120 monomers were used as titrants. In order to calculate a fraction that relates the amount of bound antibodies to the amount of unbound antibodies, the corrected normalized fluorescence (ΔF_{norm}) value of each point was divided by the amplitude of the fitted curve, resulting in values from 0 to 1 (0 = unbound, 1 = bound), processed using the KaleidaGraph 4.5 software and fitted using the K_D fit formula derived from the law of mass action. The resulting binding curves (see Fig. 6A, left panel) with corresponding K_D -values (Tab. 2A) showed that mAb 447-52D binds with distinct binding affinities to the gp120 Env/V3 chimeras, with MN being the best binding variant, followed by CDC42 and HXB2 which bind with similar affinity. Both, RF and SF33 exhibit marginal/no binding. Comparable results were obtained by a *Galanthus nivalis* lectin (GNL) capture ELISA, where mAb 447-52D was titrated to immobilized gp120 Env/V3 chimeras (see Fig. 6A, right panel and Tab. 2A) validating the affinity data measured by MST.

MST analysis of the interaction between mAb 447-52D and soluble gp140 trimer Env/V3 chimeras in buffer

On the next level of complexity, we assessed binding of mAb 447-52D to gp140 trimers. The measurements were performed in buffer as described above. The resulting binding curves (Fig. 6B, left panel) showed that the affinity ranking, as determined for gp120 before, was also preserved in measurements with gp140 Env/V3 chimeras. In contrast to the gp120 variant, however, we could detect binding of 447-52D to gp140 Env/V3 chimera RF. GNL capture ELISAs with gp140 Env/V3 chimeras again produced comparable results (Fig. 6B, right panel). K_D -values, calculated from MST binding curves of MN, HXB2, CDC42, and also RF indicate that 447-52D binds trimeric gp140 Env/V3 chimeras with higher affinity, compared to monomeric gp120 versions of the proteins (Tab. 2A). Due to the high binding affinities, the K_D -values determined for gp140 Env/V3 chimeras MN, HXB2, and CDC42 can only be used as an orientation, as the affinity is close to the concentration of the fluorescent-labeled 447-52D (0.05 nM) and therefore at the detection limit (using lower amount of labeled 447-52D was not possible without falling below the required fluorescent signal). Regarding the ELISA measurements, we could also detect

an improved binding of 447-52D to gp140 Env/V3 chimeras, however this was limited to the variants HXB2, CDC42 and RF, while MN gp140 exhibits a binding affinity comparable to gp120 MN (Tab. 2A).

Interactions between mAb 447-52D and virus-like particle-presented gp145 Env/V3 chimeras in buffer

In order to examine the ability of MST to determine complex affinity interactions between antibodies and VLP-presented antigens, we chose HIV-1 Gag VLPs decorated with gp145 Env/V3 chimeras as a model system for VLPs (PMID:28422790). MST analysis of the interaction between mAb 447-52D and the VLP-presented Env/V3 chimeras in buffer was performed by using the VLP-presented Env/V3 chimeras as fluorescently-labeled interaction partners while mAb 447-52D was used as titrant. This experimental setup was chosen because VLPs contain -next to gp145 Env proteins- all cellular components, including membrane proteins present on the cell surface, which allow an efficient labeling with fluorescent dyes via NHS-chemistry. In turn, using the antibody as titrant allows precise characterization of K_D -values, since antibody concentrations can be easily determined. The resulting binding curves (Fig. 6C, left panel) with corresponding K_D -values (Tab. 2A) showed that the VLP variants MN, CDC42 and HXB2 bind with similar affinities to mAb 447-52D, whereas we detected marginal/no binding to variants RF, SF33 and bald VLPs (data not shown). Here, the affinity ranking was apparently preserved. However, it has to be considered that the data and calculated K_D -values for VLPs exhibit relatively high standard error of the mean (SEM) values and therefore, it is difficult to define a valid ranking for the close-in affinity variants MN, CDC42 and HXB2. To validate MST results, we performed VLP-ELISA experiments, in which VLP-presented Env/V3 chimeras were adsorbed to the surface of ELISA plates and mAb 447-52D was used as titrant. The K_D -values, deduced from VLP-ELISAs (Tab. 2A), were in agreement with the results obtained by MST. As in the MST assay, the K_D -values of VLP variants MN, HXB2 and CDC42 were very similar, whereas we measured a lower affinity to VLP variant RF and no binding to SF33 and bald VLPs. As described for MST, it is therefore difficult to define a valid affinity ranking for variants MN, HXB2 and CDC42. Regarding the absolute binding signal, VLP-ELISA binding curves (see, Fig. 6C, right panel) showed a slightly different picture compared to ELISAs with gp120 monomers and gp140 trimers. This is most likely due to the fact that the Env concentrations in VLP preparations were determined by semi-quantitative slot blot titration (Figure 5A). In sum, we were able to show that MST is capable to measure the affinities of the interactions between VLP-presented Env/V3 chimeras and the mAb 447-52D as confirmed by ELISA. Nevertheless, both MST and ELISA showed some limitations to resolve the slight differences in the affinities between the VLP variants of MN, CDC42 and HXB2, as it was possible for gp120 monomers and gp140 trimers. This is most likely due to the high complexity of the VLP system, which represents an inhomogeneous mixture of particles differing in size and likely also in the amount and distribution of structural subspecies of incorporated Env. In sum, we were able to show that MST provides consistent data in the expected affinity ranking (MN>CDC42/HXB2>RF>SF33) of the interaction between monomeric gp120, trimeric gp140 Env/V3 chimeras and

mAb 447-52D, as confirmed by ELISA experiments. Further, our study demonstrates that MST and ELISA are capable to measure affinities of the complex interactions between mAb 447-52D and VLP-presented Env/V3 chimeras, although with the limitation to resolve slight differences in the affinities of high affinity binding VLP variants.

MST analysis of the interaction between mAb 447-52D and soluble gp120 and gp140 Env/V3 chimeras in 50% serum

Ideally, binding analysis of interaction partners should be performed under native-like conditions, since the environment of interaction potentially affects the behavior of interaction partners. Serum proteases, for example, are known to clip the V3 region of gp120 in subtype B Env proteins and thereby damaging protein structure (PMC4337520), which has to be considered when used for vaccination. In order to test if MST is in principle able to determine affinities under native-like conditions, we aimed to determine the affinity of mAb 447-52D to gp120, gp140 and VLP-presented Env/V3 chimeras in presence of 50% human serum, starting with gp120 monomers. The resulting binding curves (see Fig. 7 left panel) showed that the affinity ranking was in agreement with the measurements for gp120 monomers in buffer (with MN depicting the best binding, followed by CDC42/HXB2 and only marginal binding of RF and SF33), although the corresponding K_D -values (Tab. 2B) showed an overall reduction in affinity as compared to measurements in buffer (~factor of 5.7 for MN), especially for variants CDC42 and HXB2 (~factor of 22 and ~15, respectively). To validate MST results, we performed GNL capture ELISAs, in which the primary antibody (biotinylated mAb 447-52D) was incubated in the presence of 50% serum. It is noteworthy to mention that MST analysis takes place in direct presence of serum, whereas in the ELISA setting, only the primary Ab was incubated in presence of serum while the final detection by a secondary antibody was done after several washing steps. The previously determined affinity ranking was also preserved in the ELISAs (see Fig. 7 left panel), but compared to MST performed in serum, the calculated K_D -values for ELISA analysis (Tab. 2B) were in the same range as K_D -values calculated for gp120 monomers in buffer.

Next, we assayed binding of mAb 447-52D to trimeric gp140 Env/V3 chimeras in presence of 50% serum. The resulting binding curves (Fig. 7B, left panel) and calculated K_D -values (Tab. 2B) showed the expected affinity ranking (with MN depicting the highest affinity, followed by CDC42/HXB2, and only marginal binding to RF and SF33), although K_D -values of MN, CDC42 and HXB2 were very similar. This was also the case in the GNL capture ELISAs with gp140 trimers in presence of serum (Fig. 7B, right panel). The comparison of MST-derived K_D -values of gp140 trimers in buffer (Tab. 2A) and serum (Tab. 2B) showed that the binding of 447-52D was reduced in the presence of serum by factors of ~84 (MN), ~11 (HXB2) and ~6 (CDC42), supposedly due to the crowded serum environment. Further, we could detect marginal binding to Env/V3 chimera RF, but unlike in measurements in buffer, no saturation was reached and therefore no K_D -value could be calculated. As described above, serum ELISAs with gp140 trimers could confirm the MST results. Unlike in MST, mAb 447-52D showed somewhat better binding to gp140 Env/V3 chimeras in serum as compared

to binding in buffer (comparing K_D -values in gp140 trimers in Tab. 2A and B). In accordance to measurements in buffer, we could also detect an enhanced affinity of mAb 447-52D to gp140 trimers compared to gp120 monomers in both, MST and ELISAs (compare K_D -values of gp140 and gp120 in Tab. 2B).

Interactions between mAb 447-52D and virus-like particle presented gp145 Env/V3 chimeras in 50% human serum

Furthermore, we analyzed the binding of mAb 447-52D to VLPs presenting Env/V3 chimeras in presence of 50% serum. The resulting binding curves (Fig. 7C, left panel) with corresponding K_D -values (Tab. 2B) showed that the VLP variants MN, CDC42 and HXB2 bind with similar affinities to mAb 447-52D, whereas we detected marginal to no binding for VLP variants RF, SF33 and bald VLPs (data not shown). As in VLP measurements in buffer, the affinities for VLP variants MN, CDC42 and HXB2 were similar and considering the relatively high SEM-values, as described for VLPs in buffer, it is difficult to define a valid ranking. The MST results were further validated by VLP-ELISAs performed in presence of 50% serum. The K_D -values of VLP-ELISAs (Tab. 2B) were in agreement with the results obtained by MST. We were able to show that VLP variants MN, CDC42 and HXB2 bind with similar (high) affinity to 447-52D in the presence of serum, whereas we measured only low affinity binding for RF and no binding to SF33 and bald VLPs. The VLP variants CDC42 and HXB2, followed by MN, depicted the highest absolute binding signals, most likely for reasons described previously for VLP-ELISAs in buffer. Comparing MST-derived K_D -values of VLP variants in buffer (Tab. 2A) with serum (Tab. 2B) showed that mAb 447-52D binds VLPs in buffer and serum with comparable affinities. This was also the case for VLP-ELISAs (compare K_D -values of VLP-ELISAs in buffer (Tab. 2A) with K_D -values of VLP-ELISAs in serum (Tab. 2B)).

In summary, we could demonstrate that MST provides consistent data in the expected affinity ranking (MN>CDC42/HXB2>RF>SF33) of the interaction between monomeric gp120, trimeric gp140 Env/V3 chimeras and mAb 447-52D both in buffer and in the presence of 50% serum, as confirmed by ELISAs. Hence, the data underline that MST is capable to determine affinities under native-like conditions. Further, our study highlights that MST is capable of measuring affinities of mAb 447-52D and VLP-presented Env/V3 chimeras in both buffer and in presence of 50% serum, although with the limitations to resolve slight differences in the affinities of high affinity binding VLP variants. Furthermore, we detected that affinity ranking, determined for 50% serum reflects the order found for measurements in buffer, although the calculated K_D -values sometimes differed between measurements in buffer and serum for both MST and ELISA.

Interactions between BG505 SOSIP.664 trimers and a panel of quarternary structure characterizing antibodies in buffer

Contrary to other biophysical or biochemical methods like SPR, BLI and ELISA, MST does not require surface immobilization of one interaction partner, which can negatively influence the structure of the immobilized interaction partner. To address the question if the structural integrity of Env trimers is preserved during MST measurements, we chose the previously described, native-like BG505 SOSIP.664 trimers (PMC3777863),

which display epitopes of bNAbs but not of non-neutralizing Abs (PMC3777863) as a model system for stabilized next-generation Env immunogens and analyzed their binding to a panel of quarternary structure characterizing mAbs including PGT145, PGT151, 2G12, VRC01 and F105 (PMID:28423342, PMID:24768348, PMID:24965454, PMID:20616231, PMID:19965434). Thereby we compared MST with two different ELISA setups, namely a His-capturing ELISA, allowing for directed presentation of BG505 SOSIP.664 trimers via their His-tag, and direct ELISA setup in which the proteins were directly coated to the surface ELISA plates. The resulting MST binding curves (Fig. 8A, left) with corresponding K_D -values in (Tab 3A) showed that CD4bs-directed bNAb VRC01 and the N332 glycan-supersite directed bNAb 2G12 bound with high affinity to BG505 SOSIP.664 trimers which was expected since the binding of these antibodies in only marginally influenced by both, the oligomerization state and the intact quarternary structure of BG505 SOSIP.664 trimers (PMC4067080). Quarternary epitope-specific bNAbs PGT145 and PGT151 with epitopes in the trimer apex and the gp41-gp120 interface, respectively, bound with high affinities to the BG505 SOSIP.664 trimers, whereas we detected only marginal binding of the CD4bs-directed non-neutralizing Ab F105, which binds to monomers, dimers and disordered trimers but not well-folded native-like trimers (PMC3777863, PMC4972253). Taken together, the MST results show that the BG505 SOSIP.664 trimers retain their well-folded structure during MST measurement. To further validate MST results, we performed His-capture ELISAs with BG505 SOSIP.664 trimers and the very same antibody panel. His-capture ELISAs are commonly used to assess the antigenicity profile of Env vaccine candidates because they allow the directed presentation of His-tagged proteins, thereby retaining their native-like structure (PMC4972253). The results of the His-capture ELISA (see Fig 8B, left with corresponding K_D -values in Tab 3A) in general reflected the data obtained from MST measurements. We detected only marginal binding for the non-neutralizing Ab F105 and all bNAbs bound with high affinities to the BG505 SOSIP.664 trimers, comparable with the affinities from the MST analysis. In contrast, when BG505 SOSIP.664 trimers were directly coated to the solid phase (direct ELISA), the binding of the quarternary structure depending bNAbs PGT145 and PGT151 was lost and F105 binding was detected (see Fig.8C, left). This indicates a disturbance of the native-like structure, most likely caused by hydrophobic and electrostatic interactions between the BG505 SOSIP.664 trimers and the solid phase of the ELISA plate. In summary, we were able to show that the native-like protein structure of BG505 SOSIP.664 trimers is preserved during MST measurements since the results reflect the data obtained from His-capturing ELISAs and further, that the choice of the immobilization strategy in ELISA measurements can strongly impact the antigenicity profile of immobilized Env proteins.

Interactions between BG505 SOSIP.664 trimers and a panel of quarternary structure characterizing antibodies in 50% human serum

The antigenic profile of Env vaccine candidates is mostly assessed in artificial buffer and not under close-to-native conditions such as serum. The latter, for example can have considerable influence on protein structure and

thereby on the antigenic profile. This is, for example, especially known for subtype-B Env proteins (PMC4337520). Since MST tolerates the presence of 50% serum, we investigated its influence on the antigenic profile of BG505 SOSIP.664 trimers and compared the results with His-capture and direct ELISA measurements. The MST binding curves in Fig 8A, right with corresponding K_D -values in table 3B of bNAbs are in general comparable with results obtained in buffer with exception that we detected also good binding the non-neutralizing antibody F105. This indicates that a least a part of the BG505.SOSIP.664 trimers turned into a more open conformation, which allows binding of F105. However, this was not observed in the His-capture ELISA. Surprisingly, we measured a loss of binding for 2G12 in direct and His-capture ELISA, which turned out to be an effect of the biotinylation of this antibody, because we observed the same effect in a control experiment without serum (data not shown).

Interactions between i-Particles®-formulated BG505 SOSIP.664 trimers and a panel of quarternary structure characterizing antibodies

Presentation of immunogens by nanoparticles, conceptually offers several advantages over soluble proteins, like enhanced uptake of antigens into T-cells or enhanced B-cell activation (PMID:28422790). For example, Bale et al could show that liposomes decorated with Env immunogens have the potential to crosslink B-cell receptors by avidity effects, resulting in enhanced *in vitro* B-cell activation and increased IgG-binding titers in mice PMID:28592540. This highlights the potential of nanoparticles to contribute to stronger and potentially broader Ab responses. However, the antigenic profile of Env immunogens should be preserved when they are presented on nanoparticles, since this may contribute to direct the Ab response against vulnerable sites of the Env protein. Since MST was successful in characterizing the interactions between mAb 447-52D and VLPs in the Env/V3 model system, we thought MST may prove useful to investigate the antigenicity profile of PLA-adsorbed BG505 SOSIP.644 trimers as model system for state-of-the-art Env immunogens presented on nanoparticles. PLA-particles were chosen because they represent well characterized, biodegradable nanoparticles which also allow the incorporation of immunostimulatory molecules as further adjuvants PMID:25529572. In cooperation with Bernard Verrier we produced PLA-particles (i-Particles®) about 175 nm in size, with passively adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers with a calculated amount of ~50 trimers per particle and analyzed the antigenic profile by MST and ELISA. In MST experiments the PLA-particles were titrated to fluorescent-labeled antibodies, starting with a calculated concentration of ~100 nM Env in the PLA-particle solution. This setup was chosen because we wanted to avoid the labeling of the limited amount of BG505 SOSIP trimers present on PLA-particles, since labeling statistically takes place mainly in lysine residues of the protein, which in turn can affect antibody epitopes either by blocking lysines required for antibody binding or simply by sterical hindrance due to lysines carrying a fluorescent dye close to antibody epitopes. However, due to its setup, this experiment allows only a comparison in binding of different antibodies to PLA-presented BG505 SOSIP.664 trimers, which is sufficient to investigate the antigenic profile, but it is not suitable to calculate precise

K_D -values since it is difficult to determine the exact concentration of PLA-adsorbed BG505 SOSIP trimers. In the MST measurements we detected binding of all Abs to PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers in artificial buffer and also in 50 % human serum (Fig 9A, C), although measurements suffered from unspecific binding of Abs to empty control particles (see sup Fig XXX), which could not be prevented even by pre-blocking empty particles with blocking buffers. Never the less, the binding of all Abs was considered as specific, since measurements with PLA-adsorbed BG505 SOSIP trimers and resulted in saturated binding curves and (higher amplitudes, fluorescent signals...??). The background binding in this case can be most likely be explained by unspecific adsorption of the Abs to positively charged surface of the PLA-particles, which was also used for passive adsorption the BG505 SOSIP.664 trimers. In summary, it cannot be excluded that unspecific Ab binding, at least partially, also contributes to Ab binding in measurements with PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers, since the particles surface is not fully decorated with BG505 SOSIP.664 trimers, which might allow unspecific adsorption of Abs. Regarding the antigenicity profile, MST measurements indicate that PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers most likely represent a mixture of trimers with native-like and open conformation, since we could detect binding of both bNAbs, including quarternary structure depending PGT145 and PGT151, and non-neutralizing Ab F105. The mixed population of trimers present on PLA-particles can be explained by the immobilization strategy of BG505 SOSIP.644 trimers. Like we could show in direct ELISA experiments with BG505 SOSIP.664 trimers, passive adsorption of proteins can negatively influence the protein structure, which might be the reason for F105 binding in this case. However, in case of adsorption of BG505 SOSIP.664 trimers to PLA-particles the effects are not as drastically as in direct ELISA since we detected also binding of quarternary structure depending bNAbs PGT145 and PGT151. Next we investigated the antigenicity profile of PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers in a direct ELISA experiment where PLA-particles were directly coated to surface of ELISA plates. This setup was chosen for two reasons: 1) we considered that an antibody capturing approach, e.g by 2G12 ELISA, will be unsuitable to capture particles with ~175 nm in size and a limited amount of protein on the surface; 2) we assumed that immobilized PLA-particles will serve as platform, which avoids direct coupling of BG505 SOSIP.664 trimers to surface of the ELISA plate. The ELISA results shown in Fig 9B differ from the data obtained from MST measurements. We detected only binding of bNAbs 2G12 and VRC01, which do not depend on a native-like structure of the Env protein, and non-neutralizing Ab F105 which binds to disordered trimers, whereas the binding of quarternary structure depending bNAbs PGT145 and PGT151 was lost. The results indicate that the direct coating disrupts the PLA-particles structure, including BG505 SOSIP.664 trimers, which makes it difficult to analyze this kind of particles by direct ELISA. In summary we were able to demonstrate that MST is useful tool to investigate the antigenicity profile of next-generation Env immunogens with a native-like trimeric structure, which is kept intact during MST measurements as we could show by comparing MST measurements with BG505 SOSIP.664 trimers and a panel of quarternary

structure characterizing Abs with direct coating and His-capturing ELISA setups. Thereby we could show that the native-like structure of BG505 SOSIP.664 trimers is preserved in buffer measurements, whereas presence of 50% human serum seems to have a slight negative influence on trimeric structure, since we here detected good binding of non-neutralizing Ab F105 but also binding of all bNAbS in our panel, including quarternary structure depending PGT145 and PGT151. Furthermore, we were able to show that MST is useful to determine antigenicity profile of particle-presented Env immunogens, although the inherent properties of the particle type used can influence the experimental outcome by for example unspecific binding of molecules to the particle surface like in case of PLA-particles. Never the less, MST provides the advantage to measure interactions in solution, which is important if one interaction partner is sensitive to surface immobilization. This become particularly relevant in the case of ELISA measurements where direct coating of the PLA-particles seemed to result in disruption of particles and adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers.

Discussion and Outlook

Here, we used a previously described Env/V3 model library and the mAb 447-52D to investigate the capacity of MST to determine affinities of antibody-Env interactions with increasing degrees of complexity, also under close-to-native conditions. Our results demonstrate that MST is capable to resolve the affinity ranking of the interaction between mAb 447-52D and gp120 and gp140 Env/V3 chimeras, as confirmed by ELISA. MN, being the best binding variant in all experiments, was closely followed by CDC42 and HXB2, which switched between the second and third place in affinity ranking in measurements within gp120 monomers and gp140 trimers, respectively. Low affinity variants RF and SF33 completed the V3 subset. Measurements with complex VLPs confirmed that MST is capable to determine affinities between antibodies and nanoparticle-presented Env molecules. It is important to note, that for MST and ELISA clear affinity ranking of high affinity variants MN, HXB2 and CDC42 was here rather difficult. First of all, VLPs do not represent well defined nanoparticles, but rather an inhomogeneous mixture of particles differing in size and amount and substructure of incorporated Env molecules. Therefore, it is difficult to normalize for the amount of Env in different VLP preparations and use equal amounts in MST and ELISA assays. Second, the binding affinities of variants MN, HXB2 and CDC42 hardly differ from each other. Both circumstances together therefore make it difficult to define a reliable affinity ranking. Furthermore, we could show that MST can determine affinities even in the presence of 50% human serum and despite the measurements suffered from higher background (resulting in higher SEM-values), caused by the complex serum environment, the overall ranking was preserved in measurements with gp120, gp140 and to some extent also in VLP-presented gp145 Env molecules. Overall, ELISA and MST provided similar results in the affinity ranking of the Env/V3 chimeras. However, the affinity values are only comparable within the respective measurement method used. This may be most probably due to completely different specific inherent measurement conditions of MST and ELISA.

With the intention to investigate more relevant next-generation Env immunogens, we analyzed native-like BG505 SOSIP.664 trimers and set of quarternary structure characterizing Abs by MST in buffer and 50% human serum and compared the results with data obtained from direct coating and His-capturing ELISAs. Measurements in buffer showed that the native-like structure of the BG505 SOSIP.664 trimers is preserved during MST analysis since we detected binding of all bNAbS (PGT145, GT151, VRC01, 2G12) and only marginal binding for non-neutralizing Ab F105. The results were validated by His-capturing ELISA and by comparing results of MST and His-capturing ELISA with a direct ELISA assay we demonstrated that direct coating of BG505 SOSIP.664 trimers destroys the native-like structure of the protein, which has been previously described by Schiffner et al. (PMC4702668). Further, we investigated the antigenicity profile of BG505 SOSIP.664 trimers in presence of 50% human serum. In MST analysis, we observed that the binding of non-neutralizing Ab F105 was slightly enhanced presence of 50% human serum, although we detected binding of the quarternary structure depending bNAbS PGT145 and PGT151, indicating that at least a small proportion of the trimers turned into a more open conformation in the presence of serum. However, this was not detected in His-capturing ELISA. This might be explained by 1) the exceptional sensitivity of MST based on the thermophoretic effect, which is very sensitive to changes in size, charge, and solvation shell of a molecule PMC3148787, and 2) that serum is present during the measurement itself, which is not the case in ELISA where serum was only present during the incubation of the primary Ab.

Furthermore, we investigated the antigenicity profile of BG505 SOSIP.664 trimers adsorbed to surface of PLA-particles which are promising delivery systems since they are biodegradable and also allow the incorporation of immunostimulatory molecules as further adjuvants PMID:25529572. Although, MST measurements suffered from background binding of the Abs, we could detect specific bind of all bNAbS and also binding non-neutralizing Ab F105. This indicates that PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers are present on the surface of the particles as mixture of native-like trimers and trimers with disturbed quarternary structure, which may result from undirected passive adsorption of trimers to the positively charged surface of the PLA-particles. The positively charged surface of the PLA-particles, is also the most likely reason for unspecific Ab background binding in measurements with empty control particles and likely contributes also to background binding in measurements with PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers. When we analyzed PLA-particles with adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers in direct ELISA, we expected results similar as in the MST analysis, because we assumed that immobilized PLA-particles will serve as platform to present BG505 SOSIP.664 trimers. However, we observed that the native-like structure of the BG505 SOSIP.664 trimers was completely disturbed, indicating a disruption of PLA-particles and BG505 SOSIP.664 trimers due to coating to ELISA plates. It has to be shown if this would be also the case in an ELISA setup where PLA-particles were titrated to immobilized antibodies although we avoided this ELISA setup in the first place because it requires high amounts of PLA-particles.

In summary, our study showed that MST can be a useful tool for the analysis of Env vaccine candidates for various reasons:

1. MST is capable to determine affinities of interactions, starting from very simple to complex ligand presentations, as we could show in an exemplary way for soluble and VLP-presented Env/V3 chimeras and also in measurements with BG505 SOSIP.664 trimers in soluble or PLA-adsorbed state. This, in principle, allows the antigenic characterization of soluble Env vaccines or nanoparticle-presented Env vaccines, using a single technology. This is from particular interest for nanoparticle-presented Env vaccines, as it became clear that they are more effective in B-cell stimulation compared to soluble versions of the protein (PMC4889521) (PMID:28592540). However inherent properties of nanoparticles and the experimental design strongly influence if it is possible to determine binding affinities (like in case of VLPs) or if the measurement is restricted to allow characterization of the antigenicity profile by comparing antibody binding profiles rather than by precise determination of binding affinities, like in case of PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers.
2. MST is applicable for nearly any kind of buffer, enabling analyses under close-to-native conditions, like it is shown in experiments with 50 % serum. This is of particular interest, for HIV vaccination studies, since the antigenic profile of Env vaccine candidates is, as state of the art, mostly assessed in artificial buffer and not under close-to-native conditions (such as serum), which is known to have considerable influence on protein structure and thereby on the antigenic profile. This is, for example, especially known for subtype-B Env proteins (PMC4337520). MST thereby offers the advantage that binding of antibodies can be directly detected in presence of serum components, which may also influence Ab

binding. Another possible application for MST is to analyze how different kinds of immunostimulatory adjuvants influence the antigenic profile of next generation Env immunogens, since to our knowledge only few studies addressed this issue in detail (PMC4972253, PMID:29669838).

3. The main advantage of MST over ELISA and other methods is that MST does not require surface immobilization. This might be important since immobilization of one interaction partner might interfere with the binding event or has negative influences on the structure of the immobilized protein or nanoparticles like we could show in direct ELISA measurements with BG505 SOSIP.664 trimers in a soluble or PLA-adsorbed state.
4. Other benefits of MST are fast assay development, short hands-on time as well as rapid measurements. Measurement of monomers, trimers and VLPs in buffer and serum were performed under comparable conditions with only minor adjustments (see Table 1). Other important methods, such as ITC, SPR and BLI require a quite labor intensive assay establishment. Furthermore, in comparison to ELISA, MST consumes only small amounts of sample material and is faster (see Table 4).

In conclusion, MST combines the advantages of low sample consumption, fast assay development and fast readout with high sensitivity and the possibility to analyze simple as well as complex interactions with only minor adjustments in assay conditions. Furthermore, MST enables the user to measure steady-state affinities under close-to-native conditions. Therefore, we consider MST as a valuable tool not only for the analysis of Env immunogens, but as a universal method to investigate the antigenic profiles of other immunogens like influenza hemagglutinin (HA) or Ebola glycoprotein (GP).

Table 1. Parameters and measurement conditions for MST analyses of gp120 monomers, gp140 trimers and VLP-presented gp145 Env/V3 chimeras in buffer **(A)** and 50% serum **(B)**. Indicated Env concentrations are calculated based on the molecular weights of corresponding gp120 monomers, gp140 trimers. **(C)** Measurement conditions for soluble and PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers in buffer and 50 % human serum. Env concentrations in PLA preparations were determined by BCA protein assay and calculated according to the corresponding molecular weight of BG505 SOSIP.664 trimers. Antibody concentrations were calculated assuming that the average size of an IgG molecule is 150 kDa. All experiments were performed in premium coated glass capillaries on a Monolith NT.115 pico device at 25°C (NanoTemper Technologies, Munich, Germany).

A)	gp120 monomers	gp140 trimers	VLP-presented gp145
Fluorescent-labeled interaction partner	Alexa647-labeled 447-52D at 0.25 - 0.5 nM	Alexa647-labeled 447-52D at 0.05 nM	DY-647P1-labeled VLPs with Env concentrations (ng/ μ l): MN: 0.09 HXB2: 0.041 CDC42: 0.19 SF33: 0.16 RF: 0.26
Titrant	MN: 50 nM - 2 pM HXB2: 1556 nM - 50 pM CDC42: 826 nM - 25 pM RF: 920 nM - 28 pM SF33: 1101 nM - 34 pM	MN: 25 nM - 1 pM HXB2: 100 nM - 3 pM CDC42: 100 nM - 3 pM RF: 100 nM - 3 pM SF33: 2569 nM - 78 pM	447-52D: 1803 nM - 55 pM
Reaction buffer	HBS-EP		
MST power	80 %		
LED power	30 - 85 %	100 %	2 – 20 %

B)	gp120 monomers	gp140 trimers	VLP-presented gp145
Fluorescent-labeled interaction partner	Alexa647-labeled 447-52D at 0.5 nM		DY-647P1-labeled VLPs with Env concentrations (ng/ μ l): MN: 0.09 HXB2: 0.041 CDC42: 0.19 SF33: 0.16 RF: 0.26
Titrant	MN: 800 nM - 24 pM HXB2: 1556 nM - 50 pM CDC42: 800 nM - 24 pM RF: 800 nM - 24 pM SF33: 800 nM - 24 pM	MN: 25 nM - 1 pM HXB2: 100 nM - 3 pM CDC42: 100 nM - 3 pM RF: 100 nM - 3 pM SF33: 100 nM - 3 pM	447-52D: 900 nM - 27 pM
Reaction buffer	50 % HBS-EP, 50 % human serum (v/v)		
MST power	80 %		
LED power	5 - 7 %	10 - 15 %	10 – 20 %

C)	BG505 SOSIP.664 trimers		PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers	
	Buffer	50 % human serum	Buffer	50 % human serum
Fluorescent-labeled interaction partner	Alexa647-labeled mAbs VRC01, PGT145, PGT151, F105 and 2G12 at 0.25 nM			
Titrant	BG505 SOSIP.664: 150 nM - 5 pM		PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers: 96 nM - 3 pM	
Reaction buffer	HBS-EP	50 % HBS-EP,	50 % HBS-EP,	50 % PBS,

		50 % human serum (v/v)	50 % PBS (v/v)	50 % human serum (v/v)
MST power	80 %			
LED power	15 - 30 %	12 - 20 %	30 %	15 %

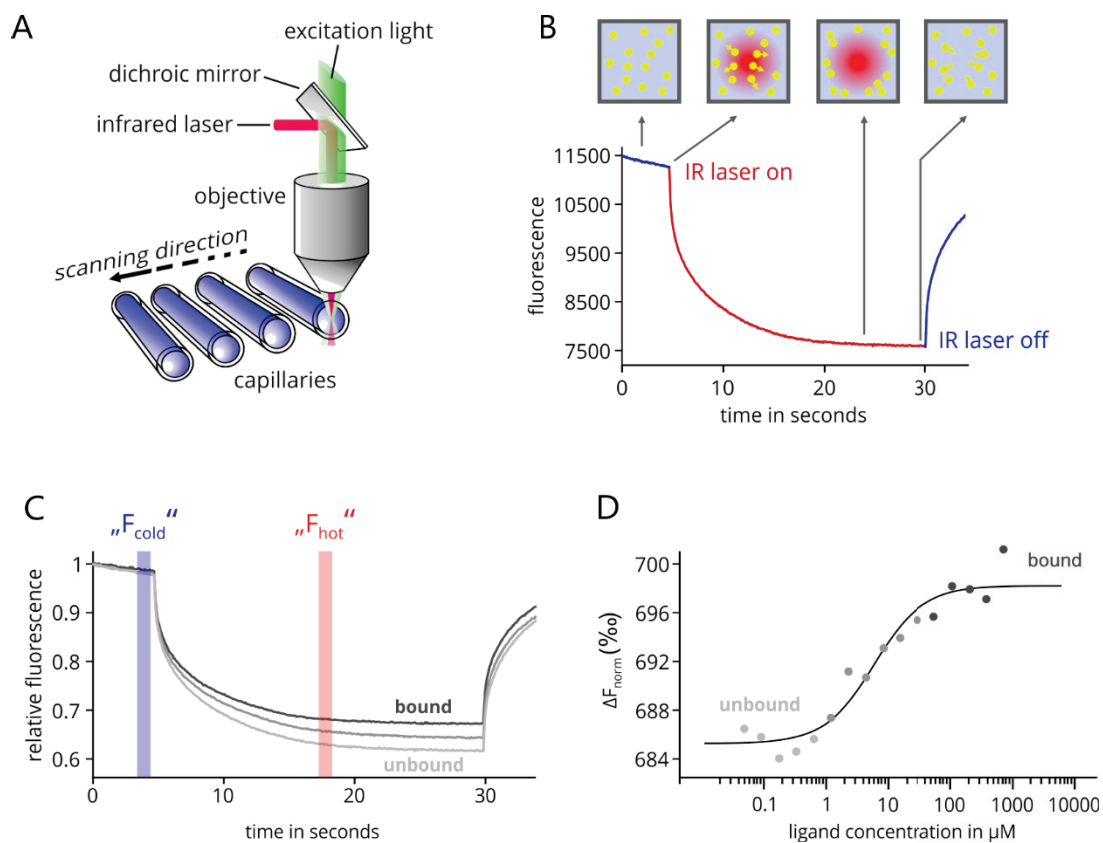


Figure 1. **(A)** Technical setup of MicroScale Thermophoresis (MST). Thin glass capillaries are filled with sample molecules. Fluorescence signals originating from the optically visible interaction partner in the sample are monitored via optics. A thermal gradient is applied by a laser source. Changes in fluorescence can be used to monitor thermophoretic movement of the molecules in solution **(B)** MST time trace (movement profile) of 447-52D with increasing amounts of monomeric Env/V3 chimera HXB2 in buffer. Fluorescence is monitored over time. After an initial five second cold phase (laser off), the laser is switched on and establishes the temperature gradient. After the T-Jump phase, in which the fluorescent dye decreases its signal yield upon heat induction, the thermophoretic movement takes place. After 30 seconds the laser is turned off and the molecules diffuse back. **(C)** Results of the 447-52D vs HXB2 monomers in buffer experiment: The MST time traces of 16 capillaries containing the same concentration of labeled 447-52D and an increasing concentration of the unlabeled HXB2 are recorded and plotted on one graph. Note that only three traces are shown here in order to enhance readability of the image. **(D)** For analysis, the change in MST signal is expressed as the change in the normalized fluorescence (ΔF_{norm}), which is defined as $F_{\text{hot}}/F_{\text{cold}}$. Normalized fluorescence of the MST traces is plotted against the concentration of HXB2. The data points are fitted in order to obtain binding parameters such as the binding affinity.

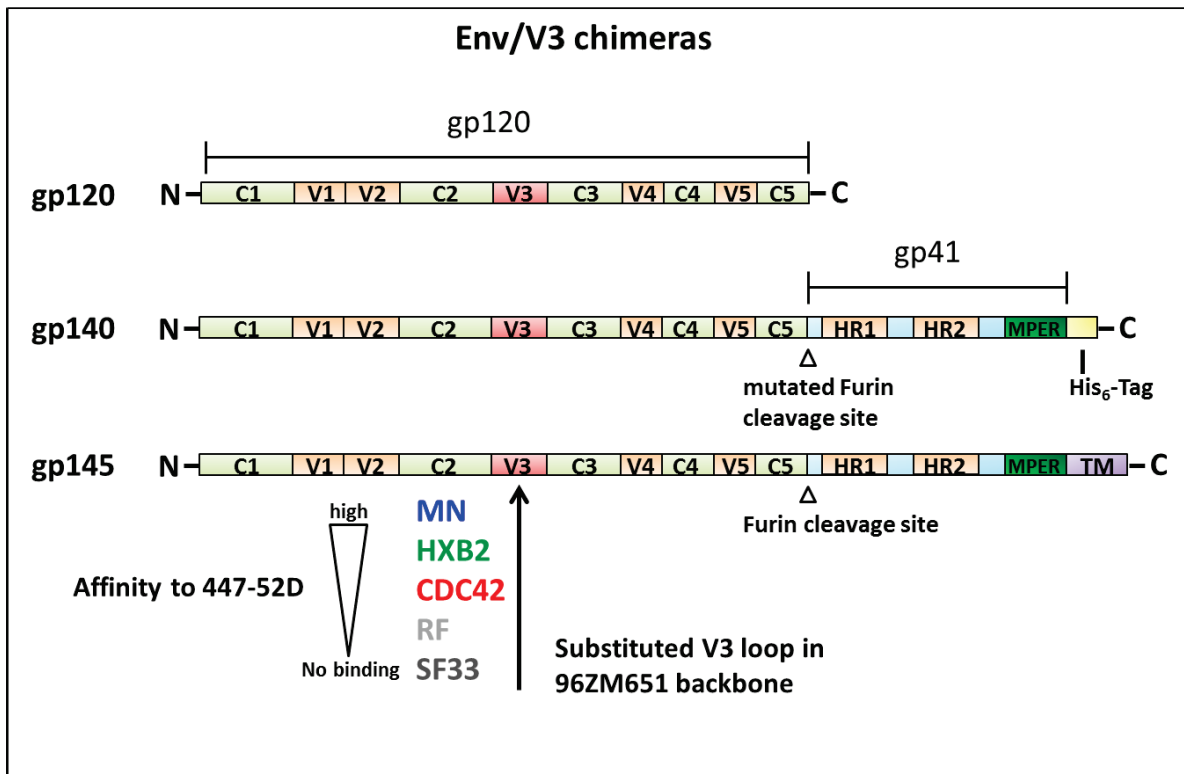


Figure 2. Linear representation of soluble monomeric gp120, trimeric gp140 and membrane-bound gp145 Env/V3 chimeras. The V3 loop of the HIV-1 isolate 96ZM651 was substituted by the V3 loops of the isolates MN, HXB2, CDC42, RF and SF33, resulting in chimeric Env variants with distinct binding affinities to the mAb 447-52D. To create soluble gp140 versions of the proteins the gp41 transmembrane domain (TM) was deleted and a C-terminal His-tag was added for affinity purification. Furthermore, the natural cleavage site was changed from REKR to REKS to prevent cleavage. To create monomeric gp120 versions of the proteins the gp41 domain was deleted.

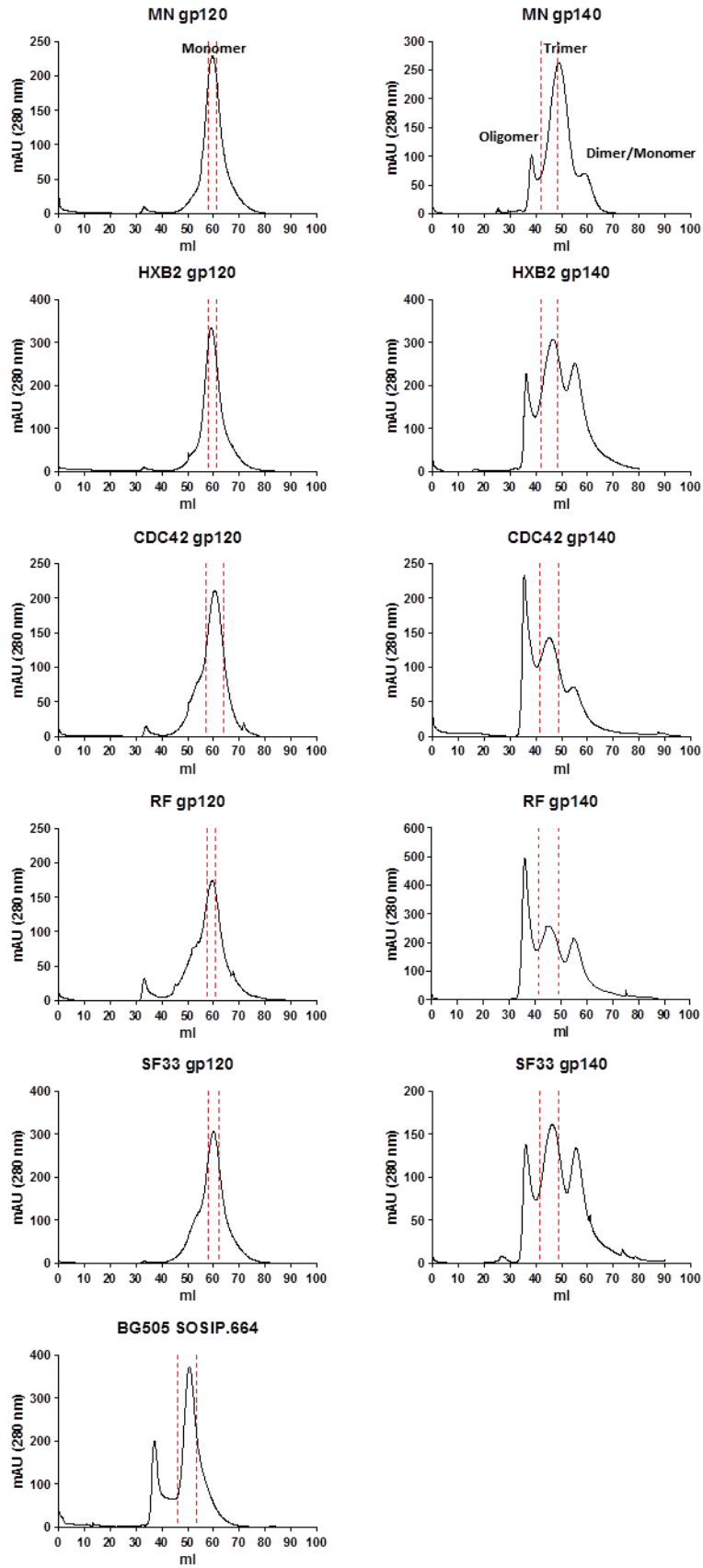


Figure 3. Preparative size exclusion chromatography profiles (HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR column) of affinity purified gp120/gp140 Env/V3 chimeras, transiently expressed in FreeStyle™ 293-F cells. Fractions between red lines were pooled.

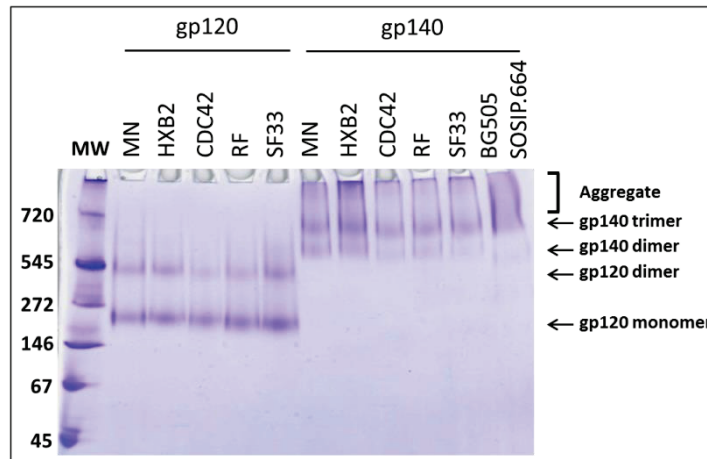


Figure 4. BN-PAGE analysis of affinity/SEC purified gp120/gp140 Env/V3 chimeras. Molecular weights of marker proteins (MW) are indicated (in kDa).

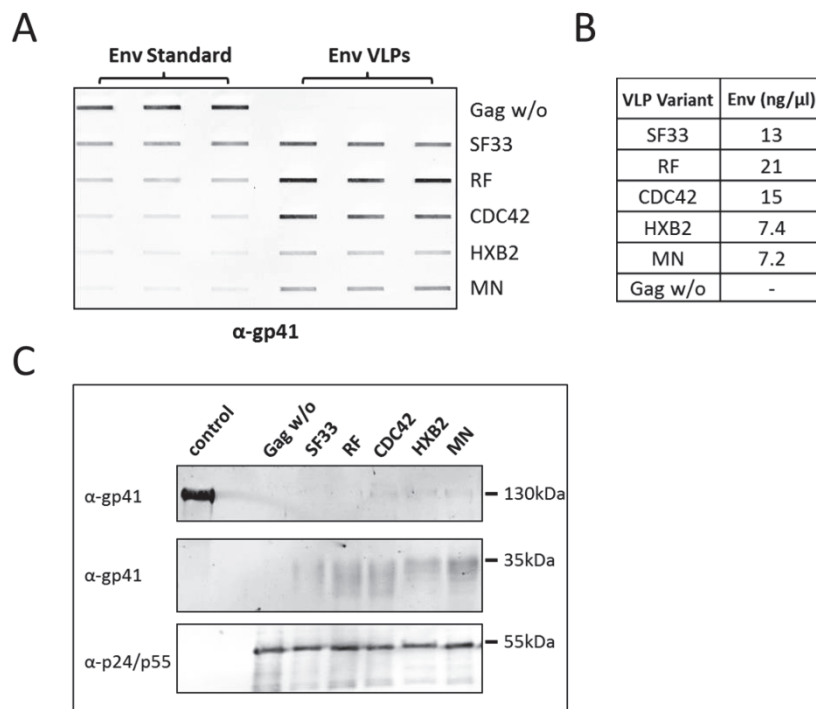


Figure 5. Slot blot and Western Blot analysis of Env/V3 pseudotyped VLPs. **(A)** Semi-quantitative analysis of Env concentrations in VLP preparations. 0.25 μ l of VLP variants were loaded in triplicates on a slot blot and stained with α -gp41 mix. A serial dilution of a soluble gp140 standard protein (96ZM651) was used to calculate the amount of Env in VLP preparations **(B)**. Bald VLPs (Gag w/o) were used as negative control. **(C)** Western Blot analysis of Env/V3 pseudotyped VLP preparations. VLP samples were loaded on a reducing SDS gel and analyzed by immunoblotting for presence of Gag (α -p24/p55 antibody CB-13/5) and Env (α -gp41 mix). Co-banding of Gag and Env in Env/V3 VLPs (**lane 4-8**) indicates incorporation of Env into VLPs. A strong gp41 signal at 35 kDa, compared to the signal at 130 kDa, indicates that the protein is predominantly cleaved. Bald Gag VLPs (Gag w/o) (**lane 3**) and soluble gp140 (**lane 1, control**) were used as negative and positive controls, respectively.

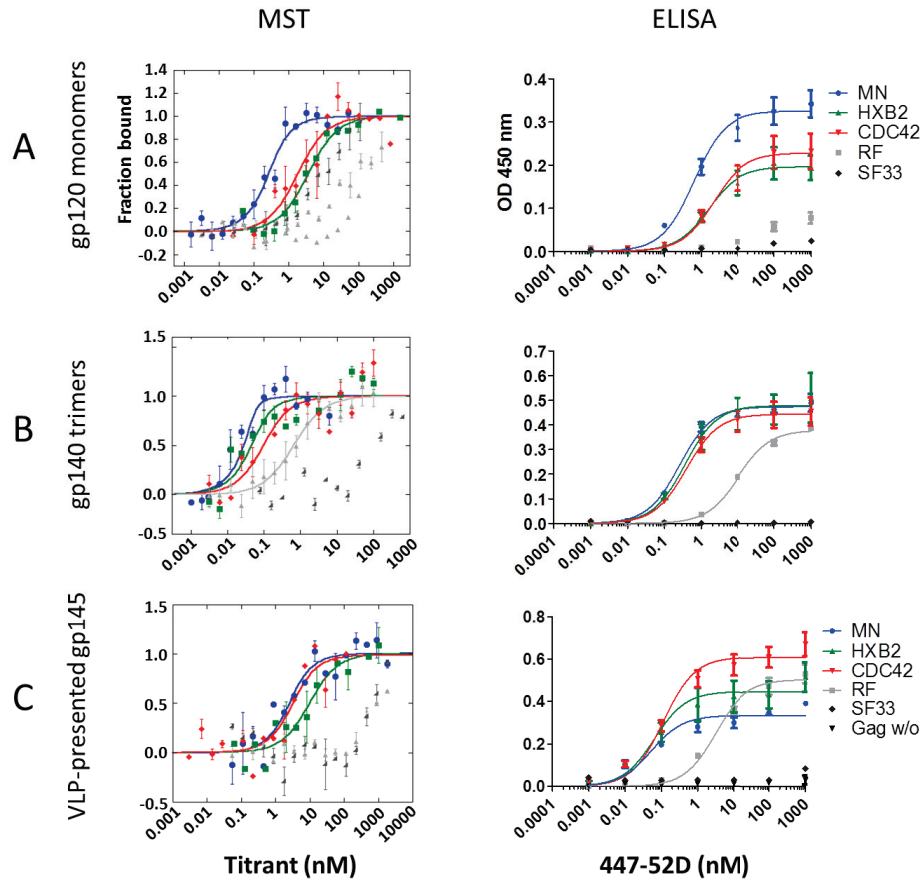


Figure 6. Interaction of mAb 447-52D with Env/V3 chimeras in buffer, quantified by MST (**left panels**) and ELISA (**right panels**). Panels **(A)**, **(B)** and **(C)** show the MST analyses of the interactions between mAb 447-52D and monomeric gp120, trimeric gp140 Env/V3 chimeras, and Env/V3 pseudotyped VLPs. Env molecules, diluted in buffer, were titrated to the Alexa647-labeled 447-52D, which was kept at constant concentration. MST analysis of Env/V3 pseudotyped VLPs was performed in an inverse setup (447-52D was titrated to DY-647P1-labeled VLPs). Results of the MST measurements are presented as normalized binding curves of at least two independent experiments, error bars reflect the standard error of the mean (SEM) of the independent experiments. Validation of MST by ELISA: Binding of 447-52D to monomeric gp120 and trimeric gp140 Env/V3 chimeras was assessed by a lectin (*Galanthus nivalis*) capture ELISA (negative control: wells coated with lectin, incubated with PBS). 447-52D, diluted in PBS, was titrated to immobilized Env molecules at indicated concentrations and a horseradish peroxidase (HRP) coupled polyclonal rabbit anti-human Ab was used for readout. Env/V3 pseudotyped VLPs were directly coated to ELISA plates and analyzed in the same way (negative control: Bald VLPs (Gag w/o)). All ELISAs were performed in two independent experiments, error bars reflect the SEM of the independent experiments.

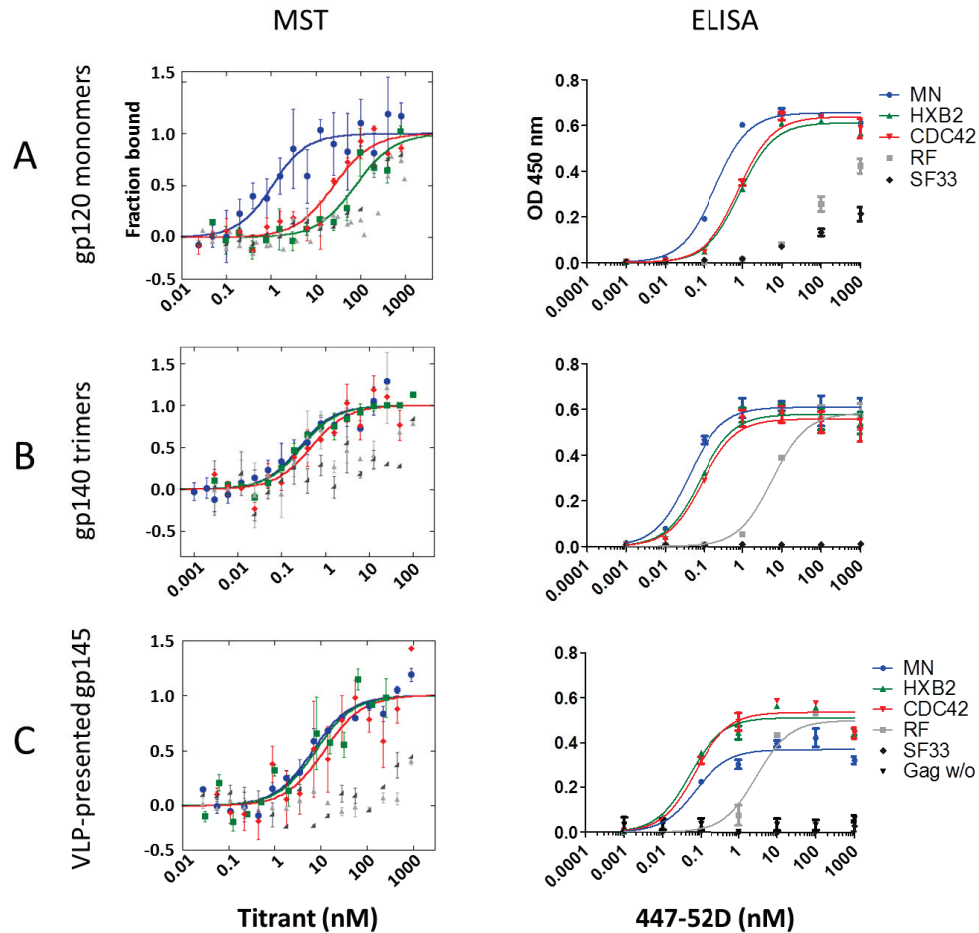


Figure 7. Interaction of mAb 447-52D with Env/V3 chimeras in 50% human serum, quantified by MST (**left panels**) and ELISA (**right panels**). Panels **(A)**, **(B)** and **(C)** show the MST analyses of the interactions between mAb 447-52D and monomeric gp120, trimeric gp140 Env/V3 chimeras and Env/V3 pseudotyped VLPs. Env molecules, diluted in buffer with 50% human serum, were titrated to the Alexa647-labeled 447-52D, which was kept at constant concentration. MST analysis of Env/V3 pseudotyped VLPs was performed in an inverse setup (447-52D, diluted in buffer with 50% human serum, was titrated to DY-647P1-labeled VLPs). Results of the MST measurements are presented as normalized binding curves of at least two independent experiments, error bars reflect the standard error of the mean (SEM) of the independent experiments. Validation of MST by ELISA: Binding of 447-52D to monomeric gp120 and trimeric gp140 Env/V3 chimeras was assessed by a lectin (*Galanthus nivalis*) capture ELISA (negative control: wells coated with lectin, incubated with PBS). Biotinylated 447-52D, diluted in PBS with 50% human serum, was titrated to immobilized Env molecules at indicated concentrations and streptavidin-POD conjugate was used for readout. Env/V3 pseudotyped VLPs were directly coated to ELISA plates and analyzed in the same way (negative control: Bald VLPs (Gag w/o)). All ELISAs were performed in two independent experiments, error bars reflect the SEM of the independent experiments.

BG505 SOSIP.664

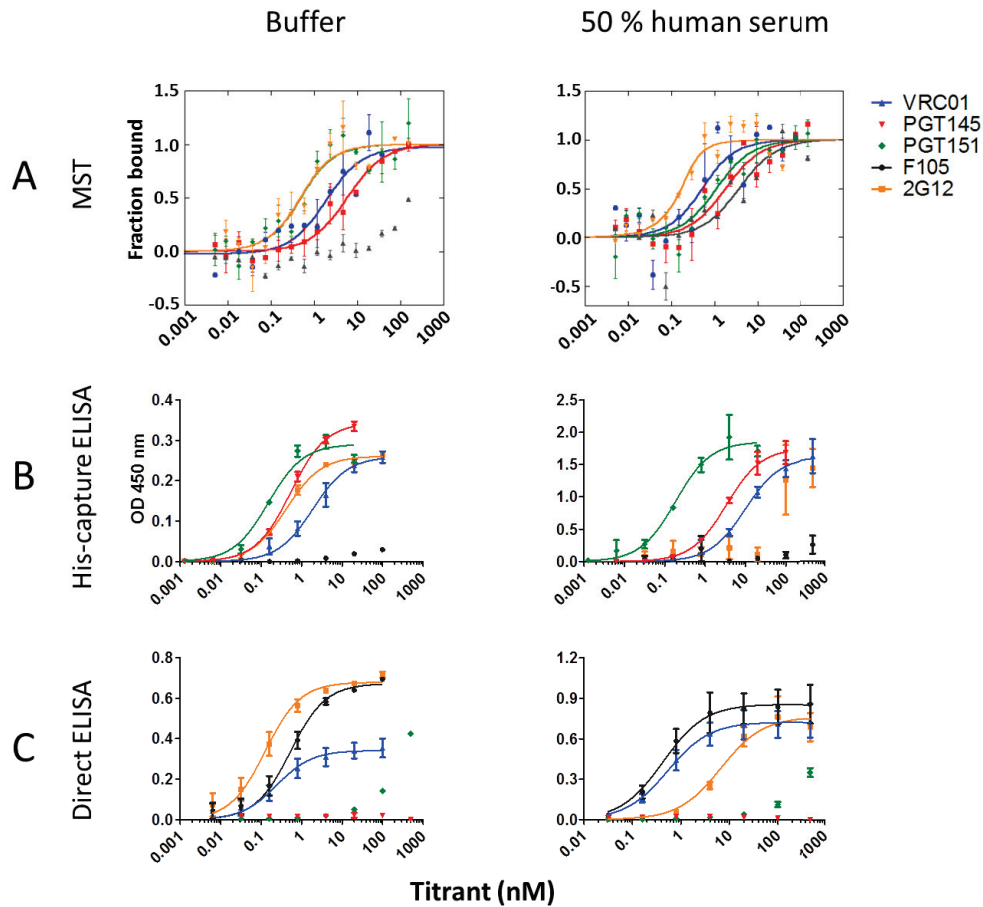


Figure 8. Interactions of BG505 SOSIP.664 with a panel of quaternary structure characterizing mAbs in buffer and 50 % human serum, quantified by MST, His-capture and direct ELISA. For MST analysis BG505 SOSIP.664, diluted in buffer or 50 % human serum, was titrated to Alexa647-labeled mAbs (VRC01, PGT145, PGT151, F105, 2G12), kept at constant concentration. Results in buffer (**A, left panel**) and 50 % human serum (**A, right panel**), are presented as normalized binding curves of two independent experiments, error bars reflect the standard error of the mean (SEM) of the independent experiments. His-capturing ELISAs were performed by immobilizing His-tagged BG505 SOSIP.664 trimers via coated anti-His Ab. In case of direct ELISAs BG505 SOSIP.664 trimers were directly coated to ELISA plates. MAb, diluted in PBS, were titrated to captured/coated BG505 SOSIP.664 trimers at indicated concentrations (negative controls: wells with PBS). A horseradish peroxidase (HRP) coupled polyclonal rabbit anti-human Ab was used for readout. Results of His-capture and direct ELISAs in buffer are shown in (**B, C left panel**). His-capture and direct ELISAs in 50 % human serum (**B, C, right panel**) were performed the same way, with the differences that biotinylated mAbs were diluted in 50 % human serum and streptavidin-POD conjugate was used for readout. All ELISA experiments were performed in two independent experiments, error bars reflect the SEM of the independent experiments.

PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664

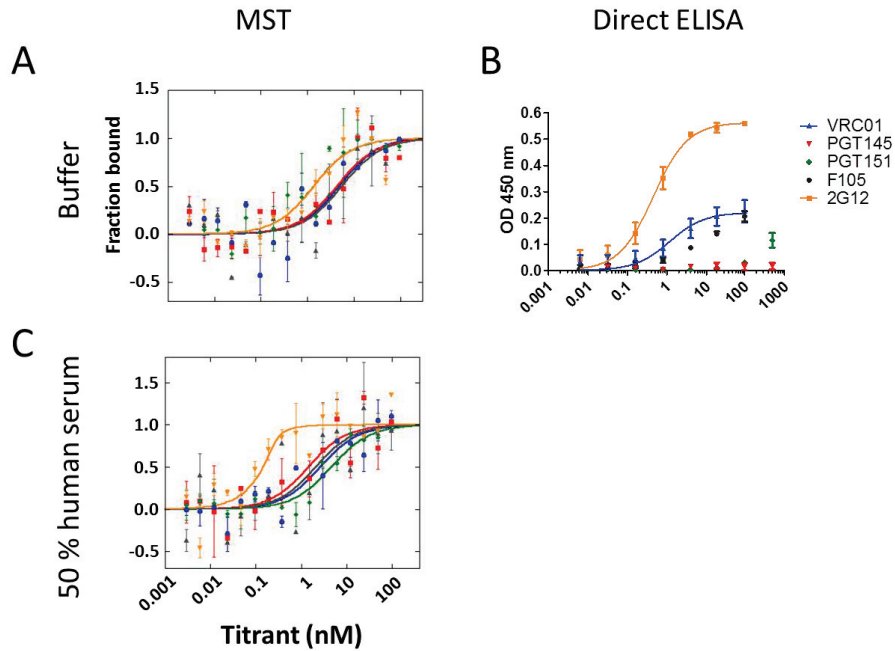


Figure 9. Interactions of PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664 with a panel of quarternary structure characterizing mAbs in buffer and 50 % human serum, quantified by MST and direct ELISA. For MST analysis PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664, diluted in buffer or 50 % human serum, was titrated to Alexa647-labeled mAbs (VRC01, PGT145, PGT151, F105, 2G12), kept at constant concentration. Results in buffer (A) and 50 % human serum (C), are presented as normalized binding curves of two independent experiments, error bars reflect the standard error of the mean (SEM) of the independent experiments. Results of direct ELISA in buffer are shown in (B). For direct ELISAs PLA-adsorbed BG505 SOSIP.664 trimers were directly coated to ELISA plates. MAbs, diluted in PBS, were titrated to coated PLA-particles at indicated concentrations (negative controls: empty PLA-particles). A horseradish peroxidase (HRP) coupled polyclonal rabbit anti-human Ab was used for readout. ELISA experiments were performed in two independent experiments, error bars reflect the SEM of the independent experiments.

Table 2. Equilibrium binding affinities (K_D) of the 447-52D-Env/V3 chimera interactions in buffer (A) and 50% human serum (B). K_D -values represent the mean value, \pm the standard error of the mean (SEM), of n experiments. Detectable, but not saturated signals were excluded from K_D -fitting and are therefore designated as "binding indicated" (b.i.). ELISA K_D -values

were calculated by using non-linear least squares regression (GraphPad Prism5). MST K_D -values are computed by the K_D -fit model of KaleidaGraph.

A) K_D (nM) in buffer							
	gp120 monomers		gp140 trimers		VLP-presented gp145		
Env/V3 chimera	MST (n=3)	ELISA (n=2)	MST (n=3)	ELISA (n=2)	MST (n=2)	ELISA (n=2)	Affinity Ranking
MN	0.14 ± 0.05	0.63 ± 0.14	0.0025 ± 0.0044	0.26 ± 0.03	1.5 ± 0.9	0.053 ± 0.018	1
HXB2	3.4 ± 0.8	1.6 ± 0.6	0.020 ± 0.019	0.36 ± 0.13	8.7 ± 4.0	0.064 ± 0.028	2/3
CDC42	1.6 ± 0.7	2.2 ± 0.7	0.070 ± 0.058	0.39 ± 0.10	2.1 ± 1.5	0.11 ± 0.03	2/3
RF	b.i.	b.i.	0.62 ± 0.18	11 ± 1	b.i.	3.2 ± 0.6	4
SF33	b.i.	b.i.	b.i.	-	b.i.	-	5

B) K_D (nM) in 50 % human serum							
	gp120 monomers		gp140 trimers		VLP-presented gp145		
Env/V3 chimera	MST (n=2)	ELISA (n=2)	MST (n=3)	ELISA (n=2)	MST (n=2)	ELISA (n=2)	Affinity Ranking
MN	0.80 ± 0.42	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.09	0.040 ± 0.009	5.7 ± 1.9	0.073 ± 0.021	1
HXB2	75 ± 37	0.86 ± 0.11	0.23 ± 0.06	0.079 ± 0.015	6.7 ± 4.7	0.052 ± 0.013	2/3
CDC42	25 ± 10	0.80 ± 0.12	0.42 ± 0.22	0.090 ± 0.020	11 ± 8	0.072 ± 0.018	2/3
RF	b.i.	b.i.	b.i.	5.7 ± 1.1	b.i.	2.9 ± 0.8	4
SF33	b.i.	b.i.	b.i.	-	b.i.	-	5

Table 3. Equilibrium binding affinities (K_D) of BG505 SOSIP.664 - antibody interactions in buffer (**A**) and 50 % human serum (**B**). K_D -values represent the mean value, ± the standard error of the mean (SEM), of n experiments. Detectable, but not saturated signals were excluded from K_D -fitting and are therefore designated as “binding indicated” (b.i.). ELISA K_D -values

were calculated by using non-linear least squares regression (GraphPad Prism5). MST K_D -values are computed by the K_D -fit model of KaleidaGraph.

A) K_D (nM) in buffer				B) K_D (nM) in 50 % human serum			
BG505 SOSIP.664				BG505 SOSIP.664			
Antibody	MST (n=2)	Capt. ELISA (n=2)	Direct ELISA (n=2)	Antibody	MST (n=2)	Capt. ELISA (n=2)	Direct ELISA (n=2)
VRC01	1.7 ± 1.0	1.9 ± 0.4	0.25 ± 0.08	VRC01	0.39 ± 0.36	9.8 ± 2.3	0.54 ± 0.16
2G12	0.35 ± 0.20	0.42 ± 0.06	0.13 ± 0.02	2G12	0.042 ± 0.041	b.i.	6.7 ± 2.0
F105	b.i.	b.i.	0.53 ± 0.08	F105	3.5 ± 2.4	b.i.	0.43 ± 0.14
PGT145	5.6 ± 1.3	0.54 ± 0.04	-	PGT145	1.6 ± 0.9	3.4 ± 0.5	-
PGT151	0.36 ± 0.18	0.15 ± 0.03	b.i.	PGT151	0.97 ± 0.48	0.18 ± 0.05	b.i.

	MST	ELISA
Amount titrant	Antibody: ~1.8 µg Env: ~2.8 µg	Antibody: ~9 µg
Amount labeled interaction partner MST/ solid phase ELISA	Antibody: ~0.72 – 7.2 ng VLPs: ~4-25 ng	Env: ~400 ng VLPs: ~200 ng
Hands on time	~15 min	~60 min
Duration experiment	~20 min for measurement of 16 capillaries	~5h

Table 4. Comparison of MST and ELISA regarding consumables and experimental effort. MST calculations are based on 16 dilutions (1:2 dilution series, starting with 1000 nM) with a volume of 6 µl/capillary. ELISA calculations are based on 8 dilutions (1:10 dilution series, starting with 1000 nM) and 50 µl/well.

Dans ce travail, nous avons pu démontrer que la MST est un outil utile pour étudier le profil antigénique des immunogènes Env qui ont une structure trimère native, structure conservée pendant l'analyse en MST, en comparant la BG505 SOSIP trimérique et un panel d'anticorps caractéristiques des structures quaternaires. Nous avons ainsi pu montrer que la structure native des trimères BG505 SOSIP est préservée lorsque l'analyse est faite dans des tampons, tandis que la présence de sérum humain (à 50 %) semble avoir une légère influence négative sur la structure du trimère. En effet, une liaison à l'anticorps F105 a été détectée, mais aussi une liaison à tous les bnAb utilisés dans cette expérience, y compris la structure quaternaire-dépendante de PGT145 et PGT151. En outre, nous avons pu montrer que la MST est utile pour déterminer le profil antigénique des immunogènes Env présentés par les particules, bien que les particules de PLA peuvent lier de façon non spécifique des molécules à la surface des particules. Néanmoins, la MST offre l'avantage de mesurer les interactions en solution, ce qui est important si un partenaire d'interaction est sensible à l'immobilisation de surface. Cela est particulièrement pertinent dans le cas des mesures ELISA où le « coating » direct des particules de PLA semblait casser les liaisons des particules et des trimères de BG505 SOSIP adsorbés.

La BG505 SOSIP, un immunogène induisant des anticorps neutralisant à large spectre

L'un des obstacles majeurs pour le développement d'un vaccin protecteur contre le VIH est l'utilisation d'un immunogène capable d'induire des anticorps neutralisants à large spectre (bnAb). A ce jour, l'approche la plus prometteuse est l'utilisation de la BG505 SOSIP qui expose autant d'épitopes d'anticorps neutralisants à large spectre que possible, tout en excluant les anticorps non neutralisants (nnAbs). De par la mutation introduite dans la BG505 (SOS : pont disulfure, IP : mutation d'une isoleucine en proline). La BG505 SOSIP est un hétérotrimère très stable et très homogène, mimant presque parfaitement la gp160 native. Par ailleurs la fixation gp120/gp41 par un pont disulfure évite le relargage de la gp120 lors de l'immunisation et le choix d'un isolat de primo-infection comme souche virale en font l'immunogène actuel de référence dans le domaine. Des essais cliniques sont actuellement en cours. La glycoprotéine BG505 SOSIP (gp140), qui adopte la conformation native de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH, est ainsi le meilleur élément prometteur d'un vaccin contre le VIH pour induire des anticorps protecteurs. Sa capacité à induire une réponse neutralisante robuste a récemment été démontrée chez le NHP. Afin de mimer l'enveloppe du virus dans son état mature et

d'exposer au mieux les sites potentiels de neutralisations par les bNAbs, les glycoprotéines BG505 SOSIP sont adsorbées sur des nanoparticules (NPs) de taille similaire au VIH (130nm). De plus, l'exposition d'épitopes neutralisants a pu être mise en évidence, indiquant la bonne conformation de la glycoprotéine BG505 SOSIP à la surface des NPs.

1.3. Evaluation des réponses immunitaires induites par l'injection des NP-BG505 SOSIP

a. Protocole d'immunisation

Pour cette expérience nous avons voulu comparer les réponses immunitaires induites par l'injection des NP-BG505 SOSIP. Nous avons étudié la réponse systémique par des prélèvements sanguins, ainsi que la réponse muqueuse avec le prélèvement des fèces et des lavements vaginaux. De plus, nous avons mis à mort 3 souris par groupes, 7 jours après chaque immunisation afin de prélever le ganglion inguinal gauche, visé lors de l'injection. Les ganglions ont ensuite été analysés en microscopie afin d'évaluer l'apparition des centres germinatifs, corrélat d'une forte réponse immunitaire. Afin d'optimiser nos formulations d'intérêt nous avons encapsulé à l'intérieur de nos nanoparticules un ligand stimulant un récepteur de l'immunité innée, le Gardiquimod (ligand TLR7). Les TLR7 détectent les ARN simple brin des virus comme ceux du VIH ou du virus de l'hépatite C. Le fait d'encapsuler un ligand de l'immunité innée devrait augmenter la réponse immunitaire induite. Comme contrôle positif nous avons utilisé l'AddaVax, qui est l'équivalent du MF59 (adjuvant huileux commercialisé dans la plupart des vaccins actuels) pour la recherche.

Les souris CB6F1 femelles de 7 semaines sont hébergées au PBES (ENS de Lyon, France). Les souris CB6F1 sont issues d'un croisement d'une femelle BALB/c et d'un mâle C57BL/6. Ce croisement permet d'obtenir des souris capables d'induire des réponses aussi bien humorales que cellulaires.

Le protocole est approuvé par le Comité Rhône-Alpes d'Éthique pour l'Expérimentation Animale (France). Cinq groupes de 14 souris ont été nécessaires pour cette expérience. Les groupes ont été divisés comme suit :

1. NP
2. NP(Gardi)
3. NP-BG505 SOSIP
4. NP(Gardi)-BG505 SOSIP
5. AddaVax + BG505 SOSIP

Résultats - Adsorption de la BG505 SOSIP du VIH-1 sur les particules de PLA

L'immunisation des souris a été faite selon le protocole ADITEC, développé par un consortium Européen afin d'homogénéiser et comparer les résultats obtenus par les différents laboratoires. Ce protocole requiert l'utilisation de souris CB6F1 et une immunisation toutes les 3 semaines ¹⁸⁹. Les souris ont été immunisées par voie sous-cutanée visant le ganglion inguinal avec 5 µg de BG505 SOSIP par injection dans 100 µL de formulation. Le protocole est résumé figure 24.

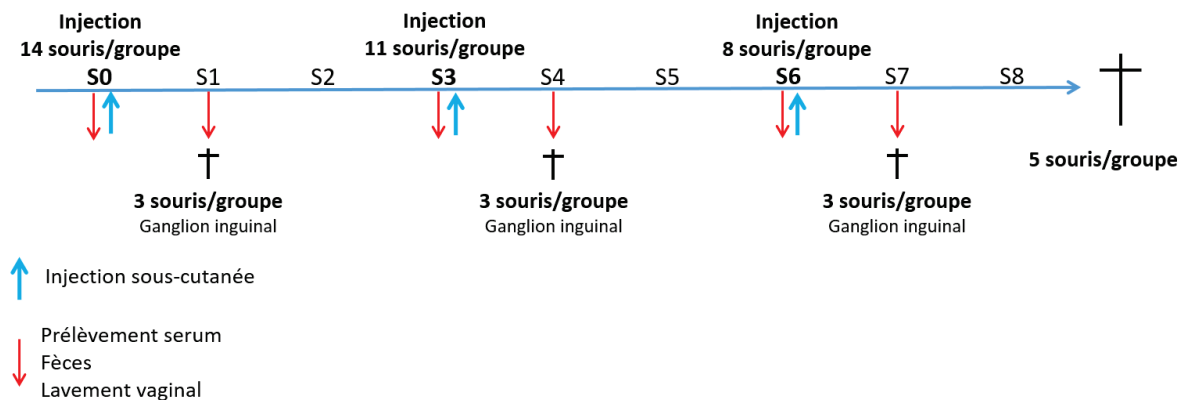


FIGURE 24 : PROTOCOLE D'IMMUNISATION DES SOURIS CB6F1 POUR EVALUER LES REPONSES IMMUNITAIRES INDUITES PAR L'INJECTION DE NP-BG505 SOSIP.

Ce protocole a été mis en place pour analyser 3 paramètres

- Evaluation de la réponse immunitaire induite par la BG505 SOSIP adsorbée sur les NP, et comparaison avec l'AddaVax (MF59-like), contrôle positif.
- Etude de l'encapsulation d'un ligand stimulant un récepteur de l'immunité innée (TLR7 dans notre cas)
- Analyse de la production des centres germinatifs dans le ganglion drainant (ganglion inguinal visé lors de l'injection sous-cutanée)

b. Prélèvements de sang, fèces et lavements vaginaux

Avant chaque immunisation puis régulièrement jusqu'à J224, le sang des souris est prélevé par voie rétro-orbitale et le sérum est isolé après centrifugation. Les sécrétions vaginales sont collectées par lavage avec 50 µL de PBS introduits dans le vagin des souris à l'aide d'une pipette (Pipette M100, Gilson) et de cônes (CP100, Gilson) adaptés. Dix microlitres de 10 x Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) sont ajoutés aux lavements vaginaux pour protéger les anticorps de la dégradation. Trois à cinq fèces par souris sont collectées et

Résultats - Adsorption de la BG505 SOSIP du VIH-1 sur les particules de PLA

diluées à 100 mg/mL avec le cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les échantillons sont centrifugés 10 min à 16000 x g et conservés à -20°C jusqu'à analyse.

c. Détection des anticorps anti-BG505 SOSIP et mesure de l'avidité des anticorps

La présence d'IgG et d'IgA anti-BG505 SOSIP est détectée par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Des plaques 96-puits (Nunc) sont recouvertes avec 100 µL de protéine BG505 SOSIP à 1 µg/mL pour une nuit à température ambiante. L'excès de BG505 SOSIP est éliminé et les plaques sont saturées avec 200 µL de lait écrémé à 10% pendant 1h à 37°C. Les plaques sont lavées avec du PBS-Tween 0,05% par un laveur automatique de plaques (Thermo Scientific). Les échantillons de sérum sont dilués dans du PBS-BSA 1% et 100 µL de solution sont déposés dans chaque puits et incubés pendant 1h à 37°C. Après lavage, des anticorps de détection anti-IgG et IgA conjugués à la HRP (Horseradish Peroxydase) sont dilués au 1 :10000ème et ajoutés dans les puits. Après 1h d'incubation à 37°C, les plaques sont lavées et 100 µL de tetramethylbenzidine (TMB, BD Biosciences) sont ajoutés pour révélation de la présence d'IgG et d'IgA. La réaction est stoppée par ajout de 1N H₂SO₄ et la densité optique est mesurée à 450 nm, avec une correction à 620 nm par un spectrophotomètre.

Pour l'analyse de l'avidité, nous dupliquons les plaques et suivons le même protocole d'ELISA, excepté pour l'étape de lavage après le dépôt des échantillons. Lors de ce lavage, une plaque sera lavée « classiquement » avec du PBS-Tween (condition non réductrice) tandis que l'autre plaque sera lavée avec de l'urée 8 M (condition réductrice). L'analyse de l'avidité se calcule par la formule : $(DO \text{ réducteur}) / (DO \text{ non-réducteur}) \times 100$. L'avidité se classe en trois niveaux : faible (<30%), intermédiaire (30-50%) et haute avidité (>50%) selon le pourcentage calculé.

1.4. Résultats

a. Induction d'une longue réponse immunitaire systémique, aussi forte que l'AddaVax

Pour évaluer la réponse immunitaire induite nous avons quantifié les titres d'IgG anti-BG505 SOSIP jusqu'à 224 jours post-immunisation (Figure 25). De façon attendue, les deux groupes contrôles (NP et NP(Gardi)) n'induisent pas d'IgG anti-BG505 SOSIP.

Concernant les trois groupes d'intérêt, on observe que les titres d'IgG sériques atteignent très rapidement des titres autour de 10^5 , puis après la dernière injection (J42) les titres restent

stables à 10^6 et ceci jusqu'à 224 jours post-immunisation (32 semaines, un peu moins de 8 mois). Bien que nous observions une légère augmentation des titres pour les formulations avec l'AddaVax, nous n'obtenons pas de différence significative entre les groupes NP-BG505, NP(Gardi)-BG505 et AddaVax-BG505. Nous observons un léger effet de l'encapsulation du ligand de TLR7 dans les nanoparticules, mais qui est modeste par rapport aux précédents résultats de l'équipe sur les ligands de l'immunité innée.

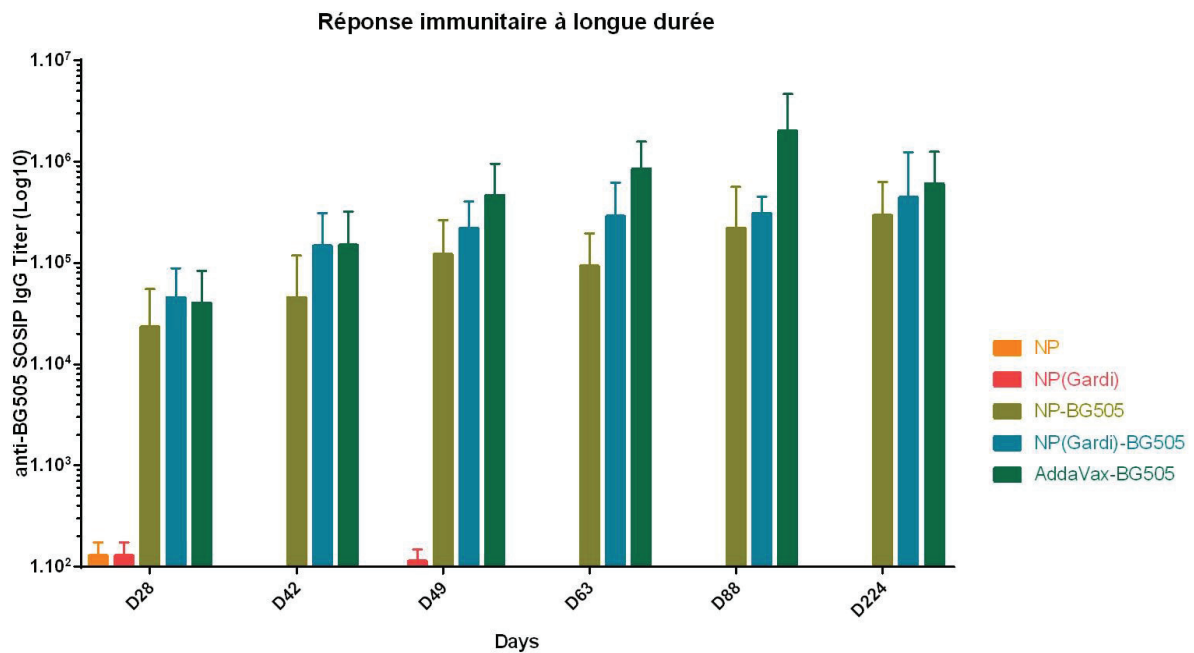


FIGURE 25 : REPOSE IMMUNITAIRE LONGUE DUREE APRES 3 INJECTIONS SOUS-CUTANEEES.

Suivi des titres d'IgG sériques au cours du temps, jusqu'à 32 semaines post-immunisation. Différence non-significative entre les groupes NP-BG505, NP(Gardi)-BG505, AddaVax-BG505.

b. Réponse immunitaire systémique aussi forte que l'AddaVax mais meilleure avidité des anticorps

Les ELISA à J63 ont été réalisés en duplicat en utilisant soit un lavage non réducteur (PBS-Tween), soit réducteur (Urée 8 M dans du PBS-Tween) après dépôt de l'échantillon et avant le dépôt des anticorps conjugués (IgG dans notre cas), pour évaluer l'avidité des anticorps générés *in vivo* contre la BG505 SOSIP. Afin qu'un test d'avidité soit interprétable, il est nécessaire d'obtenir des absorbances comprises entre 1 et 1,5. C'est pourquoi ne sont représentés ici que les résultats à J63, car les absorbances des temps cinétiques suivants ne permettaient pas d'avoir suffisamment d'échantillons par groupe. De plus, comme représenté sur la figure 26, du fait de la limite d'absorbance comprise entre 1 et 1,5 nous n'avons que trois souris dans le groupe AddaVax qui peuvent être prises en compte pour l'analyse du test.

Résultats - Adsorption de la BG505 SOSIP du VIH-1 sur les particules de PLA

Comme pour les titres d'IgG, nous n'obtenons pas de différence significative entre les trois groupes d'intérêt (Figure 26). Cependant nous observons une avidité supérieure lorsque la BG505 SOSIP est adsorbée sur les PLA (55 %), et cette avidité est augmentée lorsque le Gardiquimod est encapsulé à l'intérieur des particules (65 %), comparé à l'AddaVax (22 %). Nous n'avons pas pu faire d'analyse statistique car le nombre de souris entre les groupes était différent.

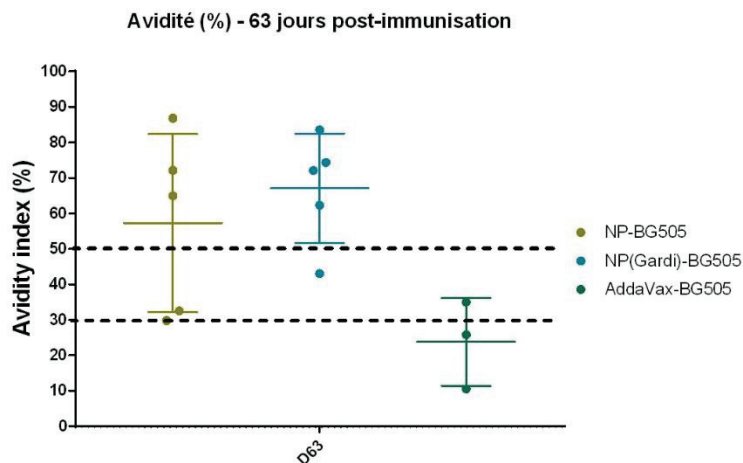


FIGURE 26 : AVIDITE DES ANTI-IGG BG505 SOSIP INDUITS PAR LES FORMULATIONS D'INTERET A J63.

c. Absence de réponse muqueuse

En parallèle de l'analyse systémique nous avons étudié les réponses muqueuses induites en prélevant les fèces et en faisant des lavements vaginaux. Pour l'analyse muqueuse nous avons déterminé les titres d'IgG mais aussi d'IgA (Figure 27). Nous représentons que les absorbances à J42, mais elles sont représentatives de ce que l'on a obtenu pour toutes les dates de prélèvement. Comme représenté sur la figure 28, nous n'avons induit aucun anti-IgA ou anti-IgG par nos formulations, que ce soit dans les fèces ou dans les lavements vaginaux.

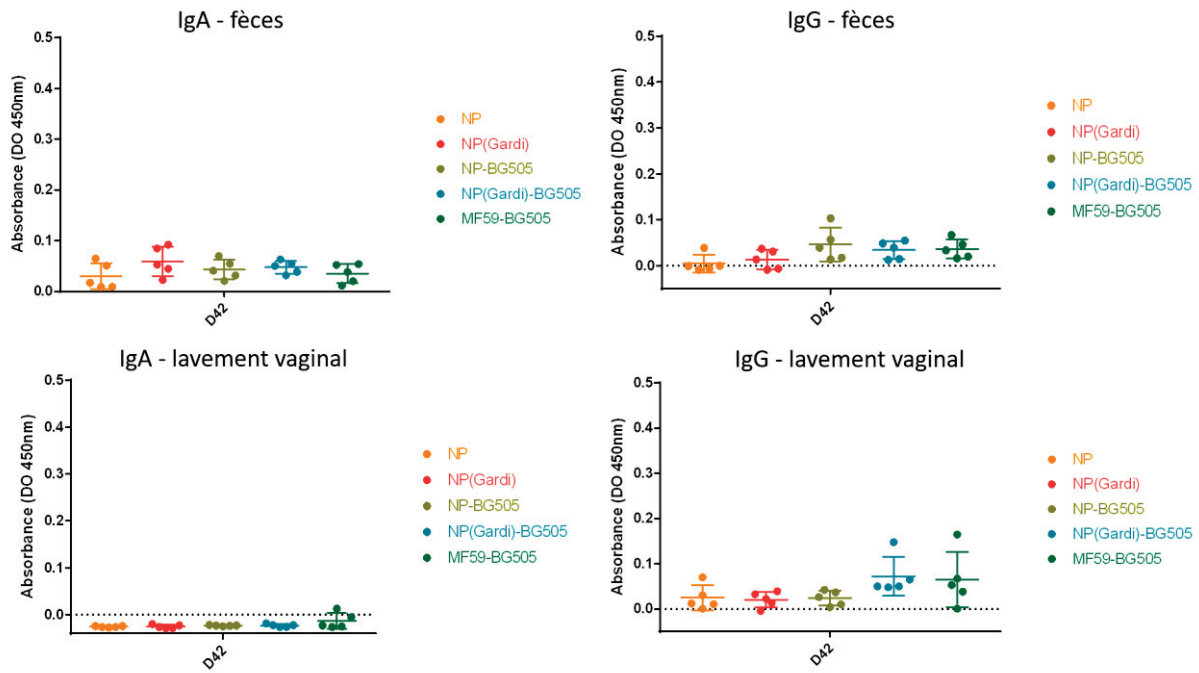


FIGURE 27 : ABSENCE DE REPONSE MUQUEUSE ANTI-IgG ET ANTI-IgA BG505 SOSIP

1.5. Conclusion

Après avoir étudié les caractéristiques physico-chimiques de nos formulations, nous avons étudié la réponse systémique induite par les NP-BG505 SOSIP chez la souris. Concernant les trois groupes d'intérêt (NP-BG505 SOSIP, NP(Gardi)-BG505 SOSIP et AddaVax-BG505 SOSIP) nous observons des titres IgG anti-BG505 SOSIP de l'ordre de 1.10^6 et stables jusqu'à 8 mois. Nous n'obtenons pas de différence significative entre les groupes. Cependant, nous remarquons un léger effet de l'encapsulation du ligand de TLR7 (Gardiquimod) dans les nanoparticules, comparé au groupe NP-BG505 SOSIP.

Lors de l'analyse de l'avidité des IgG, comme pour les titres d'IgG, nous n'obtenons pas de différence significative entre les trois groupes d'intérêt. Cependant nous observons une avidité supérieure lorsque la BG505 SOSIP est adsorbée sur les PLA (55 %), et cette avidité est augmentée lorsque le Gardiquimod est encapsulé à l'intérieur des particules (65 %), comparé à l'AddaVax (22 %).

II. Etude de la biodistribution *in vivo* des particules de PLA en tomographie selon leurs voies d'administration

Ces deux dernières décennies ont vu l'émergence de divers systèmes de délivrance en vaccination. Ces vecteurs peuvent avoir des propriétés physico-chimiques très variées permettant un large panel d'applications. Durant mes travaux de thèse, j'ai travaillé avec des particules polymériques à base de poly(acide lactique) (PLA), un polymère biodégradable et biocompatible. L'avantage de ces particules, d'une taille moyenne de 200 nm, est la possibilité d'adsorber à leur surface et/ou d'encapsuler des molécules immunostimulantes ou antigènes. Des travaux précédents de l'équipe ont démontré l'intérêt de ces formulations pour la potentialisation de réponses immunitaires dans le modèle murin ^{160,161}. Cependant, le mécanisme permettant l'induction de ces réponses immunitaires était mal compris. Un des objectifs de ces travaux était de comprendre la prise en charge des particules après leur administration et leur biodistribution dans l'organisme. Nous avons cherché à savoir si les particules restaient au site d'injection, si elles étaient redirigées vers des organes de l'immunité tels que la rate ou les ganglions, et en combien de temps ces particules étaient présentes dans l'organisme.

Pour tenter de répondre à ces questions, nous nous sommes appuyés sur la tomographie optique de fluorescence grâce au système FMT 4000 (Fluorescence Molecular Tomography, Perkin Elmer, États-Unis) : cette méthode permet d'obtenir des mesures fonctionnelles sur les petits animaux, en visualisant les organes cibles en 3 dimensions. Un des avantages premiers de cette technique est qu'elle est non invasive. En effet, elle offre la possibilité d'observer des animaux vivants, et par conséquent de suivre au sein d'un même animal la biodistribution des particules dans le temps. Nous avons encapsulé dans des NP de PLA le fluorophore DiR (1,1'-dioctadecyl-3,3',3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide) (Figure 28), pouvant être détecté par le FMT 4000. Nous avons ensuite administré ces formulations dans les mêmes conditions que nous administrons les formulations vaccinales, par voie sous-cutanée, intranasale ou par gavage, puis nous avons suivi la biodistribution des particules dans le temps.

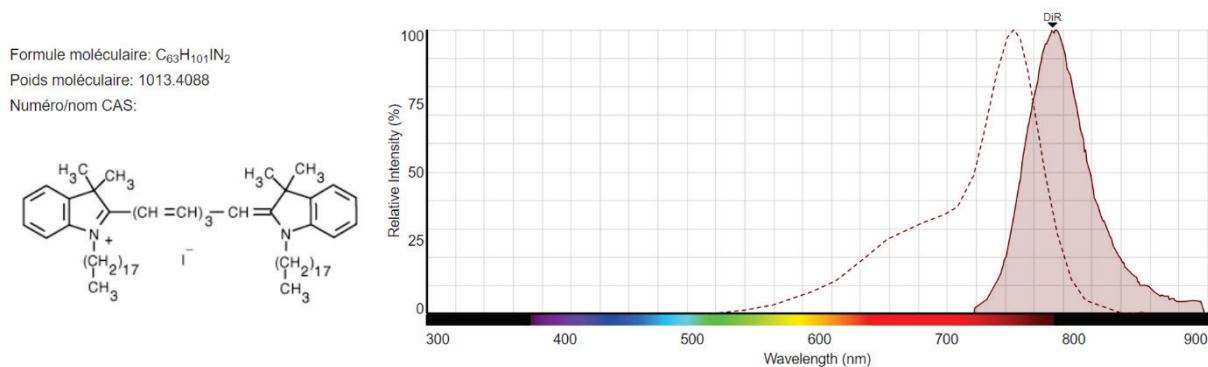


FIGURE 28 : STRUCTURE CHIMIQUE ET SPECTRE DE FLUORESCENCE DU FLUOROPHORE DiR

2.1. Matériel et Méthodes

a. Préparation des nanoparticules fluorescentes

Un fluorophore, le DiR (Thermo Fisher Scientific, λ_{ex} : 750nm, λ_{em} : 780nm, Figure 28), est encapsulé dans des nanoparticules de PLA lors de l'étape de nanopréciipitation. Les particules utilisées ont été synthétisées par la méthode de nanopréciipitation¹⁸⁶, détaillée dans la section précédente. Brièvement, le PLA et le fluorophore sont dissous dans la phase organique composée d'acétone (ratio polymère/acétone à 2% m/v, concentration de fluorophore/polymère à 0,02% m/v) et la solution est placée dans une ampoule à décanter. Une solution aqueuse composée d'un mélange eau/éthanol est placée dans un ballon en verre sous agitation magnétique fixée à 250 RPM. La phase organique est coulée goutte à goutte dans la phase aqueuse. Les solvants (acétone et éthanol) sont éliminés sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 30°C. La dispersion colloïdale finale dans le ballon est composée de particules de PLA dans l'eau. Durant toute l'opération, la solution est conservée à l'abri de la lumière.

b. Administration des formulations aux animaux

Les souris choisies pour cette expérience sont des souris SKH1 (Charles River) qui ont la particularité d'être dépourvues de poils tout en étant immunocompétentes. L'absence de poils permet de s'affranchir du signal parasite. Cinq animaux par groupe ont reçu les formulations de particules ou le fluorophore libre par quatre modes d'administration : administration sous-cutanée, intra-veineuse, intra-nasale et par gavage (Tableau 6).

Les administrations sous-cutanée et intra-veineuse sont réalisées par injection de 100 μ L de solution à un taux de solide de 0,5% (identique au taux de solide moyen utilisé pour les essais

d'immunisation) sur des souris SKH1 âgées de 8 semaines. L'administration intra-nasale est réalisée sur des souris légèrement anesthésiées à l'isoflurane. Dix microlitres de formulation sont administrés dans chaque narine. Le gavage est effectué sur souris vigiles avec l'administration de 400 µL de formulation par une sonde de gavage (Tableau 5).

Voie d'administration	Site d'administration	Mode d'administration	Volume administré
Sous-cutanée	Visant le ganglion inguinal	Seringue/aiguille	100 µL
Intra-veineuse	Veine sinus rétro-orbital	Seringue/aiguille	100 µL
Intra-nasale	Narines	Pipette/cônes	10 µL par narine
Gavage	Estomac	Sonde de gavage	400 µL

TABLEAU 5: VOIES D'ADMINISTRATION TESTÉES ET VOLUMES ADMINISTRÉS

c. Suivi des particules par tomographie optique de fluorescence

Au temps souhaité (5 min, 6 h, 24 h, 48 h puis toute les semaines si persistance du signal), les souris subissent une anesthésie gazeuse et sont placées dans des cassettes pour observation. Le système est pourvu d'un poste d'anesthésie permettant à la souris de rester endormie, et donc immobile. La cassette est introduite dans le système FMT 4000 et le profil d'adsorption et de fluorescence des souris est généré après transillumination des animaux. Ensuite, une normalisation de la fluorescence mesurée est effectuée par le système, minimisant les effets de distorsion et prenant en compte les frontières des différentes surfaces et organes. Pour finir, une étape de reconstruction est réalisée par le FMT 4000 afin de présenter une image analysable.

La possibilité de calibrer le système avec des concentrations connues de fluorophore permet de quantifier le fluorophore présent aux différents sites au cours du temps.

2.2. Résultats

a. Particules fluorescentes

Les NP utilisées pour ces expériences ont une taille moyenne de 185 nm et un indice de polydispersité de 0,203, signifiant qu'elles sont plutôt homogènes. Cette taille est conforme à celle des particules utilisées pour les essais de vaccination. Cette concordance est très importante car la taille des particules est un paramètre qui influence leur prise en charge, et

Résultats - Etude de la biodistribution *in vivo* des particules de PLA

par conséquent leur distribution dans l'organisme ⁴¹. La concentration molaire du DiR est de 26 μM et le taux de solide de 4,89%. Pour obtenir un taux de solide de 0,5% (identique au taux de solide moyen utilisé pour les essais d'immunisation), les particules sont diluées dans du PBS, le fluorophore a une concentration finale de 2,7 μM .

b. Biodistribution après administration sous-cutanée

Après injection de la formulation par voie sous-cutanée au niveau de l'intérieur de la cuisse gauche (Figure 29A), les animaux ont été anesthésiés à différents temps post-administration et la biodistribution des particules suivie dans le temps. La première observation concerne la concentration mesurée par le FMT. Juste après administration des particules fluorescentes, on observe en moyenne 280 pmol de DiR au niveau du site d'injection (Figure 29B). Les solutions administrées ayant une concentration en DiR de 2,7 μM , on devrait observer environ 270 pmol de DiR au niveau du site d'injection, ce qui est conforme avec les observations effectuées. Ce fluorophore est donc bien détecté par le tomographe et la calibration semble opérationnelle. Le signal le plus puissant est localisé au niveau du site d'injection. On remarque qu'après administration, la formulation semble diffuser autour de ce site. Six heures après administration, un animal a été mis à mort pour analyse. De la fluorescence est observée dans le ganglion inguinal drainant le site d'injection (résultats observés après prélèvement de la rate, du foie, des reins et des ganglions inguinaux drainant ou non le site d'injection, non présenté). Les particules restent présentes au niveau du site d'injection pendant une longue durée car un signal est toujours détectable après 37 jours. Le signal décroît progressivement sur toute la durée de l'analyse.

Résultats - Etude de la biodistribution *in vivo* des particules de PLA

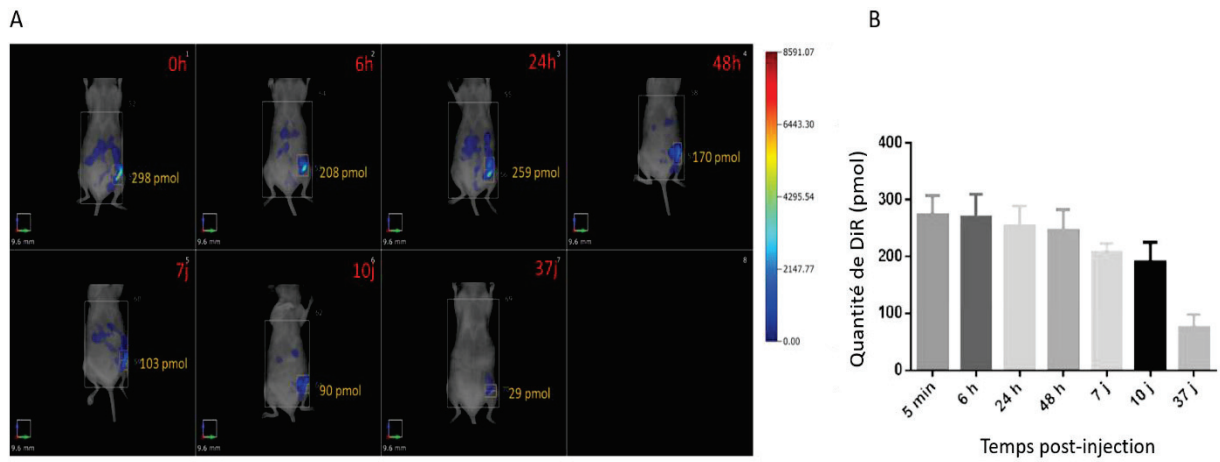


FIGURE 29 : BIODISTRIBUTION DES PARTICULES DANS L'ORGANISME DES SOURIS A DIFFERENTS TEMPS POST-INJECTION APRES ADMINISTRATION SOUS-CUTANEE. (A) EXEMPLE D'UNE SOURIS REPRESENTATIVE DES 5 ANIMAUX ANALYSES. (B) QUANTITE DE DiR MOYENNE DANS L'ORGANISME DES SOURIS EN FONCTION DU TEMPS

c. Biodistribution après administration intra-veineuse

Après injection de la formulation par voie intra-veineuse par la veine du sinus rétro-orbital, les animaux ont été anesthésiés à différents temps post-administration et la biodistribution des particules suivie dans le temps (Figure 30). Nous observons que dès l'injection, il y a 80 % des particules stockées dans le foie. Dès 14 jours nous n'observons plus qu'un faible signal.

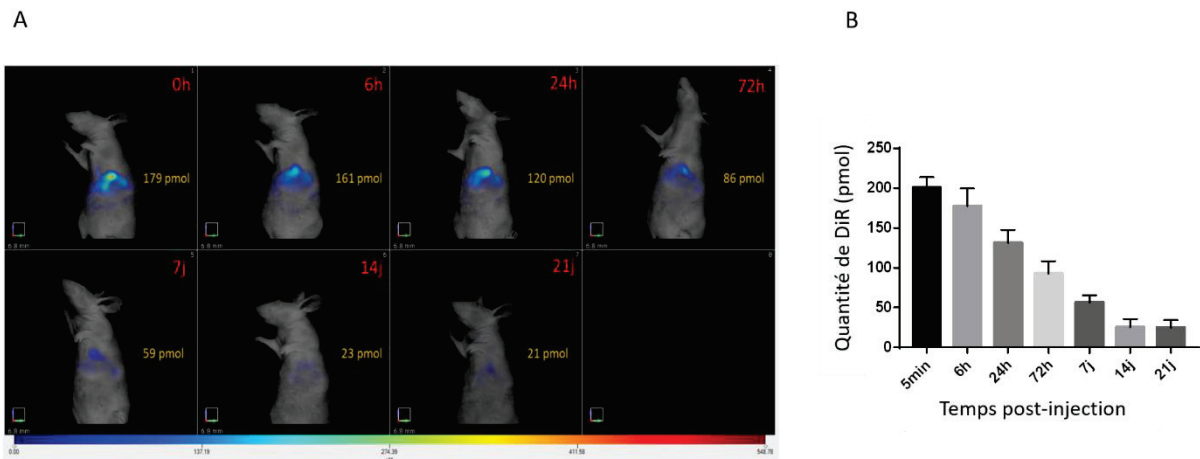


FIGURE 30 : BIODISTRIBUTION DES PARTICULES DANS L'ORGANISME DES SOURIS A DIFFERENTS TEMPS POST-INJECTION APRES ADMINISTRATION INTRA-VEINEUSE. (A) EXEMPLE D'UNE SOURIS REPRESENTATIVE DES 5 ANIMAUX ANALYSES. (B) QUANTITE DE DiR MOYENNE DANS L'ORGANISME DES SOURIS EN FONCTION DU TEMPS

d. Biodistribution après administration intra-nasale

Après administration de la formulation par voie intra-nasale, les animaux ont été anesthésiés à différents temps post-administration et la biodistribution des particules suivie dans le temps (Figure 31). Cinq minutes après administration, les particules se situent dans les voies aériennes supérieures des souris. Six heures après administration, le signal a fortement diminué (presque un tiers). Un faible signal est observé en bas de l'abdomen des souris, mais son intensité est négligeable. Après 24 heures, plus aucun signal n'est détecté.

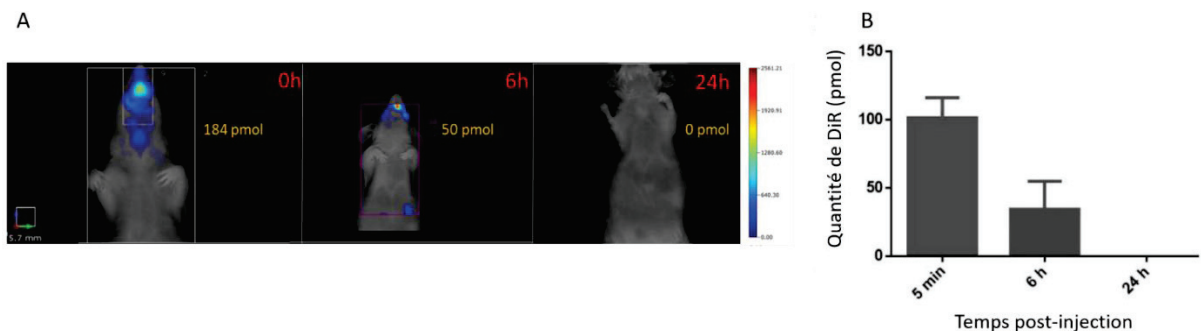


FIGURE 31 : BIODISTRIBUTION DES PARTICULES DANS L'ORGANISME DES SOURIS A DIFFERENTS TEMPS POST-INJECTION APRES ADMINISTRATION INTRA-NASALE. (A) EXEMPLE D'UNE SOURIS REPRESENTATIVE DES 5 ANIMAUX ANALYSES. (B) QUANTITE DE DIR MOYENNE DANS L'ORGANISME DES SOURIS EN FONCTION DU TEMPS

e. Biodistribution après administration par gavage

Après administration de la formulation par gavage, les animaux ont été anesthésiés à différents temps post-administration et la biodistribution des particules suivie dans le temps (Figure 32). Cinq minutes après administration, les particules se situent majoritairement au niveau de l'estomac. Six heures après administration, les particules sont distribuées dans l'estomac et dans les intestins. On remarque également que les fèces des animaux contiennent les formulations administrées. Après 24 heures, aucun signal n'est détecté, que ce soit dans les fèces ou dans l'organisme des souris.

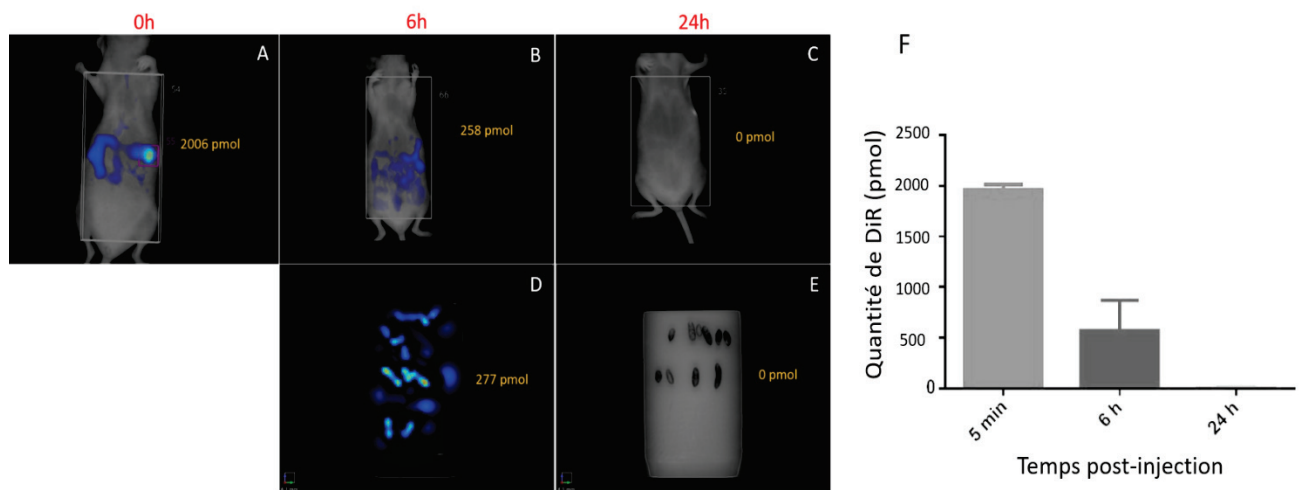


FIGURE 32 : BIODISTRIBUTION DES SOURIS A DIFFERENTS TEMPS POST-INJECTION APRES GAVAGE. (A-C) IMAGES CORPS ENTIER A 0H, 6H ET 24H. (D-E) IMAGES DES FECES A 6H ET 24H. (F) QUANTITE DE DIR MOYENNE DANS L'ORGANISME DES SOURIS EN FONCTION DU TEMPS

2.3. Discussion

Des méthodes d'analyse permettant d'observer la localisation de particules dans les organes existent¹⁹⁰, notamment avec l'utilisation de la fluorescence^{191,192} ou de marquages radioactifs¹⁹³. Cependant, la plupart des méthodes d'analyse nécessitent la mise à mort, la dissection des animaux et le prélèvement des organes pour une meilleure précision. L'émergence de la tomographie moléculaire de fluorescence permet l'observation de la biodistribution de composés fluorescents dans l'organisme entier, sans dissection¹⁹⁴. Cette méthode semble adaptée pour le suivi de particules polymériques telles que les NP de PLA.

Cette analyse nous a permis de mieux comprendre la biodistribution et la cinétique d'élimination des NP de PLA dans le modèle murin. Tandis que les particules subsistent plus d'un mois dans l'organisme après administration sous-cutanée, et une dizaine de jours par voie intraveineuse, la majeure partie de ces dernières est éliminée 24 heures après administration par voie muqueuse (intra-nasale ou gavage).

2.4. Conclusion

Cette expérience a permis la mise au point d'une technique permettant le suivi des particules de PLA dans le modèle murin. Elle nous donne des informations sur la persistance des particules dans l'organisme et leur distribution après administration. La possibilité de suivre les particules dans un même individu au cours du temps présente de nombreux avantages : on s'affranchit de la variabilité entre individus et on suit le trajet réel des particules au sein de chaque individu.

De plus, cette méthode permet de limiter le nombre d'animaux utilisés pour l'expérimentation. Ces particules pouvant être fonctionnalisées (adsorption en surface et encapsulation de molécules), il serait intéressant de voir si ces modifications peuvent influencer la biodistribution des particules.

III. Développement d'un gel thermosensible contenant des particules de PLA : caractérisations *in vitro* et évaluation de leur potentiel immunostimulant *in vivo* contre l'antigène p24

La nature amphiphile des poloxamers leur confère d'excellentes capacités de solubilisation vis-à-vis d'un grand nombre d'actifs, qui permet de réduire le volume administré ¹⁸⁰. De plus, les propriétés bioadhésives peuvent être exploitées pour augmenter le temps de résidence des formulations au site d'action. L'effet concomitant des deux propriétés précitées conduit à une amélioration de la biodisponibilité ¹⁸⁰. De plus les poloxamers sont largement reconnus pour leurs propriétés de relargage modulables ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

Afin d'optimiser ces propriétés galéniques intéressantes, la tendance actuelle montre une complexification des systèmes galéniques proposés avec notamment (i) le mélange de poloxamers entre eux ou avec d'autres polymères afin d'optimiser les propriétés rhéologiques des formulations ^{182,183} et (ii) l'inclusion de transporteurs (particules) permettant d'améliorer le contrôle du relargage et le ciblage thérapeutique ^{170,171,184}.

Dans ce projet, nous avons optimisé l'utilisation de ces hydrogels comme outil vaccinal afin d'augmenter la biodisponibilité des NP de PLA.

Nous avons tout d'abord déterminé les concentrations optimales de poloxamers afin d'induire une gélification *in situ* aux alentours de 32°C, ceci afin de s'assurer une prise « instantanée » de l'hydrogel lors d'une injection sous-cutanée. Pour cela, nous avons étudié différentes concentrations de poloxamers, avec différents ratios de P407 et de P188, en présence ou non de NP de PLA. Cela nous a permis de sélectionner une formulation d'intérêt, que nous avons caractérisé par des études de stabilité, d'érosion et d'observation en microscopie à balayage. Suite à cela, nous avons pu évaluer leur biodistribution par tomographie optique de fluorescence qui nous permet l'acquisition d'images corps entier en trois dimensions. Pour finir, nous avons évalué les réponses immunitaires induites par notre formulation d'intérêt. L'ensemble des résultats est présenté dans l'article 2.

Manuscript Number:

Title: Injectable thermosensitive hydrogel containing biodegradable nanoparticles enhances avidity of humoral responses after one single injection.

Article Type: Research paper

Keywords: thermosensitive hydrogel;
poloxamers;
biodegradable nanoparticles;
single-shot vaccines;
sustained release;
humoral response;
avidity

Corresponding Author: Dr. Bernard Verrier, PhD

Corresponding Author's Institution: CNRS

First Author: Capucine Phelip

Order of Authors: Capucine Phelip; Myriam Lamrayah; Chiarastella Perasso; Céline Coiffier; Céline Lacroix; Maxime Dzikowski; Evelyne Colomb; Damien Salmon; Bernard Verrier

Abstract: Nanoparticle-based and hydrogel-based vaccine delivery platforms have shown substantial advances in the field of immunotherapy, by maintaining native form of antigens and yielding their high local concentration with a reduction of potential side effects. To increase and improve the immune responses, and obtain the desired single-injection vaccine procedure, native antigen might be available for a longer time. In this context, we developed a dual delivery system able to enhance immune responses using biodegradable nanoparticles embedded in biocompatible thermosensitive hydrogel. This formulation has been extensively characterized through in vitro analyses (stability, erosion profile). Then, its sustained release properties towards induction of immune responses have been assessed in vivo through the use of Poly-Lactic Acid nanoparticles loaded with HIV-1 Gag antigen (p24) and correlated to their biodistribution profile after one subcutaneous injection. By favouring a better distribution in whole body, this single-injection delivery system permits the induction of strong humoral response, leading to an increase in avidity of induced antibodies. Thus, such thermosensitive hydrogel containing antigen-loaded nanoparticles appears as a safe biocompatible system for sustained delivery of vaccine antigens leading to the induction of strong IgG antibody avidity.

Suggested Reviewers: Véronique Préat
veronique.preat@uclouvain.be

Guido Vanham
GVanham@itg.be

1 ***Injectable thermosensitive hydrogel containing biodegradable nanoparticles enhances***
2 ***avidity of humoral responses after one single injection.***

3
4 Capucine Phelip¹, Myriam Lamrayah¹, Chiarastella Perasso¹, Céline Coiffier¹, Céline Lacroix¹, Maxime
5 Dzikowski², Evelyne Colomb¹, Damien Salmon^{3,4}, Bernard Verrier¹

6 ¹ Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, UMR 5305, Université Lyon 1,
7 CNRS, IBCP – Lyon, France.

8 ² Adjuvatis, 7 passage du Vercors, 69007 Lyon, France.

9 ³ Service pharmaceutique, Plateforme FRIPHARM, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, 5 Place
10 d'Arsonval, F-69437 Lyon Cedex 03, France.

11 ⁴ Laboratoire de Recherche et Développement de Pharmacie Galénique Industrielle, Plateforme
12 FRIPHARM, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique -
13 UMR 5305, Université Claude Bernard Lyon 1, 8 Avenue Rockefeller, F-69373 Lyon Cedex 08, France.

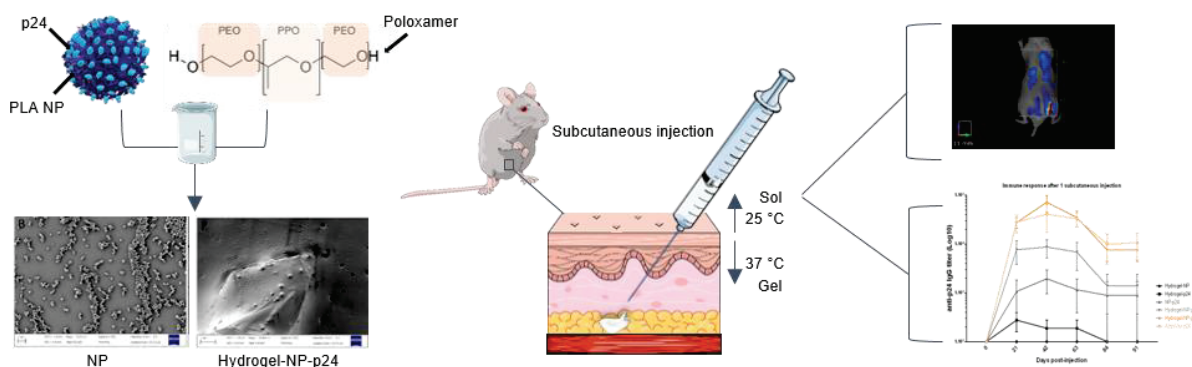
14 Corresponding author : bernard.verrier@ibcp.fr, IBCP, 7 passage du Vercors, 69007 Lyon

15 Keywords: thermosensitive hydrogel, poloxamers, biodegradable nanoparticles, single-shot vaccines,
16 sustained release, humoral response, avidity

17 Color should be used for: graphical abstract, figures 3 and 4.

18

19 **Graphical Abstract**



20

21

22 **Abstract**

23 Nanoparticle-based and hydrogel-based vaccine delivery platforms have shown substantial advances
24 in the field of immunotherapy, by maintaining native form of antigens and yielding their high local
25 concentration with a reduction of potential side effects. To increase and improve the immune
26 responses, and obtain the desired single-injection vaccine procedure, native antigen might be
27 available for a longer time. In this context, we developed a dual delivery system able to enhance
28 immune responses using biodegradable nanoparticles embedded in biocompatible thermosensitive
29 hydrogel. This formulation has been extensively characterized through *in vitro* analyses (stability,
30 erosion profile). Then, its sustained release properties towards induction of immune responses have
31 been assessed *in vivo* through the use of Poly-Lactic Acid nanoparticles loaded with HIV-1 Gag
32 antigen (p24) and correlated to their biodistribution profile after one subcutaneous injection. By

33 favouring a better distribution in whole body, this single-injection delivery system permits the
34 induction of strong humoral response, leading to an increase in avidity of induced antibodies. Thus,
35 such thermosensitive hydrogel containing antigen-loaded nanoparticles appears as a safe
36 biocompatible system for sustained delivery of vaccine antigens leading to the induction of strong
37 IgG antibody avidity.

38

39 Introduction

40 Vaccination can be defined as a means to manipulate the body's immune system in order to prepare
41 it for the rapid elimination of infectious agents or their toxic products. It is one of the most effective
42 medical interventions as it has been estimated according to the CDC (Center for Disease Control and
43 Prevention) to prevent 2.5 million deaths worldwide every year. Thus, the social and economic
44 impact is massive and justifies the ever increasing investments made by public and private funders. It
45 has been estimated by Ozawa *et al.*, that vaccination given between 2001 and 2020 will avert over 20
46 million deaths and save US\$ 350 billion in cost of illness ¹. However, vaccine technology faces
47 ongoing challenges in efficacy, practicality and safety ². Many chronic diseases cannot yet be
48 addressed by vaccination (*e.g.* HIV and HCV), and several vaccines that do function well require
49 multiple injections of complex antigen (Ag) mixtures, which is a substantial limitation. Another major
50 hurdle is eliciting a sufficiently potent immune response while meeting the safety standards
51 necessary for prophylactic vaccines designed for administration to healthy (often infant) population
52 or immuno-compromised persons (elderly) as exemplified with the different difficulties encounter
53 with Flu vaccines ³.

54 If most licensed human vaccines rely on antibody (Ab)-mediated responses for protection, we must
55 admit that the induction of potent antibodies (Abs), with long lasting half-life and broad neutralizing
56 capacities nowadays is empirical. However, recent studies have highlighted the primary role of CD4+
57 T cells and germinal centers (GCs) for the elicitation of such Abs, with a strong importance of the
58 crosstalk between B cells, follicular dendritic cells (FDCs), T follicular cells (Tfh) and the presence of a
59 « native Ag » ^{4,5}. Indeed, soluble Ag can lose native structure due to the lability or proteolysis over
60 time (leading to exposure of irrelevant/distracting epitopes), whereas a sustained release of
61 immunogen will ensure availability of an intact immunogen, favouring immune responses against
62 native forms/epitopes of the protein. One of the most recent approaches used to enhance
63 immunogenicity of subunit vaccines is Ag formulation with biomaterial-based particulate carriers ^{6,7}.
64 Thus, we could hypothesize that formulating a vaccine Ag onto the surface of a nanoparticle (NP) will
65 stabilize the native form of this Ag, preventing its degradation from proteases ⁸. Indeed, various
66 studies have demonstrated that Ag loading into synthetic particles enhances uptake and
67 presentation by professional presenting cells, such as dendritic cells (DCs) as well as increasing Ag
68 bioavailability by promoting retention in secondary lymphoid organs ^{9,10}. Furthermore, these
69 particulate carriers permit to co-deliver adjuvants, mimicking microbial danger signalling. Indeed, our
70 group has recently shown that co-delivery of vaccine Ag loaded onto nanoparticles of Poly Lactic Acid
71 (PLA) in presence of different PRR ligands or chimeric TLR/NOD ligands could amplify immune
72 responses after subcutaneous administration ^{11,12}.

73 However, the aim of vaccination is to elicit a long lasting protective immune response, by mimicking
74 a benign infection. But, during the infection process, the body is in constant contact with the
75 pathogen, allowing Ag presenting cells to integrate all request signals for initiating a strong immune
76 response ^{13,14}. This window contact is largely reduced when subunit vaccines are used, and probably
77 some immune actors could have been bypassed or simply absent from the injection site, leading to a

78 sub-optimal immune response. Even if the use of adjuvants could increase their immunogenicity,
79 most subunit vaccines require repeated injections (« prime/boost ») to reach an efficient protection.
80 It seems reasonable to assume that a sustained immune response is dependent non only of an *ad*
81 *hoc* adjuvant but also a continuous stimulation by the vaccine Ag^{15,16}.

82 To increase the sustained delivery of a vaccine Ag, several strategies have already been envisioned: i)
83 modify the attachment of the vaccine Ag to the surface of the particle by using different cross linkers
84 as it has been done in the Ab drug conjugate field, such as disulfide or thioether link, these crosslinks
85 inducing a better immune response¹⁷. ii) A second strategy is to use osmotic minipumps, implanted
86 subcutaneously to continuous supply material at fixed rate over several days or weeks. If not
87 translatable to human, such approach has brought the proof of concept that sustained delivery of Ag
88 can elicit strong neutralizing Abs in Non-Human Primate¹⁵. iii) The last strategy consists to
89 incorporate vaccine Ag in hydrogels such as PuraMatrix peptide hydrogel, as described by Yoon *et al.*
90¹⁸ but side effects in this model (appearance of granulomas) preclude such approach for prophylactic
91 vaccine, clearly indicating that it exists rooms for improvement.

92 To test the sustained Ag availability hypothesis, we design a dual delivery system to provide both i) a
93 depot effect at the site of injection and ii) a concomitant controlled release of Ag, providing all
94 immune signals necessary to an efficient response. To this aim, we have evaluated a safe-by-design
95 hydrogel, non-immunogenic, biocompatible and thermosensitive, forming a semi-solid depot *in situ*
96 at 37°C, after subcutaneous administration. We took advantage of well described poloxamer gelling
97 agents, largely used in pharmaceutical sciences^{19,20}, to identify an optimal ratio between two
98 poloxamers (P407/P188) leading to a thermosensitive gel^{21,22} adapted to nanoparticles embedding.
99 Indeed, associated with biodegradable PLA NP, carrying HIV-1 Gag p24 vaccine Ag, this poloxamer
100 hydrogel constitutes a vaccine inoculum easy to inject. By analysing biodistribution of fluorescent
101 particles through whole body mice imaging, we have noticed a wider biodistribution compared to NP
102 alone. In parallel, by immunization murine studies, we have observed the induction of strong
103 humoral immune responses with hydrogel-NP and that p24-IgGs exhibit a better avidity when NP are
104 embedded into thermosensitive hydrogels. These results validate the added value of this innovative
105 sustained release system for vaccine administration.

106

107 **Materials and methods**

108

109 **Methods**

110 **PLA nanoparticles synthesis**

111 PLA NP were bought to Adjuvatis (France) and were made by nanoprecipitation technique as
112 previously described²³. Briefly, the polymer was dissolved in acetone and this organic solution was
113 added dropwise to an aqueous solution under 250 rpm stirring. Organic solvents were then removed
114 by evaporation under reduced pressure at 30°C. The final PLA NP concentration was around 40
115 mg/mL, depending on the batch and was measured by weighing the wet and dried materials.

116

117 **Fluorescent PLA nanoparticles synthesis**

118 The near infrared fluorophore 1,1'-Diocetyl-3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanine Iodide (DiR)
119 was purchased from ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts). The fluorescent PLA NP
120 were bought to Adjuvatis and were made following the same method as described before²⁴ at a
121 fluorophore:PLA concentration of 0.02% w/w.

122

123 **p24 antigen adsorption in PLA nanoparticles**

124 HIV-1 Gag p24 Ag was purchased and purified by PX'Therapeutics (Grenoble, France) from
125 *Escherichia coli* BL21 DE3 strain and endotoxins were removed as previously described²⁵. The purity
126 of p24 was higher than 97% as assessed by silver nitrate stained reducing SDS-PAGE. The endotoxin
127 content was lower than 5 EU/mg of p24 protein, as determined using the QCL-1000 Quantitative
128 Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) kit (BioWhittaker, Walkersville, Verviers, Belgique).
129 PBS 1X (PBS) Gibco was purchased from Sigma-Aldrich. The p24 protein was diluted in PBS at
130 400 µg/mL. PLA NP were diluted at a concentration of about 20 mg/mL in PBS and 1 volume was
131 added to 1 volume of the protein solution. The adsorption reaction was incubated for 2 h at room
132 temperature (RT), with moderate end-overhead stirring. Unbound p24 protein was collected in the
133 supernatant by centrifugation at 10,000× g for 10 minutes and quantified by µ-BCA kit (Protein Assay,
134 Thermo Scientific). The absorbance of the samples was measured at 562 nm using a microplate
135 reader (Multiskan FC, Thermo Scientific).

136

137 **PLA nanoparticles characterization**

138 The hydrodynamic diameter and size distribution (polydispersity index, Pdl) were determined by
139 dynamic light scattering (DLS) at a temperature of 25°C, and a scattering angle of 173° using a
140 Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). The formulations were diluted in 1 mM NaCl 0.22 µm filtered
141 solution and each value was the mean of four independent measurements. The electrophoretic
142 mobilities were measured using the same equipment and the same highly diluted samples but at an
143 angle of 12.8°. The measurements were converted to Zeta potential according to Smoluchowski's
144 equation²⁶.

145

146 **P407/P188 hydrogel formulations preparation**

147 Poloxamer P407 (MW 13971 g/mol; 72.5% PEO) and poloxamer P188 (MW 8845 g/mol; 81.0% PEO)
148 were obtained from BASF (Ludwigshafen, Germany). Hydrogels were prepared according to the "cold
149 method", previously described by Schmolka *et al*²⁷. Briefly, the appropriate amounts of P407 and
150 P188 for each formulation were carefully weighed and placed in a vial. The required volume of PBS
151 pre-cooled at 4°C was added slowly to the vial. The dispersion was stored under agitation (200 rpm)
152 on ice until the poloxamers were dissolved completely. All the samples were prepared on a w/v
153 basis.

154

155 **PLA nanoparticles incorporation in hydrogel formulations**

156 The appropriate volume of blank NP or loaded NP was added to the already-formed hydrogel at 4°C.
157 The formulation was kept under magnetic stirring 200 rpm for 2 hours to ensure the homogeneity of
158 the final solution, without compromising the integrity of the NP. The formulations were then stored
159 at 4°C until used. All the samples were prepared on a w/v basis.

160

161 **SEM observation**

162 Observations in Scanning Electron Microscopy (SEM) were performed by depositing a drop of
163 formulations diluted in water on a stub and progressively dried by evaporation under reduced
164 pressure. All samples were then sputtered with a 10 nm gold/palladium layer prior observation, using
165 the metallizer BaltecMED020 (Leica Microsystems SAS, France). A Zeiss MEB Zeiss Merlin Compact
166 SEM (Marly Le Roi, France) with an acceleration voltage of 2 kV was used to observe samples.

167

168 **Rheological tests**

169 The viscosity determination of each hydrogel was assessed by a Rotational Rheometer RM 200 (Lamy
170 Rheology, Champagne au Mont d'Or, France) coupled to a temperature control device (Cryostat
171 Huber Ministat 125, Kaltemaschinebau GmbH, Germany). The sol-gel transition temperature (Tsol-
172 gel) and viscosity measurements were conducted using the following temperature ramp: 15 to 45 to
173 15°C, with one recording point each ten seconds at a heating rate of 1°C/min (shear rate = 10 s⁻¹). All
174 measurements were performed in triplicate, using a new sample solution of 10 mL at each time.

175

176 ***In-vitro* erosion profiles of P407/P188 hydrogel formulations**

177 Hydrogel erosion profile were obtained following the method described by Zhang *et al*²⁸. Briefly, 2,5
178 mL of cold formulations (Hydrogel and Hydrogel-NP) were transferred into pre-weighted glass vials
179 with a diameter of 2,4 cm and incubated at 37°C. After the formulations gelled, 5 mL of PBS pre-
180 equilibrated at 37°C were carefully layered over the surface of the hydrogel. At determined time
181 points, the PBS supernatant was removed. The remaining hydrogel in the vial was dried overnight in
182 a vacuum and the residual weight of the hydrogel was determined. The percentage of mass loss (%
183 w/w) was calculated using equation as follows:

$$W_{loss} = 1 - \frac{(W_t - W_0)}{(W_{hydrogel} - W_0) * 0,24}$$

184
185 Where (W_t) is the experimental weight of the dried remaining hydrogel at each time, (W₀) is the
186 initial weight of the vial without hydrogel, (W_{hydrogel}) is the experimental weight of the vial and
187 hydrogel at the beginning of the experiment, (0,24) is the dry weight of the amount of poloxamers
188 added to prepare the hydrogel. The amount of hydrogel dissolved during the study period was
189 calculated by the weight difference of the vial. The erosion profile was then obtained by plotting the
190 cumulative weight of each hydrogel formulation dissolved versus time. All the experiment was
191 performed in triplicate.

192
193 ***In vivo* biodistribution study**

194 SKH1 female mice were bred at Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) and housed at the
195 AniCan specific pathogen-free animal facility of the Centre Léon Bérard, Lyon, France. All
196 experiments were validated by the local animal ethic evaluation committee
197 (CECCAPP_CLB_2017_006) in accordance with the animal care guidelines of the European Union and
198 French laws. Seven-week-old mice received a single subcutaneous injection of 0,96 µM DiR/mouse
199 diluted in the different formulations: free DiR in hydrogel (Hydrogel-DiR), NP-DiR suspension
200 (NP(DiR)), NP-DiR in hydrogel (Hydrogel-NP(DiR)) (n=5 mice per group). Whole body fluorescence and
201 injection site fluorescence were recorded at 5 minutes, 4 hours, 1, 2, 7, 9, 17, 23, 30, 41 and 50 days
202 after injection using the FMT4000 fluorescence tomography imaging system (Perkin Elmer, USA).
203 Filter sets were chosen with the following parameters for DiR: excitation at 750 nm and emission at
204 782 nm. Acquired images were analyzed with TrueQuant software. The quantity of DiR in the whole
205 body and at the injection site were quantified by drawing Regions Of Interest (ROI).

206
207 ***In vivo* immunological study**

208 AddaVax was purchased from Invivogen (Toulouse, France). CB6F1 female mice were bred at Charles
209 River Laboratories (L'Arbresle, France) and housed at the Plateau de Biologie Expérimentale de la
210 Souris (PBES, Lyon, France). The experiments were approved by the relevant local ethics committee
211 (CECCAPP_ENS_2014_040) in accordance with the animal care guidelines of the European Union and
212 French laws. Mice were divided into 6 groups of 8 animals. Eight-week-old mice received a single
213 subcutaneous injection of 1 µg p24/mouse diluted in the different formulations: free p24 in hydrogel
214 (Hydrogel-p24), NP-p24, NP-p24 in hydrogel (Hydrogel-NP-p24), and Hydrogel-NP-p24 with free p24
215 (Hydrogel-NP-p24+p24), with a total amount of 1 µg of p24, *i.e* 0.5 µg p24 onto NP and 0.5 µg of free
216 p24. The negative control was made of NP in hydrogel (Hydrogel-NP). The standard used as positive
217 control was AddaVax, in accordance with the supplier recommendations. Mice were bled retro-
218 orbitally (100 µL) before immunisation (D0) and once per week after the immunisation to monitor Ab
219 response. The samples were heated at 37°C for 30 minutes, then centrifuged twice at 16,000 ×g for
220 10 minutes and sera were stored at -20 °C for further analysis.

221
222 **IgG ELISA and avidity assay.**

223 Serum samples were analysed for the detection of p24-specific IgG, by enzyme-linked
224 immunosorbent assay (ELISA). Ninety-six-well Nunc maxisorp plates were coated with 100 µL of
225 1 µg/mL p24 protein overnight at RT. p24 excess was eliminated and plates were blocked with 10%

226 non-fat dry milk for 1 h at 37°C to prevent non-specific binding of the Abs. Plates were washed with
 227 PBS/0.05% Tween-20 (PBST) using an auto plate washer (ThermoScientific wellwash Versa). Sera
 228 were serially diluted in PBS/BSA 1%. Then, 100 µL of each sample were incubated on blocked plates
 229 for 1 h at 37°C. Specific IgG Abs were obtained from Southern Biotech. Wells were washed and
 230 incubated 1 h at 37°C with anti-mouse IgG–HRP (horseradish peroxidase) conjugate (1:10.000). Plates
 231 were washed and developed using 100 µL per well of tetramethylbenzidine (TMB) substrate (BD
 232 Biosciences) and stopped using 1 N H2SO4. The optical density (OD) at 450 nm with a correction at
 233 620 nm was measured using a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific).
 234 The avidity of serum immunoglobulins was determined by the Ab-antigen binding resistance to 8 M
 235 urea. Samples were prediluted to give an OD at 450 nm (OD450) readout of between 1.0 and 1.5 and
 236 were added to p24-coated plates. The plates were then washed three times with either PBST or 8 M
 237 urea in PBST, before incubating with anti-mouse IgG–HRP. Samples were developed with TMB as
 238 described above. The avidity index (in percent) was calculated as the OD450 of urea-treated samples
 239 / OD450 of PBST-treated samples. Antisera with index values exceeding 50% were ascribed a high
 240 avidity, those with index values of 30 to 50% were ascribed intermediate avidity, and those with
 241 index values of <30% were ascribed a low avidity^{29,30}.

242
 243 **Statistical analysis**

244 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Version 6.0 software. All of the data are
 245 presented as the mean ± SD. For rheological studies and *in vitro* degradation profile, Student's t-test
 246 was performed. For *in vivo* biodistribution and immunisation studies, two-way ANOVA was carry out.
 247 Significance level is indicated as *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.
 248

249 **Results**

250 1. Efficient synthesis of nanoparticles and characterization

251 NP suspensions were prepared by nanoprecipitation and characterized by dynamic light scattering.
 252 The encapsulation of the fluorophore into the particle induced an increase of size around 30%
 253 compared to the empty NP but without any significant effect on homogeneity of dispersion (Pdl
 254 similar) (table 1). The adsorption of p24 did not significantly change the physico-chemical parameters
 255 of the particles, comparing to their hydrodynamic diameter and surface charge. The percentage of
 256 adsorption for p24 is 99%. NP-p24 formulations are highly reproducible and they are stable over
 257 long-term storage at +4°C (data not shown).

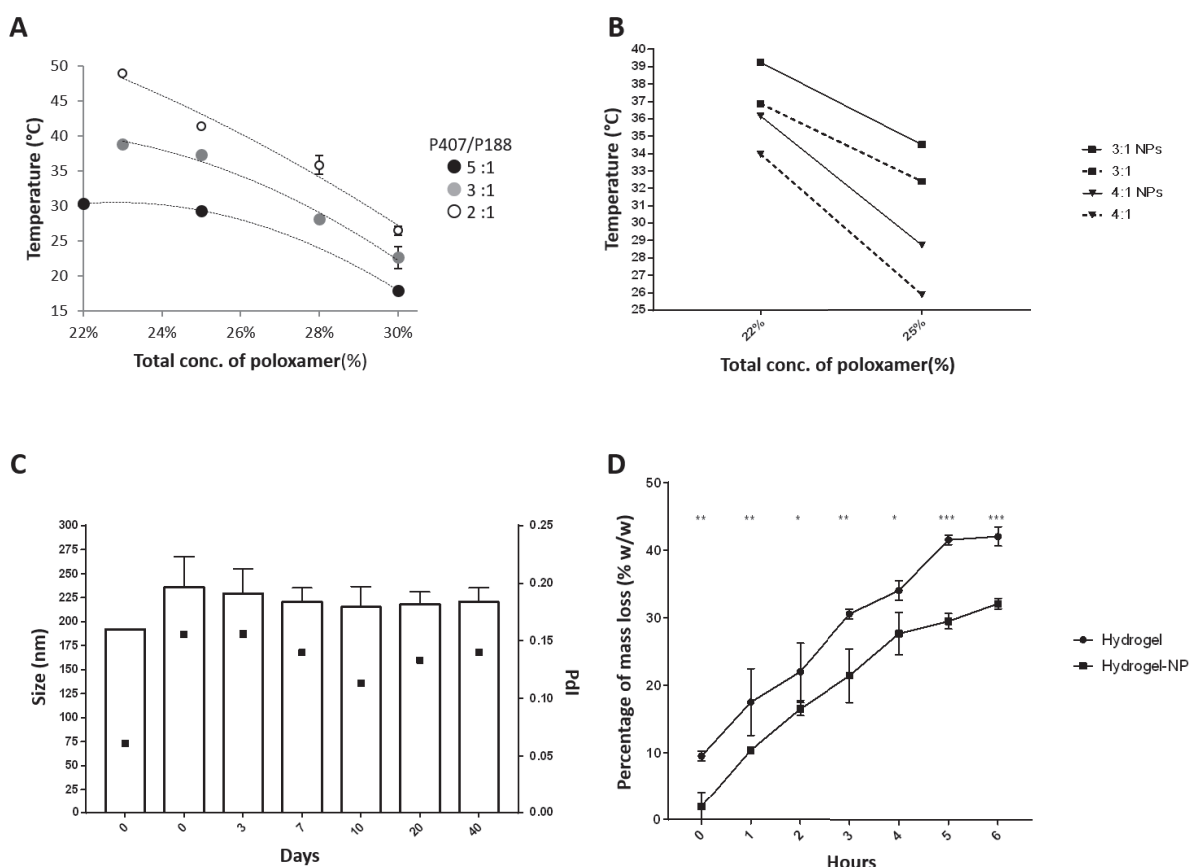
258 **Table 1:** Physical characterization of NP used for the stability, biodistribution and immunisation
 259 studies.

		Hydrodynamic diameter (nm)	Pdl	Zeta potential (mV)
Stability study	NP	191.8	0.061	- 65.5
	Hydrogel-NP (D0)	219.4	0.061	- 16.0
	Hydrogel-NP (D3)	222.4	0.066	- 14.7
	Hydrogel-NP (D20)	224.5	0.079	- 14.7
Biodistribution study	NP(DiR)	230.0	0.038	- 61.3
	NP	179.0	0.013	- 50.6
Immunisation study	NP-p24	190.1	0.086	-57.5
	Hydrogel-NP-p24	231.9	0.159	-11.9
	Hydrogel-NP-p24 + p24	231.6	0.156	-11.5

260

261 2. Hydrogel and Hydrogel-NP preparation

262 Following previous studies of Damien Salmon (unpublished data, PhD dissertation), Tsol-gel for
 263 different poloxamer formulations were investigated, and the results served as basis for the project.
 264 According to different P407:P188 ratios and aqueous composition, Tsol-gel was found in a range
 265 from 20 to 50°C (Figure 1-A). Since the project concerns a subcutaneous injection, Tsol-gel has to be
 266 around 32°C. Thereby, two polymer concentrations were selected for further experiments (22 and
 267 25%), and two P407:P188 ratios were retained (3:1 and 4:1). The NP incorporation in hydrogel was
 268 realized 24 hours after the hydrogel preparation, at 4°C under stirring (200 rpm) during 2 hours to
 269 ensure the homogeneity of formulations. They all exhibited a final NP concentration at 0.5% (w/w).
 270 Then, we investigated Tsol-gel for hydrogels whether or not including NP. Tsol-gel decreased when
 271 total quantity of poloxamers was enhanced and Tsol-gel increased when quantity of P407 was more
 272 important in the total mix (Figure 1-B). NP also induced modifications in viscosity properties of
 273 hydrogels. We observed a linear difference in Tsol-gel with the presence of NP for all tested
 274 formulations: Tsol-gel increased by two degrees (Figure 1-B). Based on these observations, the
 275 formulation at 24% of poloxamers and with the P407:P188 ratio at 4:1 was retained for the rest of
 276 studies. Tsol-gel was then at 31°C, to have the assurance that the solution will gel after subcutaneous
 277 injection (data not shown).



278
 279 **Figure 1:** Characterization of the hydrogels as a function of the poloxamer concentration and the
 280 presence or absence of particles, and study of the stability and the degradation profile of the
 281 formulations. **(A)** Transition temperature (Tsol-gel) versus P407 and P188 concentrations (with
 282 standard error bar). **(B)** Transition temperature (Tsol-gel) versus P407 and P188 concentrations,
 283 with or without PLA-NP. **(C)** NP stability inside hydrogel (24% 4:1) at 4°C during 40 days (n=3). The first
 284 histogram represents properties of NP alone, used for the formulation inside the hydrogel. **(D)** *In*
 285 *vitro* stability of hydrogel (24% 4:1) with PLA-NP at 37°C with PBS buffer (pH 7.4). The values shown

286 are the mean±SD (n=3). p-values were determined using Student's t-test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p
287 < 0.001.

288

289 3. Hydrogel-NP characterization

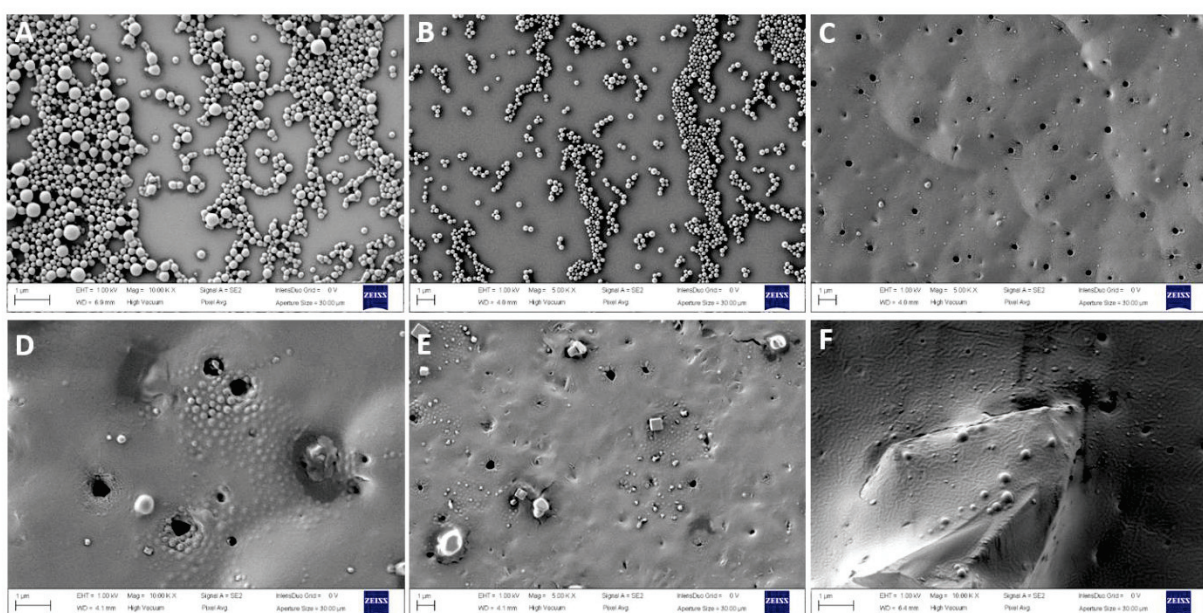
290 Concerning NP parameters, a slight increase of size after incorporation in hydrogels (191.8 to 220.0
291 nm) and a modification of the NP charge from -65,5 to -14,7 mV were observed (table 1). These
292 parameters were studied for 40 days. NP were stable, with no variation about physico-chemical
293 parameters during all experiment (Figure 1-C).

294 4. Erosion kinetic of Hydrogel and Hydrogel-NP

295 Concerning *in vitro* degradation profile, we observed a linear and significant difference between
296 Hydrogel and Hydrogel-NP. Indeed, there was less mass loss with Hydrogel-NP compared to Hydrogel
297 (Figure 1-D). After 6 hours, 30% of the mass was lost for Hydrogel-NP (meaning 70% of the hydrogel
298 is still conserved). In parallel, at the same time, almost 45% of hydrogel was dissolved (55% of the
299 hydrogel is conserved).

300 5. SEM observation

301 The NP morphology and location in hydrogels were verified after storage at 4°C for 20 days. Images
302 containing hydrogels and those relating to solutions containing the same amount of NP, were taken
303 at the same magnifications to better compare the possible physical differences. We first validated
304 the presence of NP, showing correct shape and size within the hydrogel with a total polymer
305 concentration of 22 and 25% for both the studied mixtures ratio, 3:1 and 4:1 (data not shown). NP
306 and NP(DiR) suspensions were observed as a control. NP are well conserved and homogeneous in
307 size (Figures 2-A and 2-B). In the control hydrogel, devoid of NP, it was possible to observe small
308 irregularly shaped crystals that probably correspond to the portion of phosphate buffer crystallized
309 after drying (Figure 2-C). Formulations of interest (Hydrogel-NP, Hydrogel-NP(DiR) and Hydrogel-NP-
310 p24) confirmed the well conservation of NP (size and distribution) after their incorporation in
311 hydrogels (Figures 2-D, 2-E, 2-F). As far as microscopic images are concerned, NP were visible with
312 correct shape and size without the presence of aggregates both at day 0 (data not shown) and at day
313 20. This indicates the correct incorporation of the NP and their stability within the hydrogel
314 throughout the study.



315

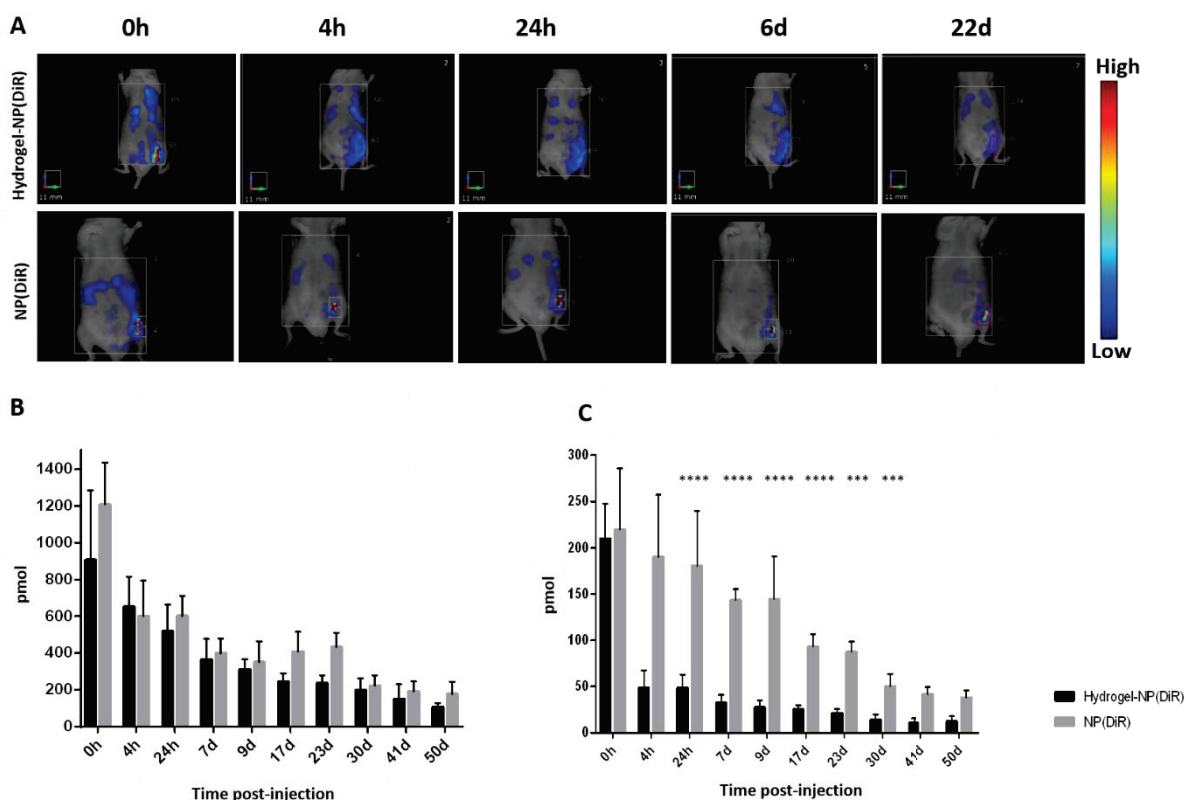
316 **Figure 2:** SEM observations of formulations used for stability, biodistribution and immunization
 317 studies. Hydrogel are made up of 24% poloxamer and P407/P188 ratio of 4:1. NP are used at 0,5 %
 318 solid rate. **(A)** NP. **(B)** NP(DiR). **(C)** Hydrogel. **(D-F)** NP inside hydrogel 20 days after the formulation,
 319 **(D)** Hydrogel-NP. **(E)** Hydrogel-NP(DiR). **(F)** Hydrogel NP-p24.

320

321 6. *In vivo* study of biodistribution

322

323 For this study, we used the technique of Fluorescence Molecular Tomography which allowed us to
 324 follow the fluorescent NP biodistribution in whole body of mice. After subcutaneous injection (above
 325 the left inguinal lymph node), we compared the quantity of fluorescence in the whole body and at
 326 the injection site for three formulations: NP(DiR), Hydrogel-NP(DiR) (Figure 3-A) and Hydrogel-DiR as
 327 control (data not shown) during 50 days. The DiR quantity was similar for each injection. The
 328 biodistribution study showed that in both NP groups, a depot effect has been achieved given the
 329 persistence of the signal even after 50 days. We observed the same degradation profile of
 330 fluorescence in whole body for both formulations during all the experiment (Figure 3-B) but,
 331 interestingly, we had an important difference at the injection site, from 4 hours of followed (Figure 3-
 332 C). For Hydrogel-NP(DiR), only 25% of the starting quantity still remained at the injection site,
 333 contrary to NP(DiR) group that showed a progressive and slow profile of degradation from this site,
 334 since 25% were still there 30 days after the injection. For Hydrogel-DiR group, the fluorescence was
 335 very weak and not detectable rapidly.



336 **Figure 3:** *In vivo* visualization of NP(DiR) inside the hydrogel or not in the whole body and injection
 337 site of mice. **(A)** Fluorescence imaging for *in vivo* tracking NP(DiR) with or without hydrogel **(B)**
 338 Quantitative analysis of fluorescence intensity in the whole body. **(C)** Quantitative analysis of
 339 fluorescence intensity at the injection site. The values shown are the mean±SD (n=5). p-values were
 340 determined by Two-Way-ANOVA. ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

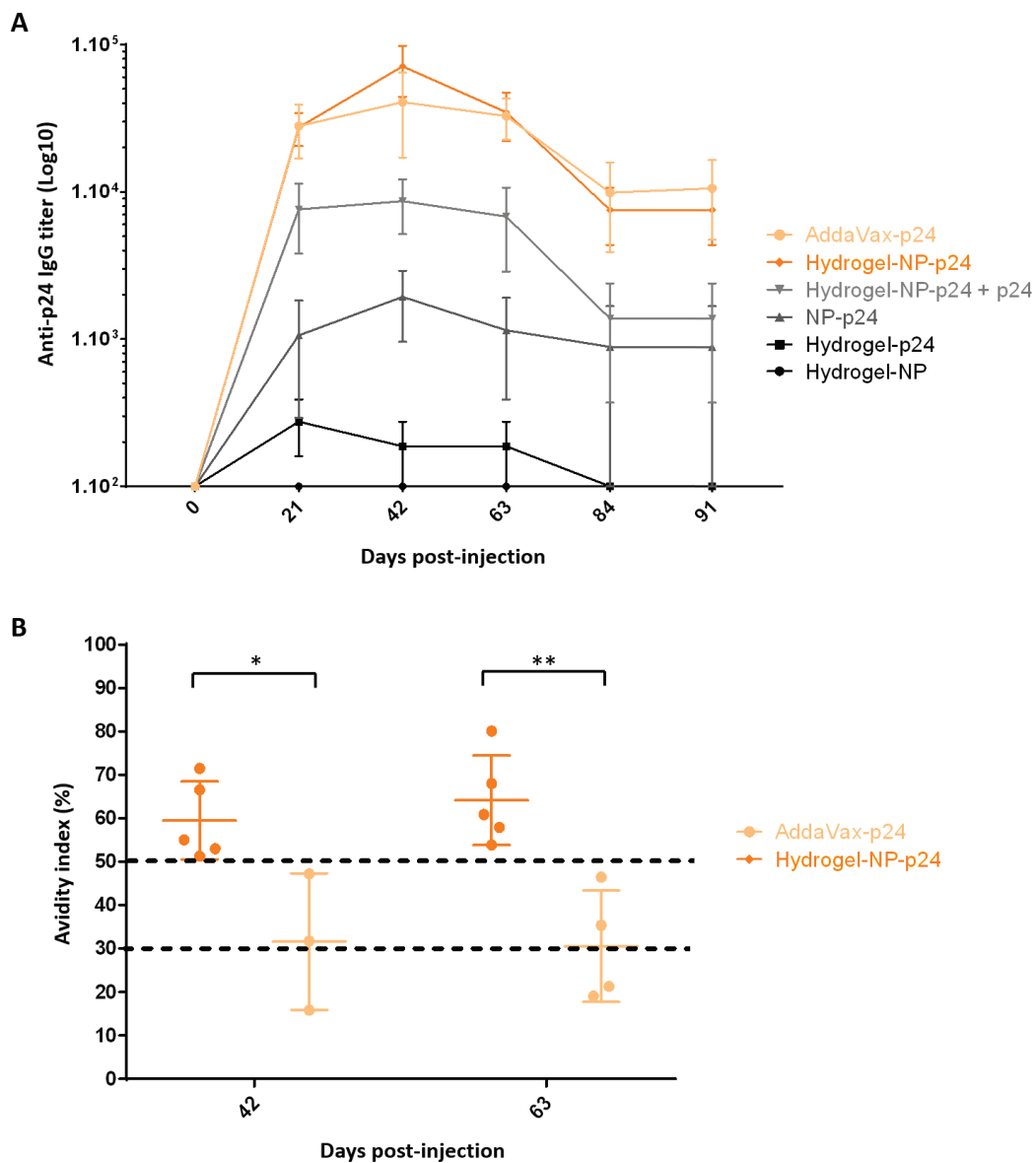
342

343 7. *In vivo* study of immunization

344

345 To examine the immune system induced by our formulations, we injected 1 µg of p24 Ag contained
346 in different Hydrogel-NP. The negative control (Hydrogel-NP) did not induce IgG, as expected.
347 Hydrogel-p24 induced a slight production of anti-p24 IgG, as obtained in free solution. We observed
348 a better production of IgG with NP-p24 (1.10^3). When half of the p24 was adsorbed onto NP and the
349 other half was free in hydrogel, we observed an enhancement of the IgG production ($1.10^{3.8}$).
350 Hydrogel-NP-p24 showed an IgG production as well the gold standard (AddaVax) with an IgG titer of
351 $1.10^{4.7}$ (Figure 4-A).

352 Then, we analysed more precisely the immune response induced by Hydrogel-NP-p24, compared to
353 AddaVax-p24 at days 42 and 63 post-injection. To do so, we did a urea treatment to determine the
354 avidity index, which allow us to differentiate low-, intermediate- and high-avidity IgG Abs. We
355 observed a better Ab avidity induced by Hydrogel-NP-p24 compared to the gold standard. At 63 days
356 post-injection, we had two-fold avidity index, with 31% induced by AddaVax-p24 and 64% for
357 Hydrogel-NP-p24. Moreover, even if Ab titers decrease slowly, our formulation induced better avidity
358 over time, whereas the Ab induced by AddaVax-p24 had the same avidity over time (Figure 4-B).



359

360 **Figure 4:** Specific anti-p24 IgG titers in sera of mice immunized. Animals (n=8 per group) received one
361 administration by subcutaneous route of 1 µg of p24 protein. **(A)** Serum p24-specific IgG titers were
362 measured by ELISA. For each animal the IgG titer was determined individually and expressed as a
363 mean±SD. **(B)** Ab avidities were measured by ELISA in duplicate, using nonreducing (PBS) and
364 reducing (8 M urea) washes after sample addition to evaluate the avidity of Abs generated *in vivo*
365 against HIV-1 p24. p-values were determined by Two-Way-ANOVA **p<0.01, *p<0.05.

366 Discussion

367 Recent studies about the development of new vaccines have suggested that their ability to form a
368 depot is important to obtain a sustained stimulation of immune system and so, override the principle
369 of prime-boost vaccination. During a naturally occurring infection, Ag are released from the site of
370 infection as while the pathogen replicates until such time as they are destroyed by the immune
371 system. This is the situation we wish to recreate with our vaccine formulation and the sustained
372 release of Ag is one such strategy for achieving this³¹.

373 In this study, we developed a new vaccine platform consisting to antigen-loaded PLA-NP embedding
374 into a thermosensitive hydrogel. Through mice experiments, we showed that a single-injection of this
375 new formulation allowed a rapid and wide NP distribution in the whole-body, and induced a strong
376 humoral response, with an increased in avidity of induced antibodies.

377 We have previously demonstrated that NP offer large benefits as Ag delivery system³². PLA-NP were
378 chosen due to their biodegradability, stability, and versatility. In the present work, the potential of
379 PLA NP as adjuvants in a vaccine strategy tends to be improved by their incorporation into hydrogel
380 to enhance their bioavailability.

381 When designing this sustained release delivery system, we focused our efforts towards the choice of
382 very well described biodegradable polymers already agreed by U. S. Food and Drug Administration
383 (FDA) for pharmaceutical applications, even though no nanoparticles formulation has yet been
384 approved for vaccination³³. The choice of hydrogels for carrying nanoparticles has been guided by
385 their three dimensional polymeric networks which swollen in water, aqueous media or biological and
386 physiological fluids. Furthermore, they have been widely used for cell encapsulation and controlled
387 release of therapeutic proteins, peptides, drugs and nucleic acids^{19,20,34-38}. Among all thermosensitive
388 hydrogels, we have focused on poloxamers, due to their long track record in pharmaceutical delivery.
389 More precisely, P407 has been frequently used as a gelling agent for the development of
390 bioadhesive, thermosensitive and controlled release formulations²². As gelling ability of P407 is
391 concentration-dependent, at low concentration P407 solution loses gelation ability, whereas at high
392 concentration P407 gelling temperature is lower than room temperature, we decided to fine tune
393 the gelling temperature of the hydrogel by mixing P407 solution with P188. They are made up of
394 poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO), PPO being the
395 hydrophobic segment whereas PEO is the hydrophilic part. Following the European pharmacopeia,
396 P407 and P188 contain different ratios of each segment.

397 Thus, we hypothesized that substituting a liquid injection by an *in situ* hydrogel could increase the NP
398 distribution and consequently the efficiency of p24 Ag. As illustrated by table 1 and figure 1, we were
399 able to produce hydrogels following the temperature constraint of both subcutaneous compartment
400 and syringeable injection. Hydrogel, containing 24% of poloxamers, with the P407:P188 ratio at 4:1,
401 was free-flowing viscous liquid at the storage temperature (4°C) and formed a semi-solid gel at
402 experimental procedure. The transition time was less than 1 minute, which is advantageous as it

403 reduces the likelihood of dose dumping and the potential for the hydrogel to be diluted with
404 physiological fluids at the site of injection ³⁹.

405 Furthermore, we showed that the incorporation of NP into hydrogels did not compromise the
406 integrity of NP as evidenced by the slight differences of size and PDI during long-term experiment
407 (figure 1-C). SEM observations confirmed this hypothesis, NP are well integrated and stable (20 days
408 experiment) into gel network (figure 2). We observed an increase in NP size of 30 nm and in Zeta
409 potential of 50 mv. It was widely described in literature that PEO-PPO monomers of poloxamers have
410 the ability to self-assemble in micelles, presenting a hydrophobic PPO core, used for incorporation of
411 lipophilic drug, surrounded by a hydrophilic PEO corona ^{40,41}, which prevented the adsorption and
412 aggregation of incorporated protein ⁴².

413 In this study, we assumed that micelles of poloxamers formed a corona around NP, increasing the
414 size and modifying the surface charge. By rheology tests, we investigated the impact of NP on
415 hydrogels viscosity. Tsol-gel were increased of 2 degrees in the presence of NP. This could be
416 explained by the fact that NP are lodged in network of poloxamer micelles, so the energy needed to
417 form the gel is more important, likely due to the increased hydrophobic interactions between the
418 PLA-NP and the hydrogel.

419 Through *in vitro* degradation experiments, we observed that NP tend to stabilize the network since
420 Hydrogel-NP had a kinetic degradation 1,5 times slower than Hydrogel alone. Interactions between
421 NP and poloxamer micelles seem stronger than weak interaction between two micelles. Thus, NP
422 stabilize the hydrogel, without preventing its natural degradation, which is an asset in our extended
423 release strategy.

424 The biodistribution studies demonstrated that the depot effect did not last long: 4 hours after
425 administration, 25% of fluorescence at injection site remained whereas the remaining part has
426 diffused into whole-body through lymphatic circuit. This rapid diffusion of NP from hydrogel at the
427 injection site offers us a systemic immune stimulation, not only to the targeted inguinal lymph node
428 as it is observed with NP(DiR), but probably to more distant secondary lymphoid organs. The
429 hydrogel corona around NP offers to the NP a capacity to be furtive. Without this high negatively
430 surface charge, we could hypothesize that NP would not be so well integrated in the target lymph
431 node. As it has been described for alum, Ag depot is not necessarily required for adjuvanticity.
432 Indeed, surgical removal of alum depots two hours after injection did not affect the magnitude of the
433 Ab response in mice ⁴³, this propriety could be an asset for our formulation.

434 To validate if sustained release of NP coated with a vaccine Ag could increase immune responses, we
435 have analysed the IgG responses detected in sera of immunized mice. The IgG production profile for
436 Hydrogel-NP-p24 group was the best among all candidate formulations, but as well as Addavax
437 group, during the all three-months experiment (figure 4-A) after one single immunization at low dose
438 of Ag. Then, a previous publication has reported that oil-in-water emulsions as adjuvants, i.e
439 AddaVax, increase number of GCs in proximal-draining lymph nodes compared to alum ⁴⁴. We
440 perform additional analysis to check the influence of sustained delivery of NP. We found, 7 days after
441 immunization, an equal number of GCs in proximal-draining lymph nodes between Hydrogel-NP-p24
442 and AddaVax-p24 (supplementary data), thus an additional immune similarity with standard. As we
443 analyzed only one-time point, it will be interesting to perform additional studies between day 7 and
444 day 10 to see an added value of such sustained release system towards Addavax, as we could suspect
445 a later increase in number of GC due to the slow release of NPs. To further analyze if differences
446 could be observed between the formulations, we measured the avidity of IgG directed against p24
447 Ag. As illustrated by figure 4, the hydrogel candidate formulation appears twice better than Addavax,

448 at day 42 post immunization (* $p < 0,05$), and even more after 63 days (** $p < 0,01$) (figure 4-B). We
449 could conclude about a sustained and prolonged immune effect with hydrogel-NP-p24, since it
450 induces higher and more persistent functional Ab titers compared to AddaVax.

451 **Conclusion**

452 Based on our previous works, we investigated a novel vaccine delivery system for protein Ag based
453 on biodegradable NP embedded in thermosensitive hydrogel, which combined both advantages of
454 particulate Ag to enhance immune response and a thermosensitive hydrogel delivery platform to
455 improve distribution in whole body. The Hydrogel-NP composite is an injectable solution at ambient
456 temperature and converts into a gel at body temperature. This formulation provides Ag depot at the
457 site of injection and promote a rapid diffusion of NP through lymphatic circulation, offering a
458 systemic immune stimulation, specifically in secondary lymphoid organs. *In vivo* immunization
459 studies showed the induction a strong humoral immunity after one single injection which was
460 maintained for longer than 9 weeks, with a high Ab-avidity. Thus, the Hydrogel-NP composite could
461 be potential candidate as a vaccine delivery system for protein Ag after one single immunization.

462 **Acknowledgments**

463 The authors would like to thank the SFR Biosciences (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon,
464 UCBL) for the access to the facilities and J. Y. Exposito for careful reading of the manuscrit. We
465 acknowledge Thomas Barré from the imaging structure AniCan (Equipex Phenocan), located within
466 the animal experimentation platform of the CRCL at the Centre Léon Bérard for its helps in Imaging
467 Analysis (FMT4000). We also acknowledge the PBES (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris)
468 core facility for mice experimental facilities, and Primatiss and N. El Kholti for the access to the
469 histochemistry facilities. We acknowledge Sophie Richard for advices.

470 **Funding**

471 CP was supported by ANRS (Agence National de la Recherche sur le SIDA) for three years' fellowship.
472 ML was supported by "La Ligue contre le Cancer" for three years' fellowship.

473 Financial support is gained from ANRS in the framework of HIVERA JTC 2014 (HIV-NANOVA) and from
474 ANR-16-CE20-0002-01 (FishRNAVax) to BV and CL.

475 **Competing interest**

476 B.Verrier has a financial interest in Adjuvatis, a biotechnology company focused on the development
477 of biodegradable particles for immune therapy.

478 **References**

- 479 1. Ozawa S, Clark S, Portnoy A, et al. Estimated economic impact of vaccinations in 73 low- and
480 middle-income countries, 2001–2020. *Bull World Health Organ.* 2017;95(9):629-638.
481 doi:10.2471/BLT.16.178475.
- 482 2. Bloom DE, Black S, Rappuoli R. Emerging infectious diseases: A proactive approach. *Proc Natl*
483 *Acad Sci.* 2017;114(16):4055-4059. doi:10.1073/pnas.1701410114.
- 484 3. Soema PC, Kompier R, Amorij JP, Kersten GFA. Current and next generation influenza

- 485 vaccines: Formulation and production strategies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;94:251-263.
486 doi:10.1016/j.ejpb.2015.05.023.
- 487 4. Cirelli KM, Crotty S. Germinal center enhancement by extended antigen availability. *Curr Opin*
488 *Immunol.* 2017;47:64-69. doi:10.1016/j.coi.2017.06.008.
- 489 5. Hanson MC, Irvine DJ. Synthesis of Lymph Node-Targeting Adjuvants. *Methods Mol Biol.*
490 2017;1494:145-152. doi:10.1007/978-1-4939-6445-1.
- 491 6. Hotaling NA, Tang L, Irvine DJ, Babensee JE. Biomaterial Strategies for Immunomodulation.
492 *Annu Rev Biomed Eng.* 2015;17:317-349. doi:10.1146/annurev-bioeng-071813-104814.
- 493 7. Irvine DJ, Hanson MC, Rakhra K, Tokatlian T. Synthetic Nanoparticles for Vaccines and
494 Immunotherapy. *Chem Rev.* 2015. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00109.
- 495 8. Pavot V, Berthet M, Rességuier J, et al. Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid)
496 particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine.* 2014;9(17):2703-
497 2718. doi:10.2217/nnm.14.156.
- 498 9. Hanson MC, Crespo MP, Abraham W, et al. Nanoparticulate STING agonists are potent lymph
499 node-targeted vaccine adjuvants. *J Clin Invest.* 2015;125(6):2532-2546. doi:10.1172/JCI79915.
- 500 10. Chen P, Liu X, Sun Y, Zhou P, Wang Y, Zhang Y. Dendritic cell targeted vaccines: Recent
501 progresses and challenges. *Hum Vaccines Immunother.* 2016;12(3):612-622.
502 doi:10.1080/21645515.2015.1105415.
- 503 11. Gutjahr A, Papagno L, Nicoli F, et al. Cutting Edge: A Dual TLR2 and TLR7 Ligand Induces Highly
504 Potent Humoral and Cell-Mediated Immune Responses. *J Immunol.* 2017;198(11):4205-4209.
505 doi:10.4049/jimmunol.1602131.
- 506 12. Gutjahr A, Phelip C, Coolen A-L, et al. Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine
507 Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines 2016, Vol 4, Page 34.* 2016;4(4):34.
508 doi:10.3390/VACCINES4040034.
- 509 13. Leleux J, Atalis A, Roy K. Engineering Immunity: Modulating Dendritic Cell Subsets and Lymph
510 Node Response to Direct Immune-polarization and Vaccine Efficacy. *J Control Release.*
511 2015:610-621. doi:10.1016/j.jconrel.2015.09.063.Engineering.
- 512 14. Liang F, Lindgren G, Sandgren KJ, et al. Vaccine priming is restricted to draining lymph nodes &
513 controlled by adjuvant-mediated antigen uptake. *Sci Transl Med.* 2017;9(393).
514 doi:10.1126/scitranslmed.aal2094.
- 515 15. Pauthner M, Havenar-Daughton C, Sok D, et al. Elicitation of Robust Tier 2 Neutralizing
516 Antibody Responses in Nonhuman Primates by HIV Envelope Trimer Immunization Using
517 Optimized Approaches. *Immunity.* 2017. doi:10.1016/j.immuni.2017.05.007.
- 518 16. Jiang H, Wang Q, Sun X. Lymph node targeting strategies to improve vaccination efficacy. *J*
519 *Control Release.* 2017;267(May):47-56. doi:10.1016/j.jconrel.2017.08.009.
- 520 17. Kapadia CH, Tian S, Perry JL, Sailer D, Christopher Luft J, DeSimone JM. Extending antigen
521 release from particulate vaccines results in enhanced antitumor immune response. *J Control*
522 *Release.* 2018;269(October 2017):393-404. doi:10.1016/j.jconrel.2017.11.020.
- 523 18. Yoon YM, Lewis JS, Carstens MR, et al. A combination hydrogel microparticle-based vaccine
524 prevents type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Sci Rep.* 2015;5(March):1-13.
525 doi:10.1038/srep13155.
- 526 19. Buwalda SJ, Boere KWM, Dijkstra PJ, Feijen J, Vermonden T, Hennink WE. Hydrogels in a

- 527 historical perspective: From simple networks to smart materials. *J Control Release*.
528 2014;190:254-273. doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.052.
- 529 20. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res*.
530 2015;6(2):105-121. doi:10.1016/j.jare.2013.07.006.
- 531 21. Nie S, Hsiao WW, Pan W, Yang Z. Thermoreversible pluronic® F127-based hydrogel containing
532 liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: In vitro drug release, cell cytotoxicity, and
533 uptake studies. *Int J Nanomedicine*. 2011;6(1):151-166. doi:10.2147/IJN.S15057.
- 534 22. Zhang K, Shi X, Lin X, Yao C, Shen L, Feng Y. Poloxamer-based in situ hydrogels for controlled
535 delivery of hydrophilic macromolecules after intramuscular injection in rats. *Drug Deliv*.
536 2015;22(3):375-382. doi:10.3109/10717544.2014.891272.
- 537 23. Lamalle-Bernard D, Munier S, Compagnon C, et al. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120
538 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and
539 immunogenicity. *J Control Release*. 2006;115(1):57-67. doi:10.1016/j.jconrel.2006.07.006.
- 540 24. Primard C, Rochereau N, Luciani E, et al. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine
541 vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials*.
542 2010;31(23):6060-6068. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.021.
- 543 25. Ataman-Önal Y, Munier S, Ganée A, et al. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated
544 with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various
545 animal models. *J Control Release*. 2006;112(2):175-185. doi:10.1016/j.jconrel.2006.02.006.
- 546 26. Sze A, Erickson D, Ren L, Li D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation
547 and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. *J Colloid Interface Sci*.
548 2003;261(2):402-410. doi:10.1016/S0021-9797(03)00142-5.
- 549 27. Schmolka IR. Artificial Skin I. Preparation and Properties of Pluronic F-127 Gels for Treatment
550 of Burns. *J Biomed Mater Res*. 1972;6:571-582.
- 551 28. Lu C, Liu M, Fu H, et al. Novel thermosensitive in situ gel based on poloxamer for uterus
552 delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2015;77:24-28. doi:10.1016/j.ejps.2015.05.014.
- 553 29. Opperman PA, Rotherham LS, Esterhuysen J, et al. Determining the Epitope Dominance on the
554 Capsid of a Serotype SAT2 Foot-and-Mouth Disease Virus by Mutational Analyses. *J Virol*.
555 2014;88(15):8307-8318. doi:10.1128/JVI.00470-14.
- 556 30. Mann JFS, McKay PF, Fiserova A, et al. Enhanced Immunogenicity of an HIV-1 DNA Vaccine
557 Delivered with Electroporation via Combined Intramuscular and Intradermal Routes. *J Virol*.
558 2014;88(12):6959-6969. doi:10.1128/JVI.00183-14.
- 559 31. Gordon S, Teichmann E, Young K, Finnie K, Rades T, Hook S. In vitro and in vivo investigation of
560 thermosensitive chitosan hydrogels containing silica nanoparticles for vaccine delivery. *Eur J*
561 *Pharm Sci*. 2010;41(2):360-368. doi:10.1016/j.ejps.2010.07.004.
- 562 32. Pavot V, Rochereau N, Primard C, et al. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into
563 poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J Control Release*.
564 2013;167:60-67. doi:10.1016/j.jconrel.2013.01.015.
- 565 33. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the Clinic. *Bioeng Transl Med*. 2016;55(4):10-29.
566 doi:10.1002/btm2.10003.
- 567 34. Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations.
568 *Eur J Pharm Biopharm*. 2000;50(1):27-46. doi:10.1016/S0939-6411(00)00090-4.

- 569 35. Klouda L, Mikos AG. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications - a review. *Eur J*
570 *Pharm Biopharm*. 2008;68(1):34-45. doi:10.1016/j.ejpb.2007.02.025.Thermoresponsive.
- 571 36. Nguyen QV, Huynh DP, Park JH, Lee DS. Injectable polymeric hydrogels for the delivery of
572 therapeutic agents: A review. *Eur Polym J*. 2015;72:602-619.
573 doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.03.016.
- 574 37. Peppas NA, Wood KM, Blanchette JO. Hydrogels for oral delivery of therapeutic proteins.
575 *Expert Opin Biol Ther*. 2004;4(6):881-887. doi:10.1517/14712598.4.6.881.
- 576 38. Singh A, Peppas NA. Hydrogels and scaffolds for immunomodulation. *Adv Mater*.
577 2014;26(38):6530–6541. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.017.Two-stage.
- 578 39. Charrueau C, Tuleu C, Astre V, Grossiord JL, Chaumeil JC. Poloxamer 407 as a thermogelling
579 and adhesive polymer for rectal administration of short-chain fatty acids. *Drug Dev Ind Pharm*.
580 2001;27(4):351-357. doi:10.1081/DDC-100103735.
- 581 40. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical
582 and pharmacological characteristics. *Pharm Res*. 2006;23(12):2709-2728. doi:10.1007/s11095-
583 006-9104-4.
- 584 41. dos Santos ACM, Akkari ACS, Ferreira IRS, et al. Poloxamer-based binary hydrogels for
585 delivering tramadol hydrochloride: Sol-gel transition studies, dissolution-release kinetics, in
586 vitro toxicity, and pharmacological evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:2391-2401.
587 doi:10.2147/IJN.S72337.
- 588 42. Batrakova E V., Kabanov A V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept
589 from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release*. 2008;130(2):98-
590 106. doi:10.1016/j.jconrel.2008.04.013.
- 591 43. Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, Pollock AH, Garside P, Brewer JM. Antigen depot is not
592 required for alum adjuvanticity. *FASEB J*. 2012;26(3):1272-1279. doi:10.1096/fj.11-184556.
- 593 44. Lofano G, Mancini F, Salvatore G, et al. Oil-in-Water Emulsion MF59 Increases Germinal
594 Center B Cell Differentiation and Persistence in Response to Vaccination. *J Immunol*.
595 2015;195(4):1617-1627. doi:10.4049/jimmunol.1402604.
- 596
- 597
- 598

Résultats - Développement d'un gel thermosensible contenant des particules de PLA

Sur la base de nos travaux précédents, nous avons développé un nouveau système de délivrance vaccinal qui permet l'adsorption de p24 sur les NP, elles-mêmes contenues dans un hydrogel thermosensible. Cette stratégie combine ainsi (i) les avantages de la délivrance particulaire qui augmente les réponses immunitaires et (ii) l'avantage d'un hydrogel thermosensible qui augmente la biodisponibilité de nos formulations nanoparticulaire.

Le composite Hydrogel-NP est une solution injectable à la température ambiante qui se transforme en un gel à température corporelle. Cette formulation fournit dans un premier temps un effet dépôt au site d'injection et, dans un deuxième temps favorise une diffusion rapide des NP par la circulation lymphatique, offrant ainsi une stimulation immunitaire systémique, en particulier dans les organes lymphoïdes secondaires.

Nous avons ainsi induit une forte immunité humorale après une seule injection, maintenue pendant plus de 9 semaines, avec la production d'IgG anti-p24 de forte avidité.

Conclusion Perspectives

I. Conclusion

L'objectif de ce travail de thèse a été de combiner trois paramètres fondamentaux vis-à-vis de la conception d'un vaccin VIH-1 : (i) le choix d'un immunogène capable d'induire une réponse protectrice à large spectre, (ii) l'utilisation d'un vecteur synthétique sûr n'induisant pas de réponse anti-vecteur et capable de présenter l'immunogène de manière efficace et (iii) un système d'administration adapté à la voie d'immunisation qui permettrait d'augmenter la durabilité de la réponse protectrice.

1. Choix de de la BG505 SOSIP comme immunogène

La glycoprotéine d'Env du VIH est la seule protéine virale exposée et, par conséquent, la cible principale des anticorps fonctionnels contre le virus. Env est fortement glycosylée, « masquant » sa détection par le système immunitaire, elle est instable, en constante mutation, et change de forme pour se fixer et infecter les cellules humaines⁹². En utilisant les stratégies classiques de vaccin sous-unitaire avec la glycoprotéine d'Env monomérique, de forts taux d'anticorps ont été obtenus, mais sans neutralisation efficace. D'après plusieurs études, cela est dû au fait que les sous-unités monomériques ne possédaient pas la conformation native du trimère d'Env^{104,105}.

Pour contourner ce problème, un travail d'optimisation de la glycoprotéine d'Env a été fait afin d'obtenir une forme stable du trimère Env. Des mutations ont été introduites, notamment un pont disulfure entre la gp120 et la gp41 (SOS)^{106,107}. En 2002, Sanders et Moore ont développé un premier trimère d'Env stabilisé appelé gp140 SOSIP¹⁰⁸. En 2013, ils ont optimisé une SOSIP dérivée d'un virus de clade A, isolé chez un nouveau-né qui a développé des bNAbs⁹¹. Cette nouvelle SOSIP, nommée BG505 SOSIP, est le premier antigène à montrer une capacité à induire des anticorps neutralisants forts contre un virus autologue/hétérologue.

Aujourd'hui, il existe des dizaines de ces trimères stables, dont certains sont déjà en cours ou en préparation pour des essais cliniques. Un essai de phase I aux États-Unis et au Kenya fera appel à un vaccin utilisant la protéine gp140 BG505 SOSIP.664 comme antigène.

Une grande partie de ce travail de thèse a consisté à (i) développer des NP de PLA fonctionnalisées avec des glycoprotéines d'enveloppe, (ii) caractériser ces formulations

(diamètre hydrodynamique, taux d'adsorption et stabilité) et (iii) évaluer les réponses immunitaires induites.

Une première étude a été réalisée avec deux glycoprotéines d'enveloppe (gp140 CN54 et gp41) qui ont un poids moléculaire plus faible et un taux de glycosylation moins important que celui de la BG505 SOSIP. Ces travaux sont présentés en annexe 1. Ils ont permis de mettre au point un protocole d'adsorption des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 à la surface des NP de PLA. Ce protocole est reproductible et nous permet d'obtenir des formulations stables dans le temps. Suite à la mise au point et à la caractérisation physico-chimique de ces formulations, leur pouvoir adjuvant a été évalué chez la souris. Deux expériences *in vivo* ont montré que les nanoparticules formulées avec les glycoprotéines d'enveloppe induisaient des fortes réponses immunitaires humorales.

2. Formulation de la BG505 SOSIP sur un vecteur qui transporte et présente l'immunogène de manière efficace

Bien que les vecteurs viraux soient considérés comme plus efficaces, les véhicules non viraux reçoivent de plus en plus d'attention car ils sont plus sûrs, plus polyvalents, et possèdent une facilité de préparation et d'amélioration. Dans ce contexte, des études confirment la valeur ajoutée des particules en tant que système de transport, capable d'induire une réponse immunitaire puissante.

Les particules à base d'acide poly-lactique (PLA) sont largement étudiées en tant qu'outil vaccinal pour leur capacité à libérer de façon prolongée des antigènes et/ou des adjuvants tout en étant dégradées à plus ou moins long terme par l'organisme, évitant les risques d'accumulation et de toxicité. Le polymère utilisé pour la synthèse des particules est biodégradable, biocompatible et biorésorbable. Le PLA est approuvé par la FDA et l'EMA et déjà utilisé dans de nombreuses applications en médecine (fils de suture, implants biorésorbables etc.)

De plus, ces particules sont capables de délivrer des peptides et des protéines à des tissus spécifiques et d'aider les CPA à déclencher une forte réponse immunitaire¹⁵³⁻¹⁵⁵. Les travaux précédents du laboratoire ont permis de concevoir un véhicule de vaccination polyfonctionnel, à base de particules biodégradables de PLA vectorisant un ou plusieurs Ags adsorbés en surface. Après administration par voie sous-cutanée chez différents modèles

Conclusion et Perspectives

animaux, ces formulations vaccinales induisent de fortes réponses humorales systémiques, comparables à celles induites par l'Alum ou le MF59^{158,159}.

Suite aux premiers résultats sur les glycoprotéines d'Env, nous avons travaillé avec la BG505 SOSIP grâce à une collaboration avec le Pr. Ralf Wagner (Regensburg, Allemagne). Par cette collaboration, nous avons pu mettre au point les adsorptions, comme décrit précédemment, et nous avons cherché à déterminer l'antigénicité de la BG505 SOSIP après adsorption sur les NP de PLA. Pour cela, nous avons utilisé la technique de Microscale Thermophoresis (MST), qui est une technique puissante et bien établie pour l'analyse des interactions moléculaires¹⁸⁷. La technique de MST permet de mesurer les constantes d'affinité et offre plusieurs avantages, notamment une faible consommation d'échantillons, une acquisition rapide des données, aucune limitation de la taille des molécules et la capacité de mesurer les affinités en solution¹⁸⁸.

Dans ce travail, nous avons pu étudier par cet outil le profil antigénique des immunogènes Env qui ont une structure trimère native, structure conservée pendant l'analyse en MST, en analysant la BG505 SOSIP trimérique avec un panel d'anticorps reconnaissant les structures quaternaires. Nous avons ainsi pu montrer que la structure native des trimères BG505 SOSIP est préservée à la surface des NP lorsque l'analyse est faite dans des tampons, tandis que la présence de sérum humain (à 50 %) semble avoir une légère influence négative sur la structure du trimère.

Après avoir étudié les caractéristiques physico-chimiques de nos formulations, nous avons étudié la réponse systémique induite par les NP-BG505 SOSIP chez la souris. Concernant les trois groupes d'intérêt (NP-BG505 SOSIP, NP(Gardi)-BG505 SOSIP et AddaVax-BG505 SOSIP) on observe des titres IgG anti-BG505 SOSIP de l'ordre de 1.10^6 et stables jusqu'à 8 mois. Nous n'obtenons pas de différence significative entre les groupes. Cependant, nous remarquons un léger effet adjuvant de l'encapsulation du ligand de TLR7 (Gardiquimod) dans les nanoparticules, comparé au groupe NP-BG505 SOSIP.

Lors de l'analyse de l'avidité des IgG, comme pour les titres d'IgG, nous n'obtenons pas de différence significative entre les trois groupes d'intérêt. Cependant nous observons une avidité supérieure lorsque la BG505 SOSIP est adsorbée sur les PLA (55 %), et cette avidité est augmentée lorsque le Gardiquimod est encapsulé à l'intérieur des particules (65 %), comparé à l'AddaVax (22 %).

Lors de cette expérience *in vivo*, nous avons utilisé un protocole d'immunisation de référence qui a montré que nous obtenons des titres aussi forts que le contrôle positif communément pratiqué. De façon intéressante, la quantité d'anticorps induits est la même, mais la qualité des anticorps est bien supérieure lorsque l'on utilise les NP de PLA.

3. Système d'administration adapté à la voie d'immunisation

Les hydrogels sont parmi les matériaux les plus utilisés pour obtenir des formes pharmaceutiques à libération contrôlée d'un médicament. Ils sont formés par des polymères hydrophiles qui vont retenir les molécules d'eau et se gonfler, formant des réseaux tridimensionnels. Cette réticulation des chaînes de polymères peut se produire par la formation de liaisons covalentes, hydrogène, d'interactions de Van der Waals ou pour des raisons physiques ¹⁶⁸.

Du fait de leur contenu important en eau, les hydrogels présentent des propriétés analogues à celles des tissus biologiques, et plus particulièrement des matrices extracellulaires, ce qui leur confère *a priori* un bon potentiel de biocompatibilité ^{169,170}.

L'application la plus classique de cette propriété des hydrogels permet la formulation de produits dit « gélifiants *in situ* » qui se présentent (i) sous la forme d'une solution hors condition physiologique et (ii) qui réticule en réponse aux conditions physiologiques du site d'administration afin de former une inclusion semi-solide ¹⁷¹.

La capacité de gélification *in situ* en réponse à la température est particulièrement intéressante car elle permet de proposer des formulations liquides à température ambiante dont la manipulation (e.g., prélèvement, transfert) et l'administration (e.g., injection, étalement) seront facilitées tout en formant une surface optimale de contact avec le tissu au site d'administration. L'augmentation de viscosité concomitante à l'administration permet d'assurer un temps de résidence prolongé, accompagné de propriétés de relargage modulables ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

Ainsi la formation *in situ* d'un hydrogel polymérique présente l'avantage d'une action prolongée, d'une fréquence d'administration réduite, de l'administration de macromolécules biologiques labiles (hormones, protéines et gènes¹⁸⁵). Le poloxamer P407 exerce une modulation significative de la fonction immunitaire et favorise l'action de nombreux

Conclusion et Perspectives

antigènes. Le mécanisme reste inconnu, mais des études ont émis l'hypothèse que le gel de poloxamer augmente la biodisponibilité de l'antigène grâce à ses caractéristiques thermosensibles et de promotion de la stabilité ¹⁸⁰.

L'effet dépôt des particules est bien connu ⁴¹, cependant il est nécessaire de développer une forme vaccinale avec un relargage prolongé afin d'avoir le moins d'immunisations possibles et donc une bonne couverture vaccinale par la population.

La nature amphiphile des poloxamers leur confère d'excellentes capacités de solubilisation vis-à-vis d'un grand nombre d'actifs, qui permet de réduire le volume administré ¹⁸⁰. De plus les poloxamers sont largement reconnus pour leurs propriétés de relargage modulables ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

Afin d'optimiser les propriétés galéniques des poloxamers, la tendance actuelle montre une complexification des systèmes proposés avec notamment (i) le mélange de poloxamers entre eux ou avec d'autres polymères afin d'optimiser les propriétés rhéologiques des formulations ^{182,183} et (ii) l'inclusion de transporteurs (*e.g.*, liposomes, particules) permettant d'améliorer le contrôle du relargage et le ciblage thérapeutique ^{170,171,184}.

Dans ce contexte, nous avons développé un hydrogel thermosensible biocompatible contenant des NP de PLA afin d'augmenter leur biodisponibilité.

D'après les premiers résultats obtenus au laboratoire, nous avons sélectionné des concentrations de poloxamers qui nous permettaient de cibler une température de gélification pour une administration sous-cutanée. Pour cela, nous avons étudié différentes concentrations de poloxamers (22 % et 25 %), avec différents ratios de P407 : P188 (4:1 et 3:1), en présence ou non de NP de PLA. Nous avons observé que la présence des NP de PLA dans l'hydrogel induisait une augmentation de la température de gélification, c'est-à-dire qu'un apport d'énergie supplémentaire est nécessaire pour obtenir la phase gel. En moyenne, la température de gélification était décalée de +2°C en présence de NP.

Ces premiers résultats nous ont permis de sélectionner une formulation d'intérêt avec 24 % de poloxamers total à un ratio 4:1. Ce choix a été fait pour deux raisons : (i) nous souhaitons une prise instantanée de l'hydrogel lors de l'injection sous-cutanée, nous devons donc avoir une température de gélification bien inférieure à 37°C mais qui reste en solution à température

Conclusion et Perspectives

ambiante, et (ii) le ratio 4:1 nous permet d'utiliser une concentration totale en poloxamers plus faible, donc une facilité d'injection avec des aiguilles standards.

Cette formulation a été contrôlée en rhéologie et en présence de NP. La température de gélification Hydrogel-NP est $\sim 32^{\circ}\text{C}$, ce qui est tout à fait cohérent pour une administration sous-cutanée.

Les caractéristiques physico-chimiques de notre formulation ont été étudiées (profil de dégradation, diamètre hydrodynamique des NP et stabilité des NP dans l'hydrogel) par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et en microscopie à balayage (MEB). Les NP sont stables au moins 20 jours dans l'hydrogel conservées à $+4^{\circ}\text{C}$.

Afin de caractériser plus précisément l'effet de l'hydrogel sur les NP, nous avons étudié la biodistribution *in vivo* des NP en présence ou non de l'hydrogel. Pour cela, nous avons utilisé la tomographie optique de fluorescence grâce au système FMT 4000. Cette méthode non-invasive permet de suivre au sein du même animal la biodistribution au cours du temps. Nous avons encapsulé dans les NP de PLA le fluorophore DiR qui émet dans le proche infra-rouge et est détecté par le FMT. De façon intéressante, nous avons observé que la présence de l'hydrogel permettait dans un premier temps d'avoir un effet dépôt des NP, comme pour les NP seules, puis dans un deuxième temps permettait de favoriser la diffusion des NP dans le corps de la souris. Ceci suggère que les NP peuvent avoir un effet plus systémique que local, et ainsi potentiellement stimuler différents ganglions, drainants ou distants, et augmenter la réponse immunitaire.

Nous avons donc évalué les réponses immunitaires induites par notre formulation, en utilisant la p24 pour la « preuve du concept », et en suivant le protocole de référence ADITEC¹⁸⁹.

Nous avons pu mettre en évidence que l'Hydrogel-NP-p24 induisait une réponse immunitaire aussi forte que le contrôle positif, l'AddaVax, avec la même cinétique de réponse humorale.

Lorsque nous analysons la qualité des anticorps induits nous observons une différence significative entre le groupe Hydrogel-NP-p24 et AddaVax-p24. En effet, le contrôle positif induit des anticorps avec un pourcentage d'avidité autour de 30 %, 42 jours ou 63 jours après l'immunisation. Tandis que l'Hydrogel-NP-p24 induit des anticorps avec un pourcentage d'avidité autour de 60 % puis 65 %, pour respectivement 42 jours et 63 jours post-immunisation.

De cette analyse, trois informations importantes apparaissent : (i) notre formulation d'intérêt induit des anticorps plus affins que le contrôle positif, (ii) cette affinité augmente au cours du temps alors que celle de la formulation AddaVax stagne, et (iii) cette avidité augmente au cours du temps malgré la légère baisse de quantité totale d'anticorps entre J42 et J63.

II. Perspectives

Ces premiers résultats, qui couplent le pouvoir adjuvant des NP et le fait que l'antigénicité de la BG505 SOSIP est en partie conservée lors de l'adsorption, nous ont permis de développer une collaboration afin de tester sur le modèle Primate Non-Humain (PNH) les formulations développées dans ce travail de thèse. Le modèle primate est le plus pertinent dans le cadre du développement d'un vaccin anti-VIH-1 avant les études d'efficacité chez l'Homme.

Cette expérience PNH a débuté en octobre 2018 et finira en juillet 2019. Lors de cette étude, des macaques rhésus sont traités par pulvérisation d'IL-7 à la surface de la muqueuse vaginale puis immunisés par la même voie avec des NP-BG505 SOSIP. Après établissement de la réponse immunitaire locale, les macaques seront soumis à une infection vaginale par un virus recombinant (SHIV) capable d'infecter les macaques. Le développement de la réponse immunitaire muqueuse et systémique chez les singes, au cours du processus de vaccination ainsi que pendant la phase aigüe de l'infection, sera étudié.

Dans un deuxième temps, une fois que nos formulations seront bien caractérisées, il serait intéressant d'utiliser le modèle PNH pour une immunisation sous-cutanée d'hydrogel-NP-BG505 SOSIP. En effet, les protocoles de synthèse de nos deux composants (*i.e.* Hydrogel-NP d'un côté et NP-BG505 SOSIP de l'autre) sont largement maîtrisés et reproductibles. Une nouvelle mise au point sera nécessaire afin de s'assurer de la bonne conformation de la BG505 SOSIP, mais le projet est aisément réalisable. De plus, une collaboration avec le CEA – IDMIT (Infectious Disease Models and Innovative Therapies) vient d'être initiée afin d'évaluer la biodistribution des NP, avec ou sans hydrogel, chez le primate. L'IDMIT est une infrastructure de biologie et de santé dédiée à la recherche pré-clinique des maladies infectieuses hébergée par le CEA. La plateforme « *In vivo* imaging » dirigée par C. Chapon utilise des systèmes d'imagerie déjà maîtrisés par l'équipe dans le cadre de l'étude des NP, comme l'illustrent nos résultats de biodistribution chez la souris et l'analyse proche infra-rouge (Résultats 2).

Conclusion et Perspectives

Afin d'augmenter les réponses cellulaires et l'avidité des anticorps induits nous souhaitons ajouter des ligands de l'immunité innée dans nos formulations d'intérêt. Le Gardiquimod, ligand TLR7, a montré une légère augmentation de la réponse humorale. C'est pourquoi nous souhaitons utiliser le Resiquimod, ligand TLR7/8, qui permettrait d'induire une plus forte réponse cellulaire et dont l'intérêt en vaccination VIH a déjà été montré en induisant une réponse CTL¹⁹⁵. Nous aimerions aussi tester le ligand NOD2, car son protocole d'encapsulation dans les NP est largement maîtrisé et il permet d'orienter une réponse muqueuse. Nous testerons ces deux ligands séparément, soit encapsulé dans les NP contenues dans l'hydrogel ou bien le ligand contenu dans l'hydrogel en présence de NP. La formulation Hydrogel-NP(ligand)-BG505 SOSIP serait la plus facile à expérimenter puisque déjà mise au point, en partie. La formulation Hydrogel(ligand)-NP-BG505 SOSIP serait plus délicate à mettre en place, mais nous faisons l'hypothèse que les micelles formées par l'hydrogel pourraient diffuser les ligands en les « formulant » et permettre ainsi une réponse immunitaire plus forte.

Concernant l'importance de l'avidité dans les réponses immunitaires induites, et la nécessité d'obtenir des anticorps neutralisants à large spectre, il sera intéressant d'évaluer l'activité ADCC (Cytotoxicité Cellulaire Dépendante de l'Anticorps) et ADCVI (Antibody-Dependent Cell-mediated Virus Inhibition). En parallèle, l'activité neutralisante des IgG et IgA présentes et purifiées à partir du sérum, des fèces ainsi que des lavages vaginaux, pourra être mesurée dans un test de neutralisation sur PBMCs infectés à l'aide de différents isolats primaires de type Tier1 et Tier2¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Nous aimerions également approfondir l'étude des réponses cellulaires en analysant les balances cytokiniques et les profils des lymphocytes sériques et muqueux.

A plus long terme, il serait intéressant d'étudier les réponses immunitaires induites par l'utilisation d'immunogènes séquentiels qui miment au mieux l'infection naturelle et l'échappement du virus. Pour cela, notre collaborateur allemand Ralf Wagner nous a déjà proposé des variants de Clade C pour lesquels ils ont obtenu, chez le lapin, de fortes réponses immunitaires neutralisantes contre un virus autologue et une neutralisation intermédiaire contre un virus hétérologue de Tier2.

Annexes

1. Adsorption de différentes glycoprotéines du VIH-1 sur les particules de PLA

Utilisation des gp140 et gp41 - Caractérisations, étude de stabilité et évaluation *in vivo* des réponses immunitaires induites

2. Comparaison des pouvoirs adjuvants des micelles et de particules de PLA

Caractérisations et évaluation *in vivo* des réponses anti-p24 induites

3. Utilisation de la p17 comme immunogène induisant des réponses immunitaires anti-gp41

Article 1

4. Intérêt des particules polymériques pour la vaccination et le ciblage des ganglions

Revue – Co-premier auteur

I. Adsorption de différentes glycoprotéines du VIH-1 sur les NP de PLA

Comme expliqué précédemment, avant de travailler avec la BG505 SOSIP j'ai eu accès à différentes glycoprotéines d'Env grâce à des collaborations.

Je présente dans un premier temps mes résultats obtenus avec la gp140 CN54 de Polymun, puis dans un deuxième temps avec deux gp41 (fournis par Wilfried Weissenhorn et Christiane Moog).

1.1. Adsorption de la gp140 et évaluation *in vivo*

Devant la difficulté d'obtenir un vaccin capable d'induire une réponse immunitaire à large spectre anti-VIH, l'utilisation de molécules immunostimulantes, comme les ligands de PRR, dans un candidat vaccin dirigé contre le VIH-1 est devenue une question critique. Néanmoins, cette recherche reste encore peu étudiée, notamment devant leurs toxicités potentielles s'ils sont utilisés à forte dose. L'un des objectifs de ce projet était dans un premier temps de tester la combinaison d'un ligand de PRR encapsulé dans la particule, et à sa surface l'adsorption d'une glycoprotéine d'Env, afin d'induire à la fois des réponses immunitaires humorales à large spectre et à médiation cellulaire.

Il a été maintenant bien établi que l'activation des cellules immunitaires par le biais de ligands mimant les PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) et ciblant ainsi les PRRs (Pattern recognition receptors) joue un rôle clé dans le développement de réponses immunitaires puissantes et orientées^{199,200}. Les PRRs intra et extracellulaires sont ainsi subdivisés en quatre groupes principaux : TLRs, NLRs, CLR et RLRs (pour respectivement Toll-like receptors, NOD-like receptors, C-type lectin receptors, RIG-I-like receptors)²⁰¹.

Cibler les PRR avec des adjuvants portant des ligands appropriés apparaît donc une approche prometteuse²⁰², et plusieurs travaux ont porté sur l'incorporation de ces molécules «signal de danger» sur les NPs-PLA, soit par encapsulation (monophosphoryl lipide A (MPL), le poly (I: C)²⁰³, CpG²⁰⁴, NOD1 et/ou des ligands NOD2¹⁶⁰) ou par couplage de surface (en général, le mannose²⁰⁵).

Il a été démontré par Cooney et coll. que la stimulation du récepteur NOD2 induisait un mécanisme d'autophagie dans des CD humaines, influençant la présentation antigénique²⁰¹ et la présentation croisée²⁰⁶. 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.

Des travaux préliminaires de l'équipe nous ont aussi permis de montrer 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.

Comme nous pouvons encapsuler dans le cœur des nanoparticules des ligands de PRR^{149,160,161,207}, sans modifier la capacité d'adsorption d'antigènes du VIH-1 à leur surface, nous avons fait l'hypothèse que nous pouvons diriger spécifiquement la réponse immunitaire vaccinale vers une orientation muqueuse en utilisant un ligand NOD2.

Pour induire une réponse neutralisante à large spectre, nous avons choisi d'étudier l'apport de NOD2 vis-à-vis du comportement immunogénique des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1.

a. Caractérisations des PLA(NOD2)-gp140

Pour mener à terme mon projet, je bénéficie de l'expertise du laboratoire d'accueil, qui a déjà mis au point le protocole de formulation des nanoparticules PLA(NOD2), coatées ou non par la protéine p24. Je me suis donc concentrée sur l'élaboration de l'adsorption de la gp140 sur les PLA(NOD2). J'ai mis au point un protocole d'adsorption de la gp140 sur les nanoparticules de PLA qui m'a permis d'obtenir des formulations reproductibles, mais qui nécessite une pré-filtration de la gp140. Les formulations produites tendent à être conforme aux exigences du laboratoire, mais avec quelques difficultés mineures puisque la gp140 a tendance à trimériser. J'ai obtenu des formulations avec un taux d'encapsulation de 93% de NOD2, un taux de 90.09% d'adsorption de la gp140 sur les PLA, avec un diamètre final de 236.4nm et un indice de polydispersité de 0.132 (Figure 33).

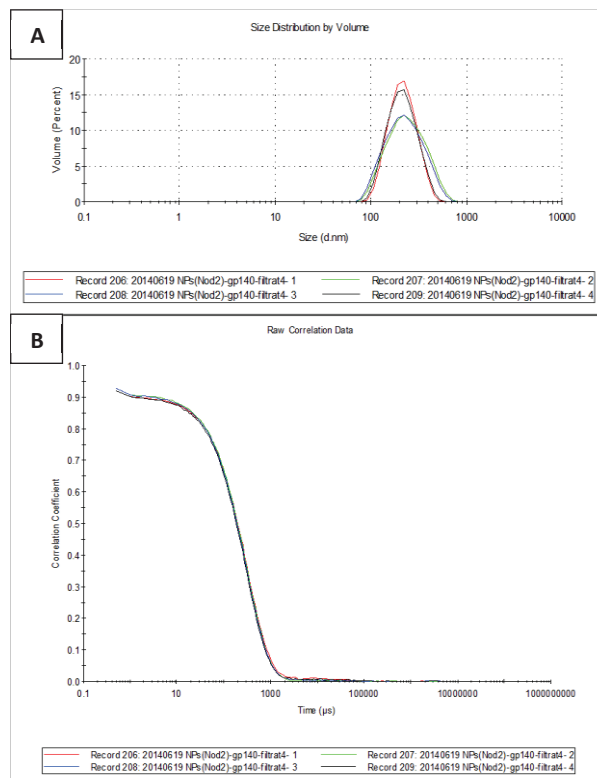


FIGURE 33 : CARACTERISTIQUES DE LA FORMULATION PLA(NOD2)-gp140.

(A) Distribution en taille des nanoparticules PLA(NOD2)-gp140. Le nombre de nanoparticules en fonction du diamètre hydrodynamique a été déterminé par DLS (ZetaSizer Malvern). (B) Corrélogramme des nanoparticules PLA(NOD2)-gp140. Chaque courbe représente une mesure.

b. Etude de la réponse immunitaire à long terme in vivo

Après la caractérisation des formulations de PLA(NOD2)-gp140, j'ai testé leur pouvoir adjuvant à long terme en immunisant des souris BALB/c. J'ai comparé l'injection sous-cutanée de l'encapsulation de NOD2 dans les nanoparticules avec la gp140 adsorbée à leur surface (PLA(NOD2)-gp140), des nanoparticules avec la gp140 adsorbée dessus (PLA-gp140), de l'injection de la gp140 et de NOD2 sous forme libre (gp140 + NOD2) et la gp140 seule (gp140). Pour cela j'ai administré 4 injections sous-cutanées à intervalle de deux semaines. J'ai effectué des prélèvements sanguins à intervalles réguliers jusqu'à 34 semaines (238 jours). Malheureusement, suite à une contamination d'une zone de production de Charles River par différents pathogènes murins, des souris contaminées ont été apportées en zone d'hébergement. Suite à cela, toutes les souris de cette zone ont été contaminées, y compris celles de mon expérimentation. J'ai été dans l'obligation de sacrifier toutes mes souris, ce qui a conduit à la fin prématurée de mon protocole, d'autant plus que les derniers prélèvements effectués étaient contaminés. Ces derniers prélèvements ne seront donc pas inclus dans mes résultats présentés ci-dessous.

Annexe - Adsorption de la gp140 et de la gp41 sur les NP de PLA

Le pouvoir adjuvant de l'injection sous-cutanée de PLA(NOD2)-gp140 a été démontré avec l'obtention d'une forte réponse IgG dans le sérum des souris, et ceci de manière durable. Dès la 1^{ère} injection, on remarque un effet significatif des PLA(NOD2)-gp140 comparé à l'injection de PLA-gp140, ou l'injection libre de gp140 et NOD2, ou la gp140 seule (Figure 34A). On remarque aussi deux tendances qui se dégagent : (i) tout d'abord un effet des nanoparticules de PLA, qui améliorent l'effet dépôt des injections et (ii), un effet de NOD2 qui potentialise la réponse immunitaire.

Le ratio des titres IgG1/IgG2a a été déterminé au fur et à mesure des prélèvements, ici ne sont représentés que le ratio IgG1/IgG2a lors du dernier prélèvement avant la contamination, soit à la semaine 18 (Figure 34B). Le ratio IgG1/IgG2a est un indicateur de la réponse induite. En effet, les IgG1 augmentent l'immunité humorale par leurs activités sur les pathogènes extracellulaires, tandis que les IgG2a augmentent l'immunité à médiation cellulaire en armant les cellules NKT. Nos résultats montrent que les PLA(NOD2)-gp140 induisent majoritairement une réponse à médiation humorale. Conformément à ce qui a déjà été publié ²⁰⁸, on remarque que l'encapsulation de NOD2 induit une très forte réponse à médiation humorale, comparé à PLA-gp140 (x3) et ce de manière significative ($p < 0,01$).

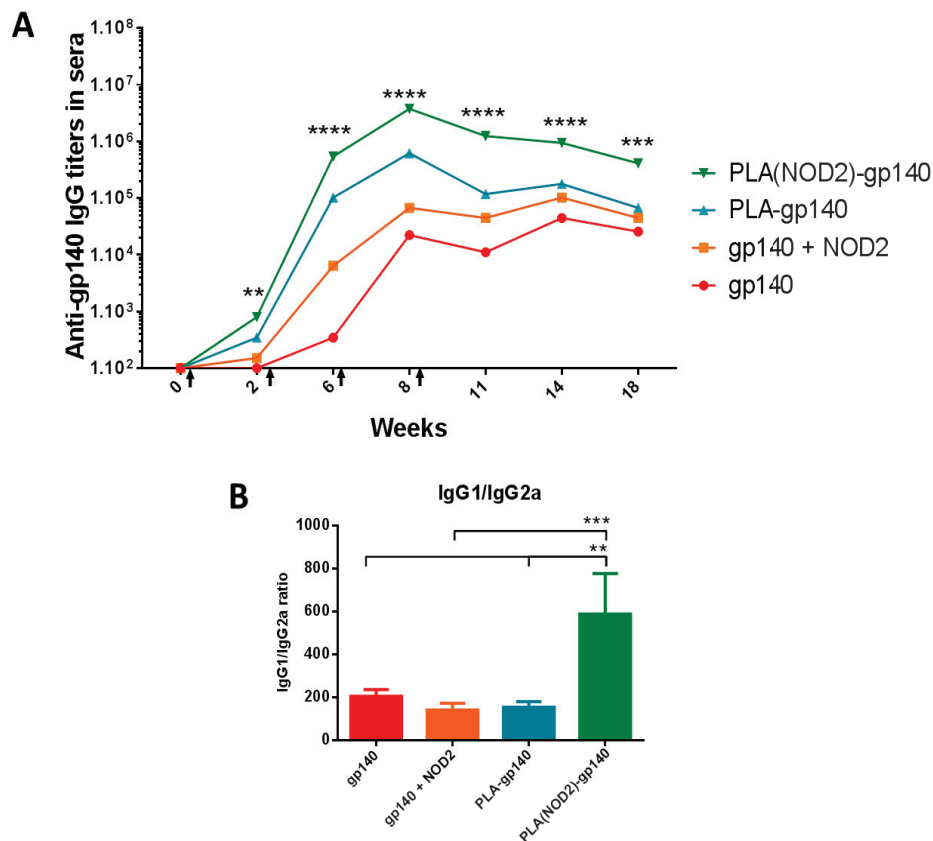


FIGURE 34 : ANALYSE DE LA REPOSE IMMUNITAIRE APRES INJECTIONS DES FORMULATIONS SUR 18 SEMAINES.

(A) Analyse des titres sériques IgG anti-gp140 des souris BALB/c suite à 4 injections sous-cutanées de 100 μ L, contenant 5 μ g gp140 et 5 μ g NOD2 pour les injections PLA(NOD2)-gp140 et gp140+NOD2. (B) Ratio des titres sériques IgG1/IgG2a, prélèvement semaine 18. Les résultats statistiques ont été déterminés en utilisant le test paramétrique ANOVA **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

1.2. Adsorption de la gp41 et évaluation *in vivo*

Suite à ces premiers résultats encourageants nous avons décidé de continuer à explorer les propriétés immunogènes des glycoprotéines d'enveloppe avec la gp41. Ce choix a été déterminé d'un point de vue physico-chimique pour la formulation des nanoparticules mais aussi d'un point de vue immunogène. Premièrement, de par l'encombrement stérique, les nanoparticules formulées avec la gp41 permettent d'obtenir des diamètres plus petits, ce qui mime au mieux la particule virale. Deuxièmement, la gp41intCys récemment décrite par Winfried Weissenhorn a la spécificité de cibler le domaine MPER, domaine qui contient les épitopes induisant les anticorps neutralisants à large spectre 2F5 et 4E10.

a. Caractérisations des PLA-gp41

Ayant à disposition au laboratoire une autre gp41, nommée S30, nous avons souhaité comparer l'adsorption des deux gp41. Sur la Figure 35 nous pouvons observer les différences de séquences entre ces deux glycoprotéines, qui sont mineures.

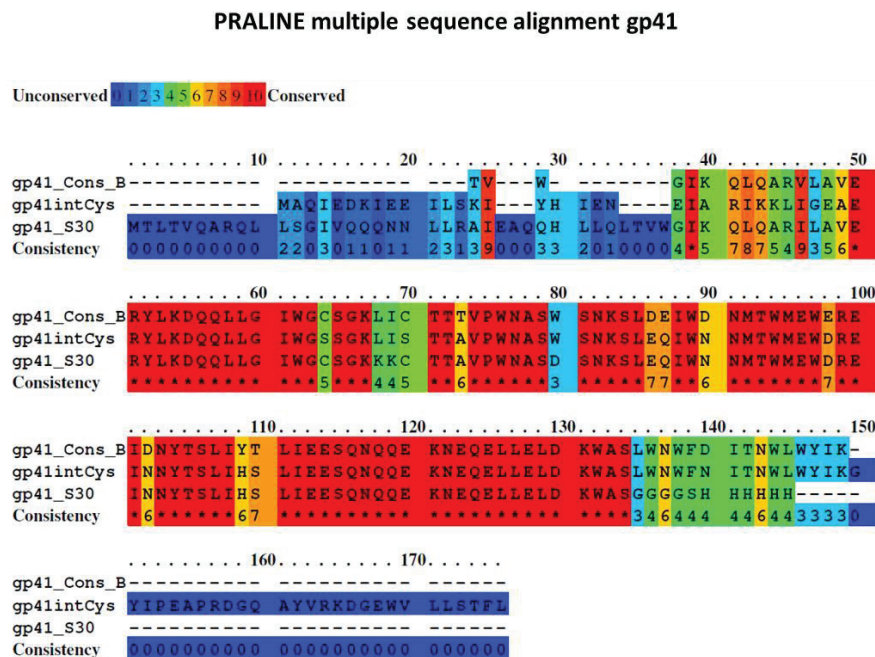


FIGURE 35 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES DE LA GP41 (HXB2, CONSENSUS B, GP41_CONS_B), DE LA GP41INTCYS ET DE LA GP41 S30. ALIGNEMENT FAIT AVEC L'OUTIL DE BIOINFORMATIQUE PRALINE.

Afin de comparer les deux gp41, je les ai adsorbées à la surface des particules et j'ai fait une première étude de stabilité. Les deux glycoprotéines ont été adsorbées sur les PLA à la même concentration, mais avec deux taux solide de PLA : 0.5% et 1%. J'ai mesuré à différents temps les tailles, indices de polydispersité et potentiels zêta des quatre formulations (Figure 36). Le potentiel zêta est la mesure de l'intensité de la répulsion ou de l'attraction électrostatique ou électrique entre particules. C'est l'un des paramètres fondamentaux connus pour affecter la stabilité. La mesure du potentiel zêta apporte une vision détaillée des causes de dispersion, d'agrégation ou de floculation et peut être appliquée pour améliorer la formulation de suspensions.

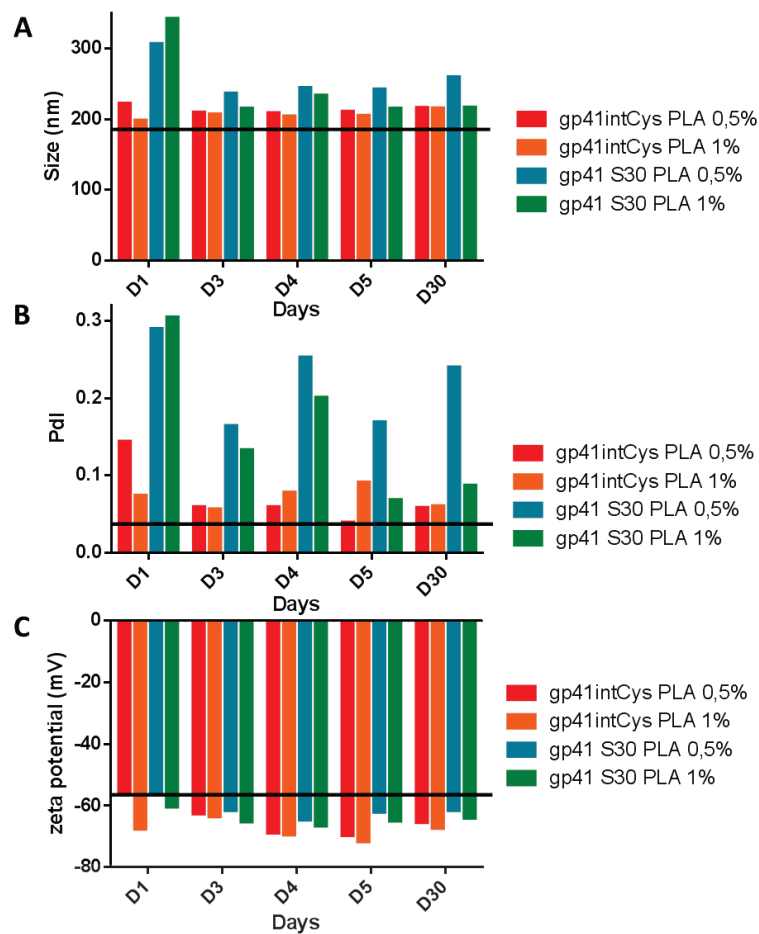


FIGURE 36 : SUIVI DES FORMULATIONS SUR 30 JOURS A +4°C.

(A) Taille des formulations au cours du temps. Les PLA nues ont une taille de 191.2nm (trait noir). (B) Indice de polydispersité des formulations au cours du temps. Les PLA nues ont un Pdl de 0.069 (trait noir). (C) Potentiel zêta des formulations au cours du temps. Les PLA nues ont un potentiel zêta de -56.9mV.

Pour les quatre formulations nous obtenons des taux d'adsorption similaires (autour de 90-92% d'adsorption). Cependant, nous remarquons qu'avec l'adsorption de la gp41intCys nous obtenons des formulations qui : (i) sont plus petites en taille et stables dans le temps (autour de 200nm ; Figure 36A), (ii) ont un très faible indice de polydispersité (Pdl, inférieur à 0,1 ; Figure 36B), (iii) ont un faible potentiel zêta (autour de -70mV ; Figure 36C). A chaque temps et pour chacun des paramètres observés, les formulations avec la gp41intCys sont de meilleures qualités qu'avec la gp41 S30. De plus, lorsque l'on compare avec les PLA nues, c'est-à-dire les PLA sans glycoprotéine, soit avant adsorption, il y a un très faible changement des caractéristiques avec la gp41intCys (Figure 36, le trait noir correspond aux PLA nues). Au vu de ces résultats et des propriétés immunogéniques de la gp41intCys nous nous concentrerons

par la suite sur la gp41intCys. De plus, ayant obtenus des meilleurs résultats avec la concentration de PLA à 1%, ce sera la concentration choisie pour la suite des formulations.

b. Stabilité des PLA-gp41intCys

Afin de caractériser au mieux mes formulations, j'ai fait une étude de stabilité sur 2 mois à +4°C. J'ai formulé mes nanoparticules de PLA avec la gp41intCys comme précédemment, c'est-à-dire à 1% de PLA et 100µg/ml de gp41intCys. J'ai mesuré le pourcentage d'adsorption le jour de la formulation puis deux mois plus tard (J60) et j'ai régulièrement analysé la taille, l'indice de polydispersité ainsi que le potentiel zêta de ma formulation (Figure 37). Le pourcentage d'adsorption de la gp41intCys sur les PLA baisse très légèrement entre J1 et J60, soit respectivement 88.82% et 84.37%. Nous remarquons que la taille des PLA-gp41intCys ne varie pas (Figure 37A) tout comme son potentiel zeta (Figure 37C). L'indice de polydispersité varie très légèrement et ne dépasse jamais 0.08, nos formulations sont donc monodisperses (Figure 37B). Comme précédemment, le trait noir correspond aux caractéristiques des PLA nues.

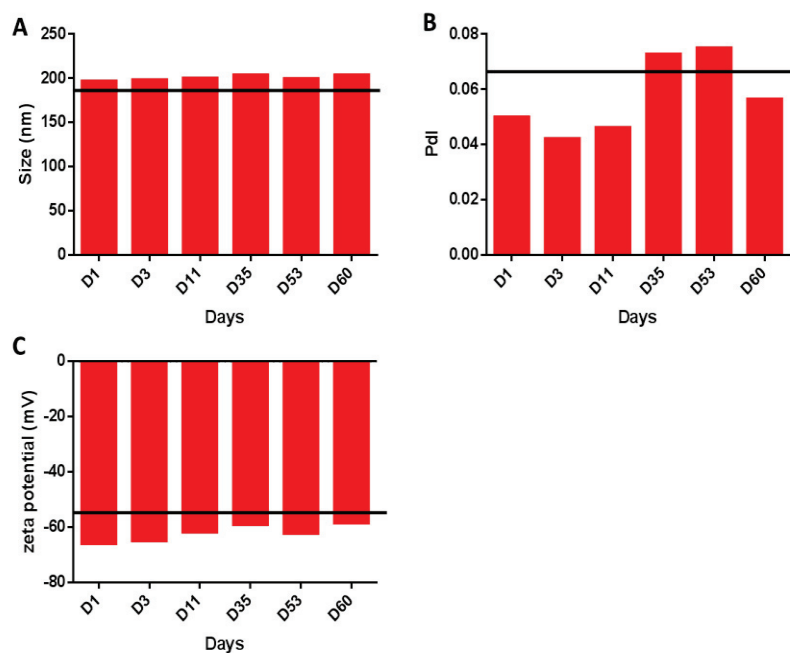


FIGURE 37 : ÉTUDE DE STABILITE DES FORMULATIONS PLA-GP41INTCYS SUR 2 MOIS A +4°C.

(A) Mesures des tailles au cours du temps. Les PLA nues ont une taille de 191.2nm (trait noir). (B) Mesures de l'indice de polydispersité au cours du temps. Les PLA nues ont un Pdl de 0.069 (trait noir). (C) Mesures des potentiels zêta au cours du temps. Les PLA nues ont un potentiel zêta de -56.9mV (trait noir).

c. Etude de la réponse immunitaire in vivo

En parallèle de ces caractérisations j'ai effectué une expérimentation préliminaire en utilisant des sprays (AptarPharma). Ces sprays ont été utilisés pour observer si on pouvait avoir une prise en charge des nanoparticules fluorescentes après administration sur la peau des souris épilées. Des résultats préliminaires ont montré, après analyse en microscopie confocale, un passage dans le derme de la souris (résultats non montrés). Au vu de ces premiers résultats encourageants nous avons donc décidé de tester nos formulations PLA-gp41intCys avec le spray et la voie sous-cutanée comme contrôle.

L'immunisation de souris avec les PLA-gp41 étant notre première expérimentation faite avec la gp41 et l'équipe ayant une forte expertise avec la protéine p24 nous avons ajouté l'administration de nanoparticules formulées avec la p24 comme contrôle. Cette expérience a donc été divisée en deux grands groupes selon la voie d'administration (spray/sous-cutané) et en trois sous-groupes pour l'antigène testé (gp41/p24/gp41+p24). Nous avons administré 3 fois nos formulations à intervalle de 2 semaines. Les souris ont reçu à chaque administration 4,8µg de gp41 et 4,75µg de p24. Pour le groupe PLA-gp41 + PLA-p24 les souris ont reçu la moitié de la dose pour chaque protéine. Le spray a été effectué sur l'intérieur de la cuisse de souris épilée à la crème dépilatoire.

Après avoir prélevé le sérum, j'ai analysé les titres IgG (Figure 38). Que ce soit avec la gp41 ou la p24, nous remarquons que l'immunisation par les sprays sur la peau de la souris ne permet pas d'induire de réponse humorale (Figure 38). L'injection de PLA-p24 permet d'obtenir des titres IgG très élevés (1.10^7) sans différence entre l'injection de PLA-p24 seule ou co-administrée avec la PLA-gp41 (Figure 38A). L'injection de PLA-gp41 permet d'obtenir des titres IgG plus modestes (1.10^4), et comme pour la p24 il n'y a pas de différence entre l'injection de PLA-gp41 ou co-administrée avec PLA-p24.

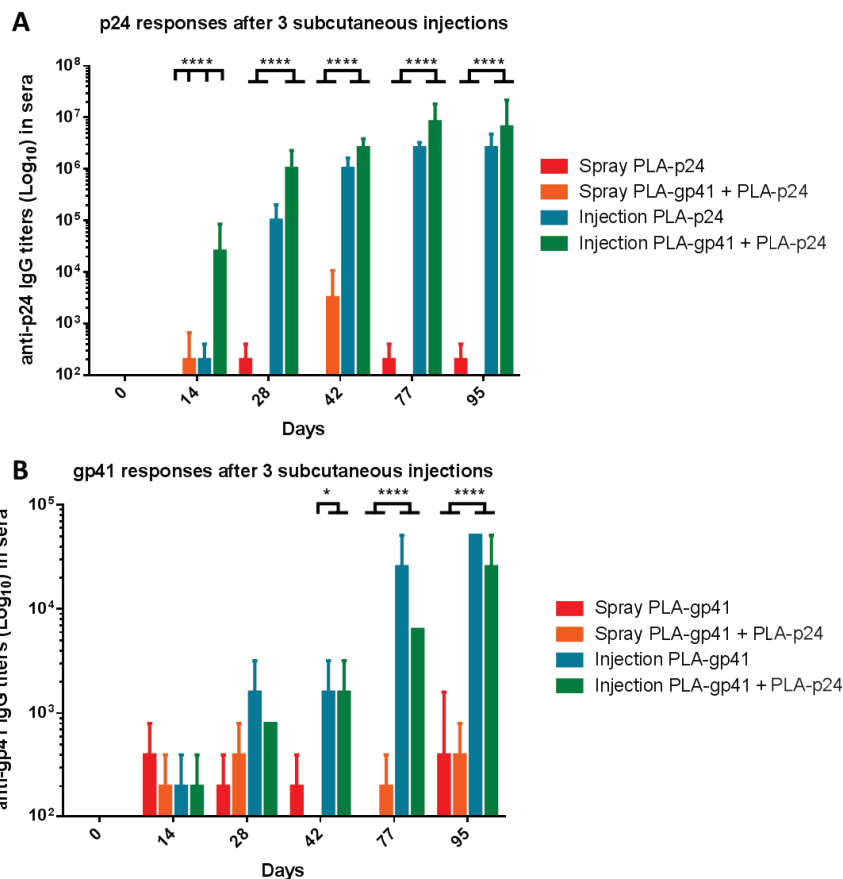


FIGURE 38 : ANALYSE DES TITRES SERIQUES IGG ANTI-P24 ET ANTI-GP41 SUR 95 JOURS.

(A) Immunisation des souris BALB/c suite à 3 immunisations de 100 μ L de formulations PLA-p24 seule ou PLA-p24 + PLA-gp41. (B) Immunisation des souris BALB/c suite à 3 immunisations de 100 μ L de formulations PLA-gp41 seule ou PLA-p24 + PLA-gp41. Les résultats statistiques ont été déterminés en utilisant le test paramétrique ANOVA. **** $p < 0,0001$, * $p < 0,1$.

1.3. Conclusion et perspectives

Grâce à ces travaux j'ai mis au point un protocole d'adsorption des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1. Ce protocole est reproductible et nous permet d'obtenir des formulations stables dans le temps. De plus, ayant validé ce protocole pour la gp140 CN54 et la gp41, qui sont deux glycoprotéines qui ont un poids moléculaire et un nombre de glycosylations très différents, cela nous a permis d'envisager l'utilisation d'autres glycoprotéines d'enveloppe, telle que la BG505 SOSIP. Suite à la mise au point et à la caractérisation physico-chimique de mes formulations j'ai pu évaluer leur pouvoir adjuvant chez la souris. Mes deux expériences *in vivo* ont montré que les nanoparticules formulées avec les glycoprotéines d'enveloppe induisaient des fortes réponses immunitaires.

II. Comparaison des pouvoirs adjuvants des micelles et des NP de PLA

Le terme vecteur désigne un objet capable de transporter une charge vers une cible prédéfinie et de libérer cette charge au niveau de cette cible. En médecine/pharmacologie, un nanovecteur est donc un objet de dimension nanométrique qui a la capacité de transporter une molécule vers un organe cible et de la relâcher au niveau de cet organe.

Un nanovecteur a trois fonctions :

- Protection de la molécule transportée
- Ciblage spécifique
- Libération de la charge

Au niveau pharmacologique, un des avantages de l'utilisation des nanovecteurs est l'augmentation de la surface d'échange entre ces objets et la cible par rapport à d'autres formes galéniques. En effet, plus un objet est petit, plus sa surface spécifique est importante, c'est-à-dire que pour le même volume final, plus un objet est petit plus sa surface en m² est grande.

Au cours des dernières décennies, de nombreux types de nanovecteurs ont été développés. Ils peuvent être classifiés selon leur caractère organique ou inorganique. Les vecteurs inorganiques sont préférentiellement utilisés pour leurs propriétés de traceurs (visualisation en imagerie médicale). Nous développerons ici les vecteurs organiques, utilisés pour leur capacité de transport de molécules, et plus spécifiquement les micelles et les nanoparticules polymériques.

2.1. Les micelles

Les micelles sont des auto-assemblages de molécules tensio-actives, qui ont une tête polaire hydrophile et queue apolaire hydrophobe. Ces molécules s'organisent en fonction des répulsions entre les parties hydrophiles et hydrophobes et le solvant. Ainsi, dans un solvant aqueux, les queues lipophiles sont à l'intérieur de la structure et les têtes hydrophiles sont à la surface. Au contraire, dans un solvant organique, les têtes hydrophiles se regroupent à l'intérieur et les queues lipophiles sont à la surface, il s'agit alors d'une micelle inverse. La formation de micelles ne peut avoir lieu qu'au-delà de la concentration micellaire critique (CMC). En dessous de la CMC, les micelles ne sont pas stables. Au-dessus de cette CMC, plus la concentration de tensioactif est élevée, plus la stabilité du système augmente.

La formation d'un « cœur » qu'il soit hydrophobe dans le cas des micelles, ou hydrophile dans le cas des micelles inverses, permet l'incorporation de principes actifs dans ces assemblages²⁰⁹. Leur taille et leur forme peuvent être modulées en faisant varier des paramètres tels que la nature du tensioactif, sa concentration, le pH du solvant ou encore sa force ionique²¹⁰.

2.2. Les nanoparticules polymériques

Les premières nanoparticules polymériques ont été mises au point par Couvreur *et al.* en 1979, à base de poly(alkyl-cyanoacrylate)²¹¹. Depuis, d'autres polymères ont été utilisés, tels que le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide glycolique) (PGA) et le poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), avec diverses masses moléculaires. L'ensemble de ces polymères sont biocompatibles et biodégradables, et ils sont autorisés pour un usage dans le domaine de la santé par les autorités américaines (FDA) et européennes (Pharmacopée Européenne). Leur dégradation ne produit pas de métabolites toxiques^{212,213}.

Il existe deux types de nanoparticules polymériques : les nanocapsules et les nanosphères.

Les nanocapsules sont des structures colloïdales, formées d'une enveloppe solide de nature polymérique contenant un cœur liquide de nature hydrophile ou lipophile. Comme les nanocapsules, les nanosphères sont des structures colloïdales. En revanche, elles sont matricielles, c'est-à-dire entièrement solides, et peuvent être pleines et poreuses. Les nanosphères poreuses sont constituées de polymère structuré en mailles, ce qui permet d'intégrer des molécules d'intérêt. La libération du principe actif de ces structures peut ensuite se faire avec ou sans dégradation du polymère. Pour les nanosphères pleines, la molécule à vectoriser doit être incorporée lors de la synthèse. Cela implique l'utilisation d'un polymère biodégradable, qui permettra une délivrance prolongée du principe actif dans l'organisme.

2.3. Les nanoparticules de PLA et les micelles

Parmi les nanoparticules polymériques, nous avons choisi de sélectionner un polymère déjà approuvé par la FDA afin de réduire les risques de toxicité et d'effets secondaires. Quatre polymères synthétiques correspondent à ce jour à ce critère : la poly(ϵ -caprolactone) (PCL), le poly(acide lactique co-glycolique) (PLGA), le poly(acide glycole) (PGA) et le poly(acide lactique) (PLA). Parmi ces polymères, le choix du laboratoire s'est porté sur le PLA dont la synthèse ne

nécessite pas l'utilisation de solvants toxiques et dont le temps de dégradation est long (1 à 2 ans), permettant ainsi une libération prolongée.

Pour la synthèse des micelles nous nous sommes appuyés sur des précédents résultats issus du laboratoire et de la bibliographie. Le polymère sélectionné est un copolymère à base de PLA et de poly(N-vinylpyrrolidone). Avec ce copolymère nous obtenons un cœur hydrophobe (PLA) et une couronne hydrophile grâce à la présence des groupes réactifs N-succinimidyl ester (poly (N-vinylpyrrolidone)). Ce type de micelles a déjà montré son potentiel vaccinal ²¹⁴. De plus, ce copolymère, utilisé comme surfactant à la surface des NP du PLA, a été précédemment montré dans notre groupe comme non cytotoxique (sur des cellules dendritiques), confirmant des études antérieures sur les copolymères à base de PLA-b-PNVP comme biocompatibles ^{215,216}.

Les micelles sont utilisées depuis des décennies pour la délivrance de principes actifs ^{217–220}, et plus récemment ont été décrites comme moyen de vaccination ADN ²²¹ et pour le ciblage des cellules dendritiques ²²² (CD). Après leur administration par voie sous-cutanée, les micelles, grâce à leur petite taille (<100nm), sont facilement transportées jusqu'aux ganglions via les vaisseaux lymphatiques et constituent un excellent moyen de délivrance de biomolécules ^{223,224}.

2.4. Comparaison de la synthèse des micelles et des NPs de PLA

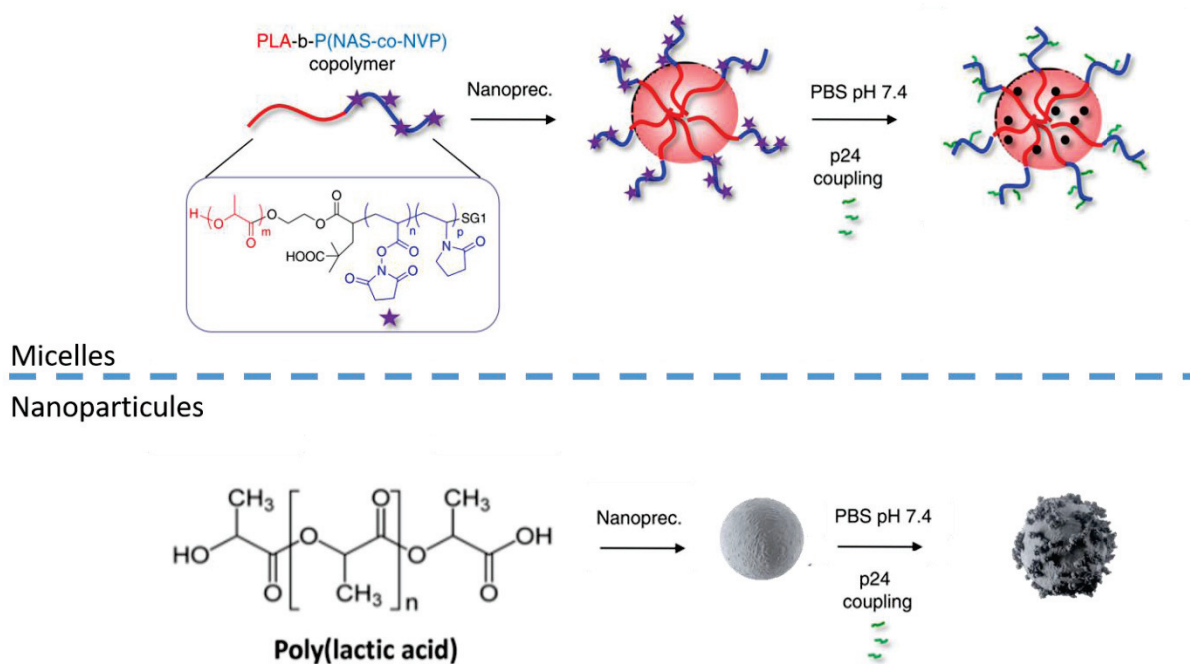
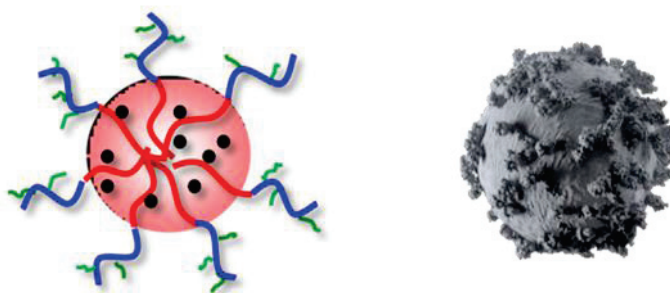


FIGURE 39 : COMPARAISON DE LA SYNTHÈSE DES MICELLES ET DES NPS DE PLA

Dans notre projet, les copolymères PLA-b-P(NAS-co-NVP) présentent un bloc hydrophobe de PLA de taille conséquente, par conséquent la dissolution directe n'a pas été possible. Le copolymère étant soluble dans un solvant organique volatil et miscible à l'eau tel que l'acétonitrile (ACN), la méthode d'évaporation de solvant a donc été choisie. Le processus de synthèse est similaire aux nanoparticules, déjà décrit précédemment (Figure 39). Le copolymère est dissous dans l'ACN (10 mg.mL^{-1}), la phase organique est ajoutée sous agitation à une phase d'eau stérile (un volume de phase organique pour deux volumes d'eau), le solvant est évaporé sous pression réduite à 30°C . Cette technique est simple et rapide à mettre en œuvre pour la préparation de micelles.

Grâce à cette technique, des micelles à base de copolymères ont été élaborées et caractérisées leur diamètre hydrodynamique, déterminé par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les diamètres des micelles varient de 53 à 75 nm et des indices de polydispersité (IP) faibles compris entre 0.021 et 0.040 (Tableau 6).

TABLEAU 6 : CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DES MICELLES ET DES NANOPARTICULES APRES SYNTHESE.



Polymère	PLA-b-P(NAS-co-NVP)	poly(acide lactique) (PLA)
Taille (nm)	75	130-220
Taux solide (%)	0,7 % (7 mg/mL, 10^{13} particules/mL)	2-6% (137nm, 2,2% = 10^{13} particules/mL)
Monodisperse	Oui – IP < 0,1	Oui – IP < 0,1
Potentiel Zêta (mV)	-40	-60
Encapsulation	Oui	Oui
Adsorption	Oui	Oui

2.5. Comparaison de la biodistribution des micelles et des NPs

Une première étude de comparaison à consister à évaluer la biodistribution en imagerie corps entier. Comme expliqué précédemment, nous avons utilisé la technique de tomographie optique de fluorescence grâce au système FMT 4000 (Fluorescence Molecular Tomography, Perkin Elmer, États-Unis) : cette méthode permet d'obtenir des mesures fonctionnelles sur les petits animaux, en visualisant les organes cibles en 3 dimensions.

a. Préparation des nanoparticules fluorescentes

Un fluorophore, le DiR (Thermo Fisher Scientific, λ_{ex} : 750nm, λ_{em} : 780nm), est encapsulé dans des nanoparticules de PLA lors de l'étape de nanoprécipitation. Les particules utilisées ont été synthétisées par la méthode de nanoprécipitation ¹⁸⁶, détaillée dans la section précédente. Brièvement, le PLA et le fluorophore sont dissous dans la phase organique composée d'acétone (ratio polymère/acétone à 2% m/v, concentration de fluorophore/polymère à 0,02% m/v) et la solution est placée dans une ampoule à décanter.

Annexe – Comparaison des pouvoirs adjuvants des micelles et des NP de PLA

Une solution aqueuse composée d'un mélange eau/éthanol est placée dans un ballon en verre sous agitation magnétique fixée à 250 RPM. La phase organique est coulée goutte à goutte dans la phase aqueuse. Les solvants (acétone et éthanol) sont éliminés sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 30°C. La dispersion colloïdale finale dans le ballon est composée de particules de PLA dans l'eau. Durant toute l'opération, la solution est conservée à l'abri de la lumière.

b. Préparation des micelles fluorescentes

Comme pour les NP nous utilisons comme fluorophore le DiR. Par contre, pour les micelles nous n'encapsulons à proprement parler de molécule. Le DiR et les micelles sont mis en contact et sous agitation pendant 20h. Le fluorophore étant hydrophobe, il se retrouve dans le cœur des micelles par diffusion passive.

c. Suivi des particules par tomographie optique de fluorescence

Les souris choisies sont des souris SKH1 (Charles River) qui ont la particularité d'être dépourvues de poils tout en étant immunocompétentes. L'absence de poils permet de s'affranchir du signal parasite. Cinq animaux par groupe ont été injectés. Au temps souhaité (5 min, 6 h, 24 h, 48 h puis toute les semaines si persistance du signal), les souris subissent une anesthésie gazeuse et sont placées dans des cassettes pour observation. Avant le début de l'expérimentation, l'appareil est calibré avec chaque sonde : NP(DiR) et micelles(DiR) afin de quantifier le fluorophore présent au cours du temps.

2.6. Résultats

a. Caractérisations des formulations fluorescentes

Les NP utilisées pour ces expériences ont une taille moyenne de 230 nm et un indice de polydispersité de 0,038, signifiant que nous avons une population monodisperse. La concentration molaire du DiR est de 5,8 μM et le taux de solide de 3 %. Pour obtenir un taux de solide de 0,5% (identique au taux de solide moyen utilisé pour les essais d'immunisation), les particules sont diluées dans du PBS, le fluorophore a une concentration finale de 0,96 μM . Les micelles utilisées ont une taille moyenne de 106,84 nm et un indice de polydispersité de 0,234. La concentration molaire du DiR est de 6,67 μM avec un taux solide de 0,5%.

b. Biodistribution après administration sous-cutanée

Après injection de 100 μ L de formulation par voie sous-cutanée au niveau de l'intérieur de la cuisse gauche (Figure 40 et 41) les animaux ont été anesthésiés à différents temps post-administration et la biodistribution des particules suivie dans le temps.

De façon intéressante, la biodistribution des micelles n'a pas été celle attendue. En effet, nous constatons une augmentation du signal de fluorescence au cours du temps pour atteindre un pic aux alentours de 72-96 heures. De plus, nous observons aussi une légère fuite des micelles vers ce qui pourrait être le thymus ou le foie.

Concernant l'augmentation du signal sur plusieurs jours nous avons deux hypothèses, qui peuvent être complémentaires :

- (i) Du fait de la formulation des micelles (DiR) nous utilisons le lot pur (à titre indicatif les NPs sont diluées 6 fois pour passer de 3 à 0,5 %). Le DiR est répertorié comme un fluorophore qui « quench », c'est-à-dire que lorsqu'il est trop concentré il inhibe sa fluorescence par encombrement stérique. Il est donc possible que lors des premières acquisitions le DiR était trop concentré pour être détecté.
- (ii) Les micelles de par leur nature amphiphile vont avoir tendance à s'incorporer dans les membranes. Comme le DiR « quench » il est possible que nous observions l'intégration des micelles dans les membranes et de ce fait le fluorophore est dilué et peut exprimer sa fluorescence.

Il serait nécessaire d'utiliser des techniques *in vitro* afin de mieux caractériser ce phénomène. Par exemple, en utilisant des tests de fusion, qui consistent à utiliser des liposomes mimant la membrane plasmique et les mettre en contact à différentes concentrations de micelles selon une cinétique préétablie, permettrait de mesurer la fluorescence, avec un appareil adapté.

Annexe – Comparaison des pouvoirs adjuvants des micelles et des NP de PLA

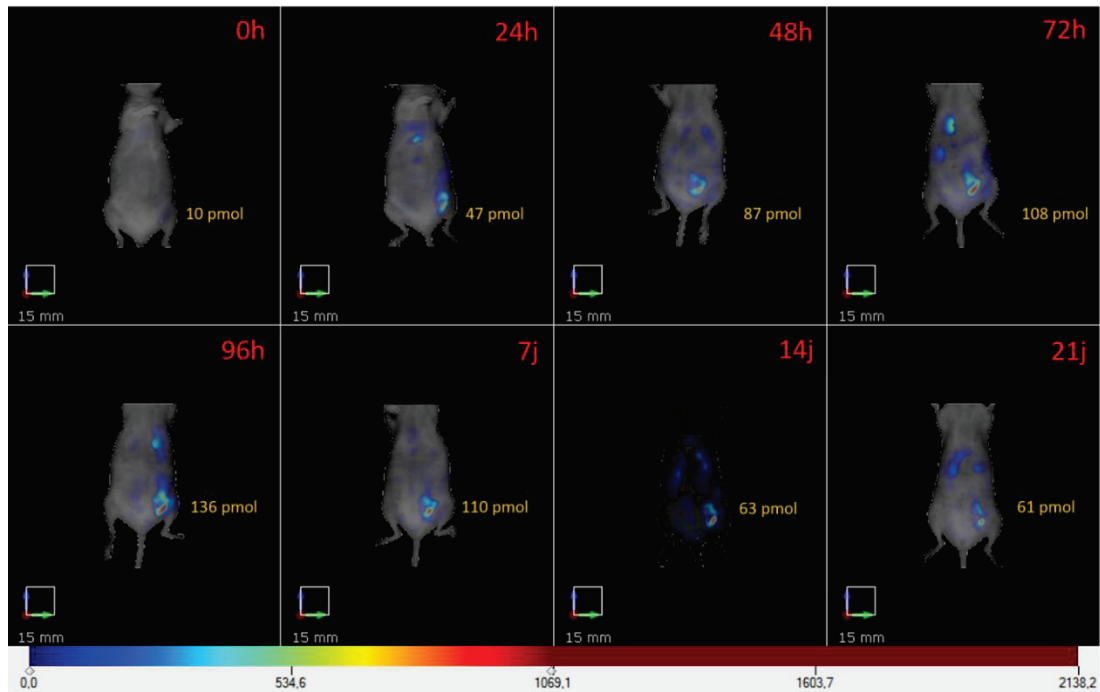


FIGURE 40 : BIODISTRIBUTION DES MICELLES DANS L'ORGANISME DES SOURIS A DIFFERENTS TEMPS POST-INJECTION APRES ADMINISTRATION SOUS-CUTANEE. LES VALEURS EN PMOL CORRESPONDENT A LA ZONE D'INJECTION.

Concernant la biodistribution des particules, nous avons obtenu les mêmes résultats développés dans la partie biodistribution, c'est-à-dire un effet dépôt localisé au site d'injection et une dégradation progressive du signal au cours du temps.

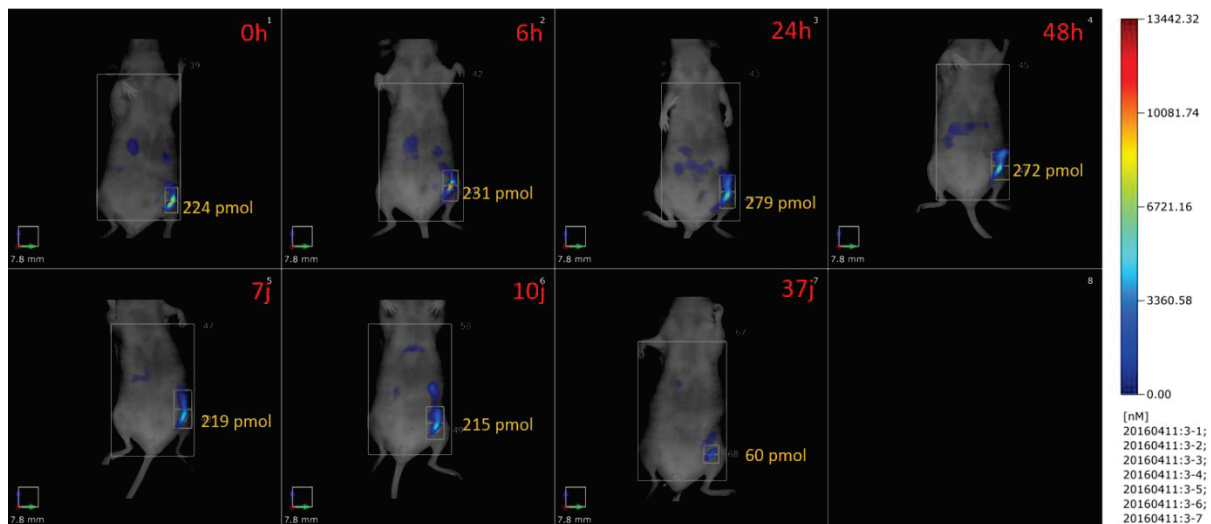


FIGURE 41 : BIODISTRIBUTION DES PARTICULES DANS L'ORGANISME DES SOURIS A DIFFERENTS TEMPS POST-INJECTION APRES ADMINISTRATION SOUS-CUTANEE. LES VALEURS EN PMOL CORRESPONDENT A LA ZONE D'INJECTION.

c. Comparaison de la biodistribution des formulations fluorescentes

De par les propriétés propres aux NP et aux micelles nous n’observons pas la même cinétique de signal de fluorescence entre l’injection sous-cutanée de micelles ou de NP (Figure 42). Cependant, de façon intéressante nous observons une similitude concernant le ratio du signal au site d’injection par rapport au signal corps entier. En effet, nous retrouvons en moyenne 22 % du signal au site d’injection pour les micelles(DiR) et 25 % pour les NP(DiR), et ceci de façon stable tout au long de la cinétique.

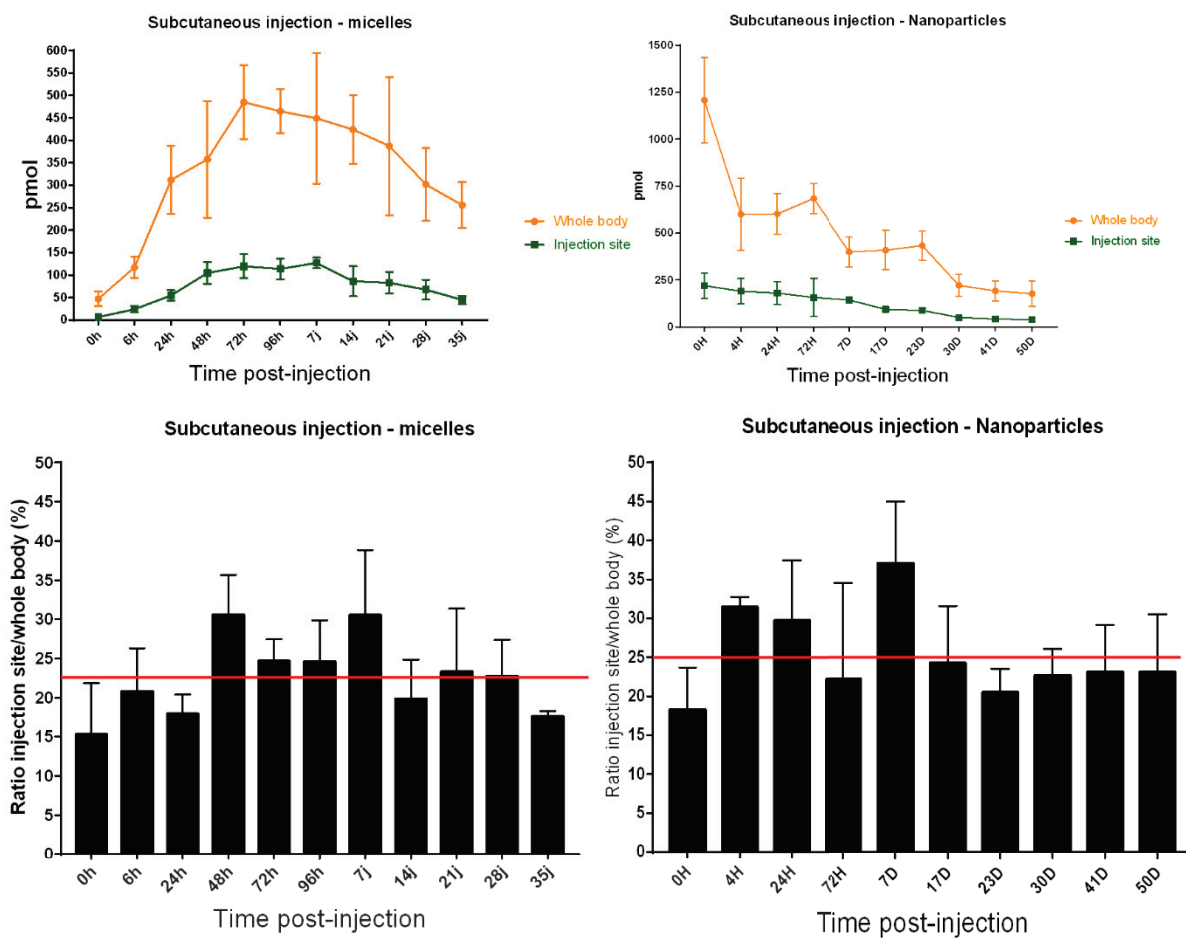


FIGURE 42 : CINÉTIQUE DE FLUORESCENCE ET RATIO DU SIGNAL AU SITE D’INJECTION PAR RAPPORT AU SIGNAL CORPS ENTIER APRES INJECTION SOUS-CUTANÉE DES FORMULATIONS FLUORESCENTES

2.7. Evaluation des réponses immunitaires induites par les micelles et les NPs

a. Protocole d'immunisation

Pour cette expérience, « preuve du concept » nous avons immunisé les souris avec de la p24 adsorbée sur les NP ou couplée aux micelles.

Ayant accès au laboratoire à 3 polymères de PLA différents pour la synthèse des NP, nous avons souhaité évaluer leur différence dans leur induction d'une réponse immunitaire. Ces 3 polymères viennent de trois sources différentes : le PLA Phusis est le polymère « historique » du laboratoire, dont la synthèse a été arrêtée par l'industriel. Le PLA PCAS est le polymère produit par une nouvelle compagnie, tandis que le polymère DF est synthétisé par un chimiste dans le laboratoire d'accueil. Par rapport aux nanoparticules, l'intérêt de ce travail était de faire le lien entre les précédents résultats de l'équipe, obtenus avec le PLA Phusis, avec les futurs résultats qui seront obtenus à partir de PLA DF et PCAS.

Nous avons ajouté trois groupes contrôle : la p24 injectée libre, et deux contrôles positifs avec l'AddaVax (MF59-like) et l'Alhydrogel (Alum).

L'immunisation des souris a été fait selon le protocole ADITEC, développé par un consortium Européen afin d'homogénéiser et comparer les résultats obtenus par les différents laboratoires. Ce protocole requiert l'utilisation de souris CB6F1 et une immunisation toutes les 3 semaines ¹⁸⁹. Les souris ont été immunisées par voie sous-cutanée visant le ganglion inguinal avec 5 µg de p24 par injection dans 100 µL de formulation. Le protocole est résumé figure 43.

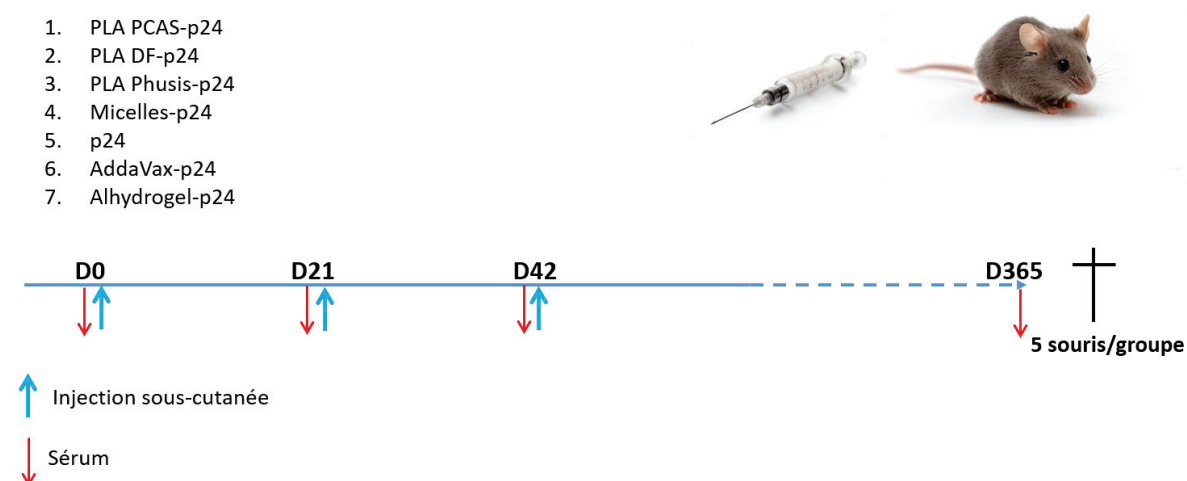


FIGURE 43 : PROTOCOLE D'IMMUNISATION DES SOURIS CB6F1

b. Prélèvements de sang et traitement des échantillons

Avant chaque immunisation et régulièrement jusqu'à 365 jours, le sang des souris est prélevé par voie rétro-orbitale et le sérum est isolé après 30 min à 37°C (bain-marie à sec) pour favoriser la coagulation du sang. Après une double centrifugation 10 min à 16 000 x g les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à analyse.

c. Détection des IgG anti-p24 et analyse de l'avidité des IgG

La présence d'IgG, IgG1 et IgG2a anti-p24 est détectée par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Des plaques 96-puits (Nunc) sont recouvertes avec 100 µL de protéine p24 à 1 µg/mL pour une nuit à température ambiante. L'excès de p24 est éliminé et les plaques sont saturées avec 200 µL de lait écrémé à 10% pendant 1h à 37°C. Les plaques sont lavées avec du PBS-Tween 0,05% par un laveur automatique de plaques (Thermo Scientific). Les échantillons de sérum sont dilués en PBS-BSA 1% et 100 µL de solution est déposé dans chaque puits et incubé pour 1h à 37°C. Après lavage, des anticorps de détection anti-IgG, IgG1 et IgG2a conjugués à la HRP (Horseradish Peroxydase) sont dilués au 1 :10000ème et ajoutés dans les plaques. Après 1h d'incubation à 37°C, les plaques sont lavées et 100 µL de tetramethylbenzidine (TMB, BD Biosciences) sont ajoutés pour révélation de la présence d'IgG. La réaction est stoppée par ajout de 1N H₂SO₄ et la densité optique (DO) est mesurée à 450 nm avec une correction à 620 nm par un spectrophotomètre.

Pour l'analyse de l'avidité, nous dupliquons les plaques et suivons le même protocole d'ELISA, excepté pour l'étape de lavage après le dépôt des échantillons. Lors de ce lavage, une plaque sera lavée « classiquement » avec du PBS-Tween (condition non réductrice) tandis que l'autre plaque sera lavée avec de l'urée 8 M (condition réductrice). L'analyse de l'avidité se calcule par cette formule : $(DO \text{ réducteur}) / (DO \text{ non-réducteur}) \times 100$. L'avidité se classe en trois niveaux : faible (<30%), intermédiaire (30-50%) et haute avidité (>50%) selon le pourcentage calculé.

d. Caractérisation physico-chimique des formulations

TABLEAU 7 : CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES PARTICULES ET MICELLES APRES FORMULATION DE LA p24

	Taille	IP	[p24]
PLA-PCAS-p24	184,0 nm	0,021	50 µg /mL
PLA-DF-p24	196,6 nm	0,034	50 µg /mL
PLA-Phusis-p24	159,2 nm	0,051	50 µg /mL
Micelles-p24	108,2 nm	0,053	50 µg /mL

Nous observons que pour les mêmes caractéristiques physico-chimiques entre les polymères de PLA, et pour les mêmes conditions de synthèse nous obtenons des particules légèrement différentes en tailles (Tableau 7). En effet, les PLA PCAS et DF induisent des particules un peu plus importantes en taille que le PLA Phusis. Par contre l'ensemble des formulations ont un indice de polydispersité faible ($<0,1$), ce qui signifie que nos formulations sont monodisperses après adsorption de la p24 dessus.

e. Evaluation des réponses immunitaires in vivo

Les réponses immunitaires induites par nos formulations ont été évaluées sur le long terme en analysant les titres d'IgG jusqu'à 365 jours après la première immunisation (Figure 44). Après 3 injections, la p24 libre induit des titres d'IgG modeste (de l'ordre de 1.10^5). Concernant les formulations d'intérêt nous pouvons les diviser en 3 sous-groupes.

- (1) Les particules à base de PLA DF et PLA PCAS permettent d'augmenter la production d'IgG jusqu'à 1.10^6 , ces deux polymères induisent la même cinétique de réponse immunitaire avec des titres d'IgG stable jusqu'à J272, puis une légère baisse à J365.
- (2) Les PLA Phusis et les micelles induisent dès la deuxième injection des titres plus élevés jusqu'à atteindre un plateau à J60. Les titres d'IgG restent stables jusqu'à J272.
- (3) Les deux groupes contrôle positif, AddaVax et Alhydrogel, induisent des titres IgG plus élevés encore dès la deuxième injection, et atteignent aussi un plateau à J60 jusqu'à J272.

Une fois le plateau atteint à J60 nous n'observons pas de différence significative entre nos formulations d'intérêt et les contrôles positifs. Les trois groupes de particules et les micelles

induisent des titres d'IgG entre 1.10^6 et 1.10^7 . De plus, toutes les formulations à J365 ont des titres légèrement diminués d'IgG.

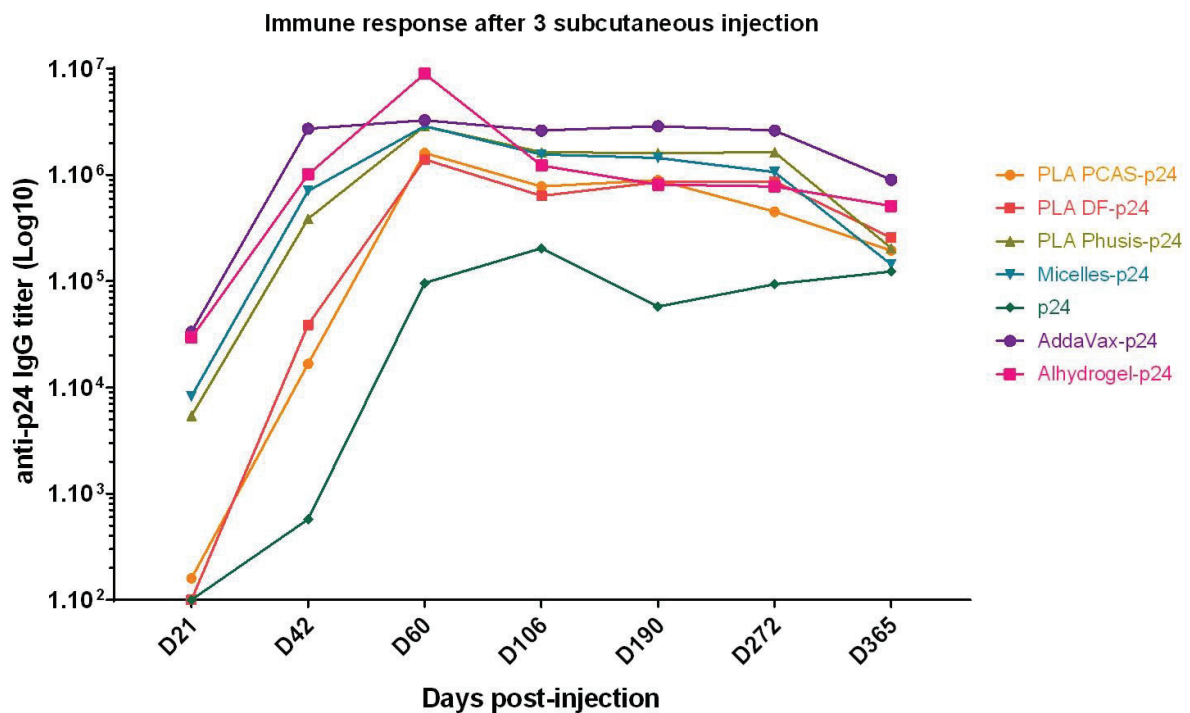


FIGURE 44 : TITRES D'IgG ANTI-P24 INDUITS PAR NOS FORMULATIONS SUR LE LONG TERME

f. Avidité des IgG anti-p24

Suite à ces résultats, nous avons regardé la qualité des anticorps induits (Figure 45). En effet, si quantitativement nous observons les mêmes titres d'IgG cela ne nous indique pas la qualité des anticorps. Comme pour les titres d'IgG nous pouvons observer 3 sous-groupes : les PLA PCAS et DF induisent des avidités intermédiaires entre 35 et 45% d'avidité. Les micelles et les PLA Phusis induisent des fortes avidités, avec un pourcentage autour de 70%. Quant aux contrôles positifs l'avidité est considéré comme intermédiaire avec environ 45% d'avidité.

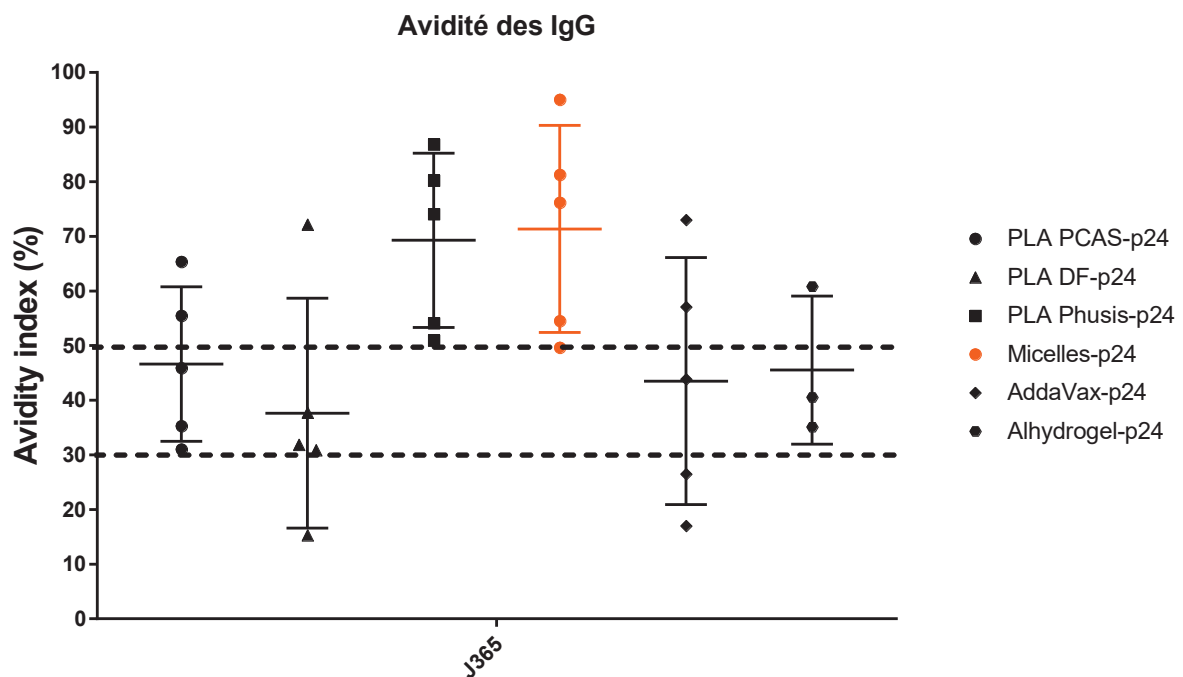


FIGURE 45 : POURCENTAGE D’AVIDITE DES IGG ANTI-P24 A J365

L’ensemble des formulations induisent les mêmes titres d’anticorps au cours du temps, avec la même cinétique. Cependant il n’y a que les PLA Phusis et les micelles qui induisent de fortes avidités de l’ordre de 70%. Les deux PLA PCAS et DF, quant à eux sont identiques dans leur induction des IgG et de leur avidité.

g. Cas spécifique des micelles

Si l’on regarde plus spécifiquement la réponse immunitaire induite par les micelles, on observe la même cinétique que les deux contrôles positifs, en induisant des hauts titres d’IgG (Figure 46). Les titres d’IgG sont compris entre ceux induits par l’AddaVax et l’Alhydrogel.

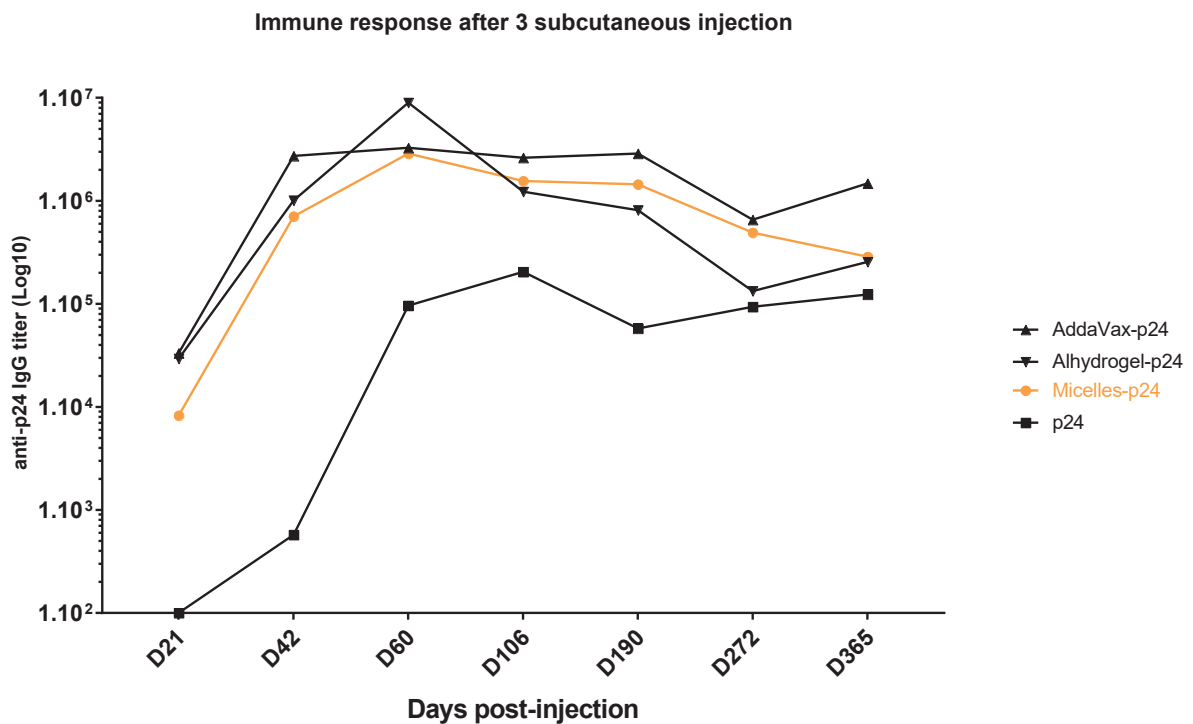


FIGURE 46 : TITRES D'IGG ANTI-P24 INDUITS PAR NOS FORMULATIONS, CAS SPECIFIQUE DES MICELLES ET DES GROUPES CONTROLES

Les deux sous-types d'IgG, IgG1 et IgG2a, ont également été dosés afin d'avoir des indications sur l'orientation de la réponse immunitaire (Figure 47). L'analyse à J365 montre que l'AddaVax induit une réponse orientée cellulaire, tandis que l'Alhydrogel induit une réponse orientée humorale. De façon intéressante, les micelles induisent une réponse immunitaire plus équilibrée, c'est-à-dire aussi bien humorale que cellulaire.

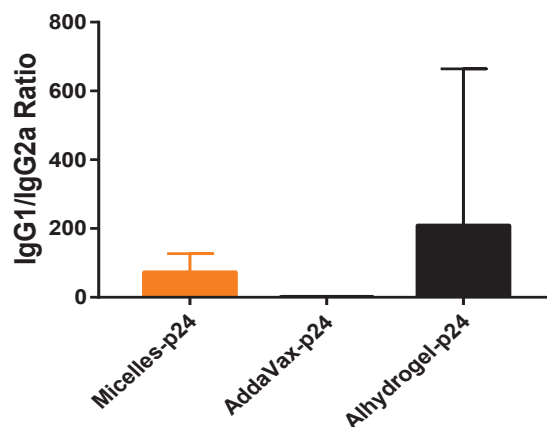


FIGURE 47 : RATIO DES SOUS-TYPES IG1/IG2A INDUITS PAR LES MICELLES

2.8. Conclusion

Ce travail avait pour objectif d'évaluer les réponses immunitaires induites par trois polymères de PLA pour la synthèse des NP ainsi que l'évaluation d'un autre type de nanovecteur avec l'utilisation des micelles. L'intérêt des micelles repose sur le fait qu'après leur administration par voie sous-cutanée elles sont facilement transportées jusqu'aux ganglions via les vaisseaux lymphatiques grâce à leur petite taille (<110nm). Nous avons donc souhaité évaluer leur pouvoir adjuvant comparé aux NP de PLA historiquement utilisées au laboratoire d'accueil. Pour cela, nous avons utilisé l'antigène modèle du laboratoire la p24, et comparé avec deux contrôles positifs avec l'AddaVax et l'Alhydrogel.

Nous avons observé que pour les mêmes caractéristiques physico-chimiques de polymère de PLA, et pour les mêmes conditions de synthèse de NP, nous n'obtenons pas les mêmes tailles de particules. Et de façon intéressante, le polymère Phusis induit les mêmes titres et la même avidité des IgG que les micelles, or c'est ce polymère qui permet la synthèse de particules le plus proche en taille des micelles.

Il serait donc intéressant de confirmer cette hypothèse en utilisant le même polymère mais dans des conditions de synthèses différentes qui permettent d'obtenir des tailles de particules différentes, et d'évaluer les réponses induites en fonction de la taille des particules.

Il serait aussi intéressant d'analyser plus précisément les polymères afin de quantifier le nombre de chaîne longues et courtes. En effet, il est supposé que plus le polymère a un nombre de chaînes courtes, plus il pourrait développer une réaction locale lors de l'injection, et donc potentiellement une réponse immunitaire plus élevée.

Annexe 3

Utilisation de la p17 comme immunogène induisant des réponses
immunitaires anti-gp41

Article



Exploiting Natural Cross-reactivity between Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 p17 Protein and Anti-gp41 2F5 Antibody to Induce HIV-1 Neutralizing Responses *In Vivo*

OPEN ACCESS

Edited by:

Charles R. Rinaldo,
University of Pittsburgh,
United States

Reviewed by:

Christiane Moog,
Institut national de la santé et
de la recherche médicale
(INSERM), France
Marie Pancera,
Fred Hutchinson Cancer
Research Center, United States
Juan Pablo Jaworski,
Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y
Técnicas (CONICET), Argentina

*Correspondence:

Christophe Guillon
christophe.guillon@ibcp.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted
to HIV and AIDS,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 23 March 2017

Accepted: 16 June 2017

Published: 30 June 2017

Citation:

Verrier B, Paul S, Terrat C, Bastide L,
Ensinas A, Phelip C, Chanut B,
Bulens-Grassigny L, Jospin F and
Guillon C (2017) Exploiting Natural
Cross-reactivity between Human
Immunodeficiency Virus (HIV)-1 p17
Protein and Anti-gp41 2F5
Antibody to Induce HIV-1
Neutralizing Responses *In Vivo*.
Front. Immunol. 8:770.
doi: 10.3389/fimmu.2017.00770

Bernard Verrier^{1†}, Stéphane Paul^{2†}, Céline Terrat¹, Liza Bastide³, Agathe Ensinas^{1,2}, Capucine Phelip¹, Blandine Chanut², Laura Bulens-Grassigny^{1,3}, Fabienne Jospin² and Christophe Guillon^{3*}

¹ Colloidal Vectors and Tissue Transport, UMR5305, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université de Lyon, CNRS, Lyon, France, ² Groupe sur l'Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, EA3064, Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, Université de Lyon, Saint-Etienne, France, ³ Retroviruses and Structural Biochemistry, UMR5086, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université de Lyon, CNRS, Lyon, France

Anti-p17 antibodies are able to neutralize human immunodeficiency virus (HIV) entry in a mouse model. In this study, we identified a region of sequence similarity between the epitopes of anti-p17 neutralizing antibodies and anti-gp41 neutralizing 2F5 antibody and verified cross-reactivity between p17 and 2F5 *in vitro*. The p17 sequence was modified to increase sequence identity between the p17 and 2F5 epitopes, which resulted in enhanced cross-reactivity *in vitro*. Immunogenicity of wild-type and modified p17 was characterized in a rabbit model. Both wild-type and mutated p17 induced anti-gp41 responses in rabbits; sera from these animals reacted with gp41 from different HIV clades. Moreover, introduction of the 2F5 sequence in p17 resulted in induction of antibodies with partially neutralizing activity. Based upon these data, we suggest that the natural cross-reactivity between HIV-1 p17 protein and 2F5 antibody can be exploited to induce antibodies with neutralizing activity in an animal model.

Keywords: human immunodeficiency virus-1, gp41, p17, neutralizing antibodies, cross-reactivity, antigen engineering

INTRODUCTION

Despite the high variability of human immunodeficiency virus (HIV), approximately 15–30% of infected patients develop broadly neutralizing antibodies (bnAbs) able to neutralize entry of the majority of HIV strains (1–3). In non-human primates, passive administration of such bnAbs protects animals from infection (4). Although several bnAbs have been characterized (2, 5), the method by which to induce such antibodies by vaccination remains an important issue (3, 6–9). Preclinical studies in various models suggest that sequential immunizations, with multiple injections and/or multiple antigens, may be one way to elicit bnAbs (10–12). However, current vaccine strategies have not yet been able to induce high bnAbs titers (13).

Another important target for HIV vaccination is the Gag polyprotein. The simian immunodeficiency virus Gag capsid subunit undergoes strong structural constraints, which limit its variability and, therefore, its ability to accumulate mutations in order to elude the host immune system (14).

Indeed, broad cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses targeting Gag are associated with a low viral load in HIV-infected people (15–17), and induction of CTL responses against HIV-1 Gag could lead to elimination of HIV-1-infected cells and aid in control of viral dissemination (18). Moreover, antibody responses against the p17 subunit of Gag could block the pathogenic effects of extracellular p17 (19, 20).

As Gag proteins are not exposed on the virion surface, few studies have systematically explored the antibody responses induced by immunization with Gag proteins and their potential to inhibit HIV infection. However, cross-reactivity between p17 and gp41 can occur (21), and viral entry can be neutralized by antibodies against p17 (22). The p17 sequence, ELDKWRK, is part of the epitope of an anti-p17 antibody that neutralizes HIV entry (22), and a bnAb, 2F5, directed against the HIV gp41 envelope subunit, was identified in an infected individual (23, 24). Interestingly, this 2F5 antibody recognizes an epitope with the sequence ELDKWAS in the membrane proximal external region (MPER) of gp41 (24). This pentapeptide, ELDKW, is shared by HIV-1 p17 and the MPER of HIV-1 gp41, and is recognized by two neutralizing antibodies targeting p17 and gp41. However, the structure of the 2F5 antibody in complex with its epitope shows the AS residues of the 2F5 epitope ELDKWAS involved in the

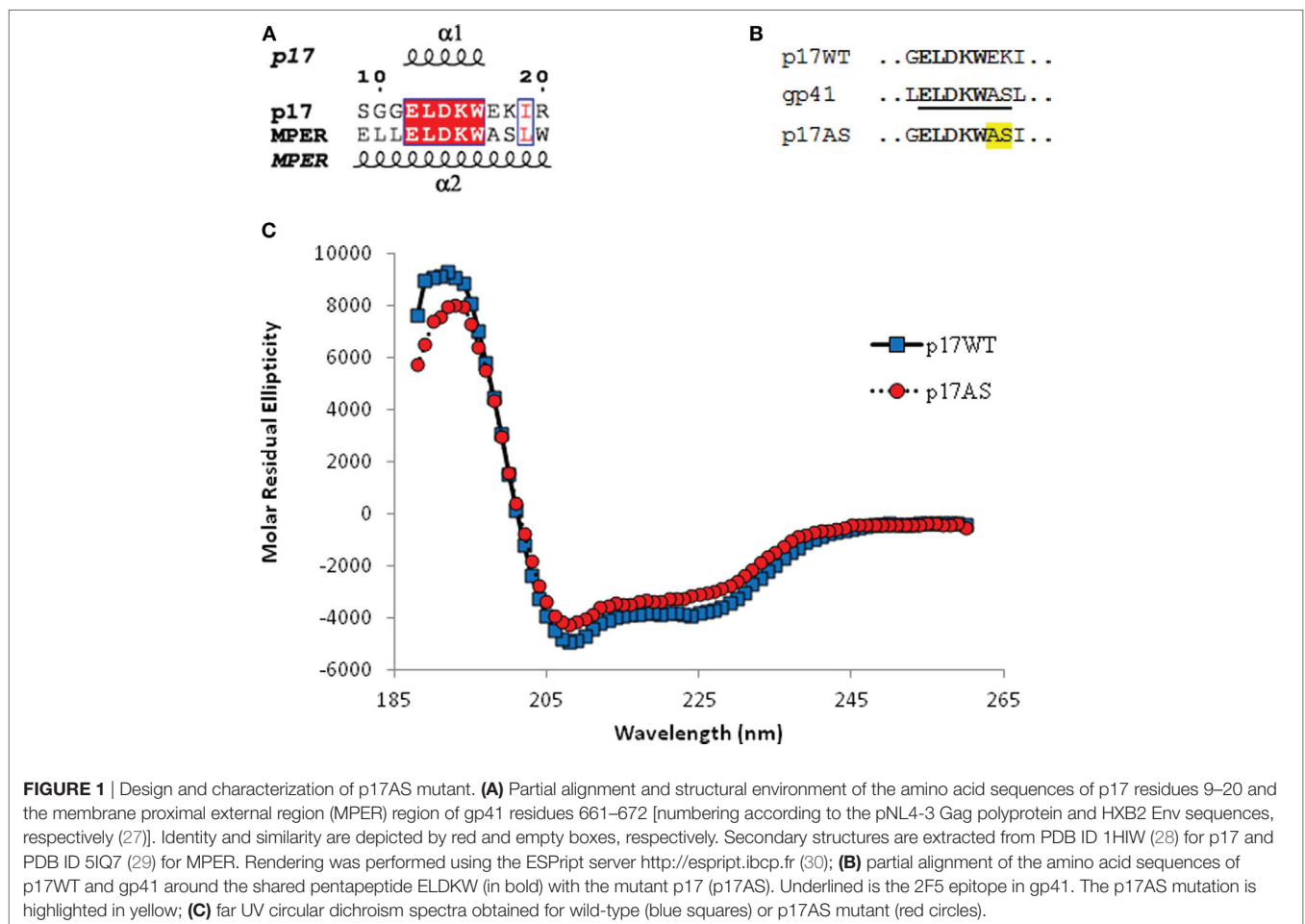
antibody/peptide interaction and in the conformation of the epitope (25).

In the present study, we demonstrated cross-reactivity between the anti-gp41 2F5 antibody and the wild-type p17 protein. We then introduced the entire ELDKWAS 2F5 epitope in the context of the ELDKW pentapeptide into p17 and evaluated cross-recognition *in vitro*. Finally, preliminary immunization experiments in an animal model confirmed the ability of p17 to induce anti-gp41 immune responses with neutralizing activities, which are improved by mutating p17.

MATERIALS AND METHODS

p17 Constructs

Amino acid sequences of the various constructs are described in **Figures 1A,B**. The wild-type gene (p17WT) from the pNL4-3. Luc.R⁻.E⁻ plasmid (26) was amplified by PCR in-frame with a C-terminal 6 × His tag. The p17AS mutant was obtained from the p17WT coding sequence using Phusion polymerase (Finnzymes) and primers p17AS-R (5'-GATAAATGGGCAAGCATTCGGTTAAG-3') and p17AS-F (5'-CTTAACCGAATGCTTGCCCA TTTATC-3'). The p17 constructs were inserted into the pRSET-B plasmid (Invitrogen) using *NdeI/EcoRI* restriction sites.



Protein Expression, Purification, and Analysis

The p17 constructs were expressed in BL21(DE3)pLys competent cells (Lucigen). Lysogeny broth (250 ml) supplemented with 25 µg/ml ampicillin were seeded with an overnight preculture and incubated at 37°C with agitation. When $OD_{600nm} \approx 0.4$, protein expression was induced with 2 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (Euromedex) and incubated for 5 h at 37°C. Cultures were then centrifuged at $6,000 \times g$ for 5 min, and pellets were stored overnight at -20°C.

Bacterial lysis and protein purification using Ni-TED resin (Macherey-Nagel) were performed as previously described (31), except lysis was performed by sonication of the pellet for 4×1 min/g with a Sonifier 250 sonicator (Brandson).

Following protein purity analysis with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), elution fractions were pooled, dialyzed against 50 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), pH 6, overnight at 4°C, and concentrated to 1 mg/ml according to the absorbance of the protein solution at 280 nm, using a Vivaspinn-PES 10 kDa (Sartorius).

Circular dichroism spectra were recorded and processed using a Chirascan Dichrometer (Applied Photophysics) as described previously (32), with 150 µl of protein at 0.2 mg/ml in 50 mM MES pH 6.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Cross-reactivity

Anti-p17 mouse monoclonal antibody 8E7A3 (isotype IgG1κ) was obtained after immunization of mice with HIV Gag (not shown). Anti-gp41 2F5 human antibody (Polymun Scientific) and isotypic controls (anti-gp120 F105 and anti-Tat 11H6H1 for 2F5 and anti-p17, respectively) have been described elsewhere (24, 33, 34). In order to evaluate cross-reactivity by ELISA, 100 ng/well p17WT or p17AS protein in 1× phosphate-buffered saline (PBS) were coated onto 96-well plates (MaxiSorb, Nunc) overnight at 25°C. Wells were saturated with 1× PBS-10% horse serum (Thermo Fisher Scientific), incubated for 1 h at 37°C, washed with 1× PBS-0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich), and then incubated with serial dilutions of the antibodies in duplicate in PBS-10% horse serum for 1 h at 37°C. After washing, wells were incubated with 100 µl horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-human or anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) diluted to 0.5 µg/ml in PBS-Tween and visualized using BD-OptiEA reagent (BD Bioscience). OD values were measured at 450 nm with a reference at 620 nm, using a Bio-Rad plate reader.

Antigen Formulation and Rabbit Immunization

The p17WT or mutant p17AS, diluted to 50 µg/ml in 1× PBS, were adsorbed on poly-lactic acid (PLA) nanoparticles for 2 h at 25°C. Adsorption yield was calculated as previously described (35). After washing, antigen/PLA complexes were resuspended in 1× PBS to a final adsorbed protein concentration of 0.2 mg/ml according to the calculated yield. Formulations were stored at 4°C

overnight before immunization the following day and remained homogeneous during all processes as verified by dynamic light scattering (data not shown).

Two groups of three rabbits (20-week-old New Zealand White female rabbits weighting 2.5 kg at the start of the experiment, Charles River Laboratories) were immunized subcutaneously with 100 µg of formulated p17WT or p17AS proteins. Animals were immunized at day (d) 0, d28, and d63. Prior to each immunization and at d14, d42, and d77, 5 ml of sera were collected from each animal. Animals were sacrificed and exsanguinated at d98 when 3.5–5 ml of serum were collected depending on the animals. Animals were housed and manipulated according to French standard regulatory ethical and welfare guidelines of the PLEXAN, Saint-Étienne (authorization no 42-218-0801) and approved by the relevant ethics committee (Comité d’Ethique en Expérimentation Animale de la Loire (CEEAL-UJM n 98), Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, Saint-Étienne; reference 00811.02).

Immunization Follow-up

Anti-p17 IgG titers were quantified by ELISA, with the immunogen coated onto plates overnight at 100 ng/well in PBS. After saturation and washes (described above in Section “Antigen Formulation and Rabbit Immunization”), sera were incubated at different concentrations for 1 h at 37°C and visualized using a HRP-conjugated anti-rabbit IgG Fc fragment (P.A.R.I.S.) at 0.1 µg/ml. Anti-gp41 titers were quantified under the same conditions, with wells coated with 100 ng/well of recombinant HXB2 gp41 protein. Titers were measured as the reciprocal of the first dilution giving a negative signal (<0.2 OD).

Sera from d98 diluted to 1:5,000 in PBS were evaluated for their reactivity against a panel of recombinant gp41 fragments, which have been described previously (36, 37). Briefly, the proteins were coated at a concentration of 100 ng/well overnight. After saturation and washes (described above in Section “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) cross-reactivity”), sera were incubated for 1 h at 37°C before being visualized with HRP-conjugated anti-rabbit IgG Fc fragment (Bethyl), as previously described (35). The immunizing antigen and an aspecific control protein (bovine serum albumin) (Thermo Fisher Scientific) were used as positive and negative controls, respectively.

Neutralization Assay

IgG were purified from animal samples at d98 using the protein G HP SpinTrap/Ab SpinTrap kit (GE Healthcare), and IgG concentrations were measured using an IgG ELISA (37). Purified IgG did not show autoreactivity when tested at 20 µg/ml against 293T or Hep2 cells (data not shown). The neutralization assay was performed using T-cell line-adapted strain LAI (clade B) or primary isolates of clade A (92UG029), B (SF162, 92US660), and D (92UG001). Neutralizing activities of purified IgG were measured as described previously (37) on SupT1 cells or peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) for the LAI strain and the primary isolates, respectively, in duplicate. PBMCs were isolated using standard Ficoll purification before being activated with phytohemagglutinin (1 µg/10⁶ cells) for 48 h. Purified rabbit IgG (50 µl, concentrated to 100 µg/ml) was

incubated with 50 μ l virus for 3 h at 37°C prior to being added to 100 μ l cells (3.10⁶ cells/ml) overnight. Cells were then washed with culture medium and incubated for 5 or 7 days (PBMCs and SupT1, respectively) before the supernatant was harvested. The concentration of p24 in the supernatant was determined using the p24 kit (InfYnity). Neutralization percentage was calculated as the reduction of p24 production compared to a control without rabbit IgG. Statistical analysis was performed using a Mann–Whitney *U*-test or a one-way analysis of variance (ANOVA) with a Bonferroni post-test (GraphPad 7.0), combining all individual data obtained for each group.

RESULTS

Evidence of Cross-Recognition of p17 by 2F5 Antibody

Alignment of the p17 N-terminal region with the MPER of gp41 containing the 2F5 epitope reveals the presence of a common pentapeptide, ELDKW, located in a similar α -helical environment (Figure 1A). Based upon this data, we introduced mutations into p17WT to re-create the complete 2F5 cognate epitope, ELDKWAS, in p17 (Figure 1B). This mutation, termed p17AS, did not impair the structure of the p17 protein, as verified by circular dichroism (Figure 1C).

Both p17WT and p17AS reacted similarly with the anti-p17 antibody (Figures 2A,B). The p17WT protein was detected

with the anti-gp41 2F5 antibody (the cognate sequence contains ELDKW), but not with the isotype control antibodies, anti-gp120 F105 (Figure 2A) and anti-Tat (data not shown), demonstrating a specific but low cross-reactivity between p17 and the anti-gp41 2F5 antibody. The p17AS mutation resulted in an increase in reactivity of 2F5 for p17AS compared to p17WT *in vitro*, as demonstrated by an approximately 2 log decrease in the apparent half maximal effective concentration (EC₅₀) (Figure 2B). The EC₅₀ values for 2F5 against p17AS were in the same range of the EC₅₀ for a specific anti-p17 antibody against its natural target, p17 (Figure 2B).

Thus, the gp41-specific 2F5 bnAb cross-reacted with the p17 Gag subunit. Introduction of the 2F5 epitope into p17 (p17AS) increased cross-recognition of p17 by the 2F5 antibody, confirming that the structural context of this region of p17 was favorable for cross-recognition.

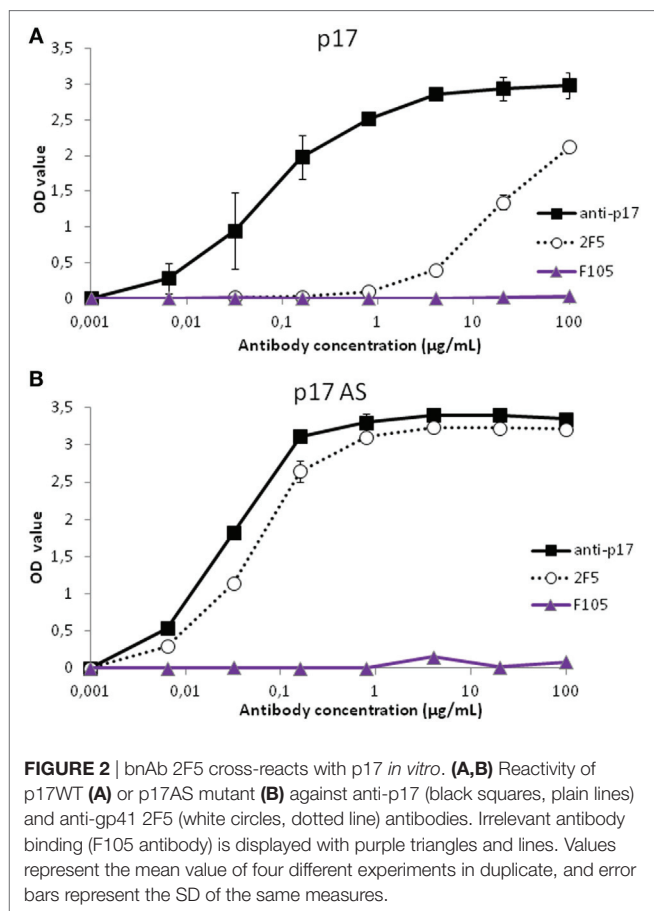
Cross-Clade Anti-gp41 Responses in Rabbits Induced by p17

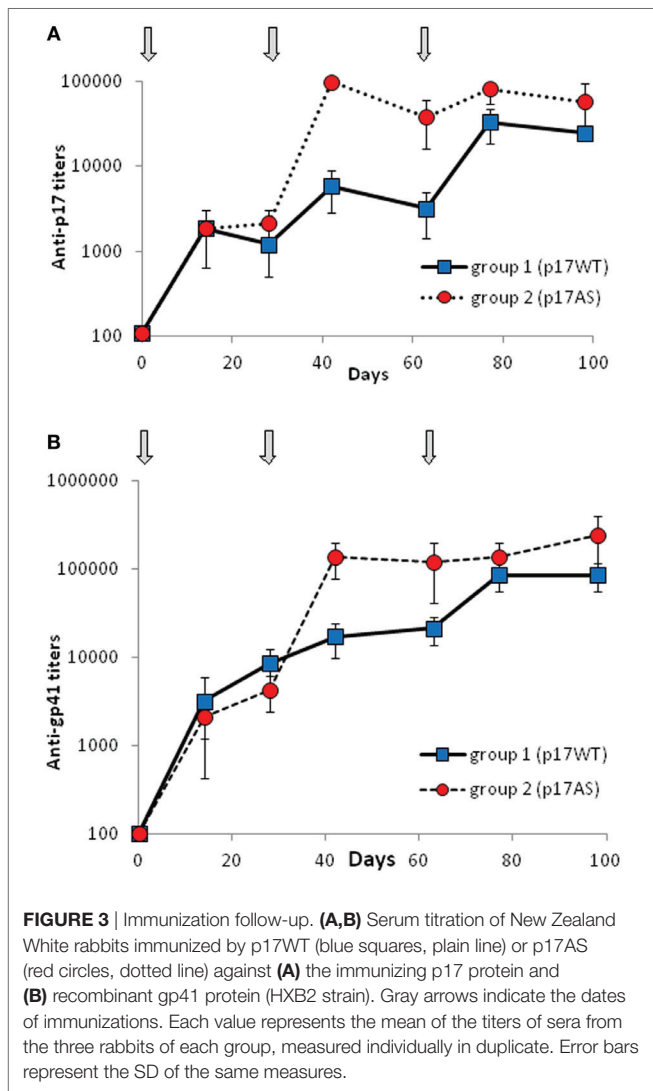
Immunogenicity of p17WT and p17AS was evaluated in rabbits. Groups of three rabbits were immunized at d0, d28, and d63 with 100 μ g of protein formulated on PLA particles, with serum samples taken every 2–3 weeks.

Antibody titers against the immunogen were estimated for each sampling point as the first dilution yielding a negative signal, and demonstrated elicitation of a high anti-p17 antibody titer ($\sim 10^5$) by both immunogens (Figure 3A). Anti-p17 antibodies appeared to be present earlier in animals immunized with p17AS compared to p17WT, but the differences in titers at d98 were not statistically significant (Mann–Whitney test, $p = 0.4$).

To confirm that p17 could induce an anti-gp41 response, the same sera were titrated against clade B gp41 (HXB2). Anti-gp41 titers showed the same profile as anti-p17 titers, reaching at least 10⁵ at d98 (Figure 3B), demonstrating that immunization with p17 can indeed induce strong titers of antibodies able to recognize gp41. At d98, there was no statistically significant difference between the two groups (Mann–Whitney test, $p = 0.4$), suggesting that amounts of induced anti-gp41 antibodies were not quantitatively higher when immunized with the p17AS mutant.

The cross-clade reactivity of these anti-gp41 antibodies was assessed through analysis of the sera for reactivity against gp41 fragments from different HIV-1 clades. As expected from anti-gp41 titer results, the serum from each animal recognized gp41 from the clade B strain (HXB2) (Figure 4), as well as strains from clades A, AE, D, and G (92UG037, 92UG024, 92TH022, and 92UG975, respectively) (Figure 4). These data indicate that the antibody response induced by p17 is able to cross-react with Env isolates from different clades around the 2F5 epitope. There was no significant difference in reactivity against the different proteins when immunized with p17WT or p17AS (Figure 4). Notably, the clade G strain, 92UG975, which exhibited the lowest signal (Figure 4), contains two mutations in the 2F5 epitope (ALDKWTS) compared to the clade B HXB2 strain used as a positive control (ELDKWAS) (27). As both mutations involve residues that participate in the 2F5/epitope interaction (25), this result suggests that the cross-reactivity of these sera targets the





2F5 epitope. Thus, immunizing rabbits with p17WT or p17AS would induce cross-clade-reactive anti-gp41 antibodies.

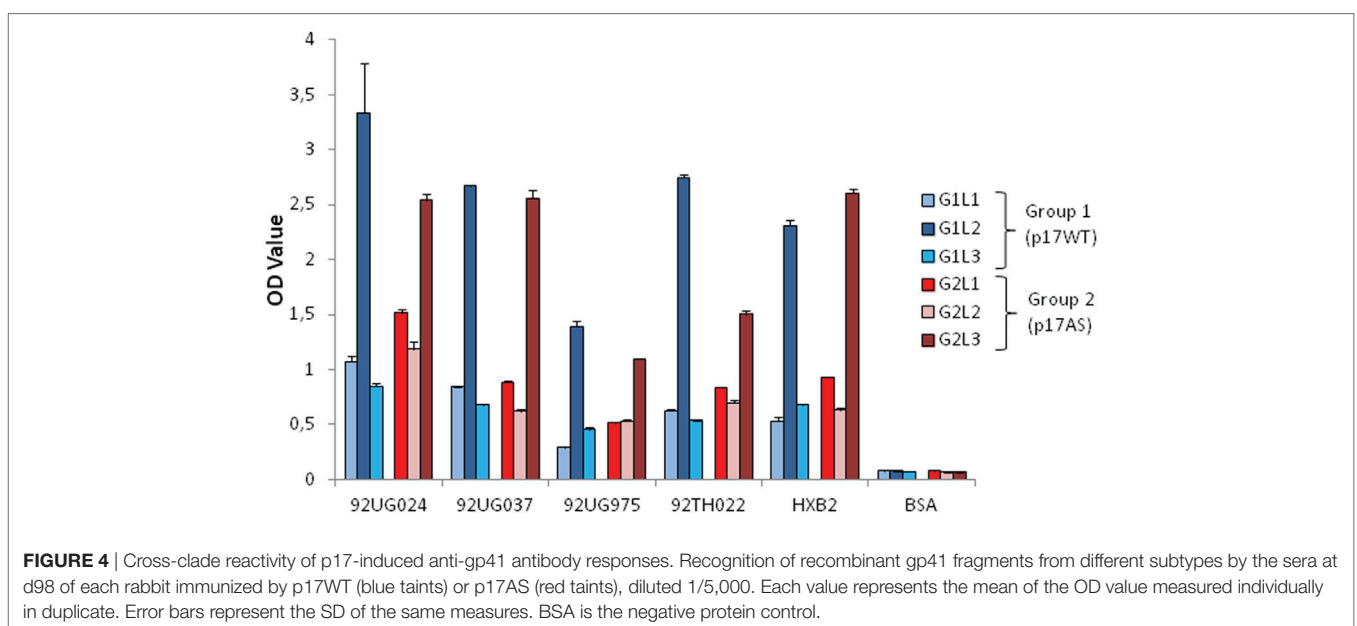
Antibodies Induced by Immunization with p17AS Show Neutralizing Activities

The sera of animals immunized with p17AS significantly neutralized the infectivity of viruses pseudotyped with the Env protein of the LAI strain compared to p17WT or pre-bled animals (ANOVA, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) (Figure 5). This also held true for viruses pseudotyped with envelopes of primary isolates (Figure 5): p17AS-induced antibody responses able to neutralize Tier 1, clade B strains (SF162, 92US660), and one Tier 2/3, clade A isolate (92UG029), with significant neutralizing activities for animals immunized with the modified p17AS protein against these strains compared to p17WT or pre-bled animals ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), reaching up to 60% of neutralization (Figure 5). Infectivity of Tier 2/3, clade D isolate 92UG001, was only marginally affected by sera from both groups, with no significant difference between the two groups of animals (Figure 5, $p > 0.5$).

Thus, although complete neutralization was not achieved, sera from p17AS-immunized animals had neutralizing activity against Tier 1 and Tier 2/3 isolates.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that the gp41-specific 2F5 bnAb cross-reacted with the p17 Gag subunit. We also found that introduction of the full-length 2F5 epitope in p17 (mutant p17AS) increased this cross-reactivity *in vitro*. Furthermore, sera obtained after immunization with p17AS neutralized Tier 1 and Tier 2/3 isolates from different clades. Neutralizing responses were detectable after three immunizations with p17AS in our study, whereas rabbits immunized with trimeric gp140 envelope proteins have detectable neutralizing responses following a



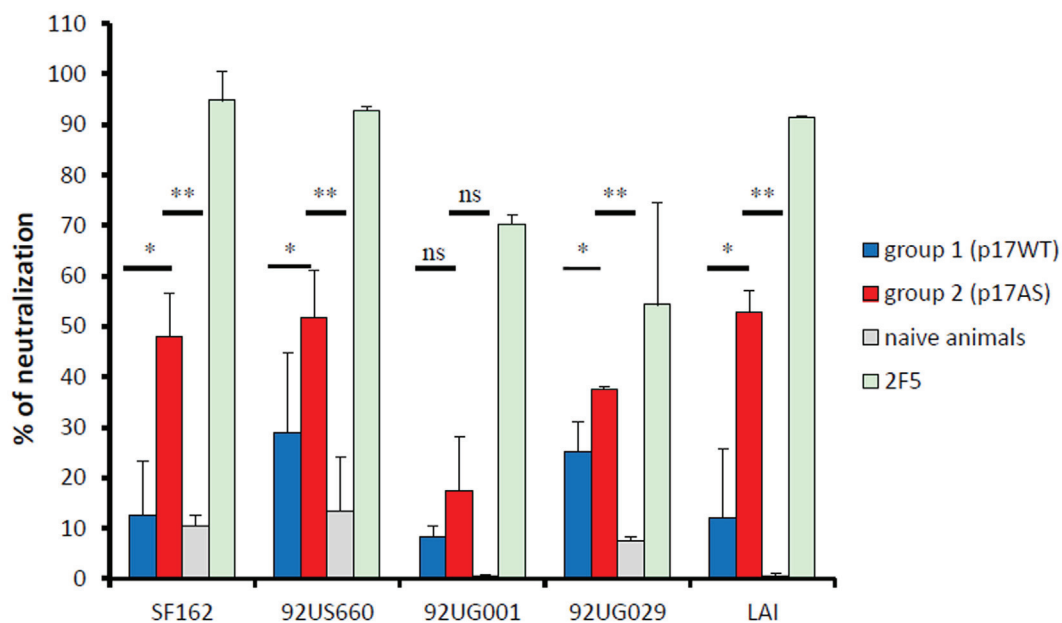


FIGURE 5 | Neutralizing activity of p17-induced anti-gp41 antibody responses. Neutralizing efficacy of purified IgG at d98 from animals immunized with p17WT (blue bars) and p17AS (red bars) against viral particles pseudotypes using envelop proteins of various isolates. Reference antibody 2F5 (green bars) and sera from non-immunized animals (gray bars) were used as positive and negative controls, respectively. Each value represents the mean of the neutralizing efficacy of purified IgG from the three rabbits of each group, measured individually in duplicate. Error bars represent the SD of the same measures. Stars indicate significant differences between the two groups in neutralizing activity against the isolate.

fourth immunization (10). This discrepancy could be due to the heavy glycosylation pattern of gp140 which may have reduced the elicitation of anti-gp140 neutralizing antibody responses (38), while our p17 antigens were not glycosylated.

In order to avoid unnecessary animal experiments, we performed a proof-of-concept study with a small number of animals, which can now be extended to a larger cohort of animals to improve statistical power. Despite the limited number of animals, our present study clearly demonstrated that p17WT and p17AS elicited antibodies in rabbits that recognize gp41 proteins from different clades and, for p17AS, possess partial neutralizing activity. Noteworthy, these gp41-reactive, cross-clade antibodies with partial neutralizing activity were obtained without the use of Env as an immunogen. This could explain the lower neutralizing activity we observed for p17AS-induced antibodies compared to other preclinical studies in which rabbits were immunized with gp140 (10). Our results suggest that cross-clade-reactive neutralizing anti-gp41 antibodies could be developed using this p17-targeting strategy. The next step is to evaluate the dose–response efficacy of neutralizing antibodies induced by p17 constructs against a larger panel of viruses (10, 39). The quality of the antibodies induced by p17 constructs for other antiviral activities, such as antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity or virus inhibition will also be assessed.

Although some exceptions occur (40), most bnAb recognize their epitope in the lipid bilayer area of the viral particle (41). Interestingly, p17 is naturally associated with the lipid bilayer during viral replication due to the presence of an N-terminal myristoyl group (42). This location brings p17 ELDKW close

to the lipid bilayer, which may enhance the induction of neutralizing antibodies. As mentioned previously, this point could not be verified as the p17 constructs were overexpressed in a bacterial system lacking natural myristoylation activity. Therefore, evaluation of cross-reactivity and immunogenicity of myristoylated forms of our p17-derived constructs is being considered.

Poly-lactic acid particles were used as an adjuvant as adsorption of the antigen is simple and reproducible, and such formulations preserve antigenicity and immunogenicity of the adsorbed antigens (43), which can also be oriented by the encapsulation of TLR ligands within the particles (44). This versatility allows for straightforward examination of the extent to which engineering of the p17 antigen, such as with the p17AS mutant, helps increase the breadth or magnitude of an induced anti-gp41 response (45). In parallel, structural information regarding interaction of the 2F5 antibody with the p17 constructs has been initiated to assist in structure-based engineering of the p17 antigen. Indeed, if an increase in sequence homology in p17AS increases the reactivity of 2F5 against p17, induced sera would be less reactive against isolates that contain a mutated sequence of the 2F5 epitope. Thus, increasing sequence homology while maintaining the structural environment of the 2F5 epitope in p17 will be the next step in optimization of a potent p17-derived antigen.

We demonstrated that sera obtained after immunization with p17AS neutralized infection by Tier 1 and Tier 2/3 isolates *in vitro*. Thus, p17 antigen can be used in an epitope scaffolding approach (46, 47), with the advantage of being a carrier

that possesses vaccinal properties. As p17 induces strong CTL responses, such an approach would result in generation of a multivalent candidate antigen inducing both anti-Gag and anti-gp41 responses. Similarly, epitope scaffolding using Gag p24 subunit as a carrier for Env epitopes has been suggested (48, 49). These previous studies are based solely on bio-computational predictions and biophysical/biochemical validations. In contrast, our approach takes advantage of the existing cross-reactivity of p17 with bnAb 2F5, and this cross-reactivity resulted in induction of anti-Env antibodies with some neutralizing efficacy in an animal model.

In conclusion, we have confirmed the natural cross-reactivity between HIV-1 p17 protein and gp41-specific 2F5 antibody which was suspected from previous studies (22). We have established the proof-of-concept that this property can be exploited to induce anti-HIV-1 neutralizing antibody responses by validating several points: first, the HIV-1 p17 protein induces anti-gp41 responses in rabbits. Second, p17 can be modified to increase its recognition by anti-gp41 antibodies *in vitro*. Finally, such a modified p17 induces antibodies with neutralizing activity in a rabbit model *in vivo*. Thus, our study paves the way for rational design of multifunctional antigens derived from p17 to induce both protective responses against Gag and neutralizing antibodies against gp41 as part of a vaccine formulation against HIV-1 infection.

ETHICS STATEMENT

Animals were housed and manipulated according to French standard regulatory ethical and welfare guidelines of the PLEXAN,

Saint-Étienne (authorization no 42-218-0801), and approved by the relevant ethics committee (Comité d'Éthique en Expérimentation Animale de la Loire (CEEAL-UJM n 98), Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, Saint-Étienne; reference 00811.02).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BV, SP, and CG designed the study. CG, LB-G, and LB produced the antigens and characterized *in vitro* cross-reactivities. CP and CT formulated the antigens. FJ, AE, and BC immunized the animals and performed neutralizing studies. CT and AE performed the ELISA with animal sera. BV, SP, CT, and CG analyzed the data. All authors participated to the writing of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. R. Montserret for his help with circular dichroism and Dr. N. Battail-Poirot for the gift of anti-p17 8E7A3 antibody.

FUNDING

CG, BV, and SP were supported in part by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS). SP and BV are supported by grants from the Fondation Pierre Bergé—Sidaction, FP7 European grants CUT'HIVAC (No. 241904) and ADITEC (No. 280873), and HIVERA support (HIVNANOVA).

REFERENCES

- Gray ES, Madiga MC, Moore PL, Mlisana K, Abdool Karim SS, Binley JM, et al. Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 mediated by plasma antibodies against the gp41 membrane proximal external region. *J Virol* (2009) 83:11265–74. doi:10.1128/JVI.01359-09
- Corti D, Lanzavecchia A. Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:705–42. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095916
- Moore PL, Williamson C, Morris L. Virological features associated with the development of broadly neutralizing antibodies to HIV-1. *Trends Microbiol* (2015) 23:204–11. doi:10.1016/j.tim.2014.12.007
- Pegu A, Hessel AJ, Mascola JR, Haigwood NL. Use of broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention. *Immunol Rev* (2017) 275:296–312. doi:10.1111/imr.12511
- Wibmer CK, Moore PL, Morris L. HIV broadly neutralizing antibody targets. *Curr Opin HIV AIDS* (2015) 10:135–42. doi:10.1097/COH.0000000000000153
- Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ. Rational design of vaccines to elicit broadly neutralizing antibodies to HIV-1. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2011) 1:a007278. doi:10.1101/cshperspect.a007278
- McCoy LE, Weiss RA. Neutralizing antibodies to HIV-1 induced by immunization. *J Exp Med* (2013) 210:209–23. doi:10.1084/jem.20121827
- Lewis GK, DeVico AL, Gallo RC. Antibody persistence and T-cell balance: two key factors confronting HIV vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:15614–21. doi:10.1073/pnas.1413550111
- McCoy LE, Burton DR. Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunol Rev* (2017) 275:11–20. doi:10.1111/imr.12484
- Quinnan GV Jr, Onabajo O, Zhang P, Yan L, Mattapallil JJ, Zhang Z, et al. Immunization of rabbits with highly purified, soluble, trimeric human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein induces a vigorous B cell response and broadly cross-reactive neutralization. *PLoS One* (2014) 9:e98060. doi:10.1371/journal.pone.0098060
- Hessel AJ, Malherbe DC, Pissani F, McBurney S, Krebs SJ, Gomes M, et al. Achieving potent autologous neutralizing antibodies responses against Tier 2 HIV-1 viruses by strategic selection of envelopes immunogens. *J Immunol* (2016) 196:3064–78. doi:10.4049/jimmunol.1500527
- Escolano A, Steichen JM, Dosenovic P, Kulp DW, Golijanin J, Sok D, et al. Sequential immunization elicits broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies in Ig knock-in mice. *Cell* (2016) 166:1445–58. doi:10.1016/j.cell.2016.07.030
- Haynes BF, Burton DR. Developing an HIV vaccine. *Science* (2017) 355:1129–30. doi:10.1126/science.aan0662
- Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, Sato H, Ryo A, Yamamoto H, et al. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* (2010) 7:90. doi:10.1186/1742-4690-7-90
- Yu XG, Shang H, Addo MM, Eldridge RL, Phillips MN, Feeney ME, et al. Important contribution of p15 Gag-specific responses to the total Gag-specific CTL responses. *AIDS* (2002) 16:321–8. doi:10.1097/00002030-200202150-00002
- 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. *Nat Med* (2007) 13:46–53. doi:10.1038/nm1520
- Radebe M, Gounder K, Mokgoro M, Ndhlovu ZM, Mncube Z, Mkhize L, et al. Broad and persistent Gag-specific CD8+ T-cell responses are associated with viral control but rarely drive viral escape during primary HIV-1 infection. *AIDS* (2015) 29:23–33. doi:10.1097/QAD.0000000000000508
- Mann JK, Ndung'u T. HIV-1 vaccine immunogen design strategies. *Virol J* (2015) 12:3. doi:10.1186/s12985-014-0221-0
- Fiorentini S, Giagulli C, Caccuri F, Magiera AK, Caruso A. HIV-1 matrix protein p17: a candidate antigen for therapeutic vaccines against AIDS. *Pharmacol Ther* (2010) 128:433–44. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.08.005

20. Caccuri F, Marsico S, Fiorentini S, Caruso A, Giagulli C. HIV-1 matrix protein p17 and its receptors. *Curr Drug Targets* (2016) 17:23–32. doi:10.2174/1389450116666150825110840
21. Buratti E, Tisminetzky SG, D'Agaro P, Baralle FE. A neutralizing monoclonal antibody previously mapped exclusively on human immunodeficiency virus type 1 gp41 recognizes an epitope in p17 sharing the core sequence IEEE. *J Virol* (1997) 71:2457–62.
22. Papsidero LD, Sheu M, Ruscetti FW. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibodies which react with p17 core protein: characterization and epitope mapping. *J Virol* (1989) 63:267–72.
23. Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, et al. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* (1993) 67:6642–7.
24. Muster T, Guinea R, Trkola A, Purtscher M, Klima A, Steindl F, et al. Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWS. *J Virol* (1994) 68:4031–4.
25. Ofek G, Tang M, Sambor A, Katinger H, Mascola JR, Wyatt R, et al. Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J Virol* (2004) 78:10724–37. doi:10.1128/JVI.78.19.10724-10737.2004
26. Connor RI, Sheridan KE, Lai C, Zhang L, Ho DD. Characterization of the functional properties of env genes from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* (1996) 70:5306–11.
27. Kuiken CL, Foley B, Leitner T, Hahn BH, Apetrei C, Mizrahi I, et al. *HIV Sequence Compendium 2010*. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National Laboratory (2010).
28. Hill CP, Worthylake D, Bancroft DP, Christensen AM, Sundquist WI. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93:3099–104. doi:10.1073/pnas.93.7.3099
29. Kwon YD, Georgiev IS, Ofek G, Zhang B, Asokan M, Bailer RT, et al. Optimization of the solubility of HIV-1-neutralizing antibody 10E8 through somatic variation and structure-based design. *J Virol* (2016) 90:5899–914. doi:10.1128/JVI.03246-15
30. Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* (2014) 42:W320–4. doi:10.1093/nar/gku316
31. Serrière J, Robert X, Perez M, Gouet P, Guillon C. Biophysical characterization and crystal structure of the Feline Immunodeficiency Virus p15 matrix protein. *Retrovirology* (2013) 10:64. doi:10.1186/1742-4690-10-64
32. Foucault M, Mayol K, Receveur-Bréchet V, Bussat M-C, Klinguer-Hamour C, Verrier B, et al. UV and X-ray structural studies of a 101-residue long Tat protein from a HIV-1 primary isolate and of its mutated, detoxified, vaccine candidate. *Proteins* (2010) 78:1441–56. doi:10.1002/prot.22661
33. Wilkinson RA, Piscitelli C, Teintze M, Cavacini LA, Posner MR, Lawrence CM. Structure of the Fab fragment of F105, a broadly reactive anti-human immunodeficiency virus (HIV) antibody that recognizes the CD4 binding site of HIV type 1 gp120. *J Virol* (2005) 79:13060–9. doi:10.1128/JVI.79.20.13060-13069.2005
34. Serrière J, Dugua J-M, Bossus M, Verrier B, Haser R, Gouet P, et al. Fab^b-induced folding of antigenic N-terminal peptides from intrinsically unstructured HIV-1 Tat protein revealed by X-ray crystallography. *J Mol Biol* (2011) 405:33–42. doi:10.1016/j.jmb.2010.10.033
35. Guillon C, Mayol K, Terrat C, Compagnon C, Primard C, Charles M-H, 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) 25:7491–501. doi:10.1016/j.vaccine.2007.08.060
36. Benjelloun F, Dawood R, Urcuqui-Inchima S, Rochereau N, Chanut B, Verrier B, et al. Secretory IgA specific for MPER can protect from HIV-1 infection in vitro. *AIDS* (2013) 27:1992–5. doi:10.1097/QAD.0b013e3283632ea1
37. Dawood R, Benjelloun F, Pin JJ, Kone A, Chanut B, Jospin F, et al. Generation of HIV-1 potent and broad neutralizing antibodies by immunization with postfusion HR1/HR2 complex. *AIDS* (2013) 27:717–30. doi:10.1097/QAD.0b013e32835cfa5
38. Zhou T, Doria-Rose NA, Cheng C, Stewart-Jones GBE, Chuang G-Y, Chambers M, et al. Quantification of the impact of the HIV-1-glycan shield on antibody elicitation. *Cell Rep* (2017) 19:719–32. doi:10.1016/j.celrep.2017.04.013
39. deCamp A, Hraber P, Bailer RT, Seaman MS, Ochsenbauer C, Kappes J, et al. Global panel of HIV-1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol* (2014) 88:2489–507. doi:10.1128/JVI.02853-13
40. Huang J, Ofek G, Laub L, Louder MK, Doria-Rose NA, Longo NS, et al. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* (2012) 491:406–12. doi:10.1038/nature11544
41. Dennison SM, Stewart SM, Stempel KC, Liao HX, Haynes BF, Alam SM. Stable docking of neutralizing human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 is dependent on the membrane immersion depth of their epitope regions. *J Virol* (2009) 83:10211–23. doi:10.1128/JVI.00571-09
42. Tang C, Loeliger E, Luncsford P, Kinde I, Beckett D, Summers MF. Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101:517–22. doi:10.1073/pnas.0305665101
43. 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. *J Control Release* (2006) 115:57–67. doi:10.1016/j.jconrel.2006.07.006
44. Pavot V, Climent N, Rochereau N, Garcia F, Genin C, Tiraby G, et al. Directing vaccine immune responses to mucosa by nanosized particulate carriers encapsulating NOD ligands. *Biomaterials* (2016) 75:327–39. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.034
45. Pavot V, Berthet M, Ressaygue J, Legaz S, Handké N, Gilbert SC, et al. Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine* (2014) 9:2703–18. doi:10.2217/nmm.14.156
46. Ofek G, Guenaga FJ, Schief WR, Skinner J, Baker D, Wyatt R, et al. Elicitation of structure-specific antibodies by epitope scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107:17880–7. doi:10.1073/pnas.1004728107
47. Correia BE, Ban YE, Holmes MA, Xu H, Ellingson K, Kraft Z, et al. Computational design of epitope-scaffolds allows induction of antibodies specific for a poorly immunogenic HIV vaccine epitope. *Structure* (2010) 18:1116–26. doi:10.1016/j.str.2010.06.010
48. Tagliamonte M, Marasco D, Ruggiero A, De Stradis A, Tortevoye P, Totrov M, et al. HIV p24 as scaffold for presenting conformational HIV Env antigens. *PLoS One* (2012) 7:e43318. doi:10.1371/journal.pone.0043318
49. Buonaguro L, Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM. Can HIV p24 be a suitable scaffold for presenting Env antigens? *Clin Vaccine Immunol* (2011) 18:2003–4. doi:10.1128/CDVI.05326-11

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Verrier, Paul, Terrat, Bastide, Ensinas, Phelip, Chanut, Bulens-Grassigny, Jospin and Guillon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 4

Intérêt des particules polymériques pour la vaccination et le ciblage
des ganglions

Revue

Review

Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting

Alice Gutjahr^{1,2,3,†}, Capucine Phelip^{1,†}, Anne-Line Coolen¹, Claire Monge¹, Anne-Sophie Boisgard¹, Stéphane Paul³ and Bernard Verrier^{1,*}

¹ Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, UMR 5305, Université Lyon 1, CNRS, IBCP, Lyon 69007, France; alice.gutjahr@ibcp.fr (A.G.); capucine.phelip@ibcp.fr (C.P.); anne-line.coolen@ibcp.fr (A.-L.C.); clairemonge.biotech@gmail.com (C.M.); anne-sophie.boisgard@ibcp.fr (A.-S.B.)

² InvivoGen, Toulouse 31400, France

³ Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, INSERM CIC1408 Vaccinologie, Faculté de Médecine de Saint-Etienne, Saint-Etienne 42270, France; stephane.paul@chu-st-etienne.fr

* Correspondence: bernard.verrier@ibcp.fr

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Olga Borges

Received: 23 August 2016; Accepted: 29 September 2016; Published: 12 October 2016

Abstract: Vaccines have successfully eradicated a large number of diseases. However, some infectious diseases (such as HIV, *Chlamydia trachomatis* or *Bacillus anthracis*) keep spreading since there is no vaccine to prevent them. One way to overcome this issue is the development of new adjuvant formulations which are able to induce the appropriate immune response without sacrificing safety. Lymph nodes are the site of lymphocyte priming by antigen-presenting cells and subsequent adaptive immune response, and are a promising target for vaccine formulations. In this review, we describe the properties of different polymer-based (e.g., poly lactic-co-glycolic acid, poly lactic acid . . .) particulate adjuvants as innovative systems, capable of co-delivering immunopotentiators and antigens. We point out how these nanoparticles enhance the delivery of antigens, and how their physicochemical properties modify their uptake by antigen-presenting cells and their migration into lymph nodes. We describe why polymeric nanoparticles increase the persistence into lymph nodes and promote a mature immune response. We also emphasize how nanodelivery directs the response to a specific antigen and allows the induction of a cytotoxic immune response, essential for the fight against intracellular pathogens or cancer. Finally, we highlight the interest of the association between polymer-based vaccines and immunopotentiators, which can potentiate the effect of the molecule by directing it to the appropriate compartment and reducing its toxicity.

Keywords: vaccine; adjuvant; immunogenicity; polymer; nanoparticles; nanodelivery; lymph node; antigen; molecular adjuvant

1. Why do We Need Adjuvants?

Preventive vaccination is one of the major successes of medicine. It represents one of the most cost-effective health investments and, according to the World Health Organization, saves 2 to 3 million lives every year. However, infectious diseases (such as HIV, *Chlamydia trachomatis*, *Bacillus anthracis* or malaria) remain a leading cause of death worldwide. In the early days of vaccination, heterologous pathogens (nonpathogenic relative of the organism, such as cowpox virus for smallpox vaccination) [1], or attenuated pathogens (with decreased pathogenicity thanks to repeated culturing, such as the tuberculosis vaccine) were used to immunize populations. Those vaccines have a high intrinsic immunogenicity and usually induce asymptomatic infections that generate a life-long immunity similar

to the one observed for individuals recovering from a natural infection. However, for many pathogens, this kind of vaccine has not been successfully developed, notably because of safety issues. Inactivated toxins (such as the inactivated tetanus toxin) or inactivated pathogens (such as the inactivated Polio virus), as well as synthetic peptides and recombinant protein subunits are now developed, but they have a poor immunogenicity. Therefore, they require a co-administration with adjuvants in order to elicit a robust immune response. Among various categories of adjuvants, delivery systems enhance antigen uptake by antigen-presenting cells and their migration into lymph nodes (LNs). Indeed, LNs house B and T lymphocytes, and are the site of lymphocyte priming by antigen-presenting cells for the induction of a subsequent adaptive immune response. Delivery systems can increase the persistence into the LNs and promote a mature immune response. There is a need for innovative adjuvants for prophylactic (preventive) vaccination, but also for therapeutic vaccines. Indeed, the use of vaccination to fight infections or cancer has been in the spotlight recently. The induction of a strong CD8⁺ T-cell immunity is central to elicit the destruction of infected or malignant cells [2], and the use of nanoparticulate vaccines seems to induce this kind of immune response through multiple pathways. For these reasons, adjuvantation is a promising strategy to address the challenges for the design of effective vaccines.

2. Biodegradable Nanoparticles for Vaccine Delivery

Biodegradable polymeric particles have been extensively studied during the past two decades. Biodegradable polymers are used in various medical applications, such as wound healing, tissue engineering, orthopedic devices, cardiovascular applications or vaccine administration. The use of nanoparticles (NPs) for vaccine administration was termed “nanovaccinology” in 2012 [3] and presents tremendous potential. Additionally, the use of biodegradable polymers for NP production is safe and reliable. They are indeed excellent adjuvants due to their physicochemical properties, which can be tuned to adapt to the desired antigen release profile and immunological response. Particle size can be tuned by changing the polymer concentration and the method of synthesis [4]. For these reasons, biodegradable NPs are ideal vectors for drug and protein delivery, and thus outstanding candidates for the future of vaccine administration [5–9].

2.1. Various Polymers for Vaccine Application

Biodegradable polymers are degraded *in vivo* by enzymatic processes, either hydrolysis or other mechanisms, and the degradation products are further eliminated by the normal metabolic pathways. This simple characteristic means that these materials have a great potential in medicine.

The field of bioengineering offers a wide range of biodegradable polymers to produce NPs. Multiple polymers are already approved by the U. S. Food and Drug Administration (FDA) for some applications, even though no NP formulation has been approved for vaccination so far [10]. Synthetic or natural biodegradable polymers may be used and each family has attractive properties. However, the most popular biodegradable polymers used in vaccine applications are poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), poly lactic acid (PLA) and polycaprolactone (PCL), three synthetic polymers.

PLGA is a highly compatible co-polymer of PLA and poly glycolic acid (PGA), and is FDA-approved for diverse applications. It has emerged as an attractive polymer as it offers wide possibilities for sustained drug delivery. For vaccine applications, NPs of PLGA can carry the antigen by encapsulation or surface attachment by covalent or ionic bonding [11].


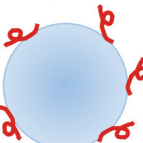
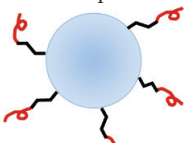
Together with PLGA, PLA is one of the most widely used polymers for particulate vaccine delivery, as a single polymer [12,13] or as a co-polymer when coupled to polyethylene glycol (PEG) [14] or PLGA [15]. This polymer is FDA-approved and its nanoformulation has already shown its efficacy in stimulating an efficient immune response after parenteral administration [16,17]. One of the major advantages of this anionic polymer is the possibility of encapsulation of hydrophobic molecules. It has been shown that PLA NPs can encapsulate or adsorb on their surface one or several antigens together with immunostimulant molecules like receptor ligands to improve their immunogenic potential [18].

Like PLA and PLGA, PCL is an aliphatic polyester and is of interest for its safety, low cost and compatibility with other polymers [19]. PCL has safe degradation by-products after hydrolysis of its ester linkages. Indeed, unlike PLA and PLGA, its degradation does not lead to the formation of lactic acid, which could affect the bioactivity of the antigen [20]. PCL has often been used for long-term implantable devices due to its slow degradation rate [6].

2.2. Polymers and Antigen/Immunopotentiator Association

The physicochemical properties of biodegradable polymers allow several ways to associate NPs and antigens, immunopotentiators or antigens/immunopotentiators together (Table 1). The bioactive molecules can indeed be trapped in the NPs by encapsulation and be released during NP degradation. The molecule of interest can also simply be adsorbed on the surface of the NPs by electrostatic or hydrophobic interactions [21]. This association is easy to perform but only provides a weak interaction with the NPs. This type of association could be interesting if the application requires a rapid release of the immunomodulators. A chemical conjugation provides a slight to strong association with the NPs by either adding a chemical cross-linker such as unmodified or modified polyethylene glycol (PEG), (interesting because of its thiol reactive maleimide), or by direct group association of the antigen with the carboxylic group of the NPs [22]. However, due to the aliphatic nature of these biopolymers, the strategies for conjugation are limited [23], which is why there is no reference to conjugation of an antigen with PCL nanoparticles in the literature. Yet, although no examples of the use of conjugated PCL nanoparticles for immunotherapy were found, conjugation by amide group could be possible. The ease of adsorbing single or multiple antigens or ligands in PLA/PLGA particles (compared with others adjuvants) explains the renewed interest in vaccine approaches using these polymeric nanoparticles [24].

Table 1. Possibilities to associate antigens or immunopotentiators to nanoparticles. Encapsulation is performed by mixing the bioactive molecule with the polymer during synthesis and leads to very few physical interactions with the nanoparticles (NP). Adsorption of the immunomodulators occurs via electrostatic or hydrophobic interactions and provides a weak association. A stronger association is provided by the chemical conjugation that links the immunomodulator and the NPs via a cross-linker.

Association	Type of Interaction	Polymers Involved
 Encapsulation	/	PLA, PLGA, PCL
 Adsorption	Electrostatic or hydrophobic	PLA, PLGA, PCL
 Conjugation	Chemical cross-linking	PLA, PLGA

3. Influence of Particle Characteristics on APCs Uptake and Targeting to Lymph Nodes

LNs are target organs for vaccine delivery, where B- and T-lymphocytes reside and are activated in the presence of an antigen. To access the LN, antigens can either enter directly or through intermediate

antigen-presenting cells (APCs). Two major types of APCs have been described for their ability to naturally uptake and process antigens: dendritic cells (DCs) and macrophages. They have similar functions, but only DCs are able to migrate from tissues to LNs and prime naïve T lymphocytes. In addition to their ability to migrate to the LNs, DCs have capacity to coordinate innate and adaptive immune responses *in vivo* and are involved in vaccination strategies [25]. Polymeric NPs enhance vaccine accumulation into LNs and promote superior cellular and humoral immunity to a variety of antigens in mice relative to soluble forms of protein and peptide vaccines [26]. Many studies have reported that nanoparticle characteristics such as size, shape or surface properties can significantly influence their biological activity [27,28]. For example, these parameters can affect targeting to specific cells, antigen uptake and the type of immune response induced. In this part, we discuss the influence of those NP properties on APC uptake and LN targeting.

3.1. Effect of Nanoparticle Size for APC Uptake and LN Targeting

Nanoparticles or exogenous pathogens can be taken up by cells through various pathways. Phagocytosis and pinocytosis (including clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis and macropinocytosis) are the two main endocytic pathways used for NP uptake (Figure 1). These different pathways differ in the composition of the coat, the size of the vesicles and the fate of the internalized molecule [29]. Macropinocytosis is a process for the endocytosis of extracellular material (0.5–5 μm) through membrane protrusions. Phagocytosis is involved in large size endocytic material with size ranges greater than 500 nm. Clathrin-mediated endocytosis induces the uptake of NPs with a size under 150 nm. Caveolae-mediated endocytosis allows different cellular processes including protein endocytosis. Generally, caveolae-vesicles induce the intracellular migration of materials with a size of 50–80 nm. NPs with a similar size as pathogens are efficiently recognized and taken up by APCs for the induction of the immune response [30]. NPs with a size between 20 and 200 nm are preferentially taken up by DCs, through the pinocytosis mechanism, while macrophages uptake larger NPs, from 0.5 to 5 μm , through macropinocytosis and phagocytosis [30].

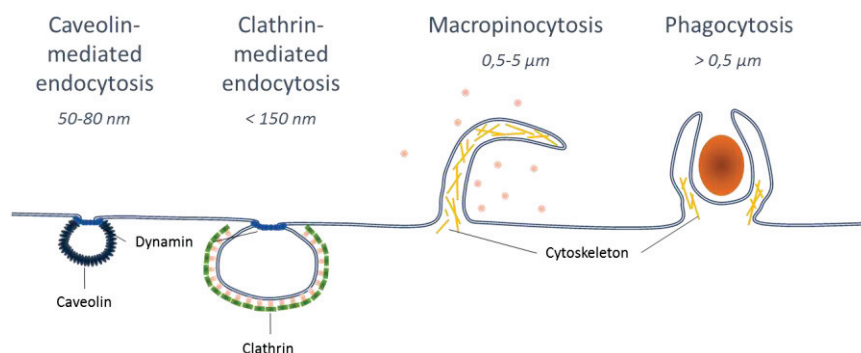


Figure 1. Pathways of endocytosis of exogenous particles, molecules or pathogens. According to the size of an extracellular molecule or particle, different endocytosis pathways take place to engulf it into the cell. Particles between 50 and 80 nm are taken into the cell through caveolin-mediated endocytosis, <150 nm by clathrin-mediated endocytosis, 0.5 to 5 μm through macropinocytosis and larger than 0.5 μm through phagocytosis.

Although intranodal injections can be performed, they are unusable for prophylactic vaccination, when the vaccine has to be administrated to a large number of persons in a rapid and convenient manner. Thus, alternative ways to direct vaccines to LNs have been developed. NPs can accumulate into LNs directly through lymphatic drainage or be taken up by APCs that will transport them to the LNs. Particle size is one of the most critical factors influencing NP uptake by immune target cells and drainage to the LNs for the induction of an optimal response. Some studies have reported that NPs with a size range between 0.5 and 2 μm are associated with an uptake by DCs at the injection site.

Smaller NPs (20–200 nm) are found in LN-resident APCs, suggesting free drainage to the LNs [31]. Another study established that particles larger than 100 nm have difficulty moving into lymphatic vessels and directly transit to LNs [32]. The size limit for lymphatic targeting is not clear and depends on both the tissue site and administration route. However, NPs with a size under 100 nm seem to be an efficient antigen delivery system to target LN-resident DCs and induce adaptive immunity [26].

Particle size can also affect the uptake efficiency and the immune response induction by APCs. Previous studies have established the preferential size of PLGA-based vaccines to induce an effective immune response (Table 2). Smaller PLGA NPs (300 nm) generate a better DC maturation and more efficient Ag-specific immune responses (IgG2a and CD8⁺ T lymphocyte) than 17 µm, 7 µm, 1 µm NPs in vivo in mice [5]. Three hundred and fifty nm PLGA NPs showed an improved internalization over 112 µm microparticles (MPs), correlated with a sustained cellular immune response in a mouse model [33]. Optimal size for efficient uptake and immune induction has not yet been clearly defined. However, nanoparticles seem to be able to trigger either humoral or cytotoxic immune responses depending on their size, probably due to the endocytosis pathway implicated [34,35].

3.2. Influence of Particle Shape for Cellular Uptake

Naturally, APCs can internalize various pathogens which can be distinguished by multiple shapes, such as rods, spirals, and ellipsoids. Polymeric delivery systems currently investigated have a spherical shape. However, in recent years, novel methods have allowed the manufacture of polymeric NPs with various shapes [36], and the influence of shape on cellular uptake and biodistribution has been investigated [27,36,37]. Non-spherical NPs show an improved membrane attachment, but a reduced uptake by APCs [17,37]. The non-spherical particle orientation is advantageous for phagocytosis initiation [37], but the membrane wrapping which in theory requires more actin remodeling may explain the more difficult and slower internalization of these particles [17]. Moreover, the shape has an influence on organism biodistribution [38]. This factor is important for the design of NPs for drug delivery at specific sites [39]. This parameter has to be taken into account for cellular uptake and subsequent draining to LNs.

3.3. Influence of Surface Characteristics of Polymeric NPs.

Surface properties such as charge and hydrophobicity have been reported to influence the uptake of NPs. Surface charge of NPs plays a significant role in the endocytosis mechanism and the activation of immune responses. Because cell membranes are negatively charged, cationic particles can be more efficiently taken up by APCs than anionic particles. For example, positively charged chitosan-based NPs have an increased internalization rate in eight types of cells, compared to neutral and negatively charged NPs [28]. In all cases, the surface charge of polymeric NPs (cationic or anionic) can be modified by using molecules with various charges like PEG or protamine [40,41]. Although cationic NPs are advantageous to enter into the cells, negative polymeric PLA NPs are also efficiently internalized by DCs [16]. Because positive NPs are more efficiently taken up by APCs, they can migrate through sentinel DCs to LNs, whereas negatively-charged polymeric particles, with a lower cellular uptake rate, might reside at the injection site and can permit antigen or immunopotentiator delivery at the site of injection [28]. Hydrophobicity has also been reported to affect NP uptake and immune response induction. In fact, hydrophobic particles induce a higher immune response than hydrophilic NPs through their increased susceptibility for phagocytosis [7].

In summary, NP size, shape and surface characteristics have an impact on their distribution in the organism, the endocytic processes involved and on the induction of immunity. As modifications in NP properties can induce different responses, the consideration of these parameters is central for adjuvants to target APCs and LNs.

4. Immune Responses and Functionalized Nanoparticles

The induction of a protective immunity requires antigen uptake either by circulating APCs present at the vaccine administration site or by LN-resident APCs after antigen migration through lymphatic vessels (Figure 2).

The APC uptake of soluble antigens is often insufficient to induce a protective immunity [42]. As antigen delivery systems, particles have demonstrated a huge potential for the development of vaccines and immunotherapies. The delivery of antigens loaded on NPs has several advantages: it prolongs antigen presence, enhances DC-mediated antigen uptake, directs stimulation of DCs and promotes immune responses [35]. Studies have investigated the advantages of polymeric NPs to induce an immune response in comparison with soluble antigens. For example, the loading of DCs with OVA formulated with PLGA-NPs has been shown to induce a more efficient duplication of CD4⁺ T-cells than soluble OVA (even at 500-times higher dose) [42].

After vaccine administration, antigens coupled to NPs are taken up by APCs (and notably by DCs) directly at the injection site or migrate to LNs through lymphatic vessels to target resident DCs (Figure 2). Via endocytosis, APCs process the foreign materials, induce the presentation of the antigenic fragment on their surface through Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules, and activate T-cells responses [43]. Depending on the endocytosis pathways, influenced by NP properties, and on the type of antigen loaded at the surface or into NPs, two types of immune response pathways can be potentially activated (MHC-I or MHC-II).

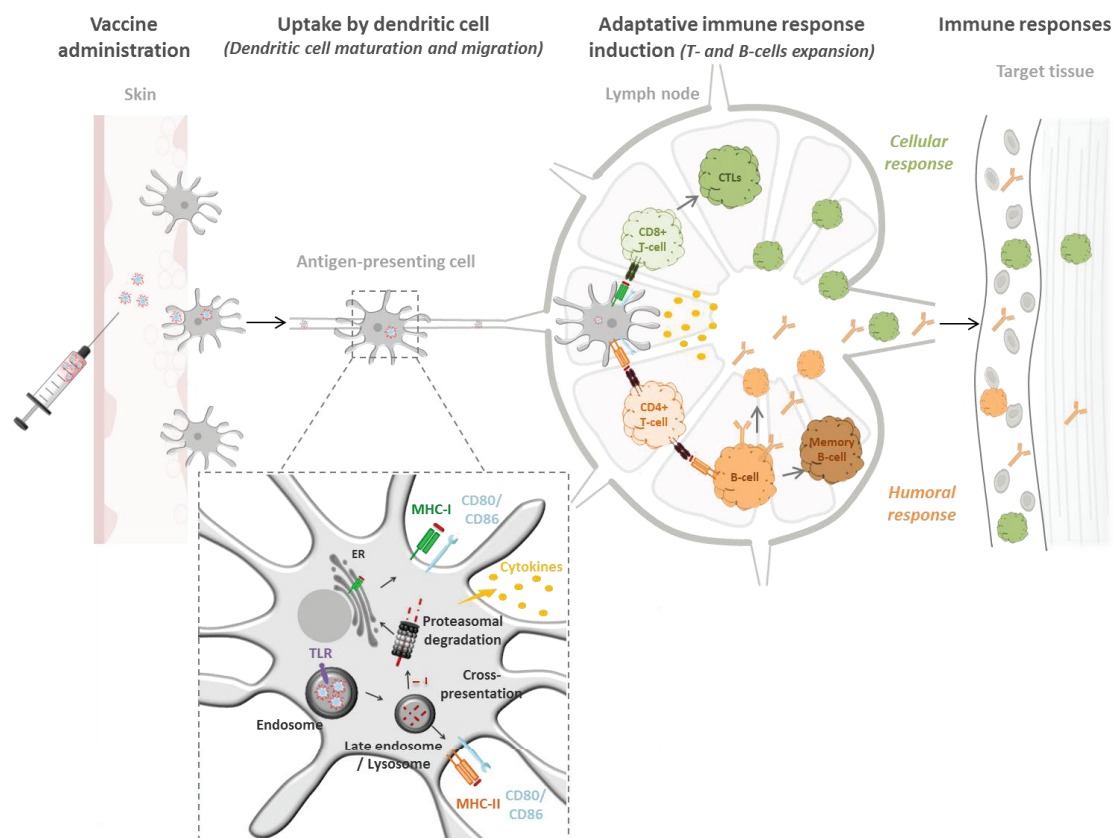


Figure 2. From vaccine administration to immune response. Administered NPs are firstly uptaken by APCs and the antigen is processed to be presented by the appropriate MHC. Antigenic peptide presented through MHC-I induce cytotoxic immune response, the peptides presented through MHC-II can activate CD4⁺ T cells that can provide help for the humoral immune response.

Studies confirm the added value of NPs as antigen delivery systems to induce broad and potent immune responses. Using an *ex vivo* priming assay, Petrizzo et al. [42] have demonstrated the efficacy of antigen delivery by PLGA NPs to induce the differentiation of naïve CD4⁺ T cells into memory cells with a TH1 phenotype. Moreover, several antigens can be loaded in the same polymeric NPs. This property allows the induction of a broad immune response. For example, the co-adsorption of HIV p24 antigen and gp120 envelope glycoprotein onto PLA NPs conserves the antigenicity of the proteins and the co-formulation elicits higher antibody titers compared to the gold standard MF59 [44].

Another important goal when designing antigen delivery systems in vaccination is the possibility of obtaining cross-presentation. The cross-presentation process consists of the presentation of an exogenous antigen, normally presented by the MHC-II pathways, in the context of MHC-I [45,46]. Antigens released by NPs in endosomes escape to the cytoplasm, are degraded in molecular fraction by the proteasome and loaded to the MHC-I. The MHC-I/peptide presentation at the APC surface, the expression of CD80/CD86 and the cytokine release induce the differentiation of CD8⁺ or cytotoxic T-cells [43]. Cross-presentation allows antigen presentation through both routes, and the use of particulate vaccines is one way to facilitate endosomal disruption after internalization [47]. The interest of poly(propylene sulfide) NPs was demonstrated, showing a targeting of LN-resident DCs and the induction of cross-presentation by NPs, leading to a cytotoxic immune response [48]. The delivery of antigens with NPs leads to their presentation through specific intracellular pathways, allowing the control of the type of immune cell stimulated by the APCs and the subsequent immune response [49].

5. Nanodelivery of Immunopotentiators

5.1. Immunopotentiators as Powerful Vaccine Adjuvants

Two classes of adjuvants are found in most modern vaccines: carrier systems and immunostimulant molecules [50]. As presented earlier, carrier (or delivery) systems, such as polymeric NPs, present the vaccine antigens in an optimal way to the immune system. Immunostimulatory molecules, in contrast to carrier systems, act directly on the immune system to potentiate or orient the immune response against the target antigen.

It is known that the immune system receptors called pathogen-recognition receptors (PRRs) are targeted by conserved microbial products called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Bacterial cell wall components, viral RNA and CpG DNA are natural pathogen components which activate PRRs. As they are present in most of the whole pathogen-based vaccines, the stimulation of PRRs has been unwittingly used in vaccines for years. Since the early days of the study of innate immunity [51], the interactions between PAMPs and PRRs have been extensively analyzed. Toll like receptors (TLRs), nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors, RIG-I-like receptors (RLRs) and C-type lectin receptors (CLRs) are the four main groups of PRRs. They sense the presence of infection and activate innate immunity but also have direct effects on the activation of adaptive immunity. Most of the molecular adjuvants currently under evaluation are PRR ligands [52]. The receptors currently targeted by polymeric nanoformulations are mostly endosomal receptors TLR3 [53], TLR4 [54], TLR7/8 [55] and TLR9 [56] (Table 2). TLR3 is stimulated by double-stranded RNA, TLR4 by lipopolysaccharide (LPS), TLR7 and TLR8 by single-stranded RNA and TLR9 by DNA containing CpG motifs (CpG oligodeoxynucleotides, ODN).

Combinations of delivery systems and immunostimulant molecules are commonly being developed as adjuvants because they have the potential to act synergistically to enhance the antigen-specific immune response. Nanodelivery can enhance the immunostimulatory properties of formulated molecules through multiple mechanisms: it can enhance the activity of the adjuvant through its concentration within lymphoid organs, prolonging its exposure to immune cells, it can allow the targeting of the appropriate cellular compartment or change the biological effect of those molecules and protect it from degradation. Moreover, these systems allow the co-delivery of immunopotentiators and antigens, which seems to be valuable for vaccine efficacy as reviewed later.

5.2. Improving Nanovectors Efficacy with Molecular Adjuvants

Biodegradable polymer-based nanovectors are often poorly immunogenic and the co-administration with molecular adjuvants is of great interest to improve and/or orient the immune response. For prophylactic vaccination, the co-encapsulation of soluble *Leishmania* antigens with the TLR4 ligand MPLA (3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A), the only TLR ligand approved as an adjuvant in human licensed vaccines preventing human papillomavirus, hepatitis B and malaria infection [57], proved to be an interesting tool for vaccination. The encapsulation of MPLA in 300 nm PLGA nanoparticles enhances the stimulation of DC maturation compared with the formulation alone [58]. The encapsulation of NOD ligands into PLA NPs of approximately 200 nm potentiates their activity. In fact, nanoformulations are more efficient to induce DC maturation *in vitro* and the co-injection of encapsulated NOD ligands with PLA particles carrying Gag p24 HIV-1 antigen increases antibody response compared to the NPs without molecular adjuvant or co-administered with the free immunomodulator [18]. Similarly, Wischke et al. [59] demonstrated that the encapsulation of NOD agonists into PLGA MPs of approximately 5 μm allows human moDC maturation *in vitro*, unlike empty MPs or soluble NOD ligand.

Molecular adjuvants have also a great interest for therapeutic vaccination. The association of a poorly immunogenic melanoma antigen with TLR4 agonist in 400 nm PLGA nanoparticles has a potent anti-tumor effect in mice, activating antigen-specific CD8⁺ T cells able to secrete IFN- γ in LNs and the spleen [60]. TLR9 recognizes specific unmethylated CpG motifs present at a high frequency in the bacterial genome but absent from mammalian genomes. The use of PLGA microspheres (1–10 μm) carrying tumor lysates and TLR9 ligand CpG ODN is promising as an anti-tumor vaccine against prostate carcinoma. Indeed, the co-encapsulation of tumor lysates with CpG-ODN induces high cytotoxic responses, leading to a reduction in tumor growth in a mouse model of prostate carcinoma [61]. Biodegradable polymeric NPs are a good alternative to adjuvants based on mineral oils that can be accompanied with adverse effects. In fact, the encapsulation of poly I:C within polyester (poly(D,L lactic-co-hydroxymethyl glycolic acid) nanoparticles of approximately 450 nm with an antigen from HPV-induced malignancies enhances the population of antigen-specific CD8⁺ cells compared to the formulation without poly I:C, with a strong therapeutic effect and no adverse effects [62].

The uptake of the NPs and the entrapped molecular adjuvants can be further enhanced by surface-modifications. Targeting specific DC subsets by functionalizing vaccines with a DC-binding ligand is an innovative approach to enhance LN targeting and vaccine efficacy. The coating of 200 nm PLGA NPs encapsulating TLRs agonists with antibodies recognizing DC-specific receptors enhances the maturation of DCs and the secretion of pro-inflammatory cytokines, as well as the activation of antigen-specific CD8⁺ T cells *in vitro*, compared to the untargeted formulations. *In vivo*, a comparable induction of an antigen-specific cytotoxic response is observed with 100-fold lower amounts of adjuvant when the TLR3 and TLR7 agonists are co-encapsulated compared to their administration in soluble form [57]. The surface-modification of 300 nm PLGA nanoparticles with a TNF α mimicking peptide enhances the uptake of the nanoparticles by DCs *in vitro* [52]. Adjuvants that target DEC-205 or other cell surface molecules expressed by DCs using antibodies coupled to NPs have been shown to enhance accumulation within LNs and immunogenicity in mice [63] and to promote both cellular and humoral immunity in humans [64]. PLGA NPs (200 nm) loaded with TLR3 and TLR7 ligands and decorated with different monoclonal antibodies targeting DEC-205, CD40 or CD11c receptors (expressed on the surface of DCs) were compared. *In vitro*, the T-cell proliferation of both CD8⁺ and CD4⁺ cells was efficiently induced by DCs loaded with targeted NPs but not by the untargeted ones. Furthermore, vaccination with PLGA NPs targeted to CD40, DEC-205 or CD11c induced efficient *in vivo* CD8⁺ response, around 80% specific killing, compared to the 40% induced by non-targeted PLGA NPs [65].

The design of adjuvants mimicking pathogens is a good way to induce an immune response. Triggering a combination of TLRs in APCs can have synergistic effects. The simultaneous delivery of MPLA, CpG ODN and the model antigen OVA loaded on 200 nm PLGA particles induces

a strong immune response against the model antigen in a mouse model [66]. The localization of the immunopotentiator seems to be a crucial point for vaccine adjuvant design. The stimulation of humoral and antigen-specific T cell responses is enhanced when CpG is encapsulated, compared to its adsorption at the surface of the nanoparticulate vector, showing the interest of mimicking the biology of the pathogens. The stimulation of TLR4 and TLR9 has a synergistic effect when co-delivered in the same particle, especially for cytotoxic response after vaccination in a mouse model [66]. A synergistic increase in the antigen-specific humoral response is observed after the immunization of mice with 300 nm PLGA NPs containing the TLR4 ligand MPL and the TLR7 ligand R837 compared with the molecular adjuvants alone [67].

All these results show that the encapsulation of molecular adjuvants is an effective way to enhance nanoparticulate vaccine immunogenicity.

5.3. Delivery of the Immunostimulant Molecules and Antigens to a Target Compartment

The nanodelivery of molecular adjuvants has diverse effects: it can avoid its systemic dissemination, enhance its uptake by APCs and help its transport to the LNs where the DCs can present the antigen to T cells and direct the immune response. The nanoformulation of a TLR9 ligand (CpG ODN) to 30 nm ultrasmall pluronic-stabilized poly(propylene sulfide) (PPS) NPs allows the drainage of the formulation within LNs and the efficient uptake and cross-presentation by DCs in a mouse model. This efficient response induces a strong cytotoxic immune response [68]. In a recent study, Lynn et al. [69] showed that the covalent binding of a TLR7 ligand to a polymer forming NPs in high density induces a high-magnitude and persistent innate immune activation restricted to the LNs, a necessary condition for promoting protective T_H1 $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell responses, and high antibody titers. The nanoformulation of TLR7 ligands in PLA-PLGA NPs increases cellularity within the draining LNs when the formulation is injected while no cell infiltration is observed when the free ligand is co-administered with the NPs [70]. This property is not limited to polymeric NPs as it has been demonstrated that lipid NPs enhance LN accumulation of stimulator of IFN genes (STING) ligands [71].

Some PRRs, such as TLR3, TLR7 and TLR9 are expressed within the endosomal compartment. The delivery in endosomes of ligands targeting these receptors is possible when using nanoformulations (Figure 2). The entrapment of TLR7 and TLR9 agonists and a model antigen (OVA) within PLGA microsphere (1–30 μm) leads to phagocytosis by APCs and the transfer into endosomal compartments in vitro. The formulations induce strong Ag-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ -mediated immune responses in mice after parenteral administration, leading to protective and therapeutic effects [72]. The encapsulation of CpG ODN within poly(γ - glutamic acid)-graf t-L-phenylalanine ethyl ester (γ -PGA-Phe) nanoparticles is a good way to potentiate the effect of CpG ODN. It induces the uptake by macrophages and the internalization of CpG ODN into endo/lysosomes, where TLR9 is expressed. Interestingly, γ -PGA-Phe particles stimulate TLR4, and the co-delivery with a TLR9 ligand synergistically stimulates macrophages in vitro. The formulation induces higher OVA-specific cytotoxic immune response than the co-administration with free CpG ODN in mice [73]. As presented earlier, the size of the particles influences their uptake by DCs. The uptake is essential as it leads to the targeting of TLR by the appropriate agonist into DCs, which induces their maturation. PLGA NPs (350 nm) and MPs (112 μm) carrying a TLR3 ligand (poly I:C) and the model antigen OVA show an improved internalization of NPs over MPs, correlated with a sustained cellular immune response in a mouse model [34].

The delivery of PRR agonists to the right cells (i.e., LN-resident DCs) and to the right compartment (endosomal compartment of the cell, where the appropriate receptor is expressed) is a crucial point for vaccine adjuvant design. The encapsulation of these ligands within particulate vectors is one way to reach this objective.

5.4. The Nanodelivery of Immunomodulators Decreases Their Toxicity

Another interesting aspect of using nanoparticulate vectors is the reduction of the amount of immune modulators that can be toxic in high doses, and the reduction of their systemic dissemination after injection. Indeed, soluble molecular adjuvants can induce toxicity due to the rapid clearance to the bloodstream after injection and the induction of a cytokine storm. Their formulation within particles allows local immune responses within the LNs. Synthetic vaccine particles co-encapsulating a model antigen and TLR7/8 or TLR9 ligands co-delivered with the model antigen OVA induce stronger humoral and cellular immune responses with lower systemic production of pro-inflammatory cytokines than the co-injection with a free agonist [70]. The formulation of polymeric NPs with a TLR9 agonist leads to similar effects of the adjuvant with lower doses, thus limiting toxicity in a mouse model [68]. The binding of a TLR7 ligand with polymer particles has recently been studied, the nanoparticulate formulation leading to a reduced systemic innate immunity activation (often associated with adjuvant toxicity and morbidity) and improved vaccine immunogenicity [69]. The encapsulation of TLR3 and TLR7 agonists reduces their side effects and the related toxicity associated with their soluble administration in a mouse model [63].

5.5. Co-Delivery or Co-Administration with Antigens?

Different strategies propose to co-deliver within the same particle or to co-administer with two different carriers the antigen and the immune modulator. The co-delivery of a TLR7 agonist with a diphtheria-tetanus-pertussis DTaP antigen results in higher antibody titers when the TLR7 ligand is encapsulated inside PLGA nanoparticles of approximately 350 nm rather than co-administered in a mouse model. The simultaneous delivery of the antigens and the molecular adjuvant is advantageous for the induction of a strong immune response in this model [74]. The co-localization of CpG and antigen on PLGA NPs of around 250 nm in diameter induces much higher antibody titers than the co-administration with free CpG motifs in a mouse model. Moreover, it induces a superior protection to West Nile Encephalitis than the control adjuvant alum [75]. The co-delivery of a TLR9 agonist with a model antigen allows a better CD8⁺ immune response than the nanoparticle-conjugated antigen co-administered with the free ligand [68]. The co-delivery of a model antigen OVA and MPLA in 350–450 nm PLGA NPs induces their uptake by DCs, leading to the induction of CD4⁺ and CD8⁺ immune responses in vitro. In mice, this formulation offers clonal expansion of CD4⁺ T cells capable of cytokine secretion [76]. In vivo, the administration of poly I:C or CpG ODN encapsulated with OVA in 1 µm PLGA particles improves the CTL activity of NP-OVA. In a solid tumor model, the functionalized NPs exert potent antitumor activity [77]. The co-entrapment of poly I:C and CpG with OVA in 150 nm mannose-functionalized aliphatic polyester-based nanoparticles induces a long lasting T_H1 immune response that is not observed with the co-administered free molecules [78]. Interestingly, the release of PRRs agonists and antigens is important for the induction of an appropriate immune response. The comparison of bare, chitosan-coated and protamine-coated PLGA MPs for the coupling with antigen and CpG showed that uncoated MPs are more efficient for the induction of CTL response in mice. The authors assessed that the low release of the antigen and CpG with other formulations was the cause of this impaired activity [79]. To conclude, the co-delivery of immunopotentiator and antigens seems to be a powerful tool to induce a strong immune response.

Table 2. In vivo effects of the nanoformulation of molecular adjuvants.

Particles Characteristics (Polymer-Size)	Model (Antigen-Model)	Target Receptor	Co-Administration or Co-Delivery	Immune Response	Ref.
γ -PGA-Phe-200 nm	OVA-mouse	TLR9	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response -CD8 ⁺ T cells response	[73]
HPMA-NIPAM-1 μ m	OVA-mouse	TLR7	Co-administration	CD4 ⁺ T cells response -Antibody	[69]
Mannose-functionalized aliphatic polyester-150 nm	OVA-mouse	TLR3 + TLR9	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response	[78]
PLA-200 nm	HIV-1 p24-mouse	NOD1 or NOD2	Co-administration	-Antibody -CD8 ⁺ T cells response	[18]
PLGA-200 nm	OVA-mouse	TLR3 + TLR7	Co-delivery	-CD4 ⁺ T cells response -Antibody	[65]
PLGA-200 nm	OVA-mouse	TLR4 + TLR9	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response	[66]
PLGA-200 nm	OVA-mouse	TLR3 + TLR7	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response -Antibody	[63]
PLGA-250 nm	rWNVE-mouse	TLR9	Co-delivery	-Protection to West Nile Encephalitis	[75]
PLGA-300 nm	OVA-mouse	TLR4 + TLR7	Co-delivery	-Antibody	[67]
PLGA-350 nm	OVA-mouse	TLR3	Co-administration	-CD8 ⁺ T cells response	[33]
PLGA-350 nm	DTaP-mouse	TLR7	Co-delivery	-Antibody	[74]
PLGA-400 nm	OVA-mouse	TLR4	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response -CD4 ⁺ T cells response	[76]
PLGA-400 nm	Melanoma antigen-mouse	TLR4	Co-delivery	-Anti-tumor effect -CD8 ⁺ T cells response	[60]
PLGA-1 μ m	OVA-mouse	TLR3 or TLR9	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response -Antitumor activity	[77]
PLGA-1–10 μ m	Tumor lysate-mouse	TLR9	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response -Antitumor activity	[61]
PLGA-1–30 μ m	OVA-mouse	TLR7 + TLR9	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response -CD4 ⁺ T cells response	[72]
pLHMGA-450 nm	HPV synthetic long peptide-mouse	TLR3	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response	[62]
PPS-30 nm	OVA-mouse	TLR9	Co-delivery	-Cross-presentation -CD8 ⁺ T cells response	[68]

Abbreviations: DTaP, diphtheria-tetanus-pertussis; γ -PGA-Phe, poly(γ -glutamic acid)-graf t-L-phenylalanine ethyl ester; HPMA, *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide; NIPAM, *N*-isopropylacrylamide; pLHMGA, Poly(D,L-lactic-co-hydroxymethyl glycolic acid); rWNVE, recombinant WN virus envelope protein.

6. Conclusions and Future Perspectives

Polymer-based particulate systems are effective delivery systems, able to deliver immunopotentiators and antigens. They enhance vaccine accumulation into LNs and promote superior humoral immunity to a variety of antigens relative to soluble forms. The nanoformulation allows the process of cross-presentation, leading to the induction of cytotoxic immune response, essential for the fight against intracellular pathogens and cancer. The nanodelivery of immune adjuvants has a great potential for vaccine adjuvantation. It allows the enhancement of the activity of the molecular adjuvant by concentrating it within the LNs, prolonging its exposure to immune cells, while reducing its toxicity. Thus, the co-delivery of antigens and immunopotentiators in polymeric nanoparticles seems to be an efficient way to induce a potent immune response.

A multitude of new challenges for the design of more effective vaccine adjuvants awaits the scientific community, with the manipulation of size, shape and other properties. Local toxicity of polymer-based particulate vaccines could be a detrimental issue, hampering their clinical use, this is why efforts have to be made to overcome this issue. Moreover, the development of delivery systems carrying RNA or DNA has been in the spotlight recently, and the development of polymer-based NPs carrying those molecules would allow their use for RNA and DNA vaccines. Indeed, even if mRNAs present multiple advantages for vaccine formulation, mRNA-based vaccines raise several challenges: protection, stabilization and transport of mRNAs to DCs to induce antigen production. In order to overcome these challenges, the development of polymeric NPs seems to be promising.

Acknowledgments: A.G. is supported by an ANRT doctoral fellowship in collaboration with InvivoGen. C.P. is supported by an ANRS doctoral fellowship, whereas A.L.C. is supported by a doctoral fellowship from ARC Santé Region Rhone-Alpes and A.S.B. by a CNRS doctoral fellowship. S.P. and B.V. are supported by grants from the

Fondation Pierre Bergé - Sidaction, two FP7 European grants CUT'HIVAC (No. 241904) and ADITEC (No. 280873) and HIVERA support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Moss, B. Smallpox vaccines: Targets of protective immunity. *Immunol. Rev.* **2012**, *239*, 8–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Dubensky, T.W.J.; Reed, S.G. Seminars in Immunology Adjuvants for cancer vaccines. *Semin. Immunol.* **2010**, *22*, 155–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mamo, T.; Poland, G.A. Nanovaccinology: The next generation of vaccines meets 21st century materials science and engineering. *Vaccine* **2012**, *30*, 6609–6611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Astete, C.E.; Sabliov, C.M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2006**, *17*, 247–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Joshi, V.B.; Geary, S.M.; Salem, A.K. Biodegradable particles as vaccine delivery systems: Size matters. *AAPS J.* **2013**, *15*, 85–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mahapatro, A.; Singh, D.K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnol.* **2011**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zhao, L.; Seth, A.; Wibowo, N.; Zhao, C.X.; Mitter, N.; Yu, C.; Middelberg, A.P.J. Nanoparticle vaccines. *Vaccine* **2014**, *32*, 327–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Boraschi, D.; Italiani, P. From Antigen Delivery System to Adjuvanticy: The Board Application of Nanoparticles in Vaccinology. *Vaccines* **2015**, *3*, 930–939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Bolhassani, A.; Javanad, S.; Saleh, T.; Hashemi, M.; Aghasadeghi, M.R.; Sadat, S.M. Polymeric nanoparticles Potent vectors for vaccine delivery targeting cancer and infectious diseases. *Hum. Vaccines Immunother.* **2014**, *10*, 321–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Anselmo, A.C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the Clinic. *Bioeng. Transl. Med.* **2016**, *55*, 10–29. [[CrossRef](#)]
11. Moon, J.J.; Suh, H.; Polhemus, M.E.; Ockenhouse, C.F.; Yadava, A.; Irvine, D.J. Antigen-displaying lipid-enveloped PLGA nanoparticles as delivery agents for a Plasmodium vivax malaria vaccine. *PLoS ONE* **2012**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Westwood, A.; Elvin, S.J.; Healey, G.D.; Williamson, E.D.; Eyles, J.E. Immunological responses after immunisation of mice with microparticles containing antigen and single stranded RNA (polyuridylic acid). *Vaccine* **2006**, *24*, 1736–1743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kanchan, V.; Panda, A.K. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5344–5357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dixit, S.; Singh, S.R.; Yilma, A.N.; Agee, R.D.; Taha, M.; Dennis, V.A. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles provide sustained delivery of a Chlamydia trachomatis recombinant MOMP peptide and potentiate systemic adaptive immune responses in mice. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* **2014**, *10*, 1311–1321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Fredriksen, B.N.; Grip, J. PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vaccine* **2012**, *30*, 656–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Primard, C.; Rochereau, N.; Luciani, E.; Genin, C.; Delair, T.; Paul, S.; Verrier, B. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6060–6068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sharma, G.; Valenta, D.T.; Altman, Y.; Harvey, S.; Xie, H.; Mitragotri, S.; Smith, J.W. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J. Control. Release* **2010**, *147*, 408–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Pavot, V.; Rochereau, N.; Primard, C.; Genin, C.; Perouzel, E.; Lioux, T.; Paul, S.; Verrier, B. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J. Control. Release* **2013**, *167*, 60–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sinha, V.R.; Bansal, K.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Trehan, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *Int. J. Pharm.* **2004**, *278*, 1–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. Silva, J.M.; Videira, M.; Gaspar, R.; Pr eat, V.; Florindo, H.F. Immune system targeting by biodegradable nanoparticles for cancer vaccines. *J. Control. Release* **2013**, *168*, 179–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Akagi, T.; Baba, M.; Akashi, M. Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. *Adv. Polym. Sci.* **2012**, *247*, 31–64.
22. Roth-Walter, F.; Sch oll, I.; Untermayr, E.; Ellinger, A.; Boltz-Nitulescu, G.; Scheiner, O.; Gabor, F.; Jensen-Jarolim, E. Mucosal targeting of allergen-loaded microspheres by Aleuria aurantia lectin. *Vaccine* **2005**, *23*, 2703–2710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Silva, J.M.; Zupancic, E.; Peres, C.; Silva, L.C.; Gaspar, R.; Pr eat, V.; Florindo, H.F. Immunomodulation against Microbial Pathogens Through Dendritic Cells. In *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science Technology and Education*; M endez-Vilas, A., Ed.; Badajoz, Spain, 2013; pp. 1686–1705.
24. Jain, S.; O’Hagan, D.T.; Singh, M. The long-term potential of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microparticles as the next-generation vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines* **2011**, *10*, 1731–1742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Banchereau, J.F.B. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, *18*, 767–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Reddy, S.T.; van der Vlies, A.J.; Simeoni, E.; Angeli, V.; Randolph, G.J.; O’Neil, C.P.; Lee, L.K.; Swartz, M.A.; Hubbell, J.A. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1159–1164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Morachis, J.M.; Mahmoud, E.A.; Almutairi, A. Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 505–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Yue, Z.G.; Wei, W.; Lv, P.P.; Yue, H.; Wang, L.Y.; Su, Z.G.; Ma, G.H. Surface Charge Affects Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Chitosan-Based Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2440–2446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Khalil, I.A.; Kogure, K.; Akita, H.; Harashima, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 32–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Scholzen, A.; Minigo, G.; David, C.; Apostolopoulos, V.; Mottram, P.L. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods* **2006**, *40*, 1–9.
31. Manolova, V.; Flace, A.; Bauer, M.; Schwarz, K.; Saudan, P.; Bachmann, M.F. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 1404–1413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Reddy, S.T.; Rehor, A.; Schmoekel, H.G.; Hubbell, J.A.; Swartz, M.A. In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles. *J. Control. Release* **2006**, *112*, 26–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Silva, A.L.; Rosalia, R.A.; Varypataki, E.; Sibuea, S.; Ossendorp, F.; Jiskoot, W. Poly-(lactic-co-glycolic-acid)-based particulate vaccines: Particle uptake by dendritic cells is a key parameter for immune activation. *Vaccine* **2015**, *33*, 847–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Leleux, J.; Roy, K. Micro and nanoparticle-based delivery systems for vaccine immunotherapy: An immunological and materials perspective. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 72–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Joshi, V.B.; Geary, S.M.; Salem, A.K. Biodegradable particles as vaccine antigen delivery systems for stimulating cellular immune responses. *Hum. Vaccin. Immunother.* **2013**, *912*, 2584–2590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Meyer, R.A.; Green, J.J. Shaping the future of nanomedicine: Anisotropy in polymeric nanoparticle design. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2016**, *8*, 191–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Champion, J.A.; Mitragotri, S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 4930–4934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Geng, Y.A.N.; Dalhaimer, P.; Cai, S.; Tsai, R.; Minko, T.; Discher, D.E. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 249–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Doshi, N.; Prabhakarparandian, B.; Rea-Ramsey, A.; Pant, K.; Sundaram, S.; Mitragotri, S. Flow and adhesion of drug carriers in blood vessels depend on their shape: A study using model synthetic microvascular networks. *J. Control. Release* **2010**, *146*, 196–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Cho, W.S.; Thielbeer, F.; Duffin, R.; Johansson, E.M.V.; Megson, I.L.; MacNee, W.; Bradley, M.; Donaldson, K. Surface functionalization affects the zeta potential, coronal stability and membranolytic activity of polymeric nanoparticles. *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 202–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

41. Han, R.; Zhu, J.; Yang, X.; Xu, H. Surface modification of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles with protamine enhanced cross-presentation of encapsulated ovalbumin by bone marrow-derived dendritic cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2011**, *96*, 142–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Petrizzo, A.; Conte, C.; Tagliamonte, M.; Napolitano, M.; Bifulco, K.; Carriero, V.; De Stradis, A.; Tornesello, M.L.; Buonaguro, F.M.; Quaglia, F.; et al. Functional characterization of biodegradable nanoparticles as antigen delivery system. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Alloatti, A.; Kotsias, F.; Magalhaes, J.G.; Amigorena, S. Dendritic cell maturation and cross-presentation: Timing matters! *Immunol. Rev.* **2016**, *272*, 97–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lamalle-Bernard, D.; Munier, S.; Compagnon, C.; Charles, M.H.; Kalyanaraman, V.S.; Delair, T.; Verrier, B.; Ataman-Önal, Y. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J. Control. Release* **2006**, *115*, 57–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Joffre, O.P.; Segura, E.; Savina, A.; Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 557–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Saluja, S.S.; Hanlon, D.J.; Sharp, F.A.; Hong, E.; Khalil, D.; Robinson, E.; Tigelaar, R.; Fahmy, T.M.; Edelson, R.L. Targeting human dendritic cells via DEC-205 using PLGA nanoparticles leads to enhanced cross-presentation of a melanoma-associated antigen. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 5231–5246. [[PubMed](#)]
47. Demento, S.L.; Cui, W.; Criscione, J.M.; Stern, E.; Tulipan, J.; Kaech, S.M.; Fahmy, T.M. Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype. *Biomaterials* **2012**, *33*, 4957–4964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Hirosue, S.; Kourtis, I.C.; van der Vlies, A.J.; Hubbell, J.A.; Swartz, M.A. Antigen delivery to dendritic cells by poly(propylene sulfide) nanoparticles with disulfide conjugated peptides: Cross-presentation and T cell activation. *Vaccine* **2010**, *28*, 7897–7906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Hubbell, J.A.; Thomas, S.N.; Swartz, M.A. Materials engineering for immunomodulation. *Nat. Rev.* **2009**, *462*, 449–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Coffman, R.L.; Sher, A.; Seder, R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **2010**, *33*, 492–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hoffmann, J.A.; Kafatos, F.C.; Janeway, C.A.; Ezekowitz, R.A.B. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* **1999**, *284*, 1313–1318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Gutjahr, A.; Tiraby, G.; Perouzel, E.; Verrier, B.; Paul, S. Triggering Intracellular Receptors for Vaccine Adjuvantation. *Trends Immunol.* **2016**, *37*, 573–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Alexopoulou, L.; Holt, A.C.; Medzhitov, R.; Flavell, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. *Nature* **2001**, *413*, 732–738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Reed, S.G.; Hsu, F.C.; Carter, D.; Orr, M.T. The science of vaccine adjuvants: Advances in TLR4 ligand adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* **2016**, *41*, 85–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Diebold, S.S. Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 813–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pohar, J.; Krajnik, A.K.; Jerala, R.; Bencina, M. Minimal Sequence Requirements for Minimal Sequence Requirements for Oligodeoxyribonucleotides Activating Human TLR9. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 3901–3908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Bentala, H.; Verweij, W.R.; Huizinga-Van der Vlag, A.; van Loenen-Weemaes, A.M.; Meijer, D.K.F.; Poelstra, K. Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. *Shock* **2002**, *18*, 561–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Margaroni, M.; Agallou, M.; Kontonikola, K.; Karidi, K.; Kammona, O.; Kiparissides, C.; Gaitanaki, C.; Karagouni, E. PLGA nanoparticles modified with a TNF α mimicking peptide, soluble Leishmania antigens and MPLA induce T cell priming in vitro via dendritic cell functional differentiation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *105*, 18–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Wischke, C.; Mathew, S.; Roch, T.; Frentsch, M.; Lendlein, A. Potential of NOD receptor ligands as immunomodulators in particulate vaccine carriers. *J. Control Release* **2012**, *164*, 299–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Hamdy, S.; Molavi, O.; Ma, Z.; Haddadi, A.; Alshamsan, A.; Gobti, Z.; Elhasi, S.; Samuel, J.; Lavasanifar, A. Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8⁺ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Vaccine* **2008**, *26*, 5046–5057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

61. Mueller, M.; Reichardt, W.; Koerner, J.; Groettrup, M. Coencapsulation of tumor lysate and CpG-ODN in PLGA-microspheres enables successful immunotherapy of prostate carcinoma in TRAMP mice. *J. Control. Release* **2012**, *162*, 159–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Rahimian, S.; Franssen, M.F.; Kleinovink, J.W.; Christensen, J.R.; Amidi, M.; Hennink, W.E.; Ossendorp, F. Polymeric nanoparticles for co-delivery of synthetic long peptide antigen and poly IC as therapeutic cancer vaccine formulation. *J. Control. Release* **2015**, *203*, 16–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Tacke, P.J.; Zeelenberg, I.S.; Cruz, L.J.; Van Hout-Kuijper, M.A.; Van De Glind, G.; Fokink, R.G.; Lambeck, A.J.A.; Figdor, C.G. Targeted delivery of TLR ligands to human and mouse dendritic cells strongly enhances adjuvanticity. *Blood* **2011**, *118*, 6836–6844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Dhodapkar, M.V.; Sznol, M.; Zhao, B.; Wang, D.; Carvajal, R.D.; Keohan, M.L.; Chuang, E.; Sanborn, R.E.; Lutzky, J.; Powderly, J.; et al. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 232–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Cruz, L.J.; Rosalia, R.A.; Kleinovink, J.W.; Rueda, F.; Löwik, C.W.; Ossendorp, F. Targeting nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for efficient CD8+ T cell response: A comparative study. *J. Control. Release* **2014**, *192*, 209–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Siefert, A.L.; Caplan, M.J.; Fahmy, T.M. Artificial bacterial biomimetic nanoparticles synergize pathogen-associated molecular patterns for vaccine efficacy. *Biomaterials* **2016**, *97*, 85–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Kasturi, S.P.; Skountzou, I.; Albrecht, R.A.; Koutsonanos, D.; Hua, T.; Nakaya, H.I.; Ravindran, R.; Stewart, S.; Alam, M.; Kwissa, M.; et al. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* **2011**, *470*, 543–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. De Titta, A.; Ballester, M.; Julier, Z.; Nembrini, C.; Jeanbart, L.; Van Der Vlies, A.J.; Swartz, M.A.; Hubbell, J.A. Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 19902–19907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Lynn, G.M.; Laga, R.; Darrach, P.A.; Ishizuka, A.S.; Balaci, A.J.; Dulcey, A.E.; Pechar, M.; Pola, R.; Gerner, M.Y.; Yamamoto, A.; et al. In vivo characterization of the physicochemical properties of polymer-linked TLR agonists that enhance vaccine immunogenicity. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 1201–1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Ilyinskii, P.O.; Roy, C.J.; O’Neil, C.P.; Browning, E.A.; Pittet, L.A.; Altreuter, D.H.; Alexis, F.; Tonti, E.; Shi, J.; Basto, P.A.; et al. Adjuvant-carrying synthetic vaccine particles augment the immune response to encapsulated antigen and exhibit strong local immune activation without inducing systemic cytokine release. *Vaccine* **2014**, *32*, 2882–2895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Hanson, M.C.; Crespo, M.P.; Abraham, W.; Moynihan, K.D.; Szeto, G.L.; Chen, S.H.; Melo, M.B.; Mueller, S.; Irvine, D.J. Nanoparticulate STING agonists are potent lymph node—targeted vaccine adjuvants. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 2532–2546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Heit, A.; Schmitz, F.; Haas, T.; Busch, D.H.; Wagner, H. Antigen co-encapsulated with adjuvants efficiently drive protective T cell immunity. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 2063–2074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Shima, F.; Uto, T.; Akagi, T.; Akashi, M. Synergistic stimulation of antigen presenting cells via tlr by combining CpG ODN and Poly(g-glutamic acid)-based nanoparticles as vaccine adjuvants. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 926–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Bruno, C.; Agnolon, V.; Berti, F.; Bufali, S.; O’hagan, D.T.; Baudner, B.C. The preparation and characterization of PLG nanoparticles with an entrapped synthetic TLR7 agonist and their preclinical evaluation as adjuvant for an adsorbed DTaP vaccine. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *105*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Demento, S.L.; Bonafé, N.; Cui, W.; Kaech, S.M.; Caplan, M.J.; Fikrig, E.; Ledizet, M.; Fahmy, T.M. TLR9-Targeted Biodegradable Nanoparticles as Immunization Vectors Protect against West Nile Encephalitis. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 2989–2997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Hamdy, S.; Elamanchili, P.; Alshamsan, A.; Satou, T.; Samuel, J. Enhanced antigen-specific primary CD4+ and CD8+ responses by codelivery of ovalbumin and toll-like receptor ligand monophosphoryl lipid A in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2015**, *33*, 97–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Lee, C.K.; Lee, Y.R.; Lee, Y.H.; Kim, K.H.; Im, S.A. Induction of Potent Antigen-specific Cytotoxic T Cell Response by PLGA-nanoparticles Containing Antigen and TLR Agonist. *Immune. Netw.* **2013**, *13*, 30–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

78. Silva, J.M.; Zupancic, E.; Vandermeulen, G.; Oliveira, V.G.; Salgado, A.; Videira, M.; Gaspar, M.; Graca, L.; Pr at, V.; Florindo, H.F. In vivo delivery of peptides and Toll-like receptor ligands by mannose-functionalized polymeric nanoparticles induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immune responses in a melanoma model. *J. Control. Release* **2015**, *198*, 91–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Fischer, S.; Schlosser, E.; Mueller, M.; Csaba, N.; Merkle, H.P.; Groettrup, M.; Gander, B. Concomitant delivery of a CTL-restricted peptide antigen and CpG ODN by PLGA microparticles induces cellular immune response. *J. Drug Target.* **2009**, *17*, 652–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



  2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

REFERENCES

1. Pasteur L. De l'atténuation du virus du choléra des poules. *Comptes Rendus Séances Académie Sci.* 1880;91:673-680. c:%5CKARSTEN%5CPDFs%5CInfectiologie-PDFs%5CInfekt-1880%5CPasteur-De l'attenuation virus du cholera des poules.pdf.
 2. Pasteur L. Méthode pour prévenir la rage après morsure. *Comptes Rendus Séances Académie Sci.* 1885;101:765-772.
 3. Simon J. Emil Behring's medical culture: From disinfection to serotherapy. *Med Hist.* 2007;51(2):201-218. doi:10.1017/S0025727300001198.
 4. GLENNY AT, HOPKINS BE. Diphtheria Toxoid As an Immunizing Agent. *Br J Exp Pathol.* 1923;17(5):524-529. doi:10.2105/AJPH.24.1.22.
 5. Hannoun C. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(9):1085-1094. doi:10.1586/14760584.2013.824709.
 6. SALK JE, KRECH U, YOUNGNER JS, BENNETT BL, LEWIS LJ, BAZELEY PL. Formaldehyde treatment and safety testing of experimental poliomyelitis vaccines. *Am J Public Health.* 1954;44(5):563-570. doi:10.2105/AJPH.44.5.563.
 7. Human W-, Cells D, Plotkin SA, Farquhar JD, Katz M, Buser F. Attenuation of RA 27 / 3 Rubella Virus. *Am J Dis Child.* 1969;(Table 2).
 8. Hilleman M, Weibel R, Buynak E, Strokes J, Whitman J. Live, attenuated mumps-virus vaccine. IV. Protective efficacy as measured in a field evaluation. *N Engl J Med.* 1988;1244-1248. doi:10.1056/NEJM199401273300403.
 9. Hanley KA. The double-edged sword: How evolution can make or break a live-attenuated virus vaccine. *Evolution (N Y).* 2011;4(4):635-643. doi:10.1007/s12052-011-0365-y.The.
 10. Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. Vaccine-Derived Polioviruses and the Endgame Strategy for Global Polio Eradication. *Annu Rev Microbiol.* 2005;59(1):587-635. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123625.
 11. KAPIKIAN AZ, MITCHELL RH, CHANOCK RM, SHVEDOFF RA, STEWART CE. An Epidemiologic Study of Altered Clinical Reactivity To Respiratory Syncytial (Rs) Virus Infection in Children Previously Vaccinated With an Inactivated Rs Virus Vaccine. *Am J Epidemiol.* 1969;89(4):405-421. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a120954.
 12. Liljeqvist S, Ståhl S. Production of recombinant subunit vaccines: Protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnol.* 1999;73(1):1-33. doi:10.1016/S0168-1656(99)00107-8.
 13. Nascimento IP, Leite LCC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian J Med Biol Res.* 2012;45(12):1102-1111. doi:10.1590/S0100-879X2012007500142.
 14. Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature.* 1982;298(5872):347-350. doi:10.1038/298347a0.
 15. Vichnin M, Bonanni P, Klein NP, et al. An Overview of Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine Safety: 2006 to 2015. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(9):983-991. doi:10.1097/INF.0000000000000793.
 16. Monie A, Hung C-F, Roden R, Wu T-C. Cervarix™ : a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biol Targets Ther.* 2008;2(1):107-113. doi:10.2147/BTT.S1877.
 17. Moyle P, Toth I. Self-Adjuvanting Lipopeptide Vaccines. *Curr Med Chem.* 2008;15(5):506-516. doi:10.2174/092986708783503249.
 18. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol.* 2011;12(6):509-517. doi:10.1038/ni.2039.
 19. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(1):11-22. doi:10.1038/nrc1252.
 20. Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine.* 2010;28(SUPPL. 3):2-13. doi:10.1016/j.vaccine.2010.07.022.
-

21. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2012;11(11):723-737. doi:10.1038/nri3073.Protective.
22. Banchereau JFB. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18(18):767-811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
23. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science (80-)*. 2011;327(5966):656-661. doi:10.1126/science.1178331.Development.
24. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*. 2008;27(45):5932-5943. doi:10.1038/onc.2008.267.
25. Zinkernagel RM, Doherty PC. The discovery of MHC restriction. *Immunol Today*. 1997;18(1):14-17. doi:10.1016/S0167-5699(97)80008-4.
26. Duque GA, Descoteaux A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. 2014;5(OCT):1-12. doi:10.3389/fimmu.2014.00491.
27. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9(5):503-510. doi:10.1038/ni1582.
28. Kubach J, Becker C, Schmitt E, et al. Dendritic Cells: Sentinels of Immunity and Tolerance. *Int J Hematol*. 2005;81(3):197-203. doi:10.1532/IJH97.04165.
29. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev*. 2007;219(1):118-142. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00551.x.
30. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. ANTIGEN PRESENTATION AND TCELL STIMULATION BY DENDRITIC CELLS. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):621-667. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828.
31. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(1):41-52. doi:10.1016/j.cytogfr.2007.10.004.Dendritic.
32. Trombetta ES, Mellman I. Cell Biology of Antigen Processing in Vitro and in Vivo. *Annu Rev Immunol*. 2005;23(1):975-1028. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538.
33. Burgdorf S, Kurts C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(1):89-95. doi:10.1016/j.coi.2007.12.002.
34. Davis SJ, Ikemizu S, Evans EJ, Fugger L, Bakker TR, van der Merwe PA. The nature of molecular recognition by T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(3):217-224. doi:10.1038/ni0303-217.
35. Wan YY, Flavell R a. How Diverse — CD 4 Effector T Cells and their Functions. *J Mol Cell Biol*. 2009;1:20-36. doi:10.1093/jmcb/mjp001.
36. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-1569. doi:10.1182/blood-2008-05-078154.
37. Chaplin DD. Overview of immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:41. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980.Overview.
38. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity*. 2009;30(5):626-635. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.002.
39. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*. 2006;126(1):32-41. doi:10.1038/sj.jid.5700001.
40. Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annu Rev Immunol*. 2013;31(1):137-161. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095954.
41. Gutjahr A, Phelip C, Coolen A-L, et al. Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines 2016, Vol 4, Page 34*. 2016;4(4):34. doi:10.3390/VACCINES4040034.
42. Wawrzyniak M, Mahony LO, Akdis M. Role of Regulatory Cells in Oral Tolerance. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2017;9(2):107-115.

43. Weiner, Howard L., Piers da Cunah, Andre., Quintano, Franco., Wu H. Oral Tolerance. *Allergy*. 2007;241(1):1-5. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x.Oral.
44. Woodrow KA, Bennett KM, Lo DD. Mucosal Vaccine Design and Delivery. *Annu Rev Biomed Eng*. 2012;14(1):17-46. doi:10.1146/annurev-bioeng-071811-150054.
45. Ogra PL, Ogra SS. Local antibody response to poliovaccine in the human female genital tract. *J Immunol*. 1973;110(5):1307-1311. http://www.jimmunol.org.insb.bib.cnrs.fr/content/jimmunol/110/5/1307.full.pdf%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4633297.
46. Brokstad KA, Cox RJ, Olofsson J, Jonsson R, Haaheim LR. Parenteral influenza vaccination induces a rapid systemic and local immune response. *J Infect Dis*. 1995;171(1):198-203. doi:10.1093/infdis/171.1.198.
47. Scherpenisse M, Mollers M, Schepp RM, et al. Detection of systemic and mucosal HPV-specific IgG and IgA antibodies in adolescent girls one and two years after HPV vaccination. *Hum Vaccines Immunother*. 2013;9(2):314-321. doi:10.4161/hv.22693.
48. Cheng C, Pal S, Bettahi I, Oxford KL, Barry PA, Maza LM de la. Immunogenicity of a vaccine formulated with the Chlamydia trachomatis serovar F, native major outer membrane protein in a nonhuman primate model. *Vaccine*. 2011;29(18):3456-3464. doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.057.Immunogenicity.
49. Egan MA, Chong SY, Hagen M, et al. A comparative evaluation of nasal and parenteral vaccine adjuvants to elicit systemic and mucosal HIV-1 peptide-specific humoral immune responses in cynomolgus macaques. *Vaccine*. 2004;22(27-28):3774-3788. doi:10.1016/j.vaccine.2004.03.011.
50. Amorij JP, Hinrichs WLJ, Frijlink HW, Wilschut JC, Huckriede A. Needle-free influenza vaccination. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(10):699-711. doi:10.1016/S1473-3099(10)70157-2.
51. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*. 2005;11(4S):S45. doi:10.1038/nm1213.
52. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: Potential and limitations. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(8):592-605. doi:10.1038/nri3251.
53. Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, 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. doi:10.1016/j.immuni.2011.01.015.
54. Lewis DJM, Huo Z, Barnett S, 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):1-5. doi:10.1371/journal.pone.0006999.
55. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (80-)*. 1983;220(4599):868-871. doi:10.1126/science.6189183.
56. Preston BD, Poesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science (80-)*. 1988;242(4882):1168-1171. doi:10.1126/science.2460924.
57. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The Accuracy of Reverse Transcriptase. *Am Assoc Adv Sci*. 1988;242(4882):1171-1173.
58. Karlsson Hedestam GB, Fouchier RAM, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(2):143-155. doi:10.1038/nrmicro1819.
59. Barré-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy JF. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(12):877-883. doi:10.1038/nrmicro3132.
60. Coffin J, Swanstrom R. HIV pathogenesis: Dynamics and genetics of viral populations and infected cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(1). doi:10.1101/cshperspect.a012526.
61. Maartens G, Celum C, Lewin SR, Town C, Africa S. Seminar HIV infection : epidemiology , pathogenesis , treatment , and prevention. *Lancet*. 2014;384(9939):258-271. doi:10.1016/S0140-6736(14)60164-1.

62. Fowke KR, Nagelkerke NJD, Kimani J, et al. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet*. 1996;348(9038):1347-1351. doi:10.1016/S0140-6736(95)12269-2.
63. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, et al. HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1--Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication. *Clin Infect Dis*. 2005;41(7):1053-1056. doi:10.1086/433188.
64. Deeks SG, Walker BD. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity*. 2007;27(3):406-416. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.010.
65. Molina J-M, Capitant C, Spire B, et al. On-Demand Preexposure Prophylaxis in Men at High Risk for HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 2015;373(23):2237-2246. doi:10.1056/NEJMoa1506273.
66. JM M, G R, BA R, et al. Tenofovir-based preexposure prophylaxis for HIV infection among African women. *N Engl J Med*. 2015;372(6):509-518. doi:10.1021/nl061786n.Core-Shell.
67. Robinson HL. HIV/AIDS Vaccines: 2018. *Clin Pharmacol Ther*. 2018. doi:10.1002/cpt.1208.
68. Gao Y, Wijewardhana C, Mann JFS. Virus-like particle, liposome, and polymeric particle-based vaccines against HIV-1. *Front Immunol*. 2018;9(FEB):1-18. doi:10.3389/fimmu.2018.00345.
69. Supachai Rerks-Ngarm, M.D., Punnee Pitisuttithum, M.D., D.T.M.H., Sorachai Nitayaphan, M.D. PD, Jaranit Kaewkungwal, Ph.D., Joseph Chiu, M.D., Robert Paris, M.D., Nakorn Prem Sri, M.D., Chawetsan Namwat, M.D., Mark de Souza, Ph.D., Elizabeth Adams, M.D., Michael Benenson, M.D., Sanjay Gurunathan, M.D., Jim Tartaglia, Ph.D., John G. McNeil, M.D., Dona PD, Merlin L. Robb, M.D., Nelson L. Michael, M.D., Ph.D., Prayura Kunasol, M.D., and Jerome H. Kim, M.D. for the MI. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *N Engl J Med*. 2009;361(23):2209-2220. doi:10.1056/NEJMoa1603827.
70. Yamamoto H, Kawada M, Tsukamoto T, et al. Vaccine-based, long-term, stable control of simian/human immunodeficiency virus 89.6PD replication in rhesus macaques. *J Gen Virol*. 2007;88(2):652-659. doi:10.1099/vir.0.82469-0.
71. Fauci AS, Marovich MA, Dieffenbach CW, Eric Hunter, Buchbinder SP. Immune Activation with HIV Vaccines: Implications of the Adenovirus Vector Experience. *Science (80-)*. 2014;344(6179):49-51. doi:10.1126/science.1250672.Immune.
72. Gilbert PB, Peterson ML, Follmann D, et al. Correlation between immunologic responses to a recombinant glycoprotein 120 vaccine and incidence of HIV-1 infection in a phase 3 HIV-1 preventive vaccine trial. *J Infect Dis*. 2005;191(August):666-677. doi:10.1086/428405.
73. Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, 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. *J Infect Dis*. 2006;194(12):1661-1671. doi:10.1086/508748.
74. Susan P. Buchbinder DVM, Duerr A, Fitzgerald DW, 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 infect Dis*. 2008;372(9653):1881-1893. doi:10.1016/S0140-6736(08)61591-3.Correspondence.
75. Gray G, Allen M, Moodie Z, et al. Safety and efficacy assessment of the HVTN 503/Phambili Study: A double-blind randomized placebo-controlled test-of-concept study of a Clade B-based HIV-1 vaccine in South Africa. *Lancet infect Dis*. 2011;11(7):507-515. doi:10.1088/1367-2630/15/1/015008.Fluid.
76. Auclair S, Liu F, Niu Q, et al. Distinct susceptibility of HIV vaccine vector-induced CD4 T cells to HIV infection. *PLoS Pathog*. 2018;14(2):1-26. doi:10.1371/journal.ppat.1006888.
77. Robb ML, Rerks-Ngarm S, Nitayaphan S, et al. Risk behaviour and time as covariates for efficacy of the HIV vaccine regimen ALVAC-HIV (vCP1521) and AIDSVAX B/E: A post-hoc analysis of the Thai phase 3 efficacy trial RV 144. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(7):531-537. doi:10.1016/S1473-3099(12)70088-9.
78. Karasavvas N, Billings E, Rao M, et al. The Thai Phase III HIV Type 1 Vaccine Trial (RV144) Regimen Induces Antibodies That Target Conserved Regions Within the V2 Loop of gp120. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(11):1444-1457. doi:10.1089/aid.2012.0103.

79. Bonsignori M, Pollara J, Moody MA, et al. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity-Mediating Antibodies from an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial Target Multiple Epitopes and Preferentially Use the VH1 Gene Family. *J Virol*. 2012;86(21):11521-11532. doi:10.1128/JVI.01023-12.
80. Sievers SA, Scharf L, West AP, Bjorkman PJ. Antibody engineering for increased potency, breadth and half-life. *Curr Opin HIV AIDS*. 2015;10(3):151-159. doi:10.1097/COH.000000000000148.
81. McCurley NP, Domi A, Basu R, et al. HIV transmitted/founder vaccines elicit autologous tier 2 neutralizing antibodies for the CD4 binding site. *PLoS One*. 2017;12(10):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0177863.
82. Shen X, Basu R, Sheetal S, et al. HIV-1 gp120 and Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) gp140 Boost Immunogens Increase Immunogenicity of a DNA/MVA HIV-1 Vaccine. *J Virol*. 2017;91(24):1077-17. doi:10.1128/JVI.01077-17.
83. Seaman MS, Janes H, Hawkins N, et al. Tiered Categorization of a Diverse Panel of HIV-1 Env Pseudoviruses for Assessment of Neutralizing Antibodies. *J Virol*. 2010;84(3):1439-1452. doi:10.1128/JVI.02108-09.
84. Buchbinder SP, Grunenberg NA, Sanchez BJ, et al. Immunogenicity of a novel Clade B HIV-1 vaccine combination: Results of phase 1 randomized placebo controlled trial of an HIV-1 GM-CSF-expressing DNA prime with a modified vaccinia Ankara vaccine boost in healthy HIV-1 uninfected adults. *PLoS One*. 2017;12(7):1-24. doi:10.1371/journal.pone.0179597.
85. Moog C, Dereuddre-Bosquet N, Teillaud J-L, et al. Protective effect of vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques. *Mucosal Immunol*. 2014;7(1):46-56. doi:10.1038/mi.2013.23.
86. Liu P, Yates NL, Shen X, et al. Infectious Virion Capture by HIV-1 gp120-Specific IgG from RV144 Vaccinees. *J Virol*. 2013;87(14):7828-7836. doi:10.1128/JVI.02737-12.
87. Burton DR, Hessel AJ, Keele BF, et al. Limited or no protection by weakly or nonneutralizing antibodies against vaginal SHIV challenge of macaques compared with a strongly neutralizing antibody. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(27):11181-11186. doi:10.1073/pnas.1103012108.
88. Lewis GK, Pazgier M, Devico AL. Survivors Remorse : antibody- - mediated protection against. 2017;275(1):271-284. doi:10.1111/imr.12510.
89. Wyatt LS, Belyakov IM, Earl PL, Berzofsky JA, Moss B. Enhanced cell surface expression, immunogenicity and genetic stability resulting from a spontaneous truncation of HIV Env expressed by a recombinant MVA. *Virology*. 2008;372(2):260-272. doi:10.1021/nn300902w.Release.
90. Egan M, Carruth LM, Rowell JF, Yu X, Siliciano RF. Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *J Virol*. 1996;70(10):6547-6556.
91. Sanders RW, Derking R, Cupo A, et al. A Next-Generation Cleaved, Soluble HIV-1 Env Trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, Expresses Multiple Epitopes for Broadly Neutralizing but Not Non-Neutralizing Antibodies. *PLoS Pathog*. 2013;9(9). doi:10.1371/journal.ppat.1003618.
92. Sanders RW, Moore JP. Native-like Env trimers as a platform for HIV-1 vaccine design. *Immunol Rev*. 2017;275(1):161-182. doi:10.1111/imr.12481.
93. Ringe RP, Sanders RW, Yasmeen A, et al. Cleavage strongly influences whether soluble HIV-1 envelope glycoprotein trimers adopt a native-like conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(45):18256-18261. doi:10.1073/pnas.1314351110.
94. Torrents de la Peña A, Sanders RW. Stabilizing HIV-1 envelope glycoprotein trimers to induce neutralizing antibodies. *Retrovirology*. 2018;15(1):63. doi:10.1186/s12977-018-0445-y.
95. Sanders RW, van Gils MJ, Derking R, et al. HIV-1 neutralizing antibodies induced by native-like envelope trimers. *Science (80-)*. 2015;(JUNE):science.aac4223-. doi:10.1126/science.aac4223.
96. Bricault CA, Kovacs JM, Badamchi-Zadeh A, et al. Neutralizing Antibody Responses following Long-Term Vaccination with HIV-1 Env gp140 in Guinea Pigs. *J Virol*. 2018;92(13):e00369-18.

doi:10.1128/JVI.00369-18.

97. Alam SM, Liao H-X, Tomaras GD, et al. Antigenicity and Immunogenicity of RV144 Vaccine AIDSVAX Clade E Envelope Immunogen Is Enhanced by a gp120 N-Terminal Deletion. *J Virol.* 2013;87(3):1554-1568. doi:10.1128/JVI.00718-12.
98. Bradley T, Pollara J, Santra S, et al. Pentavalent HIV-1 vaccine protects against simian-human immunodeficiency virus challenge. *Nat Commun.* 2017;8:1-15. doi:10.1038/ncomms15711.
99. Xu K, Acharya P, Kong R, et al. Epitope-based vaccine design yields fusion peptide-directed antibodies that neutralize diverse strains of HIV-1. *Nat Med.* 2018;24(6):857-867. doi:10.1038/s41591-018-0042-6.
100. Jardine JG, Kulp DW, Havenar-Daughton C, et al. HIV-1 broadly neutralizing antibody precursor B cells revealed by germline-targeting immunogen. *Science (80-).* 2016;351(6280):1458-1463. doi:10.1126/science.aad9195.HIV-1.
101. Jardine J, Julien J, Menis S, et al. Rational HIV immunogen design to target specific germline B cell receptors. *Science (80-).* 2013;340(6133):711-716. doi:10.1126/science.1234150.Rational.
102. Liao H, Lynch R, Zhou T, et al. Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature.* 2013;496(7446):469-476. doi:10.1038/nature12053.Co-evolution.
103. Bonsignori M, Zhou T, Sheng Z, et al. Maturation Pathway from Germline to Broad HIV-1 Neutralizer of a CD4-Mimic Antibody. *Cell.* 2017;165(2):449-463. doi:10.1016/j.cell.2016.02.022.Maturation.
104. Mascola JR, Snyder SW, Weislow OS, et al. Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluati. *J Infect Dis.* 1996;173(2):340-348.
105. Trovato M, D'Apice L, Prisco A, De Berardinis P. HIV vaccination: A roadmap among advancements and concerns. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1-14. doi:10.3390/ijms19041241.
106. Sanders RW, Schiffner L, Master A, et al. Variable-loop-deleted variants of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein can be stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits. *J Virol.* 2000;74(11):5091-5100. doi:10.1128/JVI.74.11.5091-5100.2000.
107. Binley JM, Sanders RW, Clas B, et al. A Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Complex Stabilized by an Intermolecular Disulfide Bond between the gp120 and gp41 Subunits Is an Antigenic Mimic of the Trimeric Virion-Associated Structure. *J Virol.* 2000;74(2):627-643. doi:10.1128/JVI.74.2.627-643.2000.
108. Sanders RW, Vesanen M, Schuelke N, et al. Stabilization of the Soluble , Cleaved , Trimeric Form of the Envelope Glycoprotein Complex of Human Immunodeficiency Virus Stabilization of the Soluble , Cleaved , Trimeric Form of the Envelope Glycoprotein Complex of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol.* 2002;76(17):8875-8889. doi:10.1128/JVI.76.17.8875.
109. Walker LM, Phogat SK, Wagner D, et al. Broad and Potent Neutralizing Antibodies from an African Donor Reveal a New HIV-1 Vaccine Target. *Science (80-).* 2009;326(5950):285-289. doi:10.1126/science.1178746.Broad.
110. Wu X, Yang Z, Li Y, et al. Rational Design of Envelope Identifies Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to HIV-1. *Science (80-).* 2010;329(5993):856-861. doi:10.1126/science.1187659.Rational.
111. Burton DR, Hangartner L. Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design. *Annu Rev Immunol.* 2016;34(4):412-426. doi:10.1017/S1092852915000371.Neuroimaging.
112. Geller R, Domingo-Calap P, Cuevas JM, Rossolillo P, Negroni M, Sanjuán R. The external domains of the HIV-1 envelope are a mutational cold spot. *Nat Commun.* 2015;6:1-9. doi:10.1038/ncomms9571.
113. Deml L, Speth C, Dierich MP, Wolf H, Wagner R. Recombinant HIV-1 Pr55 gag virus-like particles: Potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Mol Immunol.* 2005;42(2):259-277. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.028.
114. Jaffray A, Shephard E, Harmelen J van, Williamson C, Williamson A-L, Rybicki EP. Human immunodeficiency virus type 1 subtype C Gag virus-like particle boost substantially improves the

- immune response to a subtype C gag DNA vaccine in mice. *J Gen Virol.* 2004;85(2):409-413. doi:10.1099/vir.0.19396-0.
115. Doan LX, Li M, Chen C, Yao Q. Virus-like particles as HIV-1 vaccines. *Rev Med Virol.* 2005;15(2):75-88. doi:10.1002/rmv.449.
 116. Addo MM, Yu XG, Rathod A, et al. Comprehensive Epitope Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific T-Cell Responses Directed against the Entire Expressed HIV-1 Genome Demonstrate Broadly Directed Responses, but No Correlation to Viral Load. *J Virol.* 2003;77(3):2081-2092. doi:10.1128/JVI.77.3.2081-2092.2003.
 117. Novitsky V, Cao H, Rybak N, et al. Magnitude and Frequency of Cytotoxic T-Lymphocyte Responses : Identification of Immunodominant Regions of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C. *J Virol.* 2002;76(20):10155-10168. doi:10.1128/JVI.76.20.10155.
 118. Yu XG, Shang H, Addo MM, et al. Important contribution of p15 Gag-specific CTL responses to the total Gag-specific CTL responses. 2002;(October 2001).
 119. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, et al. CD8+T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med.* 2007;13(1):46-53. doi:10.1038/nm1520.
 120. Radebe M, Gounder K, Mokgoro M, et al. Broad and persistent Gag-specific CD8+ T-cell responses are associated with viral control but rarely drive viral escape during primary HIV-1 infection. *AIDS.* 2015;29(1):23-33. doi:10.1097/QAD.0000000000000508.Broad.
 121. Mann JK, Ndung'u T. HIV-1 vaccine immunogen design strategies. *Virol J.* 2015;12(1):6-8. doi:10.1186/s12985-014-0221-0.
 122. Dorfman T, Mammano F, Haseltine WA, Gottlinger HG. Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol.* 1994;68(3):1689-1696. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8107229.
 123. Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature.* 1993;365(6447):666-669. doi:10.1038/365666a0.
 124. Fiorentini S, Giagulli C, Caccuri F, Magiera AK, Caruso A. HIV-1 matrix protein p17: A candidate antigen for therapeutic vaccines against AIDS. *Pharmacol Ther.* 2010;128(3):433-444. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.08.005.
 125. Caccuri F, Marsico S, Fiorentini S, Caruso A, Giagulli C. HIV-1 Matrix Protein p17 and its Receptors. *Curr Drug Targets.* 2015;17(1):23-32. doi:10.2174/1389450116666150825110840.
 126. Buratti E, Tisminetzky SG, D'Agaro P, Baralle FE. A neutralizing monoclonal antibody previously mapped exclusively on human immunodeficiency virus type 1 gp41 recognizes an epitope in p17 sharing the core sequence IEEE. *J Virol.* 1997;71(3):2457-2462.
 127. Papsidero LD, Sheu M, Ruscetti FW. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibodies which react with p17 core protein: characterization and epitope mapping. *J Virol.* 1989;63(1):267-272.
 128. Muster T, Steindl F, Purtscher M, et al. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1993;67(11):6642-6647. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=238102&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 129. Muster T, Guinea R, Trkola a, et al. Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS. *J Virol.* 1994;68(6):4031-4034.
 130. Verrier B, Paul S, Terrat C, et al. Exploiting natural cross-reactivity between human immunodeficiency virus (HIV)-1 p17 protein and anti-gp41 2F5 antibody to induce HIV-1 neutralizing responses in vivo. *Front Immunol.* 2017;8(JUN):1-8. doi:10.3389/fimmu.2017.00770.
 131. Wolf FDE, Goudsmit J, Lange JMA, et al. Risk of AIDS related complex and AIDS in homosexual men with

- persistent HIV antigenaemia. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987;295(6598):569-572. doi:10.1136/bmj.295.6598.569.
132. Cheingsong-popov R, Panagiotidi C, Bowcock S, Aronstam A, Wadsworth J, Weber J. Relation between humoral responses to HIV gag and env proteins at seroconversion and clinical outcome of HIV infection. *BMJ*. 1989;302:1989-1992.
 133. Dyer WB, Kuipers H, Coolen MW, et al. Correlates of Antiviral Immune Restoration in Acute and Chronic HIV Type 1 Infection: Sustained Viral Suppression and Normalization of T Cell Subsets. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18(14):999-1010. doi:10.1089/08892220260235362.
 134. Lee TH, Essex M, Novitsky V, et al. Association between virus-specific T-cell responses and plasma viral load in human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol*. 2003;77(2):882-890. doi:10.1128/JVI.77.2.882.
 135. Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3(March):1-13. doi:10.3389/fcimb.2013.00013.
 136. Mishra B, Patel BB, Tiwari S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2010;6(1):9-24. doi:10.1016/j.nano.2009.04.008.
 137. Gelperina S, Kisich K, Iseman MD, Heifets L. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(12):1487-1490. doi:10.1164/rccm.200504-613PP.
 138. Malyala P, Singh M. Micro/Nanoparticle Adjuvants: Preparation and Formulation with Antigens. *Methods Mol Biol*. 2010;626:91-101. doi:10.1007/978-1-60761-585-9.
 139. Esparza I, Kissel T. Parameters affecting the immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid. *Vaccine*. 1992;10(10):714-720. doi:10.1016/0264-410X(92)90094-Z.
 140. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010;75(1):1-18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
 141. Hans M., Lowman A. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2002;6(4):319-327. doi:10.1016/S1359-0286(02)00117-1.
 142. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol*. 2009;86(3):215-223. doi:10.1016/j.yexmp.2008.12.004.
 143. Grislain L, Couvreur P, Lenaerts V, Roland M, Deprez-Decampeneere D, Speiser P. Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier. *Int J Pharm*. 1983;15(3):335-345. doi:10.1016/0378-5173(83)90166-7.
 144. Noble GT, Stefanick JF, Ashley JD, Kiziltepe T, Bilgicer B. Ligand-targeted liposome design: Challenges and fundamental considerations. *Trends Biotechnol*. 2014;32(1):32-45. doi:10.1016/j.tibtech.2013.09.007.
 145. Torchilin V. Intracellular delivery of protein and peptide therapeutics. *Drug Discov Today Technol*. 2009;5(2-3). doi:10.1016/j.ddtec.2009.01.002.
 146. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatsky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today*. 2010;15(1-2):40-56. doi:10.1016/j.drudis.2009.10.009.
 147. Lettiero B, Andersen AJ, Hunter AC, Moghimi SM. Complement system and the brain: Selected pathologies and avenues toward engineering of neurological nanomedicines. *J Control Release*. 2012;161(2):283-289. doi:10.1016/j.jconrel.2011.10.036.
 148. Thomasin C, Corradin G, Men Y, Merkle HP, Gander B. Tetanus toxoid and synthetic malaria antigen containing poly(lactide)/poly(lactide-co-glycolide) microspheres: Importance of polymer degradation and antigen release for immune response. *J Control Release*. 1996;41(1-2):131-145. doi:10.1016/0168-3659(96)01363-6.
 149. Pavot V, Berthet M, Rességuier J, et al. Poly(lactic acid) and poly(lactic- co -glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine*. 2014;9(17):2703-2718. doi:10.2217/nnm.14.156.
-

150. Hotaling NA, Tang L, Irvine DJ, Babensee JE. Biomaterial Strategies for Immunomodulation. *Annu Rev Biomed Eng.* 2015;17:317-349. doi:10.1146/annurev-bioeng-071813-104814.
151. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(SUPPL.):72-82. doi:10.1016/j.addr.2012.09.004.
152. Zweers MLT, Engbers GHM, Grijpma DW, Feijen J. In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide). *J Control Release.* 2004;100(3):347-356. doi:10.1016/j.jconrel.2004.09.008.
153. Nandedkar TD. Nanovaccines: Recent developments in vaccination. *J Biosci.* 2009;34(6):995-1003. doi:10.1007/s12038-009-0114-3.
154. Peek LJ, Middaugh RC, Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:915-928. doi:10.1007/978-3-319-00978-0_19.
155. Zhao L, Seth A, Wibowo N, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine.* 2014;32(3):327-337. doi:10.1016/j.vaccine.2013.11.069.
156. Westwood A, Healey GD, Williamson ED, Eyles JE. Activation of dendritic cells by microparticles containing Bacillus anthracis protective antigen. *Vaccine.* 2005;23(29):3857-3863. doi:10.1016/j.vaccine.2004.11.079.
157. Rancan F, Amselgruber S, Hadam S, et al. Particle-based transcutaneous administration of HIV-1 p24 protein to human skin explants and targeting of epidermal antigen presenting cells. *J Control Release.* 2014;176:115-122. doi:10.1016/j.jconrel.2013.12.022.
158. Guillon C, Mayol K, Terrat C, 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;25:7491-7501. doi:10.1016/j.vaccine.2007.08.060.
159. Lamalle-Bernard D, Munier S, Compagnon C, et al. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J Control Release.* 2006;115(1):57-67. doi:10.1016/j.jconrel.2006.07.006.
160. Pavot V, Rochereau N, Primard C, et al. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J Control Release.* 2013;167:60-67. doi:10.1016/j.jconrel.2013.01.015.
161. Pavot V, Climent N, Rochereau N, et al. Directing vaccine immune responses to mucosa by nanosized particulate carriers encapsulating NOD ligands. *Biomaterials.* 2016;75:327-339. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.034.
162. Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, et al. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature.* 2011;470(7335):543-547. doi:10.1038/nature09737.
163. Baxendale AJ, Hooff P Van, Durrant LG, et al. Single shot tetanus vaccine manufactured by a supercritical fluid encapsulation technology. *Int J Pharm.* 2011;413(1-2):147-154. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.04.053.
164. Raghuvanshi RS, Katare YK, Lalwani K, Ali MM, Singh O, Panda AK. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *Int J Pharm.* 2002;245:109-121.
165. Johansen P, Estevez F, Zurbriggen R, et al. Towards clinical testing of a single-administration tetanus vaccine based on PLA / PLGA microspheres. *Vaccine.* 2001;19:1047-1054.
166. Coombes AGA, Major D, Wood JM, Hockley DJ, Minor PD, Davis SS. Resorbable lamellar particles of polylactide as adjuvants for influenza virus vaccines. *Biomaterials.* 1998;19:1073-1081.
167. Lv S, Wang J, Dou S, et al. Nanoparticles Encapsulating Hepatitis B Virus Cytosine-Phosphate-Guanosine Induce Therapeutic Immunity against HBV Infection. *Hepatology.* 2013:385-394. doi:10.1002/hep.26654.
168. Peppas NA. Hydrogels and drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 1997;2(5):531-537. doi:10.1016/S1359-0294(97)80103-3.

169. Buwalda SJ, Boere KWM, Dijkstra PJ, Feijen J, Vermonden T, Hennink WE. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *J Control Release*. 2014;190:254-273. doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.052.
170. Nguyen QV, Huynh DP, Park JH, Lee DS. Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: A review. *Eur Polym J*. 2015;72:602-619. doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.03.016.
171. Ruel-Gariépy E, Leroux JC. In situ-forming hydrogels - Review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;58(2):409-426. doi:10.1016/j.ejpb.2004.03.019.
172. Johnson A, Sprangers A, Cassidy P, et al. Design and Validation of a Thermoreversible Material for Percutaneous Tissue Hydrodissection. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(8):1400-1409. doi:10.1021/nl061786n.Core-Shell.
173. Song KJ, Lee HM, Lee EJ, Kwon JH, Jo KH, Kim KS. Anti-adhesive effect of a thermosensitive poloxamer applied after the removal of nasal packing in endoscopic sinus surgery: A randomised multicentre clinical trial. *Clin Otolaryngol*. 2013;38(3):225-230. doi:10.1111/coa.12117.
174. Wimmer-Greinecker G, Bouchot O, Verhoye JP, et al. Randomized clinical trial comparing a thermosensitive polymer (LeGoo) with conventional vessel loops for temporary coronary artery occlusion during off-pump coronary artery bypass surgery. *Ann Thorac Surg*. 2011;92(6):2177-2183. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.07.003.
175. Cespi M, Bonacucina G, Pucciarelli S, et al. Evaluation of thermosensitive poloxamer 407 gel systems for the sustained release of estradiol in a fish model. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;88(3):954-961. doi:10.1016/j.ejpb.2014.08.008.
176. Jansen MPM, Verzijl JM, Burger DM, Hekster YA. Controlled release of morphine from a poloxamer 407 gel. *Int J Pharm*. 2013;452(1-2):266-269. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.05.032.
177. Veyries ML, Couaraze G, Geiger S, et al. Controlled release of vancomycin from Poloxamer 407 gels. *Int J Pharm*. 1999;192(2):183-193. doi:10.1016/S0378-5173(99)00307-5.
178. Thakur RRS, McMillan HL, Jones DS. Solvent induced phase inversion-based in situ forming controlled release drug delivery implants. *J Control Release*. 2014;176(1):8-23. doi:10.1016/j.jconrel.2013.12.020.
179. Schmolka IR. Artificial Skin I. Preparation and Properties of Pluronic F-127 Gels for Treatment of Burns. *J Biomed Mater Res*. 1972;6:571-582.
180. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res*. 2006;23(12):2709-2728. doi:10.1007/s11095-006-9104-4.
181. Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci*. 2006;9(3):339-358.
182. Lu C, Liu M, Fu H, et al. Novel thermosensitive in situ gel based on poloxamer for uterus delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2015;77:24-28. doi:10.1016/j.ejps.2015.05.014.
183. Wei G, Xu H, Ding PT, Li SM, Zheng JM. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: The rheological and gamma scintigraphic studies. *J Control Release*. 2002;83(1):65-74. doi:10.1016/S0168-3659(02)00175-X.
184. Lagarce F, Faisant N, Desfontis JC, et al. Baclofen-loaded microspheres in gel suspensions for intrathecal drug delivery: In vitro and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;61(3):171-180. doi:10.1016/j.ejpb.2005.04.004.
185. Jeong B, Wan S, Han Y. Thermosensitive sol – gel reversible hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54:37-51. doi:10.1016/j.addr.2012.09.012.
186. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm*. 1989;55(1):1-4. doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0.
187. Duhr S, Braun D. Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(52):19678-19682. doi:10.1073/pnas.0603873103.

188. Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, Baaske P, Duhr S. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol.* 2011;9(4):342-353. doi:10.1089/adt.2011.0380.
 189. Knudsen NPH, Olsen A, Buonsanti C, et al. Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens. *Sci Rep.* 2016;6(December 2015):1-13. doi:10.1038/srep19570.
 190. Pérez-Campaña C, Gómez-Vallejo V, Puigivila M, et al. Biodistribution of different sized nanoparticles assessed by positron emission tomography: A general strategy for direct activation of metal oxide particles. *ACS Nano.* 2013;7(4):3498-3505. doi:10.1021/nn400450p.
 191. Lee MJE, Veisheh O, Bhattarai N, et al. Rapid pharmacokinetic and biodistribution studies using choleroxin-conjugated iron oxide nanoparticles: A novel non-radioactive method. *PLoS One.* 2010;5(3):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0009536.
 192. Liu Y, Tseng Y, Huang L. Biodistribution Studies of Nanoparticles Using Fluorescence. *Pharm Res.* 2013;29(12):3273-3277. doi:10.1007/s11095-012-0818-1.Biodistribution.
 193. Kumar R, Roy I, Ohulchanskyy T, Vathy L. In vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles. *ACS Nano.* 2010;4(2):699-708. doi:10.1021/nn901146y.In.
 194. Stuker F, Ripoll J, Rudin M. Fluorescence molecular tomography: Principles and potential for pharmaceutical research. *Pharmaceutics.* 2011;3(2):229-274. doi:10.3390/pharmaceutics3020229.
 195. Ding Y, Liu J, Lu S, et al. Self-assembling peptide for co-delivery of HIV-1 CD8+ T cells epitope and Toll-like receptor 7/8 agonists R848 to induce maturation of monocyte derived dendritic cell and augment polyfunctional cytotoxic T lymphocyte (CTL) response. *J Control Release.* 2016;236:22-30. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.019.
 196. Heyndrickx L, Heath A, Sheik-Khalil E, et al. International network for comparison of HIV neutralization assays: The NeutNet report. *PLoS One.* 2012;4(2). doi:10.1371/journal.pone.0004505.
 197. Ren W, Mumbauer A, Gettie A, et al. Generation of Lineage-Related, Mucosally Transmissible Subtype C R5 Simian-Human Immunodeficiency Viruses Capable of AIDS Development, Induction of Neurological Disease, and Coreceptor Switching in Rhesus Macaques. *J Virol.* 2013;87(11):6137-6149. doi:10.1128/JVI.00178-13.
 198. Cohen YZ, Lorenzi JCC, Seaman MS, et al. Neutralizing activity of broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies against clade B clinical isolates produced in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol.* 2017;92(5):JVI.01883-17. doi:10.1128/JVI.01883-17.
 199. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-384. doi:10.1038/ni.1863.
 200. Geddes K, Magalhães JG, Girardin SE. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(6):465-479. doi:10.1038/nrd2783.
 201. Khan S, Bijker MS, Weterings JJ, et al. Distinct uptake mechanisms but similar intracellular processing of two different toll-like receptor ligand-peptide conjugates in dendritic cells. *J Biol Chem.* 2007;282(29):21145-21159. doi:10.1074/jbc.M701705200.
 202. Reddy ST, Swartz MA, Hubbell JA. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol.* 2006;27(12):573-579. doi:10.1016/j.it.2006.10.005.
 203. Hafner AM, Corthésy B, Merkle HP. Particulate formulations for the delivery of poly(I:C) as vaccine adjuvant. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(10):1386-1399. doi:10.1016/j.addr.2013.05.013.
 204. Schlosser E, Mueller M, Fischer S, et al. TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses. *Vaccine.* 2008;26(13):1626-1637. doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.030.
 205. Fievez V, Plapied L, des Rieux A, et al. Targeting nanoparticles to M cells with non-peptidic ligands for oral vaccination. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;73(1):16-24. doi:10.1016/j.ejpb.2009.04.009.
 206. Nair-Gupta P, Baccarini A, Tung N, et al. TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell.* 2014;158(3):506-521. doi:10.1016/j.cell.2014.04.054.
-

207. Jiménez-Sánchez G, Pavot V, Chane-Haong C, et al. Preparation and in vitro evaluation of imiquimod loaded polylactide-based micelles as potential vaccine adjuvants. *Pharm Res.* 2015;32(1):311-320. doi:10.1007/s11095-014-1465-5.
208. Magalhaes JG, Fritz JH, Le Bourhis L, et al. Nod2-Dependent Th2 Polarization of Antigen-Specific Immunity. *J Immunol.* 2008;181(11):7925-7935. doi:10.4049/jimmunol.181.11.7925.
209. Brault PA, Kariapper MST, Pham C V., et al. Protein micelles from lipoxygenase 3. *Biomacromolecules.* 2002;3(4):649-654. doi:10.1021/bm010149i.
210. Nelson PH, Rutledge GC, Hatton A. On the size and shape of assemblies micelles. *J Chem Phys.* 1997;107(June):10777-10781.
211. Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, BAuduin P, Speiser P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J Pharm Pharmacol.* 1979;31(1):331-332. doi:10.1111/j.2042-7158.1979.tb13510.x.
212. Chernenko T, Matthaeus C, Milane L, Quintero L, Amiji M, Diem M. Label-Free Raman Spectral Imaging of Intracellular Delivery and Degradation of Polymeric Nanoparticle Systems. *ACS Nano.* 2009;3(11):3552-3559. doi:10.1021/nn9010973.
213. Nanaki SG, Pantopoulos K, Bikiaris DN. Synthesis of biocompatible poly(e-caprolactone)- block-poly(propylene adipate) copolymers appropriate for drug nanoencapsulation in the form of core-shell nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:2981-2995. doi:10.2147/IJN.S26568.
214. Handké N, Lahaye V, Bertin D, et al. Elaboration of glycopolymer-functionalized micelles from an N-vinylpyrrolidone/lactide-based reactive copolymer platform. *Macromol Biosci.* 2013;13(9):1213-1220. doi:10.1002/mabi.201300102.
215. Handké N, Ficheux D, Rollet M, et al. Lysine-tagged peptide coupling onto polylactide nanoparticles coated with activated ester-based amphiphilic copolymer: A route to highly peptide-functionalized biodegradable carriers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2013;103:298-303. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.10.032.
216. Le Garrec D, Gori S, Luo L, et al. Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(d,l-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: In vitro and in vivo evaluation. *J Control Release.* 2004;99(1):83-101. doi:10.1016/j.jconrel.2004.06.018.
217. Kwon GS, Okano T. Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996;21(2):107-116. doi:10.1016/S0169-409X(96)00401-2.
218. Jones M-C, Leroux J-C. Polymeric micelles—a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm.* 1999;48(2):101-111. doi:10.1016/S0939-6411(99)00039-9.
219. Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, Kadam V. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2010;6(6):714-729. doi:10.1016/j.nano.2010.05.005.
220. Yokoyama M. Clinical Applications of Polymeric Micelle Carrier Systems in Chemotherapy and Image Diagnosis of Solid Tumors. *J Exp Clin Med.* 2011;3(4):151-158. doi:10.1016/j.jecm.2011.06.002.
221. Yang Y, Kuang Y, Liu Y, et al. Immunogenicity of multiple-epitope antigen gene of HCV carried by novel biodegradable polymers. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2011;34(1):65-72. doi:10.1016/j.cimid.2010.02.003.
222. Boudier A, Aubert-Pouëssel A, Mebarek N, et al. Development of tripartite polyion micelles for efficient peptide delivery into dendritic cells without altering their plasticity. *J Control Release.* 2011;154(2):156-163. doi:10.1016/j.jconrel.2011.05.016.
223. Dane KY, Nembrini C, Tomei AA, et al. Nano-sized drug-loaded micelles deliver payload to lymph node immune cells and prolong allograft survival. *J Control Release.* 2011;156(2):154-160. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.009.
224. Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P, Bachmann MF. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol.* 2008;38(5):1404-1413. doi:10.1002/eji.200737984.