



**HAL**  
open science

# Etude de la délivrance d'antigènes dans les voies aériennes en utilisant des nanoparticules de maltodextrine lipidées

François Fasquelle

► **To cite this version:**

François Fasquelle. Etude de la délivrance d'antigènes dans les voies aériennes en utilisant des nanoparticules de maltodextrine lipidées. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2020. Français. NNT : 2020LILUS024 . tel-03331396

**HAL Id: tel-03331396**

**<https://theses.hal.science/tel-03331396>**

Submitted on 1 Sep 2021

**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.



**Inserm**



## **Université Lille 2 Droit et Santé**

Ecole doctorale Biologie-Santé de Lille

### **THESE CIFRE**

Pour l'obtention du grade de

### **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

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

Présentée et soutenue publiquement par

**François FASQUELLE**

Le 21 Décembre 2020

**Etude de la délivrance d'antigènes dans les voies aériennes en utilisant  
des nanoparticules de maltodextrine lipidées**

**Composition du jury :**

**Président: Pr Patrick MIDOUX - Université d'Orléans**

**Rapporteurs : Pr Hervé HILLAIREAU - Université Paris-Saclay, Institut Galien Paris-Saclay  
Pr Chantal PICHON - Université d'Orléans**

**Examineurs : Pr Philippe LOISEAU - Université Paris-Saclay  
Dr Laurent DUBUQUOY - Université de Lille**

**Directeur de Thèse : Pr Didier BETBEDER - Université de Lille - VAXINANO**

**TABLE DES MATIERES**

TABLE DES MATIERES.....	1
REMERCIEMENTS .....	2
LISTE DES PUBLICATIONS .....	4
LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....	9
PREAMBULE - OBJECTIFS .....	14
RESUME.....	16
ABSTRACT.....	19
PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE .....	22
1. Nanoparticules et Nanomédecine .....	23
1.1. Les nanoparticules .....	23
1.2. La nanomédecine .....	26
1.3. Les nanoparticules utilisées en nanomédecine.....	28
1.4. Endocytose des NPs .....	42
1.5. Génération de NPs / ciblage .....	51
1.6. Conclusion intermédiaire.....	55
2. Les nanoparticules pour délivrer des vaccins par voie muqueuse .....	57
2.1. Principes généraux sur la vaccination .....	57
2.2. Influence de la voie d'administration.....	63
2.3. Intérêt des nanoparticules dans la voie muqueuse.....	80
PARTIE II: RESULTATS .....	114
Première étude: Importance of the Phospholipid Core for Mucin Hydrogel Penetration and Mucosal Cell Uptake of Maltodextrin Nanoparticles .....	115
Seconde étude: Cationic and reticulated maltodextrine NPs act as a pure delivery system, to enhance the antigens immunogenicity toward airway immune cells. .	125
PARTIE III : DISCUSSION GENERALE.....	147
PARTIE IV : CONCLUSION .....	172
Bibliographie .....	175

## REMERCIEMENTS

*Je souhaite adresser mes remerciements les plus profonds à toutes les personnes qui m'ont soutenu durant ces années de travail passionnant.*

*Je remercie tout d'abord le Professeur Didier BETBEDER, de m'avoir fait confiance dès le premier jour, de m'avoir intégré dans son laboratoire, puis dans son entreprise. Merci pour votre encadrement, pour votre disponibilité, pour nos nombreux échanges toujours constructifs, et pour votre enseignement quotidien.*

*Je remercie le Dr Rodolphe CARPENTIER, pour son aide permanente face à toutes les vicissitudes que j'ai pu rencontrer au cours de ces 3 années, et pour son humour toujours fin.*

*Je remercie l'entreprise VAXINANO de m'avoir permis de rejoindre son équipe pour réaliser ma thèse CIFRE, et ce dès ses débuts. Travailler dans cette structure a ouvert mon regard sur de bien nombreux aspects de la science et du monde des biotechnologies. Je remercie les membres de la direction, pour leur confiance et les nombreux conseils qu'ils m'ont prodigués. Je remercie les chefs de projets, Marie, Angelo et Alessio, pour leur soutien, leur simplicité, et pour le travail accompli à leur côté. Encore de bien nombreuses discussions enrichissantes... Enfin je remercie particulièrement les techniciens, mes collègues et amis Amélie, Clément et Hafssa, pour les innombrables bons moments passés à leur côté.*

*Merci à mes collègues et amis Clément et Norhane pour ces moments formidables. Pour nos digressions, nos confidences, votre soutien.*

*Je remercie l'INFINITE de m'avoir accueilli dans ses équipes. Merci à l'équipe de Jean-Luc Desseyn, particulièrement Bastien pour les collaborations scientifiques, à l'équipe de Laurent DUBUQUOY et particulièrement Madjid pour les formations à l'histologie. Merci à Virginie CHAMEROY pour l'organisation et l'animation scientifique, qui a permis de nombreux échanges avec les autres doctorants.*

*Je remercie Nathalie JOUY et Emilie FLOQUET pour leur aide considérable durant toute cette thèse. Merci pour leur gentillesse et leur sollicitude.*

## REMERCIEMENTS

*Je remercie mes amis qui m'ont tous été d'un soutien nécessaire. Merci Maxence, David, et ma Béné, pour la force.*

*Merci enfin aux membres de ma famille, mon frère, mes sœurs et mes parents, à qui je dois tout, et pour qui j'essaie de faire de mon mieux, en espérant vous rendre fiers.*

**LISTE DES PUBLICATIONS**

Lê, 2018, **Protein delivery by porous cationic maltodextrin-based nanoparticles into nasal mucosal cells: Comparison with cationic or anionic nanoparticles**, International Journal of Pharmaceutics

Lê, 2020, **Prevention of influenza virus infection and transmission by intranasal administration of a porous maltodextrin nanoparticle-formulated vaccine**, International Journal of Pharmaceutics

Fasquelle, 2020, **Importance of the Phospholipid Core for Mucin Hydrogel Penetration and Mucosal Cell Uptake of Maltodextrin Nanoparticles**, ACS Applied Biomaterials

**Cationic and reticulated maltodextrine NPs act as a pure delivery system, to enhance the antigens immunogenicity toward airway immune cells – *in progress***

**LISTE DES ABREVIATIONS**

- ADN** - Acide désoxyribonucléique
- AuNPs** - Nanoparticules d'or
- BALT** - *Bronchus Associated Lymphoid Tissue*
- BCG** - Bacille Calmette-Guérin
- BCR** - *B-cell Receptor*
- BMDC** - *Bone marrow-derived Dendritic Cells*
- CCP** - *Clathrin-coated Pit*
- CCV** - *Clathrin-coated Vesicle*
- CD** - Cellules Dendritiques
- CEPI** - *Coalition for Epidemic Preparedness Innovations*
- CLR** - *C-type Lectine Receptors*
- CMC** - Concentration Micellaire Critique
- CME** - *Clathrin-mediated Endocytosis*
- CMH** - Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CMIS** - *Common Mucosal Immune System*
- CPA** - Cellules Présentatrices d'Antigènes
- CpG** - Cytidine-phosphate Guanosine
- CPP** - *Cell Penetration Peptide*
- CS** - Chitosan
- CKS9** - peptide CKSTHPLSC
- CT** - Toxine Cholérique
- CTA** - sous-unité A de la Toxine Cholérique
- CTB** - sous-unité B de la Toxine Cholérique
- DE** - Dextrose Equivalent
- DLPC** - Dilauroyl-phosphatidylcholine
- DOPE** - Dioleoyl-phosphatidylethanolamine
- DPPE** - Dipalmitoyl-phosphatidyléthanolamine
- DPPG** - Dipalmitoyl-phosphatidylglycérol
- dsRNA** - *double stranded Ribonuceic Acid*
- DSPE** - Distéroyl-phosphatidyléthanolamine

**EGF** - *Epidermal Growth Factor*  
**EPR** - *Enhanced Permeability and Retention*  
**ETEC** - *Escherichia coli* entérotoxigènes  
**FAE** - *Follicular Associated Epithelium*  
**FDA** - *Food and Drug Administration*  
**FRET** - *Fluorescence Resonance Energy Transfert*  
**GALT** - *Gut Associated Lymphoid Tissue*  
**GC** - Glycol-chitosan  
**GFM** - *Gel-Forming Mucins*  
**GP2** - Glycoprotéines 2  
**GPI** - Glycosyl-Phosphatidyl Inositol  
**GSK** - GlaxoSmithKline  
**HMPA** - N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide  
**IFR** - *Interfollicular Regions*  
**IgG** - Immunoglobuline G  
**IONP** - *Iron Oxide Nanoparticles*  
**IRM** - Imagerie par Résonance Magnétique  
**ISCOM** - *Immune Stimulating Complex*  
**IV** - Intraveineuse  
**L<sub>B</sub>** - Lymphocyte B  
**LPS** - Lipopolysaccharide  
**L<sub>T</sub>** - Lymphocyte T  
**LT** - Toxine labile à la chaleur, issue des ETEC  
**LUV** - *Large Unilamellar Vesicle*  
**MALT** - *Mucosal Associated Lymphoid Tissue*  
**MAP** - Particules mucoadhérentes  
**MDP** - Muramyl Dipeptide  
**MLV** - *Multilamellar Vesicle*  
**MPL** - Monophosphoryl Lipid-A  
**MPP** - Particules mucopénétrantes  
**NALT** - *Nose Associated Lymphoid Tissue*  
**NDV** - *Newcastle Disease Virus*



## LISTE DES ABREVIATIONS

**NGPE** - N-glutaryl-phosphatidyléthanolamine  
**NK** - Cellules *Natural Killer*  
**NLC** - *Nanostructured Lipid Carrier*  
**NLR** - *Nod-like Receptors*  
**NP<sup>+</sup>** - Nanoparticules de maltodextrine cationiques  
**NPL** - Nanoparticules de maltodextrine cationiques lipidées  
**NP<sup>+</sup>·NR** - Nanoparticules de maltodextrine non réticulée et cationiques  
**NPL·NR** - Nanoparticules de maltodextrine non réticulées, cationiques et lipidées  
**NPs** - Nanoparticules  
**ODN** - Oligodéoxynucléotides  
**OMS** - Organisation Mondiale de la Santé  
**PAA** - Polyacrylates  
**PAMAM** - Polyamidoamine  
**PAMP** - *Pathogen-Associated Molecular Pattern*  
**PEG** - Polyéthylène glycol  
**PEI** - Polyéthylène imine  
**PCL** - Polycaprolactone  
**PGA** - Acide poly-glycolique  
**PLA** - Acide poly-lactique  
**PLGA** - Acide poly-lactique-co-glycolique  
**PLL** - Poly-L-lysine  
**Poly I-C** - Acide polyinosino-polycytidylique  
**PP** - Plaques de Peyer  
**PPH** - Phosphohydrazones  
**PPI** - Polypropylène imine  
**PRR** - *Pattern Recognition Receptors*  
**PRRSV** - *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*  
**PS-NP** - Nanoparticule de polystyrène  
**RLR** - *RIG-1 like Receptors*  
**RSV** - Virus Respiratoire Syncytial  
**QD** - *Quantum Dots*  
**SDS** - Sodium Dodecylsulfate

## LISTE DES ABREVIATIONS

**siRNA** - *Small Interfering Ribonucleic Acid*

**SPION** - *Super-Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles*

**ST** - Toxine Stable à la chaleur des ETEC

**SUV** - *Small Unilamellar Vesicles*

**TLR** - *Toll Like Receptors*

**TGI** - Tractus Gastro-Intestinal

**TCR** - *T-cell Receptor*

**TMC** - Triméthylchitosan

**UEA-1** - Agglutinine-1 d'*Ulex europaeus*

**VIH** - Virus d'Immunodéficience Humaine

**VLP** - *Virus-Like Particle*

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

*(Sauf publications)*

<i>Figure 1 : Illustration représentant les 3 types de nano-objets.....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 2 : Illustration de nanoparticules primaires (a) et secondaire (b) .....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 3 : Illustration des approches de synthèse top-down et bottom-up.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 4 : Graphique schématique représentant la relation entre le diamètre d'une particule et sa demi-vie après injection intraveineuse chez la souris (Hoshyar et al., 2016). .....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 5 : Représentation schématiques de liposomes utilisés en nanomédecine. SUV : small unilamellar vesicle, LUV : large unilamellar vesicle, GUV : Giant unilamellar vesicle, MLV : multilamellar vesicle. ....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 6 : Représentation schématiques de nanosphères pleine et poreuse et d'un polyplèxe polymère:acide nucléique (a) ; structure moléculaire d'un polymère de PLGA (b) et de chitosan (c). .....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 7 : Représentation d'un dendrimère de polyamidoamine (PAMAM) de 3 générations sous forme schématique (a) et moléculaire (b) (Hsu et al., 2017). .....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 8 : Représentation schématique de NPs inorganiques. SPION : Super Paramagnetic Iron Oxyde NPs; AuNPs : NPs d'or; MSN : Mesoporous Silica NPs. Adapté de Chattopadhyay et al., 2017. ....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 9 : Photographie de solutions de Quantum Dots de diamètres croissants, excités par une lumière bleue (450 nm). ....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 10 : Représentation schématique des différentes voies d'endocytose empruntées par les NPs (Mayor and Pagano, 2007).....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 11 : Représentation schématiques des générations de nanoparticules appliquée aux liposomes. ....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 12 : Représentation schématique des mécanismes généraux impliqués dans l'initiation de la réponse immunitaire innée et l'activation de la réponse adaptative (Jiskoot et al., 2019) .....</i>	<i>60</i>

<i>Figure 13 : Immunobiologie du MALT. Les antigènes sont captés au niveau des sites inducteurs (ici le NALT et les Plaques de Peyer), pour agir au niveau des sites effecteurs muqueux (Kiyono and Fukuyama, 2004).</i> .....	69
<i>Figure 14 : Représentation schématique des interactions entre différents adjuvants utilisés dans le vaccin par voie muqueuse, et les PRR des cellules présentatrices d'antigènes.</i> .....	75
<i>Figure 15 : Structure cristalline de la toxine cholérique (CT) et de ses sous-unités CTA1, CTA2, et CTB (Odumosu et al., 2010)</i> .....	77
<i>Figure 16 : Représentation schématique de la synthèse de VLP recombinant pour le vaccin.</i> .....	82
<i>Figure 17: Représentation schématique des nanoparticules de maltodextrine lipidées (NPL)</i> .....	85
<i>Figure 18 : Représentation schématique de la structure des mucines gélifiantes (Demouveau et al., 2018).</i> .....	87
<i>Figure 19 : Représentation schématique de la biosynthèse des mucines gélifiantes et de leurs modifications post-traductionnelles (Demouveau et al., 2018)</i> .....	88
<i>Figure 20 : Exemple de polymères mucoadhérents utilisés dans le développement de nanoparticules pour l'administration muqueuse de vaccin.</i> .....	95
<i>Figure 21 : Représentation schématique des mécanismes déterminant la présentation des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes. L'endocytose d'antigènes exogènes par les vésicules d'endocytose induit une association aux CMH de classe II dans les endosomes tardifs, puis une présentation aux lymphocytes CD4<sup>+</sup> (a). La délivrance ou l'expression cytoplasmique d'antigènes induit une dégradation par les protéasomes, suivie par une translocation des fragments de dégradation vers les réticulum endoplasmiques, où ils sont associés aux CMH de classe I, et enfin une présentation du complexe aux lymphocytes CD8<sup>+</sup> (b) (Kobayashi and van den Elsen, 2012).</i> .....	102
<i>Figure 22: Représentation schématique des biomolécules permettant de cibler les cellules M pour le vaccin.</i> .....	109
<i>Figure 23 : Schematic representation of NPL (cationic particles with reticulated maltodextrine and a phospholipid core) and NPL-NR (cationic particles with non-reticulated maltodextrine and a phospholipid core).</i> .....	133
<i>Figure 24. A: Schematic representation of the experiment. Each NPs solution was mixed with increasing amount of BSA. The percentage of association to NPL (B) and</i>	

*NPL·NR (C) was evaluated by native polyacrylamide gel electrophoresis. The internal or surface association to NPL (D) and NPL·NR (E) was evaluated by zeta-potential measurements, and the results represent the mean  $\pm$  sd of at least 6 independent measurements. Statistical analysis was made by one-way ANOVA \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . ..... 136*

*Figure 25 : A: Schematic representation of the experiment. BSA alone or associated to each NP (30 %, weight %) was incubated in presence of trypsin, for 2 h at 37 °C and pH: 7.2. The proteolysis was measured by fluorometry (B). The results represent the normalized mean of 3 independent experiments, and statistical analysis were made by one-way ANOVA. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . ..... 138*

*Figure 26 : NPL and NPL·NR were labeled with DiI, and their endocytosis was evaluated by flow cytometry, on THP-1 derived DC (A) or macrophages (B) and H292 cells (C). Their ability to bypass mucin layer was evaluated by incubating both particles with purified mucins, and measuring thereafter their endocytosis on H292 cells (D). The size of the complexes made between the NPL and NPL·NR, and the mucins, was measured by DLS (E). The results represent the mean  $\pm$  sd of at least 3 independent experiments, and the statistical analysis were made by ANOVA tests. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . ..... 139*

*Figure 27 : A: Native PAGE of NPs/E.coli-TE (30% weight ratio) after 1h; B: Stability of the NPs/E.coli-TE (30% weight ratio) association for 3 days. D: The E.coli-TE delivery by NPL and NPL·NR was evaluated on THP-1 derived DC (D), macrophages (E) and H292 (F), in presence of absence of Trypan blue. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$  ..... 141*

*Figure 28 : The immunogenicity of NPs and TE was evaluated on H292. The cells were incubated with LPS (1  $\mu$ g/mL), TE (5  $\mu$ g/mL) alone or associated to NPs (15  $\mu$ g/mL, 30% weight ratio) for 24h, and the CCL20 (left) and CCL28 (right) secretions were measured by ELISA. Results represent mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$  ..... 143*

*Figure 29 : The immunogenicity of NPs and TE was evaluated on THP-1 derived macrophages (left) and dendritic cells (right). The cells were incubated with LPS (1  $\mu$ g/mL), TE (5  $\mu$ g/mL) alone or associated to NPs (15  $\mu$ g/mL, 30% weight ratio) for 24h, and the TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-12p40 secretions were measured by ELISA. Results represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . ..... 145*

<i>Figure 30: Liste des vaccins commercialisés en France, en fonction du type d'antigène.....</i>	<i>151</i>
<i>Figure 31 : Etude de biodistribution des NPL au niveau de la muqueuse nasale de souris, au cours du temps. Trois heures après instillation nasale, les NPL (en vert) se retrouvent sous la couche de mucus (ligne pointillée) et au contact direct des cellules épithéliales (noyaux en bleu). Echelle : 50 <math>\mu\text{m}</math> (A-C) et 10 <math>\mu\text{m}</math> (A'-C'). Adapté de Bernocchi et al. <sup>29</sup>.....</i>	<i>158</i>
<i>Figure 32: Représentation schématique des interactions entre les mucines anioniques et les particules de maltodextrine, sans (<math>\text{NP}^+</math>) et avec (NPL) un cœur de phospholipides anioniques (DPPG). La présence de DPPG dans la particule induit des répulsions électrostatiques et stériques vis-à-vis des mucines, améliorant par conséquent la diffusion dans le mucus. ....</i>	<i>160</i>
<i>Figure 33: Représentation schématique des modifications pouvant être apportées à la NPL pour améliorer sa mucopénétration. A : L'ajout d'un cœur de phospholipides anioniques PEGylés, ici le distéaryl-phosphatidylethanolamine (DSPE-PEG) recouvrirait le vecteur de PEG. B : l'ajout de chaînes de PEG fonctionnalisées avec un groupement anionique, ici des fonctions carboxyliques <math>\text{COOH}</math>, recouvrirait le vecteur de PEG, par liaisons électrostatiques avec les charges cationiques déjà présentes en surface. C : En plus de l'agent cationisant GTMA, l'ajout in process d'un agent anionisant (ex : du trichlorure de phosphoryle) apporterait à la particule des charges anioniques. La surface de la NPL serait alors densément chargée en surface, avec autant de charges anioniques que cationiques. La particule serait donc zwitterionique, et globalement neutre. ....</i>	<i>161</i>
<i>Figure 34: Etude du temps de résidence de différentes NPs, lipidiques et polymériques, anioniques et cationiques, dans la muqueuse nasale de souris (de Le et al <sup>34</sup>). Les NPL ont un temps de résidence nasal de 24h, supérieur à celui des PLGA et liposomes recouvertes de chitosan (PLGA(+)) et Lipo(+)) respectivement), décrites comme mucoadhérentes, et ne restant pas plus de 3h dans la muqueuse. .</i>	<i>162</i>
<i>Figure 35: Représentation schématique de l'association de BSA avec des NPL (à gauche) ou des NPL·NR (à droite). Les antigènes sont encapsulés dans la structure de la NPL, alors qu'ils sont présent en surface de la NPL·NR. Le type de présentation aux cellules immunitaires est donc modifié en fonction de la densité de la maltodextrine. ....</i>	<i>166</i>

*Figure 36 : Images d'immunofluorescence de tissus nasal de souris après administration de PBS (à gauche) ou d'ovalbumine (à droite). Les CCL28 ont été marqués en rouge et les noyaux en bleu. L'instillation d'ovalbumine a induit une sécrétion de CCL28 dans l'épithélium, échelle : 20 µm. Adapté de Nagakubo et al., 2016 <sup>53</sup>..... 169*

## PREAMBULE - OBJECTIFS

Cette thèse de Doctorat a été réalisée dans le cadre d'une convention CIFRE entre le laboratoire de nanomédecine de l'équipe INSERM INFINITE 1286 et l'entreprise VAXINANO, sous la direction du Professeur Didier BETBEDER, grâce au soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT).

Ce manuscrit présente les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, à l'interface entre la nanomédecine et la vaccinologie. Ceux-ci ont pour objet de comprendre les mécanismes permettant à des nanoparticules de maltodextrine lipidées (NPL) de délivrer des antigènes dans les muqueuses des voies aériennes, en vue de vacciner contre les maladies infectieuses. En ce sens, l'importance de la structure physico-chimique des NPL sur la pénétration du mucus des voies aériennes, et sur la délivrance d'antigènes dans les cellules immunitaires muqueuses, a été évaluée. Les mécanismes permettant d'améliorer l'immunogénicité des antigènes ont par ailleurs été étudiés, afin de déterminer si ces particules constituent un système de délivrance pur ou immunomodulateur.

Le document se divise en quatre parties :

La **PARTIE I** est une introduction générale situant le contexte scientifique de la thèse. Elle est elle-même scindée en deux parties : la première présente les notions de nanoparticules, nanomédecine, d'endocytose et de ciblage, et la seconde traite des mécanismes de la vaccination et de l'intérêt de formulations à partir de nanoparticules, pour répondre aux défis actuellement existants, appuyé par les travaux récents les plus pertinents relevés dans la littérature.

La **PARTIE II** présente les résultats des travaux effectués durant les 3 dernières années, sous forme d'articles publiés ou soumis dans différents journaux scientifiques. Le premier article prouve l'importance d'ajouter un cœur de phospholipide anionique à la NPL, afin d'améliorer la pénétration du mucus et la délivrance d'antigène dans les cellules sous-jacente. La seconde démontre que la NPL n'est pas une particule immunomodulatrice, car elle ne stimule pas par elle-même le système immunitaire, mais qu'elle améliore l'immunogénicité des antigènes en augmentant leur délivrance intracellulaire.



Dans la **PARTIE III**, nous discutons les résultats de nos travaux et leur importance par rapport aux besoins concrets de la médecine actuelle, d'après les données de la littérature récente.

La **PARTIE IV** est une conclusion générale de la thèse.

## RESUME

L'administration de vaccins par voie muqueuse (orale et nasale) est une alternative efficace aux injections classiques. En effet, au-delà d'une plus grande compliance pour les patients et les soignants, ces voies ont l'avantage de déclencher une immunité dite muqueuse, grâce à la présence d'un système immunitaire propre (aussi appelé MALT pour *Mucosal Associated Lymphoid Tissue*). Ce MALT est situé à la surface des épithélia de revêtement. Il est différencié en îlots distinguables, les *Follicular Associated Epithelium* (FAE), et est constitué de cellules épithéliales spécialisées dans la surveillance et le prélèvement de pathogènes, les cellules M. Celles-ci surplombent une zone riche en cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et lymphocytes, les *Interfollicular Regions* (IFR). Ainsi lors d'une infection, les cellules M sont capables de prélever et transloquer des fragments antigéniques vers les CPA, qui initieront la réponse immunitaire auprès des lymphocytes. Cette réponse se traduira par une immunité humorale et cellulaire au niveau de l'épithélium infecté, au niveau des muqueuses plus distantes, mais aussi au niveau systémique. Comme la majorité des infections se produisent au niveau des muqueuses, cette stratégie d'immunisation est de plus en plus étudiée.

Si les antigènes sous-unitaires sont moins toxiques que les vaccins vivants, ils sont aussi moins immunogènes, et leur administration nécessite la présence d'un adjuvant pour stimuler efficacement les CPA et initier une réponse immunitaire forte. Or, par la voie des muqueuses, les molécules immunostimulantes classiquement utilisées pour les voies injectables (par exemple les toxines bactériennes, le LPS ou encore certaines émulsions) sont souvent reportées comme étant toxiques. L'utilisation de systèmes de délivrance pour vectoriser les antigènes jusque dans les CPA semble donc être une alternative séduisante.

On distingue deux types de vecteurs d'antigènes : les particules immunomodulatrices, et les systèmes de délivrance purs. Les premiers délivrent les antigènes dans les CPA, et en parallèle, stimulent fortement les voies pro-inflammatoires, pour orienter la balance immunitaire Th1/Th2. Parmi ces vecteurs, les plus utilisés en tests cliniques sont les virus-like particles (VLP), les émulsions à base de saponines (ISCOMs) ou les liposomes contenant des éléments bactériens (MPL, CpG...). En revanche, leur utilisation par voie muqueuse, et notamment nasale, est confrontée aux mêmes risques

de toxicité que les adjuvants classiques. Les systèmes de délivrance purs, quant à eux, n'améliorent l'immunogénicité des antigènes qu'en les délivrant dans les cellules, mimant ainsi une infection naturelle. Et bien qu'ils soient mieux tolérés par les muqueuses, leur efficacité doit s'orienter vers une pénétration du mucus, ainsi qu'une association, protection et délivrance des antigènes dans les CPA bien plus performantes.

Durant cette thèse, nous avons ainsi étudié les mécanismes permettant à des nanoparticules (NPs) de maltodextrine cationiques et lipidées (NPL) de délivrer des antigènes par voie nasale.

Nous avons tout d'abord évalué la capacité des NPL à franchir le mucus des voies respiratoires, en comparaison avec des nanoparticules mucopénétrantes (des PLGA recouvertes de PEG, ou **PLGA-PEG**) et des nanoparticules mucoadhérentes (des PLGA recouvertes de chitosan, ou **PLGA-CS**). En mesurant le déplacement des différentes NPs dans du mucus respiratoire reconstitué, nous avons observé que, grâce à la présence du cœur de phospholipides anioniques, la NPL était capable de se déplacer dans le mucus, contrairement aux PLGA-CS qui restaient immobiles. De plus nous avons observé que malgré la présence de mucines, l'endocytose des NPL et la délivrance d'antigènes protéiques n'étaient pas diminuées, contrairement aux PLGA-CS qui étaient retenues par les mucines, et aux PLGA-PEG qui malgré leur importante mucopénétration, n'étaient pas captées par les cellules, du fait de leur charge de surface neutre. Enfin, nous avons démontré que la mucopénétration de la NPL était permise grâce à une répulsion électrostatique et stérique entre les phospholipides et les mucines anioniques.

Dans une seconde étude, nous avons étudié les processus permettant aux NPL d'améliorer l'immunogénicité d'antigènes sous-unitaires par voie nasale, en mettant l'accent sur l'importance de la densité du vecteur. La NPL étant synthétisée à partir de maltodextrine réticulée avec de l'épichlorhydrine, nous avons synthétisé une NPL moins dense, grâce à de la maltodextrine non réticulée (ou **NPL·NR**). Nous avons observé que les NPL·NR associaient plus d'antigènes que les NPL, mais que cette association s'effectuait principalement en surface du vecteur. Par conséquent, les NPL·NR ne protégeaient pas les antigènes de la protéolyse, contrairement aux NPL. De même, nous avons observé que la plus forte densité des NPL leur permettait d'être

captées plus rapidement par les cellules immunitaires et épithéliales, et que la délivrance intracellulaire d'antigènes était par conséquent plus efficace. Enfin, nous avons démontré que ces particules n'étaient pas immunomodulatrices car elles ne stimulaient pas les cellules par elles-mêmes. En revanche, la délivrance intracellulaire des antigènes améliorait leur immunogénicité, avec encore une influence positive de la densité des vecteurs. Ces particules se comportent donc comme un système de délivrance d'antigène pur.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse démontrent l'importance de la structure des nanoparticules, et particulièrement de la NPL, sur son efficacité vaccinale par voie muqueuse, et confirment son efficacité comme plateforme de délivrance d'antigènes.

Ainsi, les nanotechnologies permettent de designer des vecteurs inertes, capables de délivrer les antigènes dans les cellules du MALT, en vue d'améliorer leur immunogénicité. Ces stratégies sont prometteuses pour s'affranchir de l'utilisation d'adjuvants toxiques dans la conception de nouveaux vaccins.

**ABSTRACT**

The mucosal routes of immunization present several advantages compared to classical injection routes. Indeed, besides a better compliance towards patients, these routes possess their own immune system, also known as the Mucosal Associated Lymphoid Tissue (MALT), able to trigger a local mucosal response after immunization. This tissue is mainly located in the nasal and intestinal mucosa, where it is spread in small extents called Follicular Associated Epithelium (FAE). On their apical surface, the FAE contain specialized epithelial microfold cells (or M cells), whose role is to survey potential infections by sampling pathogenic fragments, and which overlay a lymphocyte and antigen presenting cells (APC) zone. Then, when an infection occurs, M cells sample and translocate antigenic fragments to CPA, which could therefore trigger lymphocyte maturation and the initiation of the subsequent immune response. This activation will lead to both humoral and cellular immunity in the infected epithelium and could also spread to distant mucosa. As many pathogens infect the body through mucosa, this way of immunization is often considered.

Adjuvants are frequently added to subunit vaccines to enhance their immunogenicity toward APC. Indeed, despite their lower toxicity, they are also less immunogenic than live-attenuated vaccines. However, the administration of classical adjuvanting molecules, such as toxins or immunostimulating emulsions, via mucosal routes, has often led to serious adverse effects. Therefore, the alternative use of delivery systems to deliver antigen in APC after mucosal administration is more and more studied.

Antigen delivery systems include immunomodulating particles, and inert delivery systems. The first ones can enhance the mucosal antigen bioavailability by vectorizing antigens to APC, and at the same time trigger intracellular pro-inflammatory pathways, to drive the Th1/Th2 immune balance. Among them, virus-like particles (VLP), saponin-based emulsions (ISCOMs) or MPL-containing liposomes are the most represented in clinical trials. However, their mucosal administration can lead to the same adverse effects than classical immunostimulating molecules. In parallel, true delivery systems can enhance the antigens immunogenicity by increasing their intracellular delivery, thus mimicking a natural infection. They are therefore far less toxic for the mucosa than immunomodulating particles but need to be more efficient

in the mucus penetration, in the antigen association and in the APC intracellular delivery.

During this thesis, we deciphered the mechanisms allowing cationic and lipidated maltodextrine nanoparticles (NPL) to deliver antigens after nasal administration.

We first evaluated the ability of NPL to cross the airway mucus barrier, compared to mucopenetrant particles (PEG-coated PLGA or **PLGA-PEG**) and mucoadherent particles (chitosan-coated PLGA or **PLGA-CS**), by measuring their displacement in reconstituted mucus. We observed that in presence of the phospholipid core, the NPL were able to move in the mucus, while PLGA-CS NPs remained stuck in the gel. Moreover, we observed that the NPL uptake and the protein delivery in airway epithelial cells were not impaired by the presence of mucins, contrary to PLGA-CS that were hindered by the mucins, and to PLGA-PEG which were not taken up by the cells, due to their neutral surface charge. We finally demonstrated that the NPL mucopenetration was allowed thanks to steric and repulsive electrostatic forces between the anionic phospholipid core and the mucins.

In parallel, we studied the mechanisms allowing the NPL to enhance the immunogenicity of subunit antigens after nasal administration, with a highlight on the importance of the NP's density. As NPL are synthesized from reticulated maltodextrine, we synthesized softer NPL, by avoiding the use of the reticulating agent. We observed that the non-reticulated NPL (or **NPL•NR**) were able to associate more antigens than the dense ones. However, it was mostly performed on the vector's surface, which could therefore not protect the antigens against proteolysis, contrary to the NPL. Moreover, we observed that the dense particles were more taken up by both epithelial and immune cells, thus increasing the intracellular antigen delivery. Finally, we demonstrated that these NPs were not immunostimulating by themselves, but that the greater APC stimulation was only due to a better delivery, with a strong importance of the NPL's density. The NPL behave as true and inert delivery systems.

Altogether, these works decipher the importance of the NPL's structure on the vaccine efficiency after a nasal administration and support their potential as a promising antigen delivery system.

## ABSTRACT

Then, nanotechnology offers encouraging discoveries to develop new mucosal vaccines, which will be safe and efficient enough to avoid the use of toxic adjuvants.

**PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE**



## 1. Nanoparticules et Nanomédecine

### 1.1. Les nanoparticules

L'échelle nanométrique est la plus petite échelle d'organisation entre plusieurs atomes. Elle est constituée d'une multitude d'objets de formes, de compositions, d'origines et de rôles différents, appelés nano-objets. La norme ISO/TS 80004-2 :2015 définit les nano-objets comme des objets dont au moins une des dimensions est comprise entre 1 nm et 100 nm. Un objet ne possédant qu'une dimension nanométrique est nommé nanoplaque. Pour 2 dimensions on parle de nanofibres et pour 3 dimensions on utilise le terme de nanoparticules (NPs) (Figure 1). On peut séparer les NPs naturelles des NPs synthétiques. Les premières sont organiques (composés dérivés du carbone) ou inorganiques (minéraux...), et les secondes sont créées par l'activité humaine, de manière involontaire par la dégradation (produits de combustion...) ou de manière volontaire en laboratoire, pour étudier leur toxicologie ou pour chercher des applications potentielles. La prise en compte de cette échelle a débuté à la fin des années 50 avec les avancées faites dans le domaine de la miniaturisation. Le désormais célèbre discours "*There is plenty of room at the bottom*", prononcé par Richard Feynman en 1959 lors d'une conférence à l'*American Physical Society*, est considéré comme le point de départ de la recherche autour de ces nano-objets. Par la suite, d'autres évènements clés comme l'invention en 1981 du premier microscope à effet tunnel, capable d'observer les structures atomiques de surfaces conductrices, ont ouvert les champs d'études de l'échelle nanométrique.

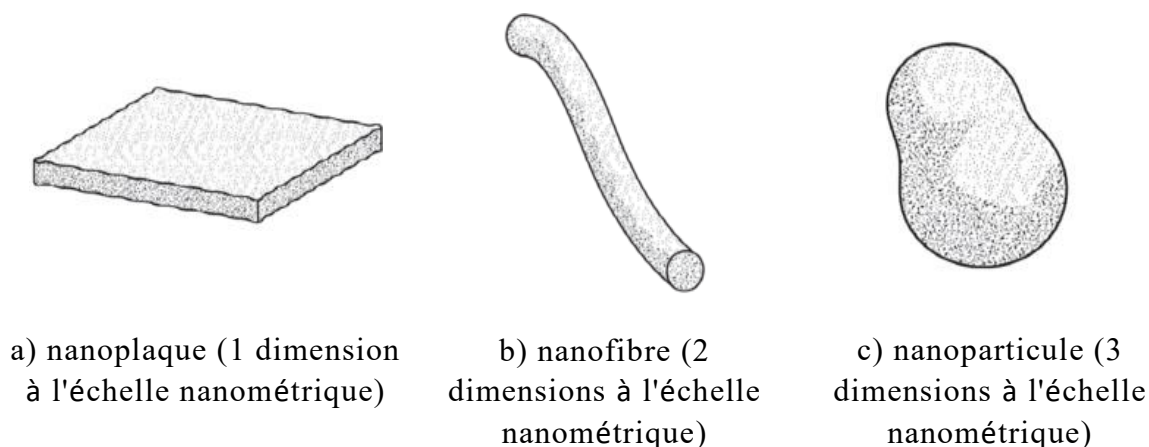


Figure 1 : Illustration représentant les 3 types de nano-objets

Les NPs naturelles et synthétiques peuvent être discrètes et individuelles, appelées « particules primaires », ou être le fruit de l'agrégation de plusieurs particules pour former un amas homogène. On parle alors de « particules secondaires » (Figure 2).

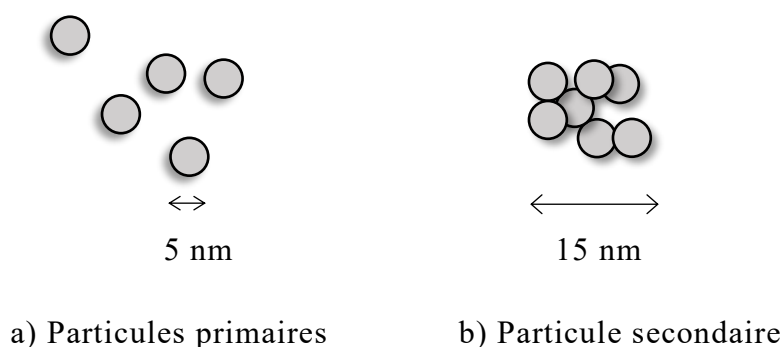


Figure 2 : Illustration de nanoparticules primaires (a) et secondaire (b)

La découverte et la compréhension du rôle des NPs dans leur comportement avec la matière et le vivant constituent les nanotechnologies. Ce terme a été utilisé pour la première fois en 1986 par le physicien Eric Drexler et s'est depuis largement démocratisé. Les nanotechnologies consistent aujourd'hui en l'étude, la fabrication et l'utilisation de ces particules et des propriétés qui leur sont associées pour des applications très diverses, parmi lesquelles la médecine, l'électronique et l'alimentation.

Les NPs possèdent des caractéristiques physico-chimiques singulières liées à leur taille, qu'il est possible d'exploiter dans ces différents domaines cités.

La fabrication d'une nanoparticule d'un matériau donné permet d'augmenter le rapport surface sur volume ( $S/V$ ) de ce dernier, ce qui a un impact sur ses propriétés physico-chimiques. Par exemple, les nanoparticules d'or de diamètre inférieur à 5 nm ont une température de fusion proche de 500°C alors que celles de diamètres supérieurs à 20nm dépassent les 1000°C (1). De même, les nanotubes de carbone, constitués de nanoplaques de graphène repliées en tube, dont le diamètre peut varier de 0,4 nm à 100 nm, donnent aux matériaux des propriétés de résistance jusqu'à 100 fois plus importantes que l'acier, bien que 6 fois plus léger (2). Ces découvertes révolutionnaires trouvent des applications dans de nombreux domaines.

La taille des NPs peut influencer leurs propriétés optiques. En effet, la lumière UV-visible possède une longueur d'onde d'ordre nanométrique. Ainsi, quand un faisceau incident de lumière blanche rencontre une NP métallique, le nuage électronique de cette dernière pourra soit absorber la partie du faisceau dont la longueur d'onde est proche de son diamètre (effet plasmon) et ainsi modifier la couleur du rayon réémis, soit être excité et fluorescer. Les quantum dots (QD) qui sont des NPs de métaux semi-conducteurs en sont l'exemple le plus représentatif, car la longueur d'onde de la fluorescence réémise va dépendre directement du diamètre de ces NPs (3).

Les particules de taille nanométrique vont enfin avoir des interactions nouvelles avec les tissus biologiques. Les NPs ont une dimension inférieure à celle des cellules, avoisinant celle d'une membrane plasmique (environ 7,5 nm) ou des jonctions serrées (100 nm à 500 nm) ce qui leur permet de pénétrer les tissus en profondeur par passages intercellulaires et transcytose, et de rentrer dans les cellules par différentes voies, selon leur taille et leur composition, à l'inverse des particules de taille plus importante dont la progression est plus facilement freinée.

À l'influence de la taille s'ajoute celles de la réactivité chimique, de l'hydrophobicité, de la charge de surface (potentiel zêta), ou de la forme. Il est possible de combiner ces différentes propriétés pour conférer aux NPs des propriétés spécifiques et uniques en vue d'utilisations précises.

Malgré l'immense variété de matériaux à partir desquels des NPs peuvent être fabriquées (organique, inorganique, mixtes), leur synthèse peut s'effectuer par trois approches principales : la *top-down* qui consiste à réduire la taille d'un objet ou d'un polymère macroscopique, la *bottom up* qui se réalise en agglomérant des atomes ou molécules entre elles (NPs métalliques, lipidiques, protéiques...) et la purification de NPs naturellement existantes (Figure 3). L'objectif d'une synthèse est d'obtenir des NPs stables dans le temps et dans leur condition d'utilisation, ayant une taille homogène et maîtrisable, avec le meilleur rendement possible. Par ailleurs, le souhait de réaliser des particules *safe by design* et à partir de chimie « verte » est de plus en plus accentué en vue des nombreuses applications potentielles.

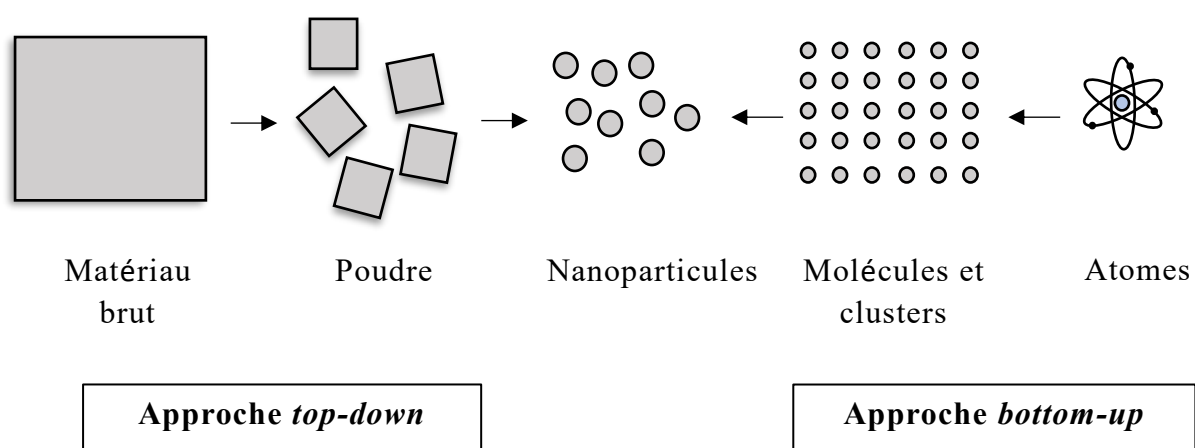


Figure 3 : Illustration des approches de synthèse *top-down* et *bottom-up*

## 1.2. La nanomédecine

La nanomédecine est l'utilisation des nanotechnologies appliquée à la recherche médicale, et se base sur le concept de la *magic bullet* théorisé par le Prix Nobel de médecine de 1908, Paul Ehrlich. En partant de ses travaux sur l'arsenic antimicrobien, il statuait lors d'un discours qu'il faudrait inventer des vecteurs capables de délivrer un médicament précisément sur son site d'action, permettant ainsi de limiter les effets secondaires. Les NPs ont depuis ce jour tenté de répondre à ce défi grâce à leur

capacité d'associer des substances actives et de les protéger *in vivo* de la dégradation, à pénétrer les tissus, à reconnaître des cellules cibles et à délivrer les médicaments sous forme biologiquement active. Ainsi ont émergé les premiers nanomédicaments, focalisés en premier lieu sur l'amélioration des agents diagnostiques et thérapeutiques anti-cancéreux. En effet les médicaments chimio-thérapeutiques sont des molécules cytotoxiques visant à ne détruire que les cellules cancéreuses, mais dont la distribution systémique induit d'importants effets secondaires par destruction des tissus sains. La doxorubicine liposomale (Doxil®) fut ainsi le premier nanomédicament thérapeutique commercialisé, en 1995, avec une délivrance plus importante du médicament au niveau des tumeurs et une toxicité cardiaque significativement diminuée (4). D'autres nanomédicaments développés en vue de diminuer la toxicité et d'améliorer l'efficacité des traitements déjà existant furent mis sur le marché à la fin des années 90 avec notamment la daunorubicine liposomale (DaunoXome®, anticancéreux accepté en 1996), la cytarabine liposomale (DepoCyt®, agent antinéoplasique accepté en 1999) et l'amphotéricine B liposomale (Ambisome®, antifongique accepté en 1999) (5). On compte aujourd'hui une cinquantaine de nanomédicaments sur le marché.

Le rôle premier des nanoparticules est donc de diminuer la toxicité de médicaments déjà existants, en modifiant favorablement leur pharmacocinétique. Les nanotechnologies peuvent potentiellement améliorer la biodistribution des médicaments, améliorer leur ciblage et diminuer leur toxicité. Ce qui permettra par ailleurs de diminuer la dose de médicament à administrer pour avoir un effet significatif. Là encore, la taille des particules joue un rôle prépondérant, puisqu'il existe une corrélation inverse entre le diamètre d'un vecteur et son temps de demi-vie après injection IV comme illustré sur la Figure 4 (6).

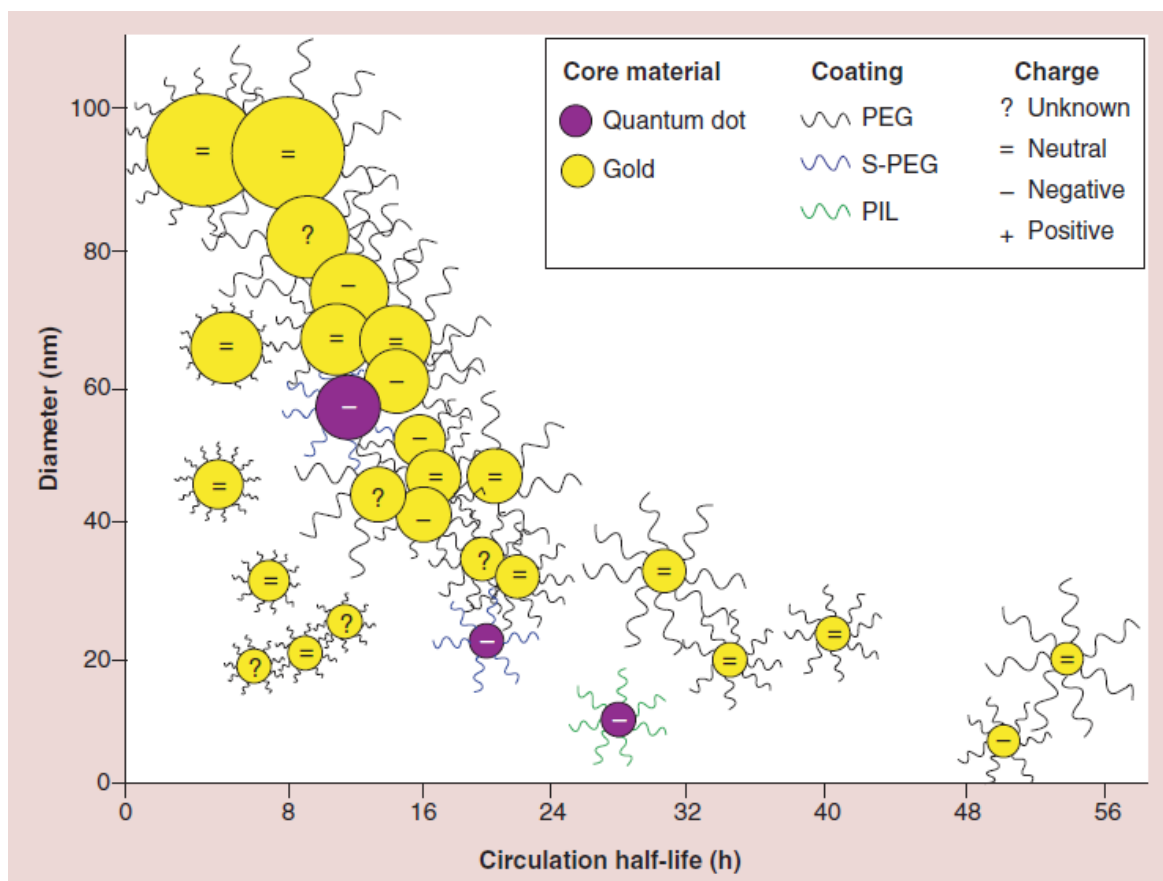


Figure 4 : Graphique schématique représentant la relation entre le diamètre d'une particule et sa demi-vie après injection intraveineuse chez la souris (6).

### 1.3. Les nanoparticules utilisées en nanomédecine

Il est commun de classer les nanoparticules utilisées en nanomédecine selon leur composition physicochimique. Ci-après sont détaillées les principales particules utilisées en nanomédecine. On distingue ainsi les particules organiques (lipidiques, polymériques, les dendrimères, les particules virales) et les particules inorganiques.

#### 1.3.1. Les particules lipidiques

##### *Les liposomes*

Les liposomes sont des NPs synthétisées à partir de phospholipides amphiphiles qui s'organisent en bicouche lipidique avec un cœur aqueux, à la manière des membranes

cellulaires. Ces NPs ont été développées dans les années 60, au départ comme modèles biologiques de membranes plasmiques (7), et furent les premières à avoir été développées pour améliorer la pharmacocinétique de médicaments. C'est pour cette raison que les premiers nanomédicaments sont des formulations liposomales. Les liposomes peuvent être synthétisés par différentes méthodes (injection éthanolique, hydratation de films lipidique, microfluidique...) ce qui permet de modifier à façon leur diamètre (15 nm-20 µm) et leur structure vésiculaire. On distingue alors, comme le montre la Figure 5, les liposomes de petite taille et unilamellaires (small unilamellar vesicles ou SUV), les liposomes multilamellaires (multilamellar Vesicle ou MLV), les liposomes unilamellaires de grande taille (large unilamellar Vesicle ou LUV) et les liposomes unilamellaires géants (giant unilamellar Vesicle ou GUV). Il est possible de modifier le comportement des liposomes en variant leur composition en phospholipides : l'ajout de lipides ayant différents taux d'insaturation et différentes longueurs de chaînes d'acides gras ou l'addition de cholestérol permet par exemple de modifier leur rigidité et leur fluidité, là où l'ajout de phospholipides portant une charge cationique (phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine...) permet d'ajouter des charges positives en surface du vecteur, favorisant à la fois la stabilité colloïdale, l'association d'antigènes anioniques, ainsi que la délivrance intracellulaire par des interactions électrostatiques (8). Après administration intraveineuse (IV), ces particules sont rapidement captées par les macrophages du système phagocytaire mononucléaire (clairance hépatosplénique), il peut donc être nécessaire de modifier la surface de ces vecteurs, de manière covalente ou électrostatique par ajout de polymères permettant d'améliorer la furtivité, le ciblage et la biodisponibilité (9,10). Indépendamment des modifications de surface, ces NPs sont pour la plupart biosourcées ce qui les rend parfaitement biocompatibles. En revanche la nature des lipides utilisés peut générer de la toxicité.

Le principal avantage de ces particules est de pouvoir associer une large variété de substances actives selon leur affinité pour les lipides : les petites molécules hydrophobes peuvent s'enchaîner au sein ou en surface de la bicouche lipidique, et les macromolécules plus hydrophiles comme les peptides peuvent être encapsulées dans le cœur hydrophile ou en surface de la bicouche. L'association peut être effectuée pendant la synthèse (*in process*) ou après (*post-loading*). Le processus de synthèse de nanomédicaments liposomaux peut être transposable à grande échelle ce qui facilite

le passage en phase clinique. En revanche l'association de médicament peut déstabiliser la structure de la particule, diminuant sa stabilité. Dès lors l'utilisation de surfactants souvent toxiques peut s'avérer nécessaire (11).

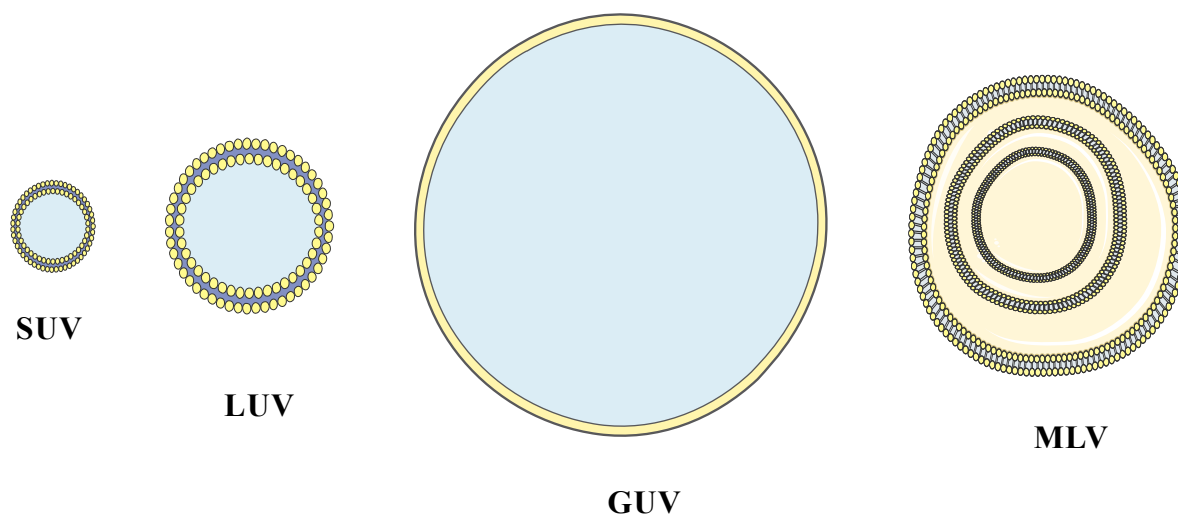


Figure 5 : Représentation schématique de liposomes utilisés en nanomédecine. SUV : small unilamellar vesicle, LUV : large unilamellar vesicle, GUV : Giant unilamellar vesicle, MLV : multilamellar vesicle.

### *Les micelles*

Les micelles sont des particules de 5 nm à 300 nm, synthétisées à partir de lipides amphiphiles, et organisées en monocouche lipidique. En milieu biologique, la tête polaire des lipides est exposée vers l'extérieur, laissant les chaînes d'acide gras vers l'intérieur, et facilitant l'encapsulation d'une grande variété de molécules hydrophobes. Ces particules s'assemblent naturellement une fois que la concentration micellaire critique (CMC) en lipides est atteinte, mais se déstabilisent par conséquent rapidement en cas de dilution, notamment lors d'une administration IV. A l'inverse, plus la concentration en lipides sera supérieure à la CMC, plus les NPs seront stables *in vivo*. C'est pourquoi des molécules amphiphiles ayant une CMC basse (environ  $10^{-7}$  M) sont les plus étudiées, car la dilution qui a lieu lors de l'administration IV devient moins limitante (12). L'association de médicament s'effectue principalement *in process* par des techniques d'émulsification huile-eau ou eau-huile-eau, ou encore par lyophilisation. Ces vecteurs ont été étudiés en parallèles des liposomes, car l'assemblage particulier des lipides permet d'échapper à l'opsonisation et à la



clairance hépatosplénique, contrairement aux liposomes (13). Récemment, on a pu voir des polymères synthétiques être développés en vue de synthétiser de nouvelles formes de micelles appelées *polyplexes* (14). Ces derniers seront décrits ci-après (Partie 1.3.2).

#### ***Les particules lipidiques solides (NLC)***

Les NLC sont des particules cristallines semi-solides, synthétisées à partir de mélanges de lipides (principalement des tri-di- ou monoglycérides, des cires et des surfactants), certains étant solides et les autres liquides à 37°C, grâce à des techniques d'homogénéisation et de cristallisation en solvants organiques. L'intérêt de ces NPs est leur stabilité *in vivo* plus importante que celle des liposomes, ce qui permet de les administrer par voie injectable et entérale (13). Le degré d'organisation de ces NPs et le taux d'association de molécules hydrophobes ou hydrophile sont dépendants de la quantité de lipides liquides dans le mélange initial (15). Il est possible de fonctionnaliser leur surface afin d'améliorer le ciblage et la biodistribution *in vivo*, pour des applications diverses comme la délivrance de gènes, la délivrance de molécules chimio-thérapeutiques ou de la délivrance transdermique de substances actives (15).

#### 1.3.2. Les particules polymériques

##### ***Les nanosphères***

Les nanosphères polymériques font partie des vecteurs les plus utilisés en nanomédecine. Ce sont des particules solides, pleines ou poreuse, souvent sphériques, synthétisées à partir de polymères ou copolymères naturels ou synthétiques et pouvant avoir une taille variée (de 20 nm à plusieurs microns) selon la méthode de synthèse (Figure 6a). Cette dernière peut s'effectuer par une approche *top-down* ou *bottom-up* en fonction du polymère initial. Ces polymères sont pour la plupart hydrophobes, et peuvent naturellement avoir des groupements fonctionnels porteurs de charges anioniques ou cationiques. Il est ainsi possible de leur associer une grande variété de substances actives. Ces polymères sont produits à grande échelle et leur structure peut

être aisément modifiée par chimie organique et chimie verte. Il est possible d'ajouter ou de supprimer certaines fonctions chimiques, de greffer de manière covalente un autre polymère, un ligand ou une substance active, en amont de la synthèse de la particule.

Les polymères synthétiques les plus représentés dans la littérature sont les acides polylactiques (PLA), les acides polyglycoliques (PGA) et leur copolymère l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA), *cf.* Figure 6b. Approuvés pour l'utilisation humaine par la Food and Drug Administration (FDA), ils sont biodégradables par hydrolyse et parfaitement biocompatibles, ce qui entraîne une libération de la substance active au cours du temps tout en évitant l'accumulation dans les tissus (16). Il est possible de les modifier chimiquement par synthèse organique en vue de leur greffer une variété de fonction chimiques (terminaisons -COOH, -NH<sub>2</sub>, -NHS ...) ou d'autres polymères comme du polyéthylène glycol (PEG), de faire varier précisément le ratio PLA :PGA dans le cas des copolymères de PLGA, ou encore de faire varier la longueur de la chaîne polymérique pour modifier le temps de dégradation de la particule (de environ 1000 Da à plus de 150 000 Da).

Les nanoparticules de PLA, PGA et PLGA peuvent être synthétisées par différentes méthodes (nanoprécipitation, émulsification, évaporation de solvant..) rendant possible le contrôle du diamètre des vecteurs et de la qualité de l'association de médicament, mais qui nécessitent toutes l'utilisation de solvants organiques plus ou moins toxiques (acétone, dichlorométhane, chloroforme...) en raison de leur faible solubilité dans les solvants aqueux, ce qui doit être pris en compte pour prévenir la dégradation potentielle de la substance active durant l'association, ainsi que la toxicité résiduelle après administration. Par ailleurs la stabilité colloïdale de ces NPs dépasse rarement plusieurs mois dû à leur tendance à s'agréger, ce qui, selon la technique de synthèse, peut nécessiter l'utilisation de surfactants, souvent toxiques. De nombreux autres polymères synthétiques sont utilisés dans la synthèse de particules dont les plus représentatifs sont les polystyrènes, les polycaprolactones (PCL), les polyacides aminés (poly-L-lysine (PLL), polyglutamate), les polypeptides ou encore les polyacrylates (PAA), tous ayant des avantages et inconvénients en termes de synthèse, de stabilité et de biodégradabilité, liés à leur structure physico-chimique.

Les polymères naturels sont quant à eux présents en abondance dans la nature, et sont pour la plupart polysaccharidiques. Ces polysaccharidiques peuvent servir de réservoir d'énergie (comme par exemple l'amidon), de structure protectrice rigide (*e.g.* la cellulose chez les végétaux, les bêta-glucanes chez les levures ou la chitine chez les crustacés) ou de structure d'ancrage cellulaire (acide hyaluronique, chondroïtine sulfate...). Il existe une très grande variété de polysaccharides utilisés en nanomédecine en raison de leur biocompatibilité, leur absence de toxicité, et leur solubilité en solvants aqueux. De même que pour les polymères synthétiques, il est possible de leur associer des substances actives hydrophiles comme hydrophobes selon leur structure chimique et leur hydrophobicité. Certains polymères sont de plus naturellement porteurs de charges anioniques (acide hyaluronique, alginate, pectine...) ce qui peut simplifier leur modification et l'association d'autres molécules et médicaments par association électrostatique. L'un des polysaccharides les plus utilisés en synthèse de NPs est le chitosan (Figure 6c) : issu de la désacétylation de la chitine, ce polymère de glucosamine est totalement biocompatible et non toxique, et possède naturellement des charges cationiques (17). Ce paramètre permet aux NPs de chitosan l'encapsulation de protéines et d'acides nucléiques par liaisons électrostatiques, ainsi que d'interagir de manière plus importante avec les cellules et les membranes biologiques. Ces différentes propriétés font du chitosan l'un des polymères les plus souvent utilisés pour recouvrir d'autres NPs, améliorant leur bioadhésion (18).

Les polymères naturels protéiques tels que l'albumine et la caséine qui sont issues des animaux, ou la zéine qui est issue de végétaux, sont aussi fréquemment utilisés en synthèse de NPs, et possèdent des propriétés de biodégradabilité et biocompatibilité semblables aux polysaccharides. En revanche ils sont moins stables compte tenu de la présence abondante de protéases dans l'environnement, et restent sensibles à l'agrégation lorsque le pH *in vivo* avoisine celui de leur point isoélectrique (19). Des nanomédicaments issus de polymères protéiques existent déjà sur le marché, dont le chef de file est l'Abraxane<sup>®</sup>, autorisée chez l'humain en 2005, qui consiste en une formulation de paclitaxel encapsulé dans une matrice d'albumine, permettant d'améliorer à la fois la demi-vie du médicament et sa délivrance (20).

*Les polyplexes*

Parallèlement aux nanosphères, les polymères peuvent être utilisés pour la synthèse de NPs appelées polyplexes. Ces vecteurs sont constitués de polymères synthétiques et polycationiques (PLL, polyéthylène imine (PEI)...), leur offrant la capacité de se complexer avec des protéines et des acides nucléiques (14,21). La complexation de ces deux entités peut former des particules de 50 nm à 500 nm, pouvant être sphérique, linéaire ou micellaire, non immunogène (Figure 6a). Ils améliorent la biodisponibilité et la transfection de matériels génétiques, principalement des siRNA, en vue de développer de nouvelles thérapies anti-tumorales basées sur l'extinction de gènes (22,23). La densité de charges cationiques permet à ces polymères d'encapsuler une quantité d'acides nucléiques plus importante que les vecteurs viraux, mais peut entraîner une agrégation rapide ainsi que des interactions non désirées avec les substances biologiques (opsonisation, bioadhésion...) (24). C'est la raison pour laquelle de nouveaux polymères sont étudiés, dans l'objectif d'améliorer la biodisponibilité de ces vecteurs par association à d'autres polymères neutres et hydrophiles, comme le polyéthylène glycol (PEG) (25).

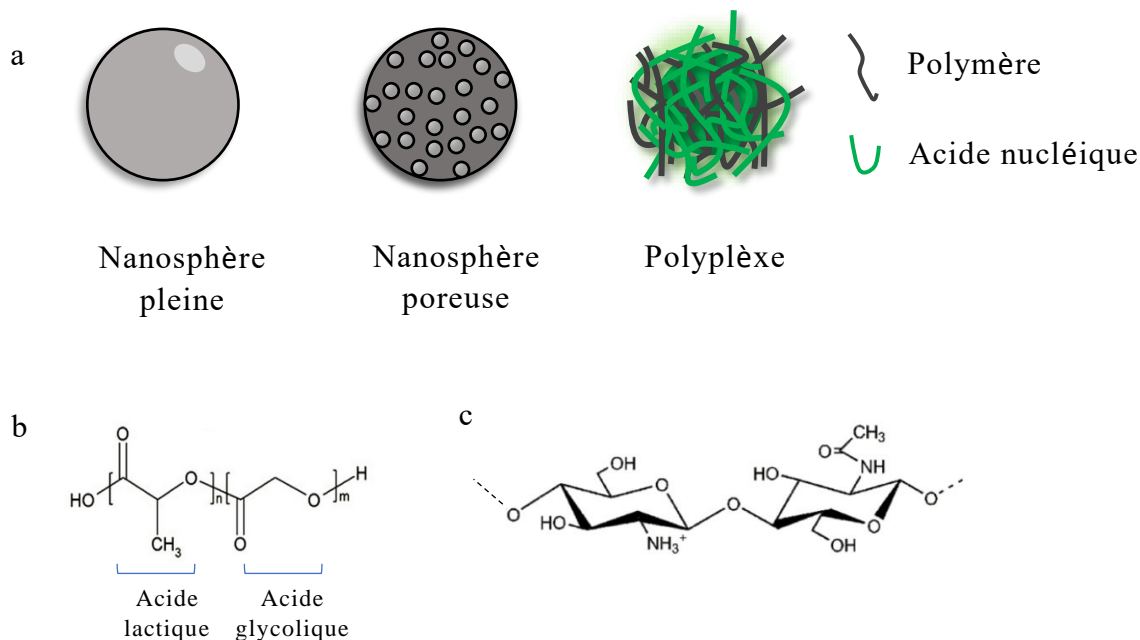


Figure 6 : Représentation schématiques de nanosphères pleine et poreuse et d'un polyplèxe polymère :acide nucléique (a) ; structure moléculaire d'un polymère de PLGA (b) et de chitosan (c).

### *Les dendrimères*

Les dendrimères (du grec *dendron* signifiant *arbre*) sont des particules synthétisées à partir de polymères branchés en réseaux, avec une architecture ramifiée autour d'un cœur moléculaire. Le premier polymère utilisé à ces fins est le polyamidoamine (PAMAM), suivi par les polypropylèneimine (PPI), la PLL, ou les phosphohydrazones (PPH). Ils sont produits grâce à une synthèse organique précise et contrôlée et possèdent une forme majoritairement sphérique et une taille nanométrique variable selon le degré de branchement, aussi appelé génération (G) (26). Ainsi, un dendrimère de PAMAM sans ramification (G0) possède un diamètre d'environ 1,5 nm alors qu'un dendrimère de sept générations (G7) aura un diamètre de 8,1 nm (27). La dernière génération est souvent fonctionnalisée par des groupements chimiques pouvant être hydrophiles (dendrimères de polyesters), hydrophobes (dendrimères de carbosilanes) mais aussi et le plus souvent porteurs de charges cationiques (PAMAM, PPI...) ou anioniques (PPH...), avec une densité de charge proportionnelle à la génération (Figure 7) (28). Ces dendrimères peuvent ainsi être considérés comme des squelettes nanoparticulaires sur lesquels pourront se greffer de manière électrostatique ou covalente des molécules d'intérêt, comme des ligands de ciblage et des substances actives. Ainsi, la maîtrise fine de la synthèse de ces vecteurs, aidée par un choix de polymère de plus en plus vaste, a permis le développement de nanomédicaments chimiothérapeutiques, anti-inflammatoires et antiviraux (26). En revanche les dendrimères cationiques et ceux ayant un nombre important de générations ont une toxicité plus élevée, par liaisons et formation de pores dans les membranes plasmiques (29). De plus, la complexité des étapes de synthèse de ces vecteurs rend leur synthèse à grande échelle difficile, ce qui ralentit la translation vers les essais cliniques.

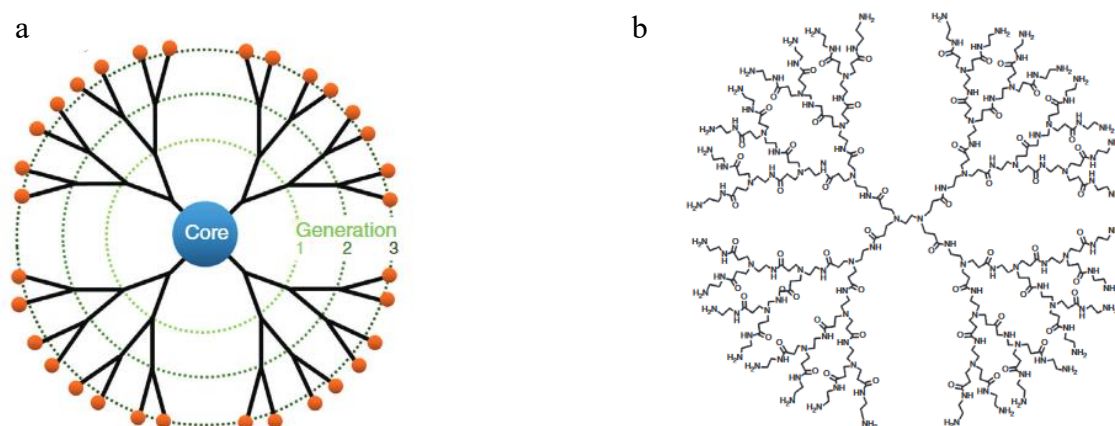


Figure 7 : Représentation d'un dendrimère de polyamidoamine (PAMAM) de 3 générations sous forme schématique (a) et moléculaire (b) (Hsu et al., 2017).

### *Les pseudo-particules virales*

Les particules virales (VLPs pour *virus-like particles*) sont une famille de vecteurs fabriqués à partir de capsides de virus déjà existants, dans lesquelles sont encapsulées des substances actives. Le terme VLP peut englober les capsides virales sans matériel génétique, des structures virales dont le matériel et/ou la surface a été modifiée chimiquement en vue de cibler un tissu à traiter, ou des particules recombinantes mimant la structure de virus naturels et exprimant des protéines d'intérêt. Ces dernières sont actuellement les plus étudiées grâce à la possibilité de concevoir des vecteurs à façon, et leur utilisation s'est accélérée grâce aux progrès de la biologie moléculaire. La production de VLPs s'effectue en effet par clonage des plasmides d'intérêt, portant la séquence génétique du vecteur à synthétiser, dans des bactéries, des levures ou des cellules d'insectes, avec des taux de productions très importants, ce qui facilite leur utilisation pour l'humain. Il existe aujourd'hui des centaines de VLP différentes synthétisées à partir de plus d'une trentaine de familles de virus, avec des structures (capside, paroi, matériel génétique) et des tailles variables selon les vecteurs d'origine (20 nm – 2 µm) (30,31). On retrouve aujourd'hui ces vecteurs principalement dans le développement de vaccins. En effet leur structure tridimensionnelle ainsi que la possibilité d'exprimer à leur surface des épitopes permet une forte reconnaissance par le système immunitaire, et l'induction de réponses cellulaires et humorale. Les VLPs font ainsi partie des stratégies principales dans le développement des vaccins modernes, principalement contre des pathologies virales.

La synthèse de ces vecteurs peut cependant présenter de nombreux challenges : une modification de la structure initiale d'un virus peut en effet diminuer grandement sa stabilité ; il est de plus difficile de garantir que l'expression d'une protéine d'intérêt puisse rendre cette protéine fonctionnelle et/ou accessible en surface du vecteur, notamment en cas de protéines multimériques (32). Les stratégies actuelles privilégient ainsi des approches de production de VLPs recombinantes exprimant à leur surface des groupements réactifs (biotine, groupement -NH<sub>2</sub> terminaux, acides aminés non naturels...), modifiées ensuite par synthèse chimique. Outre le greffage de molécule de ciblage, cette stratégie permet d'associer des médicaments en surface de ces vecteurs, afin d'étendre leur utilisation à la vectorisation de substances actives (30).

### 1.3.3. Les Particules inorganiques

Les NPs inorganiques ou métalliques furent initialement développées principalement comme agents de contraste pour l'imagerie diagnostique, grâce à leur capacité d'absorber et diffracter les ondes électromagnétiques. On les retrouve aujourd'hui dans des applications beaucoup plus diverses comme la délivrance de gènes et de médicament, la thérapie photothermique, ou la radiomédecine. L'utilisation de ces NPs à des fins combinées de thérapie et de diagnostic a mené à l'émergence d'une discipline, la théranostique. Les particules inorganiques majoritairement utilisées sont composées d'oxydes de Fer, de Silice, d'argent ou de métaux semi-conducteurs (Figure 8).

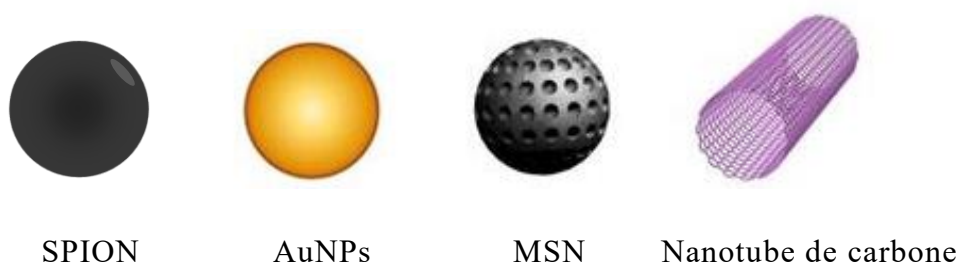


Figure 8 : Représentation schématique de NPs inorganiques. SPION : Super Paramagnetic Iron Oxide NPs ; AuNPs : NPs d'or ; MSN : Mesoporous Silica NPs. Adapté de Chattopadhyay et al., 2017.

*Les particules d'oxyde de Fer*

Les particules d'oxydes de Fer  $Fe_2O_3$  (IONP pour *Iron Oxide Nanoparticles*) ont fait partie des premières NPs développées pour une utilisation humaine comme agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), avec la commercialisation de l'Endorem® en 1994, ou du Feridex® en 1996 pour les cancers du foie. En effet, ces oxydes d'une centaine de nanomètres possèdent des propriétés super-paramagnétiques : à la différence du Fer non oxydé, ces SPION (*super-paramagnetic IONP*) n'ont pas de magnétisme intrinsèque, mais sont capable d'être magnétisées par un champ électromagnétique externe. Après extinction du champ, le magnétisme des particules s'éteint par relaxation (33). Ces propriétés permettent aux SPION d'être utilisés pour de l'imagerie, de la délivrance ciblée par magnétisme ou de la thérapie thermique, et d'éviter l'agrégation *in vivo*, notamment après administration (34). Généralement, ces vecteurs sont classés en deux catégories selon leur taille : les SPION sont les vecteurs d'une taille supérieure à 50 nm, et les USPION (*ultrasmall SPION*) ont une taille inférieure à 50 nm (35). Enfin la surface de ces vecteurs peut être modifiée chimiquement pour pouvoir associer par liaison covalente ou électrostatique des ligands de ciblage (ligand spécifiques, anticorps..) ainsi que des agents thérapeutiques (molécules chimiothérapeutiques, ARN anti-sens (siRNA pour *small interfering ribonucleic acid*)...), permettant d'étendre les utilisations de ces vecteurs en théranostique (36,37). Ces NPs sont synthétisées par synthèse chimique (pyrolyse, réactions acide-base et d'oxydo-réduction...) nécessitant l'utilisation de solvants toxiques. Elles peuvent de plus avoir une toxicité intrinsèque non négligeable, en générant un stress oxydatif et une perturbation des flux calciques dans les cellules où elles s'accumulent. Ces effets peuvent entraîner des dommages de l'ADN et des structures intracellulaires, et provoquer l'apoptose des cellules. Ainsi des stratégies visant à réduire cette toxicité sont mis à l'œuvre, par exemple en recouvrant ces vecteurs avec des polymères biocompatibles (34). Cette toxicité peut à *contrario* être utilisée pour entraîner l'apoptose de cellules cibles comme les cellules cancéreuses. Ainsi l'accumulation ciblée au sein d'une tumeur permettra sa destruction sans utiliser d'agents thérapeutiques.



*Les NPs de silice*

Les particules de silice  $\text{SiO}_2$  peuvent être pleines ou mésoporeuses selon la méthode de synthèse et la structure chimique des siloxanes (-O-Si-O-), précurseurs choisis pour la synthèse, et possèdent de nombreux avantages dont une bonne biocompatibilité, une grande stabilité en milieu biologique et sont fonctionnalisables en surface (38,39). Ces modifications permettent de diminuer la toxicité et d'améliorer la bioadhésion de ces vecteurs par ajout de groupements anionique ou cationique, hydrophile ou hydrophobe (39,40). Il existe 2 méthodes principales de synthèse pour fabriquer ces particules : la méthode de Stöber, qui consiste à agréger les précurseur  $\text{SiO}_2$  en présence d'éthanol et d'hydroxyde d'ammonium, et des méthodes d'émulsification en présence de surfactant permettant l'obtention de particules de taille très homogènes (39). Les particules de silice mésoporeuses ont de plus l'avantage d'avoir des pores de diamètre variable (1 nm – 50 nm), augmentant considérablement leur rapport surface sur volume S/V (pouvant dépasser  $1000\text{m}^2/\text{g}$ ) ce qui leur confère la capacité d'associer de grandes quantités de substances actives. Ainsi elles sont utilisées comme vecteur pour développer des traitements anti-tumoraux par association de molécules de chimiothérapie, d'anticorps monoclonaux ou des siRNA, dans l'élaboration de vaccin par association et délivrance d'antigènes, ainsi que dans des approches théranostiques, par encapsulation et délivrance ciblée d'autre NPs métalliques (41).

*Les NPs d'or*

L'or est un matériau noble dont l'utilisation en médecine remonte à l'antiquité, et il est encore utilisé de nos jours pour ses propriétés anti-inflammatoires contre les rhumatismes ou la maladie de Crohn. Son utilisation sous forme nanoparticulaire s'étend à la science des matériaux, l'optique, l'électronique et à la nanomédecine. Les NPs d'or (AuNPs) peuvent être sphériques avec une taille comprise entre 1 nm et 100 nm, ou allongées (nano-fibre) avec une longueur atteignant plusieurs centaines de nanomètres. Ces particules sont synthétisées à partir d'or commercial  $\text{Hau}^{\text{III}}\text{Cl}_4$  grâce à de nombreuses méthodes de synthèse, et on greffe à leur surface, la plupart du temps, des groupements thiolés ou aminés, ce qui facilite leur fonctionnalisation et l'association de substances actives par greffage covalent ou électrostatique (42). L'or étant un élément non toxique, les AuNPs peuvent être retrouvées en thérapie par

délivrance de molécules (anti-tumoraux, anti-inflammatoires, siRNA...) ou par thérapie radiofréquence et photothermique. Elles sont de plus utilisées dans le diagnostic *in vivo* comme puissant agent de contraste (identification de cancers et de métastases), mais aussi *in vitro* en tant que catalyseurs de réaction d'oxydo-réduction (outils diagnostiques pour la maladie d'Alzheimer, la tuberculose ou l'hépatite B), (43). Ces particules ont cependant besoin de surfactants pour améliorer leur stabilité, ce qui peut entraîner de la toxicité résiduelle.

#### 1.3.4. Les nanocristaux

Un cristal est une structure tridimensionnelle organisée et stable, obtenue par précipitation d'une ou d'un mélange de molécules. Si le cristal est lui-même composé de plusieurs petits cristaux, de taille, d'organisation et d'orientation différente, on parle de structure polycristalline. A l'inverse, un cristal homogène et uniforme dans sa structure est dit monocristallin. En nanomédecine, les nanocristaux sont des particules monocristallines de taille nanométrique. Ces NPs sont composées de molécules insolubles en milieu aqueux, cristallisées sous forme d'un cœur solide ou amorphe, stabilisé par des agents stabilisants. L'utilisation d'un cristal à cette échelle augmente la surface spécifique du médicament (comparé à une poudre par exemple) et donc facilite sa dissolution (44). Ainsi, les nanocristaux peuvent être administrés par voie orale et surtout par voie i.v. ce qui est généralement impossible pour les médicaments insolubles. Les agents stabilisants peuvent être des surfactants (sodium dodecylsulfate (SDS)...), des polymères (polyvidone, dérivés de cellulose...), ou un mélange des deux, et ils permettent de stabiliser la structure de la particule en la recouvrant, et d'empêcher leur agrégation (45). Ces surfactants peuvent enfin modifier la charge de surface des particules. Le choix du stabilisant dans la synthèse de ces NPs est donc prépondérant, et dépend directement de la structure chimique et moléculaire du médicament à encapsuler. Ainsi, bien que de nombreux exemples réalisés *in vitro* aient attesté de la dissolution plus rapide des médicaments, il semble que leur biodisponibilité *in vivo* ne s'en retrouve pas nécessairement améliorée, à cause de phénomènes d'agrégation ou de re-précipitation du médicament (46). Les techniques de synthèse *bottom-up* sont principalement utilisées pour la synthèse de ces NPs, par

des techniques de nanoprecipitation. Des méthodes *top-down* peuvent aussi être employées (homogénéisation, perle de broyage...) pour les molécules insolubles dans les solvants organiques (47).

Les nanocristaux font partie des nanomédicaments les plus développés pour la santé humaine, avec aujourd'hui 15 produits sur le marché humain. Le premier fut le Rapamune®, un nanocristal de sirolimus (immunosuppresseur) stabilisé par du SDS et de l'hydroxypropyl-cellulose. Il est administré par voie orale, sous forme de tablette, et présente une distribution plasmatique plus importante (48).

### *Les Quantum Dots*

Les QD sont des nanocristaux de 1 nm à 10 nm utilisés principalement pour leurs propriétés optiques : synthétisés à partir d'atomes semi-conducteurs (Cadmium couplé au Sélénium, Technétium ou Soufre), la structure atomique de ces particules leur confère une fluorescence intrinsèque. Cette émission s'effectue à une longueur d'onde directement de la taille de la particule (49). Plus le diamètre est important, plus la longueur d'onde d'émission est grande. Les particules de 2 nm émettent une fluorescence bleue et les particules de 6 nm et plus émettent une fluorescence rouge (Figure 9). Leur rendement de fluorescence est très élevé, car 80 % de la lumière absorbée est réémise sous forme de fluorescence. On les retrouve ainsi principalement dans des applications de diagnostic, *in vitro* comme sondes fluorescentes de biomarqueurs (micro-array, immunofluorescence...) ou comme bio-senseurs intracellulaires (marquage de protéines de surface ou intracellulaires...), et *in vivo* chez les animaux comme agents d'imagerie (50). En raison de leur diamètre, il est possible de les encapsuler au sein d'autres NPs afin d'améliorer leur biocompatibilité. À cela s'ajoute la possibilité de leur greffer des substances actives, comme par exemple des agents anti-cancéreux, afin de les vectoriser. L'utilisation directe chez l'Homme comme agent d'imagerie demeure cependant difficile car la détection des émissions de fluorescence est rapidement limitée par la profondeur des tissus. De plus la libération d'ions Cadmium et leur accumulation dans les tissus par désagrégation des QD est source de toxicité. Pour cette raison, de nouveaux QD synthétisés à partir d'atomes biocompatibles (silice, carbone, cuivre...) sont actuellement étudiés (49,51).

## NPs de Cadmium-Sélénium

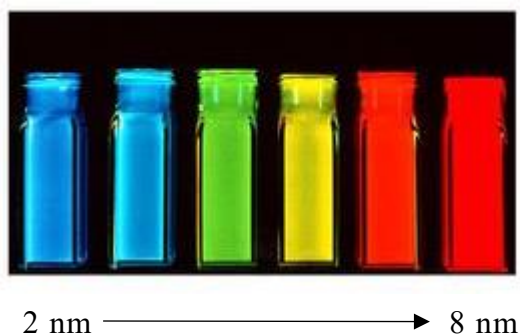


Figure 9 : Photographie de solutions de Quantum Dots de diamètres croissants, excités par une lumière bleue (450 nm).

Il existe ainsi une grande variété de matériaux pouvant être utilisés et combinés pour concevoir des NPs différentes en termes de taille, de stabilité, ou encore de charge de surface. Ces différents paramètres sont susceptibles d'influer sur la qualité de l'encapsulation des substances actives ainsi que sur leur délivrance dans les cellules. La conception d'un vecteur doit alors s'effectuer en prenant en compte l'application souhaitée, afin d'optimiser l'efficacité du nanomédicament synthétisé.

#### 1.4. Endocytose des NPs

Les substances actives sont des molécules de tailles variées dont l'efficacité est dépendante du ciblage de la cellule à traiter et de leur entrée au sein de la cellule jusqu'à la cible pharmacologique intracellulaire. L'entrée du médicament dans une cellule peut s'effectuer de différentes manières selon sa composition physico-chimique : certaines petites molécules hydrophobes peuvent par exemple passer à travers la membrane plasmique par diffusion passive, mais les mécanismes d'efflux empêche leur accumulation dans le cytoplasme ; à l'opposé la majorité des grandes molécules hydrophiles entrent plus difficilement dans les cellules car elles nécessitent une fixation à des récepteur de surface ou à des canaux d'entrée spécifiques, présents en nombre limité, et peuvent être rapidement dégradées ou rejetées une fois internalisées. Ainsi le rôle des NPs est d'améliorer l'efficacité des médicaments en augmentant leur passage des barrières biologiques, leur accumulation à proximité des cellules cibles et enfin leur délivrance à l'intérieur de ces cellules en contrebalançant

les mécanismes d'efflux et de dégradation. La taille des NPs étant souvent bien supérieure à celles des médicaments qu'elles transportent, leur entrée dans la cellule va s'effectuer par les différents mécanismes d'endocytose.

L'endocytose (du grec *endo*, signifiant « à l'intérieur » et *kutos*, signifiant « cellule, membrane ») est un ensemble de mécanismes permettant aux cellules eucaryotes (à l'exception des globules rouges) de capter des éléments exogènes et de tailles variées, ainsi que de recycler les composants de sa membrane plasmique. Ce phénomène hautement régulé s'effectue par une réorganisation locale de la structure membranaire, et fait intervenir les constituants lipidiques et protéiques enchâssés dans la membrane et sous-jacentes, ainsi que les protéines du cytosquelette (52). Le phénomène inverse, l'exocytose, permet quant à lui le relargage de substances intracellulaires vers le milieu extra-cellulaire, par fusion d'une vésicule d'exocytose avec la membrane plasmique. Il existe deux types majeurs d'endocytose chez les cellules eucaryotes : La micro-pinocytose et l'endocytose médiée par récepteur (EMR). La première, aussi appelée endocytose des phases fluides permet aux cellules d'internaliser les fluides de leur milieu extracellulaire, en vue de recevoir des signaux de l'environnement proche ainsi que pour renouveler les composants membranaires et intracellulaires. Ce processus est constitutif et ne nécessite pas de stimulus externe. Au contraire, l'EMR est activée par fixation d'un ligand sur un récepteur membranaire, entraînant la captation du complexe ligand-récepteur dans une vésicule d'endocytose. C'est le mécanisme privilégié dans la captation des NPs. Selon les types cellulaires et les mécanismes mis en jeu, on pourra distinguer deux formes d'EMR : la pinocytose et la phagocytose (Figure 10). Ces voies sont indépendantes les unes des autres mais peuvent avoir des issues et des acteurs communs.

### 1.4.1. La pinocytose

#### *Voie des clathrines*

La pinocytose médiée par la voie des clathrines (CME) est le mécanisme d'endocytose le mieux décrit dans la littérature, car il est effectué par toutes les cellules eucaryotes nucléées, et est hautement conservé chez les mammifères. Ce mécanisme est réalisé par l'action des clathrines, qui sont des protéines intracellulaires organisées en

triskelions. Elles déclenchent la formation de la vésicule d'endocytose, lorsqu'un stimulus est transmis par les récepteurs transmembranaires. Ainsi, suite à la fixation d'un ligand sur son récepteur, les clathrines et autres protéines de revêtement vont se lier à la partie intracellulaire du récepteur à l'aide de protéines d'assemblage (protéines AP) afin d'initier une invagination de la membrane plasmique, pour former un puits recouvert de clathrine (CCP pour *clathrin-coated pit*) (53). L'invagination entraîne la formation d'une vésicule recouverte de clathrine (CCV pour *clathrin-coated vesicle*) de 60 nm à 120 nm de diamètre, qui sera séparée de la membrane grâce aux protéines de scission (dynamine) et des filaments d'actine. Une fois dans le cytoplasme, les clathrines vont se dissocier de la vésicule pour devenir un endosome précoce (voie des endosomes). Le contenu de la vésicule sera ensuite redistribué en fonction de sa nature :

- Vers la membrane plasmique par des endosomes de recyclage en vue d'être exocytosé, ou d'être intégré dans la membrane (cas du recyclage des récepteurs membranaires) ;
- Vers d'autres organites dont l'appareil de Golgi par la voie rétro-golgienne, la mitochondrie ou le noyau ;
- Vers les lysosomes acides (pH 4,5) par l'intermédiaire des endosomes tardifs en vue d'être dégradé ;
- Vers le cytoplasme par échappement endosomal (cas de certains virus et particules).

Plus d'une centaine de protéines et lipides sont associées à l'initiation, la stabilisation et le transport de la vésicule (53,54). Les ligands permettant de déclencher cette voie sont variés, et on peut citer la transferrine, l'Apolipoprotéine B, l'EGF (*epidermal growth factor*), l'Immunoglobuline G (IgG) ou encore certaines toxines bactériennes (52,55).

#### *Voie des cavéoles*

La pinocytose médiée par la voie des cavéoles a été découverte lors d'observations par microscopie électronique de la structure des membranes cellulaires. Les cavéoles sont des invaginations préexistantes dans la membrane plasmique, d'environ 50 nm à 80 nm de diamètre, riches en éléments lipidiques dont le cholestérol et les

sphingolipides, et en cavéolines oligomérisées (56). Elles sont présentes à des taux variables dans les tissus humains. En effet, on les trouve en abondance sur la membrane des cellules musculaires lisses ou des cellules endothéliales alors qu'elles ne sont pas présentes sur celles des lymphocytes. Les cavéolines sont des protéines transmembranaires qui permettent la stabilité des vésicules formées. Ainsi leur déplétion ou leur surexpression permettent respectivement d'inhiber ou de potentialiser cette voie d'endocytose (57). De même la déplétion en cholestérol par des inhibiteurs pharmacologiques (filipine, M- $\beta$ -cyclodextrines...) inhibe fortement la formation des vésicules. Le mécanisme par lequel l'entrée d'un ligand au sein d'une invagination (ex : l'albumine, la toxine du choléra...) déclenche la formation d'une vésicule d'endocytose demeure imprécis et semble dépendre des types cellulaires (56,58). En revanche la formation de la vésicule s'effectue, à l'image des CCP, par action de la dynamine qui permet la scission entre le puits formé et la membrane. La vésicule créée est dite lisse car elle n'est pas recouverte d'un manteau protéique, à l'inverse cette fois-ci des CCV. Il a longtemps été suggéré que les vésicules ainsi formées rejoignent un compartiment appelé cavéosome, évitant ainsi la voie des endosomes et la dégradation lysosomale. Les observations les plus récentes tendent cependant à réfuter ce mécanisme et suggère que les vésicules rejoignent en réalité les endosomes précoces (59). En parallèle, certaines vésicules sont amenées à traverser la cellule du pôle apical ou basal vers le pôle opposé en vue d'être exocytées. Ce mécanisme appelé « transcytose » sera décrit ci-dessous.

### *La macropinocytose*

La macropinocytose est une voie d'endocytose indépendante des clathrines et des cavéoles, retrouvée chez la plupart des cellules de l'organisme. Elle consiste en la formation d'une large protrusion membranaire capable de capter un grand volume du contenu extracellulaire (de 0,5  $\mu\text{m}$  à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre). Ce phénomène hautement régulé est induit par la fixation de ligand sur des récepteurs tyrosine kinase ou par la présence de corps apoptotique, initiant l'activité de Rho-GTPase et la réorganisation de l'actine, et peut être la voie d'entrée de certaines toxines bactériennes et de virus (57). Les vésicules formées sont appelées macropinosomes et fusionnent en général avec les endosomes pour soit adresser le contenu vers les lysosomes, soit recycler leur

contenu vers la membrane plasmique. Cette voie est notamment utilisée dans les processus de captation d'antigène par les macrophages et les cellules dendritiques.

#### *Pinocytose par des voies indépendantes*

Il existe d'autres voies de pinocytose indépendante des clathrines et des cavéoles. Ces voies incluent d'autres effecteurs protéiques et lipidiques membranaires. On peut ainsi trouver l'endocytose médiée par les radeaux lipidiques, par les zones enrichies en glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI), ou par les protéines IL2R $\beta$ , Arf6 et flotilline. Il est commun de classer ces différentes voies en fonction de leur dépendance à la dynamine lors de la formation des vésicules d'endocytose : les voies des radeaux lipidiques, de l'IL2R $\beta$  et de la flotilline en sont dépendante, contrairement aux autres citées (52).

#### 1.4.2. La phagocytose

La phagocytose est une voie d'endocytose réalisée uniquement par des cellules spécialisées appelées cellules phagocytaires, que sont les macrophages, les cellules dendritiques, et les polynucléaires neutrophiles. C'est la voie privilégiée en vue de nettoyer l'organisme en captant et dégradant les débris cellulaires, corps apoptotiques, particules exogènes et pathogènes. Ce mécanisme permet ainsi la captation d'élément de 0,5  $\mu\text{m}$  à 20  $\mu\text{m}$ , par prolongement de la membrane plasmique en pseudopodes autour de ces éléments. Ces cellules ont ainsi une membrane extrêmement flexible et la capacité de réarranger rapidement leur cytosquelette. La reconnaissance d'un élément à phagocyter peut se faire par la reconnaissance de motifs moléculaires via des récepteurs aux lectines ou des récepteurs scavengers présents en surface des cellules phagocytaires, ou par fixation d'éléments préalablement opsonisés (c'est-à-dire recouvert par des protéines du complément ou des immunoglobulines (IgM et IgG)) sur leur récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines (60). La fixation entraîne une polymérisation rapide des filaments d'actine médiée par les Rho-GTPases, une réorganisation moléculaire de la membrane et la formation de pseudopodes s'allongeant autour de l'élément à internaliser. La vésicule néo-formée s'appelle un



phagosome (pH 5) et adressera son contenu vers les lysosomes acides (pH5), formant un phagolysosome, en vue de le dégrader.

#### 1.4.3. La transcytose

La transcytose est un mécanisme d'endocytose particulier permettant à un élément biologique de passer au travers d'un endothélium ou un épithélium. Ce mécanisme se divise en une phase d'endocytose où le matériel est internalisé par l'un des pôles basal ou apical de la cellule, puis par une phase d'exocytose où il est relargué par le pôle opposé. Ce mécanisme permet le passage de macromolécules malgré la présence des jonctions serrées (ex : transcytose des IgA sécrétoires du pôle basal vers le pôle apical des épithéliums respiratoires). Il est plus ou moins fréquemment retrouvé selon les épithéliums.

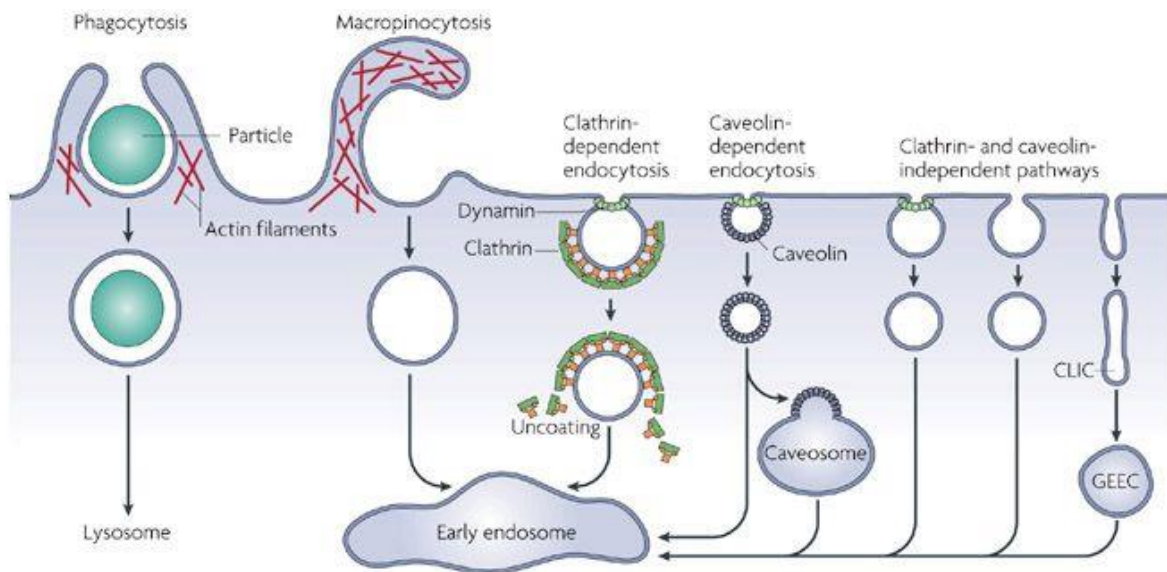


Figure 10 : Représentation schématique des différentes voies d'endocytose empruntées par les NPs (61)

## 1.4.4. Paramètres affectant l'endocytose des NPs

L'endocytose est un mécanisme important à maîtriser lors de l'élaboration d'un nanomédicament. Il existe ainsi certains paramètres physico-chimiques qu'il est possible de modifier lors de la synthèse d'un vecteur en vue d'améliorer sa prise en charge par les cellules ciblées. L'étude de l'endocytose est souvent réalisée sur cellules en culture et en présence d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des voies d'endocytose (62).

*Diamètre des NPs*

Le diamètre des NPs a une influence considérable sur la prise en charge par les cellules quelle que soit leur composition physico-chimique, et peut influencer tant la cinétique d'endocytose que la voie empruntée. Il a en effet été constaté à de nombreuses reprises que les particules de moins de 50nm étaient captées plus rapidement que celles ayant un diamètre de 100 nm ou plus (63). Ce phénomène a par exemple été observé sur les cellules épithéliales (64–66), fibroblastiques (67) ou tumorales (41,68,69), avec des particules inorganique et polymériques. Il s'explique par le fait que la membrane des cellules non spécialisées dans la captation de gros éléments est moins flexible. Elles ne sont donc pas capable de former des vésicules de taille importante pour envelopper les particules plus volumineuses (70). Des études *in silico* suggèrent ainsi que le diamètre idéal permettant la déformation de la membrane plasmique est d'environ 30 nm. Il est difficile de conclure sur une relation étroite entre le diamètre d'une particule et la voie d'endocytose permettant son internalisation. Il semble en effet qu'une particule puisse entrer par différentes voies en simultanée, selon d'autres paramètres physico-chimiques, et que les voies des clathrines, des cavéoles et de la macropinocytose sont généralement privilégiées.

Pour les cellules phagocytaires, la flexibilité de leur membrane leur permet, en plus des voies d'endocytoses classiques, de capter par phagocytose des particules de taille plus importantes allant de 500 nm à plusieurs micromètres de diamètre (63). Cela permet de sélectionner des vecteurs ciblant une délivrance au sein de ces cellules, tout en évitant d'entrer dans les autres. Il est à souligner que l'influence de la taille des

NPs sur leur endocytose est souvent difficile à appréhender, dû au fait que de petites particules peuvent s'agréger et former un cluster de taille plus importante, modifiant leur captation par les cellules.

### *Charge de surface*

La charge de surface influence la capacité des NPs à se lier à la surface des membranes cellulaires. En conditions physiologiques saines, les membranes plasmiques sont recouvertes de glycocalyx et de protéoglycanes transmembranaires anioniques sur leur partie extracellulaire (glycosaminoglycanes, héparane sulfate...). L'adhésion de NPs portant une surface cationique est donc plus importante, ce qui favorise une endocytose plus rapide et plus importante par des voies d'endocytoses non spécifiques. Ce phénomène a été observé sur des cellules épithéliales (71), cérébrales (72), phagocytaires (9) et tumorales (73), avec des particules polymériques et inorganiques. De plus, la densité de charges cationiques en surface des particules peut améliorer leur endocytose (74).

Il existe cependant des exemples contradictoires pour lesquels des particules anioniques étaient captées plus rapidement que leur équivalent cationique (75). Ces observations s'expliqueraient par la présence de régions membranaires dans lesquelles des macromolécules cationiques sont exprimées, et ce de manière plus ou moins fréquente selon les types cellulaires. Les particules anioniques s'accumuleraient ainsi en cluster au niveau de ces régions. De même, il semble que les particules de polystyrène cationiques soient mieux captées par un modèle d'épithélium intestinal, en empruntant la voie des clathrines, alors que leurs équivalents chargés négativement étaient capables de traverser cette épithélium par transcytose médiée par la voie des radeaux lipidiques (76).

Enfin les particules neutres semblent être faiblement captées par les cellules, en raison de plus faibles interactions avec les membranes. Ainsi les particules recouvertes de PEG ont un temps de résidence prolongé après administration car elles échappent à l'opsonisation et à la fixation sur les membranes cellulaires. En revanche elles semblent être moins performantes pour de la délivrance intracellulaire, quelles que soient leur composition moléculaire (77,78).

Lorsqu'une particule est administrée dans un milieu biologique, elle se retrouve recouverte par les protéines et macromolécules environnantes (albumine, facteurs de croissance, immunoglobulines...) qui finissent par former une couronne protéique (aussi appelée *protein corona*) (79). L'adsorption des protéines s'effectue par des liaisons de van der Waals et des interactions électrostatiques, selon la charge de surface de la particule. La formation de cette couronne peut grandement modifier la surface de la particule et donc ses interactions avec les cellules. Ainsi, les particules cationiques auraient tendance à accumuler une couronne protéique importante, leur conférant une charge de surface apparente anionique ; cela a pour conséquence de diminuer leur interaction avec les cellules et leur endocytose (80). Il apparaît également que le diamètre de la couronne protéique diminue la transcytose de NPs anioniques contrairement au cas des particules neutres, en raison d'un effet d'augmentation du diamètre hydrodynamique du vecteur (81).

Ces différents éléments montrent que la charge de surface d'un vecteur est donc un facteur important à prendre en compte dans son design, en vue de favoriser une délivrance intracellulaire.

### *Autres paramètres*

D'autres paramètres peuvent jouer sur l'endocytose des particules par des cellules cibles.

- La géométrie : les particules de formes oblongues semblent être mieux phagocytées par les macrophages que des particules sphériques ou plates (82,83) tandis que les particules sphériques s'avèrent être mieux endocytées par les cellules non spécialisées (70).
- L'élasticité : les NPs souples présentent une capacité à s'étendre sur la membrane plasmique, augmentant ainsi l'adhésion de surface mais diminuant l'endocytose, à cause d'une déformation de la membrane plus importante (70,84,85).
- La composition chimique : Bien qu'il n'y ait pas de lien évident entre le matériau utilisé et la voie d'endocytose emprunté, la composition chimique des vecteurs peut influencer leur endocytose. Les particules lipidiques et

hydrophobes sont par exemple plus fréquemment internalisées par les voies des cavéoles et des radeaux lipidiques que les autres types de particules. Les liposomes souples ont la possibilité d'échapper aux mécanisme d'endocytose, et de délivrer leur contenu directement dans le cytoplasme par fusion membranaire (86). Enfin, la composition lipidique des liposomes, et principalement l'augmentation du pourcentage en sphingomyéline, peut induire une diminution significative de l'endocytose par des macrophages (87).

Le design de NPs en vue de délivrer des médicaments nécessite d'étudier les mécanismes d'entrée dans les cellules cibles, ainsi que l'ensemble des paramètres favorisant cette internalisation. Si l'étude des voies d'endocytoses peut s'effectuer à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, celles concernant la qualité et la quantité des vecteurs internalisés s'avèrent être difficile à comparer. Cela nécessite en effet de prendre en compte les effets de la concentration en NPs déposés, du temps d'incubation et de la méthode d'analyse (cytométrie en flux, microscopie confocale ou électronique...).

### **1.5. Génération de NPs / ciblage**

L'intérêt principal des NPs réside dans leur capacité à pénétrer les tissus et à cibler un organe ou un type cellulaire donné. Ce ciblage peut être apporté par des caractéristiques physico-chimiques (diamètre, forme...), ou par différents types de fonctionnalisations de surface. Il est ainsi admis dans la littérature de les classer en 4 générations, en fonction de ce ciblage, le plus souvent suite à une administration IV (Figure 11).

#### **1.5.1. Première génération**

La première génération de nanoparticules se compose des NPs synthétisées sans modifications de surface. Leur intérêt est d'encapsuler des substances actives afin d'améliorer leur solubilité et leur absorption par l'organisme. La demi-vie systémique de ces formulations est cependant faible à cause de l'agrégation des particules avec

les composés du sang (opsonisation) et de l'importante captation par les macrophages du système phagocytaire mononucléaire qui s'en suit, quelques heures après injection (6,88). Ainsi la faible spécificité de ces premières NPs conduisit à l'amélioration du design, notamment par des modifications de surface.

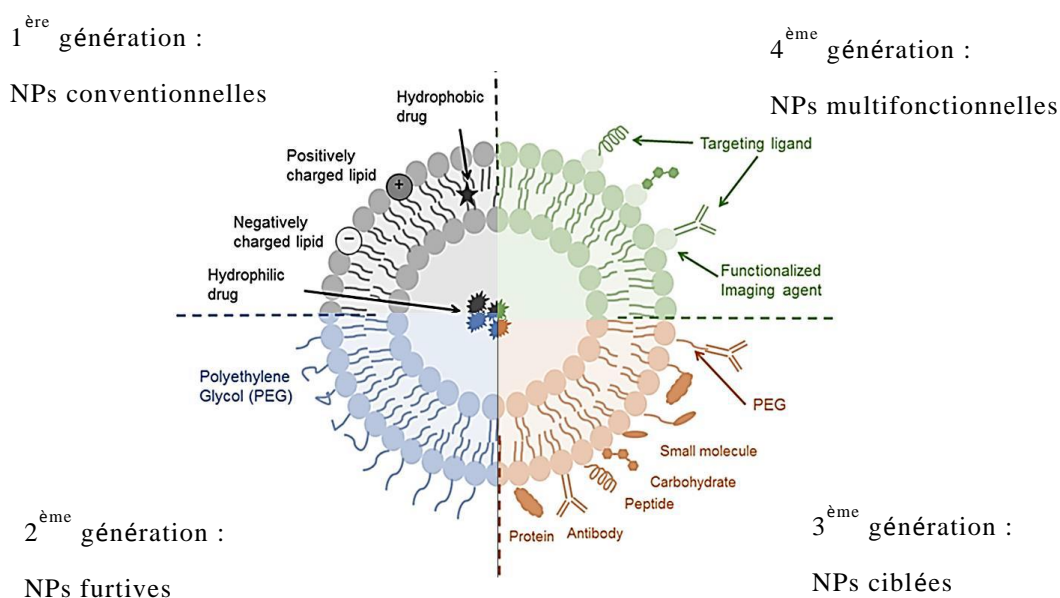


Figure 11 : Représentation schématisée des générations de nanoparticules appliquée aux liposomes.

### 1.5.2. Seconde génération

La seconde génération de NPs consiste à synthétiser des particules furtives vis-à-vis des systèmes de clairance sanguine. La fixation des opsonines (anticorps, protéines du complément, autres protéines sériques) et la phagocytose par les leucocytes circulants et tissulaires s'effectuent par reconnaissance d'éléments microbiens, ou par liaisons de natures électrostatique ou hydrophobe avec la surface des particules. Ainsi l'échappement à ces mécanismes de clairance peut être obtenu par ajout de polymères neutres et hydrophile en surface des NPs (6). A ce jour, le PEG reste le polymère le plus utilisé à ces fins. De nombreuses études ont montré que son greffage en surface de particules lipidiques, polymériques et inorganiques permet de diminuer l'association des opsonines ainsi que la phagocytose, augmentant par conséquent la

demi-vie des nanomédicaments dans le sang (89,90). Cette furtivité permet ainsi aux NPs de cibler les tissus cancéreux et de s'y accumuler de manière passive, en profitant de la perméabilité plus importante des endothéliums vasculaires néoformés (*enhanced permeability and retention* ou effet EPR). Cette accumulation permet ensuite le relargage du médicament encapsulé au niveau des tumeurs. Cette génération de NPs est celle qui a permis l'émergence des premiers nanomédicaments anticancéreux, comme le Doxil<sup>®</sup>, mais aussi de nombreux agents de contraste pour l'imagerie anticancéreuse. En revanche, malgré cette accumulation, l'hétérogénéité des tissus cancéreux (pH acide, matrice extracellulaire plus rigide...) empêche la plupart des NPs d'atteindre le cœur de la tumeur et de délivrer le médicament au plus proche des cellules tumorales. Cet inconvénient a été l'une des principales limites à la translation en clinique de nanomédicaments anticancéreux.

### 1.5.3. Troisième génération

La troisième génération de NPs consiste à greffer en surface des NPs un élément capable de cibler un type cellulaire de manière active et contrôlée, contrairement à la seconde génération. Un tel ciblage se doit d'être spécifique du tissu à traiter, et la mise en évidence de récepteurs membranaires surexprimés dans certaines pathologies a permis le design de NPs décorés de ligands ayant une forte affinité pour ces récepteurs. Ces ligands peuvent être des molécules, des peptides ou des anticorps ciblant par exemple les récepteurs aux folates, à la transferrine ou encore à l'EGF, tous trois surexprimés dans différents cas de cancers (91). Cette stratégie peut par ailleurs être employée pour cibler des tissus sains : le greffage du fragment Fc néonatal en surface de NPs entraîne par exemple un ciblage actif des entérocytes après administration orale, améliorant ainsi la transcytose à travers la barrière intestinale, et ouvrant la possibilité d'améliorer l'absorption d'insuline par voie orale (92). En outre il est possible pour les vecteurs de cette génération de combiner furtivité et ciblage dans le design de nanovecteurs, afin d'améliorer à la fois la demi-vie et la spécificité du nanomédicament.

## 1.5.4. Quatrième génération

Enfin la quatrième génération de NPs consiste dans la synthèse de vecteurs plus complexes capable de cibler et de délivrer une substance active au niveau d'un compartiment intracellulaire précis. Comme vu précédemment, la captation des nanoparticules va être dépendante du type cellulaire mais aussi des caractéristiques propres des NPs. Ainsi la fixation de ligand déclenchant préférentiellement une voie d'endocytose va engendrer un devenir différent du nanomédicament. La majorité des médicaments ont une action au niveau cytoplasmique, lieu où s'effectue un grand nombre de processus biologiques. En revanche le premier compartiment rencontré par les particules après endocytose par des cellules non spécialisées est souvent le système endolysosomal, lieu où les NPs et leur contenu sont en général dégradés (93); la délivrance cytoplasmique peut alors être accomplie par échappement des endosomes en profitant du pH acide de ces derniers. En effet le greffage de polymères sensibles au pH en surface des NPs peut entraîner la disruption de l'organelle, et la libération de la particule et de son contenu dans le cytoplasme. Une autre méthode de ciblage du cytoplasme consiste à greffer en surface des vecteurs des peptides de pénétration cellulaire (CPP). Les mécanismes d'action précis de ces peptides ne sont pas encore parfaitement élucidés, mais on sait que leur action peut intervenir par liaison avec certains phospholipides membranaires, ou encore par formation de micelles dans la membrane, induisant alors une délivrance intra-cytoplasmique sans passer par le système endolysosomal (94). Une délivrance au niveau d'autres organites peut s'avérer utile, au niveau mitochondrial dans le cas par exemple de cancers liés à des dysfonctions mitochondriales, ou encore dans le noyau pour améliorer entre autres l'efficacité de la délivrance d'acide désoxyribonucléique (ADN). Dans ces deux exemples, le greffage de ligands spécifiques permet une reconnaissance avec les membranes des organites (la guanidinium cyclique, le triphenylphosphonium ou l'octaarginine permettent de cibler la mitochondrie, le peptide NLS ou le peptide KKKRKV des virus SV40 permettent de cibler le noyau) (91,95). Ainsi Il existe de nombreux exemples de stratégies permettant de délivrer une NP et son contenu précisément au sein d'une cellule. Ces stratégies sont possibles grâce à l'immense variété de possibilité qu'offre le design de nanoparticules. Il est cependant à prendre en compte, en vue d'une course à la délivrance de plus en plus précise et efficace, que



plus un vecteur sera complexe, plus sa conception et sa stabilité sera difficile à maîtriser. Cet aspect peut être un facteur limitant dans la translation vers une fabrication du vecteur à grande échelle en vue d'une commercialisation potentielle.

### **1.6. Conclusion intermédiaire**

Les NPs sont des outils prometteurs dans le développement de thérapies plus efficaces et plus sûres. Aujourd'hui la nanomédecine s'articule autour des thérapies ciblées anti-cancéreuses, mais aussi de la médecine régénératrice, du vaccin, de la thérapie hormonale et de l'imagerie médicale.

Si les possibilités qu'offrent les nanotechnologies en termes de choix de matériaux et de techniques de synthèse, accompagnées par une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques, ont ouvert un champ d'action de plus en plus vaste dans l'émergence de nouveaux nanomédicaments depuis la fin des années 90, force est de constater qu'il existe une forte disparité entre le nombre extrêmement important de publications dans ce domaine, et le nombre bien plus restreint de nanomédicaments en phases cliniques et sur le marché (96). Cet écart s'explique principalement par une transition difficile entre la synthèse de laboratoire, et les critères de fabrication demandés en phase clinique. Ces critères incluent la possibilité de réaliser une montée d'échelle dans les volumes et les quantités de particules synthétisées, un rendement et une caractérisation reproductibles et standardisables, et une stabilité au long terme dans des conditions représentatives de leur utilisation (stabilité vis à vis des changements de température par exemple). Cette transition est d'autant plus difficile que le vecteur est fonctionnalisé. Ainsi, la possibilité d'une production à l'échelle industrielle se doit d'être un des critères principaux dans le design d'un vecteur, quelle que soit sa vocation thérapeutique. De même, de nombreux nanomédicaments ayant montré une efficacité thérapeutique chez des modèles animaux se sont révélés être peu efficaces chez l'humain, en raison de différences inter-espèces difficilement prévisibles (physiopathologie différente, bénéfice thérapeutique insuffisant comparé aux thérapies actuelles, toxicité plus importante chez l'humain...).

Les exemples de réussites et d'échecs que nous ont offerts ces 30 dernières années doivent ainsi nous permettre de prendre le recul nécessaire, pour concevoir des vecteurs capables de répondre à ces nombreux défis.

## 2. Les nanoparticules pour délivrer des vaccins par voie muqueuse

La vaccination est reconnue comme l'une des plus grandes avancées médicales de l'histoire récente de l'humanité. Depuis les travaux d'Edward Jenner sur la vaccine en 1796, des progrès considérables ont été réalisés pour comprendre et démocratiser cet acte médical. On estime en effet que la vaccination permet d'éviter chaque année dans le monde des millions de décès dus à des infections. Elle est ainsi considérée comme l'une des thérapies les plus efficaces et les plus économiques. A ce jour, grâce aux politiques de vaccination, la variole a été éradiquée, la prévalence de la poliomyélite a diminué de 99 %, et celles de la rougeole, de la tuberculose, du tétanos, de la diphtérie et de la coqueluche ont drastiquement diminué, tout comme la mortalité associée. En ce sens, la recherche essaie de développer des vaccins capables de stimuler le système immunitaire contre de plus en plus de maladies infectieuses, en ciblant les infections virales, bactériennes et parasitaires, mais aussi les cancers ou les addictions aux drogues.

La vaccinologie est ainsi aujourd'hui un champ d'étude et d'innovation permanent pour lutter contre les maladies infectieuses déjà existantes et contre celles à venir, ainsi que pour pallier la perte d'efficacité de plus en plus rapide des antibiotiques, en raison de l'adaptation des micro-organismes aux médicaments. En ce sens, grâce aux progrès réalisés dans les différents domaines de la biologie depuis le XIX<sup>e</sup> siècle, différentes stratégies sont étudiées pour permettre aux cellules du système immunitaire de mieux interagir avec les antigènes administrés et d'initier une défense efficace et au long terme contre le pathogène ciblé.

### 2.1. Principes généraux sur la vaccination

#### 2.1.1. Vaccin et immunité

Suite à l'introduction d'un pathogène dans l'organisme, la réponse immunitaire générée peut se distinguer en deux conséquences successives : la réponse innée et la réponse adaptative (97). Les pathogènes possèdent à leur surface des patterns antigéniques spécifiques, les *Pathogen-Associated Molecular Pattern* (PAMP),

naturellement reconnus par les cellules immunitaires circulantes, comme les polynucléaires, les macrophages ou les cellules dendritiques. Cette reconnaissance s'effectue par des récepteurs spécifiques, dont les « *Pattern Recognition Receptors* » (PRR) incluant les *Toll like Receptors* (TLR) et les *C-type Lectine Receptors* (CLR) liés à la membrane, et les *Nod-like Receptors* (NLR) et *RIG-1 like Receptors* (RLR) intracellulaires (98). La reconnaissance d'un pathogène potentiel va déclencher une cascade d'évènements caractéristiques de l'immunité innée permettant son élimination rapide de l'organisme, dont le recrutement des cellules *natural killer* (NK), des cellules polynucléaires et des cellules phagocytaires (cellules dendritiques (CD) et monocytes/macrophages), la sécrétion de chémokines et cytokines pro-inflammatoires, ainsi que l'opsonisation et la phagocytose du pathogène (97,99). Selon l'immunogénicité de l'antigène administré, les CD et les macrophages naïfs ayant phagocyté l'élément exogène vont se différencier en cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette maturation va entraîner l'exposition des fragments antigéniques à la surface des cellules, *via* le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), ainsi que la migration de ces CPA par les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (les ganglions lymphatiques drainants et la rate), afin de présenter les fragments antigéniques aux cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes B (L<sub>B</sub>) et T (L<sub>T</sub>) (Figure 12). Certains antigènes parviennent par ailleurs à atteindre ces organes sans avoir été capturés par les CPA. Dans les organes lymphoïdes, les L<sub>T</sub> et les L<sub>B</sub> sont localisées dans des zones séparées et distinctes, et la présentation des antigènes à l'une ou l'autre de ces cellules naïves va entraîner différents types de réponse adaptative (100).

La présentation des antigènes par les CPA aux L<sub>T</sub> s'effectue en 3 signaux distincts : la reconnaissance du complexe CMH/antigène par le récepteur des lymphocytes (*T-cell receptor* ou TCR) (signal I), l'expression par les CPA de molécules transmembranaires de costimulation CD40, CD80 et CD86 (signal II) puis la sécrétion de cytokines favorisant la maturation des lymphocytes (signal III) (97,100). On distingue deux types de L<sub>T</sub> selon la nature de leur corécepteur de TCR : les L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> et les L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup>. L'activation de ces deux sous-populations va médier différents types de réponse immunitaire. La présentation des fragments antigéniques aux L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> est effectuée par le CMH de classe I (CMH I) des CPA, et permettra à ces lymphocytes de se différencier en L<sub>T</sub> cytotoxiques (L<sub>TC</sub>) capables de reconnaître spécifiquement les

pathogènes intracellulaires, et de les tuer par sécrétion de toxines (immunité dite **cellulaire**) (100,101). La présentation des fragments antigéniques aux  $L_T CD4^+$  est effectuée par le CMH de classe II (CMH II), et permettra aux cellules de se différencier en lymphocyte « helper » ( $L_{TH}$ ). On distingue :

- la voie **Th1**, dans laquelle leur rôle sera de promouvoir la différenciation des  $L_{TC}$ ,
- la voie **Th2** dans laquelle ils déclencheront la maturation des  $L_B$  en plasmocytes et la sécrétion d'anticorps neutralisants (immunité dite **humorale**),
- la voie **Th17** par laquelle ils réguleront la balance anti- et pro-inflammatoire sur les sites d'infection, par sécrétions de cocktails de cytokines spécifiques (102,103).

Au cours de leur maturation, une sous-population des  $L_T CD8^+$  et des  $L_T CD4^+$  différenciés ira lutter activement contre l'infection et participera à l'élimination du pathogène (ces lymphocytes sont dits **effecteurs**) alors qu'une autre sous population va subsister dans les organes lymphoïdes secondaires (les lymphocytes **mémoires**). Ainsi, en cas de nouvelle infection d'un pathogène, les  $L_T$  mémoires vont se multiplier rapidement en  $L_T CD8^+$  et  $L_T CD4^+$  matures, afin d'éliminer le pathogène de manière plus rapide que lors de la première infection (104).

Les  $L_B$  sont situés dans des zones des organes lymphoïdes où la rencontre avec les antigènes solubles ou associés aux CPA est privilégiée (105). La reconnaissance du motif antigénique par les récepteurs IgM des  $L_B$  (*B-cell receptor* ou BCR) entraîne une prise en charge de l'antigène. Il sera processé par le lymphocyte et exposé à sa surface par le CMH II. La présentation du complexe CMH II/antigène aux  $L_{TH}$  de la voie Th2 va ensuite conduire à la différenciation des  $L_B$  en plasmocytes effecteurs, capables de sécréter des anticorps neutralisants contre l'antigène (100,105,106). De même que pour les  $L_T$ , une sous-population mémoire de haute affinité pour le pathogène va se développer en parallèle, par migration des  $L_B$  activés vers les centres germinaux des organes lymphoïdes secondaires. Ainsi au cours d'une réinfection par le même pathogène, ces lymphocytes vont se multiplier rapidement et se différencier en plasmocytes afin d'éliminer rapidement le pathogène par la sécrétion d'anticorps neutralisants hautement spécifiques (107).

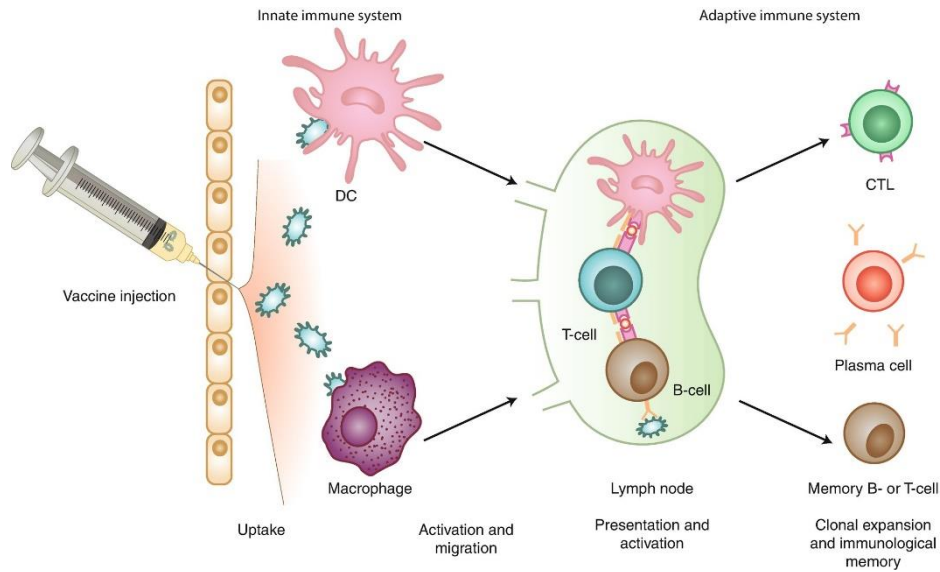


Figure 12 : Représentation schématique des mécanismes généraux impliqués dans l'initiation de la réponse immunitaire innée et l'activation de la réponse adaptative (108)

Ainsi, il ressort de cette cascade immunologique que le déclenchement d'une réponse immunitaire mémoire va directement dépendre de l'antigène administré et de son immunogénicité, c'est-à-dire de sa capacité à générer successivement une réponse innée puis adaptative, par l'activation des CPA (97). L'objectif de la vaccination est donc de mimer une infection et de favoriser la création des sous-populations mémoires afin de préparer l'organisme à lutter rapidement et efficacement contre une réelle infection.

### 2.1.2. Utilisation d'adjuvants

A ce jour les vaccins existants peuvent être classés en deux familles :

- Les vaccins vivants atténués,
- Les vaccins sous-unitaires, qui regroupent les extraits totaux de pathogènes tués, les protéines purifiées, les protéines recombinantes et les acides nucléiques.

Historiquement, les premiers vaccins développés appartenaient à la première famille. Il s'agit d'administrer une dose du pathogène entier, vivant et purifié, dont la virulence est atténuée par différentes techniques, selon que le pathogène soit bactérien ou viral. On trouvera par exemple le traitement à la chaleur, l'utilisation d'agents chimique ou

le vieillissement des cultures pour les plus anciennes méthodes, théorisées entre autre par Louis Pasteur, ou bien la génération et sélection de mutants non virulents pour les méthodes plus récentes (109). Ces antigènes possèdent une immunogénicité importante, proche du pathogène naturel, mais conservent un pouvoir infectieux résiduel rendant impossible leur administration aux personnes immunodéprimées, comme les femmes enceintes, les personnes séropositives au VIH ou les personnes âgées. C'est afin de diminuer cette virulence que les vaccins sous-unitaires ont été développés.

Contrairement aux vaccins vivants, cette deuxième famille se caractérise par des extraits totaux du pathogène tué (ex. virus de la grippe fractionné), par des toxines secrétées (toxines diphtériques et tétaniques), ou bien par des antigènes endogènes, protéiques (antigène de surface de l'hépatite B, hémagglutinine et neuraminidase de la grippe...), polysaccharidiques (capsules de pneumocoques et méningocoques...) ou plus récemment issus d'acides nucléiques purifiés, issus du pathogène ou recombinants (109,110). Ces vaccins ont émergé plus tardivement, aidés par la recherche en immunologie et en biologie moléculaire, et présentent un risque d'effet secondaire quasi nul ainsi qu'un processus de fabrication plus simple et moins couteux. En revanche ces antigènes purifiés se sont révélés être moins immunogènes chez l'homme que les vaccins vivants (111). Outre une trop courte biodisponibilité après administration, due aux enzymes de dégradation présente dans les différents tissus et aux systèmes de clairance, ces antigènes sont en effet faiblement reconnus et activent donc moins efficacement les cellules présentatrices d'antigènes et lymphocytes circulants. Ce phénomène peut être dû au manque de PAMP différents portés par ces antigènes, mais aussi au fait que le caractère immunostimulant des antigènes provient tant de leur composition précise en glucides et acides aminés, que de leur structure tridimensionnelle (112–114). Pour ces différentes raisons, ils sont quasi systématiquement associés à des systèmes adjuvants, capables de leur conférer une immunogénicité semblable à celle des vaccins vivants.

Les **molécules immunomodulatrices** furent les premiers adjuvants utilisés, avec le développement en 1932 des premiers vaccins contenant des sels d'aluminium (ou **alun**). Bien que le mécanisme d'action de cet adjuvant ne soit encore aujourd'hui que

partiellement élucidé, son efficacité dans la génération de réponses humorales a été observé dans de nombreux essais vaccinaux au cours du 20<sup>e</sup> siècle, notamment contre la diphtérie, la poliomyélite et le tétanos (97). En revanche il ne permet pas d'activer efficacement les L<sub>TC</sub> et donc de lutter contre les infections intracellulaires, et c'est la raison pour laquelle dès les années 80, avec l'émergence et la propagation spectaculaire du virus d'immunodéficience humaine (VIH), de nouveaux adjuvants ont dû être développés. Par exemple, les émulsions huile-en-eau, avec l'utilisation d'huiles naturelles telles que les saponines végétales ont rendu possible l'utilisation d'adjuvants tels que le **QS-21**, ou encore le **squalène** utilisé dans l'élaboration du MF59 (115).

En parallèle, les découvertes des mécanismes moléculaires de l'immunité innée, et notamment du rôle des PRR au début des années 90 ont entraîné le développement d'adjuvants spécifiques plus performants, capables de déclencher à la fois des réponses humorales et cellulaires, et d'augmenter la durée de la réponse mémoire, réduisant ainsi le nombre de doses nécessaires (116). Ces adjuvants peuvent être recombinants ou issus d'éléments bactériens purifiés, comme par exemple le monophosphoryl lipid-A (**MPL**) issu du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives détoxifiées, aujourd'hui utilisé dans plusieurs vaccins humains (117). Il est désormais courant de voir ces différents types d'adjuvants mélangés dans l'élaboration des vaccins modernes.

L'étude des mécanismes immuns déclenchés par ces adjuvants a montré une activation à la fois humorale et cellulaire, grâce à une stimulation plus puissante des cellules de l'immunité innée (118,119). Cependant cette immunostimulation est souvent associée à une toxicité plus importante, à cause des réactions cytolytiques déclenchées au niveau des sites d'injection. Par exemple, il a été décrit chez l'Homme et sur des modèles animaux que l'injection d'alun pouvait entraîner une inflammation locale et une hypersensibilité par dégradation des cellules et relargage de signaux de danger, que les émulsions pouvaient, par effet dépôt, générer une inflammation prolongée et un recrutement important de cellules immunitaires, ou encore que les ligand des TLR étaient associés à des désordres auto-immuns (120). Bien que cette toxicité permette une puissante activation du système immunitaire et que la plupart de ces réactions soient transitoires, le principe de précaution doit rester une priorité.



De plus, la réponse immunitaire peut être grandement influencée par les voies d'administrations utilisées. En effet, la plupart des vaccins sont administrés par voie injectable (intramusculaire ou sous-cutanée). Ces voies permettent d'initier une réponse systémique robuste, mais elles sont pour la plupart inefficaces pour induire une protection au niveau des muqueuses de l'organisme et pour lutter contre les infections associées (121). Comme la plupart des pathogènes infectent l'organisme par les muqueuses (voies respiratoires, intestinales ou génitales principalement), l'administration de vaccins par ces voies est fortement considérée.

### **2.2. Influence de la voie d'administration**

L'intérêt d'administrer des vaccins par voie muqueuse a été envisagé dans les années 60 avec l'exemple du vaccin oral contre la poliomyélite (maladie transmise par voie intestinale), démontrant que les muqueuses étaient capables de capter des antigènes, de stimuler l'immunité adaptative, et de protéger l'organisme vis-à-vis d'infections se transmettant par les muqueuses plus efficacement et plus rapidement que les voies injectables, grâce à la présence de cellules immunitaires présentes dans les muqueuses (122,123). Grâce à ces observations, liées aux avantages apportés par une administration sans aiguille (moins de risque de contamination et moins besoin de personnel formé, meilleure acceptation auprès des patients, peu d'inflammation...), l'étude et le développement de vaccins administrés par voie mucosale se sont répandus.

#### 2.2.1. La voie mucosale

La voie mucosale présente de nombreuses différences biologiques avec les tissus musculaires et cutanés. Si l'injection de vaccins permet de garantir une biodisponibilité idéale des antigènes vis-à-vis des cellules immunitaires résidentes, la présence des barrières naturelles que possèdent les muqueuses avant de pouvoir atteindre les cellules immunitaires s'avère être un défi important.

Les muqueuses représentent en effet les tissus intérieurs de l'organisme étant en contact avec l'environnement extérieur. En fonction de leur rôle, on peut distinguer la muqueuse des voies respiratoire (nasale et pulmonaire), la muqueuse gastro-intestinale (buccale, stomacale, intestinale et rectale), et la muqueuse urogénitale (vaginale, voies urinaires). Cumulées, elles occupent une surface d'environ 600 m<sup>2</sup>, et permettent de nombreux échanges entre l'organisme et son environnement (absorption de nutriment, échanges gazeux...). Elles sont en revanche directement exposées aux éléments exogènes nocifs susceptibles d'entrer dans les tissus de l'organisme, tels que les polluants, les particules et les micro-organismes pathogènes. Elles possèdent ainsi différentes barrières pour empêcher l'entrée de ces éléments.

### 2.2.2. Les barrières

La première barrière est la couche de **mucus**, qui recouvre l'intégralité des muqueuses. Le rôle de ce gel viscoélastique est de permettre l'échange de molécules, de protéger et d'hydrater les épithéliums, tout en filtrant leur accès aux particules et pathogènes. Dans les poumons, le mucus participe au filtrage des particules inhalées, alors que dans l'estomac il protège l'épithélium de l'exposition directe aux sucs gastriques. Il est composé principalement de mucines transmembranaires et sécrétées, qui sont des protéines oligomériques glycosylées de masse moléculaire élevée, capables de retenir une très grande quantité d'eau (représentant 95 % du poids total) et donnant au mucus ses propriétés physicochimiques. Il est également composé d'acides nucléiques, de lipides, de sels, de petites protéines et de débris cellulaires (124). C'est un gel poreux qui, selon la taille de ses pores (environ 100 nm dans les voies respiratoires et 500 nm dans le mucus cervico-vaginal) bloque le passage des grosses particules par exclusion stérique. De plus la présence d'acides sialiques et de zones hydrophobes sur les mucines permet de retenir certains éléments par interactions électrostatiques et hydrophobes. Enfin certains motifs glucidiques bactériens peuvent être reconnus et fixés par les glucides présents sur les mucines (125). En plus de ces propriétés, le mucus peut varier dans son épaisseur (de 15 µm dans les voies aérienne à plusieurs centaines de microns dans le côlon), dans son pH (de 7,4 dans les poumons, et entre 3,5 et 4,5 dans l'estomac), et dans sa viscosité (élevée dans le vagin, faible dans les

voies nasales), en vue de limiter au maximum son franchissement par les éléments exogènes (126,127). Enfin, de par son exposition constante aux éléments exogènes, ce gel est en renouvellement permanent grâce à la clairance mucociliaire. Ce mécanisme continu permet aux couches supérieures du mucus d'être déplacées et éliminées, grâce aux mouvement des cils présents en surface des cellules épithéliales des voies aériennes ou par le péristaltisme au niveau intestinal, tandis que les mucines sont nouvellement sécrétées par les cellules des glandes sous-mucosales et les cellules caliciformes (ou *goblet cells*) (128). Ainsi, le mucus des voies respiratoires et son contenu sont éliminés et dégradés par le tractus gastro-intestinal (TGI), et celui des voies intestinales et uro-génitales est éliminé hors de l'organisme. Le temps de clairance mucociliaire est lui aussi différent selon les muqueuses, et peut aller de 15 minutes pour la muqueuse nasale à plusieurs heures pour le TGI (127).

La seconde barrière est la barrière **cellulaire** : les muqueuses sont en effet toutes tapissées de cellules épithéliales possédant des jonctions serrées basolatérales (*zonula occludens*) importantes pour empêcher le passage de particules et de pathogènes par passages intercellulaires. La complexité de l'architecture cellulaire varie elle aussi selon les muqueuses : les voies aériennes sont agencées en un épithélium cilié pseudostratifié au niveau nasal et cuboïde simple au niveau pulmonaire (129) ; au niveau stomacal, dans l'intestin grêle et le côlon, l'épithélium est non cilié colonnaire simple (130). Dans la bouche ainsi que dans les voies uro-génitales, les épithéliums sont pluristratifiés (131).

A ces deux premières barrières peut être associée la barrière **biochimique** et **enzymatique** : le mucus ainsi que le milieu extracellulaire contiennent un nombre important d'enzymes protéolytiques et glycolytiques (lysozymes, amylases...), des immunoglobulines (IgA sécrétoires) et des peptides antimicrobiens (protéines du complément, défensines...) sécrétés par les cellules mucosales, et permettant d'éliminer les pathogènes par des mécanismes non spécifiques.

La dernière barrière présente au niveau des muqueuses est **immunologique**. En plus des cellules épithéliales, il existe en effet une population cellulaire immunitaire, dont le rôle est de capter et éliminer les pathogènes souhaitant pénétrer par les muqueuses. Cette barrière aussi appelée tissu lymphoïde associé aux muqueuses (**MALT** pour *Mucosal Associated Lymphoid Tissue*) est un système organisé diffus, et composée de

cellules dendritiques, de macrophages et de lymphocytes T et B (132). Elles sont localisées principalement sous la membrane basale de l'épithélium, bien que certaines peuvent émettre des prolongements voire être enchâssées entre les cellules épithéliales. Ces cellules sont assistées par des cellules épithéliales spécialisées dans la captation de pathogènes, les cellules M (ou *Microfold cells*). Le rôle de cette barrière est de sonder l'environnement et la présence de micro-organismes, en vue d'induire une tolérance immunologique à leur égard (vis-à-vis par exemple de la flore bactérienne commensale ou des allergènes du bol alimentaire), ou de les repousser par des sécrétions d'immunoglobulines (IgA sécrétoires) (133). Selon les muqueuses et leur exposition naturelle aux micro-organismes, la stimulation de ces populations immunitaires sera différente.

C'est la présence de ce MALT et des cellules immunocompétentes qu'il contient qui va permettre l'administration de vaccins par les muqueuses, et l'induction d'une immunité muqueuse et systémique. La captation des antigènes par les **cellules M** et les **CPA** (cellules dendritiques et macrophages) et leur présentation aux lymphocytes présents localement va entraîner l'induction de la réponse innée puis adaptative.

### 2.2.3. Immunobiologie du MALT

Le MALT est présent au niveau de toutes les muqueuses de l'organisme. Dans l'intestin on parle de GALT (pour *Gut Associated Lymphoid Tissue*), dans le nez du NALT (pour *Nose Associated Lymphoid Tissue*), ou encore dans les poumons de BALT (pour *Bronchus Associated Lymphoid Tissue*). Malgré de nombreuses similitudes, chaque tissu possède des caractéristiques qui lui sont propre. Ces différences seront à prendre en compte lors du choix de la muqueuse par laquelle le vaccin devra être administré.

Les mécanismes et les acteurs par lesquels ils stimulent l'immunité restent sensiblement identiques à ceux des voies parentérales. On peut séparer leurs actions en deux sites : les sites inducteurs et les sites effecteurs (Figure 13).

Les **sites inducteurs** correspondent au MALT de la muqueuse où les éléments exogènes sont prélevés. Lorsqu'une particule ou un élément pathogène se trouve dans

la lumière d'une muqueuse, celui-ci est généralement capté par les cellules M. Ces cellules se différencient des cellules épithéliales classiques par leur morphologie (bordure en brosse irrégulière, moins de cils au pôle apical, formation de cryptes membranaires au pôle basal, couche de mucus plus fine...) et leur importante activité d'endocytose (134). Elles sont enchâssées dans l'épithélium au niveau de surfaces discrètes appelées « épithélium associé aux follicules » (FAE pour *Follicular Associated Epithelium*), et surplombent des régions où la densité de cellules immunitaires est importante, les régions interfolliculaires (IFR pour *Interfollicular Regions*). Ces régions sont composées de CPA (CD et macrophages), et de zones enrichies en  $L_T$   $CD4^+$  et  $CD8^+$  naïfs (*T-cell zones*) et en  $L_B$  naïfs (*B-cell zones*) (135).

Ainsi, après avoir capté l'antigène, celui-ci est transcytosé de la cellule M aux CPA sous-jacentes (121). Notons que la translocation de l'antigène peut parfois être réalisée par les cellules épithéliales elles-mêmes par expression de TLR (136,137), et qu'elle peut de plus sécréter un cocktail de chémokines pro-inflammatoire attirant les cellules immunitaires (138). La captation peut de même être réalisée directement par des cellules dendritiques, par protrusion de leur membrane entre les cellules épithéliales dans les muqueuses où la présence de cellule M est plus rare (139).

Les CPA ayant reçu l'antigène vont le dégrader, exprimer certains fragments à leur surface, puis migrer vers les IFR pour présenter l'antigène aux lymphocytes, par reconnaissance entre les CMH et les TCR/BCR, assistés par des cytokines et chémokines immunomodulatrices, comme pour les voies injectables. De même, la différenciation Th1 ou Th2 des  $L_{TH}$  favorisera l'expression de cellules de type  $L_{TC}$  ou de plasmocytes. Ces présentations vont permettre la différenciation des lymphocytes en sous-populations mémoires et effectrices, dont l'action se déroulera au niveau des sites effecteurs.

Les principaux **sites effecteurs** correspondent aux muqueuses où l'antigène a été prélevé. Les lymphocytes B vont y jouer un rôle prépondérant dans l'établissement de l'immunité mucoale humorale : La présentation par les CPA couplée aux stimulations des lymphocytes *helper* de la voie Th2 va permettre la maturation des  $L_B$  en plasmocytes sécréteurs d'IgA par commutation isotypique des IgM (140). Les IgA sont des immunoglobulines de haute affinité, présentes en première ligne dans la

protection des muqueuses. En se liant à la surface des pathogènes, elles bloquent leur migration dans le mucus et leur capacité d'infecter les cellules épithéliales, et n'activent pas la fixation des protéines du complément. Les muqueuses étant constamment exposées aux pathogènes, la sécrétion d'IgA se doit d'être qualitative et quantitative ; c'est la raison pour laquelle la muqueuse intestinale contient à elle seule 80% des plasmocytes de l'organisme (141), et que le corps produit plus de sIgA que d'IgG chaque jour (133). Les plasmocytes matures vont migrer vers la lame basale de l'épithélium et sécréter de grandes quantités d'IgA spécifiques du pathogène. Les IgA vont être reconnues par les récepteurs aux immunoglobulines présents sur les membranes basales des cellules épithéliales (pIgR pour *Polymeric Immunoglobuline Receptor*), puis transcytosées vers le pôle apical pour être finalement excrétées vers la lumière.

Le recrutement local de LT cytotoxiques mature va permettre quant à lui de dégrader les micro-organismes et virus intracellulaires infectant les cellules des muqueuses.

En parallèle, des CD matures pourront migrer vers les ganglions lymphatiques drainants et vers la rate afin d'y stimuler les lymphocytes B et T. Ces derniers rejoindront alors la circulation lymphatique, puis sanguine. Dès lors, ils pourront circuler dans l'organisme et développer une immunité humorale et cellulaire systémique vis-à-vis du pathogène, ou bien retourner à la muqueuse inductrice par l'expression de molécules spécifiques, appelées molécules de *homing*.

De manière remarquable, l'expression de ces molécules peut étendre la réponse immunitaire à des muqueuses plus distantes. Il a en effet été décrit sur des modèles animaux ainsi que chez l'humain, que l'administration d'un vaccin au niveau d'un site inducteur muqueux induisait une sécrétion d'IgA et d'IgG et une activation des L<sub>TC</sub> au niveau d'un site effecteur muqueux différent (142). Ces observations ont suggéré l'existence d'un système immunitaire commun aux muqueuses (CMIS pour *Common Mucosal Immune System*) organisé par des molécules de *homing* correspondantes entre certaines muqueuses (132,143).

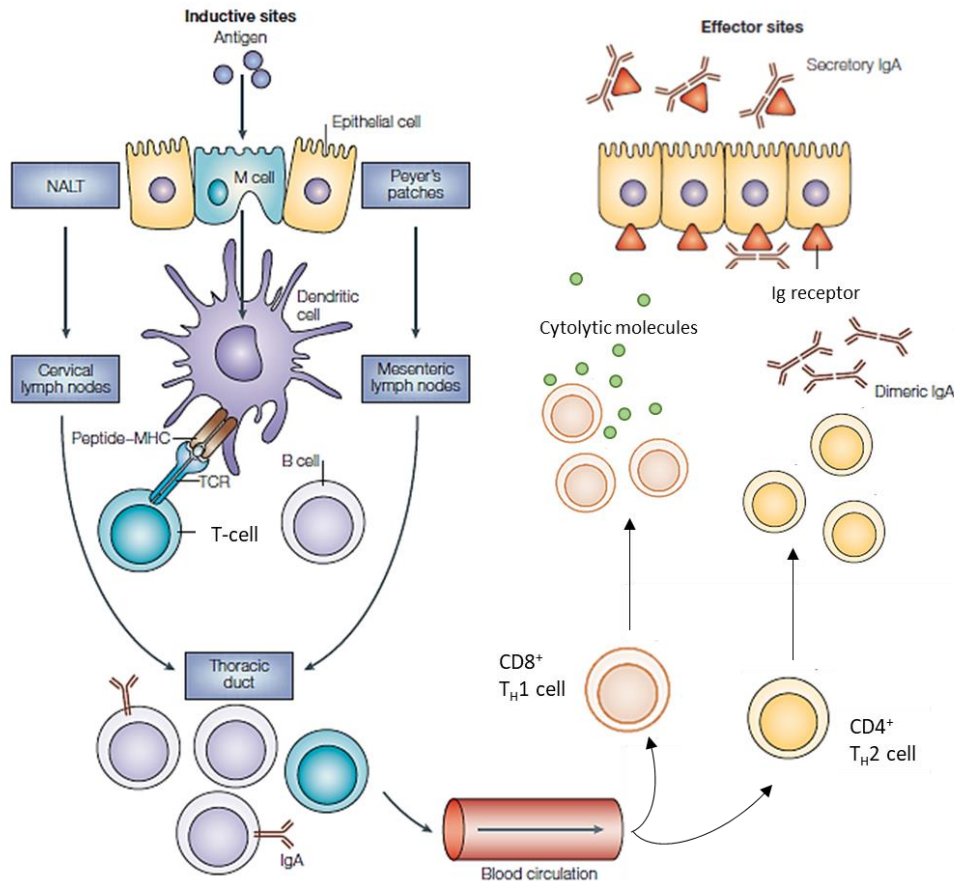


Figure 13 : Immunobiologie du MALT. Les antigènes sont captés au niveau des sites inducteurs (ici le NALT et les Plaques de Peyer), pour agir au niveau des sites effecteurs muqueux (144).

#### 2.2.4. Cas du GALT et du NALT

Du fait de leur grande exposition aux pathogènes, les voies respiratoires et intestinales ainsi que leur tissus lymphoïdes associés (le NALT et le GALT) sont les mieux décrites dans la littérature. Ce sont les plus empruntées pour l'administration de vaccins, grâce à leur accessibilité et leur capacité à initier une réponse immunitaire, mais possèdent en revanche des différences, dans leur structure et dans leur mécanisme d'action, qu'il faut prendre en compte lors du choix de la voie d'administration.

Les sites inducteurs du GALT sont concentrés au niveau des plaques de Peyer (PP). Ces structures sont retrouvées en nombre important tout le long du tube digestif, principalement au niveau de l'intestin grêle, mais aussi au niveau du colon et du

rectum. Ces structures se développent dès la vie embryonnaire de par l'exposition précoce et permanente de l'épithélium intestinal aux pathogènes (144) et elles sont très développées. Les PP sont organisées en dômes, visibles à l'œil nu (environ 25 mm d'épaisseur) au sommet desquels se trouvent les FAE (145). On retrouve sous ces dômes des CPA et les zones des lymphocytes T et B, organisées en IFR. Il peut y avoir une centaine d'IFR par PP, étroitement liées aux ganglions mésentériques par des vaisseaux lymphatiques (146). Les IFR des PP contiennent par ailleurs plus de *B-cell zones* que de *T-cell zone*, ce qui peut favoriser la réponse humorale. La translocation des antigènes s'effectue par les cellules M, et peut être réalisée par les cellules caliciformes environnantes (147). La maturation des lymphocytes pourra ainsi être réalisée dans les IFR et dans les ganglions afférents, avant qu'ils ne se dirigent vers la circulation sanguine. Dès lors l'expression de protéines de *homing*, telles que les intégrines  $\alpha 4\beta 7$  reconnaissant les récepteurs vasculaires MADCAM-1 (148), et les chémokines CCR9 reconnaissant les CCL25 des épithéliums intestinaux (149), va permettre une re-migration de ces lymphocytes effecteurs au niveau de la muqueuse intestinale. En parallèle, une immunisation par voie intestinale peut permettre la migration des lymphocytes et la sécrétion d'IgA au niveau des glandes mammaires et salivaires, et occasionnellement dans les bronches (150,151).

L'administration d'antigènes vers les PP peut s'avérer difficile par voie orale à cause du passage de l'estomac où la majorité des protéines est dégradée. Cela nécessite d'enrober les vaccins dans des agents gastro-résistants, ou d'augmenter les doses administrées ce qui, paradoxalement, peut favoriser une immunotolérance envers le pathogène (137).

Chez l'Homme, les structures inductrices du NALT se retrouvent sur l'anneau de Waldeyer, comprenant les différentes amygdales des voies oropharyngées (135,152). La formation de ces structures se déroulerait après la naissance contrairement aux PP (144). Elles sont directement accessibles, et ont une faible activité enzymatique. Les antigènes y sont donc moins dégradés que lors d'une administration par voie orale (153), permettant ainsi d'utiliser des doses vaccinales moins importantes (154). On retrouve sur ces amygdales les cellules M, présentes dans des invaginations cryptiques de l'épithélium, ainsi que les cellules immunitaires permettant d'induire une réponse immunitaire mémoire décrites précédemment (155). Il a été montré chez la souris que les lymphocytes  $CD4^+$  possèdent un phénotype dit Th0, signifiant qu'elles ont la



capacité de devenir Th1 ou Th2 selon l'antigène administré, directement après présentation par les CPA (156). Pour cette raison, la voie nasale est fréquemment empruntée dans l'élaboration de vaccins nécessitant de stimuler des réponses immunitaires de type Th1 afin d'activer préférentiellement l'immunité cellulaire, comme les vaccins antiviraux, antiparasitaires ou anticancéreux (157).

Comparé au GALT, l'épithélium nasal possède moins de cellules M mais plus de CD intraépithéliales situées hors des FAE, capables de capter les antigènes (154,158,159). Ces CPA migrent alors directement vers les nœuds lymphatiques des voies aériennes pour y stimuler et différencier les lymphocytes. Ceux-ci vont ensuite circuler dans les vaisseaux sanguins pour soit :

- retourner vers l'épithélium respiratoire, par l'expression de chémokines CCR10 reconnaissant les CCL28, et d'intégrines  $\alpha 4\beta 1$  reconnaissant les VCAM-1 (140,160)
- s'implanter au niveau d'une muqueuse plus distante (pulmonaire, intestinale et des voies génitales (161))
- rester circulant pour induire une défense systémique.

Ces caractéristiques permettent ainsi à la voie nasale d'induire une immunité cellulaire et humorale, mucoale et systémique contre un antigène.

La principale limite de cette voie d'administration vient de son lien avec le cerveau par les voies rétro-olfactives. Il est en effet possible d'utiliser la voie nasale pour administrer des molécules et peptides thérapeutiques traitant les pathologies cérébrales (162). L'administration de vaccins doit en revanche s'affranchir d'un passage nez-cerveau afin d'éviter la survenue d'effets secondaires potentiellement graves. De plus afin qu'à l'administration le contenu ne soit pas avalé et redirigé vers le TGI, les volumes administrés doivent être plus faibles que par voie orale. Il est donc nécessaire de pouvoir formuler des vaccins ayant une forte capacité à stimuler le système immunitaire.

### 2.2.5. Les adjuvants muqueux

Les premiers vaccins administrés par voie muqueuse furent des vaccins vivants. Les vaccins oraux contre la poliomyélite, le rotavirus, la salmonellose et *Vibrio cholerae* ainsi que le vaccin nasal contre la grippe, aujourd'hui commercialisés, sont des vaccins vivants atténués (163,164). En revanche, d'autres tentatives dont celle du Rotashield® contre le rotavirus, aujourd'hui retiré du marché, ont montré que cette famille de vaccin pouvait déclencher une toxicité importante vis-à-vis des muqueuses (165).

Les stratégies actuelles se penchent donc sur le développement de vaccins sous-unitaires, moins toxiques, et sur l'utilisation d'adjuvant pouvant s'avérer nécessaire pour améliorer leur immunogénicité. Les molécules immunomodulatrices classiquement utilisées pour la voie injectable, comme l'alun ou les émulsions, se sont révélées être soit trop toxiques pour les muqueuses, soit peu efficaces pour stimuler efficacement la réponse immunitaire. Ainsi il a fallu découvrir des adjuvants pouvant être utilisés au niveau des muqueuses. Ceux-ci sont classiquement administrés avec les antigènes afin d'améliorer leur présentation et reconnaissance vis-à-vis des cellules du MALT. Les adjuvants les mieux décrits sont les ligands des PRR et les toxines bactériennes (Figure 14).

#### ***Ligands des PRR***

Les **LPS** sont des molécules de grandes tailles que l'on retrouve en surface des bactéries Gram négatives, faisant et font ainsi partie des adjuvants naturels. Ils sont reconnus par les TLR de type 4 (TLR4) présents en surface des CPA, et induisent la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (166). Il ne stimulent cependant que faiblement les cellules épithéliales (167). On les retrouve naturellement présents comme adjuvants dans les vaccins muqueux composés d'extrait totaux de bactéries, dans lesquels ils sont associés à la membrane bactérienne (168–170) ou associés à d'autres antigènes, permettant d'améliorer leur immunogénicité, et le développement d'une immunité muqueuse humorale et cellulaire (171).

Les LPS ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'activation de la réponse immune par voie muqueuse. En revanche, leur importante toxicité, exprimée par une inflammation locale trop importante, limite leur utilisation dans le développement de vaccin pour l'humain. Des dérivés non toxiques ont été synthétisés, dont le **MPL**. Ce fragment peut être purifié du LPS de *Salmonella entericaserovar* ou de *Salmonella minnesota*, et se révèle être moins toxique que le LPS, tout en conservant une forte immunogénicité (172). Son efficacité comme adjuvant a ainsi pu être démontrée dans le développement de vaccins muqueux contre la grippe (173), l'hépatite B (174) ou encore la tuberculose (175). Il entre par ailleurs dans la composition du AS04 commercialisé par le groupe GSK utilisé par voie injectable.

La **flagelline** est une sous-unité du flagelle, organe permettant la mobilité des bactéries Gram négatives, et est fortement reconnue par les cellules du système immunitaire. Elle stimule les CPA et les lymphocytes mais aussi des cellules épithéliales, même à faible dose et de manière plus intense que le LPS. Elle se fixe aux TLR5, et entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (176–179). Elle a ainsi été testée comme adjuvant muqueux à de nombreuses reprises pour lutter contre la grippe (180), le choléra (181), la malaria (182) ou encore la bilharziose (183). Cependant, cet adjuvant est difficile à produire en grande quantité avec une qualité suffisante, et est peu stable vis-à-vis de la protéolyse et de l'agrégation (184). Ainsi, on ne la retrouve pour l'instant que dans peu d'essais clinique chez l'Homme, et uniquement pour des administrations par voies injectables (185).

Les **acides nucléiques** bactériens sont fortement reconnus par les cellules du système immunitaire comme signaux de danger. Les nucléotides cytidine-phosphate guanosine (CpG) sont des motifs d'acide nucléique non méthylés trouvés classiquement dans l'ADN bactérien et absents du génome humain, et sont reconnus comme PAMP par les cellules dendritiques et les L<sub>B</sub>, par fixation au TLR9 présents sur la membrane des endosomes (186,187).

Des oligodéoxynucléotides (ODN) synthétiques contenant des motifs CpG (les **ODN CpG**) ont alors été fabriqués pour stimuler l'immunité innée. A ce jour il existe 4 classes d'ODN CpG, différant selon leur structure oligonucléotidique : les types D, K, C et P. Il a été démontré que la structure des ODN CpG pouvait orienter différemment la réponse immunitaire, en activant préférentiellement les L<sub>B</sub> ou les L<sub>TC</sub>

(188). L'efficacité de ces adjuvants pour la voie mucoale a été illustrée maintes fois sur la souris, les volailles et les primates non-humains, dans l'induction d'une réponse mucoale et systémique robuste, cellulaire et humorale (189–192). Bien que la stimulation répétée de la voie TLR9 par ces CpG puisse induire une exacerbation d'infections opportunistes (187), ces adjuvants sont considérés comme non toxiques pour une utilisation humaine (193).

De même, les ARN double brins (dsRNA pour *double stranded Ribonuceic Acid*) sont reconnus par les cellules de l'immunité innée, car ils ne s'expriment qu'en cas de réplication d'un virus infectieux, ou par les cellules nécrotiques (194,195). Les récepteurs engagés dans la reconnaissance de ces motifs seront différents selon le contexte : dans le cas d'une reconnaissance extracellulaire par des récepteurs de surface (les *dsRNA-binding proteins*), le dsRNA est endocyté puis présenté au TLR3 présent en surface des endosomes ; dans le cas de la réplication intracellulaire d'un virus, l'acide nucléique se lie directement dans le cytoplasme aux NLR et RLR (194).

Des dsRNA synthétiques ont ainsi été développés en vue d'être utilisés comme adjuvants. Les acides polyinosino-polycytidyliques (**poly I-C**) sont des ARN double brins synthétiques capables de stimuler les CD en se fixant au TLR3 ainsi qu'aux RLR cytoplasmiques RIG-1 et MDA-4. Ils induisent préférentiellement la sécrétion d'interféron et favorisent les réponses de type Th1. La taille de l'ARN peut par ailleurs influencer la qualité de la réponse induite. Des dérivés de Poly-IC ont ainsi été synthétisés, dans l'objectif d'améliorer à la fois leur stabilité vis-à-vis des ribonucléases et le pouvoir immunogène. On peut citer les Poly I-C<sub>12</sub>U qui possèdent des résidus uracile et guanosine, et qui ne se fixent qu'aux TLR3 (196), ou encore les PolyICLC contenant de la Poly-L-Lysine et de la carboxyméthylcellulose, plus stables que les Poly-IC (197). Ces adjuvants stimulent préférentiellement l'immunité cellulaire, et sont donc couramment utilisés comme adjuvants dans le cadre de vaccins muqueux dirigés contre les infections virales, par voie orale mais principalement par voie nasale pour éviter les dégradations du TGI (198–202).

Néanmoins les doses utilisées par voie muqueuse doivent souvent être importantes pour générer une efficacité vaccinale (203), et la survenue d'effets secondaires due à une stimulation trop importante des TLR3 a déjà été rapportée (204).

Le **MDP** (muramyl dipeptide ou N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) est un des composés de l'Adjuvant Complet de Freund, et est connu pour être le plus petit élément des protéoglycane des parois bactériennes capables de stimuler le système immunitaire, *via* la fixation aux récepteurs intracellulaires NOD2 des cellules dendritiques (205). Il est en effet capable de stimuler la phagocytose et la sécrétion de cocktails de cytokines pro-inflammatoires. De par sa taille, il est souvent associé aux antigènes par greffage covalent, améliorant leur immunogénicité, ou sous forme d'émulsions lipidiques avec des surfactants (206). Cet adjuvant ne s'est montré efficace que dans des cas spécifiques, comme par exemple dans le cadre d'une immunisation par voie nasale contre le virus respiratoire syncytial (RSV) (207), en raison d'une immunogénicité encore trop faible. C'est pourquoi des modifications lui ont été apportées, par fixation de sucres, de lipides ou de peptides, améliorant leur stabilité et leur pouvoir immunogène (208–210).

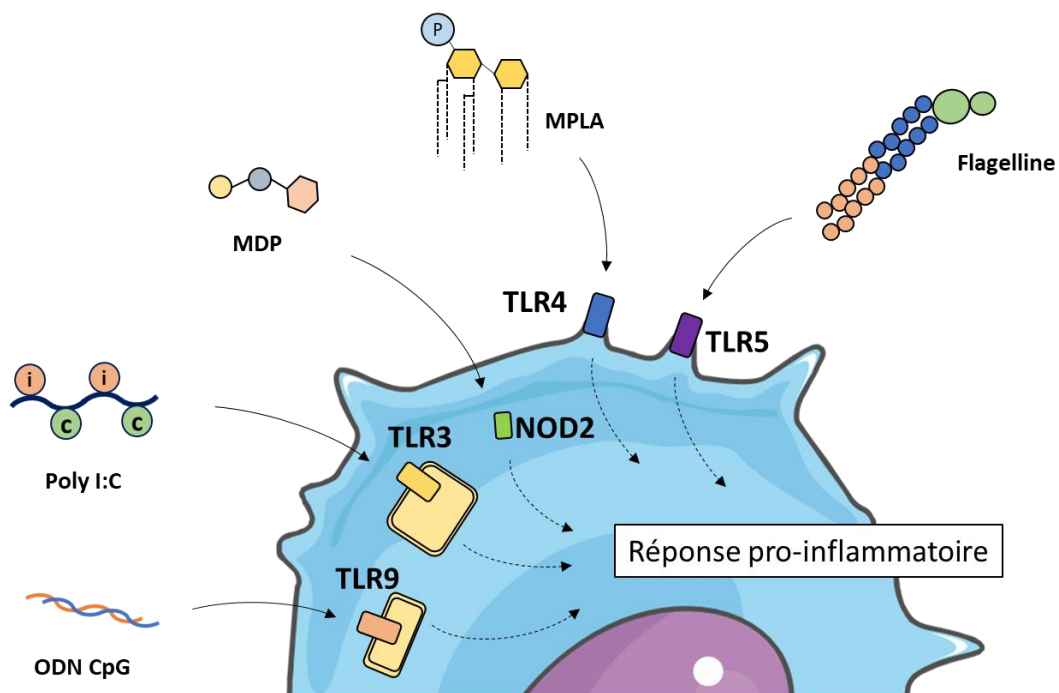


Figure 14 : Représentation schématique des interactions entre différents adjuvants utilisés dans le vaccin par voie muqueuse, et les PRR des cellules présentatrices d'antigènes.

*Les toxines bactériennes*

L'utilisation des toxines bactériennes comme adjuvants pour la voie muqueuse date de la fin des années 80, avec la découverte des mécanismes infectieux des bactéries intestinales. Les toxines sécrétées par *Vibrio cholerae* et les *Escherichia coli*, responsables d'infections mortelles dans les pays émergents, ont été les premières décrites.

Le choléra est une maladie provoquée par une infection intestinale par la bactérie Gram négative *Vibrio cholerae*. Cette infection déclenche d'importantes diarrhées chez les personnes atteintes, pouvant entraîner la mort par déshydratation. La bactérie infecte la muqueuse intestinale en se fixant sur la membrane des entérocytes. Cette fixation a lieu au niveau des gangliosides des radeaux lipidiques, et entraîne la sécrétion de la toxine cholérique (CT) (211). Cette toxine de 84kD est composée de deux sous-unités : la sous-unité B (CTB), de 55kD, qui permet la fixation de la toxine aux gangliosides, et son endocytose jusqu'à l'appareil de Golgi ; la sous-unité A (CTA) de 28kD, qui est ensuite clivée puis libérée dans le cytoplasme de la cellule pour activer les mécanismes induisant le relargage massif d'eau de la cellule vers la lumière de l'intestin (212). La partie A de cette toxine est donc responsable de la virulence de la bactérie.

L'utilisation de la CT comme adjuvant a été proposée en vertu de ses capacités à (i) résister aux protéases intestinales ; (ii) se fixer aux gangliosides de surface des cellules épithéliales et immunitaires ; (iii) stimuler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ; (iv) promouvoir la sécrétion d'IgA par les L<sub>B</sub> différenciés (213). La toxine entière ne peut être utilisée directement à cause de son importante toxicité. En effet, par voie orale, 5 µg de CT sont suffisants chez l'Homme pour provoquer des diarrhées aiguës (214), et par voie nasale, des études chez la souris ont montré qu'elle endommage grandement les muqueuses (215). Des essais vaccinaux ont ainsi été réalisés à partir des sous-unités CTA et CTB (Figure 15).

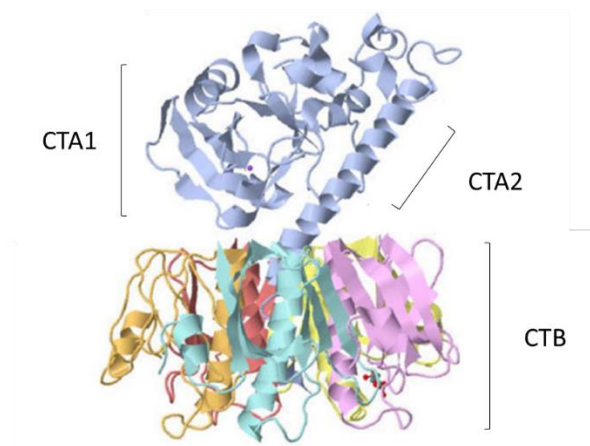


Figure 15 : Structure cristalline de la toxine cholérique (CT) et de ses sous-unités CTA1, CTA2, et CTB (216)

La **CTB** a été utilisée de par son absence d'activité toxique intestinale, contrairement à la CTA. En revanche, malgré des résultats prometteurs, les effets secondaires potentiels liés au passage nez-cerveau ont limité son utilisation par voie nasale (212). De nombreux essais ont montré l'efficacité de cet adjuvant une fois coadministré avec des antigènes vaccinaux, par voie orale, pour lutter contre les maladies liées aux infections bactériennes intestinales, dont celles provoqués par *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae* ou encore les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC), avec un produit actuellement sur le marché (Dukoral®) (217).

En revanche son immunogénicité reste inférieure à celle de la CT entière. En vue d'augmenter son efficacité, il semble plus prometteur de greffer cette sous-unité sur l'antigène pour améliorer sa captation par les APC et induire une présentation par le CMH de classe II (213). De plus, le couplage entre la CTB et des CpG a permis le développement d'adjuvants chimériques CTB-CpG afin d'améliorer l'efficacité de ces deux adjuvants (218,219).

Malgré sa toxicité intrinsèque, la **CTA** a elle aussi été envisagée pour le développement de vaccins muqueux. Cette sous unité est elle-même composée de deux sous-unité protéiques, liées par des ponts disulfures : CTA1 et CTA2. La partie CTA2 permet l'ancrage avec la CTB tandis que la partie CTA1 est responsable de l'activité toxique intracellulaire. Plusieurs stratégies ont été proposées pour conserver l'immunogénicité de la CTA tout en diminuant sa toxicité. Ainsi, des modifications de la séquence peptidique de la sous-unité, par addition ou modification d'acides aminés, ont permis leur administration par voie nasale (220,221). Aussi, le greffage

de la partie CTA1 à un ligand spécifique des immunoglobulines de surface des L<sub>B</sub> (le fragment D de la protéine A des *Staphylococcus aureus* ou DD) engendre une diminution complète sa toxicité (222). Cet adjuvant CTA1-DD peut ainsi être administré par voie nasale, et stimuler l'immunité humorale et cellulaire (223). Il est ainsi envisagé dans le développement de vaccins administrés par voie nasale, dirigés contre le VIH (224), les infections génitales par les *Chlamydia trachomatis* (225), et dans le développement d'un vaccin universel contre la grippe (226,227).

En parallèle des CT, les toxines sécrétées par les ETEC sont également envisagées dans le cadre d'immunisations par voie muqueuses. Les ETEC sécrètent des toxines stables à la température (ST pour *heat-stable toxins*) et des toxines instables (LT pour *heat-labile toxins*). Les premières sont partiellement toxiques, et ne sont pas immunogènes. Les secondes sont en revanche très similaires aux CT : elle sont composées d'une sous-unité LTB capable de se lier aux gangliosides des cellules mucosales, et une sous-unité LTA responsable d'une importante toxicité intracellulaire, entraînant de fortes diarrhées chez les personnes infectées (228). Les LT et CT possèdent par ailleurs environ 80 % d'homologie dans leur structure primaire. En revanche, la LT est moins sécrétée au niveau du tube digestif que la CT, et elle est plus sensible à la dégradation par les protéases intestinales (213).

La LT est principalement utilisée par voie orale, à cause d'une importante toxicité observée par voie nasale : des essais vaccinaux contre la grippe ont en effet montré que la toxine était capable de passer vers le cerveau par la voie rétro-olfactive, entraînant des paralysies faciales (229).

A l'image de la CT, la sous-unité **LTB** a été étudiée comme adjuvant muqueux non toxique, pour lutter contre les infections intestinales liées aux ETEC (230) aux salmonelles (231) ou d'autres pathologies (228), avec une stimulation préférentielle de la voie humorale et la sécrétion d'IgA. De plus, des études de neurotoxicité réalisées sur des souris ont démontré son innocuité vis-à-vis du cerveau à faible dose, rendant potentiellement possible son utilisation par voie nasale (232).

Enfin, des modifications ont été apportées à la sous-unité **LTA** en vue de diminuer sa toxicité tout en conservant son pouvoir immunogène. Celles-ci peuvent inclure des délétions ou modifications de la séquence protéique, comme pour les CTA. Des essais



réalisés par voie nasale, contre la grippe, ont cependant montré que ces modifications entraînent une perte significative de l'immunogénicité (233).

### *Vers des adjuvants plus sûrs et plus performants*

La voie mucosale constitue une alternative robuste aux voies injectables afin de protéger les muqueuses et l'organisme des infections, et on trouve aujourd'hui une palette de plus en plus vaste d'adjuvants qui améliorent l'efficacité des vaccins administrés par ces voies, pour la santé humaine et vétérinaire.

Ces adjuvants stimulent l'immunité de manière variée, avec la possibilité d'orienter la réponse immunitaire vers la voie humorale ou cellulaire, en fonction du pathogène. L'objectif est de déterminer la combinaison entre un antigène et un adjuvant la plus optimale pour favoriser une réponse immunitaire efficace et durable.

A ce jour, l'objectif principal des recherches actuelles est le développement de nouveaux adjuvants plus simples à produire, plus stables après fabrication et *in vivo*, moins toxiques et plus efficaces, avec des résultats prometteurs obtenus ces 10 dernières années. Ces nouveaux adjuvants doivent aider à la lutte contre les infections qui encore aujourd'hui posent d'importants problèmes sanitaires, principalement dans les pays émergents.

La toxicité de ces adjuvants est cependant toujours un frein dans le développement de vaccins. Les doses utilisées à ce jour demeurent en effet élevées, et les tests précliniques sur les rongeurs ne permettent pas d'appréhender la toxicité associée avec certitude. Enfin, la vaccination et ses effets secondaires associés concernent principalement les enfants en bas âge, et l'impact négatif sur l'opinion publique est un facteur important à prendre en compte. Le développement de systèmes adjuvants plus sûrs demeure une priorité. C'est en ce sens que les systèmes de délivrance de vaccins ont été développés, en parallèle des immunomodulateurs.

### 2.3. Intérêt des nanoparticules dans la voie muqueuse

Le principe des systèmes de délivrance est d'associer une dose d'antigène vaccinale à un vecteur, dont le rôle est de faciliter le passage des barrières puis de délivrer l'antigène directement aux cellules de l'immunité innée, et ainsi de palier la faible reconnaissance des vaccins sous-unitaire vis-à-vis des CPA. Grâce à l'émergence des technologies issues de la physique et de la chimie des particules, des vecteurs de taille proche des pathogènes bactériens et viraux, capable à la fois d'encapsuler des antigènes et d'interagir avec ces cellules peuvent être conçus. Les systèmes de délivrance peuvent être classés selon leur taille (nanoparticules et microparticules) ou selon leur composition physico-chimique (lipidique, polymérique, polysaccharidiques, métalliques, virale...), et l'ensemble des modifications qu'il est possible de leur apporter permet la synthèse et la création de nombreux vecteurs améliorant l'efficacité des vaccins sous-unitaire par différents mécanismes.

S'il y a de plus en plus de preuves scientifiques de croire que les nanoparticules sont plus efficaces que les microparticules pour immuniser par voie mucale (234), la composition chimique peut grandement varier d'un vecteur à l'autre. Le choix s'effectuera alors sur la capacité à associer les antigènes et à les délivrer dans les cellules, ou d'autres paramètres comme la simplicité de fabrication, la biodégradabilité ou la stabilité colloïdale. Des revues récentes listent les différents matériaux utilisés en recherche dans le développement de nanovecteurs pour la vaccination par voie mucale et offrent une excellente compréhension des avantages et inconvénients portés par chacun (235–239).

Ainsi, le rôle de ces nanovecteurs sera d'encapsuler les antigènes, de les protéger de la protéolyse, et de franchir le mucus pour délivrer les antigènes dans les cellules mucales.

#### 2.3.1. NPs principales utilisées pour vacciner par voie muqueuse

##### *Les liposomes*

Les liposomes sont utilisés dans diverses branches de la nanomédecine, dont les thérapies géniques, anticancéreuses ou antiparasitaires. Ces particules furent

historiquement les premières NPs utilisées dans la vaccination, avec la mise sur le marché au milieu des années 90 d'un vaccin injectable contre l'hépatite A sous forme virosomale, l'Epaxal® constitué de protéines virales enchâssées dans la bicouche lipidique et dans le cœur aqueux du virosome, sans ajout d'adjuvants immunostimulants (240). Si les particules de grande taille peuvent associer plus d'antigènes (241), elles sont plus rapidement éliminées par les systèmes de clairance. Les petites vésicules sont ainsi privilégiées pour la voie mucoale. L'association d'antigènes peut s'effectuer par des liaisons faibles ou covalentes, *in process* ou *post-loading*, au cœur du vecteur, dans la bicouche lipidique ou en surface, selon l'hydrophobicité et le point isoélectrique de l'antigène, ce qui en fait un vecteur d'antigène à haut potentiel (242). Il est de plus possible d'associer de la même manière des adjuvants. Les lipides utilisés peuvent être variés (phospholipides simples ou modifiés, cholestérol, lipides immunomodulateurs...) et influencer l'interaction avec les antigènes et les cellules immunitaires. Ces vecteurs peuvent en outre être captés par les cellules par fusion de membrane ou par endocytose. De par ces différentes caractéristiques, ils ont démontré à plusieurs reprises leur capacité à éliciter une réponse immunitaire, en améliorant l'immunogénicité des antigènes vis-à-vis des cellules des muqueuses (8).

### *Les virus-like particles (VLPs)*

Les VLPs sont des virus synthétiques fréquemment utilisés dans les vaccins injectables et muqueux, compte tenu de leur taille souvent inférieure à 100 nm et de leur faculté à associer des antigènes variés avec une forte densité d'épitopes (243). Ils sont produits par des cellules recombinantes d'insectes, de végétaux ou bactériennes, dans lesquelles est transfecté un plasmide, codant pour les capsides de virus déjà existants. Ce plasmide est de plus modifié en retirant les facteurs de virulence, et en ajoutant les séquences des antigènes qui seront associés à la capside lors de la synthèse protéique (244) (Figure 16). Les VLPs miment donc parfaitement la structure d'un vrai virus, tout en limitant leur toxicité par atténuation de son pouvoir infectieux. Ils sont par conséquent fortement reconnus par les CPA, et possèdent une immunogénicité propre, en activant naturellement les cascades intracellulaires pro-inflammatoires. Ils sont ainsi privilégiés dans l'élaboration de vaccins luttant contre les infections virales,

bien qu'ils puissent immuniser contre toute forme d'infection, selon l'antigène choisi initialement (245). Il est de plus possible de greffer des molécules en surface des VLPs pour modifier leurs interactions avec les éléments biologiques (246).

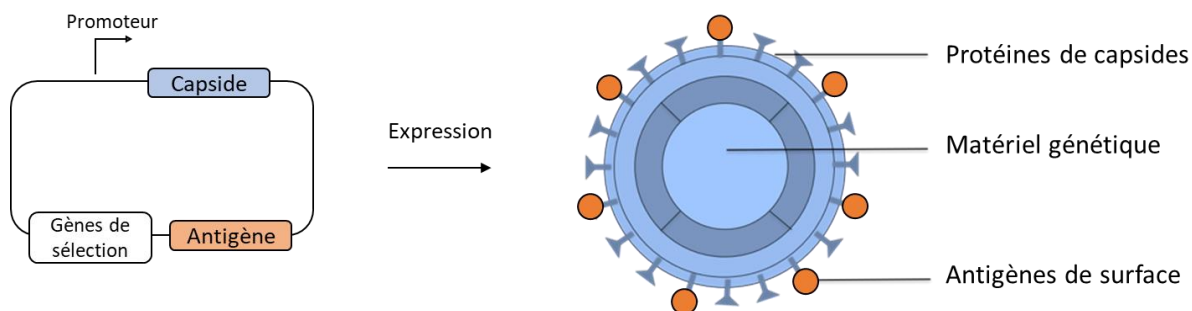


Figure 16 : Représentation schématique de la synthèse de VLP recombinant pour le vaccin.

### *Les NPs polymériques*

Les particules synthétisées à partir de polymères naturels ou de synthèse font partie des plus utilisées dans le développement de vaccins muqueux. Elles possèdent en effet une bonne biocompatibilité, une faible toxicité, une longueur de chaîne variable, une simplicité de synthèse ainsi qu'une stabilité plus importante que les liposomes (247). Certaines ont de plus naturellement des fonctions chimiques anioniques, cationiques, hydrophiles ou hydrophobes, facilitant les interactions avec les éléments biologiques et l'association des antigènes. Cette association peut se faire *in process, post loading*, en surface, ou à l'intérieur du vecteur, et la vitesse de délivrance peut être contrôlée. De plus, par des modifications chimiques, il est possible de greffer l'antigène covalamment ou par liaisons électrostatiques en surface du vecteur, de manière précise, et il en est de même pour des agents de ciblage des cellules du MALT. Le polymère est ainsi souvent choisi en fonction de l'interaction aux éléments biologiques (mucus, membranes cellulaires...), par rapport à la simplicité d'associer des antigènes de manière stable, ou encore selon son affinité pour les cellules du système immunitaire. Certains polymères déjà utilisés dans le développement de vaccins par voie injectable peuvent par ailleurs être utilisés car leurs propriétés et procédés de synthèses sont bien décrits (polymères de PLGA, PLA, PCL, chitosan...) (248).

*Les nanoparticules de maltodextrine (NPL)*

La maltodextrine est un polymère de glucose ramifié par des liaisons  $\alpha$ -1,4 issu de l'hydrolyse partielle de l'amidon. C'est un sucre utilisé à des fins alimentaires et dans la conception de médicaments chez l'humain. Elle forme naturellement dans l'eau des microparticules de 3  $\mu\text{m}$  à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, et fait ainsi parti des polymères naturels utilisés dans l'élaboration de nanoparticules pour la délivrance de protéines et de petites molécules (249,250). La synthèse de NPs de maltodextrine peut être réalisée par émulsification, par nanoprécipitation, par hydrolyse enzymatique ou chimique, ou encore par des traitements physiques comme la sonication ou l'homogénéisation (251).

L'équipe du Pr. Betbeder a démontré l'intérêt de développer des nanoparticules issues de maltodextrine afin de délivrer des antigènes par voie muqueuse. La maltodextrine est solubilisée dans l'eau, réticulée à l'aide d'épichlorhydrine et cationisée pour former un hydrogel dense et cationique. Ce gel est ensuite homogénéisé à haute pression sur plusieurs cycles, afin de broyer les gros fragments, puis l'ensemble est filtré par ultrafiltration tangentielle pour éliminer les plus petits fragments, sels et résidus de synthèse, afin d'obtenir des particules d'environ 60 nm, sphériques, poreuses et cationiques appelées **NP<sup>+</sup>** (252). Grâce à leur petite taille, leur forme sphérique et leur charge de surface cationique, ces particules sont captées rapidement les cellules épithéliales respiratoires dès 3 minutes d'incubation avec un équilibre atteint au bout d'une heure (253). Les mécanismes d'endocytose ont montré que celle-ci s'effectuait majoritairement par la voie des clathrines, médiée par les récepteurs anioniques de surface, et qu'elles étaient de plus exocytosées par une voie impliquant le cholestérol (253). Ces particules sont stables dans l'eau, et ne s'agrègent pas au cours du temps, même en présence de grandes quantités de protéines (254). Les charges de surface de ces NP<sup>+</sup> sont de plus faiblement masquées par les protéines présentes dans les milieux de cultures, et des essais de cytotoxicité et de génotoxicité ont démontré qu'elles ne sont par ailleurs pas toxiques aux doses utilisées pour délivrer des substance actives dans les cellules (254).

Afin de pouvoir associer des antigènes et molécules variés, des phospholipides anioniques (DPPG ou dipalmitoyl-phosphatidylglycérol) ont été ajoutés à ces particules par mélange *post loading* pour former des nanoparticules de maltodextrine

lipidées, les **NPL** (Figure 17). L'analyse des charges de surface des NPL a montré que les lipides s'ajoutaient à l'intérieur des particules et non en surface, sans en modifier la taille ni la stabilité (255). En revanche, due à la porosité du squelette de NP<sup>+</sup>, ces lipides restent accessibles et offrent de nouvelles propriétés aux particules. En effet, l'ajout de 70% de phospholipides (en pourcentage massique de NP<sup>+</sup>) permet aux NPL d'être furtifs vis-à-vis du système du complément, de manière similaire aux particules neutres, ce qui permettrait de diminuer l'opsonisation après administration (255). L'endocytose dans des cellules épithéliales suit sensiblement la même cinétique et les mêmes voies d'endocytose que les NP<sup>+</sup>, ainsi que les mêmes cinétiques de délivrance intracellulaire d'antigènes (256). En revanche, des mesures de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*) par microscopie confocale ont démontré que le relargage cytoplasmique et la prise en charge de ces antigènes par les cellules était plus important par les NPL, avec un échappement endosomal plus important. Cette caractéristique est importante pour moduler l'immunogénicité des antigènes délivrés et jouer sur la balance CMHI/CMHII des cellules présentatrices d'antigènes (257). De plus, les études de biodistribution après administration nasale ont démontré que les particules permettaient de prolonger le temps de résidence muqueux des antigènes chez la souris, sans traverser l'épithélium et atteindre le cerveau ni les vaisseaux sanguins (258). Les NPL restaient dans la muqueuse pendant environ 6h avant d'être avalées puis rejetées par les fèces. En outre, des études comparant les NPL avec des PLGA anioniques ou recouvertes de chitosan, et avec des liposomes anioniques ou recouverts de chitosan ont de plus montré que les particules de maltodextrine étaient captées plus rapidement et en plus grande quantité par les cellules épithéliales respiratoires, cellules dendritiques et macrophages, et qu'elles étaient capables d'associer de plus grandes quantités d'antigènes, et qu'elles permettaient un temps de résidence nasale plus long que les autres particules (9,18).

Les NPL ont été utilisées dans l'élaboration d'un vaccin contre la toxoplasmose, en encapsulant des parasites *Toxoplasma gondii* tués dans les particules (259). L'encapsulation était stable et totale, et favorisait la délivrance des antigènes dans les cellules épithéliales respiratoires. De même, des études sur des macrophages et des cellules dendritiques de souris (BMDC pour *Bone Marrow derived Dendritic Cells*) ont montré une augmentation de l'immunogénicité des antigènes par la sécrétion plus importante de cytokines pro-inflammatoires. Après administration nasale chez des

souris, un challenge létal a été réalisé par voie orale, et seule les souris vaccinées par les antigènes encapsulés ont eu un taux de survie de 100%. De plus, l'analyse de la réponse dans la rate a montré une forte activation de l'immunité cellulaire. De même, dans un contexte d'infection congénitale à *T. gondii*, la vaccination a permis la gestation et la naissance de souriceaux, avec une quantité de kystes dans le cerveau et une inflammation oculaire significativement plus faible (260). Aussi, un vaccin universel contre la grippe a été développé en encapsulant une protéine chimérique CTA1-3M2e-DD contenant un dérivé non toxique de la toxine du choléra (CTA1), l'antigène grippal M2e ainsi que le fragment D de la protéine A de *Staphylococcus aureus* comme agent de ciblage lymphocytaire (261). La délivrance aux cellules dendritiques a montré une meilleure immunogénicité de l'antigène due à une délivrance plus importante. Après instillation et challenge nasal, les chercheurs ont montré une meilleure survie par les souris immunisées avec les NPL, grâce à une immunité cellulaire splénique plus importante ainsi qu'une sécrétion d'IgA dans les poumons des souris.

Ces différents exemples démontrent l'intérêt des NPL pour délivrer des antigènes vaccinaux par voie nasale. Ces particules sont celles qui seront utilisées durant ce travail de doctorat.

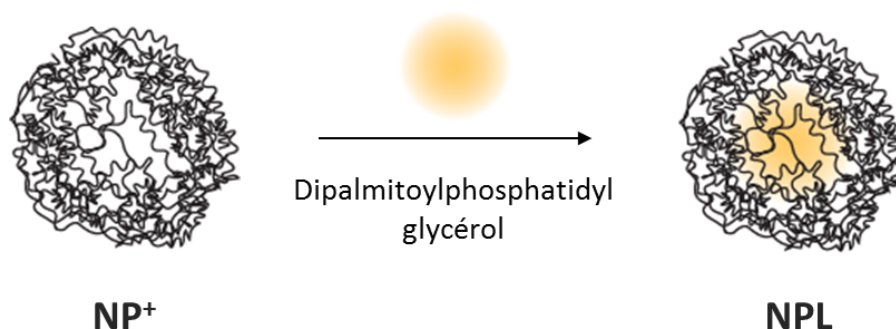


Figure 17: Représentation schématique des nanoparticules de maltodextrine lipidées (NPL)

### 2.3.2. Interactions avec le mucus

#### *Mucus et mucines*

Le mucus est la première barrière rencontrée par les particules lors d'une administration au niveau des muqueuses. Ce gel viscoélastique et semi perméable

tapisse et protège en effet les tissus de l'environnement extérieur. Sécrété par les cellules caliciformes des épithéliums, il est principalement composé d'eau à 95 %, de sels, d'acides gras et nucléiques, de peptides antimicrobiens et de mucines. Ces dernières sont des glycoprotéines transmembranaires ou sécrétées, associées les unes aux autres en un réseau poreux, et qui confèrent au mucus une viscosité 1000 à 10000 fois supérieure à celle de l'eau selon les tissus (262). Du reste, les mucines possèdent au sein de leur structure des groupements anioniques (acides sialiques), notamment au niveau des régions glycosylées, et de nombreuses zones hydrophobes, stabilisées par des ponts disulfure, leur permettant de retenir les éléments exogènes par différents types de liaisons. Enfin, la taille des pores du réseau de glycoprotéines varie de 100 nm à 500 nm selon les tissus, et l'épaisseur du gel oscille entre 1 µm dans l'œil et 800 µm dans le côlon (263). Ces différentes caractéristiques font du mucus une importante barrière physico-chimique dans laquelle se piègent la plupart des éléments pathogènes extérieurs.

Dans la conception d'un vecteur d'antigènes pour une administration par voie muqueuse, il est important d'étudier les interactions pouvant avoir lieu entre la particule et mucus. La particule doit en effet être capable de le franchir afin de pouvoir délivrer les antigènes au plus proche des cellules sous-jacentes.

Le mucus recouvrant la surface des épithéliums est organisé en deux couches. La première, directement au contact des cellules, est constituée de mucines transmembranaires qui font partie des composants du glycocalyx. Cette couche est peu épaisse et fluide, et ne joue pas le rôle de barrière vis-à-vis des pathogènes et des particules. La seconde couche est celle exposée à la lumière des muqueuses. Cette couche est épaisse et visqueuse, et est constituée de mucines sécrétées (264). Ces mucines possèdent un poids moléculaire de 0.3 MDa à 0.5 MDa grâce à leur capacité à former des réseaux covalents les unes avec les autres. Elles sont responsables de la viscoélasticité du gel de mucus, c'est pourquoi elles sont qualifiées de mucines gélifiantes (ou GFM pour *Gel Forming Mucins*) (128).

Il existe 5 GFMs différentes chez l'Homme, les MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, et MUC19, sécrétées différemment dans l'organisme : le mucus des voies nasales par exemple est principalement composé de la MUC5AC et de MUC5B et MUC2, alors



que celui de l'intestin grêle est composé des MUC2 et MUC6, représentées en Figure 18 (265).

Les **mucines** sont structurées en un squelette protéique, qui sera hautement glycosylé dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi des cellules caliciformes. Ce squelette est constitué principalement de grandes régions centrales riches en acides aminés hydroxylés (Sérine et Thréonine), de domaines C et N terminaux hydrophobes (et dont la structure est similaire au facteur de Von Willebrand), ainsi que de régions riches en cystéines, les domaines CYS. La longueur, l'organisation de ce squelette, et la répartition des domaines CYS varient selon les GFM (128). Les domaines CYS permettront aux mucines de se lier les unes aux autres par des ponts disulfure ; ils sont de plus composés de nombreux acides aminés hydrophobes capables de lier certains composés exogènes par des liaisons hydrophobes.

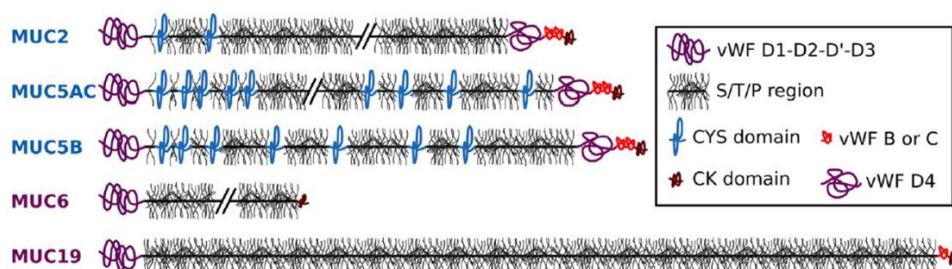


Figure 18 : Représentation schématique de la structure des mucines gélifiantes (128)

La présence des sérines et thréonines va permettre au squelette protéique d'être densément glycosylé. Les glucides représentent en effet 50 % à 90 % de la masse moléculaire finale des GFM (266). Ainsi après la transcription, le squelette protéique est envoyé au réticulum endoplasmique où auront lieu des N-glycosylations, puis à l'appareil de Golgi où auront lieu des O-glycosylations (Figure 18). Ces dernières sont les plus importantes, et vont permettre la fixation de groupements N-acétylgalactosamines (GalNAc) sur lesquels d'autres sucres pourront se fixer (fucoses, galactoses, comprenant des acides sialiques et groupements sulfates) (265). Ces sucres anioniques à pH neutre permettront aux mucines de fixer les éléments par liaisons électrostatiques.

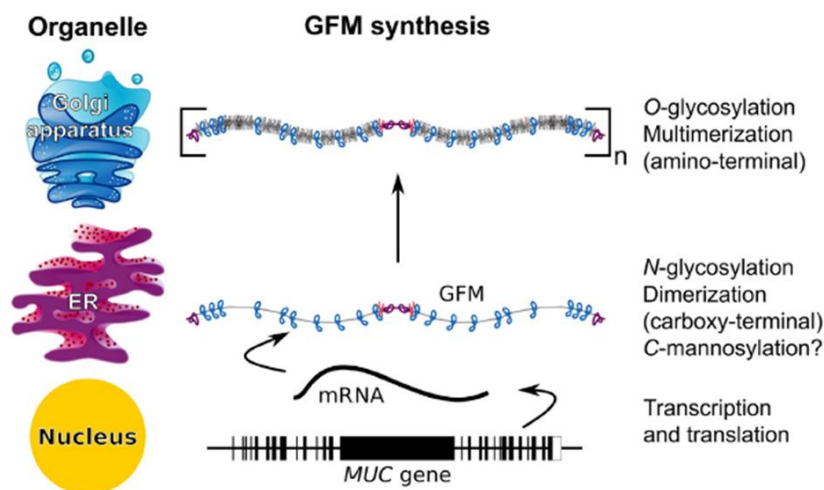


Figure 19 : Représentation schématique de la biosynthèse des mucines gélifiantes et de leurs modifications post-traductionnelles (128)

La compréhension de la structure des mucines est importante pour prévoir le comportement des NPs dans le mucus. En effet, ce comportement va directement dépendre de la nature des interactions avec les fibres de mucines.

On distingue ainsi deux types de vecteurs : les particules mucoadhérentes (MAP) et les particules mucopénétrantes (MPP) (Netsomboon and Bernkop-Schnürch, 2016). Les premières auront la capacité d'adhérer fortement au mucus par des interactions fortes avec les mucines, tandis que les secondes pourront se mouvoir dans le gel sans contrainte, en évitant toute interaction. Ces deux stratégies opposées sont envisagées dans le développement de vaccins.

### ***Les particules mucoadhérentes (MAPs)***

Les MAPs sont des vecteurs développés en vue d'augmenter la biodisponibilité muqueuse des substances actives. Lors de l'administration d'un antigène au niveau des muqueuses, sa progression vers les cellules du MALT peut être bloquée par la couche de mucus, à cause des répulsions électrostatiques entre les charges anioniques des mucines et celles de l'antigène, ou à cause d'un blocage stérique entre le diamètre des pores et le volume de l'antigène. Le rôle du vecteur mucoadhérent sera alors de

rentrer en contact avec le mucus et de se lier aux mucines, pour augmenter le temps de résidence local de l'antigène au niveau de la muqueuse (267).

La mucoadhérence est donc un phénomène physicochimique d'adhésion entre les mucines et une particule. Cette adhésion peut être médiée par différents facteurs : (i) une interaction électrostatique entre les acides sialiques anioniques des mucines et les charges cationiques portées par la surface du vecteur ; (ii) une interaction de type liaisons de van der Waals via des liaisons H et hydrophobes entre les deux éléments ; (iii) la formation de ponts disulfure entre les domaines CYS des mucines et une surface porteuse de groupements thiolés ; (iv) un enchevêtrement entre les fibres de mucines avec une longue molécule linéaire (267). La fabrication d'un vecteur mucoadhérent doit ainsi être réalisée à partir d'un polymère ou de molécules possédant au moins une de ces caractéristiques.

Dans le développement de vaccin, les molécules le plus souvent retrouvées pour augmenter la mucoadhérence de nanovecteurs sont des polymères naturels et synthétiques en raison de leur stabilité, leur biocompatibilité et leur faculté à être facilement fonctionnalisables (268). On retrouve par exemple le chitosan, l'alginate et leurs dérivés, et des polymères synthétiques comme les PAA ou le polystyrène (Figure 20) (269).

Le **chitosan** (CS) et ses dérivés font partie des polymères les plus utilisés dans les vaccins muqueux. Comme décrit précédemment, le chitosan est un polymère linéaire de glucosamine issu de la désacétylation partielle de la chitine des crustacés. Cette désacétylation entraîne l'exposition de groupements amine primaire cationiques, en conservant un pourcentage de groupements acétyle hydrophobes. Le chitosan a donc la possibilité de se lier fortement aux mucines par des liaisons électrostatiques et hydrophobes, ainsi que par des liaisons H grâce à la présence du squelette glycosylé (270). Ce phénomène a été décrit dans de nombreuses études, sur du mucus intestinal et des voies aériennes, et il en ressort que la longueur du polymère et le degré de désacétylation influe sur le caractère mucoadhérent (271,272). Ces résultats ont par ailleurs été confirmés par des études de diffusion dans le mucus dans lequel les particules de chitosan y étaient fortement ralenties (273).

Le CS a ainsi été utilisé dans la synthèse de NPs pour améliorer la délivrance muqueuse d'antigènes et la stimulation de l'immunité. Des études récentes ont évalué

l'immunogénicité du virus de la grippe porcine fractionné (Swine Influenza A virus) encapsulé dans des particules de chitosan. Comparés aux antigènes non formulés, les résultats ont montré une meilleure activation des réponses humorales et cellulaires au niveau des muqueuses, avec une activation des  $L_T$  CD8+ et une sécrétion plus importante de sIgA au niveau des muqueuses nasales et pulmonaires, ainsi qu'une meilleure sécrétion systémique d'IgG. Après un challenge non létal, les porcs vaccinés avec le nanovecteur avaient des titres viraux plus faibles dans les voies respiratoires, et une inflammation réduite dans les poumons (274).

De manière similaire, l'efficacité d'un vaccin oral contre la salmonellose a été évalué chez le poulet, après encapsulation d'extrait de paroi de *S. enteritidis* contenant de la flagelline, dans des particules de CS (275). Comparé à l'antigène seul, les formulations nanoparticulaires ont montré de meilleures sécrétions d'IgA dans les voies intestinales, une tendance à l'augmentation au niveau du sérum, du cloaque et de la trachée, et une meilleure activation de la réponse cellulaire dans le sérum et dans la rate.

Enfin, une étude récente a montré l'intérêt d'une administration nasale de polyplexes de chitosan associé à l'ARN de l'antigène M2e du virus de la grippe et à la protéine HA2 d'un virus *Influenza* H9N2 (CS + RNA + p) (276). Après deux administrations, les poulets ont été challengés par voie respiratoire. Les résultats ont montré que la combinaison des deux antigènes sous-unitaires, associés au chitosan, permet de stimuler plus efficacement la sécrétion d'IgA neutralisant au niveau pulmonaire, ainsi que la sécrétion systémique d'IgG spécifique.

Dans ces exemples le CS augmente la biodisponibilité muqueuse des antigènes, ce qui favorise la prise en charge par les cellules du MALT et l'activation de la réponse mémoire, tant pour la voie orale et nasale et chez différents types d'animaux. Il est cependant possible d'apporter des modifications structurales à ce polymère dans l'objectif d'améliorer sa bioadhésion.

Les groupements amine primaire portés par le CS ont un pKa proche de 6, et sont donc déprotonés à pH physiologique. Cela le rend insoluble dans l'eau, ce qui complexifie la fabrication de nanoparticules de petite taille et l'association aux antigènes, et diminue la possibilité d'interagir avec les groupements anioniques des mucines.

La transformation de ces groupements en triméthylamine permet d'apporter des charges cationiques indépendantes du pH, et de fabriquer du **triméthylchitosan** (TMC). Le TMC est soluble dans l'eau contrairement au chitosan, pour des pH variant de 4 à 9, grâce à la présence de ces charges cationiques (277). Il est également plus mucoadhérent que le CS et ce dépendamment du taux d'ammonium quaternaires (278), confirmant son potentiel en tant que vecteur d'antigènes mucoadhérent.

Dans une étude chez le poulet, *Zhao et al.* ont utilisé des NPs de TMC comme vecteur pour une administration orale et nasale du virus de la maladie de Newcastle atténué (NDV pour *Newcastle disease virus*) (279). Malgré des taux d'IgG sériques similaires, la vaccination mucoale avec le TMC a permis une meilleure réponse humorale et cellulaire. De plus, 100 % des animaux vaccinés par voie nasale et orale ont été protégés du challenge, contre 80 % des animaux ayant reçu le vaccin non encapsulé.

L'immunisation de souris par voie nasale a également été démontrée par administration d'antigènes sous-unitaires issus de *Bordetella pertussis* encapsulés dans des particules de TMC, comparé à une co-administration avec de l'alun (280). Après 2 administrations, l'analyse de la réponse immunitaire a montré une sécrétion d'IgG spécifiques dans le sang identique entre les groupes TMC et alun, mais une sécrétion bien plus élevée d'IgA dans les voies aériennes pour le groupe TMC. La réponse cellulaire mesurée dans la rate a de plus montré une meilleure réponse des splénocytes après restimulation.

D'autres modifications peuvent être apportées au chitosan pour améliorer le développement de vecteur mucoadhérent. L'ajout de glycol permet ainsi de fabriquer du **glycol-chitosan** (GC) mucoadhérent et soluble dans l'eau à pH acide comme basique (281). Des essais vaccinaux contre l'hépatite B ont été réalisés chez la souris, en administrant des antigènes sous-unitaires du virus encapsulés dans des particules de GC, par voie nasale. L'analyse de biodisponibilité a montré un temps de résidence muqueux supérieur avec les GC par rapport au CS non modifié. De plus, la sécrétion d'IgG sérique était supérieure pour le groupe GC, similaire au groupe ayant reçu une administration d'antigènes associés à de l'alun par voie sous-cutanée. Enfin, la sécrétion d'IgA spécifique était supérieure avec les NPs de GC qu'avec les NPs de CS, dans la salive, les voies aériennes et génitales (282).

D'autres transformations ont encore être apportées au chitosan en vue d'améliorer sa mucoadhérence et sa solubilité, comme le greffage de groupements thiolés (283). A ce jour, ces polymères n'ont pas encore été testés dans le développement de vaccin muqueux.

Enfin, le CS et ses dérivés peuvent être utilisés comme polymères de recouvrement de surface, pour améliorer la mucoadhérence d'autres NPs. L'ajout de CS en surface de NPs polymériques et liposomales permet par exemple d'augmenter leur temps de résidence au niveau des muqueuses (18,284). On peut ainsi choisir le matériau initial en fonction de sa capacité à associer l'antigène, et le recouvrement permet d'optimiser la délivrance au niveau des muqueuses.

Ainsi, le recouvrement de NPs de PLGA par du CS (C-PLGA) et du GC (GC-PLGA) dans le cadre d'un vaccin nasal contre l'hépatite B chez la souris révèle une mucoadhérence plus longue pour les GC-PLGA que pour les C-PLGA, elles même plus adhérentes que les PLGA nues (285). Après avoir reçu deux administrations, la réponse humorale systémique ainsi que les réponses humorales et cellulaires au niveau des muqueuses sont sensiblement plus élevées pour les CG-PLGA par rapport au C-PLGA. Ces deux NPs élicitent par ailleurs le système immunitaire plus efficacement que les PLGA non recouvertes.

Ainsi, le chitosan est un polymère naturel biocompatible permettant d'améliorer l'immunogénicité de vaccins sous-unitaires administrés par voie muqueuse, grâce à son caractère mucoadhérent. La possibilité de le fonctionnaliser ainsi que son absence de toxicité en font l'un des polymères les plus étudiés dans le développement de vaccins.

L'**alginate** est un copolymère naturel retrouvé chez les algues, et approuvé par la FDA pour l'utilisation humaine. Il est composé d'acide-D-mannuronique (M) et d'acide-L-guluronique (G) liés en  $\beta$ -1-4, et d'une longueur allant de 30 KD à 400 KD. Biocompatible, il est soluble dans l'eau et biodégradable, et on le retrouve fréquemment utilisé comme polymère pour fabriquer des gélules et comprimés, ainsi que pour concevoir des vecteurs de substance active par voies muqueuses (286). Il peut en effet former des hydrogels en présence de cation divalents. La répartition des sucres peut se faire en séquence hétérogène (Les M et G s'alternent et se suivent sous une forme MGMGMG) ou homogène (plusieurs M/G reliés à la suite sous une forme

MMMM ou GGGG), ce qui influence directement les propriétés physicochimique du polymère (287). De plus, malgré ses charges anioniques, l'alginate possède une mucoadhérence semblable au chitosan, dû au fait que les polyanions peuvent générer de nombreuses liaisons H avec les mucines (288). C'est pourquoi de nombreuses études décrivent son utilisation, seul ou en recouvrement de surface d'autres NPs, dans le développement de vecteurs vaccinaux pour des administrations muqueuses.

Récemment a été étudiée la capacité de NPs d'alginate à stimuler une réponse immunitaire mucoale chez le lapin, contre le virus de la grippe, en absence et en présence d'adjuvants muqueux classiques (CpG-ODN et QS-21) (289). Les groupes ayant reçu les vaccins non adjuvantés ont montré une sécrétion d'IgG sériques moins importante, mais une sécrétion d'IgA dans les voies nasales ainsi qu'une réponse cellulaire similaire aux autres groupes.

Enfin, l'alginate est souvent retrouvé associé au chitosan dans la formation de particules mucoadhérentes pour la vaccination. Ainsi des vecteurs Chitosan-Alginate ont été développés pour associer et délivrer des antigènes du virus de la rougeole par voie orale (290). L'association de chitosan a permis de protéger les antigènes de la dégradation par les sucs gastriques. Après immunisation, la réponse humorale dans les intestins était plus importante pour les antigènes formulés, ainsi que la sécrétion systémique d'IgG.

Par ailleurs, de par les propriétés gélifiantes de l'alginate, la majorité des travaux étudient ce polymère seul ou associé dans la formation de microparticules mucoadhérentes.

Les **Polyacrylates** sont des polymères synthétiques, anioniques à pH neutre, susceptibles de se lier au mucus et d'augmenter le temps de résidence au niveau des muqueuses (291). Ainsi, en administrant par voie nasale chez la souris un peptide antigénique issu de l'antigène M de Streptococcus, associé à des dendrimères de polyacrylate par liaisons covalentes, avec ou sans toxine cholérique, une réponse humorale identique entre les 2 groupes a été observée, suggérant l'intérêt d'utiliser ce polymère dans l'élaboration de vecteur muqueux (292)..

Le **polystyrène** est un polymère plastique synthétique, constitué de motifs styrènes, dont la longueur des chaînes peut être ajustée de quelques centaines à plusieurs millions de daltons. On peut ainsi fabriquer des particules de ce polymère de formes et de diamètres très précis, et ce de manière homogène. Malgré la carcinogénicité du styrène, les données actuelles ne permettent pas d'affirmer que les NPs de polystyrène (PS-NPs) soient toxiques pour l'Homme, excepté à de fortes doses (293). Par chimie organique, il est possible d'ajouter des groupement chimiques variés sur les chaîne du polymère pour le fonctionnaliser (carboxyl, sulfonyl, amine...), et donc pour optimiser la création de nanovecteurs (294,295). Il a ainsi été démontré par des techniques de vidéo-microscopie confocale que les PS-NPs fonctionnalisées par des groupements carboxyliques adhèrent fortement au mucus cervico-vaginal (296). Ce caractère mucoadhérent a été exploité dans l'élaboration d'un vaccin contre le VIH, administré chez la souris par voie nasale (297). En greffant de manière covalente le VIH inactivé en surface de PS-NPs, l'immunisation a permis d'éliciter une sécrétion d'IgA neutralisants dans les voies vaginales, et une sécrétion d'IgG sérique.

Les dérivés du polystyrène ne sont en revanche pas biodégradables, ce qui limite leur utilisation comme système de délivrance nanoparticulaire.

D'autres polymères naturels et synthétiques, dont la cellulose ou l'acide hyaluronique, sont fréquemment utilisés pour leurs propriétés mucoadhérentes dans l'élaboration de vecteur d'antigène par voie mucoale, sous forme de microparticules plutôt que de nanoparticules.

Ces différents exemples montrent que la mucoadhérence est donc une propriété exploitable par les nanovecteurs pour améliorer la délivrance mucoale des antigènes qui leur sont associés.



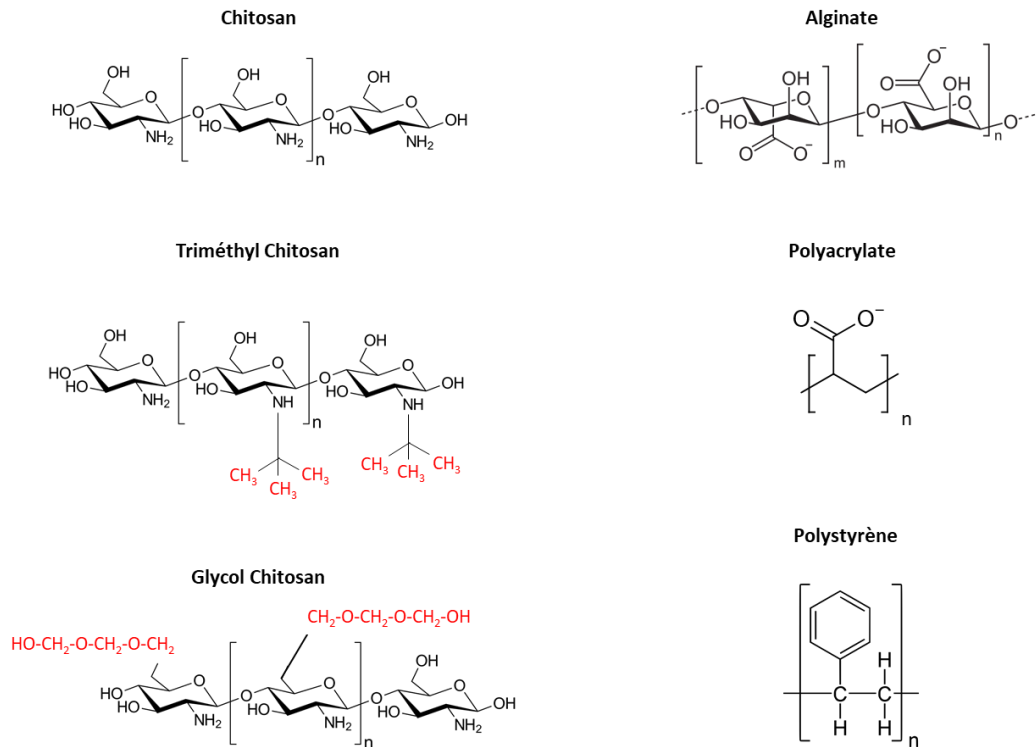


Figure 20 : Exemple de polymères mucoadhérents utilisés dans le développement de nanoparticules pour l'administration muqueuse de vaccin.

Cette stratégie possède toutefois des limites qu'il est possible de palier. En effet, si une forte mucoadhérence améliore significativement l'accessibilité des antigènes aux muqueuses, elle ne permet pas de les délivrer directement dans les cellules du MALT. Leur prise en charge dépendra donc uniquement de la quantité atteignant les cellules, et de la reconnaissance de motifs antigéniques, comme pour la voie injectable. De plus, le temps de résidence au niveau de la muqueuse d'administration reste dépendant de la clairance mucociliaire.

Ainsi, l'élaboration de vecteurs mucopénétrants, capables de franchir le mucus pour atteindre les cellules sous-jacentes pour y délivrer les antigènes, a été proposée (127).

*Les particules mucopénétrantes*

Les MPP sont des particules développées pour augmenter la biodisponibilité muqueuse des substances actives, et ce indépendamment de la clairance mucociliaire. Le rôle de ces vecteurs est en effet de traverser la couche supérieure du mucus et d'atteindre la membrane des cellules sous-jacentes pour optimiser la prise en charge du médicament.

A l'inverse de la mucoadhérence, la mucopénétration est un phénomène physicochimique permis par l'absence d'interaction entre les mucines et une particule. Ce phénomène est donc obtenu par des vecteurs dont le diamètre est inférieur à celui des pores du gel de mucus, et dont la surface évite les interactions électrostatiques avec les acides sialiques anioniques, les liaisons H et hydrophobes et la formation de ponts disulfure avec les domaines CYS des mucines (268).

Les polymères les plus utilisés à ces fins sont les polymères neutres et hydrophiles comme le **PEG** ou les **poloxamers**. Leur structure consiste en de longues chaînes carbonées et oxydées, neutres et hydrophiles. Ces polymères sont fréquemment utilisés dans le développement de vecteurs furtifs capables d'échapper à la vigilance du système immunitaire par voie sanguine, en évitant la fixation des opsonines. Le recouvrement de NPs par ces polymères permet donc d'éviter toute interaction avec les protéines des milieux biologiques, dont les mucines. Ainsi en vue d'améliorer la mucopénétration, la densité de PEG autour de la particule doit être la plus élevée pour empêcher stériquement l'accès au cœur de la particule (298,299). De même, un polymère de poids moléculaire trop faible ne permet pas de recouvrir efficacement les vecteurs, mais un polymère trop long forme des filaments susceptibles de s'enchevêtrer dans les mailles du mucus, diminuant ainsi la mucopénétration du vecteur (300,301). Le PEG améliore ainsi grandement la biodistribution des NPs au sein des muqueuses intestinales, vaginales et pulmonaires (298,301,302). Par cette méthode, plusieurs équipes ont réussi à améliorer la délivrance de peptides au niveau des muqueuses en utilisant des vecteurs recouverts de PEG, par voie orale et respiratoire (303,304).

Dans le développement de vaccin, l'efficacité de particules de PLA recouvertes de PEG et encapsulant de la toxine tétanique a été démontré (305). Après administration nasale, les MPP permettaient une meilleure sécrétion d'IgA dans la salive, les voies aériennes et l'intestin grêle.

De même, l'administration par voie orale d'antigènes du virus de l'hépatite B, encapsulés dans des vecteurs de PLA recouverts de PEG a montré une meilleure activation de l'immunité mucoale que des vecteurs nus (306).

Enfin, des résultats similaires ont été obtenus avec des liposomes recouverts de PEG dans le cadre d'immunisation contre la grippe, administrés par voie sublinguale (307).

Récemment, l'ajout de Gantrez® AN [poly(anhydride)], un polymère commercial de méthyl(vinyle)éther de 130 KD de structure semblable aux poloxamers, en surface de particules de zéines a amélioré la délivrance par voie orale d'extraits membranaires d'ETEC (308). Le mucopénétration du vecteur a été confirmé par microscopie confocale, et l'immunisation sur des souris puis des génisses enceintes a montré une élévation des IgG et sIgA sériques et des sIgA au niveau intestinal, avec une forte activation de la réponse cellulaire dans la rate.

Le PEG et les poloxamers ont le potentiel d'améliorer la mucopénétration et le temps de résidence des vecteurs, ce qui entraîne une meilleure biodisponibilité des vaccins administrés par voie muqueuse. Ils présentent en revanche des inconvénients majeurs pour délivrer les antigènes dans les cellules. En effet, une surface neutre et hydrophile ne permet pas aux NPs d'être efficacement captées par les cellules (77). La majorité des vecteurs pénétreront donc le mucus, mais resteront au contact des cellules, sans pouvoir y délivrer les antigènes. Par ailleurs, la présence de PEG diminue grandement l'échappement endosomal des vecteurs après captation. Plusieurs stratégies tentent de palier ce dilemme (aussi appelé *PEG dilemma*), en greffant des peptides de reconnaissance membranaire en bout de chaîne de PEG, ou en réduisant le pourcentage de recouvrement autour du vecteur (77,279). Malgré la furtivité qu'il apporte aux particules, le PEG peut de plus être reconnu par le système immunitaire. Cela entraîne la sécrétion dans le mucus d'anticorps dirigés contre ce polymère, diminuant la mucopénétration de vecteurs, après des administrations répétées (309).

Des recherches récentes se sont ainsi focalisées sur le développement de polymères alternatifs, pour la plupart synthétiques, permettant de traverser le mucus tout en permettant l'endocytose des particules. Des preuves de concept ont été réalisées avec des **poly-oxazoline** (310), de la **polydopamine** (311) et des dérivés d'acides acryliques dont les **HMPA** (N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide) (312). L'équipe de Bernkop-Schnürch étudie de plus l'utilisation de polymères anioniques susceptibles de pénétrer le mucus, et d'être clivés à proximité des cellules par les phosphatases environnantes, libérant ainsi de nouvelles charges cationiques favorisant l'interaction avec les membranes cellulaires (313). D'autres stratégies ont enfin été étudiées, comme le greffage d'enzymes mucolytiques en surface de particules (314).

De plus, des études se sont inspirées de la surface des virus pour designer des particules furtives dans le mucus. Les virus sont en effet des nanoparticules naturelles dont certains sont susceptibles de pénétrer le mucus et d'infecter l'organisme par les muqueuses. L'étude des mécanismes de mucopénétration a révélé que la surface de ces virus est densément recouverte de charges anioniques et cationiques, avec une charge de surface globalement neutre. Il en résulte un jeu d'attraction-répulsion avec les mucines, ce qui permet aux virus de pénétrer le gel aussi aisément que dans l'eau (315). Une surface **zwitterionique**, alternant charges anioniques et cationiques, permettrait ainsi d'améliorer la mucopénétration de NPs.

L'utilisation du phospholipide zwitterionique dilauroyl-phosphatidylcholine (DLPC) a par exemple permis le développement de liposomes mucopénétrants pour améliorer la biodistribution intestinale (316).

Ces stratégies prometteuses n'ont en revanche pas encore été étudiées dans le développement de vaccins muqueux.

### 2.3.3. Délivrance des antigènes

L'utilisation des NPs comme vecteurs d'antigènes est non seulement liée à leur capacité à protéger les antigènes de la dégradation protéolytique, à améliorer le passage des barrières jusqu'aux cellules cibles, mais aussi à la possibilité de délivrer l'antigène directement dans les cellules (317).

La délivrance intracellulaire est un des paramètres permettant d'améliorer l'immunogénicité des antigènes. En effet, la prise en charge de protéines antigéniques par les cellules des muqueuses dépend principalement de la reconnaissance des épitopes portés par ces derniers avec des récepteurs membranaire ou intracellulaires spécifiques des cellules immunitaires, les PRR. Or, sans adjuvants, les vaccins sous-unitaires possèdent moins de PAMP et d'épitopes susceptibles d'être reconnus. De plus la fixation spécifique sur des récepteurs est saturable, et la quantité d'antigènes pouvant être captés est limitée. L'objectif des NPs est donc de maximiser l'internalisation des antigènes dans les cellules d'intérêt : en associant une quantité importante d'antigènes à un vecteur, la captation de ce dernier favorisera l'internalisation d'une grande quantité d'antigènes. Cette prise en charge plus importante va stimuler la réponse des cellules épithéliales et immunitaires de manière plus intense, ainsi que la réponse immunitaire associée.

#### *Délivrance dans les cellules épithéliales*

Les cellules épithéliales sont en première ligne dans la défense des muqueuses contre les infections, et elle participent à l'élaboration de la réponse mémoire en recrutant et en aidant à la stimulation des cellules présentatrices d'antigène, par reconnaissance de motifs antigéniques, principalement via les TLR4/5/9 et les NOD1/2 (318). Cette reconnaissance entraîne la translocation des antigènes, et active les voies intracellulaires induisant la sécrétion de chémokines et de cytokines pro-inflammatoires, et l'expression du CMH de classe II (138,319). Ainsi dans l'intestin, l'expression de la chémokine CCL-28 permet par exemple le recrutement de L<sub>B</sub> sécréteurs d'IgA porteur du récepteur CCR10, et la sécrétion de CCL-25 permet de recruter des L<sub>B</sub> et L<sub>T</sub> variés présentant le récepteur CCR9 (161). Dans les voies aériennes, la sécrétion de CCL20 et de GM-CSF par les cellules épithéliales entraîne le recrutement des cellules dendritiques, et d'orienter la nature de la réponse immunitaire par sécrétion de cytokines (320). Des études ont en outre démontré que la co-administration d'antigènes du virus de la grippe avec des plasmides de CCL19 et CCL28, par voie nasale, amélioreraient la réponse muqueuse humorale et cellulaire (321). D'autres études ont encore démontré que l'utilisation des adjuvants CpG et CT par voie intestinale en présence du virus de la grippe inactivé augmentait par 3 fois la

production de CCL20 au niveau des plaques de Peyer et des cellules épithéliales, et améliorerait le recrutement de cellules dendritiques. Par ailleurs, une délivrance plus importante dans les cellules M permettrait d'améliorer la présentation des antigènes aux cellules sous-jacentes.

La délivrance d'antigènes dans les cellules épithéliales est donc un facteur important pour améliorer l'immunogénicité d'antigènes sous-unitaires, en stimulant la sécrétion des cytokines et chémokines pro-inflammatoires, améliorant ainsi la prise en charge par les CPA.

### *Délivrance dans les cellules présentatrices d'antigènes*

Les CPA, et plus particulièrement les cellules dendritiques, sont les cellules principalement responsables de la présentation antigénique aux lymphocytes. La qualité de la présentation aux antigènes influence la qualité de la réponse immunitaire mémoire. Ainsi, l'amélioration de la délivrance d'antigènes grâce aux NPs permettrait d'augmenter l'activation de ces cellules, indépendamment de l'immunogénicité de la particule elle-même. Cette activation peut se mesurer *in vitro* par dosage des cytokines pro-inflammatoires dans le surnageant des cellules, ou en mesurant l'expression de récepteurs de surface spécifique de la présentation antigénique (CD40, CD80, CD86, CMHI et CMHII). L'encapsulation d'un extrait total de *T. gondii* dans des NPs de maltodextrine a ainsi amélioré la délivrance intracellulaire des antigènes, favorisant ce faisant la sécrétion des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL-6, TNF- $\alpha$  et IL-10 par des cellules dendritiques et macrophages différenciés et entraînant ainsi une forte réponse mucoale contre le parasite. Le profil des cytokines sécrétées permet par ailleurs de suivre l'orientation de la réponse immunitaire, avec dans cet exemple un profil favorisant la maturation des LT CD4<sup>+</sup> en un profil L<sub>TH</sub> de la voie Th1, nécessaire pour lutter contre les parasites intracellulaires (259). De même, l'association de la protéine de fusion CTA1-3E $\alpha$ -DD à des liposomes de 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) a amélioré la reconnaissance et l'immunogénicité de l'antigène vis-à-vis de cellules dendritiques, avec une expression plus importante des CMHII, CD80 et CD86, ainsi qu'une sécrétion plus importante d'IL-1 $\beta$  et IL-6 (322). Enfin, l'association de lysats tumoraux à des particules de PLGA a augmenté l'expression de surface des CD80, CD86 et CMH II des CD en vue de réaliser de la

vaccination antitumorale par voie orale (323). La délivrance intracellulaire par les NPs joue donc un rôle prépondérant dans l'activation des CPA et dans l'efficacité de la réponse mémoire induite.

De manière plus complexe, le trafic intracellulaire suivant la délivrance influence lui aussi le type de présentation antigénique par les cellules dendritiques aux lymphocytes. Lors d'une infection, les antigènes sont phagocytés, puis transitent par le compartiment lysosomal pour être ensuite exposés par le CMHII, alors que lors d'une présentation croisée, les antigènes exposés par le CMHI sont des pathogènes intracellulaires ayant infecté la CPA, qui circulent donc dans leur cytoplasme et finissent par être dégradés par le protéasome (257). Cela explique la difficulté des premiers vaccins à induire une réponse cellulaire en absence d'adjuvant spécifique. La voie d'endocytose empruntée par les NPs pour délivrer des antigènes a donc un impact direct sur la qualité de la réponse immunitaire induite. Une délivrance et une dégradation lysosomale des antigènes induira une présentation par le CMHII des CPA, favorisant la réponse  $CD4^+$ , alors qu'une délivrance cytoplasmique induira préférentiellement une présentation croisée par le CMHI, activant les  $CD8^+$  et la réponse cellulaire (Figure 21). En fonction de la pathologie, le design de vecteur est ici important afin de cibler le compartiment dans lequel délivrer les antigènes.

Plusieurs stratégies ont été étudiées pour développer des vecteurs capables de délivrer des antigènes dans le cytoplasme. Des NPs cationiques polymériques à base d'acide propyl(acrylique) ont été synthétisées, encapsulant de l'ovalbumine comme antigène témoin, capables d'être captées par endocytose puis de délivrer les antigènes dans le cytoplasme par échappement endosomal (325). Cet échappement est réalisé par disruption osmotique de la membrane de l'endosome, grâce de la surface aminée du vecteur, titrant les protons acides de l'organite. La libération intracellulaire de l'ovalbumine a ainsi permis l'expression d'épitopes spécifiques (peptide SIINFEKL) exposés *via* le CMH I. Cette stratégie a été utilisée à plusieurs reprises en utilisant d'autres polymères polycationiques comme le PEI (326–328).

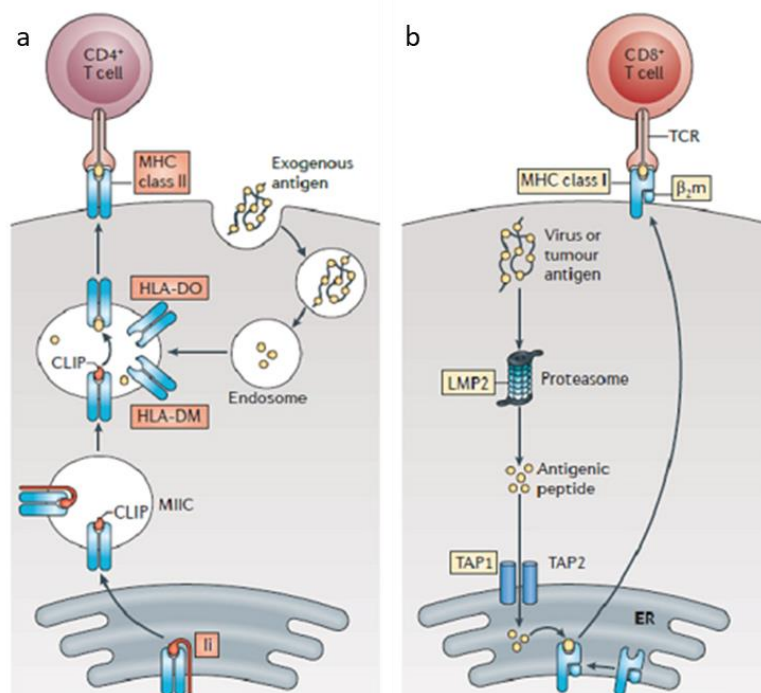


Figure 21 : Représentation schématique des mécanismes déterminant la présentation des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes. L'endocytose d'antigènes par les vésicules d'endocytose induit une association aux CMH de classe II dans les endosomes tardifs, puis une présentation aux lymphocytes  $CD4^+$  (a). La délivrance cytoplasmique d'antigènes induit une dégradation par les protéasomes, suivie par une translocation des fragments de dégradation vers les réticulum endoplasmiques, où ils sont associés aux CMH de classe I, et enfin une présentation du complexe aux lymphocytes  $CD8^+$  (b) (324).

La délivrance cytoplasmique peut aussi être réalisée grâce aux liposomes fusogéniques. Selon leur taille, leur charge de surface et leur composition lipidique, les liposomes peuvent être captés par pinocytose ou phagocytose, ou bien fusionner directement avec la membrane, en libérant ainsi leur contenu directement dans le cytoplasme. Cette stratégie est déjà utilisée pour la transfection d'acides nucléiques car elle empêche leur dégradation et favorise leur expression dans le cytoplasme (pour les ARNm et siRNA) et dans le noyau (pour la transgénèse). Elle peut de même être réalisée pour la délivrance d'antigènes. Ainsi un liposome fusogénique a été synthétisé à partir de DOPE (dioleoyl-phosphatidylethanolamine) et d'un peptide de perméabilisation des membranes (peptide KALA) (329). L'association d'ovalbumine dans ces liposomes a permis leur délivrance dans le cytoplasme des BMDC indépendamment des voies d'endocytose, et une activation de la présentation par le



CMH de classe I. En parallèle, l'utilisation de liposomes composés de lipides cationiques captés par endocytose a favorisé une réponse de type humorale par expression du CMH de classe II. De même, l'utilisation de liposomes fusogéniques peut aider à l'échappement endosomal en fusionnant avec la membrane de l'endosome, libérant ainsi le vecteur dans le cytoplasme. Ainsi un liposome de DOPE recouvert d'un polymère hydrophobe de 3-methyl-glutarylated poly(glycidol) a été développé, capable de délivrer de l'ovalbumine dans le cytoplasme des cellules dendritiques par fusion avec la membrane de l'endosome (330). Cela a permis de présenter le peptide par le CMH de classe I et une activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Après administration nasale, la réponse splénique a confirmé cette activation de l'immunité cellulaire.

La reconnaissance et l'internalisation des NPs par les CD peuvent directement dépendre des caractéristiques physicochimiques du vecteur. En effet, la taille, la charge de surface, la forme ou encore la rigidité sont des paramètres influençant la captation par les différentes voie d'endocytose, et la délivrance d'antigènes (331).

L'influence de la **taille** de NPs de polystyrène anioniques a été étudiée sur la délivrance d'ovalbumine dans des CD (332). Ils ont observé que les NPs de 40 nm et 49 nm étaient significativement mieux captées que celles de 20 nm ou de 67 nm et plus, générant ainsi une meilleure réponse immunitaire. De même, une étude réalisée sur macrophages a montré que les particules de chitosan de 400nm étaient mieux captées que celles de 1,9 µm et 4,8 µm, induisant de ce fait une expression plus importante des CD80 et CD86, ainsi qu'une plus grande sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (333). D'une manière générale, il semble que les particules de taille inférieure à 200 nm soient les mieux captées par les CPA. Par ailleurs, le diamètre des pores de particules de silice mésoporeuses influe sur l'efficacité vaccinale : Les NPs ayant des pores de 10 nm de diamètre associent et présentent plus efficacement les antigènes aux cellules dendritiques, que celles ayant des pores de 5 nm (334). La présentation croisée par le CMH I s'en trouve elle aussi améliorée, avec une possibilité de développer une vaccination anti-cancéreuse.

En plus de la taille, la **charge** de surface des vecteurs est un élément important pour l'internalisation puisque leur captation est principalement médiée par les interactions

électrostatiques avec les récepteurs de surface des cellules. Ce paramètre affecte donc directement la délivrance et l'immunogénicité des antigènes. Pour valider cette hypothèse, de l'ovalbumine a été greffé sur des particules de polyacrylate, chargées positivement ou négativement (335). Les particules cationiques délivraient plus d'antigènes dans les cellules dendritiques de souris que les anioniques, avec une expression plus importante des ARNm de CD80, CD86 et CMHII et de leur expression en surface des cellules. Après administration pulmonaire, seules les particules cationiques ont déclenché une sécrétion d'IgA spécifiques au niveau des voies aériennes.

La **forme** des vecteurs peut de plus avoir une influence sur la reconnaissance par les cellules phagocytaires, et leur capacité à internaliser les éléments. Des études comparant des microparticules de polystyrène sphériques, en bâtonnets ou sous forme de sphères aplaties ont en effet montré que les particules oblongues étaient les plus phagocytées et internalisées, grâce à leur forme mimant celle des bactéries, et à la plasticité membranaire plus encline à envelopper des objets ayant ces formes (82,83). Des études d'immunogénicité ont cependant démontré que, malgré cette internalisation plus importante, les particules oblongues stimulaient les cellules de manière moins efficace que les particules sphériques et cubiques de taille similaires (336). Cela peut être dû au fait que les nanoparticules sphériques peuvent être à la fois captées par phagocytose et par endocytose classique, contrairement aux particules oblongues captées uniquement par phagocytose (91). En revanche, selon le type de vecteur et de méthodes de synthèse, ce paramètre peut être plus complexe à maîtriser que ceux cités précédemment.

De manière similaire à la forme, la **rigidité** des particules est enfin un facteur pouvant influencer l'immunogénicité des NPs car elle influe sur la captation des cellules. Les particules élastiques sont en effet plus susceptibles de s'aplatir sur les membranes des cellules, augmentant la fixation aux récepteurs de surface mais diminuant ainsi l'invagination et la formation de vésicules d'endocytose (85). Il a ainsi été démontré que des particules rigides étaient 3 à 5 fois plus associées aux cellules dendritiques, induisant ainsi une expression plus importante des CD83 et CD40 de surface, en absence comme en présence d'adjuvants (337).

*Délivrance aux lymphocytes B*

La captation des antigènes par les cellules M et la translocation qui s'en suit permet aux cellules dendritiques sous-jacentes de les capter pour les présenter aux lymphocytes T. Il est de plus possible, comme dans le cas d'une administration par voie injectable que les antigènes migrent jusqu'aux lymphocytes B, dans les *B-cell zones*, et soient reconnus via leur BCR. Cette reconnaissance induira, comme après une présentation par les CPA, l'exposition des motifs antigéniques par les CMH II et une co-activation avec les L<sub>TH</sub>.

Ainsi l'association d'antigènes à des vecteurs pourra favoriser, après translocation par les cellules M, la reconnaissance des antigènes par les L<sub>B</sub>. L'association de BSA et de lysozyme en surface de vecteurs de PEI/Phosphate de calcium a ainsi amélioré la stimulation de lymphocytes B, et ce de manière dépendante à la valence des antigènes en surface des NPs (338). En effet, une valence importante vis-à-vis des BCR permet de mieux stimuler les L<sub>B</sub> et d'améliorer l'activation des lymphocytes T (339). Il a de plus été démontré que l'espace entre les antigènes présents en surface pouvait modifier la capacité des vecteurs à stimuler les L<sub>B</sub> (340). En effet, en utilisant des particules de polystyrène recouvertes d'antigènes de la grippe, ils ont montré que les particules recouvertes de manière dense activaient moins bien les lymphocytes que les vecteurs ayant des antigènes plus espacés.

La structure des formulations vaccinales permet ainsi d'améliorer l'immunogénicité des antigènes vis-à-vis des lymphocytes B. Cette stratégie peut être utilisée pour améliorer la réponse humorale dirigée contre un antigène, bien qu'aucune étude par voie mucoale n'ait à notre connaissance été réalisée.

## 2.3.4. Ciblage

Les nanoparticules possèdent l'intérêt d'avoir une surface fonctionnalisable, et outre l'amélioration de la mucopénétration et de l'internalisation, il est possible d'y greffer des molécules permettant de cibler les cellules d'intérêt. Ce greffage peut être réalisé par des liaisons covalentes ou électrostatiques, et vise les éléments présents en surface des cellules M ou des CPA, pour favoriser la prise en charge mucoale et la

présentation qui s'en suit aux lymphocytes par les mécanismes décrits précédemment. Selon le type de cellules visées et leur présence au sein des muqueuses, l'efficacité des agents de ciblage peut être variable. Ainsi, les cellules M sont les plus étudiées en vue d'améliorer la délivrance et l'immunogénicité des antigènes par des nanovecteurs (341).

### *Ciblage des cellules M*

Les cellules M sont en première ligne dans la captation des antigènes et particules exogènes colonisant les muqueuses de l'organisme. Chez l'Homme, elles sont en effet présentes de manière régulière au niveau des amygdales dans les voies aériennes, ou des plaques de Peyer pour les voies digestives. La couche de mucus y est plus fine et la présence des FAE et des cellules immunitaires associées est plus importante (342). La délivrance ciblée de ces cellules semble donc être une stratégie rationnelle en vue d'améliorer l'immunogénicité des antigènes sous-unitaires.

Le ciblage médié par des vecteurs s'appuie sur le greffage de ligands en surface de NPs, capable de se lier au niveau de récepteurs présents de manière spécifique et constitutive chez la cellule d'intérêt (Figure 22). Les études réalisées en ce sens chez la cellule M de souris et humaine ont ainsi permis de découvrir des candidats ligands potentiels, qui ont été testés dans des essais de vaccination par voie muqueuse (134).

L'agglutinine-1 de *Ulex europaeus* (ou **UEA-1**) est une **lectine** végétale ayant une forte affinité pour le récepteurs aux  $\alpha$ -L-fucose des cellules M de souris (343), et des études ont montré que son greffage en surface de vecteur leur permet de s'accumuler préférentiellement au niveau des cellules M (344). On la retrouve ainsi fréquemment utilisée dans le développement de vaccins muqueux, à partir de vecteur polymériques et lipidiques.

Des vecteurs de PLGA ont été développés pour délivrer des antigènes de l'hépatite B par voie orale, avec de la lectine UEA-1 greffées covalamment en surface (345). Après immunisation, le ciblage des cellules M induisait des taux d'IgA 5 à 10 fois supérieures dans les intestins, la salive et les voies génitales de souris, ainsi qu'une réponse cellulaire splénique sensiblement plus importante. Ils ont par la suite obtenus des résultats similaires en synthétisant des liposomes de DSPE (distéroyl-

phosphatidyléthanolamine), cholestérol et NGPE (N-glutaryl-phosphatidyléthanolamine), recouvert d'UEA-1, et pour délivrer le même antigène (346).

De même, des nanoparticules de PLGA et de DPPE (dipalmitoyl-phosphatidyléthanolamine) ont été synthétisées avec la lectine UEA-1 conjuguée en surface par liaison covalente (347). Les études de biodistribution *in vivo* ont montré que la lectine triplait la translocation du vecteur au niveau des plaques de Peyer, avec un temps de résidence intestinal plus prononcé sur toute la longueur de l'intestin. Après une immunisation par voie orale avec de l'ovalbumine encapsulée, la présence des sIgA intestinales et des IgG systémiques était plus élevée, et d'autant plus améliorée par la présence de MPL.

Plus récemment, des études ont été réalisées sur des cochons, en délivrant par voie orale des antigènes du PRRSV (*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*), encapsulés dans des particules de PLGA recouvertes d'UEA-1 (348). La fonctionnalisation par les lectines a permis d'améliorer significativement la sécrétion d'IgA spécifiques dans les selles et lavages intestinaux, ainsi que les taux d'IgG sériques neutralisants.

Cette lectine améliore ainsi la délivrance des antigènes aux cellules M par des particules. En revanche, dû à des différences de glycosylation cellulaire entre les espèces, son affinité pour les cellules M humaines reste à déterminer (349).

A l'image de l'UEA-1, d'autres lectines végétales ont été étudiées comme agent de ciblage en surface de particules pour lier les récepteurs aux glucides des cellules M et améliorer l'immunogénicité d'antigènes, dont l'agglutinine du pois d'asperge (**LTA** pour *Lotus tetragonobolus Agglutinin*) (350), la lectine fongique (**AAL** pour *Aleuria aurantia Lectin*) (351) ou encore la lectine de tomate (**LT**) (352).

Ces différentes lectines sont d'origine naturelle et sont totalement biocompatibles pour des applications muqueuses. Leur fixation aux récepteurs et glucides présents en surface des cellules M n'est cependant pas spécifique. En effet, elles peuvent aussi se lier en surface d'autres cellules muco-sales, ainsi qu'à d'autres glucides et notamment ceux présents sur les mucines.

Tout comme les lectines, les anticorps sont des protéines possédant de fortes affinités avec leur ligand, et leur greffage en surface de NPs est une approche courante pour améliorer la spécificité de vectorisation, quelles que soient les voies d'administration. Ainsi, les cellules M ont une forte affinité pour les **sIgA**, *via* l'expression du récepteur Dectin-1 appartenant à la famille des lectines de type C (353). Le greffage de ces anticorps en surface de vecteur pour cibler les cellules M a ainsi été étudié.

Dès la fin des années 90, le recouvrement covalent de liposomes par des sIgA, a permis un ciblage spécifique des plaques de Peyer, multipliant par 5 la quantité d'IgA spécifiques sécrétées après immunisation par voie rectale (354).

De même l'administration par voie nasale de particules issues d'un mélange de chitosan et de dextran, encapsulant la toxine de la coqueluche, et recouvertes d'IgA, permet leur accumulation au niveau du NALT (355)

De même que pour les sIgA, d'autres anticorps ont été greffés en surface de NPs pour cibler les biomolécules de surface des cellules M. Par exemple, l'anticorps **NKM 16-2-4** possède une forte affinité pour le motif  $\alpha$  (1,2)-fucose présent sur les glucides en surface des cellules M, et son greffage sur les toxines tétaniques et botuliques a montré une meilleure prise en charge par les plaques de Peyer, ainsi qu'une sécrétion d'IgG systémique et d'IgA intestinale plus importante que les toxines seules ou associées à de l'UEA-1 (356).

De même les anticorps **anti-GP2** peuvent se lier aux glycoprotéines 2 (GP2) exprimées spécifiquement en surface des cellules M, dont le rôle est de participer à la reconnaissance et à la translocation des antigènes (357). Le greffage de cet anticorps sur différents antigènes a ainsi amélioré leur prise en charge par les cellules M et l'induction d'une réponse humorale muqueuse protectrice (358).

Leur utilisation en recouvrement de surface de NPs est ainsi prometteuse pour améliorer l'immunogénicité de vaccins.

Il existe enfin des **motifs peptidiques** susceptibles de se lier à des récepteurs exprimés par les cellules M. Leur faible poids moléculaire et leur simplicité de synthèse permet un greffage en surface des particules pouvant être optimisé, favorisant un ciblage actif et spécifique. Ces peptides sont souvent issus de banques peptidiques et sélectionnés par des méthodes de criblage, en mesurant leur affinité pour un récepteur choisi. Ainsi,

le tripeptide Arginine-Glycine-Aspartate (**RGD**) possède une forte affinité pour le récepteur aux intégrines  $\beta 1$  présent au niveau des FAE et des cellules M (359). Son greffage en surface de nanoparticules de PLGA pegylées augmente leur prise en charge par les plaques de Peyer, et favorise la sécrétion d'IgG dans le sérum après administration orale (360). De même, **co1** est un peptide de 12 acides aminés (SFHQLPARSPLP) capable de se fixer spécifiquement sur le récepteur du complément 5a (C5aR) des cellules M (361). Son greffage sur une protéine de l'enveloppe du virus de la dengue a amélioré son accumulation au niveau des plaques de Peyer, ainsi que la réponse humorale muqueuse et systémique contre le virus (362). Enfin le motif peptidique « CKSTHPLSC » aussi appelé **CKS9**, découvert par *Yoo et al.*, a montré sa capacité à améliorer spécifiquement la translocation de vecteurs de chitosan par les cellules M (363). L'encapsulation d'antigène de *Brachyspira hyodysenteriae* dans des particules de PLGA recouvertes de CKS9 et de chitosan a ainsi permis d'augmenter la sécrétion d'IgA dans les fèces et d'IgG sériques, chez la souris, après administration par voie orale (364).

L'utilisation de peptides de surface est donc une stratégie prometteuse pour cibler spécifiquement les cellules M et améliorer la délivrance d'antigènes par des nanoparticules. Il est désormais nécessaire d'apporter de nouvelles preuves de concept avec différents modèles animaux pour valider ces approches, à cause de la variabilité inter-espèce existante dans l'expression des cellules M au niveau des muqueuses nasales et intestinales (365).

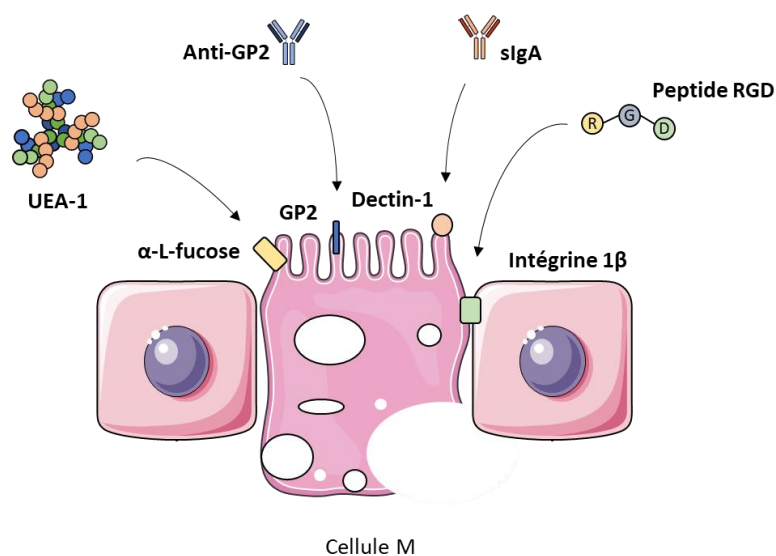


Figure 22: Représentation schématique des biomolécules permettant de cibler les cellules M pour le vaccin.

*Ciblage des cellules présentatrices d'antigène*

Les CPA sont les cellules principales dans l'initiation de la réponse innée et adaptative. La qualité de la captation des antigènes influe en effet sur celle de la réponse induite. Le ciblage de ces cellules peut améliorer l'immunogénicité des antigènes sous-unitaires. Les vecteurs conçus pour cibler ces CPA sont classiquement développés pour les voies injectables. De par leur présence sous les FAE, elles sont en effet plus difficilement atteignables par voie muqueuse. La stratégie de ciblage vise donc à améliorer la captation par les cellules dendritiques intra-épithéliales, ou la stimulation après translocation par les cellules M.

De par leur rôle dans l'immunité innée, les CPA peuvent reconnaître certains PAMP via l'expression des PRR qui comprend les TLR, les CLR, les NLR et RLR. Cette famille de récepteur peut être ciblée en concevant des vecteurs mimant la surface des antigènes pour activer les voies intracellulaires de l'inflammation et de la présentation antigénique.

On trouve ainsi dans la famille des CLR des récepteurs au **mannose** (ou CD206), dont le rôle est de reconnaître et se lier aux mannose, N-acétylglucosamine et fucose fréquemment retrouvé en surface des microorganismes (366). Le mannose est un sucre épimère du glucose, et la ramification de dizaines ou centaines de résidus par des liaisons osidiques  $\beta$ -1,4 produit le mannane. Ce polymère est fréquemment retrouvé dans la paroi des levures et constitue un des PAMP reconnus par les CPA. Ainsi le recouvrement de nanovecteurs par des motifs mannose a permis dans plusieurs études d'améliorer spécifiquement la délivrance d'antigènes dans les CPA, et d'en améliorer l'immunogénicité (367). Cette stratégie de ciblage a été utilisée dans le développement de particules de chitosan complexées avec du mannose pour délivrer des acides nucléiques par voie nasale, en vue de lutter contre les infections à *Mycobacterium tuberculosis* (368). L'addition de mannose a permis d'augmenter la prise en charge par les CPA, d'améliorer la réponse humorale et cellulaire au niveau des voies respiratoires et du sang des souris, et de protéger les souris vis-à-vis d'un challenge non léthal.



Les polymères de mannane contiennent souvent des résidus de glucose dans leur structure, et si la quantité de glucose est importante, on parle alors de glucomannane. Ce polymère est plus soluble dans l'eau que le mannane, et permet à l'image du mannose de cibler les CPA. La synthèse de nanoparticules de chitosan couplées à des chaînes de glucomannane a ainsi montré une captation significativement plus importante par les CPA, et une administration par voie orale avec de la toxine tétanique comme antigène témoin a montré une meilleure sécrétion d'IgA neutralisants dans la salive, les intestins et les fèces (369). De même, des liposomes de sels biliaires (ou bilosomes) incorporant du glucomannane et encapsulant de la BSA comme antigène ont été développés. Après administration par voie orale, la réponse humorale sérique et muqueuse a été sensiblement améliorée par la présence des glucides (370).

D'autres motifs glucidiques issus de micro-organismes peuvent être reconnus par les CPA par l'intermédiaire des récepteurs Dectin-1, et utilisés pour améliorer le ciblage de vaccin. Par exemple les  **$\beta$ -glucanes** sont des polymères de glucose ramifiés par des liaisons  $\beta$ -1,3 et  $\beta$ -1,6 retrouvés en surface des levures et champignons, et considérés comme sûrs pour la santé humaine par la FDA (371). Des études ont associé des  $\beta$ -glucanes, couplés par des liaisons covalentes à un peptide RGD ciblant les cellules M, avec des antigènes de virus de la grippe, pour former des nanoparticules administrés par voie orale (372). Les essais d'immunisation ont montré une sécrétion d'IgA intestinales et d'IgG sériques significativement plus importante vis-à-vis de l'antigène testé.

Enfin, le **DEC-205** (ou CD205) est un récepteur de surface des cellules dendritiques, dont le rôle est de reconnaître et endocyter les antigènes issus des corps apoptotiques et nécrotiques (373). Des stratégies ciblant ce récepteur ont été testées pour améliorer l'immunogénicité de vaccins muqueux. Ainsi, des particules de chitosan ont été développées avec des anticorps anti-CD205 greffés en surface (374). La protéine N du SARS-CoV a été associée à ces vecteurs, délivrée par voie nasale, et comparée à la voie intramusculaire. Les dosages d'anticorps ont montré une sécrétion plus importante d'IgA par voie nasale grâce à la présence des anticorps, avec une activation de la réponse cellulaire dans la rate.

Ainsi, les nanotechnologies permettent de designer des vecteurs capables de cibler spécifiquement les cellules du MALT de différentes manières. Ces stratégies sont prometteuses pour s'affranchir de l'utilisation d'adjuvants toxiques pour les muqueuses tout en améliorant l'immunogénicité d'antigènes sous-unitaires.

### 2.3.5. Particules immunomodulatrices

L'utilisation d'adjuvants demeure encore l'option la plus efficace pour développer des vaccins chez l'Homme et les animaux. En effet, à ce jour, en phase clinique, peu de vecteurs réussissent à améliorer l'immunogénicité d'antigènes sous-unitaires sans être associés à des adjuvants, par voie injectable et *a fortiori* par voie muqueuse (375). Les stratégies actuelles tendent à combiner l'action des deux systèmes. Il s'agit d'encapsuler les antigènes afin d'améliorer leur biodisponibilité auprès du MALT et leur délivrance, ainsi que de stimuler les CPA grâce aux adjuvants, permettant par ailleurs de réduire les doses administrées.

De manière intéressante, l'encapsulation d'adjuvants dans des NPs permet d'améliorer l'efficacité de leur stimulation vis-à-vis des CPA. Ainsi l'encapsulation des oligonucléotides CpG dans des liposomes PEGylés a montré une meilleure stimulation de BMDC de souris, avec une sécrétion significativement plus importante d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  et une expression plus importante des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 (376). On trouve ainsi de nombreuses études dans lesquelles les adjuvants sont intégrés dans des vecteurs, souvent lipidiques et polymériques, et améliorent l'effet des nanoparticules. Les adjuvants peuvent être des LPS (377), du MPL (378), de la flagelline (379) du CpG (380) ou encore du poly I:C (381).

Enfin, on peut trouver des nanoparticules synthétisées directement à partir de molécules immunostimulatrices. Par exemple, les **ISCOMs** (pour *Immune Stimulating COMplex*) sont des vecteurs lipidiques d'environ 40 nm, composés principalement de cholestérol et de saponines qui allient les propriétés des particules d'encapsuler et de délivrer les antigènes dans les cellules, et celles des adjuvants d'améliorer l'immunogénicité et la réponse induite (382). Ainsi, dès les années 90, des études ont montré que les ISCOMs étaient capables d'encapsuler des antigènes variés et d'immuniser par voie orale et nasale contre la grippe (383), le RSV, (384) ou le

rotavirus (385), en élicitant une forte réponse mucoale et systémique, à la fois humorale et cellulaire. Ce vecteur a été amélioré par la suite en ISCOMATRIX, pour faciliter l'encapsulation d'antigènes, et est retrouvé en études cliniques (386,387).

De même les composés AS01 et AS02, développés par GSK, sont des liposomes immunomodulateurs. Le premier est composé d'un mélange MPL/QS-21, et la forme nanoparticulaire permet à la fois d'encapsuler les antigènes, et de réduire la toxicité du QS-21. On le retrouve ainsi dans le premier vaccin humain enregistré permettant de lutter contre une parasitose (Mosquirix®, contre la malaria) (117). De même, le second est une émulsion huile-en-eau constituée des mêmes composés, et est utilisé chez l'homme pour lutter contre la grippe (388). Ils ne sont en revanche à ce jour pas étudiés pour des administrations muqueuses.

**PARTIE II: RESULTATS**

**Première étude:** Importance of the Phospholipid Core for Mucin Hydrogel Penetration and Mucosal Cell Uptake of Maltodextrin Nanoparticles

L'administration d'antigènes par les muqueuses peut être améliorée par la vectorisation à l'aide de nanoparticules. Le rôle de ces vecteurs est de franchir les différentes barrières limitant l'accès aux muqueuses, et de délivrer les antigènes dans les cellules sous-jacentes. Ces barrières sont la couche de mucus recouvrant les épithélia, ainsi que les enzymes et biomolécules de protection. Ainsi, dans le design d'un nanovecteur, il est important d'étudier sa capacité à franchir ces différentes barrières et à délivrer l'antigène non dégradé jusqu'aux cellules sous-jacentes.

Dans cette première étude, publiée dans le journal *ACS Applied Biomaterials*, nous avons étudié la capacité des particules de maltodextrine lipidées (NPL) à pénétrer le mucus pour délivrer un antigène dans les cellules épithéliales sous-jacentes. Le déplacement des NPL a été étudié dans un hydrogel de mucus reconstitué des voies aériennes, en comparaison avec des particules mucoadhérentes (ici des particules de PLGA recouvertes de chitosan) et des particules mucopénétrantes (des particules de PLGA recouvertes de PEG). Nous avons ainsi démontré l'importance du cœur de phospholipides anioniques sur la mucopénétration de la NP, grâce à des phénomènes de répulsions électrostatiques et stériques vis-à-vis des mucines composant l'hydrogel.

## Importance of the Phospholipid Core for Mucin Hydrogel Penetration and Mucosal Cell Uptake of Maltodextrin Nanoparticles

François Fasquelle, Rodolphe Carpentier,\* Bastien Demouveau, Jean-Luc Desseyn, and Didier Betbeder

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acsabm.0c00521>

Read Online

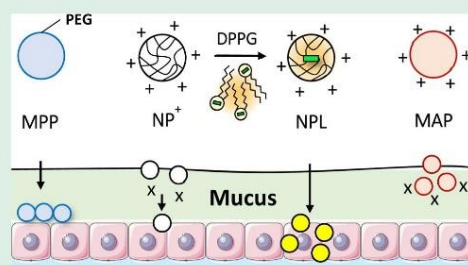
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

**ABSTRACT:** Nanoparticles (NPs) used as mucosal antigen delivery systems are a promising way to vaccinate. However, NPs have to cross the mucus gel and penetrate into mucosal cells to deliver antigens, and a mismatch exists between mucopenetrating NPs, rarely able to interact with cells, and NPs designed to deliver antigens into cells, but often described as mucoadhesives. Here, we compared the ability of cationic maltodextrin-based NPs, either without (NP<sup>+</sup>) or with an anionic phospholipid core (NPL), to interact with mucins and airway epithelial cells. We showed that their lipid core increased the NPL's mobility in mucin hydrogel by reducing interactions with mucins. Similarly, the uptake and protein delivery by NPLs into airway epithelial cells were not hindered by mucins. This highlights the importance of anionic lipids in the NPL, which are more efficient in crossing the mucin hydrogel while retaining the ability to interact with epithelial cells, an intermediate behavior between mucoadhesive and mucopenetrating NPs.

**KEYWORDS:** nanoparticles, lipids, mucus, mucins, antigen delivery



### 1. INTRODUCTION

Mucosal surfaces are principal entry points for numerous pathogens. Several studies have shown that airway and intestinal mucosa can be targeted to trigger vaccination against an antigen thanks to the presence of the mucosal-associated lymphoid tissue, and these observations led to the development of many vaccination strategies aiming to deliver antigens at the mucosa.<sup>1</sup> Among these strategies, the intracellular delivery of antigens by nanoparticles (NPs) is one of the most promising as it enhances their bioavailability and immunogenicity.<sup>2</sup> Hence, in order to efficiently deliver antigens, it is necessary to design particles able to cross mucosal barriers.<sup>3</sup>

Mucus is a viscoelastic hydrogel that covers almost all mammalian mucosal epithelium and prevents exogenous pathogens and particles penetrating to the underlying tissue. Although mucus composition differs according to the epithelium, it is mainly composed of water, secreted and transmembrane mucins, lipids, proteins, DNA, salts, and cell debris.<sup>4–6</sup> The mucus's rheological properties are mainly influenced by the composition of secreted, gel-forming mucins which are high-molecular-weight glycoproteins (10–40 MD) with different hydrophobic residues, disulfide bonds, sulfate contents, and glycosylation rates. The cross-linking and entanglement between mucin fibers leads to the formation of the mucus gel, with variable thickness, porosity, viscosity, and elasticity depending on the mucin composition.<sup>4,6</sup> Conse-

quently, in order to deliver encapsulated antigens into the mucosa, the interaction between NPs and the mucus must be mastered. It is now common to group NPs regarding to their behavior within the mucus: the mucoadherent particles (MAPs) and the mucopenetrating particles (MPPs).<sup>7</sup>

MAPs are particles that can adhere to mucus via chemical bonds (electrostatic or hydrophobic interactions, H bonds, or disulfide bridges with mucins) or physical interactions (entanglement with mucin fibers or hindrance due to the gel mesh size).<sup>8,9</sup> The advantage of an MAP approach for drug delivery is the possibility to extend the residence time of the drug close to the tissue of interest. This strategy is often used to increase the delivery of small, hydrophobic molecules. However, their residence time in airways is highly dependent on the natural mucociliary clearance. Moreover, MAPs are unable to cross the mucus barrier to reach the underlying epithelial cells, and therefore, they are not suitable for the intracellular delivery of proteins unless high doses are used. On the contrary, MPPs are vectors designed to cross the mucus gel in order to reach

Received: May 5, 2020

Accepted: August 3, 2020

Published: August 3, 2020

epithelial cells: this penetration is possible by decreasing both chemical and physical interactions with mucin fibers.<sup>7</sup> Thus, in most cases, MPPs are coated with hydrophilic and neutral polymers such as polyethylene glycol (PEG) or other poloxamers, resulting in neutral hydrophilic particles. It is now well-known that MPPs exhibit a deeper biodistribution in mucosa than MAPs and that their residence time is affected less by mucociliary clearance, meaning drugs can be delivered more efficiently.<sup>7</sup> Nevertheless, back-diffusion of MPPs has often been described because of a steep concentration gradient of particles inside the mucus layer. In addition, because of their neutral and hydrophilic surfaces, these particles cannot be efficiently endocytosed by the epithelial cells, which is a major issue for the delivery of peptide antigens.<sup>10</sup> Consequently, the design of NPs that are able to cross the mucus layer to be endocytosed by epithelial cells is an important challenge for the mucosal delivery of vaccines.

For example, it is possible to vary the percentage of PEG coating on NPs in order to find the right balance between mucopenetration and cell internalization.<sup>11</sup> On the other hand, new hydrophilic and neutral polymers have been developed to coat NPs such as poly(2-ethyl-2-oxazoline) (POZ), polydopamine (PDA), or *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer (pHPMA) and some of them show the same mucopenetration ability as PEG while permitting delivery to cells.<sup>12–14</sup> Finally, zwitterionic particles have been studied, as they show the same neutral electronic surface charge as mucopenetrating viruses because of a high density of both anionic and cationic charges, while having the ability to penetrate mucus layers and deliver proteins to epithelial cells.<sup>15</sup>

Maltodextrin-based NPs (NP<sup>+</sup>) are cationic and porous vectors designed for mucosal immunization, able to be highly endocytosed by mucosal cells and to encapsulate large amounts of antigens.<sup>16</sup> It is possible to add anionic phospholipids in NP<sup>+</sup> in order to obtain lipidated maltodextrin NPs (NPLs). Compared to NP<sup>+</sup>, these NPLs exhibit better cytoplasmic antigen delivery. Moreover, they are “stealthy” with respect to the complement system in a way that is similar to neutral particles.<sup>17</sup> We have already demonstrated that after nasal administration, the mucosal residence time of NPLs was longer than liposomes or poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based MAPs.<sup>18,19</sup> Therefore, in the present study, we more closely examined the role of NPLs interactions with airway mucins, compared to known MAPs and MPPs, to better understand their proven ability to reach the underlying epithelium. PEG-coated PLGA NPs (PLGA-PEG NPs) and chitosan (CS)-coated PLGA NPs (PLGA-CS NPs) were, respectively, used as model MPPs and MAPs.<sup>20,21</sup> As they possess the same size range as NPLs, the diffusion of each of these NPs in the mucin hydrogel was measured by multiple particle tracking (MPT). The impact of mucoadherence and mucopenetration was assessed on airway epithelial cells in the presence of mucins, and finally, the role of the cationic maltodextrin matrix and the anionic lipid core on the association with mucins were probed by dynamic light scattering (DLS), microscopy, and turbidimetry.

## 2. MATERIALS AND METHODS

**2.1. NP Syntheses and Labeling.** **2.1.1. Maltodextrin NPs.** Porous maltodextrin-based NPs (NP<sup>+</sup>) and particles with anionic phospholipids (NPLs) were prepared as previously described.<sup>17</sup> Maltodextrin (100 g, Roquette, France) was dissolved in 2 N sodium hydroxide with magnetic stirring at room temperature and then epichlorohydrin (4.72 mL, Merck, France) and glycidyltrimethylam-

monium chloride (GTMA, 31.08 g, Merck, France) were added, yielding a cationic polysaccharide hydrogel. The gel was then neutralized with acetic acid and crushed using a high-pressure homogenizer (LM20, Microfluidics, France). The particles obtained were then purified by tangential flow ultrafiltration (AKTA flux 6, GE Healthcare, France) using a 750 kDa membrane (GE Healthcare, France) to obtain purified NP<sup>+</sup> particles. These NP<sup>+</sup> particles were then mixed with 70% dipalmitoylphosphatidyl glycerol (DPPG, Lipoid, Germany) at 80 °C for 2 h and filtered through a 0.2 μm filter to produce NPLs.

**2.1.2. PLGA NPs.** Cationic PLGA-CS NPs were produced by nanoprecipitation.<sup>22</sup> RGS03H Resomer (Boehinger Ingelheim, Germany) was dissolved at 10 mg/mL in an acetone/ethanol mixture (85:15) for 5 min with magnetic stirring. This organic phase was then injected rapidly into 10 mL of ultrapure water supplemented with 10% (w/w) low-molecular-weight CS (50,000–190,000 Da, 75–85% deacetylated, Merck, France) with stirring. No surfactant was added at any step of the synthesis. Residual organic solvents were eliminated by vacuum evaporation at 240 rpm and at 27 °C for 5 min.

Neutral PLGA-PEG NPs were produced by nanoprecipitation using the PLGA-PEG copolymer [poly(lactide-co-glycolide)-*block*-poly(ethylene glycol) methyl ether, MW 55,000:5000, Sigma, France]. The copolymer was dissolved as indicated above and injected dropwise into ultrapure water, followed by vacuum evaporation of the organic solvents.

**2.1.3. NP Labeling.** NP<sup>+</sup> were labeled by mixing 0.5% w/w [fluorescein isothiocyanate (FITC), Sigma-Aldrich, France, 10 mg/mL in dimethyl sulfoxide] with NP<sup>+</sup> overnight at room temperature in a 0.2 M sodium bicarbonate buffer, pH 9.0.

NPLs were labeled with DiI (1-1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate, Thermo Fisher Scientific, France) by mixing 1% w/w dye (1 mg/mL in ethanol) with the particle suspension overnight. NPL-FITCs were produced by adding DPPG to FITC-labeled NP<sup>+</sup> as described above.

PLGA-CS and PLGA-PEG were labeled with DiI by mixing 1% w/w DiI (1 mg/mL in ethanol) with the polymer in the organic phase before the nanoprecipitation.

Each labeled particle was purified by dialysis using a 10 kDa dialysis cassette (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes 10 MWCO, Thermo Fisher, France) to remove the unbound dye.

**2.2. NP Characterization.** **2.2.1. Dynamic Light Scattering.** The particles' average hydrodynamic diameters were measured at 25 °C by DLS using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, France). Measurements were performed at 1 mg/mL in 23 mM NaCl for maltodextrin-based particles (due to their porosity) and in pure water for the other NPs. The results are expressed as the mean ± standard deviation (sd) of at least six independent syntheses.

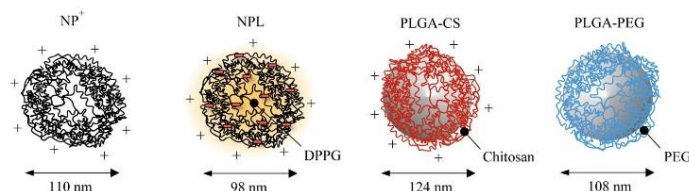
**2.2.2. ζ Potential.** ζ potentials were measured by electrophoretic light scattering (ELS) in ultrapure water and at 25 °C using a Zetasizer Nano ZS. The results are expressed as the mean ± sd of at least six independent syntheses.

**2.3. Mucin and Mucus.** **2.3.1. Preparation of Mucin Samples.** Mucin solution (0.5% w/v) was prepared by dissolving 50 mg of lyophilized mucin from bovine submaxillary glands (Merck, France) in 10 mL of Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) with calcium and magnesium (Thermo Fisher, France). The solution was then vortexed at 25 °C until complete solubilization.

Fluorescent mucin solution was prepared by mixing mucin solution with Bodipy FLC5 NHS (1% w/w, Thermo Fisher, France) in a carbonate/bicarbonate buffer (pH = 8.3) for 1 h. Labeled mucins were purified from the unbound dye by gel filtration on a PD-10 Sephadex desalting column (GE Healthcare, France), and protein fractions were collected and pooled to obtain final mucin-Bodipy.

The final concentration was measured using microBCA assay according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific Pierce Micro BCA, Thermo Fisher, France).

**2.3.2. Mucin Hydrogel.** To prepare the airway mucin hydrogel, mucins were dissolved at 2.5% (w/v) in DPBS buffer at 25 °C.<sup>23</sup> The solution was stirred for 1 h and used thereafter.



**Figure 1.** Representation of the four NPs used in the study. NP<sup>+</sup> = cationic porous maltodextrin-based NPs. NPL = cationic porous maltodextrin-based NPs with a lipid core (DPPG). PLGA-CS = CS-coated poly-lactic-co-glycolic acid NPs. PLGA-PEG = PEG-coated poly-lactic-co-glycolic acid NPs. The mean hydrodynamic diameter obtained by DLS is indicated.

**2.4. MPT in a Reconstituted Mucin Hydrogel.** A sample of fluorescently labeled NPs (2  $\mu$ L) diluted to 1 mg/mL was incubated in 20  $\mu$ L of a fresh mucin hydrogel (2.5% w/v) in custom-made wells. After a 5 min equilibration time, videos of each particle type were recorded for 20 s and at 20 frames per second by high-resolution video microscopy (Zeiss Observer Z1 Spinning Disk, magnification  $\times 100$ , Zeiss France). The mean square displacement of each particle was calculated on ImageJ as  $\langle r^2(\tau) \rangle = [x(t+\tau) - x(t)]^2 + [y(t+\tau) - y(t)]^2$  on at least 100 particles from three independent experiments, and the diffusion coefficient in the gel  $D_m$  at 1 s was then determined.<sup>24</sup>

The theoretical diffusion coefficient in water  $D_w$  was calculated for each particle with the Stokes–Einstein formula  $D_w = \frac{k_B T}{3\pi\eta d}$  with  $k_B = 1.38 \times 10^{-23}$ ,  $T = 298.15$  K,  $\eta = 1 \times 10^{-3}$  Pa·s, and  $d$  corresponding to the mean particle diameter determined by DLS.

**2.5. Uptake of Particles by Airway Epithelial Cells.** NCI-H292 epithelial cells (H292, ATCC CRL-1848) were maintained in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640, Thermo Fisher Scientific, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 1% (v/v) l-glutamine (Thermo Fisher Scientific, France) at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

To measure the influence of mucins on the uptake of NPs, cells were seeded in 24-well plates at a density of  $5 \times 10^4$  cells per well until confluence. They were then treated for 30 min with 5  $\mu$ g of FITC or DiI-labeled NPs, previously incubated with mucins (mass ratio 1:1), in 500  $\mu$ L of fresh medium.

Cells were harvested with trypsin (0.25% EDTA, Thermo Fisher Scientific, France), collected by centrifugation, and diluted in PBS (without calcium or magnesium) before cytometry analysis on a CyAn ADP Analyzer (Beckman Coulter). Isolated cells were selected by their size and cellular complexity with a gating on SSC-A/FSC-A and then SSC-A/SSC-H. Trypan blue (1.2 mg/mL, Merck, France) was used to quench the FITC extracellular fluorescence adsorbed on the cell surface. Analyses were performed on 7500 individual cells and the results are expressed as the mean  $\pm$  sd of at least three independent experiments.

**2.6. Protein Delivery and Processing.** To measure the influence of mucins on protein delivery by NPs, 1.5  $\mu$ g of BSA-DQ (DQ Green BSA, Thermo Fisher Scientific, France) was associated to 5  $\mu$ g of NPs (postloading association by mixing at 25 °C for 3 h<sup>25</sup>). The formulations were incubated with mucin (mass ratio 1:1) for 15 min and dropped in 500  $\mu$ L of fresh medium, for 30 min.

Cells were harvested with trypsin, collected by centrifugation, and diluted in PBS without calcium and magnesium before cytometry analysis on a CyAn ADP Analyzer (Beckman Coulter). Isolated cells were selected by their size and cellular complexity with a gating on SSC-A/FSC-A and then SSC-A/SSC-H. Analyses were performed on 7500 cells and the results are expressed as the mean  $\pm$  sd of at least three independent experiments.

**2.7. Investigation of the Interaction between the NPs and Mucins.** **2.7.1. Size Analysis of the NP–Mucin Complexes.** Interactions between NPs and mucins can be assessed by DLS.<sup>26</sup>

Each NP type was diluted to 1 mg/mL and mixed with a solution of mucin diluted to 1 mg/mL (1:1 mass ratio) in DPBS (pH = 7.4) for 15 min at 25 °C, and the size of the complexes was measured by DLS. An

increase in the size range of the NPs and of the mucins indicated an association with the mucins.

**2.7.2. Fluorescence Microscopy.** Microscopic observations are a qualitative method to analyze the interactions between NPs and mucins. NPs (1 mg/mL) were mixed with mucin-Bodipy (1:1 mass ratio) in phosphate buffer (pH 7.4) for 15 min, and the complexes were observed thereafter by epifluorescence microscopy (Eclipse Ti, magnification  $\times 20$ , Nikon Instruments Inc.). Representative pictures were taken. The larger the mucin complexes, the more the NPs interact with them.

**2.7.3. Sedimentation Studies.** Maltodextrin-based particles with 10, 30, and 50% of DPPG, respectively, named NPL<sub>10</sub>, NPL<sub>30</sub>, and NPL<sub>50</sub> were synthesized as described for NPLs (Section 2.1.1) and mixed with a mucin solution (0.5% w/v, 1:1 NP–mucin mass ratio) at 25 °C. After 30 min, pictures of the precipitated complexes were taken, and the optical density of the supernatant was measured at 500 nm to detect aggregated mucins.<sup>27</sup>

**2.8. Statistical Analysis.** The results are represented as the mean  $\pm$  standard deviation of at least three independent experiments and analysis of the variance was carried out using the ANOVA test.

### 3. RESULTS

**3.1. NP Syntheses and Characterization.** The development of mucosal vaccine nanocarriers is a promising field of study because of the need of new treatments for infectious diseases. Apart from the ability to associate antigens and to deliver them efficiently into mucosal cells, these carriers must first be able to cross mucosal barriers such as mucus.<sup>5</sup>

In order to describe the NPL–mucus interactions, maltodextrin-based NPs and PLGA-based NPs (used as a control) were synthesized. A schematic representation of the NPs used is depicted in Figure 1. Their size was measured by DLS and their surface charge was measured by electrophoretic mobility.

NP<sup>+</sup> are porous, cationic, and spherical particles made from reticulated maltodextrin. Their mean hydrodynamic diameter was  $110 \pm 16$  nm with a  $\zeta$  potential of  $+28 \pm 4$  mV (Table 1). The anionic phospholipid (DPPG) was added within the NP<sup>+</sup> in order to produce NPL particles. These NPLs had a mean diameter of  $98 \pm 14$  nm and remained cationic with a surface charge of  $+24 \pm 3$  mV, indicating that the phospholipids were

**Table 1. Physicochemical Characteristics of Each NP<sup>a</sup>**

	hydrodynamic diameter (nm)	PDI	$\zeta$ -potential (mV)
NP <sup>+</sup>	110 $\pm$ 16	0.263	+28 $\pm$ 4
NPL	98 $\pm$ 16	0.120	+24 $\pm$ 3
PLGA-CS	124 $\pm$ 17	0.106	+37 $\pm$ 5
PLGA-PEG	108 $\pm$ 18	0.129	−6 $\pm$ 3

<sup>a</sup>Hydrodynamic diameter was measured by DLS and the  $\zeta$  potential was measured by ELS in water just after syntheses. The results in the table represent the mean  $\pm$  sd of at least six independent syntheses.

C

https://dx.doi.org/10.1021/acsabm.0c00521  
ACS Appl. Bio Mater. XXXX, XXX, XXX–XXX

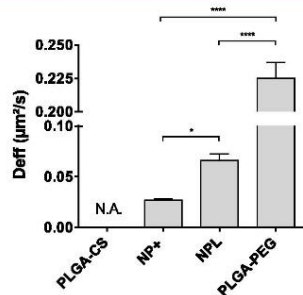


associated inside the particles, as has been previously described.<sup>17</sup>

PLGA NPs are dense and spherical particles made from a copolymer of glycolic and lactic acids and have an easily functionalized surface.<sup>28</sup> Here, we synthesized PLGA particles by nanoprecipitation and coated their surface by adding CS in order to produce cationic PLGA particles (PLGA-CS) for use as an MAP model. These particles had a mean diameter of  $124 \pm 17$  nm and were cationic with a positive  $\zeta$  potential of  $+37 \pm 5$  mV. Moreover, we synthesized neutral PLGA particles as an MPP model, using a PEGylated PLGA copolymer (PLGA-PEG). They had a size of  $108 \pm 18$  nm and their surface charge was neutral ( $-6 \pm 3$  mV), confirming the overlaying of the PEG on the surface of the particles.

All the particles were monodispersed (PDI < 0.3) with similar size ranges, between 100 and 125 nm. They were stable for at least 7 days in water at 4 °C (data not shown).

**3.2. Behavior in the Mucin Hydrogel.** The ability of each particle to penetrate mucus was observed by measuring the diffusion of fluorescently labeled NPs in the mucin hydrogel (2.5% w/v) by MPT.<sup>24</sup> The particles were incubated in the gel for 5 min and videos of their diffusion were recorded to calculate the mean square displacement over time. Finally, the diffusion coefficient at 1 s was calculated and compared to their theoretical diffusion in water. Used as an MAP model, PLGA-CS were aggregated in the gel and therefore no diffusion could be observed, which is consistent with their known mucoadherent characteristics (Figure 2). In contrast, PLGA-PEG particles,



**Figure 2.** Diffusion coefficient ( $D_{eff}$ ) in the mucin hydrogel (2.5% w/v) for each particle at  $t = 1$  s. NPs ( $2 \mu\text{L}$ ,  $1 \text{ mg/mL}$ ) were incubated in  $20 \mu\text{L}$  of the fresh hydrogel and videos were recorded for 20 s by high-resolution video microscopy. Results represent the means  $\pm$  SEM of three independent experiments, with  $n > 100$  particles for each experiment. Statistical analysis was carried out with a one-way ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ). \* $p < 0.05$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

a model of MPP, had a high mean square displacement at 1 s of  $0.225 \pm 0.0117 \mu\text{m}^2$ . Their  $D_m/D_w$  mean ratio was 0.0566, indicating that their diffusion was about 18 times slower than in water, but which remains consistent with their reported mucopenetration ability. For maltodextrin-based particles, the mean square displacements at 1 s were  $0.027 \pm 0.0012 \mu\text{m}^2$  for NP+ and  $0.066 \pm 0.0064 \mu\text{m}^2$  for NPLs. Their  $D_m/D_w$  mean ratios were, respectively, 0.0069 and 0.0151, indicating that the diffusion was about 144 lower for NP+ and about 66 times lower for NPLs than in water.

These results indicated that despite their cationic surface, NP+ and NPL were able to diffuse slowly in the gel. Moreover, NPL

diffusion in the mucin hydrogel was higher than NP+, suggesting that the presence of the anionic phospholipids improved their mucopenetration.

**3.3. Impact on Cell Delivery.** The impact of mucoadherence and mucopenetration on cell delivery was probed by comparing the uptake of NP+, NPL, and PLGA-CS in airway epithelial cells (H292) in the presence of mucins (Figure 3). Fluorescently labeled particles ( $5 \mu\text{g}$ ) were incubated with a mucin solution (1:1 mass ratio) and the mixture was added to cells for 30 min. The intracellular fluorescence of NPs was measured by flow cytometry. We did not observe any uptake of PLGA-PEG because of the neutral surface charge (data not shown), as has been discussed previously by many authors.<sup>29</sup> We observed that in the presence or absence of mucins, the same amount of NPLs was endocytosed by the cells, while the uptake of NP+ was significantly reduced by 23% and by 94% for PLGA-CS NPs (Figure 4A). The use of trypan blue to quench surface excitation of FITC-labeled NP+ and NPL did not decrease the fluorescence (data not shown), confirming the NP+ intracellular localization. Moreover, the protein delivery and processing by each particle in the presence of mucins were determined: BSA-DQ was associated to each NP type, and the formulations were then incubated with mucins. The mix was finally deposited on H292 cells and the intracellular BSA degradation measured by flow cytometry. For NPLs, the presence of mucins did not decrease the cell delivery and degradation of BSA, while for NP+, the delivery was significantly reduced by 45% and by 88% for PLGA-CS NPs (Figure 4B).

Altogether, these results suggested that NPLs were not hindered by mucins thanks to their lipid core and were endocytosed by epithelial cells in contrast to NP+ and PLGA-CS NPs, confirming their mucopenetration ability.

**3.4. Interaction between NPs and Airway Mucins.** Complementary in vitro techniques were used to precisely decipher the role of NP-encapsulated lipids in the interactions between maltodextrin NPs and mucins.

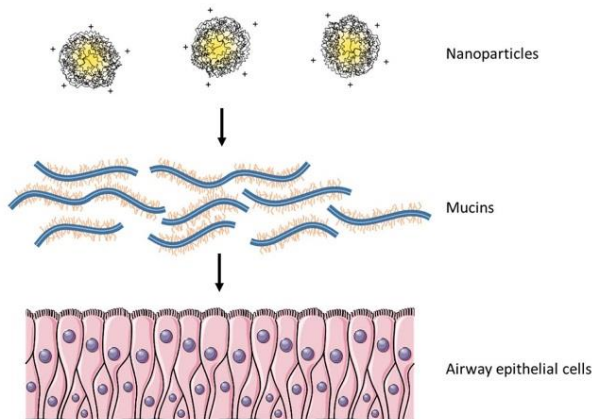
DLS is a physical method used to probe the interactions occurring between mucins and NPs.<sup>26</sup> Here, each particle was incubated with purified mucins (1:1 mass ratio) and the size of the complexes was measured (Table 2). The hydrodynamic diameters of the maltodextrin-based particles NP+ and NPLs increased sharply in the presence of mucins (more than 50,000 nm for NP+ and around 4500 nm for NPLs), which suggested an association to mucins for both types of particles. However, the presence of the lipid core markedly reduced the size of the NP–mucin complexes, suggesting fewer and/or weaker interactions between NPLs and the mucins.

These results were further confirmed by epifluorescence microscopy. NP+ and NPLs were incubated with fluorescently labeled mucins (1:1 mass ratio) and their aggregation was directly observed and compared to free mucins (Figure 5). Although free mucins did not form large complexes, the interaction with NP+ produced complexes in a range between 20 and 50  $\mu\text{m}$  and for NPLs, between 2 and 10  $\mu\text{m}$ . These results are consistent with those obtained by DLS.

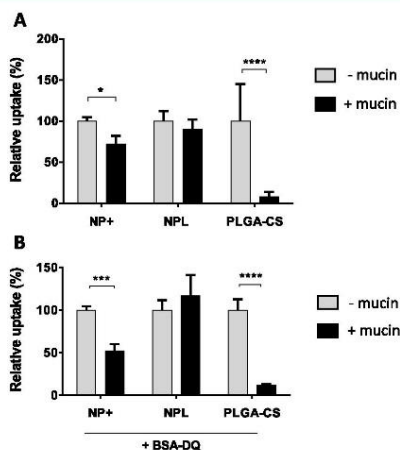
To confirm that the difference of mucin association between NP+ and NPLs was due to the presence of lipids inside the NP+, NPs with increasing amounts of lipids were synthesized, from 0 to 70% of lipids per particle (mass %). After synthesis, the size and the surface charge of each particle were comparable with a size around 100 nm and a  $\zeta$  potential close to +25 mV (Figure 6). These particles were mixed with a mucin solution as described above (0.5% w/v, mass ratio 1:1) and the mucin

D

https://dx.doi.org/10.1021/acsabm.0c00521  
ACS Appl. Bio Mater. XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 3.** Schematic representation of the experiment designed to probe the NP uptake in the presence of mucins. NPs were associated with mucins and the complexes were incubated for 30 min with airway epithelial cells (H292) to mimic the airway residence time.



**Figure 4.** (A) Uptake of each NP type by airway epithelial cells in the absence and presence of mucins. Fluorescently labeled NPs were associated with mucins (mass ratio 1:1) and the complexes were incubated with airway epithelial cells (H292). (B) Intracellular delivery of BSA-DQ by each particle in airway epithelial cells in the absence and presence of mucins. Dye-quenched BSA (BSA-DQ) was associated to each particle, and the NP formulations were mixed with mucins (mass ratio 1:1). The complexes were then incubated with airway epithelial cells (H292). Uptake measurements were carried out by flow cytometry. Results represented the mean  $\pm$  sd of at least three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

aggregation was evaluated after 30 min by observing the presence of sedimentation at the bottom of the glass tube. Less sedimentation was observed with increasing amounts of lipids. On the contrary, association of mucins and NP<sup>+</sup> or NPL<sub>10</sub> led to a complete sedimentation, meaning strong interactions between the mucins and the particles (Figure 7A). Moreover, to confirm the sedimentation, the presence of compacted mucins was

**Table 2. Size of the Complexes Formed between Maltodextrin-Based NPs and Mucins (1:1 Mass Ratio)<sup>a</sup>**

	size (nm)
mucins	420 $\pm$ 69
NP <sup>+</sup> mucins (1:1)	>50,000
NPL mucins (1:1)	4566 $\pm$ 1108

<sup>a</sup>Each particle type was incubated with mucins for 15 min and the size measurements were recorded by DLS. Results represent the mean  $\pm$  sd of three independent experiments.

determined by measuring the optical density at 500 nm (O.D.) in the supernatant.<sup>27</sup> The significant sedimentation observed for NP<sup>+</sup> or NPL<sub>10</sub> was associated with a low O.D. in the supernatant of 0.057 because all the NP–mucin complexes had sedimented, confirming that large complexes were formed. Then, a progressive increase in the O.D. was measured in the supernatant (0.231, 0.451, and 0.702, respectively, for NPL<sub>30</sub>, NPL<sub>50</sub>, and NPLs), meaning that the more the NPL contained lipids, the more the NP–mucin complexes remained in suspension (Figure 7B).

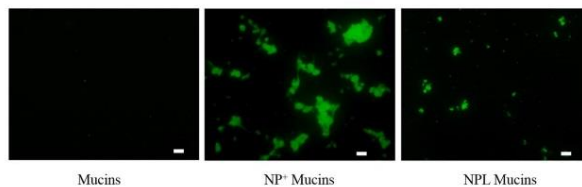
#### 4. DISCUSSION

The development of mucosal vaccine nanocarriers is an encouraging field of study because of the need of new treatments for infectious diseases. Apart from the ability to associate antigens and to deliver them efficiently into mucosal cells, these carriers must first be able to cross mucosal barriers such as the mucus.<sup>5</sup>

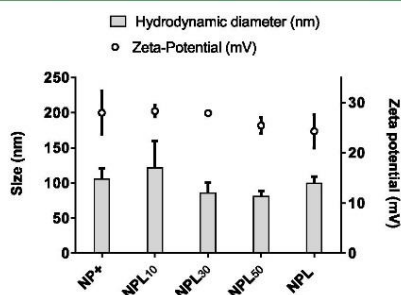
MAPs are carriers made with compounds that, as their name suggests, can adhere to mucus via chemical bonds (e.g., electrostatic interactions, H bonds, or van der Waals interactions) or physical interactions (steric hindrance). They are widely developed as mucosal antigen delivery systems thanks to their ability to increase the antigen retention time in mucosa compared to classic NPs.<sup>9,28,30–35</sup> However, their mucosal residence time is often limited by mucus clearance, including mucociliary mechanisms, and these particles can also adhere to other tissue and matter which further reduce their bioavailability.

E

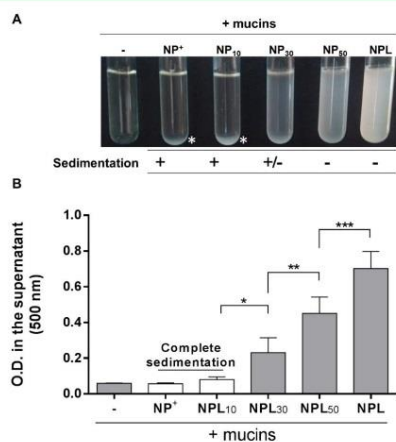
<https://dx.doi.org/10.1021/acsabm.0c00521>  
ACS Appl. Bio Mater. XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 5.** Images of the maltodextrin-based NPs and mucin complexes (1:1 mass ratio). Mucins were labeled in green. Representative images were taken by epifluorescence microscopy. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 6.** Physicochemical characteristics of the maltodextrin-based NPs with increasing amounts of lipids (0% = NP<sup>+</sup>, 10% = NPL<sub>10</sub>, 30% = NPL<sub>30</sub>, 50% = NPL<sub>50</sub>, and 70% = NPL, mass ratio). Bars represent the hydrodynamic diameters obtained by DLS and plots are the  $\zeta$  potentials obtained by ELS of the means  $\pm$  sd of three independent syntheses.



**Figure 7.** (A) Representative pictures of the sedimentation study. Maltodextrin-based particles with increasing amounts of lipids in their cores were incubated with mucins (0.5% w/v, 1:1 mass ratio). Asterisks show complete sedimentation. (B) Measurements of the optical density of the supernatants obtained in the sedimentation studies. The supernatants were collected and the absorbance at 500 nm was measured to detect NP–mucin complexes in solution (mean  $\pm$  sd of three independent experiments). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ .

MPPs have been developed as carriers able to cross the mucus and greatly enhance the residence time by limiting their physicochemical interaction with mucin fibers, thereafter delivering antigens close to the underlying immune cells. These particles are often coated with hydrophilic and neutral polymers such as PEG and other poloxamers to avoid electrostatic and hydrophobic bindings with mucins.<sup>7</sup> Nevertheless, PEG-coated NPs still encounter some limitations such as restricted interactions with cell membranes because of their neutral charge, back-diffusion inside the mucus layer, or hypersensitivity directed against poloxamers and their derivatives.<sup>10,36</sup>

Other hydrophilic and neutral polymers have been tested to coat NPs such as POZ, PDA, or pHPMA and can increase mucopenetration following the same mechanism as poloxamers, while keeping interaction with mucosal cells.<sup>12–14</sup>

Some viruses are known to be mucopenetrating because of their high density of both anionic and cationic charges. Hence, their apparent neutral surface charge allows them to minimize electrostatic interaction with mucins while still being able to bind to cell membranes.<sup>37</sup> These observations led to the development of zwitterionic NPs with just this dual to penetrate the mucus layer and interact with the underlying cells.<sup>15</sup>

In this study, we wanted to more-closely examine the role of lipid loading of maltodextrin-based NPs in determining their behavior in a mucin hydrogel. NP<sup>+</sup> is a maltodextrin-based cationic NP able to incorporate large amounts of antigens and to be rapidly endocytosed by mucosal cells and in which it is also possible to add an anionic phospholipid core to obtain NPLs. We have already shown that the presence of an anionic phospholipid core in NPLs allowed them to behave as “stealth” carriers, suggesting that despite their cationic surface charge, the anionic lipids allowed them to behave like neutral NPs with respect to the complement system.<sup>17</sup> Therefore, in this study, we examined the role of the lipid core on NPL’s interaction with mucins and assess its potential impact on protein delivery.

We compared NP<sup>+</sup> and NPL with MAPs and MPPs, respectively, CS-coated PLGA (PLGA-CS) and PEG-coated PLGA (PLGA-PEG). PLGA-CS exhibited a highly cationic surface charge in water (+37 mV) indicating a good covering of the CS.<sup>18</sup> On the other hand, PLGA-PEG exhibited a neutral charge in water (–5 mV) confirming the PEG coating. Finally, NP<sup>+</sup>, NPL, PLGA-CS, and PLGA-PEG NPs were all of a similar size which permitted us to exclude a size effect in assessing their interaction with the mucus.

MPT is a precise tool to probe the diffusion of particles in biological fluids.<sup>24</sup> Here, we measured the diffusion of fluorescently labeled NPs in a mucin hydrogel over time. It is noteworthy that contrary to fresh mucus, reconstituted mucus lacks physiological properties such as the ability of gel-forming mucins to cross-link with each other and thus cannot exactly

F

<https://dx.doi.org/10.1021/acsabm.0c00521>  
ACS Appl. Bio Mater. XXXX, XXX, XXX–XXX

reproduce the true, in vivo behavior of NPs.<sup>38</sup> However, this strategy has been extensively used as a first step in order to probe the role of NPs' structure and composition on their diffusion in mucus.<sup>12,39,40</sup> Contrary to PLGA-CS, NP<sup>+</sup> and NPL were allowed to diffuse in the hydrogel (respectively, 8 and 3.7 times slower than PLGA-PEG) despite their cationic surface charge, which has been little documented in the literature.<sup>13,41</sup> This difference with PLGA-CS could be attributed to the lower  $\zeta$ -potential or to the hydrophilic features of the maltodextrin polymer, resulting in weaker interactions with mucins.<sup>3</sup> Moreover, NPL diffusion was 2.4 times higher than NP<sup>+</sup> indicating an impact of the lipid core on mucin interactions.

Because our aim is to develop nanovectors for airway vaccination, we measured the ability of each particle to be endocytosed by airway epithelial cells and to deliver antigens in the presence of mucins. Concerning PLGA-CS NPs, the endocytosis was strongly hindered in the presence of mucins (by 94%, Figure 7) confirming their mucoadherent features. For NP<sup>+</sup>, the endocytosis was lower in the presence of mucin by only 23%, while no difference was observed for NPLs. Consistently, protein delivery was significantly reduced in the presence of mucin for PLGA-CS (88% lower) and for NP<sup>+</sup> (45% lower) while no difference was observed for NPLs. Again, this is in accordance with the MPPT, showing that PLGA-CS movement was completely inhibited in the presence of mucins, while NP<sup>+</sup> and NPLs diffused enough to be taken up by cells. This apparently confirmed the role of the lipid core on the mucopenetration ability of NPLs.

To understand the role of the anionic phospholipids on NPs' interaction with mucus, we incubated NP<sup>+</sup> and NPLs with mucins (1:1 mass ratio) and looked at the size of the resultant complexes by DLS.<sup>26</sup> Mucins had a size of about 420 nm, which is consistent with the data from the literature.<sup>12,26,42,43</sup> The mucin–NP<sup>+</sup> complexes were more than 10 times bigger than the mucin–NPL complexes (50 and 4.5  $\mu\text{m}$ , respectively), indicating that the presence of the anionic lipids in the NPLs' core decreased their association with mucins. These results were confirmed by epifluorescence microscopy, where NP<sup>+</sup> incubated with labeled mucins formed larger complexes than NPLs. The fact that both NP<sup>+</sup> and NPLs were still able to be endocytosed by epithelial cells while making large complexes suggest that the NPs did not aggregate and remained free to move from mucins to be taken up individually by the cells, in contrast to MAPs.

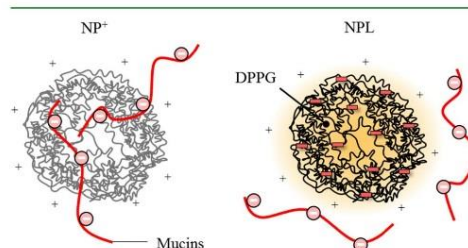
To support the fact that the lipids influenced the mucopenetrating properties of maltodextrin-based NPs, we synthesized NPLs with increasing amounts of lipids, from 0% (NP<sup>+</sup>) to 70% (NPL) (mass %). Because larger complexes sediment rapidly, we assessed NPs' association with mucins by observing the sedimentation after 30 min and measured the presence of the NP–mucin complexes in the supernatant by turbidimetry.<sup>27</sup> We observed that the greater the lipid concentrations in the NPs, the less the NP–mucin complexes sedimented, confirming that their lipidation decreased NPs' association to mucins in a dose-dependent manner.

The fact that phospholipids decreased mucins' association with the NPLs is surprising as mucins may bind to lipophilic compounds via hydrophobic interactions.<sup>3</sup> Therefore, we suggest that two processes occur in concert:

- (i) DPPG anionic phosphate groups cause electrostatic repulsions with the anionic mucins. After the addition of the DPPG to the NP<sup>+</sup> to create NPLs, the  $\zeta$  potential remains unchanged indicating that the lipids do not cover

the particles but instead are associated inside the NPs' structure.<sup>17</sup> However, for soft NPs with thick charged layers, the presence of anionic charges close to the particle surface may not modify the Stern layer and therefore do not lower the apparent  $\zeta$  potential.<sup>44</sup> Hence, for the NPLs studied here, the anionic phospholipids are close to the surface despite a cationic  $\zeta$  potential and therefore they may still repel biological compounds such as mucins.

- (ii) The association of mucins to NP<sup>+</sup>, in addition to electrostatic binding, may be due to the porosity of the particle allowing penetration of the mucin fibers into the maltodextrin matrix (also known as the diffusion theory<sup>45</sup>). The presence of DPPG inside the NPL would then lead to a steric hindrance, thus decreasing



**Figure 8.** Schematic representation of the interaction between the mucins and the NPLs. The cationic charges contributed by GTMA are distributed throughout the maltodextrin scaffold including the surface. The anionic charges contributed by DPPG remain inside the maltodextrin but are close to the surface. The resulting  $\zeta$  potential is cationic but the DPPG can interact with its environment. Thus, DPPG may decrease the association with mucins by both electrostatic repulsion and steric hindrance.

the penetration of mucins into the maltodextrin matrix and increasing mucopenetration (Figure 8).

## 5. CONCLUSIONS

Current strategies aimed at enabling NPs to cross the mucus, while retaining their ability to be endocytosed by underlying cells, rely on coating polymers to “hide” the particle's surface. Here, we have demonstrated a novel approach involving porous, cationic NPs filled with anionic phospholipids (NPLs). The surface of these maltodextrin-based NPs is preserved because it is the lipid core that reduced NPLs' interactions with mucins. These results further highlight the potential for NPLs to be an efficient vector for mucosal vaccine delivery.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Rodolphe Carpentier – University of Lille, Inserm, CHU Lille, U1286—INFINITE—Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France; [orcid.org/0000-0003-3398-757X](https://orcid.org/0000-0003-3398-757X); Email: [rodolphe.carpentier@univ-lille.fr](mailto:rodolphe.carpentier@univ-lille.fr)

### Authors

François Fasquelle – University of Lille, Inserm, CHU Lille, U1286—INFINITE—Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France; Vaxinano, S9000 Lille, France

**Bastien Demouveau** – University of Lille, Inserm, CHU Lille, U1286—INFINITE—Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

**Jean-Luc Desseyn** – University of Lille, Inserm, CHU Lille, U1286—INFINITE—Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France; [orcid.org/0000-0001-6876-8049](https://orcid.org/0000-0001-6876-8049)

**Didier Betbeder** – University of Lille, Inserm, CHU Lille, U1286—INFINITE—Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France; Vaxinano, S9000 Lille, France

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acsabm.0c00521>

#### Notes

The authors declare no competing financial interest.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Pr. Julie Kerr-Conte and Amanda Elledge for critically reading the manuscript and Clément Herkt and the Flow core and imaging facilities of BICeL campus Hospitalo-Universitaire for their technical assistance. We are grateful to Dr. Mike Howsam for English proofreading. This work did not receive specific funding and was performed with the support of the University of Lille, the INSERM, and the CHU Lille.

#### REFERENCES

- (1) Kraehenbuhl, J.-P.; Neutra, M. Mucosal Vaccines: Where Do We Stand? *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 2609–2628.
- (2) Zaman, M.; Good, M. F.; Toth, I. Nanovaccines and Their Mode of Action. *Methods* **2013**, *60*, 226–231.
- (3) Lai, S. K.; Wang, Y.-Y.; Hanes, J. Mucus-Penetrating Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Mucosal Tissues. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 158–171.
- (4) Lai, S. K.; Wang, Y.-Y.; Wirtz, D.; Hanes, J. Micro- and Macrorheology of Mucus. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 86–100.
- (5) Pearson, J. P.; Chater, P. L.; Wilcox, M. D. The Properties of the Mucus Barrier, a Unique Gel – How Can Nanoparticles Cross It? *Ther. Deliv.* **2016**, *7*, 229–244.
- (6) Demouveau, B.; Gouyer, V.; Gottrand, F.; Narita, T.; Desseyn, J.-L. Gel-Forming Mucin Interactome Drives Mucus Viscoelasticity. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2018**, *252*, 69–82.
- (7) Netsomboon, K.; Bernkop-Schnürch, A. Mucoadhesive vs. Mucopenetrating Particulate Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *98*, 76–89.
- (8) Garg, N. K.; Mangal, S.; Khambete, H.; Sharma, P. K.; Tyagi, R. K. Mucosal Delivery of Vaccines: Role of Mucoadhesive/Biodegradable Polymers. *Recent Pat. Drug Delivery Formulation* **2010**, *4*, 114–128.
- (9) Schattling, P.; Taipaleenmäki, E.; Zhang, Y.; Städler, B. A Polymer Chemistry Point of View on Mucoadhesion and Mucopenetration. *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 1700060.
- (10) Hatakeyama, H.; Akita, H.; Harashima, H. The Polyethylene-glycol Dilemma: Advantage and Disadvantage of PEGylation of Liposomes for Systemic Genes and Nucleic Acids Delivery to Tumors. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 892–899.
- (11) Lechanteur, A.; Furst, T.; Evrard, B.; Delvenne, P.; Piel, G.; Hubert, P. Promoting Vaginal Distribution of E7 and MCL-1 siRNA-Silencing Nanoparticles for Cervical Cancer Treatment. *Mol. Pharmaceutics* **2017**, *14*, 1706–1717.
- (12) Poinard, B.; Kamaluddin, S.; Tan, A. Q. Q.; Neoh, K. G.; Kah, J. C. Y. Polydopamine Coating Enhances Mucopenetration and Cell Uptake of Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 4777–4789.
- (13) Mansfield, E. D. H.; Silience, K.; Hole, P.; Williams, A. C.; Khutoryanskiy, V. V. POZylation: A New Approach to Enhance Nanoparticle Diffusion through Mucosal Barriers. *Nanoscale* **2015**, *7*, 13671–13679.
- (14) Liu, M.; Zhang, J.; Zhu, X.; Shan, W.; Li, L.; Zhong, J.; Zhang, Z.; Huang, Y. Efficient Mucus Permeation and Tight Junction Opening by Dissociable “Mucus-Inert” Agent Coated Trimethyl Chitosan Nanoparticles for Oral Insulin Delivery. *J. Controlled Release* **2016**, *222*, 67–77.
- (15) Shan, W.; Zhu, X.; Tao, W.; Cui, Y.; Liu, M.; Wu, L.; Li, L.; Zheng, Y.; Huang, Y. Enhanced Oral Delivery of Protein Drugs Using Zwitterion-Functionalized Nanoparticles to Overcome Both the Diffusion and Absorption Barriers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 25444–25453.
- (16) Dombu, C. Y.; Kroubi, M.; Zibouche, R.; Matran, R.; Betbeder, D. Characterization of Endocytosis and Exocytosis of Cationic Nanoparticles in Airway Epithelium Cells. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 355102.
- (17) Paillard, A.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Kroubi, M.; Garcion, E.; Benoit, J.-P.; Betbeder, D. Positively-Charged, Porous, Polysaccharide Nanoparticles Loaded with Anionic Molecules Behave as “Stealth” Cationic Nanocarriers. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 126–133.
- (18) Le, M. Q.; Carpentier, R.; Lantier, I.; Ducourneau, C.; Dimier-Poisson, I.; Betbeder, D. Residence Time and Uptake of Porous and Cationic Maltodextrin-Based Nanoparticles in the Nasal Mucosa: Comparison with Anionic and Cationic Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2018**, *550*, 316–324.
- (19) Bernocchi, B.; Carpentier, R.; Lantier, I.; Ducourneau, C.; Dimier-Poisson, I.; Betbeder, D. Mechanisms Allowing Protein Delivery in Nasal Mucosa Using NPL Nanoparticles. *J. Controlled Release* **2016**, *232*, 42–50.
- (20) Tang, B. C.; Dawson, M.; Lai, S. K.; Wang, Y.-Y.; Suk, J. S.; Yang, M.; Zeitlin, P.; Boyle, M. P.; Fu, J.; Hanes, J. Biodegradable Polymer Nanoparticles That Rapidly Penetrate the Human Mucus Barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 19268–19273.
- (21) Mura, S.; Hillaireau, H.; Nicolas, J.; Kerdine-Römer, S.; Le Droumaguet, B.; Deloménie, C.; Nicolas, V.; Pallardy, M.; Tsapis, N.; Fattal, E. Biodegradable Nanoparticles Meet the Bronchial Airway Barrier: How Surface Properties Affect Their Interaction with Mucus and Epithelial Cells. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 4136–4143.
- (22) Govender, T. PLGA Nanoparticles Prepared by Nanoprecipitation: Drug Loading and Release Studies of a Water Soluble Drug. *J. Controlled Release* **1999**, *57*, 171–185.
- (23) Sosnik, A.; das Neves, J.; Sarmiento, B. Mucoadhesive Polymers in the Design of Nano-Drug Delivery Systems for Administration by Non-Parenteral Routes: A Review. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 2030–2075.
- (24) Schuster, B. S.; Ensign, L. M.; Allan, D. B.; Suk, J. S.; Hanes, J. Particle Tracking in Drug and Gene Delivery Research: State-of-the-Art Applications and Methods. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2015**, *91*, 70–91.
- (25) Lê, M. Q.; Carpentier, R.; Lantier, I.; Ducourneau, C.; Fasquelle, F.; Dimier-Poisson, I.; Betbeder, D. Protein Delivery by Porous Cationic Maltodextrin-Based Nanoparticles into Nasal Mucosal Cells: Comparison with Cationic or Anionic Nanoparticles. *Int. J. Pharm. X* **2019**, *1*, 100001.
- (26) Griffiths, P. C.; Cattoz, B.; Ibrahim, M. S.; Anuonye, J. C. Probing the Interaction of Nanoparticles with Mucin for Drug Delivery Applications Using Dynamic Light Scattering. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *97*, 218–222.
- (27) Bhatta, R. S.; Chandasana, H.; Chhonker, Y. S.; Rath, C.; Kumar, D.; Mitra, K.; Shukla, P. K. Mucoadhesive Nanoparticles for Prolonged Ocular Delivery of Natamycin: In Vitro and Pharmacokinetics Studies. *Int. J. Pharm.* **2012**, *432*, 105–112.
- (28) Kammona, O.; Kiparissides, C. Recent Advances in Nanocarrier-Based Mucosal Delivery of Biomolecules. *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 781–794.
- (29) Pelaz, B.; del Pino, P.; Maffre, P.; Hartmann, R.; Gallego, M.; Rivera-Fernández, S.; de la Fuente, J. M.; Nienhaus, G. U.; Parak, W. J. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano* **2015**, *9*, 6996–7008.

H

<https://dx.doi.org/10.1021/acsabm.0c00521>  
ACS Appl. Bio Mater. XXXX, XXX, XXX–XXX

- (30) Liu, B.; Wu, Z.; Liu, T.; Qian, R.; Wu, T.; Aizong Shen, Q. Polymeric Nanoparticles Engineered as a Vaccine Adjuvant-Delivery System. In *Immunization–Vaccine Adjuvant Delivery System and Strategies*; Wang, N., Wang, T., Eds.; IntechOpen, 2018.
- (31) Cu, Y.; Booth, C. J.; Saltzman, W. M. In Vivo Distribution of Surface-Modified PLGA Nanoparticles Following Intravaginal Delivery. *J. Controlled Release* **2011**, *156*, 258–264.
- (32) Saito, S.; Aina, A.; Suzuki, T.; Harada, N.; Ami, Y.; Yuki, Y.; Takeyama, H.; Kiyono, H.; Tsukada, H.; Hasegawa, H. The Effect of Mucoadhesive Excipient on the Nasal Retention Time of and the Antibody Responses Induced by an Intranasal Influenza Vaccine. *Vaccine* **2016**, *34*, 1201–1207.
- (33) Pawar, D.; Jaganathan, K. S. Mucoadhesive Glycol Chitosan Nanoparticles for Intranasal Delivery of Hepatitis B Vaccine: Enhancement of Mucosal and Systemic Immune Response. *Drug Delivery* **2016**, *23*, 185–194.
- (34) Pawar, D.; Mangal, S.; Goswami, R.; Jaganathan, K. S. Development and Characterization of Surface Modified PLGA Nanoparticles for Nasal Vaccine Delivery: Effect of Mucoadhesive Coating on Antigen Uptake and Immune Adjuvant Activity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 550–559.
- (35) Lee, H.-B.; Yoon, S.-Y.; Singh, B.; Oh, S.-H.; Cui, L.; Yan, C.; Kang, S.-K.; Choi, Y.-J.; Cho, C.-S. Oral Immunization of FMDV Vaccine Using PH-Sensitive and Mucoadhesive Thiolated Cellulose Acetate Phthalate Microparticles. *Tissue Eng. Regener. Med.* **2018**, *15*, 1–11.
- (36) Wenande, E.; Garvey, L. H. Immediate-Type Hypersensitivity to Polyethylene Glycols: A Review. *Clin. Exp. Allergy* **2016**, *46*, 907–922.
- (37) Lai, S. K.; O'Hanlon, D. E.; Harrold, S.; Man, S. T.; Wang, Y.-Y.; Cone, R.; Hanes, J. Rapid Transport of Large Polymeric Nanoparticles in Fresh Undiluted Human Mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 1482–1487.
- (38) Murgia, X.; Loretz, B.; Hartwig, O.; Hittinger, M.; Lehr, C.-M. The Role of Mucus on Drug Transport and Its Potential to Affect Therapeutic Outcomes. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2018**, *124*, 82–97.
- (39) Craparo, E. F.; Porsio, B.; Sardo, C.; Giammona, G.; Cavallaro, G. Pegylated Polyaspartamide–Polylactide-Based Nanoparticles Penetrating Cystic Fibrosis Artificial Mucus. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 767–777.
- (40) Surasmo, S.; Saengkrit, N.; Ruktanonchai, U. R.; Suktham, K.; Woramongkolchai, N.; Wutikhun, T.; Puttipipatkachorn, S. Surface Modification of PLGA Nanoparticles by Carbopol to Enhance Mucoadhesion and Cell Internalization. *Colloids Surf., B* **2015**, *130*, 229–236.
- (41) Dawson, M.; Krauland, E.; Wirtz, D.; Hanes, J. Transport of Polymeric Nanoparticle Gene Carriers in Gastric Mucus. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 851–857.
- (42) Lu, S.; Neoh, K. G.; Kang, E.-T.; Mahendran, R.; Chiong, E. Mucoadhesive Polyacrylamide Nanogel as a Potential Hydrophobic Drug Carrier for Intravesical Bladder Cancer Therapy. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *72*, 57–68.
- (43) Korytowski, A.; Abouillan, W.; Amadei, F.; Makky, A.; Gumiero, A.; Sinning, I.; Gauss, A.; Stremmel, W.; Tanaka, M. Accumulation of Phosphatidylcholine on Gut Mucosal Surface Is Not Dominated by Electrostatic Interactions. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2017**, *1859*, 959–965.
- (44) Lowry, G. V.; Hill, R. J.; Harper, S.; Rawle, A. F.; Hendren, C. O.; Klaessig, F.; Nobbmann, U.; Sayre, P.; Rumble, J. Guidance to Improve the Scientific Value of Zeta-Potential Measurements in NanoEHS. *Environ. Sci.: Nano* **2016**, *3*, 953–965.
- (45) Laffleur, F. Mucoadhesive Polymers for Buccal Drug Delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2014**, *40*, 591–598.

**Seconde étude:** Cationic and reticulated maltodextrine NPs act as a pure delivery system, to enhance the antigens immunogenicity toward airway immune cells.

L'administration muqueuse d'antigènes par des systèmes de délivrance est une alternative efficace à l'utilisation de molécules adjuvantes. L'encapsulation des antigènes au sein de NPs permet en effet d'améliorer leur biodisponibilité vis-à-vis des cellules immunitaires présentes au niveau du MALT. Il existe ainsi deux types de système de délivrance : (i) ceux permettant une internalisation massive des antigènes dans les cellules présentatrices d'antigènes ; (ii) ceux ayant une action immunomodulatrice intrinsèque supplémentaire. Ces deux mécanismes permettent une meilleure stimulation des voies pro-inflammatoires, et *in fine* une présentation aux lymphocytes plus efficace. En ce sens, le design du vecteur est de première importance, car il modifie sa capacité à associer un antigène, à le protéger des enzymes protéolytiques et à le délivrer dans les cellules.

Dans cette seconde étude, nous avons tenté de déterminer si la NPL appartenait à la première ou à la seconde famille de vecteur d'antigène. Nous avons de plus élucidé l'importance de la **masse volumique** des NPL, sur l'amélioration tant de la délivrance que de l'immunogénicité d'un antigène complexe, dans les cellules immunitaires de la muqueuse des voies aériennes.

## 1. Introduction

Vaccines currently designed for mucosal immunization are generally made up by using subunit antigens (389). These preparations display a higher stability, better-defined manufacturing procedures and a lower toxicity compared to live attenuated vaccines, although generally considered far less immunogenic. For this reason, the formers are often supplemented with adjuvants, whose function is to enhance the bioavailability of the antigens and the following recognition by antigen presenting cells (APC) and the activation of T and B lymphocytes (111,117). Adjuvants are classified according to their mechanism of action, in three categories, namely immunomodulators, delivery systems and the combination of both.

Immunomodulators act by harmonizing the response of the immune system towards an antigen. These molecules often derive from pathogens, as in the case of soluble bacterial toxins (e.g., cholera toxins (CT) from *Vibrio cholerae*), nucleic acids (e.g., bacterial CpG ODN, viral dsRNA), purified proteins and glycolipids (e.g., the flagellin or the monophosphoryl lipid A (MPL)), or from other sources (e.g., saponin QS-21 from *Quillaja saponaria*, or the synthetic imidazoquinolines) (97,390). The majority of the immunomodulators are recognized by APC through different membrane-bound and intracellular pattern recognition receptors (PRR), triggering the activation of pro-inflammatory intracellular pathways, finally leading to the expansion of either Th1 or Th2 cell populations (172). This advantage however cannot be exploited on a large scale due to difficulties in the stabilization of the molecules, which moreover are incompatible during mucosal administrations since potentially leading to serious adverse effects (120,391,392).

On the other hand, nanoparticles (NPs) as antigen delivery systems offer promising strategies to enhance the mucosal immunogenicity of subunit vaccines. These systems include lipid-based particles (e.g., liposomes, micelles, squalene-based emulsions), polymeric and polysaccharidic nanospheres (e.g., poly-lysine, starch, PLGA, chitosan) or inorganic materials (e.g., gold and mesoporous silica), which are ready to transport the antigens within their core or on their surface (154). Indeed, the association of the antigens to these vectors prolongs their bioavailability, following to enhanced interactions at mucosal level and protection from proteolysis (235), and



promotes the endocytosis by APC, instrumentally leading to an efficient intracellular delivery of the antigen therefore inducing an immune response (393).

Noteworthy, the design of NPs is important to ensure an efficient antigen association and delivery of the antigens. Hence, the size, the shape, the density or surface charge of the delivery system can greatly improve on the vaccine's efficiency (394).

In addition, some delivery systems, on account of their inner composition, are also able to modulate the immunity. For example, the AS01, used in the licensed malaria vaccine Mosquirix™, is an immunostimulating liposomal carrier containing MPL and QS-21. AS01 is capable to encapsulate the antigens, and at the same time, to stimulate APC through TLR4 targeting, leading to Th1 mediated immune response (395,396). Similarly, immune stimulating complexes (ISCOMs and ISCOMATRIX) are liposomes made from phospholipids, cholesterol and saponins, triggering Th1 and Th2 with potential application for mucosal and injectable immunization (384,397). In the same way, the oil-in-water emulsion AS02 composed by saponins and MPL, carries antigens and triggers Th1 immune response through TLR4 recognition (398,399).

Similarly, virus-like particles (VLP) represent an additional type of efficient immunostimulating vectors. Indeed these safe and nanosized recombinant particles can deliver various subunits antigens, and as perfectly mimicking the natural shape and size of a living virus, they efficiently trigger the immune system toward a Th1 immune response (400). This accounts for the application of VLP as efficient delivery systems for mucosal vaccines, principally against viral infections (401,402).

If all these immunomodulating carriers are more efficient than classical inert delivery systems, the mucosal administration of pro-inflammatory molecules still raises concerns due to potential safety issues.

Cationic maltodextrin-based nanoparticles are porous and spherical NPs with a phospholipid core (NPL), able to incorporate and deliver a large amount of antigens inside the cells (9,403). Due to their anionic lipid core, NPL penetrate the mucus after nasal administration, and therefore increase the antigen retention time in the mucosa (18,258,404). Accordingly, these nanoparticles are ideal for nasal administration of subunit vaccines against different diseases (259–261).

In the present study, we deciphered the mechanisms allowing these NPs to act as an adjuvant, and therefore if they are immunomodulators or inert delivery systems. Their ability to enhance the immunogenicity of a complex antigen (an *E. coli* total extract antigen) after a mucosal administration was investigated in airway epithelial cell, dendritic cells, and macrophages. Moreover, we elucidated the importance of the NPL density on their efficiency, using reticulated (NPL) and non-reticulated particles (NPL-NR). The two particles were identical in terms of size, surface charge and composition, therefore allowing their comparison. The ability of these NPs to load a complex bacterial total extract was assessed by PAGE analysis. In addition, their uptake and antigen delivery were evaluated by flow cytometry. Finally, their ability to enhance the TE immunogenicity was evaluated by measuring the cytokine secretions, of each epithelial and immune cell, by ELISA assay.

## 2. Material and methods

### 2.1 Material

Maltodextrin was purchased from Roquette (France) and DPPG (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol) was from Lipoid (Germany). Cell culture media (RPMI 1640, DMEM and IMDM), fetal calf serum (FCS), nonessential amino acids, TrypLE™ Express (0,45 mg/mL EDTA), L-glutamine, Trypan Blue 0.4 % , phosphate buffered saline (PBS), NaOH, ethanol, DiI (1,10-dioctadecyl-3,3,30,30-tetramethylene), Fluorescein Isothiocyanate (FITC), DQ™ Green BSA, Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes 10MWCO and Micro BCA Protein Assay Kit were purchased from ThermoFisher Scientific (France). Epichlorhydrin (1-chloro-2,3-epoxypropane), GTMA (glycidyl-trimethyl-ammonium chloride), NaBH<sub>4</sub>, bovine serum albumin (BSA), purified bovine submaxillary mucins and PD-10 Sephadex desalting column were purchased from Sigma-Aldrich (France). Human CCL20 (MIP-3a), CCL-28, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-12p40 ELISA Kit were purchased from Biolegend (San Diego, CA, USA). The *E. coli* total extract was supplied by Eurofins Bactup (France). The human muco-epidermoid bronchiolar carcinoma cell line NCI-H292 (hereafter H292) was supplied by Dr J.M. Lo-Guidice (University of Lille, France). The human monocytic cell line THP-1 was donated by Dr. F. Nessler (Pasteur Institute of Lille, France).

## *2.2 NPs syntheses and labeling*

### *2.2.1 Maltodextrin nanoparticles*

Maltodextrin-based nanoparticles with phospholipid core (NPL) were synthesized as previously described (255). Maltodextrin (100 g) was dissolved in 2 N sodium hydroxide with magnetic stirring at 25°C, and then epichlorohydrin (4.72 mL) and GTMA (31.08 g) were added, to get a cationic polysaccharide gel. The gel was then neutralized with acetic acid and crushed using a high-pressure homogenizer (LM20, Microfluidics, France). The particles obtained were then purified by tangential flow ultra-filtration (AKTA flux 6, GE Healthcare, France) using a 750 kDa membrane (GE Healthcare, France) to obtain purified NP<sup>+</sup> particles. These NP<sup>+</sup> were mixed thereafter with 70% DPPG (weight %) at 80°C for 2 h and filtered through a 0.2 µm filter to produce NPL.

Soft maltodextrin-based particles were produced as above but without epichlorohydrin, to avoid the reticulation of the maltodextrine. The non-reticulated NP<sup>+</sup> (NP<sup>+</sup>·NR) were also mixed with 70% DPPG (weight %) to obtain non-reticulated NPL (NPL·NR).

### *2.2.2 Nanoparticle labeling*

NPL and NPL·NR were labeled with DiI by mixing 1 % w/w dye (1 mg/ml in ethanol) with the particle suspension overnight. Each labeled particle was purified by dialysis using a 10 kDa dialysis cassette to remove the unbound dye, and the labelling was confirmed by fluorometry (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific, France).

## *2.3 Nanoparticles and formulations characterization*

### *2.3.1 Dynamic Light Scattering (DLS)*

The average hydrodynamic diameters were measured in 23 mM NaCl and at 25°C by DLS using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, France). The results are expressed as the mean Number ± standard deviation (sd) of at least three independent syntheses.

### 2.3.2 Zeta Potential

Zeta potentials were measured in ultrapure water and at 25°C by electrophoretic light scattering (ELS) using a Zetasizer nanoZS. The results are expressed as the mean  $\pm$  sd of at least three independent syntheses.

### 2.3.3 NPs density

NPs density was evaluated by picnometry (405) : the weight of 10 mL NP<sup>+</sup> and NP<sup>+</sup>-NR solutions (5 %) were compared to 50 mg of freeze-dried NPs and ultrapure water. The solution's densities were then calculated as:

$$\rho(NP) = \frac{m(NP \text{ lyoph}) \cdot \rho(H_2O)}{m(H_2O) - (m(NP \text{ sol}) - m(NP \text{ lyoph}))}$$

### 2.4 Protein labelling

An *E.coli* total extract (*E.coli*-TE) solution (5 mg/mL) was mixed with FITC (1 % w/w) in a 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer (pH = 8.3) with magnetic stirring and at room temperature for 1 h. Labeled *E.coli*-TE was purified from the unbound dye by dialysis in 10 kDa dialysis cassettes. The labelling was confirmed by fluorometry (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific, France), and the final protein concentration was measured using microBCA assay, according to the manufacturer's instructions.

### 2.5 Post-loading of antigens within nanoparticles

The loading of NPL and NPL·NR with BSA and *E. coli*-TE was performed by mixing both components in ultrapure water at room temperature for at least 1 h, at different protein/NPL weight ratio.

The protein association was evaluated with native polyacrylamide gel electrophoresis (native PAGE). The formulations were supplemented with a non-denaturing buffer (Tris-HCL 125 mM (pH 6.8), 10 % glycerol and 0.06 % bromophenol blue) and run on a 10 % acrylamide-bisacrylamide gels for 15 min at 120 V then 45 min at 180 mV. Under these conditions, NPs-associated protein do not enter the gel, while the non-associated proteins do. The gels were then stained by the silver nitrate method, scanned and quantified using the ImageJ software (9).

### *2.6 BSA-DQ hydrolysis in presence of proteases*

To evaluate the ability of NPL and NPL·NR to protect antigens from proteolysis, 3.75 µg of non-fluorescent BSA-DQ was associated with 11.25 µg NPL or NPL·NR (30 % weight ratio), in 200 mL of PBS (150 mM; pH 7.2), in a 96 well plate. Unassociated BSA-DQ was used as negative control. For trypsin treatment, 50 µL of 5 units of trypsin diluted in PBS was added in each well, for 0.84 µM final concentration of enzyme, and the plate was incubated for 120 minutes at 37°C. The proteolysis was observed by the generation of BSA-DQ fluorescent fragments, measured by fluorometry ( $\lambda_{ex}$ : 485 nm,  $\lambda_{em}$ : 527 nm), with the 100 % of degradation set over the protein alone.

### *2.7 Cell culture*

H292 epithelial cells and human monocytic THP-1 cells were maintained in RPMI 1640, supplemented with 10 % heat-inactivated FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 1 % (v/v) L-glutamine at 37°C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere.

### *2.8 NPs endocytosis*

Cells were seeded in 24-well plates at a density of  $5 \times 10^4$  cells per well until confluence. The differentiation of THP-1 into a M0 macrophage-like (THP-1 M $\phi$ ), adherent phenotype was performed by adding 40 ng/ml PMA to the culture media for 48 h, followed by a further 24 h rest in fresh media with serum. The differentiation of THP-1 into immature dendritic cells (THP-1 iDC) was performed by adding 1500 IU/mL rhIL-4 and rhGM-CSF to the culture media for 5 days, and a medium renewal was performed every 2 days with fresh cytokine-supplemented medium.

Cells were then treated for 5 to 180 min with 9 µg DiI-labeled NPs, in 500 µL of fresh medium.

To evaluate NPs' association to airway mucins, 9 µg of DiI-labeled NPs were incubated for 15 min with a mucin solution (0.1 %) and the mix was added to H292 cells for 30 min.

Cells were harvested with TrypLE™ Express, collected by centrifugation and diluted in PBS (without calcium or magnesium) before cytometry analysis on an Attune™ NxT (ThermoFisher Scientific). Isolated cells were selected by their size

and cellular complexity with a gating on SSC-A:FSC-A then SSC-A:SSC-H. Analyses were made on 7,500 individual cells and the results are expressed as the mean  $\pm$  sd of at least three independent experiments.

### *2.9 Protein delivery by nanoparticles in cells*

H292 cells were seeded in 24-well plates at a density of  $5 \times 10^4$  cells per well until confluence. The differentiation of THP-1 into a M0 macrophage-like (THP-1 M $\phi$ ), adherent phenotype was performed by seeding them in 24-well plates, at a density of  $5 \times 10^4$  cells per well, with 40 ng/ml PMA in the culture media for 48 h, followed by a further 24 h rest in fresh media. The differentiation of THP-1 into immature dendritic cells (THP-1 iDC) was performed by adding 1500 IU/mL rhIL-4 and rhGM-CSF to the culture media for 5 days, and a medium renewal was performed every 2 days, with fresh cytokine-supplemented medium.

Cells were then treated for 30 to 180 min with 3  $\mu$ g fluorescein-labeled *E. coli*-TE, alone or encapsulated in NPL and NPL·NR, and in 500  $\mu$ L of fresh medium.

Cells were harvested with TrypLE™ Express, collected by centrifugation and diluted in PBS (without calcium or magnesium) before cytometry analysis on an Attune™ NxT (ThermoFisher Scientific). Trypan blue (40  $\mu$ g/mL) was added to quench extracellular fluorescence. Isolated cells were selected by their size and cellular complexity with a gating on SSC-A:FSC-A then SSC-A:SSC-H. Analyses were made on 7,500 individual cells and the results are expressed as the mean  $\pm$  sd of at least 3 independent experiments.

### *2.10 In vitro evaluation of epithelial cells, macrophages, and dendritic cells immune activation*

H292, THP-1 M $\phi$  and THP-1 iDC cells were seeded in 96-well plates at a density of  $10^4$  cells per well until confluence. They were then treated for 24 h, in 250  $\mu$ L, under different stimulation conditions: cells alone, 5  $\mu$ g/mL *E.coli*-TE alone, 15  $\mu$ g/mL NPL or NPL·NR, or *E.coli*-TE encapsulated in NPs (5  $\mu$ g/mL *E.coli*-TE and 15  $\mu$ g/mL NP). Cell culture supernatants were collected after 24 h, and cytokine productions were directly evaluated using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Characterization of NPL and NPL·NR

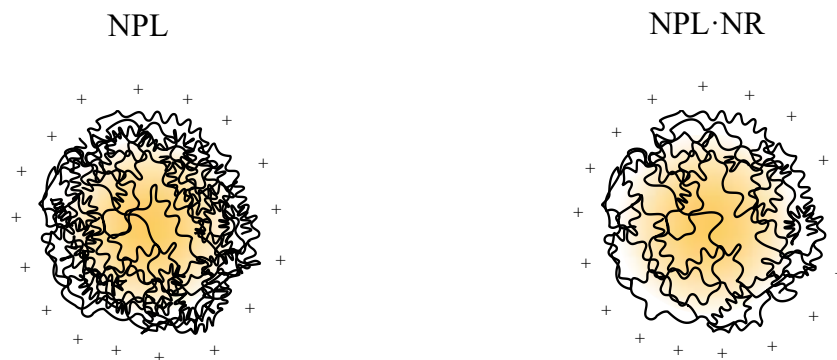


Figure 23 : Schematic representation of NPL (cationic particles with reticulated maltodextrine and a phospholipid core) and NPL·NR (cationic particles with non-reticulated maltodextrine and a phospholipid core).

Table 1 : The diameters and surface charges were measured in water, by DLS (in number) and ELS, respectively, and their density before lipidation by pycnometry. Results represent the mean  $\pm$  sd of at least three independent measurements, made on three independent batches.

	<b>DIAMETER</b>		<b>Z-POTENTIAL</b>	<b>DENSITY BEFORE</b>
	<b>IN WATER</b>	<b>PDI</b>	<b>(MV)</b>	<b>LIPIDATION (G/CM<sup>3</sup>)</b>
	<b>(NM)</b>			
NP <sup>+</sup>	33 $\pm$ 4	0.26	+ 36 $\pm$ 5	1.37 $\pm$ 0.29
<b>NPL</b>	<b>35 <math>\pm</math> 5</b>	<b>0.28</b>	<b>+ 38 <math>\pm</math> 2</b>	<b>N. A</b>
NP <sup>+</sup> ·NR	17 $\pm$ 6	0.19	+ 32 $\pm$ 6	1.21 $\pm$ 0.09
<b>NPL·NR</b>	<b>24 <math>\pm</math> 9</b>	<b>0.25</b>	<b>+ 38 <math>\pm</math> 3</b>	<b>N. A</b>

In this study, two nanoparticles with different density were designed, synthesized and compared. NPL are reticulated cationized maltodextrin NPs with a lipid core. NPL·NR were synthesized as NPL, but with a non-reticulated maltodextrin to obtain softer particles. Indeed, maltodextrin is known to produce microparticles when diluted in water, due to hydrophilic and hydrophobic interactions between the polysaccharides (249,406). Their homogenization lead to the formation of nanoparticles, less dense than the reticulated ones. Interestingly, the absence of reticulation may affect other parameters such as the elasticity or the porosity. This was confirmed by the pycnometry results obtained before lipidation, with NP<sup>+</sup> showing a density of 1.37 g/cm<sup>3</sup> and NP<sup>+</sup>·NR of 1.21 g/cm<sup>3</sup>. NPL had a mean diameter of 35 nm, and their surface was cationic with a zeta-potential of +38 mV. No variation of size nor zeta potential was observed after the lipidation, corroborating that the anionic phospholipids were inside the particles. NPL·NR had a diameter of 25 nm, and a cationic surface, of +38 mV. This suggests that the lower density slightly decreased the particle's size but did not affect the surface charge. As no significant variation of size nor surface charge was observed between NP<sup>+</sup>·NR and NPL·NR, it can be concluded that, just like for NPL, the phospholipids were inside the non-reticulated particles, despite their lower density. The dispersion of both particle sizes was homogeneous with a PDI < 0.3. Furthermore, no significant modification of NPL and NPL·NR's sizes or surface charge was observed in water at room temperature for at least one year (data not shown).

### *3.2 Characterization of protein loading in NPL and NPL·NR*

To evaluate the influence of the particle's density on the protein association, NPL and NPL·NR were mixed with an increasing amount of BSA (Figure 2A). Polyacrylamide



gel electrophoresis showed that maximum BSA incorporation was 200 % in NPL (Figure 2B), and 300 % in NPL·NR (Figure 2C, weight %), suggesting that NPL saturated faster than NPL·NR. This may be due to the larger pores in the NPL·NR's maltodextrin scaffold, compared to the NPL, induced by the absence of reticulation. In parallel, zeta-potential analysis revealed that NPL's surface charge remained steady from 30% to 100% and dropped when mixed with 200 % BSA and more. This indicated that BSA was encapsulated inside the particles, from 30 % to 100 % loading, and on the surface for 200 % loading. On the contrary, NPL·NR's surface charge continuously decreased when mixed with 30 % BSA and more, indicating that the protein was mostly exposed on the NPs' surface. As NPs with cationic surfaces are known to interact more with cell membrane than neutral and anionic NPs, this surface loading could therefore influence the antigen presentation and delivery inside mucosal and immune cells.

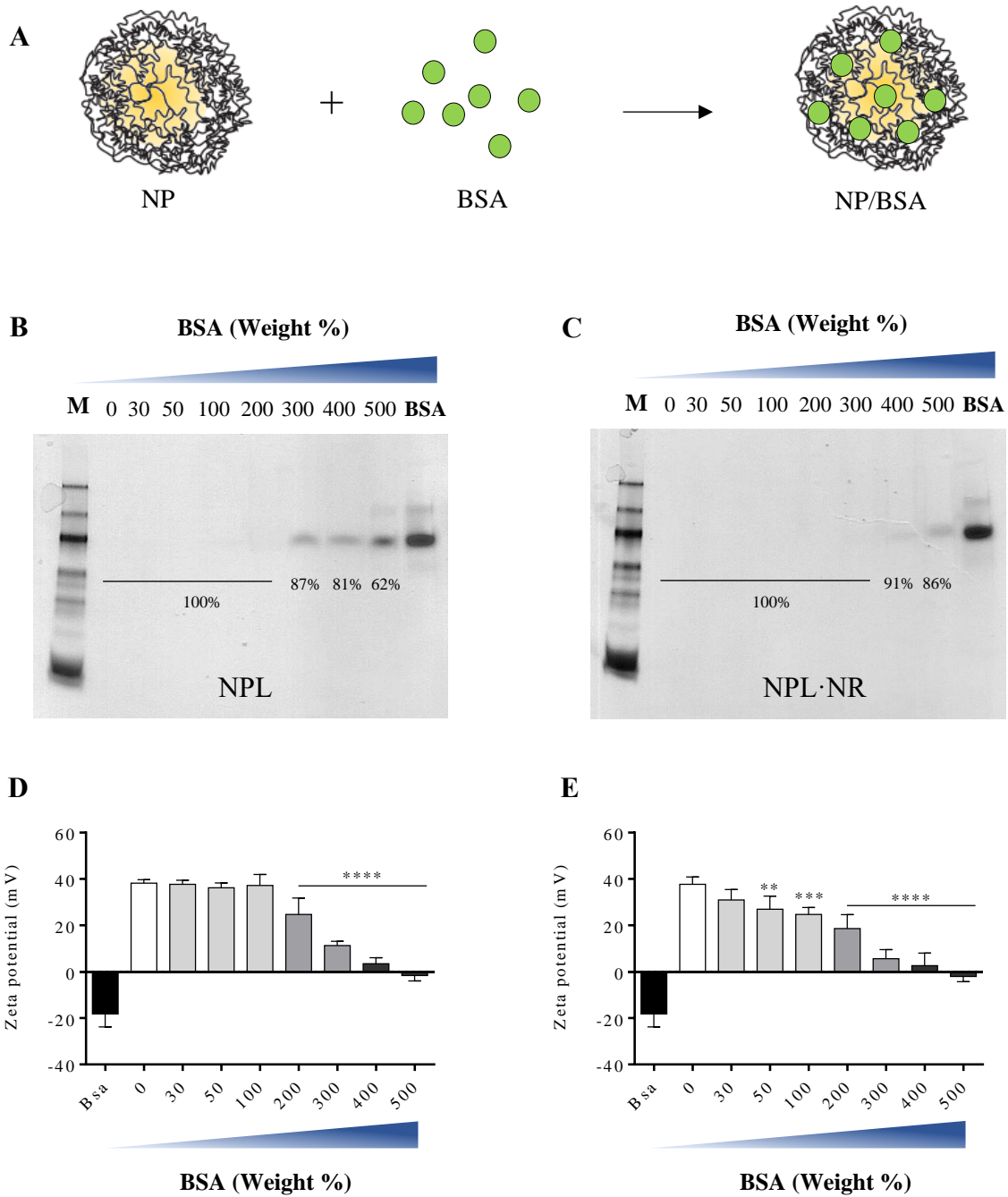


Figure 24. A: Schematic representation of the experiment. Each NPs solution was mixed with increasing amount of BSA. The percentage of association to NPL (B) and NPL-NR (C) was evaluated by native polyacrylamide gel electrophoresis. The internal or surface association to NPL (D) and NPL-NR (E) was evaluated by zeta-potential measurements, and the results represent the mean  $\pm$  sd of at least 6 independent measurements. Statistical analysis was made by one-way ANOVA \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### *3.3 Influence of NP association on BSA hydrolysis by proteases*

Delivery systems can enhance the antigen delivery by protecting the proteins from proteolysis, thus increasing their bioavailability. Therefore, to understand if the NPL's density had an influence on the preservation of the antigen, BSA-DQ was used, in presence or absence associated of NPL and NPL·NR, along with trypsin, which is a natural proteolytic enzyme found in the airway mucosa (Figure 3A). The fluorescence intensity of BSA-DQ hydrolysis was measured for 2 h at 37°C and pH 7.2.

When associated to NPL,  $73\pm 1$  % proteolysis was observed after 2 h, while for NPL·NR,  $95\pm 11$  % protein was degraded (Figure 3B). NPL could therefore significantly reduce the antigen proteolysis, contrary to NPL·NR. This is probably due to the greater protein exposition on the NPL·NR surface than for NPL, as stated before (Figure 2D and 2E).

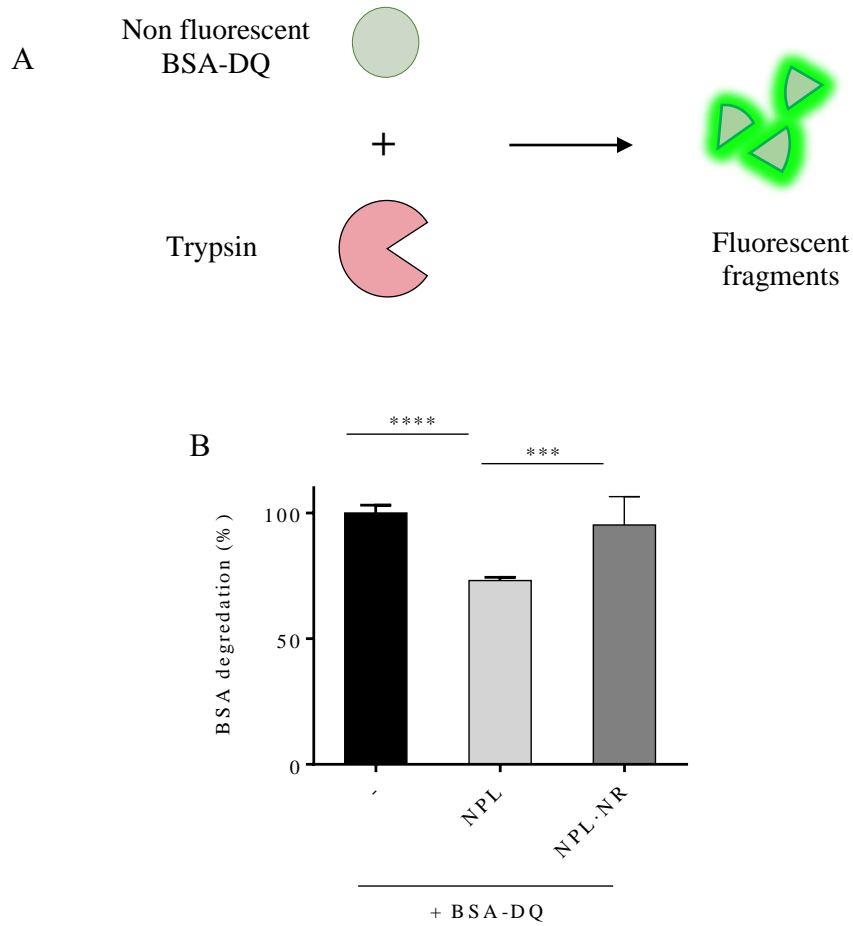


Figure 25 : A: Schematic representation of the experiment. BSA alone or associated to each NP (30 %, weight %) was incubated in presence of trypsin, for 2 h at 37 °C and pH: 7.2. The proteolysis was measured by fluorometry (B). The results represent the normalized mean of 3 independent experiments, and statistical analysis were made by one-way ANOVA. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 3.4 NP's endocytosis

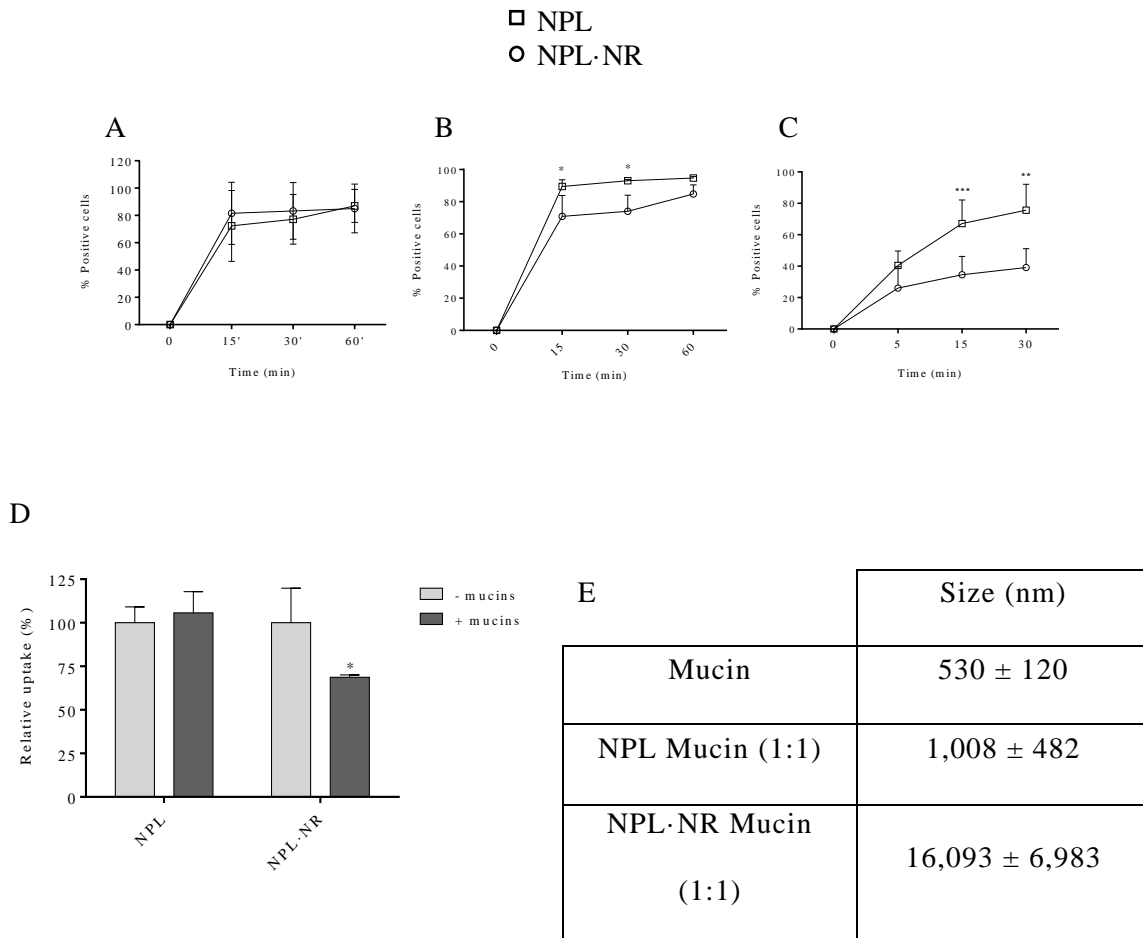


Figure 26 : NPL and NPL·NR were labeled with DiI, and their endocytosis was evaluated by flow cytometry, on THP-1 derived DC (A) or macrophages (B) and H292 cells (C). Their ability to bypass mucin layer was evaluated by incubating both particles with purified mucins and measuring thereafter their endocytosis on H292 cells (D). The size of the complexes made between the NPL and NPL·NR, and the mucins, was measured by DLS (E). The results represent the mean  $\pm$  sd of at least 3 independent experiments, and the statistical analysis were made by ANOVA tests. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

To mimic the interaction with the NALT's cell population, the endocytosis of NPL and NPL·NR was evaluated on airway epithelial cells H292, and THP-1 differentiated dendritic cells and macrophages. Due to their small size and their cationic surface

charge, both particles were rapidly taken up by the cells (Figure 3A, 3B and 3C). However, NPL had a faster endocytosis than NPL·NR for macrophages and epithelial cells, suggesting that dense particles interact more easily with the cell membrane than the soft ones. Indeed, for particles of diameter  $< 50$  nm, pinocytosis is the main way of endocytosis, even for phagocytic cells. These mechanisms involve membrane invaginations, which are easily triggered with stiff particles (85).

The presence of mucins did not hinder the uptake of NPL by H292, due to the steric interactions inside the maltodextrin scaffold, and the electrostatic repulsions between the phospholipid core and the mucins, as previously demonstrated (404). However, the uptake of NPL·NR decreased by 25%, suggesting a stronger interaction with mucins, which partially blocked their endocytosis. To confirm these observations, the size of the complexes made between both particles and mucins were measured by DLS: NPL made complexes with a size close to  $1 \mu\text{m}$  (i.e.,  $1,008$  nm) while NPL·NR made complexes with a size over 15 fold larger (i.e.,  $16.09 \mu\text{m}$ ). Therefore, NPL·NR showed greater interaction with mucins than NPL. This is in accordance with the studies of BSA loading, in which it was suggested that NPL·NR had larger pores than NPL due to their lower density. Therefore, the mucin fibers were more susceptible to interpenetrate the maltodextrin scaffold, fact that would lead to the formation of large complexes and finally to a hindrance that limits the endocytosis.

Finally, the density appears to be an important parameter for both endocytosis and mucopenetration for these NPs.

3.5 TE cell delivery

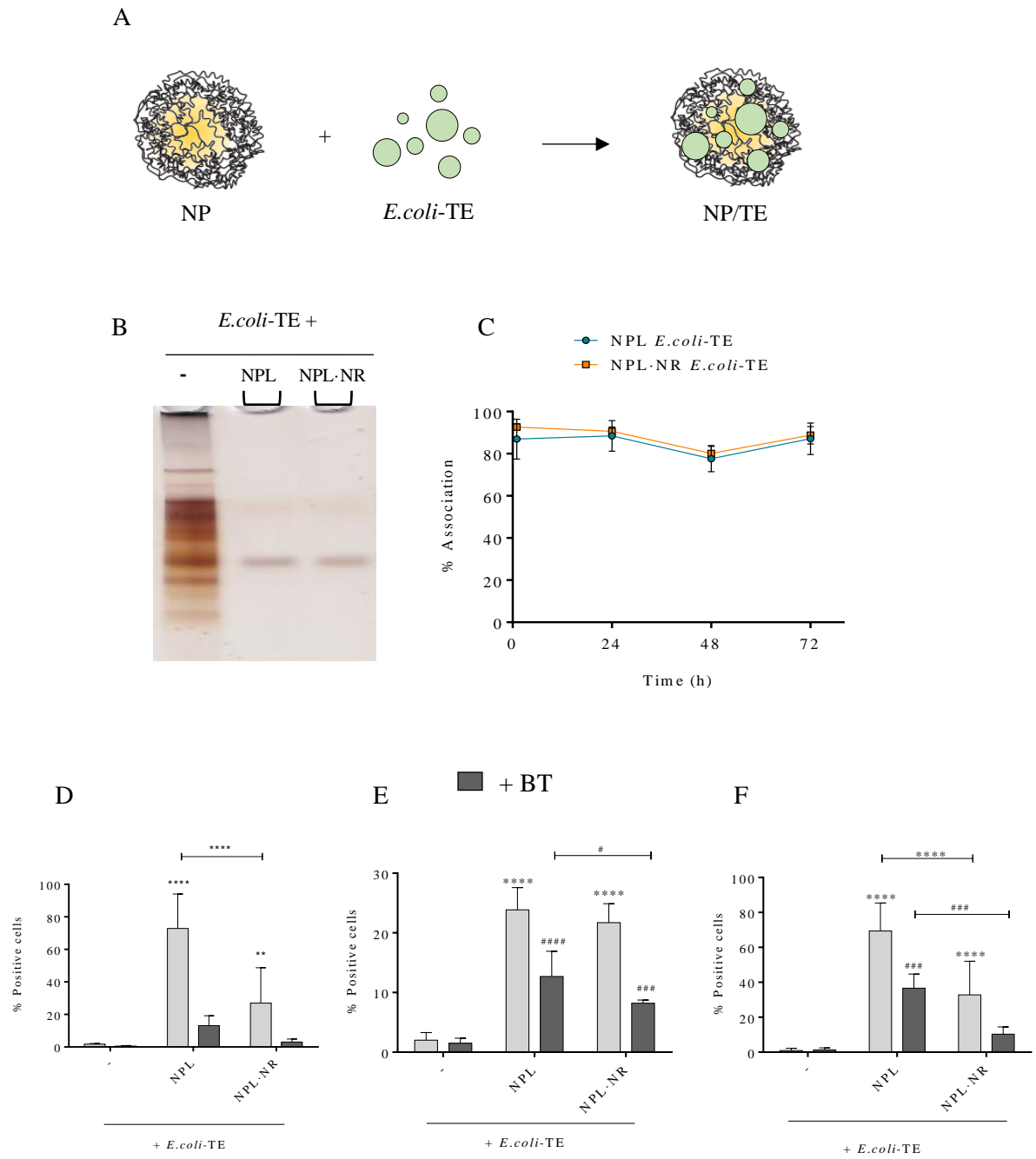


Figure 27 : A: Native PAGE of NPs/*E.coli*-TE (30% weight ratio) after 1h; B: Stability of the NPs/*E.coli*-TE (30% weight ratio) association for 3 days. D: The *E. coli*-TE delivery by NPL and NPL-NR was evaluated on THP-1 derived DC (D), macrophages (E) and H292 (F), in presence of absence of Trypan blue. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$

The ability of NPL and NPL·NR to associate and deliver complex antigens was evaluated with an *E. coli* total extract (*E. coli*-TE). Both particles were mixed in water with the crude antigen (30 % NPs/TE, weight %), and the association was measured by Native-PAGE. After 1 h, both particles associated most of the total extract's proteins, with no difference between the particles ( $87 \pm 9$  % association for the NPL and  $93 \pm 2$  % for the NPL·NR). After 72 h, no significant loss was observed. Hence NPL and NPL·NR had the same ability to associate this total extract over time, with no implication of the maltodextrin density.

The *E. coli*-TE intracellular delivery was evaluated on dendritic cells, macrophages and epithelial cells, by flow cytometry. The TE was covalently labeled with fluorescein, and the measurements were made in presence of Trypan blue to quench membrane-bound fluorescence. For every cell line, the TE's cell association was significantly greater when associated to NPL or NPL·NR. For dendritic and epithelial cells, this cell association was greater with NPL than with NPL·NR. Moreover, the intracellular delivery was significantly greater with NPL than NPL·NR, for every cell line. These results are in accordance with the endocytosis experiments, confirming that the more the particle density, the greater the intracellular uptake. Moreover, as demonstrated above, the NPL's apparent surface charge remains cationic in presence of antigens, contrary to NPL·NR. Consequently, formulations made with the NPL are more likely to interact with cell membrane to be endocytosed than the one made with the NPL·NR.

Nevertheless, the antigen intracellular delivery is not a sufficient evidence to evaluate a particle's adjuvanticity. Indeed, a total extract contain ligands able to be recognized by membrane and intracellular immune receptors. Therefore, the evaluation of the immunological activation is still necessary.



### 3.6 Formulation's immunogenicity

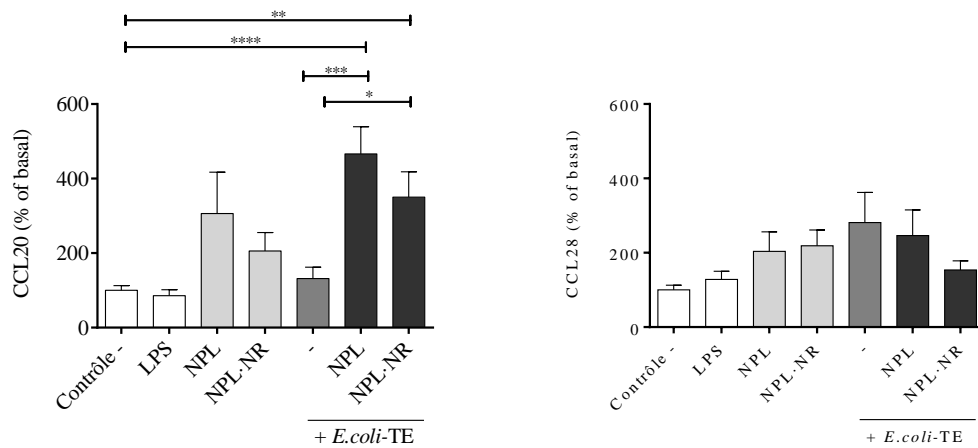


Figure 28 : The immunogenicity of NPs and TE was evaluated on H292. The cells were incubated with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), TE (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) alone or associated to NPs (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30% weight ratio) for 24h, and the CCL20 (left) and CCL28 (right) secretions were measured by ELISA. Results represent mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$

Epithelial cells are mainly the first mucosal cells to encounter a pathogen after it cross the mucus layer. Consequently, they can recognize some pathogenic pattern, and to secrete cytokine cocktails, such as pro-inflammatory cytokines or chemo-attractive chemokines. Among them, CCL20 and CCL28 are known to increase respectively immature dendritic cell and B lymphocyte migration to the infection site, hence favoring the development of the immune response (407–409). Accordingly, in presence of adjuvants, mucosal vaccines may increase the secretion of these cytokines.

In order to evaluate the mucosal adjuvanticity of NPL and NPL-NR, airway epithelial cells were incubated with *E. coli*-TE alone or associated to each particle, and the secretion of CCL20 and CCL28 was measured. Compared to the bacterial TE alone, the formulation increased 300% to 400% times more the secretions of CCL20 (Figure 7). Moreover, formulations made with NPL seem to stimulate the CCL20 production greater than the NPL-NR, but with no statistical differences. The two particles alone

also induced a 200% to 300% increasing of CCL20 secretion, suggesting that their fast endocytosis could be perceived as a danger signal for the cells. In contrast, a trend in CCL28 increasing secretion was detected in presence of the particles and the TE, alone or associated to the NPL, but without statistical differences.

Altogether, these results suggest that both particles were able to enhance the antigen's immunogenicity toward epithelial cells to a similar extent, probably as a consequence of their ability to deliver the antigens inside the cells, and despite their difference in density. The adjuvanticity seems to orientate the immunity mostly through dendritic cell recruitment rather than lymphocyte cells.

Finally, the particle's adjuvanticity was evaluated on macrophages and dendritic cells, by measuring the secretion of different cytokines. The formulations made with both NPL and NPL·NR induced 5 times increase in IL-1 $\beta$  secretion by macrophages, suggesting a greater pro-inflammatory activation. However, only the NPL formulations could increase the IL-12p40 secretion, suggesting a Th1/Th17 orientation. The same pattern was observed for dendritic cells, where only the formulations made with the NPL increased the IL-1 $\beta$  and the IL-12p40 secretions. No significant secretion of TNF- $\alpha$  nor IL-6 was detected compared to unstimulated cells. It can be concluded that as the *E. coli*-TE was better delivered by NPL than NPL·NR. These results confirm the importance of NP's density to enhance an antigen immunogenicity through a better delivery.

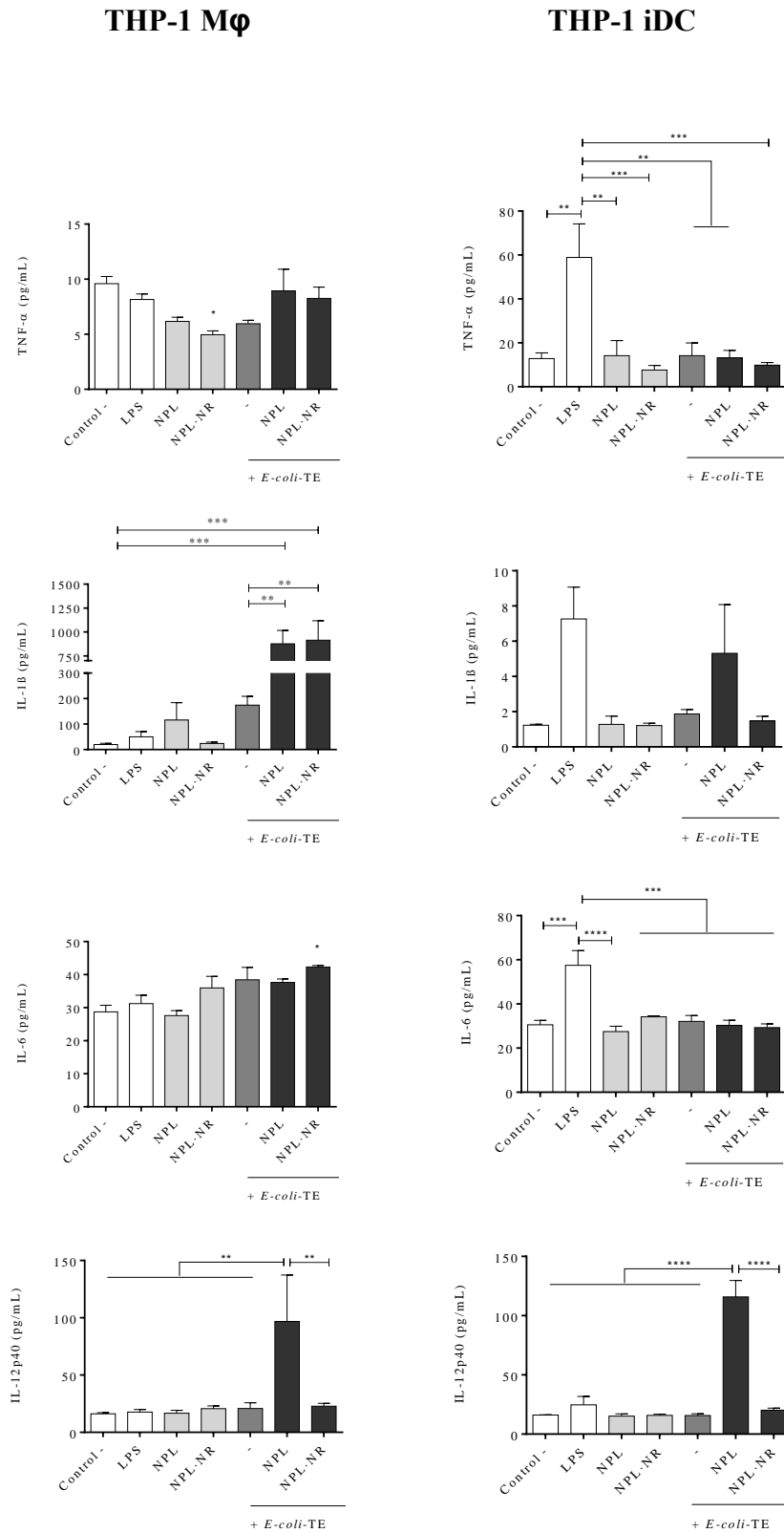


Figure 29 : The immunogenicity of NPs and TE was evaluated on THP-1 derived macrophages (left) and dendritic cells (right). The cells were incubated with LPS (1 µg/mL), TE (5 µg/mL) alone or associated to NPs (15 µg/mL, 30% weight ratio) for 24h, and the TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-12p40

*secretions were measured by ELISA. Results represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$*

#### 4. Conclusion

To bypass the use of immunomodulating molecules, the development of efficient mucosal vaccines can be done with innovative alternatives like delivery systems. For nanosized vectors, parameters like the size, the shape, the density, or surface charge are important to ensure the enhancement of the antigen's immunogenicity. Here the mechanism allowing NPL to enhance the immunogenicity of *E.coli* total extract antigens after a mucosal administration was elucidated, and the importance of the NP's density on this efficiency was investigated using reticulated (NPL) and non-reticulated particles (NPL·NR). Due to their higher density, NPL were capable to associate, protect and deliver antigens in APC and epithelial cells more efficiently than NPL·NR, leading to a greater immunogenicity. These results clearly demonstrate that NPL are not immunomodulating carriers but act as a true delivery system toward APC.

**PARTIE III : DISCUSSION GENERALE**

*Recherche en vaccinologie – Intérêt des nanoparticules*

Depuis la découverte du premier vaccin contre la variole par Edward Jenner au 18<sup>ème</sup> siècle, la vaccination a permis de lutter contre de nombreuses infections. Depuis ce jour, la volonté d'améliorer sans cesse l'efficacité des vaccins, et de diversifier leur utilisation à un maximum d'infections et à d'autres pathologies (ex : cancer, Alzheimer, addictions...) a fait émerger différentes stratégies d'immunisation (410–412). Grâce à une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques, le choix de l'antigène (vaccins vivants atténués ou vaccins sous-unitaires), l'utilisation de différentes familles d'adjuvants (sels d'aluminium, ligands des TLR, systèmes de délivrance...), et le choix de la voie d'administration (intramusculaire, sous-cutanée, orale, nasale...) sont désormais systématiquement pris en compte dans l'élaboration d'un vaccin. De nombreuses combinaisons peuvent ainsi aujourd'hui être envisagées pour permettre de vacciner le plus efficacement un grand nombre de personnes, et avec le moins de risque possible.

En France par exemple, 56 vaccins sont aujourd'hui commercialisés pour lutter contre 23 infections. Parmi eux, 20 sont composés d'antigènes sous-unitaires, 22 sont des vaccins vivants atténués, et 14 contiennent les deux types de vaccins (Figure 30). Les adjuvants utilisés sont de types sels d'aluminium et toxines bactériennes, et tous sont administrés par voie injectable, à l'exception du Dukoral® administré par voie orale (<https://vaccination-info-service.fr>).

La prévalence des maladies infectieuses des pays occidentaux est en revanche bien moins élevée que celle des pays de l'hémisphère Sud, notamment ceux en voie de développement. Les climats chauds et humides, associés à une importante pauvreté des populations limitant leur accès aux soins, favorisent en effet la propagation de

virus, bactéries et parasites susceptibles de contaminer l'humain. Les besoins en thérapies et notamment en vaccins efficaces sont donc plus importants. A titre d'exemple, en 2018, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estimait à 228 millions le nombre de personnes atteintes de paludisme dont 93% en Afrique, pour 405 000 décès (<https://www.who.int/fr>). Bien que des traitements médicamenteux, associés à des stratégies préventives, contribuent à ralentir la propagation, aucun vaccin efficace n'a encore vu le jour. D'autres infections partagent le même constat (Hépatite C, choléra, Zika...).

Enfin, le siècle dernier a été marqué par l'émergence de plusieurs épidémies. Parmi les plus marquantes, on peut citer le choléra en 1900, l'encéphalite léthargique en 1915, la grippe espagnole en 1918, les virus de la grippe H2N2 en 1957 et H3N2 en 1968, le VIH dans les années 80, le virus Ebola en 2013 ou encore l'épidémie de SARS-CoV-2 aujourd'hui. L'OMS, aidé par d'autres fondations internationales dont la *Coalition for Epidemic Preparedness Innovations* (CEPI), jouent le rôle d'observatoire de surveillance des épidémies afin d'aider à l'anticipation, la prévention et le contrôle de ces phénomènes (<https://cepi.net>). Ensemble, ils émettent des recommandations régulières à la communauté scientifique pour favoriser la découverte de stratégies vaccinales concrètes et efficaces contre les maladies à haut potentiel épidémique. Ainsi en 2019, la CEPI recommandait, au-delà de l'efficacité, d'orienter les activités de recherche vers le développement de vaccins simples et rapides à développer, stables dans le temps, et peu sensibles aux variations de température. La recherche en vaccinologie est par conséquent d'une priorité majeure encore de nos jours.

L'utilisation des NPs dans le développement de vaccins apparaît aujourd'hui comme une stratégie sérieuse pour répondre à ces exigences. En effet, l'association d'antigènes à des systèmes de délivrance, inertes (liposomes, nanosphères polymériques...) ou immunomodulateurs (émulsions huile/eau type AS01, ISCOMATRIX, VLP...), favorise à la fois un développement rapide et à grande échelle de vaccins, une réponse immunitaire efficace avec une dose antigénique réduite, ainsi qu'une tolérance de plus en plus maîtrisée (247,413). L'épidémie de Covid-19 en cours nous en offre une illustration concrète: fin juillet 2020, sur les 6 vaccins étant en phase II, III et IV de développement clinique, 2 d'entre eux utilisent des NPs (414). Le plus avancé, développé par Moderna Therapeutics, est constitué de liposomes cationiques encapsulant un ARNm codant pour la protéine de surface Spike du virus (mRNA-1273) (415). Le second utilise une technologie VLP, à partir d'un adénovirus Ad5 exprimant lui aussi la protéine Spike (416). De même, sur les 28 vaccins en phase I et I/II, 9 utilisaient des NPs, principalement des VLP et liposomes cationiques, dont un adjuvanté avec des saponines (technologie Matrix M<sup>®</sup> de Novavax). Sur les 109 vaccins en phase préclinique, 33 utilisaient ces mêmes technologies. Ces exemples démontrent le potentiel croissant des nanovecteurs pour répondre aux challenges liés à la vaccination.



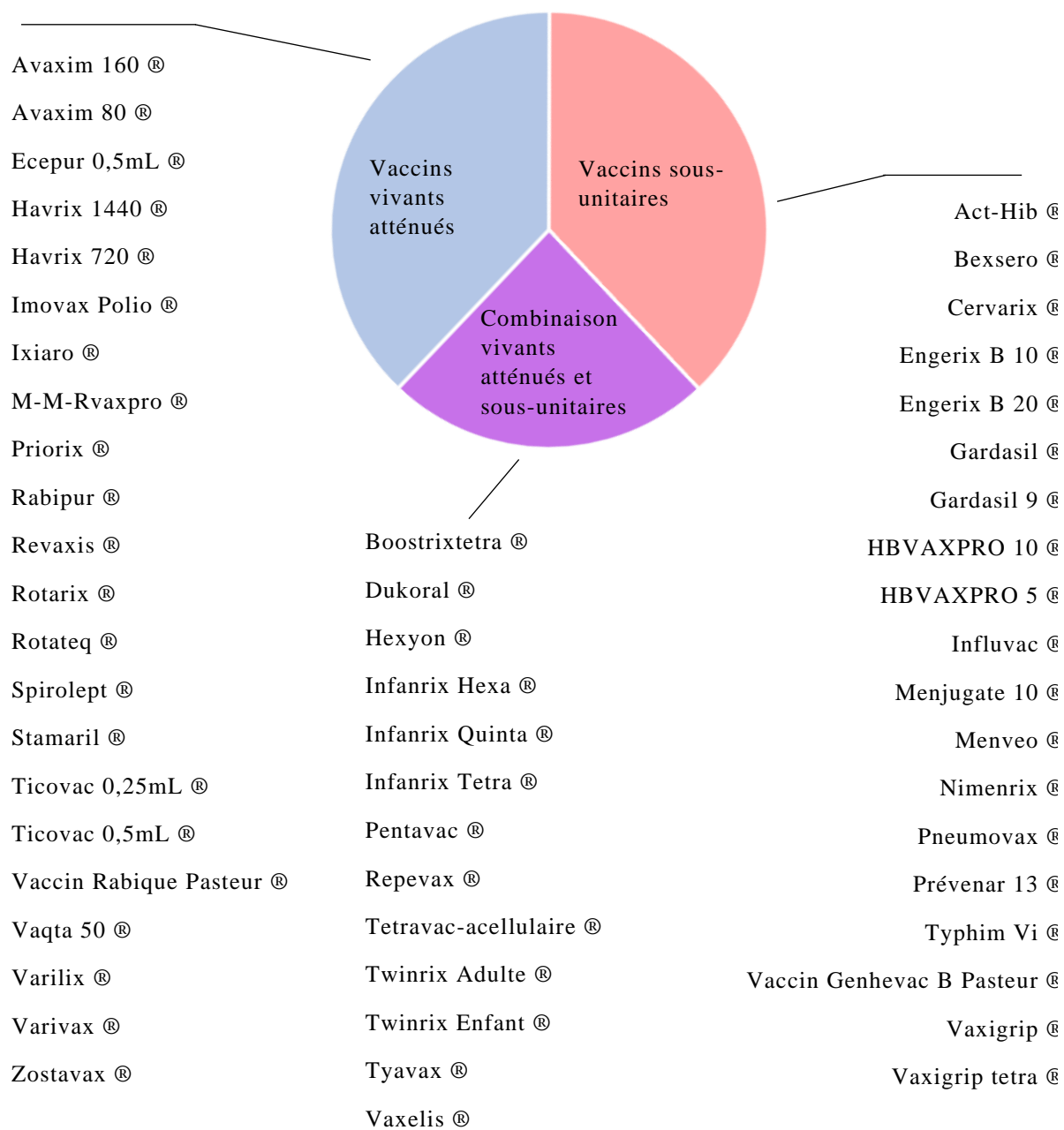


Figure 30: Liste des vaccins commercialisés en France, en fonction du type d'antigène

*Importance de la voie muqueuse*

Le système immunitaire muqueux n'est étudié que depuis la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, et bien qu'il partage certains éléments cellulaires et moléculaires avec le système immunitaire systémique, il travaille principalement à la tolérance vis-à-vis de l'environnement extérieur. Il s'agit en effet de faire le tri entre la flore commensale, bénéfique à l'organisme, et les pathogènes susceptible d'infecter l'organisme. Une balance immunologique est donc ici en jeu, et dont l'acteur principal est le MALT (133). Distribué inégalement sur l'ensemble des muqueuses de l'organisme, ce tissu sonde l'environnement grâce ses cellules M directement enchâssées dans les épithéliums. Ces dernières prélèvent et transcytosent en permanence les molécules et cellules de la lumière, pour les présenter aux cellules immunitaires sous-jacentes, principalement des cellules dendritiques et macrophages résidents. (134) Ainsi, en fonction des motifs microbiens reconnus, les réponses transmises par ces CPA seront soit de nature anti-inflammatoire, pour maintenir le micro-organisme au niveau de la muqueuse, soit de nature pro-inflammatoire, en vue de déclencher une défense active, médiée par les lymphocytes B et T, vis-à-vis de l'élément infectieux. Cette réponse sera marquée par la sécrétion d'IgA et la différenciation de lymphocytes cytotoxiques, au niveau de la muqueuse où l'infection s'est produite, mais aussi de muqueuses plus distantes. De plus, grâce à la migration des CPA vers les ganglions drainants, puis vers la rate, une réponse mémoire systémique pourra fréquemment être observée (131).

Puisque la majorité des infections ont lieu au niveau des muqueuses, par échappement aux systèmes de vigilance naïfs, l'administration de vaccins par ces mêmes voies devrait permettre de développer une défense de première ligne plus efficace, via une immunité tant humorale que cellulaire. Cette hypothèse a été confirmée à la fin des années 60 avec le vaccin oral contre la poliomyélite (123). Il s'est en revanche avéré

que les muqueuses sont plus sensibles aux adjuvants et aux vaccins vivants atténués, avec un risque accru de voir apparaître des effets secondaires. Le Rotashield®, vaccin oral contre le rotavirus, a ainsi été retiré du marché en 1999 pour des cas d'occlusions intestinales chez le nourrisson. De même, le vaccin nasal Nasalflu dirigé contre la grippe fut relié à des cas de paralysie faciale, à cause du passage vers le cerveau de l'adjuvant utilisé (131). Ces exemples ont exacerbé la réticence des scientifiques et des agences gouvernementales envers les voies d'administrations muqueuses. Pour cette raison, et malgré une littérature abondante sur ce sujet, seuls 8 vaccins ont obtenu une autorisation de mise sur le marché pour l'humain dans le monde, contre la poliomyélite, la fièvre typhoïde, le choléra, le rotavirus, et la grippe (Tableau 1) (121).

Tableau 1: Liste des vaccins commercialisés pour l'Homme dans le monde, administrés par voie muqueuse (Adapté de Azegami et al., 2014 (121))

Nom	Cible	Voie d'administration	Composition
Nombreux	Poliovirus	Orale	<i>Poliovirus</i> vivant atténué
Vivotif ®	Salmonella Typhi	Orale	<i>S. Typhi</i> vivant atténué
Dukoral ®	V. cholerae	Orale	<i>V. cholerae</i> O1 tué + CTB
Shanchol ® & ORCVax ®		Orale	<i>V. cholerae</i> O1 et O139 tué
RotaTeq ®	Rotavirus	Orale	<i>Rotavirus</i> vivant recombinant
Rotarix ®		Orale	<i>Rotavirus</i> vivant atténué
FluMist Quadrivalent ®	Virus Influenza	Nasale	<i>Virus Influenza</i> recombinant vivant atténué
Nasovac®		Nasale	<i>Virus Influenza</i> vivant atténué

Les systèmes de délivrance nanoparticulaires offriraient la possibilité de remplacer les adjuvants utilisés jusqu'à ce jour, en limitant les risques d'effets secondaires.

### *Intérêt des NPs pour la voie muqueuse - Influence de la structure de la NPL sur la mucopénétration*

A la surface des muqueuses, l'hydrogel de mucus est la première barrière empêchant les éléments exogènes d'atteindre les cellules épithéliales, et de pénétrer plus profondément dans l'organisme. De par ses caractéristiques physico-chimiques et sa composition protéique, il est en effet capable de repousser ou de piéger les particules et micro-organismes, qui seront ensuite éliminés par les enzymes présentes localement, et par la clairance mucociliaire (124). Ainsi, lors de l'administration de vaccins par voie muqueuse (nasale et orale principalement), les antigènes sont eux-aussi retenus dans les couches superficielles du mucus, avant de pouvoir atteindre les cellules du MALT responsables de l'activation de l'immunité innée et adaptative (365). Leur association à des systèmes de délivrance doit donc permettre de contourner ce premier système de défense.

Les premières particules étudiées pour améliorer la délivrance mucosale d'antigènes furent les particules mucoadhérentes (MAP). Celles-ci peuvent se lier au mucus par des liaisons hydrogènes, électrostatiques, ou hydrophobes, avec les mucines, par enchevêtrement dans les mailles du gel, ou par rétention stérique dans les pores formés par les réseaux protéiques (267). En se liant fortement au mucus, elles augmentent le temps de résidence mucosal de l'antigène qu'elles encapsulent. En revanche, elles ne délivrent pas l'antigène directement dans les cellules du MALT, et le temps de

résidence est directement dépendant de la clairance mucociliaire, et par conséquent, dépendant de la voie d'administration (417).

Ces MAP sont les plus étudiées dans la délivrance mucosale d'antigènes, car leur synthèse est simple et reproductible. En effet, elles peuvent être développées à partir de particules polymériques, comme lipidiques. Les charges cationiques peuvent être apportées par des polysaccharides (ex: le chitosan...) ou des lipides (ex : DPPE...), et les liaisons hydrogènes peuvent être favorisées par divers polymères naturels ou synthétiques (alginate, cellulose...) (418). De plus, il n'est pas nécessaire d'avoir des particules de taille nanoparticulaire pour adhérer fortement au mucus : l'utilisation de microparticules mucoadhérentes a en effet montré à plusieurs reprises une efficacité d'immunisation comparable aux nanoparticules, par voie orale comme nasale (419,420). Leur synthèse et leur caractérisation sont plus simples que pour les NPs, et le risque de passage vers le cerveau après administration nasale est limité, c'est pourquoi elles sont encore aujourd'hui étudiées dans la délivrance muqueuse de vaccins.

Les particules mucopénétrantes (MPP) ont été étudiées plus récemment pour améliorer la biodisponibilité muqueuse des antigènes. Cette mucopénétration est réalisée par des particules évitant toute liaison avec les mucines, et toute interaction stérique avec les mailles et pores du gel (267). Théoriquement, la surface des particules se doit donc d'être électriquement neutre et hydrophile, et leur diamètre doit être inférieur à celui des pores du mucus (<200nm en moyenne). Grâce à leur capacité à pénétrer profondément le mucus, elles délivreraient les antigènes au plus près des cellules du MALT, et augmenteraient donc leur temps de résidence, et ce indépendamment de la

clairance mucociliaire, contrairement aux MAP. Cette hypothèse a été vérifiée lors d'essais d'immunisation, notamment par voie nasale avec des particules de PLA, recouvertes de PEG, montrant une meilleure biodisponibilité et une sécrétion d'IgA plus importante que les particules nues (305).

En revanche la synthèse de particules pénétrantes est plus contraignante. Le recouvrement de surface par un polymère neutre et hydrophile doit être maîtrisé, et stable dans le temps, ce qui est aujourd'hui encore complexe à atteindre. De plus, l'influence du diamètre des particules sur l'efficacité de la mucopénétration est aujourd'hui encore discutée. En effet, si des particules ayant une surface neutre et hydrophile, et une taille inférieure à 100nm seront efficacement pénétrantes, en évitant à la fois les interactions électrostatiques et stériques avec le mucus, des résultats contradictoires ont été obtenus sur des particules de diamètres supérieurs. Dans du mucus de côlon, des particules de diamètre inférieur ou égal à 100nm diffusaient librement, contrairement à celle de 200nm et 500nm (421). Au contraire, la diffusion de particules de 200nm et 500nm s'est révélée être plus importante que celle de 100nm dans du mucus vaginal humain (296). Enfin, des particules de 500nm ont été fortement ralenties par du mucus gastro-intestinal, contrairement à des particules de 100nm et 200nm (421). Dans la délivrance muqueuse de vaccins, des particules recouvertes de PEG de 200nm et de 1.5 $\mu$ m ont été administrées par voie nasale, avec *in fine* une réponse immunitaire similaire, chez la souris. L'influence du diamètre des MPP semble ainsi devoir être évaluée pour chaque type de particule ainsi que pour chaque source de mucus. Ces résultats contradictoires peuvent par ailleurs être liés à la difficulté d'obtention et de caractérisation de ces NPs, ainsi que leur stabilité.

Par ailleurs, le PEG reste aujourd'hui le polymère le plus utilisé dans le recouvrement de particules. Il peut en effet se greffer autour de particules métalliques, lipidiques et

polymériques, et diminuer de manière importante les interactions avec les mucines (422). En revanche la génération d'anticorps anti-PEG au niveau des muqueuses limite son utilisation répétée. De plus, il réduit grandement la prise en charge par les cellules épithéliales et immunitaires, en diminuant les interactions électrostatiques et hydrophobes avec les membranes plasmiques (423). Des stratégies parallèles sont aujourd'hui étudiées, comme l'utilisation de polymères alternatifs (polyoxazoline, polydopamine...) ou le développement de particules zwitterioniques, dont la surface mimant celle des virus est globalement neutre (310,311,316).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié les interactions entre une nanoparticule de maltodextrine lipidée (NPL) et le mucus des voies aériennes. La NPL est en effet utilisée dans le cadre de délivrance d'antigènes par voie nasale, et des études de biodistribution ont révélé qu'elle franchissait le mucus jusqu'aux cellules épithéliales sous-jacentes, améliorant ainsi fortement son temps de résidence (Figure 31) (258). La NPL étant une nanoparticule cationique et de diamètre inférieur à 100nm, nous avons étudié les mécanismes lui permettant de franchir le mucus.

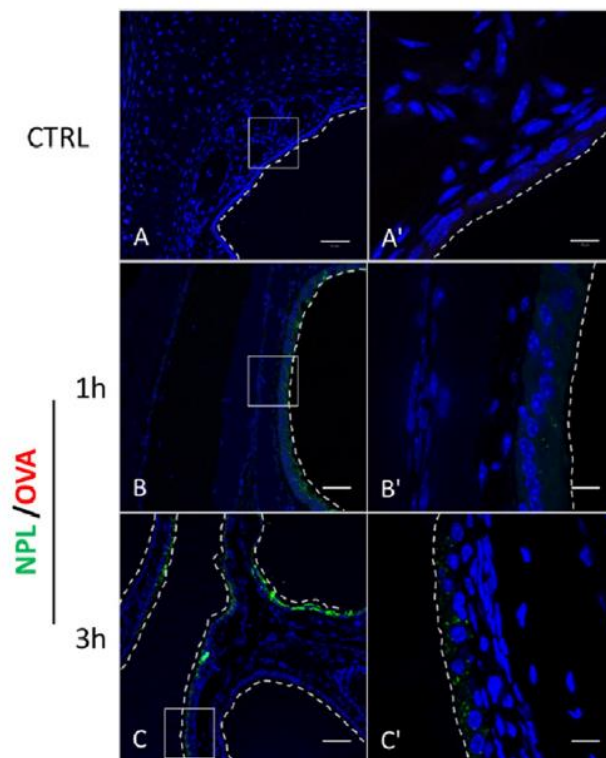


Figure 31 : Etude de biodistribution des NPL au niveau de la muqueuse nasale de souris, au cours du temps.

Trois heures après instillation nasale, les NPL (en vert) se retrouvent sous la couche de mucus (ligne pointillée) et au contact direct des cellules épithéliales (noyaux en bleu). Echelle : 50  $\mu\text{m}$  (A-C) et 10  $\mu\text{m}$  (A'-C'). Adapté de Bernocchi et al. (258)

Ainsi, en comparaison avec des MAP (des PLGA recouvertes de chitosan (ou **PLGA-CS**)) et des MPP (des PLGA recouvertes de PEG (ou **PLGA-PEG**)) de même diamètre, nous avons démontré, dans du mucus des voies respiratoires reconstitué, que la NPL était effectivement capable de se déplacer dans le mucus. Au contraire, les particules de PLGA-CS sont restées immobiles, confirmant leur forte mucoadhérence. En revanche, les particules de PLGA-PEG se sont montrées significativement plus diffusives que les NPL. Ces résultats suggèrent que, malgré leur diffusion, les NPL se déplaçaient plus lentement que des particules recouvertes de PEG, probablement dû à leur surface cationique. En comparaison avec des particules de maltodextrine non



lipidées (NP<sup>+</sup>), les NPL diffusaient significativement plus vite malgré un diamètre similaire, suggérant une importance du cœur de phospholipides anioniques sur l'échappement aux mucines. Il est à noter que ces résultats ont été obtenus sur du mucus reconstitué, dont les mucines ne peuvent pas former d'importantes mailles et qui ne possèdent donc pas la viscosité d'un vrai mucus. Une alternative permettant d'avoir des conditions plus proches du vivant serait d'utiliser du mucus fraîchement prélevé sur de la trachée de mammifères (souris, porc, humain...). La culture *in vitro* de cellules des voies respiratoires et productrices de mucus (ex : les Calu-3 pulmonaires) eut été une autre méthode (424). Dans la suite de notre étude, nous avons choisi des cellules H292-NCI sécrétrices de mucines, dans le milieu desquelles nous avons rajouté des mucines purifiées, pour simuler la couche de mucus. En présence de ces mucines, l'endocytose des NPL et la délivrance intracellulaire d'antigènes n'ont pas été diminuées, contrairement à celle des PLGA-CS mucoadhérentes, confirmant les résultats précédemment obtenus. Les NP<sup>+</sup> ont quant à elles été significativement retenues par les mucines, confirmant l'importance du cœur de phospholipides sur la mucopénétration. Ce cœur lipidique permettrait en effet, par répulsion électrostatique avec les mucines anioniques, de diminuer l'interaction avec les mucines. Cela suggère par ailleurs que ces phospholipides seraient susceptibles d'interagir avec l'environnement voisin de la NPL, et donc qu'ils seraient proche de la surface de la particule. Ainsi, les charges anioniques repousseraient les mucines, tandis que les charges cationiques permettraient d'interagir avec les membranes des cellules sous-jacentes. Ce mécanisme se rapproche de celui des virus et des particules zwitterioniques (Figure 32). En parallèle, la présence de ces lipides empêcherait, par interactions stériques, l'enchevêtrement des fibres de mucines dans le squelette poreux

de maltodextrine. Ce nouveau mécanisme pourrait en outre améliorer la mucopénétration d'autres NPs poreuses (ex : les particules mésoporeuses de silice...).

Si le cœur de DPPG joue un rôle important dans la cinétique d'endocytose de la NPL, ainsi que dans la délivrance cytoplasmique des protéines encapsulées (256), notre étude démontre qu'il joue aussi un rôle dans la pénétration du mucus. Son impact dans l'amélioration de la biodisponibilité muqueuse des antigènes, et donc dans l'efficacité vaccinale, est ainsi multiple. Cette étude confirme que la structure intrinsèque de la NPL, et les éléments qui la composent, sont des paramètres devant être précisément maîtrisés.

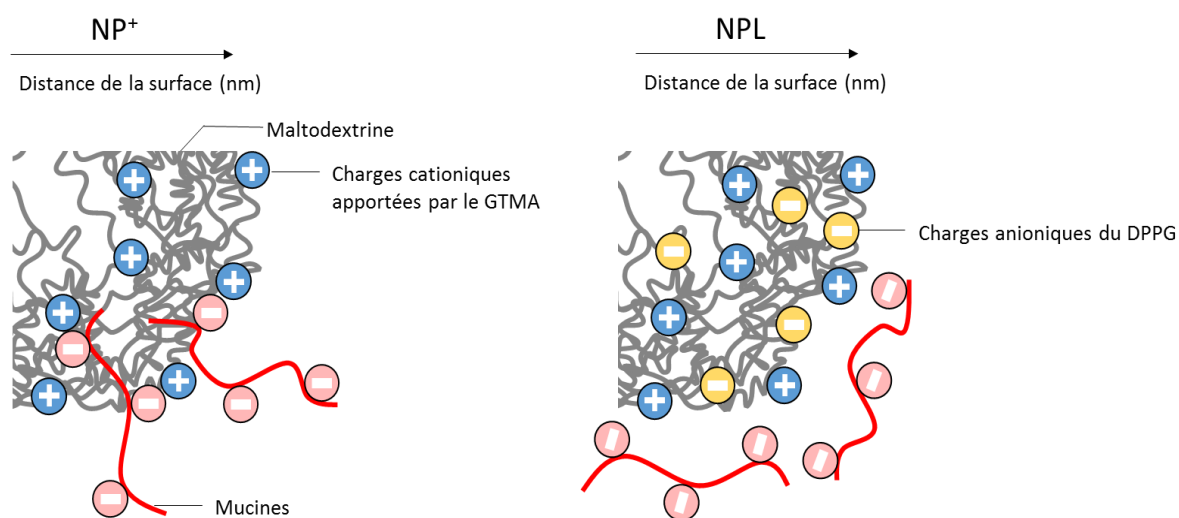


Figure 32: Représentation schématique des interactions entre les mucines anioniques et les particules de maltodextrine, sans ( $NP^+$ ) et avec (NPL) un cœur de phospholipides anioniques (DPPG). La présence de DPPG dans la particule induit des répulsions électrostatiques et stériques vis-à-vis des mucines, améliorant par conséquent la diffusion dans le mucus.

D'autres modifications structurales pourraient être apportées à la NPL pour améliorer significativement sa mucopénétration : (i) Le recouvrement d'un polymère hydrophile et neutre en surface de la particule permettrait de diminuer l'interaction avec les

mucines. Ce recouvrement pourrait se faire par lipitation de la particule avec un phospholipide PEGylé (ex : DSPE-PEG...), ou bien par association électrostatique de polymères neutres fonctionnalisés (ex : PEG-COOH...) sur les charges cationiques (Figure 33 A et B) ; (ii) Le greffage covalent, en plus des charges cationiques apportées par le GTMA, de charge anioniques, par un agent anionisant (ex : du trichlorure de phosphoryle) offrirait à la NPL une surface zwitterionique, globalement neutre, susceptibles de traverser plus efficacement le mucus (Figure 33C). Ces différentes modifications pourraient en revanche modifier la capacité de la particule à associer des antigènes, à être capté par les cellules ou à échapper au système endolysosomal. Il s'agirait de trouver la balance optimisant l'ensemble de ces caractéristiques.

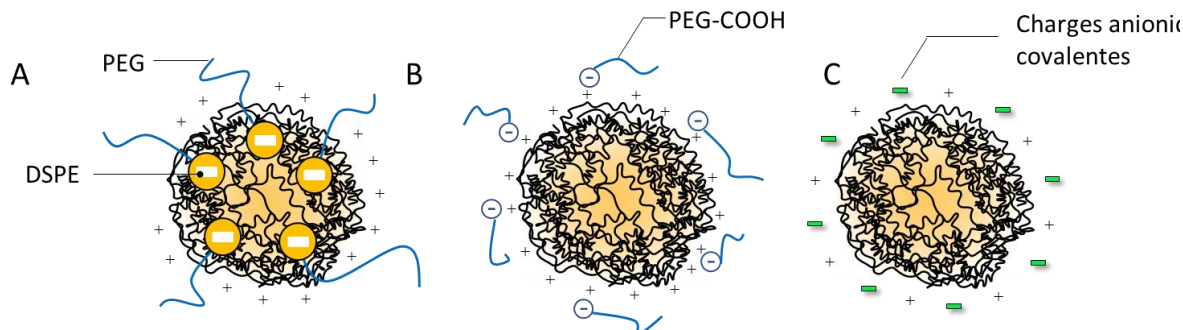


Figure 33: Représentation schématique des modifications pouvant être apportées à la NPL pour améliorer sa mucopénétration. A : L'ajout d'un cœur de phospholipides anioniques PEGylés, ici le distéaryl-phosphatidylethanolamine (DSPE-PEG) recouvrirait le vecteur de PEG. B : l'ajout de chaînes de PEG fonctionnalisées avec un groupement anionique, ici des fonctions carboxyliques COOH, recouvrirait le vecteur de PEG, par liaisons électrostatiques avec les charges cationiques déjà présentes en surface. C : En plus de l'agent cationisant GTMA, l'ajout in process d'un agent anionisant (ex : du trichlorure de phosphoryle) apporterait à la particule des charges anioniques. La surface de la NPL serait alors densément chargée en surface, avec autant de charges anioniques que cationiques. La particule serait donc zwitterionique, et globalement neutre.

Le développement de particules mucopénétrantes est une nécessité pour les mucus épais et visqueux, comme ceux de l'intestin (100µm à 500µm d'épaisseur) ou du côlon (800 µm) (126,263). Le mucus des voies aériennes possède en revanche une épaisseur (environ 15µm) et une viscosité, plus faibles. Bien qu'il soit à même de bloquer les particules mucoadhérentes, il serait ainsi plus facile pour des particules faiblement pénétrantes, comme la NPL, de le traverser et d'atteindre les cellules sous-jacentes (Figure 34).

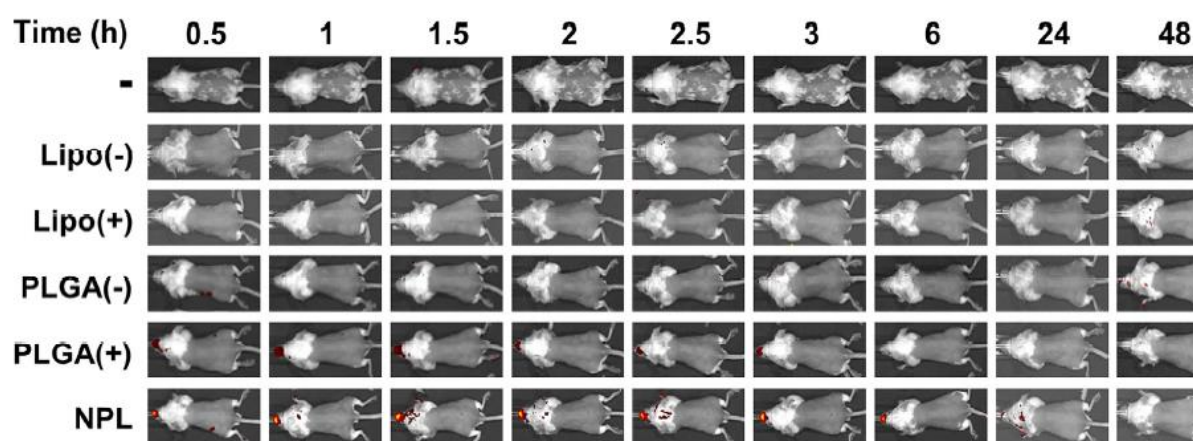


Figure 34: Etude du temps de résidence de différentes NPs, lipidiques et polymériques, anioniques et cationiques, dans la muqueuse nasale de souris (de Le et al (18)). Les NPL ont un temps de résidence nasal de 24h, supérieur à celui des PLGA et liposomes recouvertes de chitosan (PLGA(+)) et Lipo(+)) respectivement), décrites comme mucoadhérentes, et ne restant pas plus de 3h dans la muqueuse.

*Influence de la structure de la NPL sur la délivrance et l'immunogénicité d'extraits totaux bactériens*

Au-delà de la protection vis-à-vis de la protéolyse, de la pénétration du mucus et *in fine* de l'amélioration de la biodisponibilité muqueuse, l'association d'antigènes vaccinaux à des NPs permet d'améliorer leur immunogénicité grâce à de meilleures interactions avec les cellules épithéliales et les CPA (393). Les nanovecteurs améliorent en effet la délivrance intracellulaire des antigènes, permettant une prise en charge et une réponse immunitaire induite plus importante. Le devenir intracellulaire de l'antigène peut influencer sur le type de la réponse immunitaire induite (Th1, Th2 ou Th17), selon l'antigène et selon le récepteur susceptible de reconnaître le motif antigénique. Par exemple, une délivrance et une dégradation lysosomale des antigènes induira une présentation par le CMHII des CPA, favorisant la réponse CD4<sup>+</sup>, alors qu'une délivrance cytoplasmique induira préférentiellement une présentation croisée par le CMHI, activant les CD8<sup>+</sup> et la réponse cellulaire (324).

De nombreuses études comparent l'influence des paramètres structuraux sur l'efficacité vaccinale du vecteur. Une modification de la taille, de la forme, de la charge de surface, de la rigidité, ou encore du type d'association de l'antigène (en surface ou interne au vecteur) peuvent par exemple faire varier la réponse induite (394). Par exemple, il est aujourd'hui admis que des particules de taille inférieure à 100nm et porteuses de charges cationiques sont plus efficacement captées par les cellules, grâce notamment à une meilleure interaction avec les glycosaminoglycanes sulfatés membranaires, mais que les cellules phagocytaires reconnaissent aisément les particules ovoïdes de plus de 500nm, de par leur ressemblance aux bactéries. En

revanche, peu d'études ont à ce jour déterminé l'influence de la densité de vecteur sur l'efficacité vaccinale. Les travaux réalisés sur l'endocytose de nanovecteurs de différentes rigidités montraient que l'invagination membranaire s'effectue plus rapidement pour les vecteurs denses, et que les particules plus élastiques s'étalent sur la surface des membranes, se liant à plusieurs récepteurs (85). L'effet sur l'immunogénicité n'a été principalement étudié que sur des vecteurs liposomaux de compositions lipidiques différentes (394).

La NPL est une particule synthétisée à partir de maltodextrine de maïs, réticulée de façon covalente avec de l'épichlorhydrine (256). Sa structure est densifiée, et de forme circulaire, ce qui lui permet d'être captée rapidement par les cellules épithéliales et immunitaires, et d'être utilisée comme système de délivrance d'antigènes par voie nasale (9,259). Afin d'étudier l'influence de sa rigidité sur son efficacité vaccinale, nous avons synthétisé une NP similaire, avec une densité plus faible, grâce à de la maltodextrine non réticulée. En effet, en solution aqueuse, les chaînes de maltodextrine s'associent naturellement par des liaisons hydrogènes et hydrophobes, formant des microparticules de tailles variables, entre 1 $\mu$ m et 100 $\mu$ m de diamètre, selon la source d'amidon et la longueur de la chaîne de maltodextrine (aussi appelé Dextrose Equivalent, DE) (249,406).

Dans notre étude, la densité des particules a été mesurée par pycnométrie en phase liquide. Cette méthode, couramment utilisée pour étudier la masse volumique de polymères, compare le poids d'un élément sous la forme sèche et solubilisée dans un solvant de volume connu (425). Nos particules de maltodextrine pouvant être lyophilisées avant l'étape de lipidation avec des phospholipides, les mesures de

pycnométrie ont été effectuées à cette étape, et sur 3 lots de synthèse différents. Ainsi, la masse volumique des particules réticulées non lipidées ( $NP^+$ ,  $\rho=1.323 \text{ g/cm}^3$ ) était significativement plus élevée que celle des non réticulées ( $NP^+ \cdot NR$ ,  $\rho=1.209 \text{ g/cm}^3$ ), confirmant notre hypothèse. A notre connaissance, seule la densité de microparticules de maltodextrine non réticulées ont été mesurées : pour des chaînes d'une longueur proche de la maltodextrine que nous avons utilisée ( $DE = 6$ ), la littérature rapporte des masses volumiques de  $1.35 \text{ g/cm}^3$ , proche de nos valeurs (426). De plus, à titre de comparaison, des travaux rapportent pour des liposomes une densité proche de  $1 \text{ g/cm}^3$ , pour des NPs de polystyrène une valeur de  $1.050 \text{ g/cm}^3$ , pour NPs de PLGA une valeur de  $1.3 \text{ g/cm}^3$  et pour des NPs poreuses de silice une valeur proche de  $2 \text{ g/cm}^3$  (427–429). D'autres techniques plus couramment utilisées pour mesurer la masse volumique de NPs, comme par exemple la pycnométrie en phase gazeuse, permettraient de confirmer nos valeurs (430). En parallèle, l'évaluation de l'élasticité des deux particules (par exemple par mesure du module de Young, par microscopie en force atomique) corroborerait ces résultats (431). Enfin, des observations en microscopie électroniques donneraient des informations quant à la forme de ces particules non réticulées, pour compléter la caractérisation.

Les particules utilisées dans notre étude, les NPL et NPL·NR, possèdent un cœur de DPPG anionique. La caractérisation effectuée sur les particules avant et après lipidation ne montrent pas de variation significative ni de taille, ni de charge de surface, indiquant que, malgré une densité plus faible, les DPPG accédaient bien à l'intérieur de la particule non réticulée, comme décrit pour les NPL. Les deux particules possédaient donc une composition, taille et charge de surface semblable, permettant leur comparaison.

En incubant des quantités croissantes de BSA avec chaque particule, nous avons observé que la NPL·NR pouvait associer plus de protéines que la NPL. En absence de réticulation, la NPL·NR aurait des pores plus larges que la NPL, et une densité de chaîne de maltodextrine plus faible dans sa structure, limitant la saturation stérique au sein de sa structure. En revanche, ces protéines demeureraient accessibles en surface de la particule non réticulée, contrairement à la NPL qui les encapsulait. La diminution de densité influe donc sur la manière d'associer les antigènes, et par conséquent sur leur protection vis-à-vis de la protéolyse. En effet, en présence de trypsine, les NPL protégeaient plus efficacement la BSA de la dégradation que les NPL·NR.

Si une encapsulation permet de délivrer les antigènes à l'intérieur des cellules immunitaires, une association en surface peut améliorer la reconnaissance antigénique, en augmentant la reconnaissance directement par les récepteurs en surface des cellules (Figure 35). Ce phénomène a été décrit avec des particules de PEI/Phosphate de calcium, en surface desquels de la BSA et du lysozyme ont été associés, améliorant leur reconnaissance vis-à-vis de lymphocytes B (338).

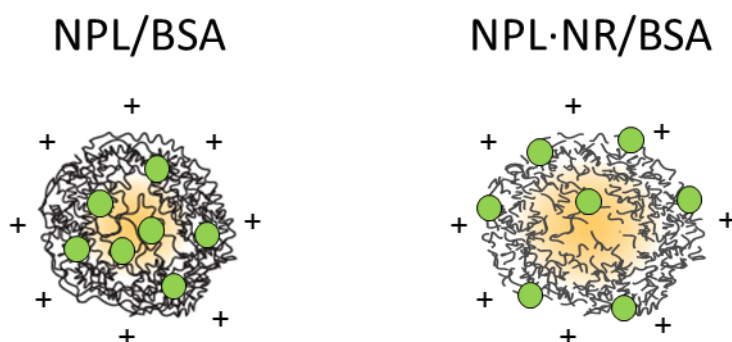


Figure 35: Représentation schématique de l'association de BSA avec des NPL (à gauche) ou des NPL·NR (à droite). Les antigènes sont encapsulés dans la structure de la NPL, alors qu'ils sont présent en surface de la NPL·NR. Le type de présentation aux cellules immunitaires est donc modifié en fonction de la densité de la maltodextrine.



L'endocytose des deux vecteurs a ensuite été étudiée sur des lignées humaines immortalisées de cellules épithéliales respiratoires (H292-NCI) et immunitaires (THP-1, dérivées en macrophages, et en cellules dendritiques naïves), mimant les interactions avec le MALT lors d'une administration nasale. Nous avons observé, pour ces 3 lignées, que chaque particule était captée rapidement. En revanche, la NPL était captée plus rapidement que la NPL·NR, confirmant ainsi que les particules denses de diamètre inférieur à 100 nm sont plus facilement endocytées par les cellules. Enfin, en présence de mucines, l'endocytose des NPL par les cellules épithéliales n'étaient pas perturbée, contrairement aux NPL·NR dont la captation fut réduite de 30 %. De par leur plus faible densité, elles seraient plus susceptibles de s'associer aux mucines, probablement à cause d'une plus grande porosité, favorisant l'enchevêtrement des fibres de mucines dans les particules.

Nous avons choisi un extrait total bactérien provenant d'une souche d'*E.coli* comme antigène complexe témoin, pour étudier la capacité des deux vecteurs à délivrer les antigènes et à améliorer leur immunogénicité. Nous avons observé une association aux cellules plus importante par les NPL que par les NPL·NR, dans les 3 types cellulaires. L'ajout de bleu Trypan pour quencher la fluorescence membranaire a montré que les antigènes étaient délivrés de manière plus importante dans les cellules épithéliales et immunitaires par la NPL, confirmant les résultats précédents.

Finalement, nous avons évalué la qualité de la présentation antigénique sur la réponse immunitaire induite par les cellules épithéliales et immunitaires, en incubant l'extrait

total d'*E.coli*, seul ou associé aux 2 particules, avec les cellules en culture, et en mesurant la sécrétion de différents marqueurs pro-inflammatoires.

Les cellules épithéliales des voies respiratoires étant en première ligne lors d'une infection muqueuse, elles ont la capacité de sécréter des cytokines et chémokines pro-inflammatoires. Parmi les chémokines, les CCL20 et CCL28 sont connues pour induire respectivement le recrutement de cellules dendritiques naïves et de lymphocytes B sécréteurs d'IgA (407,432). Dans notre étude, nous avons observé que les formulations stimulaient plus efficacement la sécrétion de CCL20 par les H292 que l'extrait total seul. En revanche seule une faible sécrétion de CCL28 a été mesurée. La délivrance de cet ET favoriserait donc le recrutement de cellules dendritiques plutôt que de lymphocytes. Nous avons enfin observé que les particules vides stimulaient sensiblement la sécrétion de CCL20, suggérant que leur endocytose constitue un signal de danger pour les cellules épithéliales.

Les CPA sécrètent quant à elles des cytokines pro-inflammatoires, ainsi que des protéines membranaires de co-stimulation, influençant la voie de différenciation des lymphocytes auxquels ils présenteront l'antigène. Nous avons ainsi mesuré que l'ET formulé dans les NPL et NPL-NR induisait une sécrétion d'IL-1 $\beta$  5 fois supérieure à l'ET seul, dans les macrophages comme dans les cellules dendritiques. En revanche, seules les formulations réalisées avec la NPL stimulaient la sécrétion d'IL-12p40 dans les deux types cellulaires. Les particules vides n'induisaient par ailleurs aucune stimulation. Ces résultats confirment donc l'importance de la densité sur l'efficacité de la présentation des antigènes. En délivrant plus efficacement l'extrait total, les NPL favorisaient une voie Th1/Th17 par la sécrétion d'IL-12. La mesure de l'expression des protéines de costimulation CD80, CD86, et des CMH affinerait cette évaluation.

Ces travaux *in vitro* nous ont permis de démontrer que la délivrance d'antigènes par des vecteurs non immunogènes amélioreraient l'induction de la réponse immunitaire, et de confirmer l'influence de la densité de vecteurs sur le devenir des antigènes encapsulés. Des travaux *in vivo* plus poussés apporteraient des réponses plus précises quant à l'importance de ce paramètre, comme par exemple, des images d'immunohistochimie des chémokines CCL20 et CCL28, après instillation nasale des formulations NP/ET (Figure 36) (433). Des essais vaccinaux, avec analyse des IgG sériques, des sécrétions d'IgA dans les voies respiratoires, et de la mesure des cytokines après re-stimulation des ganglions lymphatiques et des splénocytes, statueraient quant à l'efficacité concrète de ces deux vecteurs de densités différentes dans l'élaboration de vaccins.

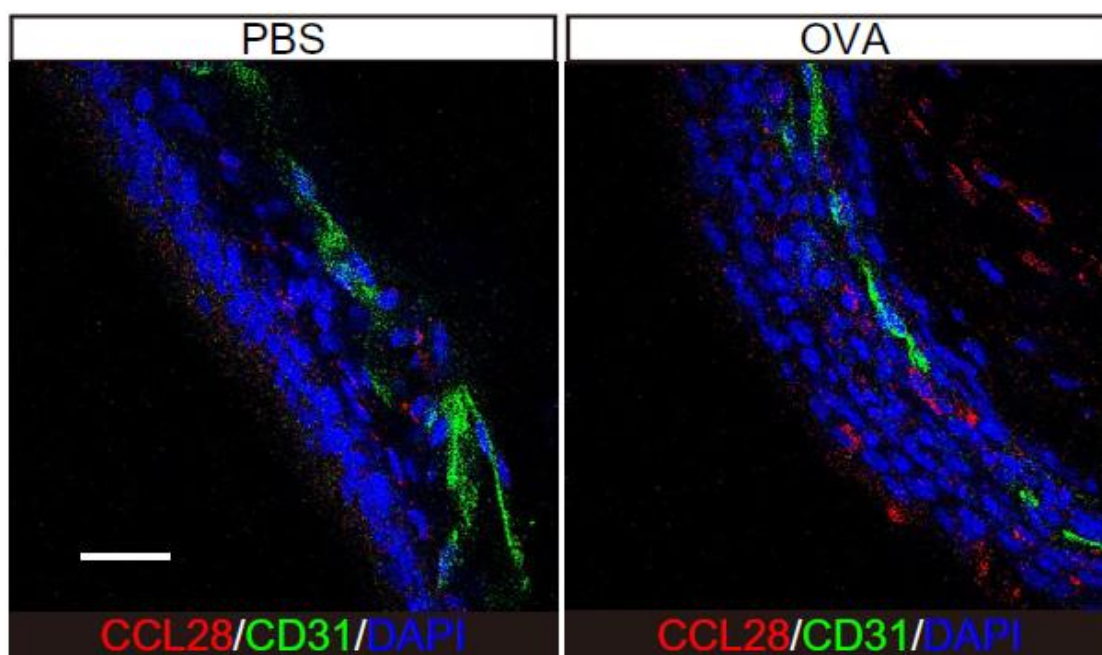


Figure 36 : Images d'immunofluorescence de tissus nasal de souris après administration de PBS (à gauche) ou d'ovalbumine (à droite). Les CCL28 ont été marqués en rouge et les noyaux en bleu. L'instillation d'ovalbumine a induit une sécrétion de CCL28 dans l'épithélium, échelle : 20  $\mu$ m. Adapté de Nagakubo et al., 2016 (433).

Au-delà de l'efficacité vaccinale, le développement industriel de systèmes de délivrance vaccinaux doit répondre à des exigences supplémentaires : la fabrication à grande échelle, la capacité à associer quantitativement les antigènes et la stabilité colloïdale des formulations vis-à-vis de températures élevées sont aujourd'hui considérés comme les facteurs principalement recherchés. Si de prometteuses avancées ont été réalisées ces dernières années, avec notamment le développement de VLP pour de nombreux essais vaccinaux (avec 50 essais cliniques de phase III et IV ces 20 dernières années, dont aucun par voie muqueuse), l'utilisation de nanovecteurs vaccinaux est encore limitée, car les industries peinent à répondre à ce cahier des charges.

La synthèse des VLP, par exemple, fait appel aux technologies de cellules recombinantes. La mise en place à l'échelle industrielle de ces techniques nécessite des investissements conséquents, et ne peut donc être réalisées que par des groupes importants pouvant assumer ces dépenses. A l'inverse, la synthèse de vecteurs lipidiques ou polymériques se fait majoritairement par des processus de chimie organique ou inorganique, et, malgré certaines limites apportées notamment par l'utilisation de solvants souvent toxiques, leur développement à grande échelle est plus simple à mettre en œuvre.

De même, les liposomes, virosomes et émulsions lipidiques sont, de part leur composition, très instables aux variations de température. Cela limite leur transport dans vers les zones de fortes chaleurs comme les pays de l'hémisphère Sud, pays où les besoins en vaccins sont les plus nécessaires. Là encore, les vecteurs polymériques possèdent un avantage car les écarts de températures influent peu sur leur stabilité. La

réalité du marché pharmaceutique veut que la fabrication d'un vaccin, comme pour tout médicament, doit permettre à son fabricant un retour sur investissement, souvent réalisé plusieurs décennies en amont. La perspective de limiter son utilisation à une zone géographique restreinte peut donc malheureusement freiner le développement de ces technologies, malgré les améliorations potentielles qu'elles apporteraient.

Les vecteurs polymériques ont donc un avantage pratique par rapport aux autres NPs. Ces systèmes de délivrance ont fait l'objet de très nombreuses publications pour des immunisations par voie mucosale, avec une efficacité relative sur les modèles étudiés. Paradoxalement, leur utilisation chez l'homme, sans adjuvant, peine à générer des résultats concurrençant l'utilisation d'immunostimulateurs. Pour cette raison, l'utilisation d'adjuvant, principalement les saponines, le CpG ou le MPL, reste privilégiée.

**PARTIE IV : CONCLUSION**

L'utilisation des NPs pour des applications biomédicales offre de nombreuses opportunités pour répondre aux limites actuellement rencontrées, tant dans l'amélioration de l'efficacité des médicaments, que dans la diminution de leurs effets secondaires. Dans le domaine vaccinal, les NPs favorisent ainsi la stabilité des antigènes vis-à-vis de l'hydrolyse, améliorent leur délivrance aux cellules présentatrices d'antigènes, et participent à l'élaboration d'une réponse immunitaire plus importante. Par voie muqueuse, ces vecteurs permettent de plus d'améliorer la biodistribution des antigènes, pour atteindre les cellules du MALT.

Les antigènes peuvent s'associer à différents types de vecteurs nanoparticulaires. Ces derniers ont des structures physico-chimiques variables, selon leur composition et processus de synthèse. On distingue alors les systèmes de délivrance purs, et les vecteurs immunomodulateurs, et leurs caractéristiques (taille, charge de surface, composition, densité...) sont autant d'éléments à maîtriser pour optimiser leur efficacité dans la conception d'un vaccin.

Au cours de cette thèse, nous avons évalué la capacité d'une nanoparticule de maltodextrine cationique et lipidée (NPL) à délivrer des antigènes dans les cellules des muqueuses nasales. Nous avons établi que le cœur de phospholipides anioniques jouait un rôle important dans la pénétration du mucus, pour délivrer les antigènes dans les cellules épithéliales sous-jacentes. Nous avons de plus démontré que la NPL est un système de délivrance pur, non immunomodulateur, et que la réticulation de la maltodextrine favorisait la protection et la délivrance d'extrait totaux, menant à une stimulation accrue des cellules immunitaires. Ce vecteur universel d'antigène offre ainsi l'opportunité de vacciner par voie nasale contre un grand nombre d'infections.

Si aujourd'hui peu de vaccins sont administrés par voie muqueuse, le développement d'adjuvants stables, efficaces et non toxiques comme les systèmes de délivrance nanoparticulaires contribue à l'émergence de ces vaccins de nouvelle génération.



# Bibliographie

1. Dick K, Dhanasekaran T, Zhang Z, Meisel D. Size-Dependent Melting of Silica-Encapsulated Gold Nanoparticles. *J Am Chem Soc.* mars 2002;124(10):2312-7.
2. Lacerda L, Bianco A, Prato M, Kostarelos K. Carbon nanotubes as nanomedicines: from toxicology to pharmacology. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 déc 2006;58(14):1460-70.
3. Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science.* 25 sept 1998;281(5385):2013-6.
4. Barenholz Y (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J Controlled Release.* juin 2012;160(2):117-34.
5. Farjadian F, Ghasemi A, Gohari O, Roointan A, Karimi M, Hamblin MR. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. *Nanomed.* janv 2019;14(1):93-126.
6. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on *in vivo* pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomed.* mars 2016;11(6):673-92.
7. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* août 1965;13(1):238-52.
8. Bernasconi V, Norling K, Bally M, Höök F, Lycke NY. Mucosal Vaccine Development Based on Liposome Technology. *J Immunol Res.* 2016;2016:1-16.
9. Lê MQ, Carpentier R, Lantier I, Ducournau C, Fasquelle F, Dimier-Poisson I, et al. Protein delivery by porous cationic maltodextrin-based nanoparticles into nasal mucosal cells: Comparison with cationic or anionic nanoparticles. *Int J Pharm X.* déc 2019;1:100001.
10. Milla P, Dosio F, Cattell L. PEGylation of Proteins and Liposomes: a Powerful and Flexible Strategy to Improve the Drug Delivery. *Curr Drug Metab.* 1 janv 2012;13(1):105-19.
11. Choi YH, Han H-K. Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics. *J Pharm Investig.* janv 2018;48(1):43-60.
12. Hanafy N, El-Kemary M, Leporatti S. Micelles Structure Development as a Strategy to Improve Smart Cancer Therapy. *Cancers.* 20 juill 2018;10(7):238.
13. Kopeckova K, Eckschlager T, Sirc J, Hobzova R, Plch J, Hrabeta J, et al. Nanodrugs used in cancer therapy. *Biomed Pap.* 25 juin 2019;163(2):122-31.
14. Merkel OM, Kissel T. Quo vadis polyplex? *J Controlled Release.* sept 2014;190:415-23.
15. Li Q, Cai T, Huang Y, Xia X, Cole S, Cai Y. A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. *Nanomaterials.* 27 mai 2017;7(6):122.
16. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers.* 26 août 2011;3(3):1377-97.

17. Zeng Z. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int J Nanomedicine*. avr 2011;765.
18. Le MQ, Carpentier R, Lantier I, Ducournau C, Dimier-Poisson I, Betbeder D. Residence time and uptake of porous and cationic maltodextrin-based nanoparticles in the nasal mucosa: Comparison with anionic and cationic nanoparticles. *Int J Pharm*. oct 2018;550(1-2):316-24.
19. DeFrates K, Markiewicz T, Gallo P, Rack A, Weyhmler A, Jarmusik B, et al. Protein Polymer-Based Nanoparticles: Fabrication and Medical Applications. *Int J Mol Sci*. 9 juin 2018;19(6):1717.
20. Gradishar WJ. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother*. juin 2006;7(8):1041-53.
21. Wang Y, Gao S, Ye W-H, Yoon HS, Yang Y-Y. Co-delivery of drugs and DNA from cationic core-shell nanoparticles self-assembled from a biodegradable copolymer. *Nat Mater*. oct 2006;5(10):791-6.
22. Tockary TA, Osada K, Chen Q, Machitani K, Dirisala A, Uchida S, et al. Tethered PEG Crowdedness Determining Shape and Blood Circulation Profile of Polyplex Micelle Gene Carriers. *Macromolecules*. 27 août 2013;46(16):6585-92.
23. Duro-Castano A, Conejos-Sánchez I, Vicent M. Peptide-Based Polymer Therapeutics. *Polymers*. 21 févr 2014;6(2):515-51.
24. Quader S, Kataoka K. Nanomaterial-Enabled Cancer Therapy. *Mol Ther*. juill 2017;25(7):1501-13.
25. Nelson CE, Kintzing JR, Hanna A, Shannon JM, Gupta MK, Duvall CL. Balancing Cationic and Hydrophobic Content of PEGylated siRNA Polyplexes Enhances Endosome Escape, Stability, Blood Circulation Time, and Bioactivity *in Vivo*. *ACS Nano*. 22 oct 2013;7(10):8870-80.
26. Kim Y, Park EJ, Na DH. Recent progress in dendrimer-based nanomedicine development. *Arch Pharm Res*. juin 2018;41(6):571-82.
27. Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today*. avr 2001;6(8):427-36.
28. Caminade A-M, Majoral J-P. Which Dendrimer to Attain the Desired Properties? Focus on Phosphorhydrazone Dendrimers. *Molecules*. 9 mars 2018;23(3):622.
29. Hsu H-J, Bugno J, Lee S, Hong S. Dendrimer-based nanocarriers: a versatile platform for drug delivery: Dendrimer-based nanocarriers. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. janv 2017;9(1):e1409.
30. Yan D, Wei Y-Q, Guo H-C, Sun S-Q. The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. *Appl Microbiol Biotechnol*. déc 2015;99(24):10415-32.
31. Zeltins A. Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Mol Biotechnol*. janv 2013;53(1):92-107.
32. Brune KD, Howarth M. New Routes and Opportunities for Modular Construction of Particulate Vaccines: Stick, Click, and Glue. *Front Immunol*. 26 juin 2018;9:1432.

33. Tsapis N. Agents de contraste pour l'imagerie médicale: Les exemples de l'IRM et de l'ultrasonographie. *médecine/sciences*. janv 2017;33(1):18-24.
34. Sharma H, Mishra PK, Talegaonkar S, Vaidya B. Metal nanoparticles: a theranostic nanotool against cancer. *Drug Discov Today*. sept 2015;20(9):1143-51.
35. Gautier J, Allard-Vannier E, Hervé-Aubert K, Soucé M, Chourpa I. Design strategies of hybrid metallic nanoparticles for theragnostic applications. *Nanotechnology*. 1 nov 2013;24(43):432002.
36. Jeon H, Kim J, Lee YM, Kim J, Choi HW, Lee J, et al. Poly-paclitaxel/cyclodextrin-SPION nano-assembly for magnetically guided drug delivery system. *J Controlled Release*. juin 2016;231:68-76.
37. Bruniaux J, Djemaa SB, Hervé-Aubert K, Marchais H, Chourpa I, David S. Stealth magnetic nanocarriers of siRNA as platform for breast cancer theranostics. *Int J Pharm*. nov 2017;532(2):660-8.
38. Hoang Thi TT, Cao VD, Nguyen TNQ, Hoang DT, Ngo VC, Nguyen DH. Functionalized mesoporous silica nanoparticles and biomedical applications. *Mater Sci Eng C*. juin 2019;99:631-56.
39. Shirshahi V, Soltani M. Solid silica nanoparticles: applications in molecular imaging: SOLID SILICA NPs IN MOLECULAR IMAGING. *Contrast Media Mol Imaging*. janv 2015;10(1):1-17.
40. Yazdimamaghani M, Moos PJ, Dobrovolskaia MA, Ghandehari H. Genotoxicity of amorphous silica nanoparticles: Status and prospects. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. févr 2019;16:106-25.
41. Wang Y, Zhao Q, Han N, Bai L, Li J, Liu J, et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. févr 2015;11(2):313-27.
42. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev*. 2009;38(6):1759.
43. Singh P, Pandit S, Mokkapati VRSS, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int J Mol Sci*. 6 juill 2018;19(7):1979.
44. Peltonen L, Strachan C. Understanding Critical Quality Attributes for Nanocrystals from Preparation to Delivery. *Molecules*. 12 déc 2015;20(12):22286-300.
45. Zhou Y, Du J, Wang L, Wang Y. Nanocrystals Technology for Improving Bioavailability of Poorly Soluble Drugs: A Mini-Review. *J Nanosci Nanotechnol*. 1 janv 2017;17(1):18-28.
46. Sarnes A, Kovalainen M, Häkkinen MR, Laaksonen T, Laru J, Kiesvaara J, et al. Nanocrystal-based per-oral itraconazole delivery: superior in vitro dissolution enhancement versus Sporanox® is not realized in in vivo drug absorption. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 28 avr 2014;180:109-16.
47. Müller R, Junghanns. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine*. oct 2008;295.

48. Haeri A, Osouli M, Bayat F, Alavi S, Dadashzadeh S. Nanomedicine approaches for sirolimus delivery: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 31 oct 2018;46(sup1):1-14.
49. Pleskova S, Mikheeva E, Gornostaeva E. Using of Quantum Dots in Biology and Medicine. In: Saquib Q, Faisal M, Al-Khedhairi AA, Alatar AA, éditeurs. *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cité 14 mars 2020]. p. 323-34. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1048). Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-72041-8\\_19](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-72041-8_19)
50. Matea C, Mocan T, Tabaran F, Pop T, Mosteanu O, Puia C, et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *Int J Nanomedicine.* juill 2017;Volume 12:5421-31.
51. Volkov Y. Quantum dots in nanomedicine: recent trends, advances and unresolved issues. *Biochem Biophys Res Commun.* déc 2015;468(3):419-27.
52. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of Endocytosis. *Annu Rev Biochem.* juin 2009;78(1):857-902.
53. Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mai 2018;19(5):313-26.
54. Tweten DJ, Bayly PV, Carlsson AE. Actin growth profile in clathrin-mediated endocytosis. *Phys Rev E.* 23 mai 2017;95(5):052414.
55. Benmerah A, Lamaze C. Clathrin-coated pits: vive la différence? *Traffic Cph Den.* août 2007;8(8):970-82.
56. Lamaze C, Tardif N, Dewulf M, Vassilopoulos S, Blouin CM. The caveolae dress code: structure and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* août 2017;47:117-25.
57. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 6 mars 2003;422(6927):37-44.
58. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles.* janv 2014;3(1):24641.
59. Sandvig K, Kavaliauskiene S, Skotland T. Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity. *Histochem Cell Biol.* août 2018;150(2):107-18.
60. Lancaster CE, Ho CY, Hipolito VEB, Botelho RJ, Terebiznik MR. Phagocytosis: what's on the menu? *Biochem Cell Biol.* févr 2019;97(1):21-9.
61. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* août 2007;8(8):603-12.
62. Dutta D, Donaldson JG. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cell Logist.* oct 2012;2(4):203-8.
63. Park JH, Oh N. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine.* mai 2014;51.

64. Varela JA, Bexiga MG, Åberg C, Simpson JC, Dawson KA. Quantifying size-dependent interactions between fluorescently labeled polystyrene nanoparticles and mammalian cells. *J Nanobiotechnology*. 24 sept 2012;10:39.
65. Wang B, Zhang J, Chen C, Xu G, Qin X, Hong Y, et al. The size of zinc oxide nanoparticles controls its toxicity through impairing autophagic flux in A549 lung epithelial cells. *Toxicol Lett*. mars 2018;285:51-9.
66. Win KY, Feng S-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*. mai 2005;26(15):2713-22.
67. Prabha S, Zhou W-Z, Panyam J, Labhasetwar V. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm*. 5 sept 2002;244(1-2):105-15.
68. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*. avr 2006;6(4):662-8.
69. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol*. mars 2008;3(3):145-50.
70. Zhang S, Gao H, Bao G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS Nano*. 22 sept 2015;9(9):8655-71.
71. Platel A, Carpentier R, Becart E, Mordacq G, Betbeder D, Nessler F. Influence of the surface charge of PLGA nanoparticles on their *in vitro* genotoxicity, cytotoxicity, ROS production and endocytosis: Charge-dependent nanoparticle toxicity. *J Appl Toxicol*. mars 2016;36(3):434-44.
72. Jallouli Y, Paillard A, Chang J, Sevin E, Betbeder D. Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood–brain barrier *in vitro*. *Int J Pharm*. nov 2007;344(1-2):103-9.
73. Kralj S, Rojnik M, Romih R, Jagodič M, Kos J, Makovec D. Effect of surface charge on the cellular uptake of fluorescent magnetic nanoparticles. *J Nanoparticle Res*. oct 2012;14(10):1151.
74. Rancan F, Gao Q, Graf C, Troppens S, Hadam S, Hackbarth S, et al. Skin Penetration and Cellular Uptake of Amorphous Silica Nanoparticles with Variable Size, Surface Functionalization, and Colloidal Stability. *ACS Nano*. 28 août 2012;6(8):6829-42.
75. Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*. nov 2007;28(31):4600-7.
76. Bannunah AM, Vllasaliu D, Lord J, Stolnik S. Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of Size and Surface Charge. *Mol Pharm*. déc 2014;11(12):4363-73.
77. Pozzi D, Colapicchioni V, Caracciolo G, Piovesana S, Capriotti AL, Palchetti S, et al. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio–nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells. *Nanoscale*. 2014;6(5):2782.

78. Van Haute D, Liu AT, Berlin JM. Coating Metal Nanoparticle Surfaces with Small Organic Molecules Can Reduce Nonspecific Cell Uptake. *ACS Nano*. 23 janv 2018;12(1):117-27.
79. Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnology*. 19 juill 2013;11:26.
80. Forest V, Pourchez J. Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona. *Mater Sci Eng C*. janv 2017;70:889-96.
81. Ho YT, Kamm RD, Kah JCY. Influence of protein corona and caveolae-mediated endocytosis on nanoparticle uptake and transcytosis. *Nanoscale*. 2018;10(26):12386-97.
82. Champion JA, Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci*. 28 mars 2006;103(13):4930-4.
83. Sharma G, Valenta DT, Altman Y, Harvey S, Xie H, Mitragotri S, et al. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J Controlled Release*. nov 2010;147(3):408-12.
84. Huang C, Butler PJ, Tong S, Muddana HS, Bao G, Zhang S. Substrate stiffness regulates cellular uptake of nanoparticles. *Nano Lett*. 10 avr 2013;13(4):1611-5.
85. Yi X, Shi X, Gao H. Cellular Uptake of Elastic Nanoparticles. *Phys Rev Lett*. 22 août 2011;107(9):098101.
86. Braun T, Kleusch C, Naumovska E, Merkel R, Csiszár A. A bioanalytical assay to distinguish cellular uptake routes for liposomes: Fluorescence Tracking of Endocytosis and Membrane Fusion. *Cytometry A*. mars 2016;89(3):301-8.
87. Allen TM, Austin GA, Chonn A, Lin L, Lee KC. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Biochim Biophys Acta*. 9 janv 1991;1061(1):56-64.
88. Li S-D, Huang L. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Mol Pharm*. août 2008;5(4):496-504.
89. Arami H, Khandhar A, Liggitt D, Krishnan KM. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2015;44(23):8576-607.
90. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev*. juin 2009;61(6):428-37.
91. Yameen B, Choi WI, Vilos C, Swami A, Shi J, Farokhzad OC. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J Controlled Release*. sept 2014;190:485-99.
92. Pridgen EM, Alexis F, Kuo TT, Levy-Nissenbaum E, Karnik R, Blumberg RS, et al. Transepithelial Transport of Fc-Targeted Nanoparticles by the Neonatal Fc Receptor for Oral Delivery. *Sci Transl Med*. 27 nov 2013;5(213):213ra167-213ra167.
93. Duncan R, Richardson SCW. Endocytosis and intracellular trafficking as gateways for nanomedicine delivery: opportunities and challenges. *Mol Pharm*. 4 sept 2012;9(9):2380-402.

94. He Y, Li F, Huang Y. Smart Cell-Penetrating Peptide-Based Techniques for Intracellular Delivery of Therapeutic Macromolecules. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2018;112:183-220.
95. Rajendran L, Knölker H-J, Simons K. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nat Rev Drug Discov.* janv 2010;9(1):29-42.
96. He H, Liu L, Morin EE, Liu M, Schwendeman A. Survey of Clinical Translation of Cancer Nanomedicines—Lessons Learned from Successes and Failures. *Acc Chem Res.* 17 sept 2019;52(9):2445-61.
97. Pasquale A, Preiss S, Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines.* 16 avr 2015;3(2):320-43.
98. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* avr 2009;22(2):240-73, Table of Contents.
99. Koenderman L, Buurman W, Daha MR. The innate immune response. *Immunol Lett.* déc 2014;162(2):95-102.
100. Gause KT, Wheatley AK, Cui J, Yan Y, Kent SJ, Caruso F. Immunological Principles Guiding the Rational Design of Particles for Vaccine Delivery. *ACS Nano.* 24 janv 2017;11(1):54-68.
101. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol.* juin 2011;12(6):509-17.
102. Smith DM, Simon JK, Baker Jr JR. Applications of nanotechnology for immunology. *Nat Rev Immunol.* août 2013;13(8):592-605.
103. Veldhoen M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat Immunol.* juin 2017;18(6):612-21.
104. Rosenblum MD, Way SS, Abbas AK. Regulatory T cell memory. *Nat Rev Immunol.* févr 2016;16(2):90-101.
105. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol.* janv 2009;9(1):15-27.
106. Yuseff M-I, Pierobon P, Reversat A, Lennon-Duménil A-M. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol.* juill 2013;13(7):475-86.
107. Williams MA, Bevan MJ. Effector and Memory CTL Differentiation. *Annu Rev Immunol.* avr 2007;25(1):171-92.
108. Jiskoot W, Kersten GFA, Mastrobattista E, Slütter B. Vaccines. In: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B, éditeurs. *Pharmaceutical Biotechnology* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cité 17 avr 2020]. p. 281-304. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-00710-2\\_14](http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-00710-2_14)
109. Plotkin SA. Vaccines, vaccination, and vaccinology. *J Infect Dis.* 1 mai 2003;187(9):1349-59.
110. Nabel GJ. Designing Tomorrow's Vaccines. *N Engl J Med.* 7 févr 2013;368(6):551-60.

111. O'Hagan DT, Fox CB. Are we entering a new age for human vaccine adjuvants? *Expert Rev Vaccines*. 3 juill 2015;14(7):909-11.
112. Wallis J, Shenton DP, Carlisle RC. Novel approaches for the design, delivery and administration of vaccine technologies. *Clin Exp Immunol*. 8 avr 2019;cei.13287.
113. Mamo T, Poland GA. Nanovaccinology: The next generation of vaccines meets 21st century materials science and engineering. *Vaccine*. oct 2012;30(47):6609-11.
114. Purcell AW, McCluskey J, Rossjohn J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov*. mai 2007;6(5):404-14.
115. Wenbin Tuo DZ. QS-21: A Potent Vaccine Adjuvant. *Nat Prod Chem Res* [Internet]. 2015 [cité 17 sept 2019];03(04). Disponible sur: <http://www.esciencecentral.org/journals/qs21-a-potent-vaccine-adjuvant-2329-6836-1000e113.php?aid=57627>
116. Delany I, Rappuoli R, De Gregorio E. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol Med*. juin 2014;6(6):708-20.
117. Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin Immunol*. 2018;39:14-21.
118. Didierlaurent AM, Laupèze B, Di Pasquale A, Hergli N, Collignon C, Garçon N. Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2 janv 2017;16(1):55-63.
119. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 nov 2009;183(10):6186-97.
120. Batista-Duharte A, Martínez DT, Carlos IZ. Efficacy and safety of immunological adjuvants. Where is the cut-off? *Biomed Pharmacother*. sept 2018;105:616-24.
121. Azegami T, Yuki Y, Kiyono H. Challenges in mucosal vaccines for the control of infectious diseases. *Int Immunol*. 1 sept 2014;26(9):517-28.
122. Chalmers WSK. Overview of new vaccines and technologies. *Vet Microbiol*. oct 2006;117(1):25-31.
123. Ogra PL, Karzon DT, Righthand F, MacGillivray M. Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection. *N Engl J Med*. 24 oct 1968;279(17):893-900.
124. Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev*. févr 2009;61(2):75-85.
125. Sigurdsson HH, Kirch J, Lehr C-M. Mucus as a barrier to lipophilic drugs. *Int J Pharm*. août 2013;453(1):56-64.
126. Corazziari ES. Intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. avr 2009;48 Suppl 2:S54-55.



127. Lai SK, Wang Y-Y, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev.* févr 2009;61(2):158-71.
128. Demouveau B, Gouyer V, Gottrand F, Narita T, Desseyn J-L. Gel-forming mucin interactome drives mucus viscoelasticity. *Adv Colloid Interface Sci.* févr 2018;252:69-82.
129. Ganesan S, Comstock AT, Sajjan US. Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue Barriers.* oct 2013;1(4):e24997.
130. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2009;124(1):3-20.
131. Kraehenbuhl J-P, Neutra M. Mucosal Vaccines: Where Do We Stand? *Curr Top Med Chem.* 31 oct 2013;13(20):2609-28.
132. Wright PF. Inductive/Effector Mechanisms for Humoral Immunity at Mucosal Sites: INDUCTION OF MUCOSAL IMMUNITY. *Am J Reprod Immunol.* mars 2011;65(3):248-52.
133. Brandtzaeg P. Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. *Scand J Immunol.* déc 2009;70(6):505-15.
134. Wang M, Gao Z, Zhang Z, Pan L, Zhang Y. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum Vaccines Immunother.* 2 déc 2014;10(12):3544-51.
135. Perry M, Whyte A. Immunology of the tonsils. *Immunol Today.* sept 1998;19(9):414-21.
136. J Philpott D, E Girardin S, J Sansonetti P. Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. *Curr Opin Immunol.* août 2001;13(4):410-6.
137. Russell-Jones GJ. Oral vaccine delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 1 mars 2000;65(1-2):49-54.
138. Nowarski R, Jackson R, Flavell RA. The Stromal Intervention: Regulation of Immunity and Inflammation at the Epithelial-Mesenchymal Barrier. *Cell.* janv 2017;168(3):362-75.
139. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* avr 2001;2(4):361-7.
140. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen F-E, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* janv 2008;1(1):11-22.
141. Brandtzaeg P, Johansen F-E. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev.* août 2005;206:32-63.
142. Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol.* nov 2004;25(11):570-7.
143. Lazarus NH, Kunkel EJ, Johnston B, Wilson E, Youngman KR, Butcher EC. A Common Mucosal Chemokine (Mucosae-Associated Epithelial Chemokine/CCL28) Selectively Attracts IgA Plasmablasts. *J Immunol.* 1 avr 2003;170(7):3799-805.

144. Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus PEYER'S-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol.* sept 2004;4(9):699-710.
145. Jung C, Hugot J-P, Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int J Inflamm.* 2010;2010:1-12.
146. Heel KA, McCAULEY RD, Papadimitriou JM, Hall JC. REVIEW: Peyer's patches. *J Gastroenterol Hepatol.* févr 1997;12(2):122-36.
147. McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature.* mars 2012;483(7389):345-9.
148. Kantele A, Zivny J, Häkkinen M, Elson CO, Mestecky J. Differential homing commitments of antigen-specific T cells after oral or parenteral immunization in humans. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 mai 1999;162(9):5173-7.
149. Svensson M, Marsal J, Ericsson A, Carramolino L, Brodén T, Márquez G, et al. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest.* oct 2002;110(8):1113-21.
150. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol.* 25 juill 2012;12(8):592-605.
151. Mitragotri S. Immunization without needles. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(12):905-16.
152. Hellings P, Jorissen M, Ceuppens JL. The Waldeyer's ring. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000;54(3):237-41.
153. Sarkar MA. Drug metabolism in the nasal mucosa. *Pharm Res.* janv 1992;9(1):1-9.
154. Marasini N, Skwarczynski M, Toth I. Intranasal delivery of nanoparticle-based vaccines. *Ther Deliv.* mars 2017;8(3):151-67.
155. Claeys S, Cuvelier C, Quatacker J, Van Cauwenberge P. Ultrastructural investigation of M-cells and lymphoepithelial contacts in naso-pharyngeal associated lymphoid tissue (NALT). *Acta Oto-Laryngol Suppl.* 1996;523:40-2.
156. Hiroi T, Iwatani K, Iijima H, Kodama S, Yanagita M, Kiyono H. Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. *Eur J Immunol.* 1998;28(10):3346-53.
157. Lobaina Mato Y. Nasal route for vaccine and drug delivery: Features and current opportunities. *Int J Pharm.* déc 2019;572:118813.
158. Frieke Kuper C, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, et al. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today.* janv 1992;13(6):219-24.
159. Kuper CF. Histopathology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicol Pathol.* août 2006;34(5):609-15.
160. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 2 août 1990;346(6283):425-34.

161. Czerkinsky C, Holmgren J. Mucosal Delivery Routes for Optimal Immunization: Targeting Immunity to the Right Tissues. In: Kozlowski PA, éditeur. *Mucosal Vaccines* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [cité 25 mars 2020]. p. 1-18. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 354). Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/82\\_2010\\_112](http://link.springer.com/10.1007/82_2010_112)
162. Dombu CY, Betbeder D. Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials*. janv 2013;34(2):516-25.
163. Carter NJ, Curran MP. Live attenuated influenza vaccine (FluMist®; Fluenz™): a review of its use in the prevention of seasonal influenza in children and adults. *Drugs*. 20 août 2011;71(12):1591-622.
164. Czerkinsky C, Holmgren J. Vaccines against enteric infections for the developing world. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 19 juin 2015;370(1671):20150142.
165. Schwartz JL. The first rotavirus vaccine and the politics of acceptable risk. *Milbank Q*. juin 2012;90(2):278-310.
166. McAleer JP, Vella AT. Educating CD4 T cells with vaccine adjuvants: lessons from lipopolysaccharide. *Trends Immunol*. nov 2010;31(11):429-35.
167. Gewirtz A. Intestinal Epithelial Toll-Like Receptors: To Protect. And Serve? *Curr Pharm Des*. 1 janv 2003;9(1):1-5.
168. Chakraborty S, Harro C, DeNearing B, Ram M, Feller A, Cage A, et al. Characterization of Mucosal Immune Responses to Enterotoxigenic *Escherichia coli* Vaccine Antigens in a Human Challenge Model: Response Profiles after Primary Infection and Homologous Rechallenge with Strain H10407. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2016;23(1):55-64.
169. Shamsuzzaman S, Ahmed T, Mannoor K, Begum YA, Bardhan PK, Sack RB, et al. Robust gut associated vaccine-specific antibody-secreting cell responses are detected at the mucosal surface of Bangladeshi subjects after immunization with an oral killed bivalent *V. cholerae* O1/O139 whole cell cholera vaccine: comparison with other mucosal and systemic responses. *Vaccine*. 25 févr 2009;27(9):1386-92.
170. Van De Verg LL, Hartman AB, Bhattacharjee AK, Tall BD, Yuan L, Sasala K, et al. Outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* as a mucosal adjuvant for lipopolysaccharide of *Brucella melitensis* in mouse and guinea pig intranasal immunization models. *Infect Immun*. déc 1996;64(12):5263-8.
171. Pérez O, Bracho G, Lastre M, Mora N, Del Campo J, Gil D, et al. Novel adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure containing native lipopolysaccharide as a pathogen-associated molecular pattern. *Immunol Cell Biol*. déc 2004;82(6):603-10.
172. Chilton PM, Hadel DM, To TT, Mitchell TC, Darveau RP. Adjuvant Activity of Naturally Occurring Monophosphoryl Lipopolysaccharide Preparations from Mucosa-Associated Bacteria. Morrison RP, éditeur. *Infect Immun*. sept 2013;81(9):3317-25.
173. Iwasaki T, Hirano T, Kodama S, Kadowaki Y, Moriyama M, Kawano T, et al. Monophosphoryl lipid A enhances nontypeable *Haemophilus influenzae* -specific mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. juin 2017;97:5-12.

174. Baldrige J. Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration. *Vaccine*. mai 2000;18(22):2416-25.
175. Doherty TM, Olsen AW, van Pinxteren L, Andersen P. Oral vaccination with subunit vaccines protects animals against aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. juin 2002;70(6):3111-21.
176. Eaves-Pyles T, Murthy K, Liaudet L, Virág L, Ross G, Soriano FG, et al. Flagellin, a novel mediator of *Salmonella*-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 janv 2001;166(2):1248-60.
177. Hajam IA, Dar PA, Shahnawaz I, Jaume JC, Lee JH. Bacterial flagellin—a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med*. sept 2017;49(9):e373-e373.
178. Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith JA, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest*. 15 juin 2000;105(12):1769-77.
179. Van Maele L, Fougereon D, Janot L, Didierlaurent A, Cayet D, Tabareau J, et al. Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. *Mucosal Immunol*. mai 2014;7(3):489-500.
180. Ben-Yedidia T, Marcus H, Reisner Y, Arnon R. Intranasal administration of peptide vaccine protects human/mouse radiation chimera from influenza infection. *Int Immunol*. juill 1999;11(7):1043-51.
181. Lee SE, Kim SY, Jeong BC, Kim YR, Bae SJ, Ahn OS, et al. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infect Immun*. janv 2006;74(1):694-702.
182. Bargieri DY, Rosa DS, Braga CJM, Carvalho BO, Costa FTM, Espíndola NM, et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella Typhimurium* FliC flagellin. *Vaccine*. nov 2008;26(48):6132-42.
183. Ben-Yedidia T, Tarrab-Hazdai R, Schechtman D, Arnon R. Intranasal Administration of Synthetic Recombinant Peptide-Based Vaccine Protects Mice from Infection by *Schistosoma mansoni*. Mansfield JM, éditeur. *Infect Immun*. 1999;67(9):4360-6.
184. Lu Y, Swartz JR. Functional properties of flagellin as a stimulator of innate immunity. *Sci Rep*. mai 2016;6(1):18379.
185. Cui B, Liu X, Fang Y, Zhou P, Zhang Y, Wang Y. Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 3 avr 2018;17(4):335-49.
186. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. avr 2011;10(4):499-511.
187. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov*. juin 2006;5(6):471-84.

188. Iho S, Maeyama J, Suzuki F. CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants. *Hum Vaccines Immunother.* 2015;11(3):755-60.
189. Gao Y, Su Q, Yi Y, Jia Z, Wang H, Lu X, et al. Enhanced Mucosal Immune Responses Induced by a Combined Candidate Mucosal Vaccine Based on Hepatitis A Virus and Hepatitis E Virus Structural Proteins Linked to Tuftsin. Reeves RK, éditeur. *PLOS ONE.* 13 avr 2015;10(4):e0123400.
190. Lin Y-L, Chow Y-H, Huang L-M, Hsieh S-M, Cheng P-Y, Hu K-C, et al. A CpG-adjuvanted intranasal enterovirus 71 vaccine elicits mucosal and systemic immune responses and protects human SCARB2-transgenic mice against lethal challenge. *Sci Rep.* déc 2018;8(1):10713.
191. Maeyama J, Takatsuka H, Suzuki F, Kubota A, Horiguchi S, Komiya T, et al. A Palindromic CpG-Containing Phosphodiester Oligodeoxynucleotide as a Mucosal Adjuvant Stimulates Plasmacytoid Dendritic Cell-Mediated TH1 Immunity. Rodrigues MM, éditeur. *PLoS ONE.* 24 févr 2014;9(2):e88846.
192. Usman Ishaq M, Rafique A, Cheema HMN, Umer Ashraf M, Rahman SU, Zahid Abbas R, et al. Role of cytosine-phosphate-guanosine-Oligodeoxynucleotides (CpG ODNs) as adjuvant in poultry vaccines. *Worlds Poult Sci J.* 1 sept 2018;74(3):453-62.
193. Scheiermann J, Klinman DM. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine.* nov 2014;32(48):6377-89.
194. Chattopadhyay S, Sen GC. dsRNA-Activation of TLR3 and RLR Signaling: Gene Induction-Dependent and Independent Effects. *J Interferon Cytokine Res.* juin 2014;34(6):427-36.
195. Martins KA, Bavari S, Salazar AM. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert Rev Vaccines.* 4 mars 2015;14(3):447-59.
196. Trumpfheller C, Caskey M, Nchinda G, Longhi MP, Mizenina O, Huang Y, et al. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proc Natl Acad Sci.* 19 févr 2008;105(7):2574-9.
197. Levy HB, Baer G, Baron S, Buckler CE, Gibbs CJ, Iadarola MJ, et al. A modified polyriboinosinic-polyribocytidylic acid complex that induces interferon in primates. *J Infect Dis.* oct 1975;132(4):434-9.
198. Cha RM, Khatri M, Sharma JM. Protection against avian metapneumovirus subtype C in turkeys immunized via the respiratory tract with inactivated virus. *Vaccine.* janv 2011;29(3):459-65.
199. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S-I, et al. Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol.* mars 2005;79(5):2910-9.
200. Pérez-Girón JV, Belicha-Villanueva A, Hassan E, Gómez-Medina S, Cruz JLG, Lüdtke A, et al. Mucosal Polyinosinic-Polycytidylic Acid Improves Protection Elicited by Replicating Influenza Vaccines via Enhanced Dendritic Cell Function and T Cell Immunity. *J Immunol.* 1 août 2014;193(3):1324-32.

201. Renu S, Feliciano-Ruiz N, Ghimire S, Han Y, Schrock J, Dhakal S, et al. Poly(I:C) augments inactivated influenza virus-chitosan nanovaccine induced cell mediated immune response in pigs vaccinated intranasally. *Vet Microbiol.* mars 2020;242:108611.
202. Scallan CD, Tingley DW, Lindbloom JD, Toomey JS, Tucker SN. An adenovirus-based vaccine with a double-stranded RNA adjuvant protects mice and ferrets against H5N1 avian influenza in oral delivery models. *Clin Vaccine Immunol CVI.* janv 2013;20(1):85-94.
203. Tamura S-I, Ainai A, Suzuki T, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal Inactivated Influenza Vaccines: a Reasonable Approach to Improve the Efficacy of Influenza Vaccine? *Jpn J Infect Dis.* 2016;69(3):165-79.
204. Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, et al. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med.* févr 2005;11(2):138-45.
205. Laman AG, Lathe R, Shepelyakovskaya AO, Gartseva A, Brovko FA, Guryanova S, et al. Muramyl peptides activate innate immunity conjointly via YB1 and NOD2. *Innate Immun.* nov 2016;22(8):666-73.
206. Lidgate DM, Byars NE. Development of an Emulsion-Based Muramyl Dipeptide Adjuvant Formulation for Vaccines. In: Powell MF, Newman MJ, éditeurs. *Vaccine Design [Internet].* Boston, MA: Springer US; 1995 [cité 26 mars 2020]. p. 313-24. (Borchardt RT. *Pharmaceutical Biotechnology*; vol. 6). Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-1823-5\\_12](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-1823-5_12)
207. Shafique M, Wilschut J, de Haan A. Induction of mucosal and systemic immunity against respiratory syncytial virus by inactivated virus supplemented with TLR9 and NOD2 ligands. *Vaccine.* janv 2012;30(3):597-606.
208. Ogawa C, Liu Y-J, S. Kobayashi K. Muramyl Dipeptide and its Derivatives: Peptide Adjuvant in Immunological Disorders and Cancer Therapy. *Curr Bioact Compd.* 1 sept 2011;7(3):180-97.
209. Willems MMJHP, Zom GG, Meeuwenoord N, Khan S, Ossendorp F, Overkleeft HS, et al. Lipophilic Muramyl Dipeptide-Antigen Conjugates as Immunostimulating Agents. *ChemMedChem.* janv 2016;11(2):190-8.
210. Willems MMJHP, Zom GG, Meeuwenoord N, Ossendorp FA, Overkleeft HS, van der Marel GA, et al. Design, automated synthesis and immunological evaluation of NOD2-ligand-antigen conjugates. *Beilstein J Org Chem.* 26 juin 2014;10:1445-53.
211. Lencer WI, Tsai B. The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem Sci.* déc 2003;28(12):639-45.
212. Baldauf K, Royal J, Hamorsky K, Matoba N. Cholera Toxin B: One Subunit with Many Pharmaceutical Applications. *Toxins.* 20 mars 2015;7(3):974-96.
213. Sánchez J, Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell Mol Life Sci.* mai 2008;65(9):1347-60.
214. Levine MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol Rev.* déc 1983;47(4):510-50.

215. Fukuyama Y, Okada K, Yamaguchi M, Kiyono H, Mori K, Yuki Y. Nasal Administration of Cholera Toxin as a Mucosal Adjuvant Damages the Olfactory System in Mice. *PLoS One*. 2015;10(9):e0139368.
216. Odumosu O, Nicholas D, Yano H, Langridge W. AB Toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable. *Toxins*. 25 juin 2010;2(7):1612-45.
217. Jelinek T, Kollaritsch H. Vaccination with Dukoral against travelers' diarrhea (ETEC) and cholera. *Expert Rev Vaccines*. juill 2008;7(5):561-7.
218. Lv X, Song H, Yang J, Li T, Xi T, Xing Y. A multi-epitope vaccine CTB-UE relieves *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory reaction via up-regulating microRNA-155 to inhibit Th17 response in C57/BL6 mice model. *Hum Vaccines Immunother*. 2014;10(12):3561-9.
219. Pan X, Ke H, Niu X, Li S, Lv J, Pan L. Protection Against *Helicobacter pylori* Infection in BALB/c Mouse Model by Oral Administration of Multivalent Epitope-Based Vaccine of Cholera Toxin B Subunit-HUUC. *Front Immunol*. 2018;9:1003.
220. Hagiwara Y, Komase K, Chen Z, Matsuo K, Suzuki Y, Aizawa C, et al. Mutants of cholera toxin as an effective and safe adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine*. 16 juill 1999;17(22):2918-26.
221. Periwal SB, Kourie KR, Ramachandaran N, Blakeney SJ, DeBruin S, Zhu D, et al. A modified cholera holotoxin CT-E29H enhances systemic and mucosal immune responses to recombinant Norwalk virus-virus like particle vaccine. *Vaccine*. janv 2003;21(5-6):376-85.
222. Agren LC, Ekman L, Löwenadler B, Lycke NY. Genetically engineered nontoxic vaccine adjuvant that combines B cell targeting with immunomodulation by cholera toxin A1 subunit. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 avr 1997;158(8):3936-46.
223. Lycke N. The B-cell targeted CTA1-DD vaccine adjuvant is highly effective at enhancing antibody as well as CTL responses. *Curr Opin Mol Ther*. févr 2001;3(1):37-44.
224. Sundling C, Schön K, Mörner A, Forsell MNE, Wyatt RT, Thorstensson R, et al. CTA1-DD adjuvant promotes strong immunity against human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins following mucosal immunization. *J Gen Virol*. déc 2008;89(Pt 12):2954-64.
225. Cunningham KA, Carey AJ, Lycke N, Timms P, Beagley KW. CTA1-DD is an effective adjuvant for targeting anti-chlamydial immunity to the murine genital mucosa. *J Reprod Immunol*. juill 2009;81(1):34-8.
226. Eliasson DG, El Bakkouri K, Schön K, Ramne A, Festjens E, Löwenadler B, et al. CTA1-M2e-DD: a novel mucosal adjuvant targeted influenza vaccine. *Vaccine*. 26 févr 2008;26(9):1243-52.
227. Fan XT, Wang YL, Su QD, Qiu F, Yi Y, Jia ZY, et al. Intranasal Immunization Using CTA1-DD as a Mucosal Adjuvant for an Inactivated Influenza Vaccine. *Biomed Environ Sci BES*. juill 2019;32(7):531-40.
228. Ma Y. Recent advances in nontoxic *Escherichia coli* heat-labile toxin and its derivative adjuvants. *Expert Rev Vaccines*. nov 2016;15(11):1361-71.

229. Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, et al. Use of the Inactivated Intranasal Influenza Vaccine and the Risk of Bell's Palsy in Switzerland. *N Engl J Med.* 26 févr 2004;350(9):896-903.
230. Ma Y, Luo Y, Huang X, Song F, Liu G. Construction of *Bifidobacterium infantis* as a live oral vaccine that expresses antigens of the major fimbrial subunit (CfaB) and the B subunit of heat-labile enterotoxin (LTB) from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology.* 1 févr 2012;158(2):498-504.
231. Jeon BW, Nandre RM, Lee JH. Oral immunization with an attenuated *Salmonella Gallinarum* mutant as a fowl typhoid vaccine with a live adjuvant strain secreting the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *BMC Vet Res.* 2013;9(1):96.
232. Hagiwara Y, Iwasaki T, Asanuma H, Sato Y, Sata T, Aizawa C, et al. Effects of intranasal administration of cholera toxin (or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain. *Vaccine.* févr 2001;19(13-14):1652-60.
233. De Haan, Holtrop, Verweij, Agsteribbe, Wilschut. Mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the recombinant A subunit of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Immunology.* août 1999;97(4):706-13.
234. Cordeiro AS, Alonso MJ, de la Fuente M. Nanoengineering of vaccines using natural polysaccharides. *Biotechnol Adv.* nov 2015;33(6):1279-93.
235. Chadwick S, Kriegel C, Amiji M. Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Adv Drug Deliv Rev.* mars 2010;62(4-5):394-407.
236. Bernocchi B, Carpentier R, Betbeder D. Nasal nanovaccines. *Int J Pharm.* sept 2017;530(1-2):128-38.
237. Kaur L, Sharma A, Yadav AK, Mishra N. Recent advances on biodegradable polymeric carrier-based mucosal immunization: an overview. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 3 avr 2018;46(3):452-64.
238. Sharma R, Agrawal U, Mody N, Vyas SP. Polymer nanotechnology based approaches in mucosal vaccine delivery: Challenges and opportunities. *Biotechnol Adv.* janv 2015;33(1):64-79.
239. Zaman M, Good MF, Toth I. Nanovaccines and their mode of action. *Methods.* mai 2013;60(3):226-31.
240. Bovier PA. Epaxal: a virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection. *Expert Rev Vaccines.* oct 2008;7(8):1141-50.
241. Moon JJ, Suh H, Bershteyn A, Stephan MT, Liu H, Huang B, et al. Interbilayer-crosslinked multilamellar vesicles as synthetic vaccines for potent humoral and cellular immune responses. *Nat Mater.* mars 2011;10(3):243-51.
242. Heurtault B, Frisch B, Pons F. Liposomes as delivery systems for nasal vaccination: strategies and outcomes. *Expert Opin Drug Deliv.* juill 2010;7(7):829-44.



243. Lee Y-T, Ko E-J, Lee Y, Kim K-H, Kim M-C, Lee Y-N, et al. Intranasal vaccination with M2e5x virus-like particles induces humoral and cellular immune responses conferring cross-protection against heterosubtypic influenza viruses. *Tompkins SM, éditeur. PLOS ONE.* 11 janv 2018;13(1):e0190868.
244. Jain NK, Sahni N, Kumru OS, Joshi SB, Volkin DB, Russell Middaugh C. Formulation and stabilization of recombinant protein based virus-like particle vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* oct 2015;93:42-55.
245. Al-Barwani F, Donaldson B, Pelham SJ, Young SL, Ward VK. Antigen delivery by virus-like particles for immunotherapeutic vaccination. *Ther Deliv.* nov 2014;5(11):1223-40.
246. Strable E, Finn MG. Chemical modification of viruses and virus-like particles. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;327:1-21.
247. Pati R, Shevtsov M, Sonawane A. Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases. *Front Immunol.* 4 oct 2018;9:2224.
248. Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. *Front Cell Infect Microbiol [Internet].* 25 mars 2013 [cité 22 mai 2017];3. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3607064/>
249. Chronakis IS. On the Molecular Characteristics, Compositional Properties, and Structural-Functional Mechanisms of Maltodextrins: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* oct 1998;38(7):599-637.
250. Wang H, Feng T, Zhuang H, Xu Z, Ye R, Sun M. A Review on Patents of Starch Nanoparticles: Preparation, Applications, and Development. *Recent Pat Food Nutr Agric.* 23 juill 2018;9(1):23-30.
251. Kim H-Y, Park SS, Lim S-T. Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* févr 2015;126:607-20.
252. De Miguel I, Imbertie L, Rieumajou V, Major M, Kravtsoff R, Betbeder D. Proofs of the structure of lipid coated nanoparticles (SMBV) used as drug carriers. *Pharm Res.* juill 2000;17(7):817-24.
253. Dombu CY, Kroubi M, Zibouche R, Matran R, Betbeder D. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. *Nanotechnology.* 3 sept 2010;21(35):355102.
254. Merhi M, Dombu CY, Brient A, Chang J, Platel A, Le Curieux F, et al. Study of serum interaction with a cationic nanoparticle: Implications for in vitro endocytosis, cytotoxicity and genotoxicity. *Int J Pharm.* févr 2012;423(1):37-44.
255. Paillard A, Passirani C, Saulnier P, Kroubi M, Garcion E, Benoît J-P, et al. Positively-Charged, Porous, Polysaccharide Nanoparticles Loaded with Anionic Molecules Behave as 'Stealth' Cationic Nanocarriers. *Pharm Res.* janv 2010;27(1):126-33.
256. Dombu C, Carpentier R, Betbeder D. Influence of surface charge and inner composition of nanoparticles on intracellular delivery of proteins in airway epithelial cells. *Biomaterials.* déc 2012;33(35):9117-26.

257. Kim CG, Kye Y-C, Yun C-H. The Role of Nanovaccine in Cross-Presentation of Antigen-Presenting Cells for the Activation of CD8+ T Cell Responses. *Pharmaceutics*. 15 nov 2019;11(11):612.
258. Bernocchi B, Carpentier R, Lantier I, Ducournau C, Dimier-Poisson I, Betbeder D. Mechanisms allowing protein delivery in nasal mucosa using NPL nanoparticles. *J Controlled Release*. juin 2016;232:42-50.
259. Dimier-Poisson I, Carpentier R, N'Guyen TTL, Dahmani F, Ducournau C, Betbeder D. Porous nanoparticles as delivery system of complex antigens for an effective vaccine against acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Biomaterials*. mai 2015;50:164-75.
260. Ducournau C, Nguyen TT, Carpentier R, Lantier I, Germon S, Précausta F, et al. Synthetic parasites: a successful mucosal nanoparticle vaccine against *Toxoplasma* congenital infection in mice. *Future Microbiol*. avr 2017;12(5):393-405.
261. Bernasconi V, Bernocchi B, Ye L, Lê MQ, Omokanye A, Carpentier R, et al. Porous Nanoparticles With Self-Adjuvanting M2e-Fusion Protein and Recombinant Hemagglutinin Provide Strong and Broadly Protective Immunity Against Influenza Virus Infections. *Front Immunol*. 12 sept 2018;9:2060.
262. Lai SK, Wang Y-Y, Wirtz D, Hanes J. Micro- and macrorheology of mucus. *Adv Drug Deliv Rev*. févr 2009;61(2):86-100.
263. Pearson JP, Chater PI, Wilcox MD. The properties of the mucus barrier, a unique gel – how can nanoparticles cross it? *Ther Deliv*. avr 2016;7(4):229-44.
264. Lillehoj EP, Kato K, Lu W, Kim KC. Cellular and Molecular Biology of Airway Mucins. In: *International Review of Cell and Molecular Biology* [Internet]. Elsevier; 2013 [cité 17 sept 2019]. p. 139-202. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124076976000040>
265. McGuckin MA, Thornton DJ, éditeurs. *Mucins: methods and protocols*. New York: Humana Press; 2012. 329 p. (Methods in molecular biology).
266. Fahy JV, Dickey BF. Airway Mucus Function and Dysfunction. *N Engl J Med*. 2 déc 2010;363(23):2233-47.
267. Schattling P, Taipaleenmäki E, Zhang Y, Städler B. A Polymer Chemistry Point of View on Mucoadhesion and Mucopenetration. *Macromol Biosci*. sept 2017;17(9):1700060.
268. Netsomboon K, Bernkop-Schnürch A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. janv 2016;98:76-89.
269. Khutoryanskiy VV. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromol Biosci*. 14 juin 2011;11(6):748-64.
270. Collado-González, González Espinosa, Goycoolea. Interaction Between Chitosan and Mucin: Fundamentals and Applications. *Biomimetics*. 25 avr 2019;4(2):32.
271. Dedinaite A, Lundin M, Macakova L, Auletta T. Mucin-chitosan complexes at the solid-liquid interface: multilayer formation and stability in surfactant solutions. *Langmuir ACS J Surf Colloids*. 11 oct 2005;21(21):9502-9.

272. Menchicchi B, Fuenzalida JP, Bobbili KB, Hensel A, Swamy MJ, Goycoolea FM. Structure of Chitosan Determines Its Interactions with Mucin. *Biomacromolecules*. 13 oct 2014;15(10):3550-8.
273. Zhang X, Cheng H, Dong W, Zhang M, Liu Q, Wang X, et al. Design and intestinal mucus penetration mechanism of core-shell nanocomplex. *J Controlled Release*. févr 2018;272:29-38.
274. Dhakal S, Renu S, Ghimire S, Shaan Lakshmanappa Y, Hogshead BT, Feliciano-Ruiz N, et al. Mucosal Immunity and Protective Efficacy of Intranasal Inactivated Influenza Vaccine Is Improved by Chitosan Nanoparticle Delivery in Pigs. *Front Immunol*. 2 mai 2018;9:934.
275. Renu S, Markazi AD, Dhakal S, Shaan Lakshmanappa Y, Shanmugasundaram R, Selvaraj RK, et al. Oral Deliverable Mucoadhesive Chitosan-Salmonella Subunit Nanovaccine for Layer Chickens. *Int J Nanomedicine*. févr 2020;Volume 15:761-77.
276. Hajam IA, Senevirathne A, Hewawaduge C, Kim J, Lee JH. Intranasally administered protein coated chitosan nanoparticles encapsulating influenza H9N2 HA2 and M2e mRNA molecules elicit protective immunity against avian influenza viruses in chickens. *Vet Res*. déc 2020;51(1):37.
277. Kotzé AF, Thanou MM, Lueßen HL, de Boer (A)Bert G, Verhoef JC, Junginger HE. Effect of the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Eur J Pharm Biopharm*. mai 1999;47(3):269-74.
278. Sandri G, Rossi S, Bonferoni MC, Ferrari F, Zambito Y, Colo GD, et al. Buccal penetration enhancement properties of N-trimethyl chitosan: Influence of quaternization degree on absorption of a high molecular weight molecule. *Int J Pharm*. juin 2005;297(1-2):146-55.
279. Zhao K, Sun Y, Chen G, Rong G, Kang H, Jin Z, et al. Biological evaluation of N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride chitosan as a carrier for the delivery of live Newcastle disease vaccine. *Carbohydr Polym*. sept 2016;149:28-39.
280. Najminejad H, Kalantar SM, Mokarram AR, Dabaghian M, Abdollahpour-Alitappeh M, Ebrahimi SM, et al. Bordetella pertussis antigens encapsulated into N-trimethyl chitosan nanoparticulate systems as a novel intranasal pertussis vaccine. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol*. déc 2019;47(1):2605-11.
281. Palazzo C, Trapani G, Ponchel G, Trapani A, Vauthier C. Mucoadhesive properties of low molecular weight chitosan- or glycol chitosan- and corresponding thiomers-coated poly(isobutylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. août 2017;117:315-23.
282. Pawar D, Jaganathan KS. Mucoadhesive glycol chitosan nanoparticles for intranasal delivery of hepatitis B vaccine: enhancement of mucosal and systemic immune response. *Drug Deliv*. 2 janv 2016;23(1):185-94.
283. M. Ways T, Lau W, Khutoryanskiy V. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers*. 5 mars 2018;10(3):267.
284. Shalaby TI, El-Refaie WM. Bioadhesive Chitosan-Coated Cationic Nanoliposomes With Improved Insulin Encapsulation and Prolonged Oral Hypoglycemic Effect in Diabetic Mice. *J Pharm Sci*. 2018;107(8):2136-43.

285. Pawar D, Mangal S, Goswami R, Jaganathan KS. Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: Effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *Eur J Pharm Biopharm.* nov 2013;85(3):550-9.
286. Sosnik A. Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art. *ISRN Pharm.* 2014;2014:1-17.
287. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.* janv 2012;37(1):106-26.
288. Severino P, da Silva CF, Andrade LN, de Lima Oliveira D, Campos J, Souto EB. Alginate Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. *Curr Pharm Des.* 6 août 2019;25(11):1312-34.
289. Dehghan S, Kheiri MT, Abnous K, Eskandari M, Tafaghodi M. Preparation, characterization and immunological evaluation of alginate nanoparticles loaded with whole inactivated influenza virus: Dry powder formulation for nasal immunization in rabbits. *Microb Pathog.* févr 2018;115:74-85.
290. Biswas S, Chattopadhyay M, Sen KK, Saha MK. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. *Carbohydr Polym.* 5 mai 2015;121:403-10.
291. Park H, Robinson JR. Mechanisms of mucoadhesion of poly(acrylic acid) hydrogels. *Pharm Res.* déc 1987;4(6):457-64.
292. Zaman M, Skwarczynski M, Malcolm JM, Urbani CN, Jia Z, Batzloff MR, et al. Self-adjuvanting polyacrylic nanoparticulate delivery system for group A streptococcus (GAS) vaccine. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* avr 2011;7(2):168-73.
293. Kik K, Bukowska B, Sicińska P. Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. *Environ Pollut.* juill 2020;262:114297.
294. Abdelkhalig A, van der Zande M, Punt A, Helsdingen R, Boeren S, Vervoort JJM, et al. Impact of nanoparticle surface functionalization on the protein corona and cellular adhesion, uptake and transport. *J Nanobiotechnology.* déc 2018;16(1):70.
295. Loos C, Syrovets T, Musyanovych A, Mailänder V, Landfester K, Nienhaus GU, et al. Functionalized polystyrene nanoparticles as a platform for studying bio–nano interactions. *Beilstein J Nanotechnol.* 15 déc 2014;5:2403-12.
296. Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, Man ST, Wang Y-Y, Cone R, et al. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci.* 30 janv 2007;104(5):1482-7.
297. Akagi T, Ueno M, Hiraishi K, Baba M, Akashi M. AIDS vaccine: Intranasal immunization using inactivated HIV-1-capturing core–corona type polymeric nanospheres. *J Controlled Release.* déc 2005;109(1-3):49-61.
298. Xu Q, Ensign LM, Boylan NJ, Schön A, Gong X, Yang J-C, et al. Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus *ex Vivo* and Distribution *in Vivo*. *ACS Nano.* 22 sept 2015;9(9):9217-27.

299. Yu T, Chan K W Y, Anonuevo A, Song X, Schuster BS, Chattopadhyay S, et al. Liposome-based mucus-penetrating particles (MPP) for mucosal theranostics: Demonstration of diamagnetic chemical exchange saturation transfer (diaCEST) magnetic resonance imaging (MRI). *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* févr 2015;11(2):401-5.
300. Maisel K, Reddy M, Xu Q, Chattopadhyay S, Cone R, Ensign LM, et al. Nanoparticles coated with high molecular weight PEG penetrate mucus and provide uniform vaginal and colorectal distribution *in vivo*. *Nanomed.* juin 2016;11(11):1337-43.
301. Schneider CS, Xu Q, Boylan NJ, Chisholm J, Tang BC, Schuster BS, et al. Nanoparticles that do not adhere to mucus provide uniform and long-lasting drug delivery to airways following inhalation. *Sci Adv.* avr 2017;3(4):e1601556.
302. Maisel K, Ensign L, Reddy M, Cone R, Hanes J. Effect of surface chemistry on nanoparticle interaction with gastrointestinal mucus and distribution in the gastrointestinal tract following oral and rectal administration in the mouse. *J Controlled Release.* janv 2015;197:48-57.
303. Porsio B, Craparo EF, Mauro N, Giammona G, Cavallaro G. Mucus and Cell-Penetrating Nanoparticles Embedded in *Nano - into - Micro* Formulations for Pulmonary Delivery of Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis. *ACS Appl Mater Interfaces.* 10 janv 2018;10(1):165-81.
304. Tan X, Zhang Y, Wang Q, Ren T, Gou J, Guo W, et al. Cell-penetrating peptide together with PEG-modified mesostructured silica nanoparticles promotes mucous permeation and oral delivery of therapeutic proteins and peptides. *Biomater Sci.* 2019;7(7):2934-50.
305. Vila A, Sánchez A, Évora C, Soriano I, Vila Jato JL, Alonso MJ. PEG-PLA Nanoparticles as Carriers for Nasal Vaccine Delivery. *J Aerosol Med.* juin 2004;17(2):174-85.
306. Jain AK, Goyal AK, Mishra N, Vaidya B, Mangal S, Vyas SP. PEG-PLA-PEG block copolymeric nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *Int J Pharm.* mars 2010;387(1-2):253-62.
307. Oberoi HS, Yorgensen YM, Morasse A, Evans JT, Burkhart DJ. PEG modified liposomes containing CRX-601 adjuvant in combination with methylglycol chitosan enhance the murine sublingual immune response to influenza vaccination. *J Controlled Release.* févr 2016;223:64-74.
308. Matías J, Brotons A, Cenoz S, Pérez I, Abdulkarim M, Gumbleton M, et al. Oral Immunogenicity in Mice and Sows of Enterotoxigenic Escherichia Coli Outer-Membrane Vesicles Incorporated into Zein-Based Nanoparticles. *Vaccines.* 31 déc 2019;8(1):11.
309. Richter AW, Åkerblom E. Antibodies against Polyethylene Glycol Produced in Animals by Immunization with Monomethoxy Polyethylene Glycol Modified Proteins. *Int Arch Allergy Immunol.* 1983;70(2):124-31.
310. Mansfield EDH, Sillence K, Hole P, Williams AC, Khutoryanskiy VV. POZylation: a new approach to enhance nanoparticle diffusion through mucosal barriers. *Nanoscale.* 2015;7(32):13671-9.
311. Poinard B, Kamaluddin S, Tan AQQ, Neoh KG, Kah JCY. Polydopamine Coating Enhances Mucopenetration and Cell Uptake of Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 6 févr 2019;11(5):4777-89.

312. Shan W, Zhu X, Liu M, Li L, Zhong J, Sun W, et al. Overcoming the Diffusion Barrier of Mucus and Absorption Barrier of Epithelium by Self-Assembled Nanoparticles for Oral Delivery of Insulin. *ACS Nano*. 24 mars 2015;9(3):2345-56.
313. Suchaoin W, Pereira de Sousa I, Netsomboon K, Lam HT, Laffleur F, Bernkop-Schnürch A. Development and in vitro evaluation of zeta potential changing self-emulsifying drug delivery systems for enhanced mucus permeation. *Int J Pharm*. août 2016;510(1):255-62.
314. Pereira de Sousa I, Steiner C, Schmutzler M, Wilcox MD, Veldhuis GJ, Pearson JP, et al. Mucus permeating carriers: formulation and characterization of highly densely charged nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. nov 2015;97:273-9.
315. Olmsted SS, Padgett JL, Yudin AI, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Diffusion of Macromolecules and Virus-Like Particles in Human Cervical Mucus. *Biophys J*. oct 2001;81(4):1930-7.
316. Shan W, Zhu X, Tao W, Cui Y, Liu M, Wu L, et al. Enhanced Oral Delivery of Protein Drugs Using Zwitterion-Functionalized Nanoparticles to Overcome both the Diffusion and Absorption Barriers. *ACS Appl Mater Interfaces*. 28 sept 2016;8(38):25444-53.
317. Perry SL, McClements DJ. Recent Advances in Encapsulation, Protection, and Oral Delivery of Bioactive Proteins and Peptides using Colloidal Systems. *Molecules*. 5 mars 2020;25(5):1161.
318. Maldonado-Contreras AL, McCormick BA. Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity. *Cell Tissue Res*. janv 2011;343(1):5-12.
319. Sokol CL, Luster AD. The Chemokine System in Innate Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. mai 2015;7(5):a016303.
320. Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, Avila PC. Epithelium: At the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. déc 2007;120(6):1279-84.
321. Hu K, Luo S, Tong L, Huang X, Jin W, Huang W, et al. CCL19 and CCL28 Augment Mucosal and Systemic Immune Responses to HIV-1 gp140 by Mobilizing Responsive Immunocytes into Secondary Lymph Nodes and Mucosal Tissue. *J Immunol*. 15 août 2013;191(4):1935-47.
322. Norling K, Bernasconi V, Agmo Hernández V, Parveen N, Edwards K, Lycke NY, et al. Gel Phase 1,2-Distearoyl- *sn* -glycero-3-phosphocholine-Based Liposomes Are Superior to Fluid Phase Liposomes at Augmenting Both Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class II and Costimulatory Molecule Display by Dendritic Cells *in Vitro*. *ACS Infect Dis*. 8 nov 2019;5(11):1867-78.
323. Kohnepoushi C, Nejati V, Delirez N, Biparva P. Poly Lactic-co-Glycolic Acid Nanoparticles Containing Human Gastric Tumor Lysates as Antigen Delivery Vehicles for Dendritic Cell-Based Antitumor Immunotherapy. *Immunol Invest*. nov 2019;48(8):794-808.
324. Kobayashi KS, van den Elsen PJ. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol*. déc 2012;12(12):813-20.
325. Foster S, Duvall CL, Crownover EF, Hoffman AS, Stayton PS. Intracellular Delivery of a Protein Antigen with an Endosomal-Releasing Polymer Enhances CD8 T-Cell Production and Prophylactic Vaccine Efficacy. *Bioconjug Chem*. 15 déc 2010;21(12):2205-12.

326. Dong H, Wen Z, Chen L, Zhou N, Liu H, Dong S, et al. Polyethyleneimine modification of aluminum hydroxide nanoparticle enhances antigen transportation and cross-presentation of dendritic cells. *Int J Nanomedicine*. juin 2018;Volume 13:3353-65.
327. Kye Y-C, Park S-M, Shim B-S, Firdous J, Kim G, Kim HW, et al. Intranasal immunization with pneumococcal surface protein A in the presence of nanoparticle forming polysorbitol transporter adjuvant induces protective immunity against the *Streptococcus pneumoniae* infection. *Acta Biomater*. mai 2019;90:362-72.
328. Li P, Luo Z, Liu P, Gao N, Zhang Y, Pan H, et al. Bioreducible alginate-poly(ethylenimine) nanogels as an antigen-delivery system robustly enhance vaccine-elicited humoral and cellular immune responses. *J Controlled Release*. juin 2013;168(3):271-9.
329. Miura N, Akita H, Tateshita N, Nakamura T, Harashima H. Modifying Antigen-Encapsulating Liposomes with KALA Facilitates MHC Class I Antigen Presentation and Enhances Anti-tumor Effects. *Mol Ther*. avr 2017;25(4):1003-13.
330. Yuba E, Kojima C, Harada A, Tana, Watarai S, Kono K. pH-Sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a carrier of antigenic proteins for activation of cellular immunity. *Biomaterials*. févr 2010;31(5):943-51.
331. Wu J, Ma G. Biomimic strategies for modulating the interaction between particle adjuvants and antigen-presenting cells. *Biomater Sci*. 2020;10.1039.C9BM02098E.
332. Mottram PL, Leong D, Crimeen-Irwin B, Gloster S, Xiang SD, Meanger J, et al. Type 1 and 2 Immunity Following Vaccination Is Influenced by Nanoparticle Size: Formulation of a Model Vaccine for Respiratory Syncytial Virus. *Mol Pharm*. févr 2007;4(1):73-84.
333. Yue H, Wei W, Yue Z, Lv P, Wang L, Ma G, et al. Particle size affects the cellular response in macrophages. *Eur J Pharm Sci*. déc 2010;41(5):650-7.
334. Hong X, Zhong X, Du G, Hou Y, Zhang Y, Zhang Z, et al. The pore size of mesoporous silica nanoparticles regulates their antigen delivery efficiency. *Sci Adv*. juin 2020;6(25):eaaz4462.
335. Fromen CA, Robbins GR, Shen TW, Kai MP, Ting JPY, DeSimone JM. Controlled analysis of nanoparticle charge on mucosal and systemic antibody responses following pulmonary immunization. *Proc Natl Acad Sci*. 13 janv 2015;112(2):488-93.
336. Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, et al. Gold Nanoparticles as a Vaccine Platform: Influence of Size and Shape on Immunological Responses *in Vitro* and *in Vivo*. *ACS Nano*. 28 mai 2013;7(5):3926-38.
337. Cui J, Rose RD, Best JP, Johnston APR, Alcantara S, Liang K, et al. Mechanically Tunable, Self-Adjuvanting Nanoengineered Polypeptide Particles. *Adv Mater*. 2013;25(25):3468-72.
338. Temchura VV, Kozlova D, Sokolova V, Überla K, Epple M. Targeting and activation of antigen-specific B-cells by calcium phosphate nanoparticles loaded with protein antigen. *Biomaterials*. juill 2014;35(23):6098-105.
339. Bennett NR, Zwick DB, Courtney AH, Kiessling LL. Multivalent Antigens for Promoting B and T Cell Activation. *ACS Chem Biol*. 21 août 2015;10(8):1817-24.

340. Brewer MG, DiPiazza A, Acklin J, Feng C, Sant AJ, Dewhurst S. Nanoparticles decorated with viral antigens are more immunogenic at low surface density. *Vaccine*. févr 2017;35(5):774-81.
341. Islam MA, Firdous J, Badruddoza AZM, Reesor E, Azad M, Hasan A, et al. M cell targeting engineered biomaterials for effective vaccination. *Biomaterials*. févr 2019;192:75-94.
342. Date Y, Ebisawa M, Fukuda S, Shima H, Obata Y, Takahashi D, et al. NALT M cells are important for immune induction for the common mucosal immune system. *Int Immunol*. 18 déc 2017;29(10):471-8.
343. Malik B, Goyal AK, Markandeywar TS, Rath G, Zakir F, Vyas SP. Microfold-cell targeted surface engineered polymeric nanoparticles for oral immunization. *J Drug Target*. janv 2012;20(1):76-84.
344. Foster N, Clark MA, Jepson MA, Hirst BH. Ulex europaeus 1 lectin targets microspheres to mouse Peyer's patch M-cells in vivo. *Vaccine*. mars 1998;16(5):536-41.
345. Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, Mishra N, Vyas SP. M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *J Drug Target*. déc 2007;15(10):701-13.
346. Gupta PN, Vyas SP. Investigation of lectinized liposomes as M-cell targeted carrier-adjuvant for mucosal immunization. *Colloids Surf B Biointerfaces*. janv 2011;82(1):118-25.
347. Ma T, Wang L, Yang T, Ma G, Wang S. M-cell targeted polymeric lipid nanoparticles containing a toll-like receptor agonist to boost oral immunity. *Int J Pharm*. oct 2014;473(1-2):296-303.
348. Du L, Yu Z, Pang F, Xu X, Mao A, Yuan W, et al. Targeted Delivery of GP5 Antigen of PRRSV to M Cells Enhances the Antigen-Specific Systemic and Mucosal Immune Responses. *Front Cell Infect Microbiol*. 25 janv 2018;8:7.
349. Azizi A, Kumar A, Diaz-Mitoma F, Mestecky J. Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells. *PLoS Pathog*. 11 nov 2010;6(11):e1001147.
350. Mishra N, Tiwari S, Vaidya B, Agrawal GP, Vyas SP. Lectin anchored PLGA nanoparticles for oral mucosal immunization against hepatitis B. *J Drug Target*. janv 2011;19(1):67-78.
351. D'Souza B, Bhowmik T, Shashidharamurthy R, Oettinger C, Selvaraj P, D'Souza M. Oral microparticulate vaccine for melanoma using M-cell targeting. *J Drug Target*. févr 2012;20(2):166-73.
352. Long P, Zhang Q, Xue M, Cao G, Li C, Chen W, et al. Tomato lectin-modified nanoemulsion-encapsulated MAGE1-HSP70/SEA complex protein vaccine: Targeting intestinal M cells following peroral administration. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. juill 2019;115:108886.
353. Rochereau N, Drocourt D, Perouzel E, Pavot V, Redelinguys P, Brown GD, et al. Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol*. sept 2013;11(9):e1001658.
354. Zhou F. Mucosal IgA response to rectally administered antigen formulated in IgA-coated liposomes. *Vaccine*. 1995;13(7):637-44.



355. Sharma S, Benson HAE, Mukkur TKS, Rigby P, Chen Y. Preliminary studies on the development of IgA-loaded chitosan–dextran sulphate nanoparticles as a potential nasal delivery system for protein antigens. *J Microencapsul.* mai 2013;30(3):283-94.
356. Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim D-Y, et al. A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *J Exp Med.* 26 nov 2007;204(12):2789-96.
357. Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature.* nov 2009;462(7270):226-30.
358. Shima H, Watanabe T, Fukuda S, Fukuoka S-I, Ohara O, Ohno H. A novel mucosal vaccine targeting Peyer's patch M cells induces protective antigen-specific IgA responses. *Int Immunol.* nov 2014;26(11):619-25.
359. Gullberg E, Keita AV, Salim SY, Andersson M, Caldwell KD, Söderholm JD, et al. Identification of cell adhesion molecules in the human follicle-associated epithelium that improve nanoparticle uptake into the Peyer's patches. *J Pharmacol Exp Ther.* nov 2006;319(2):632-9.
360. Garinot M, Fiévez V, Pourcelle V, Stoffelbach F, des Rieux A, Plapied L, et al. PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *J Controlled Release.* juill 2007;120(3):195-204.
361. Kim S-H, Jung D-I, Yang I-Y, Kim J, Lee K-Y, Nochi T, et al. M cells expressing the complement C5a receptor are efficient targets for mucosal vaccine delivery. *Eur J Immunol.* nov 2011;41(11):3219-29.
362. Kim S-H, Jung D-I, Yang I-Y, Jang S-H, Kim J, Truong TT, et al. Application of an M-cell-targeting ligand for oral vaccination induces efficient systemic and mucosal immune responses against a viral antigen. *Int Immunol.* nov 2013;25(11):623-32.
363. Yoo M-K, Kang S-K, Choi J-H, Park I-K, Na H-S, Lee H-C, et al. Targeted delivery of chitosan nanoparticles to Peyer's patch using M cell-homing peptide selected by phage display technique. *Biomaterials.* oct 2010;31(30):7738-47.
364. Jiang T, Singh B, Li H-S, Kim Y-K, Kang S-K, Nah J-W, et al. Targeted oral delivery of BmpB vaccine using porous PLGA microparticles coated with M cell homing peptide-coupled chitosan. *Biomaterials.* févr 2014;35(7):2365-73.
365. Longet S, Lundahl MLE, Lavelle EC. Targeted Strategies for Mucosal Vaccination. *Bioconjug Chem.* 21 mars 2018;29(3):613-23.
366. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol.* déc 2012;92(6):1177-86.
367. Yang R, Xu J, Xu L, Sun X, Chen Q, Zhao Y, et al. Cancer Cell Membrane-Coated Adjuvant Nanoparticles with Mannose Modification for Effective Anticancer Vaccination. *ACS Nano.* 26 juin 2018;12(6):5121-9.
368. Wu M, Zhao H, Li M, Yue Y, Xiong S, Xu W. Intranasal Vaccination with Mannosylated Chitosan Formulated DNA Vaccine Enables Robust IgA and Cellular Response Induction in the Lungs of Mice and Improves Protection against Pulmonary Mycobacterial Challenge. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:445.

369. Harde H, Siddhapura K, Agrawal AK, Jain S. Divalent toxoids loaded stable chitosan–glucomannan nanoassemblies for efficient systemic, mucosal and cellular immunostimulatory response following oral administration. *Int J Pharm.* juin 2015;487(1-2):292-304.
370. Jain S, Indulkar A, Harde H, Agrawal AK. Oral mucosal immunization using glucomannosylated bilosomes. *J Biomed Nanotechnol.* juin 2014;10(6):932-47.
371. De Smet R, Allais L, Cuvelier CA. Recent advances in oral vaccine development: Yeast-derived  $\beta$ -glucan particles. *Hum Vaccines Immunother.* 8 mai 2014;10(5):1309-18.
372. Lee D-Y, Nurunnabi M, Kang SH, Nafiujjaman M, Huh KM, Lee Y, et al. Oral Gavage Delivery of PR8 Antigen with  $\beta$ -Glucan-Conjugated GRGDS Carrier to Enhance M-Cell Targeting Ability and Induce Immunity. *Biomacromolecules.* 10 avr 2017;18(4):1172-9.
373. Shrimpton RE, Butler M, Morel A-S, Eren E, Hue SS, Ritter MA. CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Mol Immunol.* mars 2009;46(6):1229-39.
374. Raghuwanshi D, Mishra V, Das D, Kaur K, Suresh MR. Dendritic Cell Targeted Chitosan Nanoparticles for Nasal DNA Immunization against SARS CoV Nucleocapsid Protein. *Mol Pharm.* 2 avr 2012;9(4):946-56.
375. Kaurav M, Madan J, Sudheesh MS, Pandey RS. Combined adjuvant-delivery system for new generation vaccine antigens: alliance has its own advantage. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 12 nov 2018;46(sup3):S818-31.
376. Shirai S, Shibuya M, Kawai A, Tamiya S, Munakata L, Omata D, et al. Lipid Nanoparticles Potentiate CpG-Oligodeoxynucleotide-Based Vaccine for Influenza Virus. *Front Immunol.* 9 janv 2020;10:3018.
377. Saraf S, Jain S, Sahoo RN, Mallick S. Lipopolysaccharide derived alginate coated Hepatitis B antigen loaded chitosan nanoparticles for oral mucosal immunization. *Int J Biol Macromol.* 16 mars 2020;154:466-76.
378. Sahu KK, Pandey RS. Development and characterization of HBsAg-loaded Eudragit nanoparticles for effective colonic immunization. *Pharm Dev Technol.* 7 févr 2019;24(2):166-75.
379. Wang C, Zhu W, Luo Y, Wang B-Z. Gold nanoparticles conjugating recombinant influenza hemagglutinin trimers and flagellin enhanced mucosal cellular immunity. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* juin 2018;14(4):1349-60.
380. Tada R, Muto S, Iwata T, Hidaka A, Kiyono H, Kunisawa J, et al. Attachment of class B CpG ODN onto DOTAP/DC-chol liposome in nasal vaccine formulations augments antigen-specific immune responses in mice. *BMC Res Notes.* déc 2017;10(1):68.
381. Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A, et al. Efficient Immunization and Cross-Priming by Vaccine Adjuvants Containing TLR3 or TLR9 Agonists Complexed to Cationic Liposomes. *J Immunol.* 15 juin 2006;176(12):7335-45.
382. Hu KF, Lövgren-Bengtsson K, Morein B. Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev.* 23 sept 2001;51(1-3):149-59.

383. Rimmelzwaan GF, Baars M, van Beek R, van Amerongen G, Lövgren-Bengtsson K, Claas EC, et al. Induction of protective immunity against influenza virus in a macaque model: comparison of conventional and iscom vaccines. *J Gen Virol.* avr 1997;78 ( Pt 4):757-65.
384. Hu KF, Elvander M, Merza M, Akerblom L, Brandenburg A, Morein B. The immunostimulating complex (ISCOM) is an efficient mucosal delivery system for respiratory syncytial virus (RSV) envelope antigens inducing high local and systemic antibody responses. *Clin Exp Immunol.* août 1998;113(2):235-43.
385. Van Pinxteren LA, Campbell I, Clarke CJ, Snodgrass DR, Bruce MG. A single oral dose of inactivated rotavirus and ISCOM matrices induces partial protection in lambs. *Biochem Soc Trans.* mai 1997;25(2):340S.
386. Baz Morelli A, Becher D, Koernig S, Silva A, Drane D, Maraskovsky E. ISCOMATRIX: a novel adjuvant for use in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases. *J Med Microbiol.* 1 juill 2012;61(7):935-43.
387. Bigaeva E, Doorn E van, Liu H, Hak E. Meta-Analysis on Randomized Controlled Trials of Vaccines with QS-21 or ISCOMATRIX Adjuvant: Safety and Tolerability. Sambhara S, éditeur. *PLOS ONE.* 5 mai 2016;11(5):e0154757.
388. Garçon N, Van Mechelen M. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing Adjuvant Systems. *Expert Rev Vaccines.* avr 2011;10(4):471-86.
389. Rappuoli R, Mandl CW, Black S, De Gregorio E. Vaccines for the twenty-first century society. *Nat Rev Immunol.* déc 2011;11(12):865-72.
390. Moyer TJ, Zmolek AC, Irvine DJ. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *J Clin Invest.* 1 mars 2016;126(3):799-808.
391. Wiley JA, Richert LE, Swain SD, Harmsen A, Barnard DL, Randall TD, et al. Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Elicited by a Protein Cage Nanoparticle Enhances Protection in Mice against Diverse Respiratory Viruses. Zimmer J, éditeur. *PLoS ONE.* 23 sept 2009;4(9):e7142.
392. Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T, Sigurdson C, Wagner H, Akira S, et al. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med.* févr 2004;10(2):187-92.
393. Lemoine C, Thakur A, Krajišnik D, Guyon R, Longet S, Razim A, et al. Technological Approaches for Improving Vaccination Compliance and Coverage. *Vaccines.* 16 juin 2020;8(2):304.
394. Benne N, van Duijn J, Kuiper J, Jiskoot W, Slütter B. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *J Controlled Release.* juill 2016;234:124-34.
395. White MT, Verity R, Griffin JT, Asante KP, Owusu-Agyei S, Greenwood B, et al. Immunogenicity of the RTS,S/AS01 malaria vaccine and implications for duration of vaccine efficacy: secondary analysis of data from a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* déc 2015;15(12):1450-8.

396. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *The Lancet*. juill 2015;386(9988):31-45.
397. Wee JLK, Scheerlinck J-PY, Snibson KJ, Edwards S, Pearse M, Quinn C, et al. Pulmonary delivery of ISCOMATRIX influenza vaccine induces both systemic and mucosal immunity with antigen dose sparing. *Mucosal Immunol*. nov 2008;1(6):489-96.
398. Leroux-Roels I, Devaster J-M, Leroux-Roels G, Verlant V, Henckaerts I, Moris P, et al. Adjuvant system AS02V enhances humoral and cellular immune responses to pneumococcal protein PhtD vaccine in healthy young and older adults: Randomised, controlled trials. *Vaccine*. janv 2015;33(4):577-84.
399. Laurens MB, Thera MA, Coulibaly D, Ouattara A, Kone AK, Guindo AB, et al. Extended Safety, Immunogenicity and Efficacy of a Blood-Stage Malaria Vaccine in Malian Children: 24- Month Follow-Up of a Randomized, Double-Blinded Phase 2 Trial. *PLOS ONE*. 2013;8(11):9.
400. Charlton Hume HK, Vidigal J, Carrondo MJT, Middelberg APJ, Roldão A, Lua LHL. Synthetic biology for bioengineering virus-like particle vaccines: CHARLTON HUME ET AL. *Biotechnol Bioeng*. avr 2019;116(4):919-35.
401. Quan F-S, Ko E-J, Kwon Y-M, Joo KH, Compans RW, Kang S-M. Mucosal Adjuvants for Influenza Virus-Like Particle Vaccine. *Viral Immunol*. déc 2013;26(6):385-95.
402. Rosales-Mendoza S, González-Ortega O. Virus-Like Particles-Based Mucosal Nanovaccines. In: *Nanovaccines* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cité 23 sept 2020]. p. 267-318. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-31668-6\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-31668-6_10)
403. Dombu CY, Kroubi M, Zibouche R, Matran R, Betbeder D. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. *Nanotechnology*. 2010;21(35):355102.
404. Fasquelle F, Carpentier R, Demouveau B, Desseyn J-L, Betbeder D. Importance of the Phospholipid Core for Mucin Hydrogel Penetration and Mucosal Cell Uptake of Maltodextrin Nanoparticles. *ACS Appl Bio Mater*. 13 août 2020;acsabm.0c00521.
405. Tokuhiko T. Temperature Dependence of Density of Polymer Gels 1. A Pycnometry Method Applied to Poly( *N*-isopropylacrylamide)-Water System. *J Phys Chem B*. août 1999;103(34):7097-101.
406. Qin Y, Liu C, Jiang S, Xiong L, Sun Q. Characterization of starch nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Influence of amylose content and starch type. *Ind Crops Prod*. sept 2016;87:182-90.
407. Starner TD, Barker CK, Jia HP, Kang Y, McCray PB. CCL20 Is an Inducible Product of Human Airway Epithelia with Innate Immune Properties. *Am J Respir Cell Mol Biol*. nov 2003;29(5):627-33.
408. Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, Gordon T. Airway Epithelial Cells Release MIP-3 $\alpha$ /CCL20 in Response to Cytokines and Ambient Particulate Matter. *Am J Respir Cell Mol Biol*. juin 2003;28(6):648-54.

409. Berri M, Virlogeux-Payant I, Chevaleyre C, Melo S, Zanello G, Salmon H, et al. CCL28 involvement in mucosal tissues protection as a chemokine and as an antibacterial peptide. *Dev Comp Immunol.* juin 2014;44(2):286-90.
410. Song G, Yang H, Shen N, Pham P, Brown B, Lin X, et al. An Immunomodulatory Therapeutic Vaccine Targeting Oligomeric Amyloid- $\beta$ . *J Alzheimers Dis JAD.* 5 sept 2020;
411. Ozgen MH, Blume S. The continuing search for an addiction vaccine. *Vaccine.* 23 2019;37(36):5485-90.
412. Thomas S, Prendergast GC. Cancer Vaccines: A Brief Overview. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2016;1403:755-61.
413. Lung P, Yang J, Li Q. Nanoparticle formulated vaccines: opportunities and challenges. *Nanoscale.* 2020;10.1039.C9NR08958F.
414. Saha RP, Sharma AR, Singh MK, Samanta S, Bhakta S, Mandal S, et al. Repurposing Drugs, Ongoing Vaccine, and New Therapeutic Development Initiatives Against COVID-19. *Front Pharmacol.* 19 août 2020;11:1258.
415. Corbett KS, Flynn B, Foulds KE, Francica JR, Boyoglu-Barnum S, Werner AP, et al. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *N Engl J Med.* 28 juill 2020;NEJMoa2024671.
416. Zhu F-C, Guan X-H, Li Y-H, Huang J-Y, Jiang T, Hou L-H, et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet.* août 2020;396(10249):479-88.
417. Laffleur F, Bernkop-Schnürch A. Strategies for improving mucosal drug delivery. *Nanomed.* déc 2013;8(12):2061-75.
418. Laffleur F. Mucoadhesive polymers for buccal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* mai 2014;40(5):591-8.
419. Gutierrez I, Hernández RM, Igartua M, Gascón AR, Pedraz JL. Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. *Vaccine.* 22 nov 2002;21(1-2):67-77.
420. Caetano LA, Almeida AJ, Gonçalves LMD. Approaches to tuberculosis mucosal vaccine development using nanoparticles and microparticles: a review. *J Biomed Nanotechnol.* sept 2014;10(9):2295-316.
421. Ensign LM, Henning A, Schneider CS, Maisel K, Wang Y-Y, Porosoff MD, et al. *Ex Vivo* Characterization of Particle Transport in Mucus Secretions Coating Freshly Excised Mucosal Tissues. *Mol Pharm.* 3 juin 2013;10(6):2176-82.
422. Huckaby JT, Lai SK. PEGylation for enhancing nanoparticle diffusion in mucus. *Adv Drug Deliv Rev.* janv 2018;124:125-39.
423. Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. The Polyethyleneglycol Dilemma: Advantage and Disadvantage of PEGylation of Liposomes for Systemic Genes and Nucleic Acids Delivery to Tumors. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(6):892-9.

424. Lechanteur A, das Neves J, Sarmiento B. The role of mucus in cell-based models used to screen mucosal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* janv 2018;124:50-63.
425. Armstrong NA, Minchom CM, Patel VJ. Density Determination of Powders by Liquid Displacement Methods. *Drug Dev Ind Pharm.* janv 1989;15(4):549-59.
426. Takeiti CY, Kieckbusch TG, Collares-Queiroz FP. Morphological and Physicochemical Characterization of Commercial Maltodextrins with Different Degrees of Dextrose-Equivalent. *Int J Food Prop.* 24 févr 2010;13(2):411-25.
427. Minelli C, Sikora A, Garcia-Diez R, Sparnacci K, Gollwitzer C, Krumrey M, et al. Measuring the size and density of nanoparticles by centrifugal sedimentation and flotation. *Anal Methods.* 2018;10(15):1725-32.
428. Albert C, Huang N, Tsapis N, Geiger S, Rosilio V, Mekhloufi G, et al. Bare and Sterically Stabilized PLGA Nanoparticles for the Stabilization of Pickering Emulsions. *Langmuir.* 20 nov 2018;34(46):13935-45.
429. Yazdimamaghani M, Barber ZB, Hadipour Moghaddam SP, Ghandehari H. Influence of Silica Nanoparticle Density and Flow Conditions on Sedimentation, Cell Uptake, and Cytotoxicity. *Mol Pharm.* 4 juin 2018;15(6):2372-83.
430. Stange U, Scherf-Clavel M, Gieseler H. Application of Gas Pycnometry for the Density Measurement of Freeze-Dried Products. *J Pharm Sci.* nov 2013;102(11):4087-99.
431. Guo P, Liu D, Subramanyam K, Wang B, Yang J, Huang J, et al. Nanoparticle elasticity directs tumor uptake. *Nat Commun.* déc 2018;9(1):130.
432. Vazquez MI, Catalan-Dibene J, Zlotnik A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. 2016;23.
433. Nagakubo D, Yoshie O, Hirata T. Upregulated CCL28 expression in the nasal mucosa in experimental allergic rhinitis: Implication for CD4(+) memory T cell recruitment. *Cell Immunol.* avr 2016;302:58-62.