

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX NANOVACCINS
À BASE DE PEPTIDES AUTO-ASSEMBLÉS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MARGARYTA BABYCH

JANVIER 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier mes directeurs de recherche, Pr Steve Bourgault et Pr Denis Archambault de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet exceptionnel et du temps qu'ils m'ont accordé.

J'aimerais également remercier les organismes subventionnaires IRSC/CRSNG ainsi que le programme Action Concertée en Santé pour leur soutien financier, sans lequel ces travaux n'auraient pas eu lieu.

J'aimerais aussi remercier tous mes collègues étudiants des laboratoires Bourgault et Archambault, soit Trang, Ximena, Sulttan, Noé, Mathew, Guillaume, Élisabeth, Geneviève, Laurie, Claude, Marlène, Dominic pour les beaux moments. Un merci spécial à Trang, pour ton support.

Grand merci à ma famille de m'avoir encouragé tout au long de ce parcours. Je vous aime beaucoup!

Max, à chacun de ces moments, tu étais là, je ne te remercierais jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi.

Merci!

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	ix
RÉSUMÉ	xii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Vaccins : une brève introduction	1
1.2 Mécanismes de réponse immunitaire et acteurs de la réponse immune	1
1.2.1 Immunité innée	3
1.2.2 Immunité adaptative	5
1.3 Les vaccins.....	8
1.3.1 Un aperçu des vaccins traditionnels	9
1.3.2 Les enjeux de la vaccinologie moderne.....	11
1.3.3 Adjuvant	12
1.4 Utilisation de structures protéiques auto-assemblées en tant que plateforme vaccinale	15
1.4.1 Particules pseudo-virales	15
1.4.2 Auto-assemblage moléculaire	17
1.5 Amyloïde.....	19
1.5.1 Structure (supra)moléculaire des fibres amyloïdes	21
1.5.2 Mécanisme d'auto-assemblage amyloïde	24
1.5.3 Cytotoxicité	26
1.6 Peptides amphiphiles	28
1.6.1 Conception de nanostructures auto-assemblées à base de peptides amphiphiles	29
1.6.2 Mécanismes d'auto-assemblage de peptides amphiphiles	31
1.7 Modèles antigéniques peptidiques	33

1.7.1 Virus Chikungunya.....	33
1.7.2 Virus de l'Influenza aviaire.....	35
1.8 Problématique et sujet d'étude	36
1.8.1 Hypothèse.....	38
1.8.2 Objectifs du projet.....	38
CHAPITRE II	
ENGINEERING AND EVALUATION OF SELF-ASSEMBLED AMYLOID NANOPARTICLES AS POTENTIAL VACCINES.....	39
2.1 Résumé.....	41
2.2 Abstract.....	42
2.3 Introduction.....	43
2.4 Materials and methods.....	46
2.4.1 Peptide synthesis, purification and characterization.....	46
2.4.2 Preparation of self-assembled amyloid fibrils and E2EP3-KLH conjugate	46
2.4.3 Thioflavin T fluorescence.....	47
2.4.4 Circular dichroism spectroscopy	47
2.4.5 Transmission electron microscopy.....	48
2.4.6 Atomic force microscopy.....	48
2.4.7 Enzyme-linked immunosorbent assay for epitope accessibility.....	49
2.4.8 Cell viability assay	49
2.4.9 Evaluation of cellular uptake by confocal microscopy and flow cytometry.....	50
2.4.10 Mice immunization.....	50
2.4.11 Determination of anti-E2EP3 antibody titers.....	51
2.5 Results and discussion	52
2.5.1 Design and characterization of amyloid-based nanovaccines	52
2.5.2 Availability of epitopes on the surface of amyloid fibrils.....	54
2.5.3 I ₁₀ amyloid-based nanovaccines are cytocompatible.....	55
2.5.4 Amyloid fibrils are efficiently internalized by macrophages	56

2.5.5 Evaluation of the immune response in mice.....	58	
2.6 Conclusion	59	
2.7 Figures.....	61	
2.8 Acknowledgements.....	67	
2.9 Supporting information.....	68	
CHAPITRE III		
DÉVELOPEMENT ET CARACTÉRISATION DE MICELLES		
CYLINDRIQUES		70
3.1 Mise en contexte	70	
3.2 Matériels et méthodes	71	
3.2.1 Synthèse, purification et caractérisation des peptides amphiphiles.....	71	
3.2.2 Préparation de fibrilles.....	71	
3.2.3 Spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD).....	72	
3.2.4 Microscopie à force atomique	72	
3.3 Résultats et discussion	72	
3.3.1 Auto-assemblage des peptides amphiphiles en fonction du pH	72	
3.3.2 Auto-assemblage du peptide amphiphile chimérique	76	
3.3 Conclusion	79	
CHAPITRE IV		
DISCUSSION GÉNÉRALE		81
4.1 Discussion générale	81	
4.2 Conclusion et perspectives.....	88	
BIBLIOGRAPHIE	91	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Exemples de vaccins vivants atténués utilisés chez l'homme	10
1.2 Exemples de vaccins inactivés commerciaux utilisés chez l'homme.....	11
1.3 Principaux PAMP actuellement utilisés ou en cours d'étude en tant qu'adjuvants potentiels.....	15
1.4 Exemples de pathologies humaines associées à la formation de dépôts amyloïdes	20
1.5 Exemples d'amyloïdes fonctionnels dans des différents organismes.....	21

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Représentation schématique des principales voies de la réponse immunitaire ...	2
1.2 Exemples de cellules du système immunitaire adaptatif qui reconnaissent et dirigent la réponse contre les pathogènes	5
1.3 Tailles des systèmes de délivrance adjuvant et les dimensions de différents agents pathogènes	14
1.4 Les trois composantes d'un vaccin sous-unitaires optimal.....	14
1.5 Particules fibrillaires auto-assemblées à base de peptides.....	18
1.6 Organisation moléculaire des fibres amyloïdes en structure quaternaire en feuillets- β -croisés.....	23
1.7 Représentation du mécanisme de formation de fibres amyloïdes par polymérisation nucléation-dépendante	26
1.8 Résumé des effets cytotoxiques induits par des intermédiaires de phase de latence de l'IAPP.....	28
1.9 Schéma représentatif de la structure moléculaire d'un peptide amphiphile.....	30
1.10 Illustration schématique de l'auto-assemblage de peptides amphiphiles affichant un nombre différent de carbone au niveau des chaînes alkyles en milieu acide, neutre ou basique	32
2.1 Design of self-assembled amyloid cross- β -sheet nanovaccine.....	61
2.2 Self-assembly and conformational transition of chimeric peptides.....	62
2.3 Supramolecular analysis of amyloid fibrils.	63
2.4 Availability of functional epitopes on fibril surface.....	64
2.5 Cytocompatibility of E2EP3-I ₁₀ amyloid fibrils.....	65
2.6 Cellular uptake of amyloid fibrils by macrophages.....	66
2.7 Adjuvanted IgG responses against E2EP3	67
2.8 ThT fluorescence and AFM images of E2EP3 and M2e peptide epitopes after 96 h. incubation under constant agitation.....	68
2.9 Representative AFM images of I ₁₀ amyloid assemblies after 96 h. incubation	68
2.10 Immunogold labeling of I ₁₀ amyloid assemblies observed by transmission electron microscopy.....	69
2.11 CD analysis of fluorescent labelled E2EP3-I ₁₀ fibrils	69
3.1 Schéma représentatif de la structure moléculaire et la séquence des peptides amphiphiles utilisés	73
3.2 Spectres de dichroïsme circulaire du peptide amphiphile à différents pH en fonction du temps	75
3.3 Analyse supramoléculaire par microscopie à force atomique des peptides amphiphiles en fonction du pH.....	76

3.4	Spectres de dichroïsme circulaire du peptide amphiphile C ₁₆ -V ₃ A ₃ K ₃ et du peptide amphiphile fonctionnalisé avec l'épitope E2EP3 en fonction du temps.....	78
3.5	Analyse supramoléculaire par la microscopie à force atomique du peptide amphiphile C ₁₆ -V ₃ A ₃ K ₃ et du peptide amphiphile fonctionnalisé avec l'épitope E2EP3 en fonction du temps	79
4.1	Comparaison de la réponse en anticorps induite par E2EP3 chez les souris vaccinées.....	87

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

ADN	acide désoxyribonucléique
AFM	microscopie à force atomique
Alum	sels d'aluminium
APCs	<i>antigen-presenting cells</i>
ARN	acide ribonucléique
BCR	<i>B-cell receptor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	dichroïsme circulaire
CD4+	cluster de différenciation 4
CD8+	cluster de différenciation 8
CHIKF	fièvre Chikungunya
CHIKV	virus Chikungunya
CPA	cellules présentatrices d'antigène
CpG	C-phosphate-G
CTL	cellules cytotoxiques
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DC	cellules dendritiques
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthyle sulfoxyde

DO	densité optique
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EU	<i>endotoxin units</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FITC	fluorescein isothiocyanate
Fmoc	fluorenylmethyloxycarbonyl
FTIR	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
HA	hémagglutinine
HCTU	2-(6-chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiun hexafluorophosphate
(h)IAPP	<i>(humain) islet amyloid polypeptide</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleukine
ISCOM	complexes immunostimulants
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
Ig	immunoglobuline
LPS	lipopolysaccharide
LT	lymphocyte T
MET	microscopie électronique à transmission
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>

MRE	<i>mean residue ellipticity</i>
MS	spectrométrie de masse
NA	neuraminidase
NK	<i>natural killer cells</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	tampon phosphate salin
PPV	particules pseudo-virales
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
rIAPP	<i>rat islet amyloid polypeptide</i>
RLR	<i>RIG-like receptor</i>
RT	room temperature
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TEM	<i>transmission electron microscopy</i>
TFA	trifluoroacetic acid
Th	<i>T helper</i>
ThT	Thioflavine T
TIR	<i>Toll/Interleukine-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

RÉSUMÉ

La vaccination constitue l'une des découvertes scientifiques les plus significatives du siècle dernier pour l'amélioration de la santé, autant chez l'homme que chez les animaux domestiques. Néanmoins, le développement de nouvelles stratégies de vaccination demeure encore aujourd'hui un défi important. Les vaccins classiques sont basés selon le concept d'introduction du pathogène entier et leur efficacité est souvent compliquée par le risque lié à la sécurité et à la stabilité du vaccin. Ainsi, des vaccins alternatifs sous-unitaires, basés sur des fragments antigéniques de l'agent pathogène, ont été développés. Toutefois, ceux-ci sont beaucoup moins immunogènes et n'induisent souvent qu'une protection partielle. Au cours de la dernière décennie, le développement de nanoparticules arborant une forte densité de déterminants antigéniques à leur surface a fait l'objet d'étude afin d'augmenter l'immunogénicité des vaccins sous-unitaires et de répondre aux problèmes de sécurité des vaccins conventionnels. Dans le cadre de ce projet, de nouveaux nanovaccins entièrement synthétiques basés sur des séquences peptidiques affichant des propriétés d'auto-assemblage élevées ont été développés.

Deux différentes plateformes peptidiques ont été étudiées. La première à base d'une courte séquence peptidique amyloïdogénique naturelle, qui suite à son auto-assemblage, forme des fibres amyloïdes. La deuxième repose sur la formation de micelles cylindriques suite à l'association organisée de peptides amphiphiles synthétiques. Les propriétés structurales des nanofilaments conjugués respectivement avec deux épitopes antigéniques dérivés du virus Chikungunya et du virus de l'Influenza aviaire ont été étudiées par une combinaison d'approches biophysiques, incluant la spectroscopie par dichroïsme circulaire, la fluorescence et la microscopie à force atomique. Bien que ces deux types de peptides aient démontré une forte capacité d'auto-assemblage, la conjugaison covalente d'un antigène avait une influence plus importante sur la formation des micelles cylindriques amphiphiles en comparaison aux filaments amyloïdes. Des essais d'ELISA et d'immunomarquage aux particules d'or des fibres amyloïdes ont montré une forte densité d'épitopes à la surface de ces dernières. Les études *in vitro* ont démontré que les particules amyloïdes étaient cytocompatibles et qu'elles étaient internalisées efficacement par les macrophages J774A.1, utilisés en tant que modèle de cellules présentatrices d'antigènes. Les essais d'immunisation chez la souris ont montré une forte production d'IgG dirigés contre l'épitope antigénique. Cette réponse immune dépendait de la présence de particules auto-assemblées et ne nécessitait pas la co-injection d'un adjuvant physique, tel que les sels d'aluminium (Alhydrogel). Dans l'ensemble, ce projet de recherche indique que des assemblages en feuillets- β -croisés constituent une plate-forme nanovaccinale appropriée afin d'ancrer des épitopes et d'augmenter l'immunogénicité d'antigènes peptidiques.

Mots clés : nanovaccins, auto-assemblage, peptides, fibres amyloïdes, micelles cylindriques, peptides amphiphiles, réponse immunitaire.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Vaccins : une brève introduction

Pour faire face aux infections, l'homme et les animaux supérieurs ont développé un système de défense élaboré nommé système immunitaire. Cependant, la vaccination demeure l'outil de contrôle de premier choix des infections virales. Le concept de la vaccination a été développé grâce aux travaux d'Edward Jenner et de Louis Pasteur. L'utilisation des vaccins à base de virus atténués ou inactivés a permis de diminuer grandement la mortalité associée aux maladies infectieuses, comme la variole humaine lors des épidémies (Plotkin, 2005). La vaccination imite une infection microbienne permettant la stimulation du système immunitaire pour prévenir le développement d'une maladie et/ou l'orientation de la réponse immunitaire contre un envahisseur d'une pathologie ciblée. Son rôle est de générer des cellules dites mémoire contre des pathogènes spécifiques afin d'acquérir une protection à long terme (Plotkin et Plotkin, 2011; Smith, 2011). De plus, de nouvelles stratégies en vaccination peuvent contribuer à la santé en prévenant et en traitant non seulement les maladies transmissibles, mais aussi les maladies non transmissibles, tel que le cancer (Rappuoli *et al.*, 2014).

1.2 Mécanismes de réponse immunitaire et acteurs de la réponse immune

Pour assurer la protection de l'organisme, le système immunitaire possède trois principaux mécanismes de défense : les barrières externes, l'immunité innée et l'immunité adaptative (Moser et Leo, 2010). La défense externe comprend les

barrières physiques (la peau, l'épithélium, les muqueuses) et chimiques (les enzymes destructrices comme le lysozyme, les acides gastriques) qui agissent au niveau des interfaces et empêchent la pénétration de l'agresseur dans l'organisme. Les agresseurs ayant réussi à pénétrer dans l'organisme font face à la défense interne qui implique l'immunité innée et adaptative (**Fig. 1.1**).

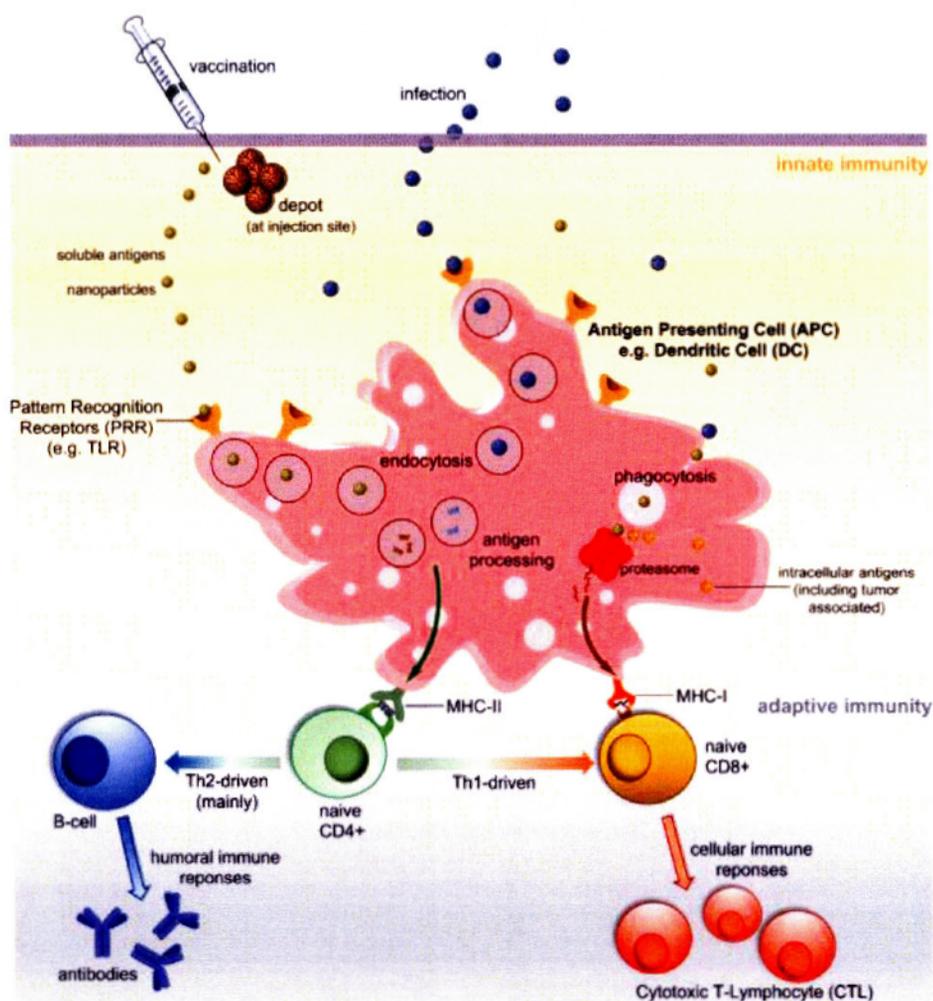


Figure 1.1 Représentation schématique des principales voies de la réponse immunitaire (Skwarczynski et Toth, 2016).

1.2.1 Immunité innée

L'immunité innée représente la première ligne de défense chez tout individu en absence d'immunisation préalable. Celle-ci intervient rapidement, mais n'est toutefois pas spécifique. Ce mécanisme de défense a pour but d'empêcher la pénétration et la prolifération d'agents infectieux dans l'organisme et ne résulte pas à une mémoire immunologique à l'égard des agents pathogènes. Ce type de protection représente une défense naturelle avec des réponses non-spécifiques. Parmi les cellules du système immunitaire inné, on retrouve les cellules résidant dans les tissus comme les macrophages et les cellules dendritiques et les cellules "mobiles" telles que les neutrophiles, éosinophiles et monocytes. Ces dernières se déplacent dans le corps via la circulation sanguine et lymphatique et peuvent être rapidement recrutées au niveau du site d'infection afin de fournir une défense immédiate contre les agents pathogènes envahissants (Moser et Leo, 2010). Contrairement aux cellules du système adaptatif, les cellules du système inné reconnaissent et répondent aux agents pathogènes de manière non spécifique. La réponse du système immunitaire inné est assurée en grande partie par les récepteurs du soi appelés PRR (du terme anglais « Pattern Recognition Receptors») et des motifs structuraux du non-soi appelés PAMP (du terme anglais « Pathogen Associated Molecular Patterns»).

Les motifs PAMP représentent généralement des structures moléculaires complexes dérivées d'agents pathogènes qui sont hautement conservées chez la majorité des micro-organismes (Turvey et Broide, 2010). Les PAMP reconnus par les PRR comprennent des lipides, des lipoprotéines, des protéines et des acides nucléiques dérivés d'une large gamme de microorganismes (Kawai et Akira, 2010). À ce jour, plusieurs classes de PRR ont été caractérisées, tels que les récepteurs Toll-like (TLR), les récepteurs RIG-like (RLR), les récepteurs NOD-like (NLR) et les récepteurs d'ADN (Kumar *et al.*, 2011). Parmi les PRR les plus étudiés, on retrouve les

récepteurs TLR qui reconnaissent une grande variété de PAMP. On les trouve sur la majorité des cellules, mais principalement au niveau des macrophages et des cellules dendritiques. Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I composées de trois régions: (1) une première région composée d'ectodomains riches en leucine qui interviennent dans la reconnaissance des PAMP; (2) une région comprenant les domaines transmembranaires; (3) un domaine intracellulaire appelé récepteur Toll/Interleukine-1 (TIR) impliqué dans la transduction du signal en aval (Kawai et Akira, 2011). La localisation cellulaire appropriée de ces récepteurs est importante pour l'accessibilité des ligands et la transmission du signal, permettant ainsi de reconnaître des pathogènes extracellulaires ou intracellulaires. Par exemple, parmi les récepteurs TLR certains sont localisés sur la surface cellulaire (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6) et permettent la reconnaissance des composants de la membrane microbienne. D'autres récepteurs sont exprimés dans les vésicules intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) et reconnaissent principalement des acides nucléiques (Blasius et Beutler, 2010; Moyle et Toth, 2013). La reconnaissance de PAMP exogènes par les récepteurs des cellules du système immunitaire inné, tel que TLR, déclenche différentes voies de signalisation qui conduisent à l'endocytose des pathogènes et mènent à l'activation du système immunitaire adaptatif. La phagocytose est une fonction importante des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques, qui mène non seulement à la destruction des microorganismes pathogènes, mais également à la production de cytokines pro-inflammatoires nécessaires pour déclencher la réponse immunitaire adaptative (Mina-Osorio et Ortega, 2005; Reichardt *et al.*, 2010).

1.2.2 Immunité adaptative

La protection offerte par le système immunitaire inné est renforcée par celle du système immunitaire adaptatif qui est la deuxième ligne de défense contre les agents infectieux. Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative, quoique moins rapide, est plus évoluée, complexe, spécifique et dotée d'une mémoire immunologique (Pancer et Cooper, 2006; Spiering, 2015). Le système immunitaire adaptatif, avec l'aide des cellules présentatrices d'antigène que sont les macrophages et les cellules dendritiques, implique principalement les cellules T et B dotées de récepteurs spécialisés qui déclenchent des réponses immunitaires spécifiques (**Fig. 1.2**). Les réponses du système adaptatif peuvent être divisées en deux grandes catégories : la réponse humorale et la réponse cellulaire. Les lymphocytes T sont principalement responsables de l'immunité cellulaire tandis que les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale. Néanmoins, ces deux types cellulaires travaillent conjointement avec d'autres types de cellules pour induire une immunité adaptative efficace (Akira, 2011; Pancer et Cooper, 2006).

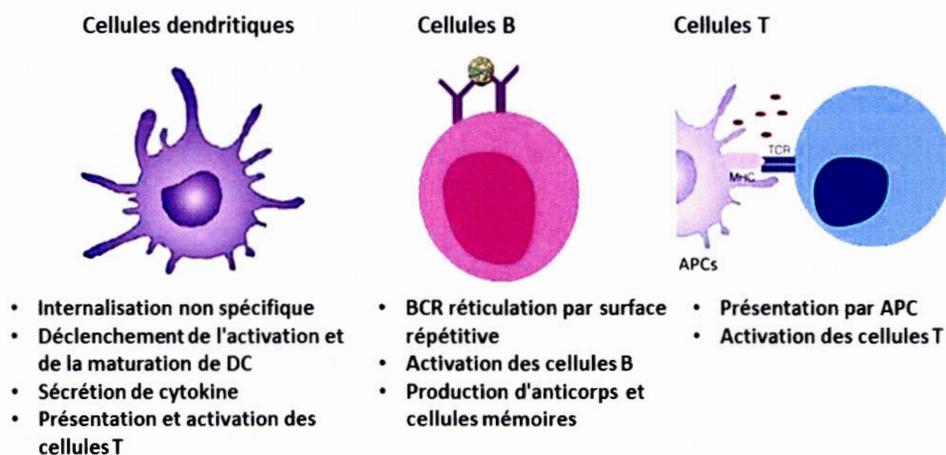


Figure 1.2 Exemples de cellules du système immunitaire adaptatif qui reconnaissent et dirigent la réponse contre les pathogènes (adapté de (Gomes, Ariane C. *et al.*, 2017))

Deux situations peuvent se présenter lors de l'action de l'immunité adaptative : l'antigène peut soit interagir directement avec les lymphocytes B qui possèdent des récepteurs spécifiques, soit être présenté à des lymphocytes T par des cellules présentatrices d'antigènes (Moser et Leo, 2010). Lors de l'interaction directe des antigènes avec les lymphocytes B, ces derniers sont stimulés résultant en leur prolifération et différenciation en cellules productrices d'anticorps (plasmocytes) afin de sécréter des anticorps spécifiques pour la destruction de l'antigène. Les lymphocytes B représentent une grande famille de cellules immunitaires qui diffèrent par le type d'anticorps qu'elles produisent en réponse aux antigènes qu'elles reconnaissent. Les cellules B sont mono-spécifiques, dans le sens qu'elles reconnaissent une structure précise de l'antigène spécifique du pathogène appelée déterminant antigénique ou épitope. En raison de ce haut niveau de diversité, les anticorps permettent de reconnaître une majorité des structures moléculaires, telles que les protéines, les lipides ou les acides nucléiques (Moser et Leo, 2010). Une fois l'infection résolue, certaines cellules se différencient en cellules B mémoires. Ce mécanisme permet à ces cellules B mémoires de réagir rapidement suite à la nouvelle rencontre avec le même agent pathogène, en se différenciant en plasmocytes produisant des anticorps (Spiering, 2015).

Bien que les anticorps permettent au système immunitaire de réagir avec une haute diversité d'antigènes, leur taille ne leur permet pas de traverser la membrane plasmique, ce qui nécessite donc un autre mécanisme pour bloquer l'action des agents pathogènes intracellulaires comme les virus. De ce fait, les lymphocytes T représentent des cellules distinctes qui permettent au système immunitaire de reconnaître et de combattre les pathogènes intracellulaires (Moser et Leo, 2010). Dans le cas des lymphocytes T, ils ne peuvent reconnaître les antigènes que sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC I) ou de classe II (MHCII), exprimées à la surface de cellules

présentatrices d'antigène. L'étape de reconnaissance implique également les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Les macrophages et les cellules dendritiques sont les principales CPA et celles-ci permettent l'internalisation et la fragmentation des pathogènes sous forme de courts peptides. Suite à la détection et à l'internalisation des pathogènes, les CPA vont être activées et migrer vers les organes lymphoïdes secondaires, tels que la rate ou les ganglions lymphatiques, afin de présenter le complexe peptide/MHC aux lymphocytes T naïfs. Les lymphocytes T, comme les lymphocytes B, expriment à leur surface un récepteur spécifique de l'antigène, appelé récepteur de l'antigène des lymphocytes T (TCR). Ces cellules peuvent être classées en deux groupes selon l'expression à leur surface cellulaire de molécules CD4+ ou CD8+. Les lymphocytes CD4+ sont appelés cellules T auxiliaires (du terme anglais « T helper » (Th)) et affichent une haute affinité envers les molécules du complexe d'histocompatibilité majeur de classe II. Les lymphocytes CD8+ sont principalement des cellules cytotoxiques (CTL) qui reconnaissent l'antigène présenté par les molécules du MHC de classe I. Cette dernière interaction mène à une phase d'expansion durant laquelle les lymphocytes T naïfs vont proliférer et se différencier en lymphocytes Th ou CTL qui contribueront alors à l'élimination du pathogène et à la sécrétion d'anticorps.

Les cellules T cytotoxiques ont pour but de rechercher et de détruire les cellules infectées par des agents pathogènes ou des cellules endommagées, comme lors de l'apoptose. Quant aux cellules T auxiliaires, celles-ci n'attaquent pas directement les agents pathogènes, mais activent et stimulent d'autres cellules du système immunitaire inné et adaptatif, notamment les lymphocytes B, les lymphocytes T cytotoxiques et les macrophages via la sécrétion de cytokines spécifiques (Spiering, 2015). Les cellules T auxiliaires peuvent se diviser en quatre types: Th1, Th2, Th17 et cellules régulatrices T (Treg) (Spiering, 2015). Ces cellules sont les acteurs clés des réponses immunitaires adaptatives qui mènent à une réponse immunitaire plus forte et

plus efficace. Les premières à être identifiées ont été les cellules Th de type 1 (Th1) et de type 2 (Th2) qui sont impliquées de manière critique dans différents types de réponses immunitaires. En général, les cellules Th1 favorisent le développement d'une réponse immunitaire cellulaire. Ils produisent l'IL-2 et l'IFN- γ et activent les macrophages, les cellules NK et les cellules T cytotoxiques CD8+ pour éliminer les pathogènes et les cellules infectées (Zhu, 2015). D'autre part, les cellules Th2 favorisent le développement d'une réponse immunitaire humorale. Ces dernières sécrètent des cytokines, telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10, qui stimulent l'expression des molécules MHC II des lymphocytes B et provoquent une plus forte production d'IgE et IgG1 (Kaiko *et al.*, 2008).

En conclusion, les principaux acteurs de la réponse adaptative sont les cellules T auxiliaires, les cellules T cytotoxiques et les anticorps. Une caractéristique unique de l'immunité adaptative est la production et le stockage des anticorps de mémoire adaptés à une structure moléculaire unique du pathogène, produite en quelques jours ou quelques semaines via les cellules T et B spécialisées. Ceci permet une réponse plus rapide aux invasions futures par ce même pathogène.

1.3 Les vaccins

La vaccination est une méthode de prévention basée sur une préparation antigénique qui induit la formation d'anticorps capables de s'opposer à l'infection par des agents pathogènes spécifiques. Les vaccins de première génération couramment utilisés chez l'humain sont basés selon le concept d'introduction du pathogène entier. Ceux-ci peuvent être classifiés en deux catégories: vivant atténué et inactivé. En général, leur efficacité est souvent compliquée par des problèmes liés à une immunogénicité limitée de certains antigènes et/ou au risque de retour à la virulence. Le

développement de vaccins de nouvelle génération est un besoin important afin de contrer ces désavantages.

1.3.1 Un aperçu des vaccins traditionnels

Les vaccins classiques sont basés sur le concept d'introduction du pathogène entier dépourvu de sa capacité d'induire une pathologie comme les vaccins à base de pathogènes vivants atténués ou comme les vaccins dits inactivés qui sont incapables de se multiplier. L'injection de ces micro-organismes entiers fournit la livraison de nombreux composants microbiens, dont certains peuvent induire une protection chez l'hôte tout en agissant, pour certains, de composants immunostimulants (Brito *et al.*, 2013). Ceci est particulièrement avantageux dans le cas des vaccins atténués. Cette approche de vaccination est la plus proche d'une infection naturelle et permet d'activer le système immunitaire presque aussi efficacement qu'une infection par l'agent pathogène sauvage (Moyle, 2015). Néanmoins, ceci signifie également l'administration des nombreux composants, qui ne sont pas requis pour stimuler les réponses immunitaires protectrices et qui peuvent réduire l'efficacité d'un vaccin et/ou entraîner des effets indésirables (Donati et Rappuoli, 2013). De plus, étant donné que ces vaccins contiennent des organismes vivants, il existe un certain degré d'imprévisibilité lié à la sécurité et à la stabilité du vaccin car les agents pathogènes peuvent revenir à leur forme pathogénique et provoquer la maladie. L'autre approche traditionnelle de développement de vaccins comprend l'administration de microorganismes inactivés. Ce type de vaccin ne présente aucun risque d'induire la maladie et est considéré plus sécuritaire que les vaccins vivants atténués. Malgré l'apport significatif au niveau de la sécurité, cette approche permet une réponse immunitaire relativement faible, car les traitements utilisés pour l'inactivation (la chaleur, la fragmentation, les modifications génétiques ou encore l'utilisation de

produits chimiques) peut dénaturer certaines des composantes vaccinales. Pour cette raison, plusieurs doses de vaccin sont généralement nécessaires pour induire une réponse immunitaire suffisante (Moyle et Toth, 2013).

Le principe à la base des vaccins traditionnels est resté inchangé depuis leur découverte, il y a près de deux siècles (Donati et Rappuoli, 2013). Malgré certains des désavantages mentionnés, de nombreux vaccins de première génération ont été commercialisés (**Tableau 1.1 et 1.2**) (Moyle, 2015). Par contre, les problèmes d'efficacité et/ou de sécurité des vaccins traditionnels ont motivé le développement de nouvelles stratégies vaccinales pour identifier des vaccins plus sûrs, incluant les vaccins recombinants sous-unitaires, avec des réponses immunitaires spécifiques vis-à-vis des épitopes antigéniques ciblés.

Tableau 1.1 Exemples de vaccins vivants atténués utilisés chez l'homme (adapté de (Moyle, 2015))

Pathogène viral	Pathogène bactérien
Virus de l'encéphalite japonaise	BCG vaccin contre la tuberculose
Virus de la rubéole	Vaccin oral contre la typhoïde
Virus ourlien	
Virus de la rougeole	
Virus de la varicelle	
Virus de la varicelle-zona	
Virus de la fièvre jaune	
Rotavirus	

Tableau 1.2 Exemples de vaccins inactivés commerciaux utilisés chez l’homme (adapté de (Moyle, 2015))

Pathogène	Adjuvant
Bactérie <i>Vibrio cholerae</i> (Choléra)	Sous-unité de la toxine B du choléra (CTB)
Bactérie <i>Coxiella burnetii</i> (Fièvre Q)	Hydroxyde d'aluminium
Virus de Hépatite A	
Virus de Influenza	
Poliovirus (IPV)	
Virus de la rage	

1.3.2 Les enjeux de la vaccinologie moderne

La première grande révolution a été le développement de vaccins sous-unitaires suite à la compréhension de l’importance précise des composantes du micro-organisme. Le développement de vaccins sous-unitaires repose uniquement sur les composants/fragments antigéniques de l’agent pathogène. Ceci nécessite donc une compréhension des réponses immunitaires, qui à son tour guide le choix des composants pour induire une immunité protectrice contre le pathogène ciblé. De ce fait, les vaccins sous-unitaires induisent une immunité spécifique à un antigène donné. Donc, en raison de leur formulation bien définie, ils sont susceptibles de réduire le risque d'effets secondaires associé au vaccin traditionnel. Parmi les approches de vaccination sous-unitaires modernes, on retrouve les protéines recombinantes, les peptides, les polysaccharides, les conjugués et les vaccins à l'ADN (Moyle, 2015). Cependant, ces vaccins ont tendance à être faiblement immunogènes et nécessitent l'utilisation de puissants agents immunostimulants, tels que les adjuvants. La co-injection, ou la fusion, d'antigènes avec un adjuvant permet la

stabilisation des antigènes, leur libération prolongée et/ou le ciblage de cellules spécifiques du système immunitaire.

1.3.3 Adjuvant

Afin d'améliorer la réponse immunitaire des vaccins sous-unitaires, il y a une demande pour des adjuvants sécuritaires et efficaces. Un adjuvant a pour but de renforcer l'immunité en augmentant la quantité et/ou la qualité des réponses immunitaires cellulaires et humorales générées envers les antigènes avec lesquels il est co-administré. Ils peuvent également permettre le contrôle de la réponse immunitaire provoquée (Foged *et al.*, 2012). Malgré leur rôle important, il y a une très faible diversité d'adjuvants actuellement utilisée dans les vaccins commerciaux.

Les sels d'aluminium (phosphate d'aluminium et hydroxyde d'aluminium) représentent l'adjuvant le plus utilisé dans les vaccins chez l'humain (Coffman *et al.*, 2010). Par contre, l'adjuvant à base d'aluminium est essentiellement associé à l'induction d'une réponse immunitaire humorale médiée par des anticorps Th2-dépendants, ce qui représente un inconvénient majeur pour les vaccins qui ciblent des voies intracellulaires comme dans le cas des cancers et des pathogènes intracellulaires (Kool *et al.*, 2012). De ce fait, l'identification et le développement de nouveaux adjuvants efficaces sont importants pour agir en synergie avec les antigènes.

Deux approches sont privilégiées pour générer des adjuvants de nouvelle génération, soit le développement de nouveaux systèmes de délivrance, soit l'identification d'agents immunomodulateurs (Foged *et al.*, 2012; O'Hagan et Valiante, 2003). Le système de délivrance aide à améliorer l'internalisation et/ou la présentation des antigènes tandis que les immunomodulateurs aident à activer les cellules

immunitaires innées. Les deux types d'adjuvants peuvent être utilisés seul ou en combinaison (O'Hagan et Valiante, 2003).

La première approche permet un plus grand contrôle sur la taille et la forme des particules vaccinales administrées, deux éléments importants pour l'induction des réponses des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène. En effet, les particules de taille similaire à des bactéries ou des virus peuvent imiter les agents pathogènes et améliorer leur internalisation par les CPA (**Fig. 1.3**). Les dimensions des particules vaccinales varient grandement. Les particules entre 20-200 nm de diamètre pénètrent efficacement dans le système lymphatique et sont internalisées par les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Des exemples de systèmes d'administration comprennent les vaccins antigéniques protéiques ou sous-unités virales (<10 nm), les particules pseudo-virales (PPV, du terme anglais « *Virus-like particles* », VLP), les nanoparticules (20-200 nm) et les microparticules (ex : émulsions, sels minéraux (Alum)) qui sont les plus grandes (100 nm-20 µm). Un choix adéquat du système de livraison peut augmenter la stabilité du vaccin ainsi que sa reconnaissance par les cellules immunitaires. La deuxième classe réfère aux agents immunomodulateurs qui activent directement les cellules immunitaires via des récepteurs spécifiques. De nombreux immunomodulateurs appartiennent aux PAMP qui représentent des structures moléculaires hautement conservées chez les micro-organismes et permettent d'augmenter la réponse immunitaire via l'interaction avec les récepteurs TLR (**Tableau 1.3**). Une combinaison de ces deux approches offre la meilleure stratégie pour la production de vaccins très puissants générant une mémoire immunologique de longue durée (**Fig. 1.4**) (Bachmann et Jennings, 2010).

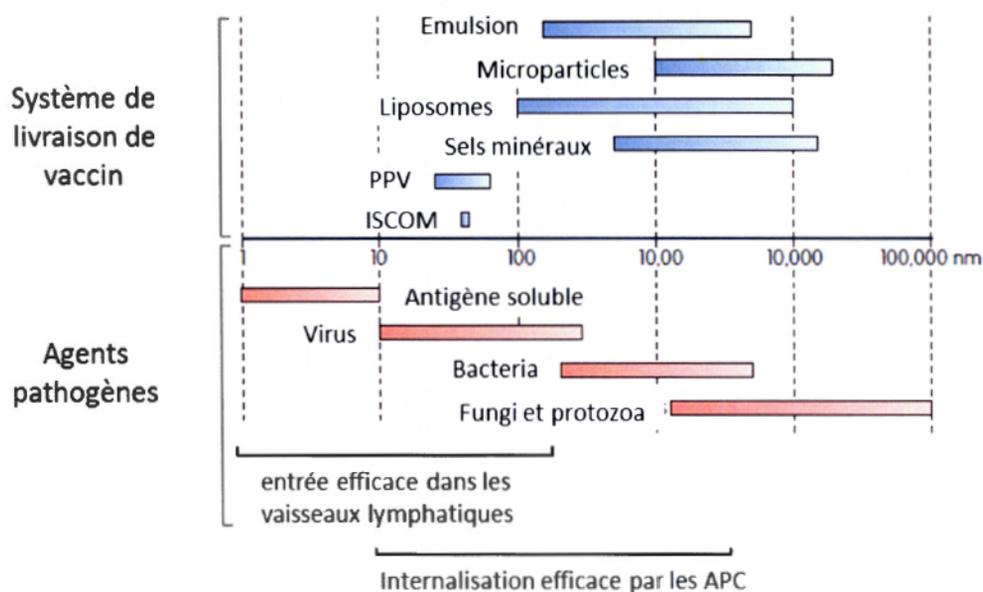


Figure 1.3 Tailles des systèmes de délivrance adjuvant et les dimensions de différents agents pathogènes. ISCOM, complexes immunostimulants; PPV, particules pseudo-virales (adapté de (Bachmann et Jennings, 2010))

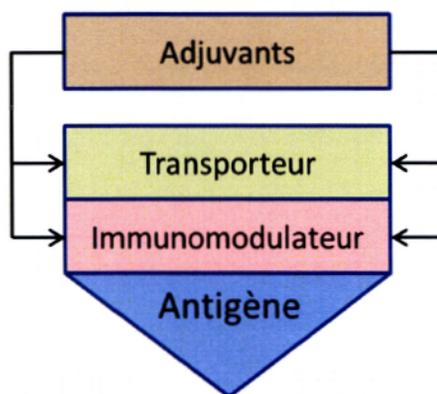


Figure 1.4 Les trois composantes d'un vaccin sous-unitaires optimal (adapté de (O'Hagan et Valiante, 2003)).

Tableau 1.3 Principaux PAMP actuellement utilisés ou en cours d'étude en tant qu'adjuvants potentiels (adapté de (Karch et Burkhard, 2016)).

PAMP	Origine du microorganisme	Récepteur	Système immunitaire adaptatif activé
LPS	Bactéries à Gram-négatif	TLR4/Inflammasome	Humorale /Cellulaire
Flagelline	Bactéries flagellées	TLR5/Inflammasome	Humorale /Cellulaire
Agonistes de ssARN	Virus à ssARN	TLR7/TRL8	Humorale /Cellulaire
CpG	Microorganismes	TLR9	Humorale /Cellulaire

1.4 Utilisation de structures protéiques auto-assemblées en tant que plateforme vaccinale

Les avancées technologiques dans le développement de vaccins au cours des deux dernières décennies ont dévoilé le grand potentiel des particules pseudo-virales. Les nanovaccins composés de protéines auto-assemblées ont suscité un grand intérêt pour leurs propriétés uniques telles que la biocompatibilité, la faible toxicité et la spécificité moléculaire. Ces molécules sont produites par un processus naturel qui est l'auto-assemblage de protéines dont la résultante peut servir à développer des plateformes vaccinales.

1.4.1 Particules pseudo-virales

Les particules pseudo-virales font partie de la grande famille des nanovaccins et consistent en des particules similaires aux virus sans leur bagage génétique. Ils sont produits selon des processus naturels, tels que l'auto-assemblage de protéines de

capsides virales pour former les particules qui ressemblent par leur taille et leur forme aux virus (Zhao *et al.*, 2013). Les PPV peuvent être composées d'une seule ou de plusieurs types de protéines virales fonctionnelles responsables de la pénétration cellulaire par le virus, ce qui assure donc leur entrée cellulaire efficace. De ce fait, ils permettent d'imiter l'organisation, la structure et l'immunogénicité des virus natifs, sans le risque associé à leur sécurité. Il est également possible d'intégrer un épitope d'un virus ciblé ou d'un antigène tumoral sur la surface externe ou interne de la protéine pour permettre soit l'encapsulation de l'antigène, soit leur exposition à la surface (Ding *et al.*, 2018; Mohsen *et al.*, 2017). L'effet de présenter une haute densité d'antigènes répartie sur la surface ou concentrée à l'intérieur de la nanostructure permet d'induire une interaction multivalente avec les CPA, ce qui conduit à des réponses immunitaires efficaces (Karch et Burkhard, 2016). Donc, l'utilisation de PPV en vaccination représente une stratégie prometteuse pour augmenter l'immunogénicité des vaccins sous-unitaires.

La propriété de l'auto-assemblage et la présentation d'une forte densité d'épitopes peuvent être envisagées pour le développement de nouvelles nanostructures à des fins vaccinales. Cependant, à l'heure actuelle, seulement deux vaccins de type PPV ont été commercialisés chez l'homme soit le vaccin recombinant contre l'hépatite B et le vaccin contre le virus du papillome humain (Yang, L. *et al.*, 2016). Néanmoins, le développement de vaccins à base de protéines présente des inconvénients associés à la complexité et au coût de la production, à l'instabilité et à la présence d'impureté (Skwarczynski et Toth, 2011). Pour surmonter ces problèmes, les particules basées sur le principe de l'auto-assemblage peuvent être utilisées comme système de livraison et/ou immunomodulateur.

1.4.2 Auto-assemblage moléculaire

L'auto-assemblage moléculaire représente une stratégie très intéressante pour le développement de nanoparticules en raison de sa simplicité d'application et de la grande variété de nanostructures pouvant être générée. L'auto-assemblage moléculaire est défini comme l'arrangement spontané de molécules par des interactions non covalentes telles que les liaisons hydrogène, électrostatiques, hydrophobes, de van der Waals, et les interactions π - π (Webber *et al.*, 2015). Bien que les interactions non covalentes impliquées dans l'auto-assemblage aient une énergie beaucoup plus faible par rapport aux liaisons covalentes, elles sont suffisantes pour produire des nanostructures hautement organisées et robustes. Le processus d'auto-assemblage est dirigé par des facteurs internes et externes et se produit lorsque les différentes forces attractives/répulsives à l'intérieur et entre les molécules sont équilibrées (Mandal *et al.*, 2014; Whitesides et Grzybowski, 2002). Les facteurs internes sont liés aux propriétés intrinsèques des molécules, tels que la charge, la conformation moléculaire et le rapport hydrophile/hydrophobe. Les facteurs externes sont liés à l'environnement et incluent le pH, la concentration, la température, le solvant et la présence d'autres molécules dans l'environnement. Dans la nature, ce phénomène est communément exploité par différentes biomolécules comme l'ADN et les polypeptides. Par exemple, les capsides virales et le cytosquelette cellulaire sont des exemples probants de structures biologiques complexes résultant d'un auto-assemblage coordonné. (Negahdaripour *et al.*, 2017). En effet, en plus des protéines auto-assemblées naturelles, il est possible d'explorer la production de nanoparticules à base de polymères, de lipides et de polypeptides prônant à s'auto-assembler en différentes structures à des fins biomédicales (Zhao *et al.*, 2017).

L'utilisation de peptides auto-assemblants offre des avantages uniques par rapport aux autres macromolécules. Les peptides peuvent être facilement produits en grande

quantité par voie chimique (synthèse peptidique sur support solide) et ce, avec une grande pureté et une caractérisation bien définie. De plus, ils sont stables, hydrosolubles et peuvent être lyophilisés (Skwarczynski et Toth, 2011). Les structures formées suite à l'auto-assemblage peptidiques présentent une haute organisation moléculaire et affichent plusieurs caractéristiques avantageuses, telles que la biodégradabilité, une faible cytotoxicité, une haute stabilité thermique, chimique et enzymatique. Également, leur taille peut être définie et relativement bien contrôlée et leur surface peut être fonctionnalisée avec une large gamme de molécules (Karch et Burkhard, 2016). Il existe plusieurs types de particules à base de peptides auto-assemblés. Par exemple, on retrouve des structures à base de séquence amyloïde, d'assemblages hélicoïdaux et de peptides amphiphiles (Fig. 1.5) (Woolfson et Mahmoud, 2010).

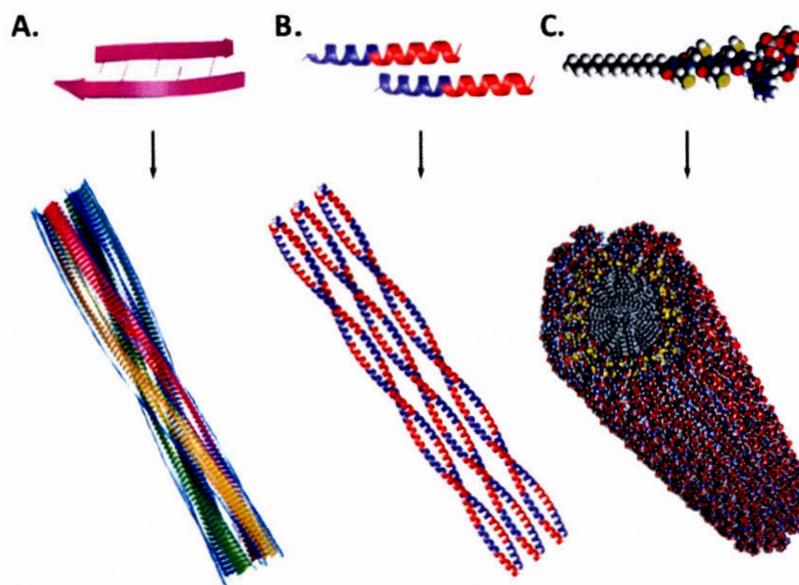


Figure 1.5 Particules fibrillaires auto-assemblées à base de peptides. Assemblages de type (A) amyloïde, (B) hélicoïdale et (C) amphiphile (adapté de (Woolfson et Mahmoud, 2010)).

1.5 Amyloïde

Le terme amyloïde désigne des agrégats polypeptidiques extracellulaires, insolubles, fibreux qui sont caractérisés par une structure quaternaire riche en feuillets- β -croisés. Historiquement, les amyloïdes ont été associés à diverses maladies en raison du fait que leur présence chez l'humain est reliée à plusieurs états pathologiques. De ce fait, le mauvais repliement des protéines et la formation de dépôts protéiques insolubles sont des caractéristiques pathologiques d'un certain nombre de maladies dégénératives, y compris la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et le diabète de type II (**Tableau 1.4**) (Chiti et Dobson, 2017; Wei *et al.*, 2017).

Le terme « amylose » a été initialement proposé au XIX^{ème} siècle mais ce n'est que récemment que les analyses biochimiques et biophysiques ont permis de découvrir la diversité des protéines pouvant conduire à la formation de fibres amyloïdes. Le processus d'auto-assemblage et d'association contrôlée de peptides/protéines joue un rôle crucial dans de nombreuses fonctions cellulaires du corps comme la motilité, la morphologie, le maintien de la polarité et la régulation de la transcription (Wei *et al.*, 2017). De plus, des études récentes ont identifié de nombreuses structures amyloïdes qui accomplissent des activités physiologiques cruciales chez les organismes vivants qui les utilisent pour leurs propriétés biologiques, physiques et mécaniques uniques. Ces amyloïdes fonctionnels ont été identifiés dans presque toutes les espèces, des bactéries aux insectes et aux mammifères (**Tableau 1.5**) (Fowler *et al.*, 2007). Par exemple, chez l'homme, la protéine Pmel17 adopte un état quaternaire amyloïde afin de séquestrer les intermédiaires toxiques lors de la synthèse de la mélanine, un processus clé de la pigmentation cutanée (Fowler *et al.*, 2006). Il a été rapporté que les hormones peptidiques sont stockés dans les granules sécrétoires du système endocrinien sous forme de structures amyloïdes (Maji *et al.*, 2009). En outre, l'amyloïdogenèse physiologique pourrait permettre aux cellules de s'adapter aux

facteurs de stress en stockant de grandes quantités de protéines sous forme d'*amyloid droplets* dans le noyau afin d'entrer dans un état de dormance en réaction à divers stress (Audas *et al.*, 2016). Ces exemples indiquent que la structure quaternaire amyloïde n'est pas seulement associée aux pathologies, mais peut également avoir des rôles fonctionnels bénéfiques.

Tableau 1.4 Exemples de pathologies humaines associées à la formation de dépôts amyloïdes (adapté de (Chiti et Dobson, 2017))

Précurseur polypeptidique	Maladie associée	Structure native de la protéine ou du peptide
A β	Maladie d'Alzheimer	Nativement désordonnée
Islet amyloid polypeptide (IAPP) ou « amylin »	Diabète de type 2	Nativement désordonnée
α -Synuclein	Maladie de Parkinson	Nativement désordonnée
Chaines légères d'immunoglobulines	Amylose à chaînes légères	Tout β , «Ig like»
Transthyrétine	Amyloïdose systémique	Feuillets- β

Tableau 1.5 Exemples d'amyloïdes fonctionnels dans des différents organismes (adapté de (Fowler, D. M. *et al.*, 2007))

Espèce	Protéine	Fonction
Fungi <i>S. cerevisiae</i>	Sup35p	Régulation de la lecture de codon « Stop »
Bacteria <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp.</i>	Curlin	Formation de biofilms
Animalia <i>Homo sapiens</i>	Pmel17	Séquestration des intermédiaires toxiques lors de la synthèse de la mélanine
	Différentes hormones peptidiques/protéiques	Stockage naturel dans les granules sécrétoires du système endocrinien
	Protéines hétérogènes avec des propriétés biophysiques de type amyloïde	Adaptation des cellules aux facteurs de stress

1.5.1 Structure (supra)moléculaire des fibres amyloïdes

Plusieurs peptides et protéines amyloïdogéniques ont été analysés afin d'étudier et de comprendre davantage le mécanisme de formation, la structure moléculaire et l'organisation supramoléculaire des fibres amyloïdes. Malgré le fait que les polypeptides précurseurs ont des différences marquées au niveau de leur séquence primaire, au niveau de leur structure à l'état natif et sont impliqués dans différentes maladies ou fonctions biologiques, la morphologie et les propriétés physico-chimiques de fibres amyloïdes formées sont similaires. La microscopie a permis d'observer la structure macromoléculaire des fibres amyloïdes. Les fibres prototypiques sont longues, peuvent être soit linéaires ou torsadées et sont constituées

de sous-unités individuelles appelées «protofilaments» (Goldsbury *et al.*, 1999; Jiménez *et al.*, 2002). Les fibres amyloïdes sont organisées de manière hiérarchique et sont constituées de 2 à 8 protofilaments chacun d'environ 2-7 nm de diamètre. Chaque protofilament est composé d'un grand nombre de feuillets- β adoptant une structure quaternaire protéique en feuillets- β -croisés (**Fig. 1.6**). Les feuillets- β sont constitués de brins- β orientés perpendiculairement à l'axe de la fibre. Ces brins sont joints par un réseau important de liaisons hydrogène et peuvent être orientés soit parallèlement, soit antiparallèlement. À leur tour, les feuillets- β sont entassés les uns contre les autres et stabilisés par des interactions entre les chaînes latérales des résidus via des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques, des forces de van der Waals et/ou un empilement π - π (**Fig. 1.6**) (Chiti et Dobson, 2017; Hu *et al.*, 2016; Tycko, 2014; Tycko et Wickner, 2013).

Les études de diffraction aux rayons X des différentes structures amyloïdes ont montré la présence de deux patrons de diffraction caractérisés par une réflexion à 4.7 et 10 Å. Le signal méridional à 4.7 Å, dans le même sens que la fibre, correspond à la distance entre les brins- β occupée par les ponts hydrogènes à l'intérieur des feuillets- β reliant les groupements amide N-H et C=O du squelette peptidique. Le signal équatorial à 10 Å, perpendiculaire à l'axe de la fibre, est quant à lui attribué à l'empilement des feuillets- β voisins (Greenwald et Riek, 2010; Makin et Serpell, 2005).

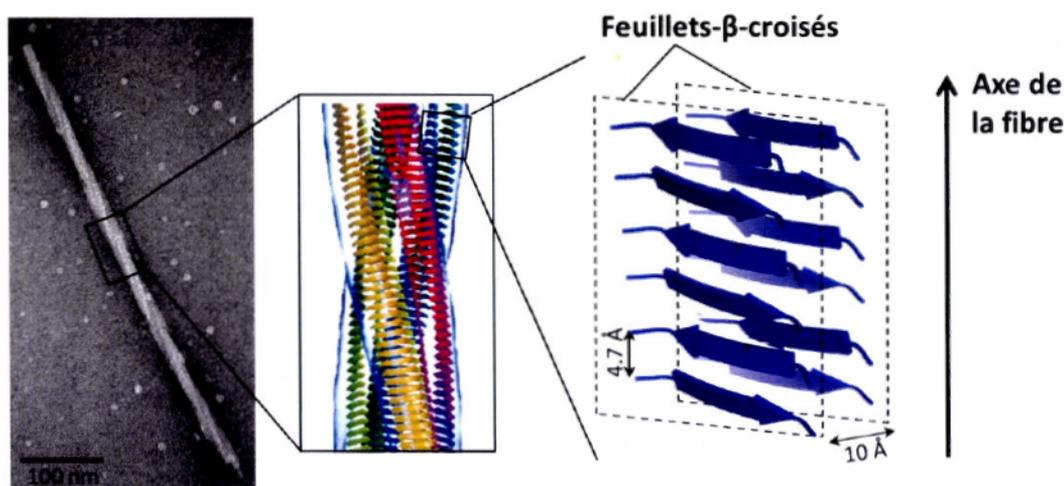


Figure 1.6 Organisation moléculaire des fibres amyloïdes en structure quaternaire en feuillets- β -croisés.

Les fibres amyloïdes peuvent être caractérisées par trois principales approches chimiques ou biophysiques. Premièrement, leur structure et morphologie peuvent être visualisées par la microscopie électronique à transmission (MET) et par la microscopie à force atomique (AFM). Au niveau macroscopique, les fibres amyloïdes présentent un polymorphisme et apparaissent sous forme de filaments de 0,2 à 5 μm de longueur et de 4 à 15 nm de diamètre. Deuxièmement, la spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permettent d'observer la transition de la structure secondaire native vers la structure secondaire qui est riche en feuillets- β (Bouchard *et al.*, 2000). Finalement, les fibres ont des propriétés d'interaction avec certains colorants tels que le Rouge Congo (en anglais *Congo red*) et la thioflavine T (ThT). Pour la première molécule, un déplacement de son maximum d'absorption et l'apparition d'une biréfringence verte au microscope sont observés en présence des fibres. En outre, une augmentation de la fluorescence est observée dans le cas de la thioflavine T suite à sa liaison à la structure amyloïde (Klunk *et al.*, 1999; Mathis *et al.*, 2012; Nilsson, 2004).

1.5.2 Mécanisme d'auto-assemblage amyloïde

À l'heure actuelle, le mécanisme de formation des fibres amyloïdes reste encore incompris et fait toujours l'objet de nombreuses études. Il est largement accepté que la formation des fibres amyloïdes implique un mécanisme de type nucléation-dépendante caractérisé par une cinétique de formation sigmoïdale reflétant trois phases distinctes : (i) phase de latence, (ii) phase d'élongation et (iii) phase d'équilibre (Gillam et MacPhee, 2013). La première phase de latence est considérée comme étant le temps nécessaire à la formation d'un noyau à haute énergie. Tout d'abord, le monomère protéique/peptidique soluble doit s'assembler pour former un noyau. Cette étape est lente et thermodynamiquement défavorable en raison des interactions non efficaces entre les monomères pour former des oligomères. Cette étape limitante résulte en la formation de noyaux stables lorsque les interactions à l'intérieur de la structure sont suffisamment fortes pour compenser la diminution d'entropie. La diversité des séquences peptidiques et des protéines amyloïdes ainsi que leurs structures natives implique qu'il n'existe pas de mécanisme unique de formation des espèces oligomériques. Pour cette raison Chiti et Dobson ont proposé différentes voies en fonction des états conformationnels des protéines amyloïdes (Chiti et Dobson, 2017). Une fois le noyau formé, la phase d'élongation exponentielle entraîne la formation de protofilaments par l'association de monomères ou d'oligomères compétents aux extrémités libres du protofilament (Knowles *et al.*, 2009). L'énergie thermique ou les forces mécaniques peuvent induire la fragmentation de fibres et favoriser la nucléation secondaire, accélérant le processus d'amyloïdogenèse. La troisième phase est atteinte lorsque la plupart des peptides monomères solubles sont convertis en amyloïdes et qu'un équilibre est atteint (**Fig. 1.7**).

L'approche la plus courante pour étudier la cinétique de la formation d'amyloïdes repose sur la mesure de la fluorescence de la molécule ThT en fonction du temps. La ThT est un colorant benzothiazole dont la fluorescence émise est fortement amplifiée suite à sa liaison aux structures riches en feuillets- β des amyloïdes (Naiki *et al.*, 1989). Ceci permet d'observer généralement une cinétique sigmoïdale reflétant trois phases distinctes (**Fig. 1.7B**). Par contre, ce colorant est insensible aux espèces préfibrillaires, ce qui nécessite le développement de sondes fluorescentes alternatives pour détecter les oligomères (Ban *et al.*, 2003; Biancalana et Koide, 2010; Quittot *et al.*, 2018).

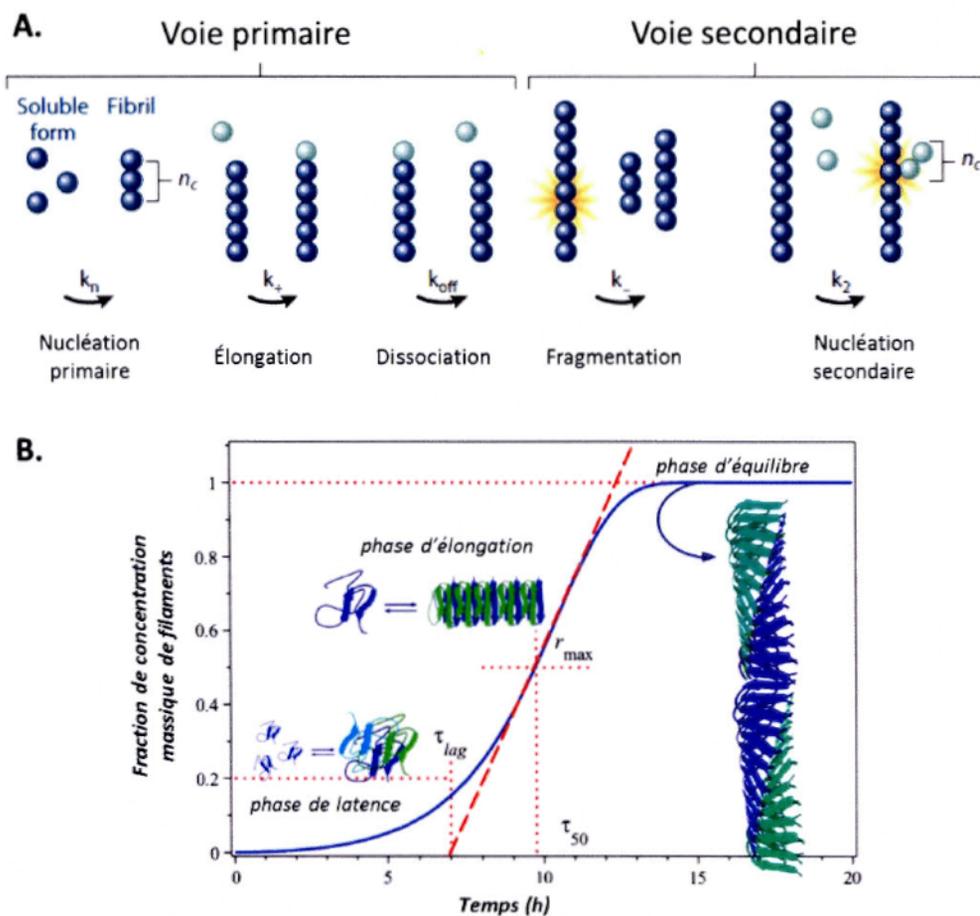


Figure 1.7 Représentation du mécanisme de formation de fibres amyloïdes par polymérisation nucléation-dépendante. (A) Modèle des étapes clés et (B) profil de croissance sigmoïdale de l'amyloïdogenèse (adapté de (Chiti et Dobson, 2017; Gillam et MacPhee, 2013)).

1.5.3 Cytotoxicité

La présence des dépôts amyloïdes dans les tissus de patients atteints de différentes maladies a naturellement conduit les chercheurs à les considérer comme la cause principale de ces pathologies. Cependant, il est devenu de plus en plus évident que les

espèces protéiques responsables de la toxicité sont d'origine oligomérique et non pas fibrillaire.

Dans le cadre de l'amyloïdose des îlots pancréatiques, qui est associée au diabète de type II, le laboratoire du Pr. Raleigh a démontré que la toxicité de l'islet amyloid polypeptide (IAPP) vis-à-vis des cellules β -pancréatiques dépend du temps d'assemblage et que les espèces responsables de la toxicité ne sont pas les fibres mais les oligomères solubles (Abedini *et al.*, 2016). En effet, en combinant la technique de dosage de liaison à la thioflavine-T et la TEM avec l'essai de viabilité cellulaire, cette équipe a observé que la toxicité est inversement corrélée à la formation des fibres, car la toxicité commence à diminuer dans la phase de croissance et disparaît dans la phase de saturation (**Fig. 1.8**) (Abedini *et al.*, 2016). Également, de nombreuses études suggèrent que les oligomères amyloïdes solubles pré-fibrillaires affichant un faible poids moléculaire sont les espèces toxiques principales responsables de la mort des neurones dans la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (Arosio *et al.*, 2015; Masliah *et al.*, 2000; Winner *et al.*, 2011). Malgré de nombreuses études, le mécanisme de toxicité des espèces oligomériques n'est toujours pas bien compris, mais ces résultats confirment néanmoins que les intermédiaires toxiques sont de nature pré-fibrillaire. Cela suggère donc l'utilisation sécuritaire des structures fibrillaires dans le domaine biomédical. Récemment, des assemblages riches en feuillets- β , similaire aux structures amyloïdes, ont montré un certain potentiel pour le développement de nanovaccins (Rudra *et al.*, 2010; Waku *et al.*, 2013).

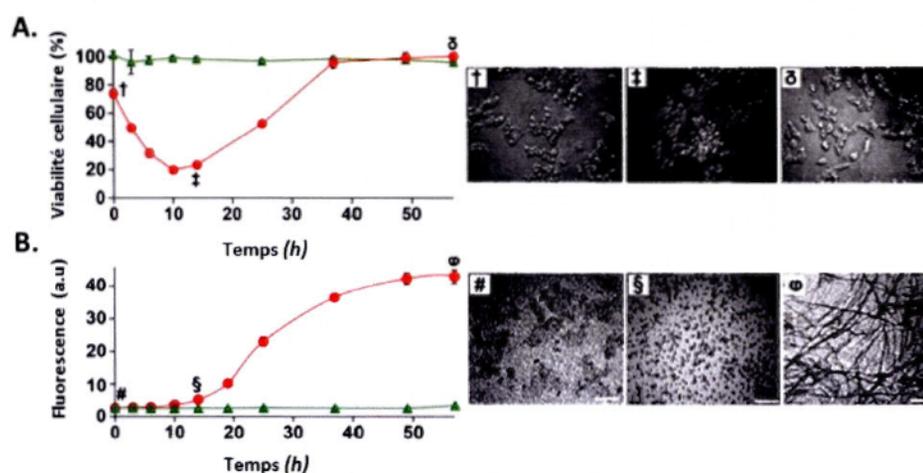


Figure 1.8 Résumé des effets cytotoxiques induits par des intermédiaires de phase de latence de l'IAPP. (A) Essai de viabilité cellulaire en fonction des espèces quaternaires de l'IAPP humain (hIAPP) (●) et l'IAPP murin (rIAPP) (▲). Microscopie optique: (†) Cellules β -pancréatiques vivantes après incubation avec hIAPP à temps zéro; (‡) les cellules- β en apoptose après incubation avec des intermédiaires de la phase de latence; (δ) cellules- β vivantes après incubation avec des fibrilles amyloïdes. (B) Cinétique contrôlée par la thioflavine-T de la formation d'amyloïde: hIAPP (●) et rIAPP (▲). Images TEM: (#) hIAPP non toxique à temps zéro; (§) les intermédiaires toxiques de la phase de latence pré-fibrillaire; (ϕ) fibrilles amyloïdes (échelle: 200 nm) (adapté de (Abedini *et al.*, 2016)).

1.6 Peptides amphiphiles

Les peptides amphiphiles sont un autre type de molécule qui a attiré une attention considérable au cours de la dernière décennie en raison de sa forte capacité à s'auto-assembler pour former une grande diversité de nanostructures. Ce potentiel d'auto-assemblage est dicté par la nature amphiphile conférée par l'ajout d'une chaîne alkyle

ou lipidique hydrophobe à un corps peptidique hydrophile formant le groupe de tête (Dehsorkhi *et al.*, 2014).

1.6.1 Conception de nanostructures auto-assemblées à base de peptides amphiphiles

L'élément le plus important dans la conception de peptide amphiphile est la nature fortement amphiphile de la molécule. L'amphiphilicité résulte de la présence simultanée d'un groupe hydrophile et d'un groupe hydrophobe sur une même molécule. La **figure 1.9** illustre une structure chimique représentative d'un peptide amphiphile qui est généralement composée de trois régions: (1) une queue hydrophobe, (2) une séquence peptidique capable de former des liaisons hydrogène par formation de feuillets β intermoléculaires et (3) des acides aminés chargés (acides ou basiques) pour fournir une charge favorisant ainsi leur solubilité dans l'eau, créer des forces de répulsion et déclencher des changements structuraux par des changements de pH ou l'addition de sels. L'extrémité opposée à la queue hydrophobe peut être utilisée pour intégrer à la molécule un signal bioactif qui peut être un épitope peptidique fonctionnel ou un segment liant des biomolécules, ou encore un agent pharmacologique quelconque (Cui *et al.*, 2010; Dehsorkhi *et al.*, 2014; Webber *et al.*, 2013).

Le caractère amphiphile de ces molécules est la force motrice pour l'auto-assemblage. L'extrémité hydrophobe peut être d'origine lipidique ou peptidique (Wang *et al.*, 2017; Webber *et al.*, 2013). La longueur de la chaîne alkyle ou la présence de différents acides aminés hydrophobes permettent d'engendrer différentes nanostructures pour présenter spécifiquement des molécules bioactives à l'extrémité opposée (Meng *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010). L'autre élément clé des peptides amphiphiles est la région adjacente à la queue hydrophobe qui est responsable de la

formation du feuillet- β . Cette région est composée d'une séquence peptidique constituée entre 4 et 8 acides aminés ayant la capacité de former des liaisons hydrogène intermoléculaires pour former des feuillets- β , ce qui permet une association contrôlée supplémentaire (Matson et Stupp, 2012; Paramonov *et al.*, 2006). La structure du peptide amphiphile est complétée par l'ajout d'un ou plusieurs résidus chargés afin d'aider à la solubilité. Par conséquent, les changements de pH de la solution peuvent considérablement modifier l'auto-assemblage.

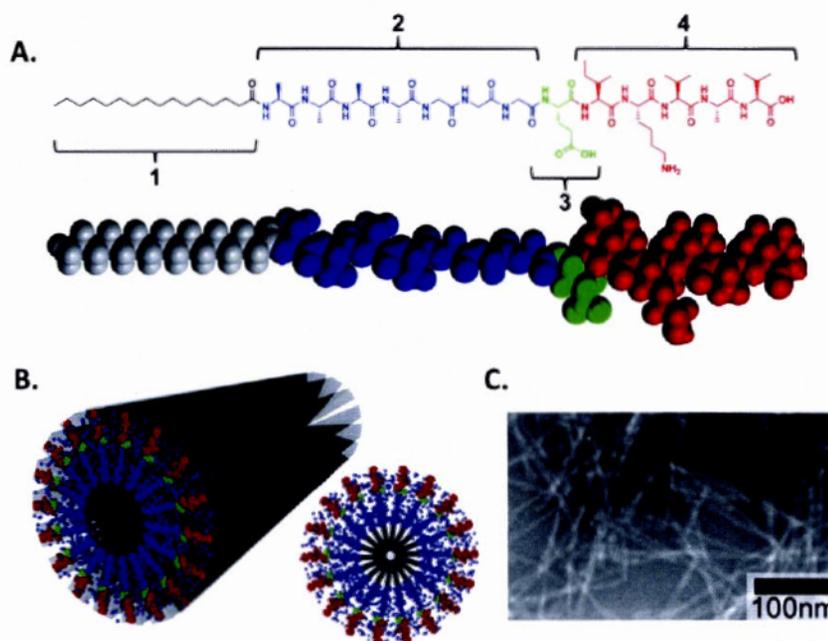


Figure 1.9 (A) Schéma représentatif de la structure moléculaire d'un peptide amphiphile composé de trois domaines principaux : (1) une queue hydrophobe (en noir), (2) un segment en feuillet- β (en bleu), (3) une tête polaire composée d'acides aminés chargés (en vert) et (4) une molécule fonctionnelle (en rouge). (B) Illustration de l'auto-assemblage d'un peptide amphiphile en nanofibres. (C) Micrographie MET des nanofibres IleLysValAlaVal (adapté de (Webber *et al.*, 2013)).

1.6.2 Mécanismes d'auto-assemblage de peptides amphiphiles

L'auto-assemblage moléculaire des peptides amphiphiles est dirigé par trois forces motrices: les interactions hydrophobes des queues d'alkyle (région 1), les liaisons hydrogène entre les segments peptidiques moyens (région 2) et les répulsions électrostatiques entre les acides aminés chargés (région 3) (**Fig. 1.9A**). L'agrégation des molécules est favorisée par les interactions hydrophobes en milieu aqueux et les liaisons hydrogène alors que les résidus chargés favorisent la répulsion électrostatique entre les molécules de peptide amphiphile (Cui *et al.*, 2010; P Hendricks *et al.*, 2017). Dans un système dans lequel les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène coexistent, les assemblages finaux résultent en un équilibre délicat entre chacune de ces contributions énergétiques. La cinétique et la géométrie de la nanostructure diffèrent en fonction des forces intermoléculaires impliquées. Dans un système avec des liaisons hydrogène relativement faibles, la formation de micelles sphériques est favorisée. Dans le cas contraire, où les liaisons hydrogène prédominent, leur contribution énergétique brise la symétrie sphérique et conduit à la formation de micelles cylindriques. Xu et ses collègues ont étudié le comportement d'auto-assemblage des peptides amphiphiles en milieu aqueux à différents pH en fonction des longueurs de queues hydrophobes d'alkyle (Xu *et al.*, 2010). Ils ont démontré qu'à pH acide les peptides amphiphiles peuvent s'auto-assembler en nanofibres, tandis que suite à l'augmentation du pH, les nanofibres composées de peptide amphiphile ayant une queue alkyle hydrophobe relativement courte sont converties en micelles sphériques. Cependant, les nanostructures fibreuses composées de queues alkyles hydrophobes plus longues restent inchangées en raison des fortes interactions hydrophobes intermoléculaires (Xu *et al.*, 2010).

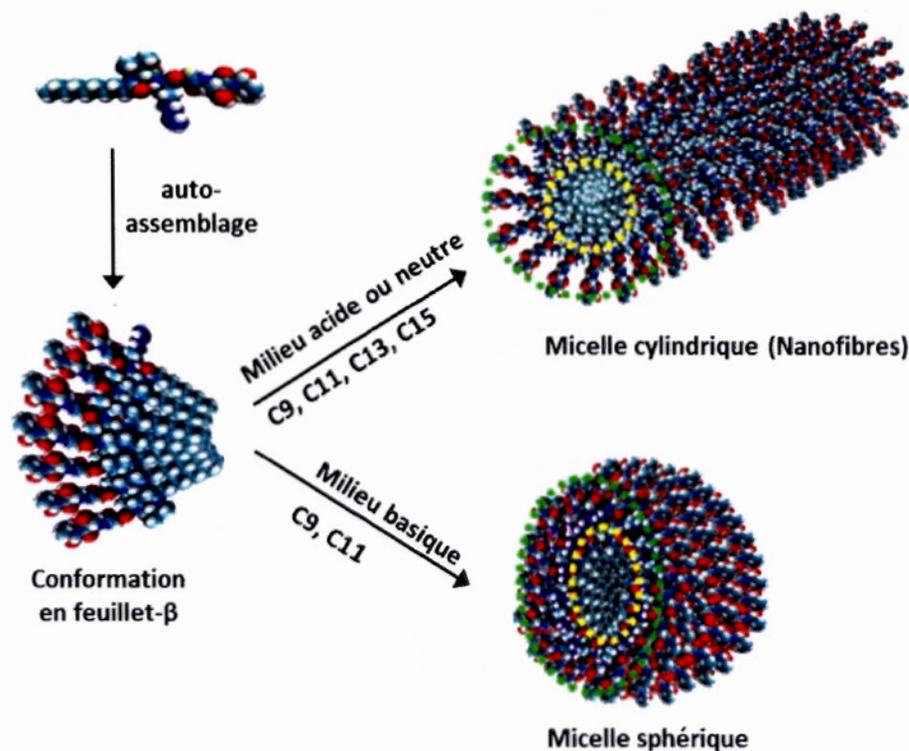


Figure 1.10 Illustration schématique de l'auto-assemblage de peptides amphiphiles affichant un nombre différent de carbone au niveau des chaînes alkyles en milieu acide, neutre ou basique (adapté de (Xu *et al.*, 2010))

Le laboratoire du Professeur Stupp a développé et exploré l'auto-assemblage de différents peptides amphiphiles pour diverses applications en nanotechnologie. Ils suggèrent que ces nanostructures possèdent un grand potentiel en tant que nouveaux matériaux bioactifs composés de nanofibres. Par exemple, le laboratoire de Pr. Stupp a rapporté l'utilisation de ces nanostructures pour mimer la matrice extracellulaire (Hartgerink *et al.*, 2001). De telles structures pourraient avoir une large gamme d'applications médicales et (bio)technologiques, incluant le développement de nanovaccins.

1.7 Modèles antigéniques peptidiques

Deux antigènes peptidiques dérivés, respectivement, du virus Chikungunya (E2EP3) et du virus de l'Influenza aviaire (M2e) ont été sélectionnés en tant que modèles antigéniques. Ces antigènes sont hautement conservés chez leurs virus respectifs et les études précédentes ont démontré leur capacité protectrice. Les épitopes de choix diffèrent entre eux par leur charge nette à pH physiologique (+2 pour E2EP3; -2 pour M2e) et par la longueur de leur séquence peptidique. L'utilisation de ces deux différents épitopes prometteurs pour la conception d'un vaccin permettra d'étudier l'influence de leurs propriétés physico-chimiques sur l'auto-assemblage peptidique.

1.7.1 Virus Chikungunya

Le virus Chikungunya (CHIKV) est l'agent responsable de la fièvre Chikungunya (CHIKF), qui est une maladie virale transmise par les moustiques *Aedes*. Il s'agit d'un alphavirus de la famille des *Togaviridae*. Le mot « Chikungunya » vient du langage kimakonde qui signifie «devenir tordu», ce qui fait référence à l'apparence des patients ayant une posture contournée et qui souffrent de douleurs articulaires (Lumsden, 1955). CHIKV a provoqué de nombreuses épidémies, à la fois en Afrique et en Asie. De même, des cas de fièvre Chikungunya ont été rapportés dans de nombreux pays d'Asie, d'Afrique, d'Europe et des Amériques ("Outbreak and spread of chikungunya," 2007). Le virus provoque la fièvre et des arthralgies (douleurs articulaires) sévères et peut causer une maladie aiguë ou chronique.

Le virus contient un génome constitué d'un ARN simple brin de sens positif de 11,8 kilobases et affiche un diamètre d'environ 70-100 nm (Strauss et Strauss, 1994). Le génome code pour neuf protéines virales, dont cinq sont des précurseurs de protéines

structurales, soit une protéine de capsid (C), deux glycoprotéines de surface d'enveloppe (E1 et E2) et deux petites protéines supplémentaires (E3 et 6K) (Kuhn, 2007; Teng *et al.*, 2011). Similaire à d'autres alphavirus, la glycoprotéine E2 se lie à des récepteurs cellulaires pour initier l'entrée du virus dans les cellules hôtes, tandis que la glycoprotéine E1 est responsable de la fusion de la membrane cellulaire hôte-virus (Gibbons *et al.*, 2003; Kielian, 2006). Les protéines E3 et 6K agissent comme des protéines auxiliaires dans le processus d'assemblage et de maturation du virus (Simizu *et al.*, 1984). Différentes technologies ont été explorées pour le développement de vaccins contre CHIKV, incluant des virus vivants atténués ou inactivés, des vaccins à base d'ADN ou des vaccins de type particules pseudo-virales (Salazar-Gonzalez *et al.*, 2015). Par contre, à l'heure actuelle, aucun vaccin contre le CHIKV n'est disponible commercialement. Au lieu d'utiliser des protéines entières dans la formulation du vaccin, une approche alternative implique l'utilisation des séquences peptidiques minimales d'un antigène reconnu par le système immunitaire. Plusieurs épitopes immunogènes ont été proposés, mais Kam et ses collègues ont observé, durant une infection primaire chez des patients provenant de Singapour et de la Malaisie, que la réponse IgG naturelle est dominée par des anticorps neutralisants contre l'épitope E2EP3. E2EP3 (STKDNFNVYKATRPYLAH, aa 2800-2818) est une séquence linéaire située à l'extrémité N-terminale de la glycoprotéine E2 à proximité d'un site de clivage à la furine E2/E3. Cet épitope est exposé sur l'enveloppe virale et est hautement conservé dans de nombreux alphavirus (Kam *et al.*, 2014; Kam, *et al.*, 2012). L'épitope linéaire E2EP3 représente un candidat de choix qui pourrait être incorporé dans des formulations vaccinales contre le CHIKV.

1.7.2 Virus de l'Influenza aviaire

Le second modèle antigénique utilisé dans le cadre de ce projet provient du virus de l'influenza aviaire. Les virus grippaux aviaires en tant que virus grippaux zoonotiques peuvent infecter l'homme suite à des contacts directs avec des animaux ou des environnements contaminés. Par contre, ce type de virus n'entraîne pas de transmission inter-humaine efficace. Le virus de l'influenza aviaire, est un virus à ARN à brin négatif appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae*. Ce virus est du type A qui est le plus important en terme de santé publique humaine, car il est le seul type connu à causer des pandémies de grippe et à infecter les humains, les autres mammifères et oiseaux (Bouvier et Palese, 2008). En 1997, des cas d'infection humaine par le virus A (H5N1) hautement pathogène ont été observés à Hong Kong, coïncidant avec une épizootie chez la volaille (Houser et Subbarao, 2015; Suarez *et al.*, 1998). Depuis 2003, ce virus aviaire s'est propagé dans des régions d'Asie, d'Europe et d'Afrique, provoquant des millions d'infections chez les oiseaux (Normile, 2004). Comme les oiseaux jouent un rôle important en tant que source d'aliments et de revenus chez l'homme, la lutte contre la maladie chez l'animal est essentielle afin de réduire le risque d'une nouvelle pandémie. Ces infections rares chez l'homme peuvent également promouvoir le développement de nouvelles souches de grippe humaines présentant un potentiel pandémique.

Le virus de l'influenza aviaire affiche une forme sphérique de l'ordre de 100 nm de diamètre ou filamenteuse pouvant être supérieure à 300 nm (Bouvier et Palese, 2008; Calder *et al.*, 2010). Son enveloppe membranaire contient deux glycoprotéines, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), ainsi que des canaux ioniques protéiques (M2) traversant l'enveloppe lipidique. La couche intérieure de l'enveloppe est constituée de la protéine matricielle (M1) essentielle pour la formation de particules pseudo-virales et capable de former des tubes intracellulaires (Calder *et al.*,

2010). La caractéristique principale du virus de la grippe est sa variabilité au niveau des glycoprotéines de surface, HA et NA, qui se lient aux récepteurs de l'hôte pour faciliter l'entrée virale. Puisqu'il existe 18 sous-types d'hémagglutinine et 11 sous-types de neuraminidase, ces glycoprotéines sont les protéines qui déterminent le sous-type du virus de la grippe (Houser et Subbarao, 2015). Les vaccins classiques antigrippaux sont basés sur le concept de la production d'anticorps dirigés contre la protéine HA virale. Par contre, leur variabilité présente de nombreuses incertitudes des souches de sélection pour le vaccin de la saison et permet au virus d'échapper à l'immunité antigrippale existante. Compte tenu des limites des vaccins antigrippaux approuvés, il est nécessaire d'adopter une approche de développement d'un vaccin universel qui ne nécessitera pas de mises à jour annuelles. Un candidat important pour le vaccin universel cible la protéine M2. M2 est une protéine transmembranaire homo-tétramérique de type III qui agit en tant que viroporine. Chaque monomère, composé de 96 acides aminés, présente un ectodomaine N-terminal (M2e) de 23 résidus, un domaine transmembranaire de 19 résidus et un domaine C-terminal intracellulaire de 54 résidus (Cho *et al.*, 2015; Zebedee et Lamb, 1988). Le domaine extracellulaire M2e est hautement conservé chez tous les sous-types de la grippe et présente un antigène cible pour la production d'un vaccin antigrippal (De Filette *et al.*, 2005).

1.8 Problématique et sujet d'étude

Actuellement, la majorité des vaccins sont encore développés selon le concept d'introduction chez l'hôte du pathogène entier qui n'induit pas de pathologie (vaccins vivants atténués) ou qui est incapable de se multiplier (vaccins inactivés). Toutefois, un regain de la virulence pour le 1^{er} type ou une inactivation incomplète et une réponse immunitaire faible pour le 2^{ième} type demeurent des inconvénients majeurs.

Pour contrer ces problèmes, le développement de vaccins dits de nouvelle génération, incluant les vaccins sous-unitaires, est un besoin important. Ces vaccins sont plus sécuritaires car ils contiennent uniquement des fragments antigéniques de l'agent pathogène (protéiques/peptidiques, glucidiques). Toutefois, ceux-ci sont fortement moins immunogènes et moins efficaces pour induire une immunité pour la protection de la maladie. La combinaison des avantages des vaccins viraux et des vaccins sous-unitaires, dans le but de maximiser la sécurité et l'efficacité du vaccin, est une avenue hautement prometteuse. Ce type de vaccins repose sur une approche alternative qui consiste à augmenter l'immunogénicité par une forte densité d'antigène réparti sur la surface de nanostructures, ce qui fournit une interaction multivalente avec des cellules présentatrices d'antigène et, pourrait donc permettre d'augmenter la réponse immunitaire.

Au cours des deux dernières décennies, les chercheurs ont beaucoup exploré les nanostructures à base de peptides auto-assemblants en tant que matériaux/particules avancés en biomédecine et ingénierie tissulaire. L'utilisation de peptides en tant que bloc de construction comporte de nombreux avantages dans le design et la production de nanovaccins. En outre, le processus d'assemblage de ces peptides est spontané et permet de former des structures hautement ordonnées possédant une haute stabilité chimique, enzymatique et mécanique. La modulation de la séquence en acides aminés permet d'ajuster les propriétés physico-chimiques de la nanostructure. Également, la synthèse peptidique permet d'ajouter des épitopes antigéniques au domaine peptidique d'auto-assemblage afin de présenter ces épitopes dans un mode multivalent sur les structures finales, ce qui entraîne une meilleure bio-reconnaissance par les cellules immunitaires. Finalement, l'utilisation de peptides de synthèse permet d'éviter les processus souvent problématiques associés à la purification et caractérisation des produits biologiques.

1.8.1 Hypothèse

Afin de répondre à cette problématique, nous émettons l'hypothèse que le design de nanofilaments hautement organisés à base de peptides et affichant l'épitope fonctionnel à leur surface pourrait conduire au développement de nouveaux nanovaccins hautement efficaces.

1.8.2 Objectifs du projet

L'objectif global de ce projet est de développer de nouvelles plateformes de vaccination riche en feuillets- β à base de peptides affichant une forte capacité d'auto-assemblage. Les deux objectifs spécifiques sont:

1. La conception, synthèse et caractérisation de nanostructures à base de peptides amyloïdes ainsi que leur validation biologique *in vitro* et *in vivo*.
2. La conception, synthèse et caractérisation de nanostructures à base de peptides amphiphiles.

Pour atteindre ces objectifs et étudier le potentiel de ces structures en tant que plateforme de vaccination, nous avons sélectionné deux modèles d'antigène peptidique dérivés, respectivement, du virus Chikungunya et du virus de l'Influenza aviaire. Ces antigènes sont hautement conservés chez leurs virus respectifs. Les études précédentes ont identifié et démontré la capacité protectrice des courtes séquences peptidiques E2EP3, dérivé de l'extrémité N-terminale de la glycoprotéine E2 de l'enveloppe virale du virus Chikungunya, et M2e, provenant de l'ectodomaine N-terminal de la protéine M de la matrice du virus de l'Influenza. Ces deux épitopes prometteurs pour la conception d'un vaccin seront utilisés comme antigènes modèles.

CHAPITRE II

ENGINEERING AND EVALUATION OF SELF-ASSEMBLED AMYLOID NANOPARTICLES AS POTENTIAL VACCINES

Margaryta Babych^{1,2}, Geneviève Bertheau-Mailhot^{3,4}, Ximena Zottig^{1,2}, Laurie Gauthier^{3,4}, Denis Archambault^{3,4*} and Steve Bourgault^{1,2*}

¹*Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, Montréal, Qc, CANADA*

²*Quebec Network for Research on Protein Function, Engineering, and Applications, PROTEO*

³*Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal, Qc, CANADA*

⁴*The Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre, CRIPA*

Description du rôle des auteurs

Margaryta Babych :

- Conception du projet;
- Exécution des expériences (synthèse peptidique, l'assemblage et caractérisation des nanostructures, immunisation des souris);
- Rédaction de l'article

Geneviève Bertheau-Mailhot :

- Exécution des expériences (essai de cytotoxicité, internalisation, immunisation des souris, ELISA);
- Conseils techniques

Ximena Zottig :

- Exécution des expériences (immunomarquage aux particules d'or, TEM)

Laurie Gauthier :

- Exécution des expériences (essai de cytotoxicité, immunisation des souris, ELISA)

Denis Archambault :

- Conception du projet,
- Rédaction et correction de l'article

Steve Bourgault :

- Conception du projet,
- Rédaction et correction de l'article

2.1 Résumé

La conception de nanoparticules exposant une forte densité d'antigènes constitue une stratégie prometteuse pour répondre aux défis concernant la sécurité des vaccins classiques atténués ainsi que pour augmenter l'immunogénicité des vaccins sous-unitaires. Dans cette étude, nous avons développé un nanovaccin entièrement synthétique basé sur une séquence peptidique amyloïde avec des propriétés d'auto-assemblage élevées. Deux épitopes immunogènes ont été utilisés pour évaluer le potentiel d'un peptide de 10 résidus dérivé de l'islet amyloid polypeptide: (i) E2EP3 provenant de la glycoprotéine E2 du virus Chikungunya et (ii) M2e du domaine extracellulaire de la protéine matricielle 2 du virus influenza A. Des peptides chimériques, contenant l'antigène peptidique attaché au corps amyloïde par un court bras flexible, ont été préparés par synthèse sur support solide. Tel qu'observé par microscopie à force atomique, ces polypeptides s'auto-assemblent en fibres linéaires et non ramifiées d'un diamètre entre 6 et 8 nm. Ces assemblages étaient caractérisés par une conformation quaternaire riche en feuillets- β croisés, ce qui est démontré par la spectroscopie de dichroïsme circulaire et la fluorescence de la thioflavine T. Des dosages ELISA et l'immunomarquage aux particules d'or des fibres ont révélé une forte densité d'épitopes E2EP3 et M2e exposés sur la surface des fibres. Ces particules amyloïdes étaient cytocompatibles et ont été efficacement internalisées par les macrophages. L'immunisation des souris avec les constructions de E2EP3 a révélé de fortes réponses d'IgG contre l'épitope, qui dépendaient de l'auto-assemblage et ne nécessitaient pas la co-injection d'un adjuvant, tel que l'Alhydrogel. Ces résultats indiquent que la structure amyloïde riche en feuillets- β croisés constitue une plateforme nanovaccinale synthétique auto-adjuvante adéquate pour ancrer des déterminants antigéniques et pour augmenter l'immunogénicité des épitopes peptidiques.

2.2 Abstract

The design of nanoparticles exposing a high density of antigens constitutes a promising strategy to address safety concerns of conventional live-attenuated vaccines as well as to increase the immunogenicity of subunit vaccines. In this study, we developed a fully-synthetic nanovaccine based on an amyloid peptide sequence with high self-assembling properties. Two immunogenic epitopes were used to evaluate the potential of a 10-mer peptide derived from the islet amyloid polypeptide: (i) E2EP3 from E2 glycoprotein of the Chikungunya virus and (ii) M2e from the extracellular domain of influenza A virus matrix protein 2. Chimeric peptides, encompassing the peptide antigen attached to the amyloid core by a short flexible linker, were prepared by solid phase synthesis. As observed by atomic force microscopy, these polypeptides self-assembled into linear and unbranched fibrils with a diameter ranging from 6 to 8 nm. A quaternary conformation rich in cross- β -sheets characterized these assemblies, as demonstrated by circular dichroism spectroscopy and thioflavin T fluorescence. ELISA assays and transmission electronic microscopy of immunogold labeled-fibrils revealed a high density of E2EP3 and M2e epitopes exposed on the fibril surface. These amyloid particles were cytocompatible and were efficiently uptaken by macrophages. Mice immunization with E2EP3-constructs revealed strong IgG responses against the epitope, which were dependent on self-assembly and did not require the co-injection of Alhydrogel adjuvant. These results indicate that the cross- β -sheet amyloid assembly constitutes a suitable synthetic self-adjuvanted nanovaccine platform to anchor antigenic determinants and to increase the immunogenicity of peptide epitopes.

2.3 Introduction

Vaccination has constituted one of the most significant advances in human health of the last century. Today, most vaccines used in clinics still consist of conventional vaccines that are based on live-attenuated pathogens (1st type) or inactivated microbial particles (2nd type) (Moyle, 2017; Moyle et Toth, 2013; Skwarczynski et Toth, 2014). However, risk of reversion to virulence for the 1st type or incomplete inactivation and weak induced immunological response for the 2nd type remain major inconvenients (Gomes *et al.*, 2017). Efficiency and/or safety issues of conventional vaccines have motivated the development of novel vaccination strategies (Garcia-Sastre et Mena, 2013). Subunit vaccines have shown great potential to develop safer formulations. However, they tend to be weakly immunogenic and to require the use of strong immunostimulatory agents, known as adjuvants. The co-delivery of an antigen with adjuvant allows its stabilization, sustained release and/or activation of specific cells of the immune system (Moyle et Toth, 2013; Skwarczynski et Toth, 2014). Besides, an alternative strategy to increase the immunogenicity of subunit vaccines consists of developing nanoparticles exposing a high density of relevant antigens at their surface or in their core (Gomes *et al.*, 2017; Herve *et al.*, 2014; Moyle, 2017). These nanovaccines have several advantages including; (i) enhanced immunogenicity, (ii) increased adsorption by antigen-presenting cells and/or (iii) stabilization of the antigen (Boraschi et Italiani, 2015; Luo *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2014). Synthetic and inorganic derived nanoparticles, such as polymers, liposomes and gold particles, were evaluated as delivery systems to enhance antigen processing and/or as immunostimulatory adjuvant, although they have limitations associated with their toxicity, stability and/or biocompatibility (Zaman *et al.*, 2013). On the other hand, particles composed of proteins that self-assemble into well-organized repetitive antigen displays have attracted great interest for their biocompatibility, low toxicity, stability, molecular specificity and multivalency (Karch et Burkhard, 2016).

Protein-based nanoparticles include viral structural proteins and synthetic peptides that self-assemble by non-covalent interactions into well-defined nanoscale assemblies (Negahdaripour *et al.*, 2017). Recently, β -sheet rich fibrils, which closely resembled to amyloids, have revealed potential applications in nanovaccine engineering (Azmi *et al.*, 2014; Pompano *et al.*, 2014; Rudra *et al.*, 2010; Waku *et al.*, 2013).

From a structural perspective, amyloids are highly organized proteinaceous assemblies characterized by a cross- β -sheet quaternary structure in which individual β -strands are running nearly perpendicular to the fibril axis and the β -sheets are tightly packed on one another (Tycko *et al.*, 2013). These nanostructures, which result from the self-assembly of monomeric building blocks, have been historically associated with pathological states (Chiti et Dobson, 2017). Interestingly, recent studies have identified many amyloid assemblies that play essential physiological roles in living organisms, which utilize them for their unique biological, physical and/or mechanical properties (Fowler *et al.*, 2007). The occurrence of functional amyloids in almost all species highlights that this cross- β -sheet quaternary conformation could be used as biomaterials and nanoparticles for (bio)medical applications. In fact, amyloid assemblies have interesting characteristics, including mechanical resistance similar to spider silk, high biocompatibility and thermal, chemical and enzymatic stability (Knowles et Buehler, 2011; Wei *et al.*, 2017). In this respect, amyloid peptide sequences could be engineered to generate nanovaccines. By functionalizing an immunogenic epitope to an amyloidogenic peptide, the resulting assemblies would function as a repetitive antigen display. The high density of antigen distributed on the surface of the amyloid core should allow stronger immune responses than un-conjugated peptide epitope (Pompano *et al.*, 2014). Moreover, the use of synthetic peptides facilitates preparation, purification, characterization and storage, making them excellent candidates as vaccines. An

analogous strategy has been used by means of an artificial short β -sheet sequence, the Q11 peptide (QQKFQFQFEQQ) (Azmi *et al.*, 2014; Rudra *et al.*, 2012; Rudra *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2016). The nanovaccine delivery system based on the self-assembling Q11 peptide elicited T cell-dependent antibody responses toward the immunogenic epitope of chicken egg ovalbumin, OVA₃₂₃₋₃₃₉, without inducing inflammatory response (Rudra *et al.*, 2010). While this β -sheet-rich fibrillary vaccination technology appears promising, this approach has not been validated with an amyloid sequence derived from a natural protein and with scaffolds harboring different supramolecular morphology, *i.e.* length, height, twisting pitch, *etc.* Considering that the size, shape, hydrophobicity and surface charge can dramatically affect the biodistribution, cellular uptake and immune response of particles (Jorquera et Tripp, 2016; Wen *et al.*, 2016), it is critical to evaluate additional self-assembling fibrillizing peptides as nanoplatform for vaccine purposes. Moreover, the cellular mechanisms involved in the adjuvanted effect of fibrillar assemblies are still unclear.

In this context, we designed an amyloid vaccination platform based on a short sequence derived from the islet amyloid polypeptide (IAPP). This 10-mer amyloidogenic peptide was merged, either at the N- or C-terminal end, with two different antigenic determinants respectively derived from the influenza A virus and the Chikungunya virus (**Fig. 2.1**) (De Filette *et al.*, 2005; Kam *et al.*, 2012; Liu et Chen, 2005). This study reveals that cross- β -sheet fibrils assembled from a biological amyloid sequence constitute a suitable platform to anchor peptide epitopes and to substantially increase their immunogenicity.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Peptide synthesis, purification and characterization

Peptides were synthesized on solid support based on Fmoc chemistry and 2-(6-chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate (HCTU) coupling strategy, as previously described (De Carufel *et al.*, 2015). Pseudoproline dipeptide derivatives were incorporated to facilitate the synthesis of chimeric peptides (Abedini et Raleigh, 2005; Nguyen *et al.*, 2017). For fluorescein labeling, Fmoc-Lys(Dde)-OH was first coupled at the N-terminus of each peptidyl-resin followed by Boc-Gly-OH. After Dde removal with 2% hydrazine in DMF, a solution containing fluorescein isothiocyanate (FITC; 3 eq.) and triethylamine (6 eq.) in DMF was added and the mixture reacted overnight. Crude peptides were purified by preparative HPLC using a C18 column and a linear gradient of acetonitrile in H₂O/TFA (at 0.6% v/v). Collected fractions were analyzed by analytical HPLC using a C18 column and by 'time of flight' mass spectrometry using a LC/MS-TOF. Fractions corresponding to the desired peptide with a purity of over 95% were pooled and lyophilized.

2.4.2 Preparation of self-assembled amyloid fibrils and E2EP3-KLH conjugate

Lyophilized peptides were solubilized at 4 mM, otherwise specified, in endotoxin-free Tris-HCl (20 mM, pH 7.4) and sonicated for 5 min. Self-assembly was performed for 96 h., otherwise specified, at room temperature (RT) under rotary agitation at 40 rpm. Fluorescent fibrils were prepared at 1 mM with a molar ratio of 3:7 (FITC-E2EP3-I₁₀: E2EP3-I₁₀) under the same conditions. Conjugation of E2EP3 to keyhole limpet hemocyanin (KLH) was carried out at a 1:1 weight ratio of thiol-

modified E2EP3 peptide (E2EP3-Cys) to maleimide-activated KLH in the presence of 0.05 eq. TCEP. After 2 h. incubation at RT in endotoxin-free sterile Tris-HCl (20 mM, pH 7.4), KLH-conjugates were purified by dialysis (3.5K cut-off). LPS quantification was performed using the Limulus amoebocyte lysate detection assay (Pedersen *et al.*, 1994) and all preparations contained < 0.03 EU/mL. According to FDA recommendation (threshold of 0.5 EU/mL for vaccination in humans), these solutions were considered LPS-free and used for *in vitro* and *in vivo* experiments (He *et al.*, 2009).

2.4.3 Thioflavin T fluorescence

At the desired time of incubation, peptides were diluted in Tris-HCl (20 mM, pH 7.4) to 150 μ M. Thioflavin T (ThT) was added to a final concentration of 40 μ M and fluorescence was measured with excitation wavelength set at 440 and the emission spectra were measured from 450 to 550 nm.

2.4.4 Circular dichroism spectroscopy

At the desired time of incubation, samples were diluted at a final concentration of 150 μ M in Tris-HCl (20 mM, pH 7.4) and incorporated into a 1 mm path length quartz cell. Far-UV CD spectra were recorded from 190 to 260 nm using a J-815 CD spectropolarimeter. Wavelength step was set at 0.5 nm with an average time of 10 sec/scan at each wavelength step. Each collected spectrum was background subtracted with peptide-free buffer. Raw data were converted to mean residue ellipticity (MRE):

$$\begin{aligned}
 MRE \text{ (deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}\text{)} &= \\
 &= \frac{\text{Mean residue weight (g} \cdot \text{mol}^{-1}\text{)} \times \text{CD signal (deg)}}{10 \times \text{path length (cm)} \times \text{peptide concentration (g} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)}}
 \end{aligned}$$

2.4.5 Transmission electron microscopy

Samples were diluted to 150 μM and applied to glow-discharged copper carbon coated 400 mesh grids. Samples were negatively stained with 1.5% (w/v) uranyl formate for 1 min and air-dried for 24 h. For immunogold staining, grids with adsorbed fibrils were floated on droplets of 1% bovine serum albumin (BSA) to block non-specific binding. After incubation with primary antibody (1:1000) for one hour, grids were washed with 1% BSA in PBS, floated on droplets of gold-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500) for 1 h., washed with distilled water and stained with 1.5% (w/v) uranyl formate. Grids were examined using a FEI Tecnai 12 BioTwin microscope operating at 120 kV and equipped with an AMT XR80C CCD camera system.

2.4.6 Atomic force microscopy

Samples were diluted to 150 μM in 1% acetic acid and immediately applied to freshly cleaved mica. Micas were washed with deionized water were air-dried for 24 h. Images were acquired on a Veeco/Bruker Multimode AFM using scanasyst-air mode with a silicon tip (2-12 nm tip radius, 0.4 N/m force constant) on a nitride lever. Images were taken at 0.2 Hz and 1024 scan/min. The width and length of at least 150 individual fibrils per experiments were determined.

2.4.7 Enzyme-linked immunosorbent assay for epitope accessibility

High-binding ELISA plates were coated with 1.2 μM of peptide (E2EP3 or M2e) or amyloid assemblies (E2EP3-I₁₀, I₁₀-E2EP3 and M2e-I₁₀) overnight at 4°C. Wells were washed and blocked with PBS 0.05% tween-20 (PBS-T) containing 1% (w/v) BSA for 1h. Coated plates were treated with primary monoclonal antibody (anti-E2EP3 (1:1000) or anti-M2e (1:500)) for 3h at RT. Plates were washed and incubated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10 000). Peroxidase signal was detected using 3,3'-5,5'-tetramethyl benzedine (TMB) and absorbance at 450 nm.

2.4.8 Cell viability assay

J774A.1 macrophages were grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 50 U/mL penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. J774A.1 cells were cultured on sterile glass coverslips (5×10^5 cells/well) in a 24-well plate. After overnight incubation, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 4 h in presence of peptide solutions at final concentrations ranging between 200 μM and 2 μM in DMEM. Medium was removed and Live/Dead reagent solution (4 μM ethidium homodimer-1; 2 μM calcein-AM) in sterile PBS was added in each well. After incubation for 45 min at RT, cover glass were inverted and mounted on a microscope slide and samples were analyzed using a fluorescent microscope with a 20 \times 0.75-numerical aperture objective lens. Three images by wells were taken and processed using ImageJ software. Percentage of cell viability was calculated as the viable cells (green labeled) over the total number of cells (green + red). Statistical analysis were performed using Student's t-test ($p < 0.05$).

2.4.9 Evaluation of cellular uptake by confocal microscopy and flow cytometry

J774A.1 macrophages were cultured on coverslips overnight as described above. Cells were washed with PBS and incubated with fluorescent labeled peptides or fibrils (20 μ M) at 37 °C for 4 h. Cells were then washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 1 μ g/mL DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride). Cover glasses were mounted and fluorescence was analyzed with confocal microscope using a 60 \times oil immersion lens. All images were analyzed using ImageJ software. For flow cytometry analysis, cells were seeded in 6-well plates at a density of 2.5×10^5 cells/well overnight. After removing the media, cells were treated with labeled peptides or amyloid fibrils (1 or 10 μ M) at 37 °C for 4 h in complete DMEM media. After incubation, cells were washed 3 times with PBS buffer and harvested. Cells were suspended in PBS buffer prior to flow cytometry analysis. To confirm that the measured fluorescence was not associated to adsorption at the cell surface, trypan blue was used to quench the extracellular fluorescence of live cells. Cells were treated with 1 mg/mL trypan blue for 1 min immediately before flow cytometry analysis. Flow cytometry analyses were performed with 10 000 gated cells/sample with excitation at 488 nm and emission at 530 nm.

2.4.10 Mice immunization

Animal protocols were approved by the institutional committee according to the regulation of the Canadian Council for Animal Care. Peptides were dissolved in endotoxin-free sterile Tris-HCl (20 mM, pH 7.4) and allowed to self-assemble, as described above. Stock solutions were then diluted at the final concentration (1 mM and 4 mM) in endotoxin-free sterile PBS. Six-week-old female BALB/c mice were immunized subcutaneously with 200 μ L of synthetic peptide (E2EP3), fibrils

(E2EP3-I₁₀, I₁₀-E2EP3 and I₁₀ alone) or with 100 µL of KLH-E2EP3 (100 µg) with, or without, aluminium hydroxide gel (Alhydrogel adjuvant; Alum). Alum-adjuvanted groups received the same volume and peptide dose, prepared by diluting the peptide solution in Alum at a 1:1 volume ratio. Mice received two boosts at day 14 and 28 post-immunization with 100 µL, each containing 100 or 400 nmol of peptides. Control mice were immunized using the same volume of PBS. Blood samples were collected from the saphenous vein at day 0, 14 and 28-post primary-immunization. Mice were sacrificed two weeks after the final boost (day 42) and sera were harvested from cardiac puncture.

2.4.11 Determination of anti-E2EP3 antibody titers

Antibody titers were determined using an indirect ELISA. Plates were coated overnight at 4°C with 2 µg/mL of E2EP3 peptide (or I₁₀) diluted in sodium carbonate 0.05 M (pH 9.6). After extensive washing with PBS-T, plates were blocked with 1% (w/v) Bovine serum albumin (BSA) solution for 1 h. Determination of whole IgG was performed using 100 µL of a serial dilution of mouse sera (starting point 1:10²) in PBS-T (1% BSA) while isotype IgG determination were obtained by a dilution of 1:1000 of antisera (IgG2a, IgG2b, IgG3) or 1:10000 (IgG1). After 3 h incubation and 3 washes, HRP-conjugated goat anti-mouse whole IgG (1:5000), IgG1 (1:10000), IgG2a (1:5000), IgG2b (1:5000) and IgG3 (1:5000) were added for 1 h. Plates were washed and HRP signal was detected using TMB substrate. To determine antibody titers, optical density (450 nm) were compared to the cutoff value. The cutoff values represent two time the mean of the negative control group (PBS) for each dilution. Titer represents the last dilution with an absorbance above the cutoff value.

2.5 Results and discussion

2.5.1 Design and characterization of amyloid-based nanovaccines

In this study, we used a short amyloid sequence derived from IAPP to generate a nanovaccine scaffold. IAPP, or amylin, is an aggregation-prone 37-residue peptide hormone expressed by pancreatic β -cells (Nguyen *et al.*, 2015). IAPP amyloid fibrils are known to be non-cytotoxic (Abedini *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2017). The segment 20-29 of IAPP (I₁₀), which is often considered as the amyloidogenic sequences, was used as the self-assembling unit (**Fig. 2.1B**). It was reported that this 10-mer segment (SNNFGAILSS) self-assembles into cross- β -sheet amyloid fibrils independently of the full-length parent peptide (Madine *et al.*, 2008; Moriarty et Raleigh, 1999). It is known that the size and properties (charge, conformation, hydrophobicity) of the conjugate can dramatically affect the self-assembling capacity of a fibrillizing unit as well as the resulting (supra)molecular organization and, in some cases, it can even prevent the formation of amyloid (Azmi *et al.*, 2014; Lopez Deber *et al.*, 2014). To investigate the potential of I₁₀ as a immunogenic carrier, we initially selected two peptide epitopes with different physico-chemical properties. The first one consists of the dominant linear epitope E2EP3 derived from the N-terminal domain of the E2 glycoprotein, which is exposed on the viral envelope of the Chikungunya virus (Kam *et al.*, 2012). The second immunogenic epitope derived from the N-terminal extracellular domain of the influenza A virus matrix protein 2 (M2e). This sequence is evolutionarily conserved among various avian influenza strains and constitutes a promising epitope for designing a universal vaccine (De Filette *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2015). Epitopes were merged to the amyloidogenic sequence via a flexible tetra-Gly spacer to better allow the assembly of the chimeric peptide sequence (**Fig. 2.1B**).

Under their monomeric state, *i.e.* immediately after solubilization in aqueous buffer, all peptides showed mainly a random coil secondary structure, as revealed by the presence of a single minimum between 200 and 206 nm by CD spectroscopy (**Fig. 2.2A**). Nonetheless, CD spectrum of monomeric M2e-I₁₀ peptide indicated the presence of a partial helical conformation, with a second minimum at 222 nm. This is in agreement with the postulated α -helix of the N-terminal segment of the extracellular domain of M2e protein (Cho *et al.*, 2015). Upon 96 h incubation under rotary agitation, all chimeric peptides adopted a secondary structure rich in β -sheets, as observed with the single minimum around 218 nm (**Fig. 2.2B**). The formation of the amyloid cross- β -sheet quaternary conformation was evaluated using thioflavin T (ThT) fluorescence. ThT is a benzothiazole dye that exhibits a strong increase of its fluorescence quantum yield and a shift of its excitation spectrum upon binding to amyloid structure (Naiki *et al.*, 1989; Sebastiao *et al.*, 2017). All peptides were ThT-negative at time 0 whereas a strong ThT signal was observed after 4 days of incubation (**Fig. 2.2C**). It is worth mentioning that the E2EP3 and M2e peptide epitopes alone (without the amyloid I₁₀ fibrilizing unit) did not self-assemble over 96 h, as observed by ThT fluorescence and atomic force microscopy (AFM) (**Fig. 2.8**). The formation of supramolecular assemblies was confirmed by negative-stain transmission electron microscopy (TEM). As observed on **Fig. 2.2D**, all four peptides formed fibrils characterized by a ribbon-like morphology and these assemblies were poorly twisted. Thus, independently of the net charge (+2 for E2EP3; -2 for M2e), the physico-chemical properties and the length of the grafted epitope, as well as its orientation (N- or C-terminal), the I₁₀ chimeric peptides undergo a random coil-to- β -sheet secondary conformational transition into morphologically similar amyloid fibrils.

We further characterized amyloid fibrils by AFM and an average diameter ranging between 6 and 8 nm was revealed for all assemblies (**Fig. 2.3**). Surprisingly for

amyloid particles, a moderate polydispersity in fibril length was observed and these fibrils tend to be somewhat short. E2EP3-functionalized fibrils showed a similar distribution with an average length of 630 ± 303 nm and 503 ± 206 nm for E2EP3-I₁₀ (**Fig. 2.3A**) and I₁₀-E2EP3 fibrils (**Fig. 2.3B**), respectively. In contrast, filaments of M2e-I₁₀ were shorter, with an average length of approximately 371 ± 135 nm (**Fig. 2.3C**). AFM quantification of I₁₀ fibrils, without epitope, was challenging considering that these assemblies tend to form clumps of particles (**Fig. 2.9**). Nonetheless, non-functionalized I₁₀ assemblies show similar height and length to I₁₀ fibrils functionalized with immunogenic epitope. The average length of amyloid assemblies observed in this study is shorter than the length reported for Q11 fibrils in the order of microns (Rudra *et al.*, 2010), whereas the diameters were in the same range (Wen *et al.*, 2016). Considering that the strength of T-cell response, the efficiency to enter the lymphatic system as well as the uptake by antigen-presenting cells (APCs) are dependent of the nanoparticle size (Jorquera et Tripp, 2016), the difference in length between the Q11 and I₁₀ fibrillar platform could have an effect on the resulting immune response. Besides, it has been shown that the conjugation of a 29-mer B cell epitope derived from the M-protein of group A Streptococcus (J14) precludes the self-assembly of the Q11 fibrillizing sequence (Azmi *et al.*, 2014) while, as reported here, the I₁₀ sequence can tolerate at least two different conjugated epitopes. Overall, these results indicate that the conjugation of different peptide sequences at the N- or C-terminus of I₁₀ did not affect its ability to self-associate into cross- β -sheet-rich amyloid fibrils as well as the final morphology of the resulting assemblies.

2.5.2 Availability of epitopes on the surface of amyloid fibrils

Antigen accessibility and reactivity are key factors that need to be considered for the design of subunit (nano)vaccines (Zaman *et al.*, 2013). To evaluate the availability of

E2EP3 and M2e epitopes on fibril surface, we used qualitative (TEM) and semi-quantitative immunoassays (ELISA). Immunogold staining provided us with information about the presence and accessibility of the antigens. To label epitopes in TEM samples, a secondary antibody conjugated with 10 nm gold nanoparticle was used to reveal the intermolecular interaction between the primary antibody and the peptide. Fibrils assembled from E2EP3-I₁₀, I₁₀-E2EP3 and M2e-I₁₀ chimeric peptides bound avidly to gold-conjugated antibody upon treatment with anti-E2EP3 and anti-M2e antibody, respectively (**Fig. 2.4**). In sharp contrast, I₁₀ fibrils showed no labelling with gold particles using the anti-E2EP3 and the anti-M2e antibody, confirming the specificity of the assay (**Fig. 2.10**). The distribution of gold nanoparticles along the fibril axis further indicated that the epitope is accessible on the fibril surface and that the immunogenic peptides are not incorporated into the amyloid core. The availability of the epitopes on the I₁₀ amyloid fibrils was confirmed by ELISA using monoclonal antibodies to E2EP3 and M2e. Plates were coated with the monomeric peptide epitope or with functionalized fibrils and the binding of primary antibody was revealed using a secondary antibody conjugated with peroxidase. Strikingly, the plates coated with E2EP3 and M2e amyloid fibrils produced a similar ELISA signal to plate coated with the same amount of monomeric peptide (**Fig. 2.4D-E**). These results indicate that the epitopes were present and available on the surface of the I₁₀ amyloid fibrils for all three constructs.

2.5.3 I₁₀ amyloid-based nanovaccines are cytocompatible

Amyloid fibrils were historically associated with pathological states and insoluble amyloid deposits were originally supposed to cause cell death. Over the last two decades compelling studies have revealed that the toxicity resides in the transient formation of soluble oligomeric intermediates and that well-defined amyloid fibrils

are not cytotoxic (De Carufel *et al.*, 2015; Kaye *et al.*, 2003). Nonetheless, before moving forward with mice immunizations with the amyloid-based vaccine against the Chikungunya virus, we evaluated the toxicity of I₁₀, E2EP3-I₁₀ and I₁₀-E2EP3 assemblies using the Live/Dead assay. Cytotoxicity assays were conducted at high concentrations, 2 μ M and 200 μ M, using the macrophage J774A.1 cell line. As observed on fluorescence microscopy images, macrophages treated with nanofibrils showed a similar green/red cell ratio to the vehicle treated cells (PBS) (**Fig. 2.5A**). The red fluorescence (ethidium homodimer-1) is associated with loss of plasma membrane integrity whereas the green fluorescence correlates with intracellular esterase activity of metabolically active macrophages. This was further supported by a quantitative analysis, which indicated a cell viability of over 85% for all amyloid fibrils (**Fig. 2.5B**).

2.5.4 Amyloid fibrils are efficiently internalized by macrophages

Internalization of antigens by antigen-presenting cells (APCs) is a prerequisite for the initiation of the immune response and the induction of immunological memory (Black *et al.*, 2010). APCs include dendritic cells, macrophages and B-cells. To evaluate the potential of the I₁₀ amyloid assemblies as antigen delivery system into APCs, we performed cellular uptake assays using macrophages J774A.1. Accordingly, a fluorescent probe was attached to the N-terminal domain of the chimeric peptide E2EP3-I₁₀ and internalization of labelled amyloids was evaluated by confocal microscopy and flow cytometry. To maintain the overall peptide net charge, a Lys residue was added at the N-terminus and the fluorophore was orthogonally conjugated to the Lys ϵ -amine on solid support using isothiocyanate chemistry. To construct fluorescent amyloid fibrils, E2EP3-I₁₀ and Fluo-E2EP3-I₁₀ peptides were co-assembled at a 7:3 molar ratio, respectively, for 96 hours under constant rotary

agitation. This molar ratio of fluorescent peptide allowed the assembly of fluorescent fibrils that appeared morphologically identical to unlabeled E2EP3-I₁₀ assemblies, as revealed by TEM analysis (**Fig. 2.6A**). By CD spectroscopy, fluorescein-labelled amyloids showed a characteristic β -sheet signal (**Fig. 2.11**). To evaluate the uptake of E2EP3-I₁₀ assemblies by macrophages, cells were incubated with fluorescent fibrils for 4 h at 37°C. Confocal fluorescence microscopy analysis showed that nanoparticles were efficiently uptaken by macrophages (**Fig. 2.6B-C**). Z-stack reconstruction revealed that the fluorescence was located inside the macrophages, confirming that amyloids were internalized by macrophages. Nonetheless, fluorescent puncta were also observed at the cell surface, suggesting that assemblies could also gathered on the plasma membrane. We then quantified these observations by flow cytometry. E2EP3-I₁₀ fibrils were efficiently internalized by macrophages, with over 90% of cells being FITC-positive after incubation with 10 μ M of labeled amyloids (**Fig. 2.6D**). To discriminate internalized fibrils from membrane-bound assemblies and to confirm that the fluorescence emitted from the nanoparticles was indeed intracellular, 1 mg/mL of trypan blue was added just prior to flow cytometry analysis to quench the extracellular fluorescence of living cells (Patino *et al.*, 2015). In presence of trypan blue, no significant decrease of the mean fluorescence intensity was observed (**Fig. 2.6E**), confirming the internalization of fibrils by macrophages. In sharp contrast, the monomeric-labeled E2EP3 peptide was poorly internalized by macrophages in comparison to the fibrils, at both concentrations (**Fig. 2.6F**). The high cellular uptake of fibrils decorated with E2EP3 compared to the epitope alone could be attributed to specific characteristics of the particles, including large interaction surface area with cell membrane. These results highlight that amyloid fibrils decorated with an antigenic epitope can be efficiently internalized by macrophages, a prototypical APC.

2.5.5 Evaluation of the immune response in mice

Results of cellular uptake revealed that I₁₀-fibrils deliver immunogenic antigen into APCs. To evaluate the potential of amyloid-based nanovaccine, mice BALB/c were immunized subcutaneously in presence, or in absence, of Alum adjuvant. KLH conjugated with E2EP3, in presence of Alum, was used as the positive control whereas PBS served as the negative control. Serum collected 14 days after the final boost, *i.e.* 42 days after primary immunization) was evaluated for IgG response against E2EP3 using ELISA. There was no IgG raised against the I₁₀ scaffold peptide, indicating that the amyloid platform is non-immunogenic (data not shown). In absence of Alum, the monomeric E2EP3 epitope did not raise any significant level of IgG against E2EP3 (**Fig. 2.7A**). When co-injected with Alum, the monomeric E2EP3 peptide raised a very low antibody response. In sharp contrast, when the E2EP3 epitope was conjugated to the amyloid scaffold via the N-terminal domain of the self-assembling unit, a sharp increase of antibody titers was observed. Notably, results showed that injection of 400 nmol E2EP3-I₁₀ elicited a similar IgG response to the 100 nmol doses (**Fig. 2.7A**). Interestingly, the Alum-adjuvanted E2EP3-I₁₀ fibrils showed a similar antibody response to E2EP3-I₁₀ fibrils alone (at 100 nmol), suggesting that the amyloid-scaffold acts as a self-adjuvanted nanovaccine. I₁₀-E2EP3 fibrils, *i.e.* E2EP3 conjugated to the C-terminal end of the I₁₀ amyloidogenic core, induced a significantly lower level of IgG titer compared to the E2EP3-I₁₀ construct. This indicates that the orientation of the E2EP3 epitope on the fibril surface is important. It was reported by alanine-scan analysis that the core-binding region that is recognized by anti-E2EP3 antibodies isolated from CHIKV-infected patients comprises the N-terminal segment 3-10 (STKDNFNVYK) (Kam *et al.*, 2012). Accordingly, when E2EP3 is linked to the C-terminal end of the amyloid core, *i.e.* I₁₀-E2EP3, processing of the fibrils by APCs likely lead to a pattern of peptide fragments with lower immunogenicity compared to the N-terminally orientated fibrils

due to fragmentation of the N-terminal segment of E2EP3. The isotypes of IgG were determined to evaluate the predominant antibodies produced in mice in response to amyloid-based vaccine. IgG1, typical of a Th2 response (Stevens *et al.*, 1988), was the predominant IgG subclasses induced by the fibrillar nanovaccine (**Fig. 2.7B**). IgG2a, IgG2b and IgG3, prototypical of Th1 response (Mosmann et Coffman, 1989), were also produced, but at lower level. As expected, a mixed Th1/Th2 E2EP3-specific response was observed for the KLH positive control group. The co-injection with the adjuvant Alum did not changed the antibody isotypes against E2EP3 fibrils, which was still biased towards Th2. Overall, these results highlight the potential of amyloid self-assembling peptide as immunogenic carrier by triggering an immunological response against a highly conserved epitope derived from the Chikungunya virus.

2.6 Conclusion

Synthetic peptides corresponding to a specific epitope sequence of an antigen offer, in theory, many advantages over conventional and subunit vaccines such as easy of synthesis, storage stability, specificity and safety (Yang et Kim, 2015). However, peptide-based vaccines have major limitations related to their very poor immunogenicity and low stability in biological fluids. Over the last two decades, strategies to overcome these limitations have been evaluated, including the usage of nanoparticles harboring a high density of peptide epitopes as delivery and/or immunestimulatory system. In this study, we designed a cross- β -sheet amyloid-based nanovaccine by attaching immunogenic epitopes to a short sequence derived from an aggregation-prone polypeptide. We observed that the self-assembling unit I₁₀ tolerates the successive addition of a 18-mer cationic peptide (E2EP3) and a 23-mer anionic peptide (M2e), leading to the formation of ribbon-like unbranched fibrillar

assemblies. In contrast to monomeric peptide epitope, the resulting amyloid fibrils decorated with E2EP3 were efficiently uptaken by macrophages, suggestive of a potential stimulation of the immune response. Actually, these fully-synthetic vaccines elicited high antibody titers against E2EP3 without the need for any additional adjuvants, such as aluminium salts. Particularly, the I₁₀ amyloid-core was not cytotoxic and non-immunogenic. The strong immune response observed against the epitope derived from the Chikungunya virus could be due to the efficient phagocytosis of the amyloid assemblies by APCs, as observed for macrophages *in vitro*. Moreover, considering that Alum did not increase the immune response of amyloid-based vaccine, the self-adjuvanting effect of the fibrillar scaffold could be related to a depot effect associated with a protection against enzymatic proteolysis and an extended residence time at the site of injection. Overall, this study highlights that short amyloid sequences derived from natural amyloidogenic protein constitutes a promising strategy to design self-assembled nanovaccine, uncovering new research direction for the development of fully-synthetic vaccine.

2.7 Figures

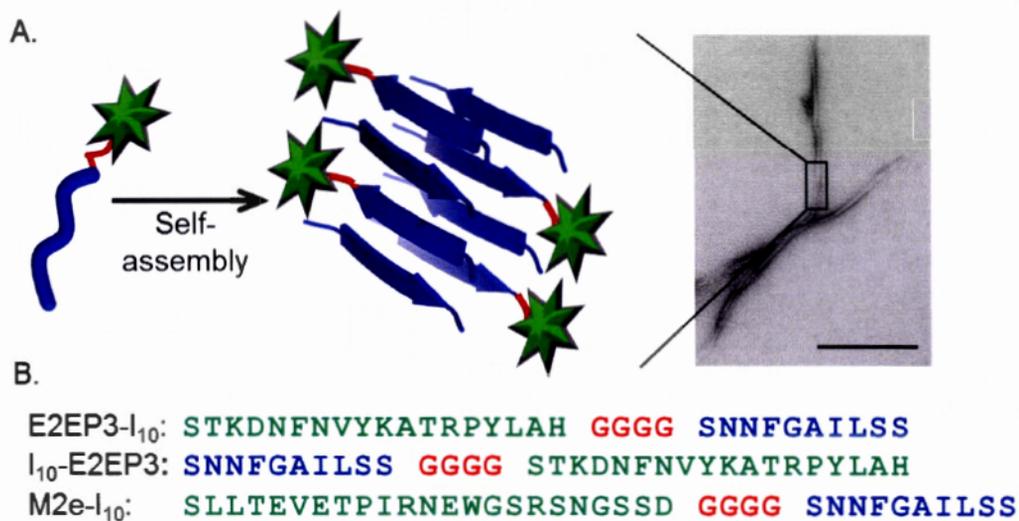


Figure 2.1 Design of self-assembled amyloid cross- β -sheet nanovaccine. (A) Schematic representation of self-assembly and TEM image of a prototypical amyloid fibril with the epitope represented by a green star, the flexible linker in red and the amyloid peptide in blue. Scale bar is 200 nm. (B) Sequence of chimeric peptides with the self-assembling amyloidogenic unit in blue (I₁₀), the flexible linker in red (GGGG) and the peptide epitope in green (E2EP3 or M2e).

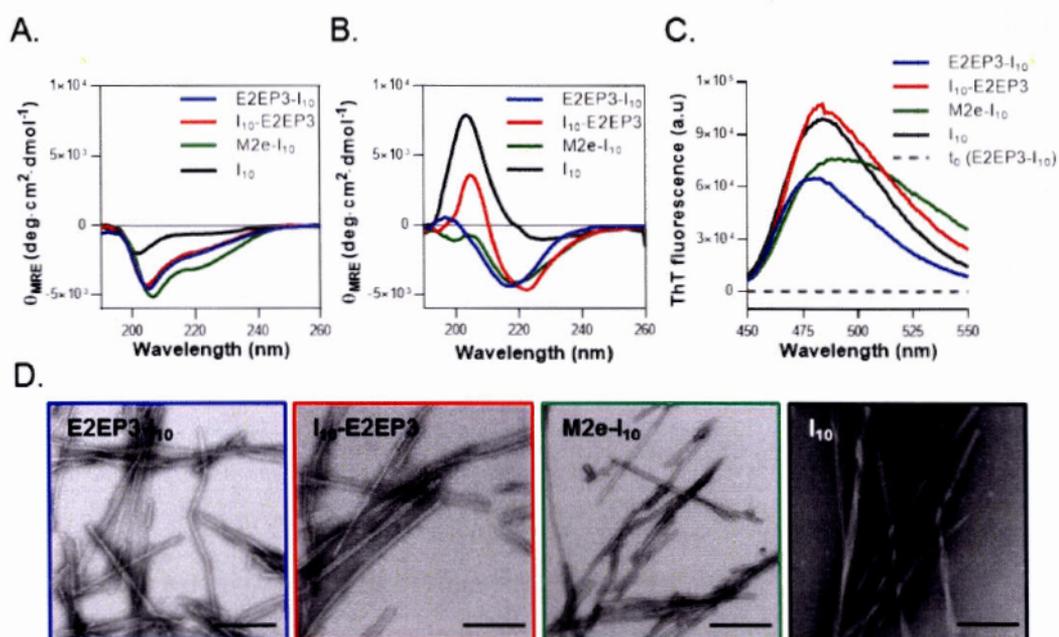


Figure 2.2 Self-assembly and conformational transition of chimeric peptides. (A, B) Circular dichroism spectra of monomeric peptides (A; time 0) and amyloid fibrils (B; time 96 h.). (C) ThT fluorescence spectra of amyloid assemblies after 96 h incubation. Emission fluorescence spectra were recorded between 450 and 550 nm after excitation at 440 nm. (D) Representative TEM images of amyloid assemblies after 96 h incubation. Scale bar is 200 nm.

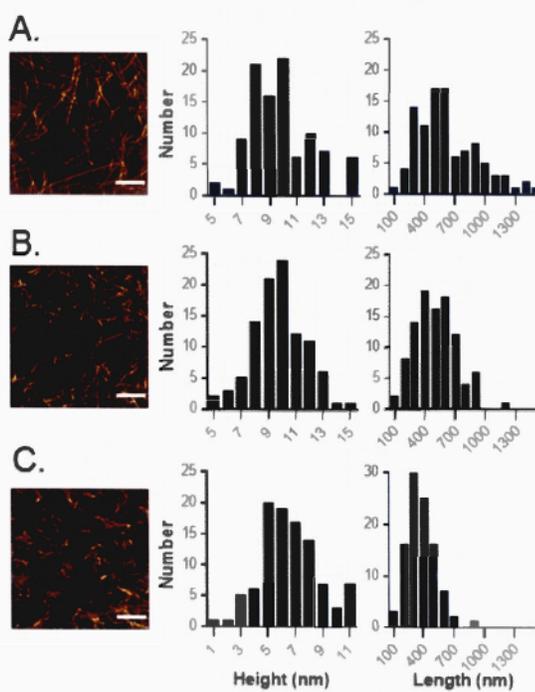


Figure 2.3 Supramolecular analysis of amyloid fibrils assembled from (A) E2EP3-I₁₀, (B) I₁₀-E2EP3 and (C) M2e-I₁₀. Distribution of height and length of fibrillar assemblies extracted from AFM analysis of 150 fibrils from at least three different sample preparations. Scale bar is 1 μ m.

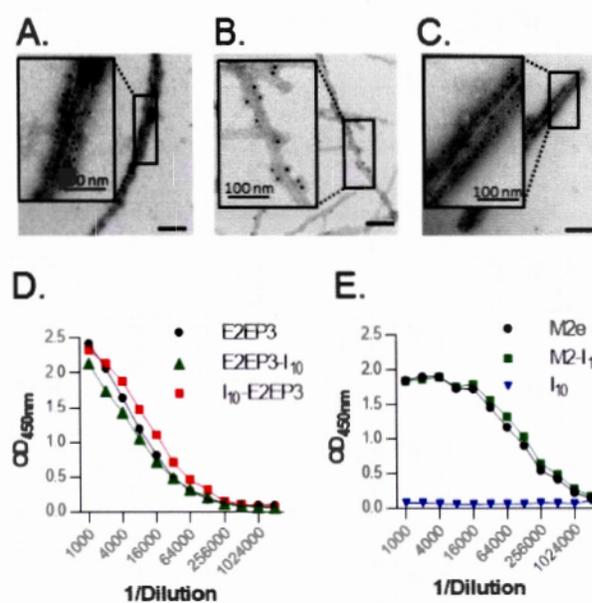


Figure 2.4 Availability of functional epitopes on fibril surface. Immunogold labeling of (A) E2EP3-I₁₀ fibrils, (B) I₁₀-E2EP3 fibrils and (C) M2e-I₁₀ fibrils observed by transmission electron microscopy after 96 h incubation with agitation. Scale bar is 200 nm. (D, E) ELISA analysis of individual monomeric peptide epitopes (E2EP3 or M2e) and fibrils (E2EP3-I₁₀, I₁₀-E2EP3, M2e-I₁₀ and I₁₀) at 1.2 μ M.

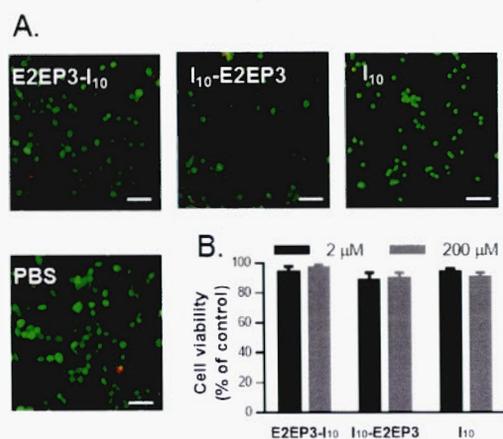


Figure 2.5 Cytocompatibility of E2EP3-I₁₀ amyloid fibrils. (A, B) Cells were treated with 2 and 200 μ M of E2EP3-I₁₀, I₁₀-E2EP3 or I₁₀ fibrils and cell viability was measured by means of the live/dead assay. (A) Representative fluorescence microscopy images showing the distribution of lived (green) and dead (red) J774A.1 cells after treatment with 200 μ M fibrils. Scale bar is 50 μ m. (B) Statistical analysis of three independent experiments. Data represent the mean \pm SD.

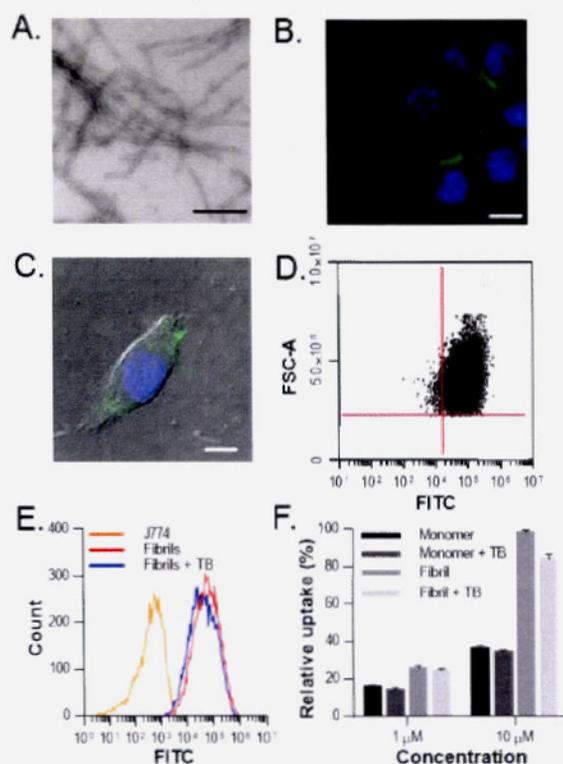


Figure 2.6 Cellular uptake of amyloid fibrils by macrophages. (A) Representative TEM images of fluorescent fibrils (Fluo-E2EP3-I₁₀:E2EP3-I₁₀, 3:7). Scale bar is 200 nm. (B) Representative fluorescence confocal microscopy images of macrophages after 4 h with 10 μM labeled E2EP3-I₁₀ fibrils (green). Scale bar is 10 μm. (C) Differential interference contrast (DIC) image merged with fluorescence confocal microscopy image of the cellular uptake of E2EP3-I₁₀ fibrils by macrophages. Scale bar is 10 μm. (D) Representative flow cytometry diagram showing cellular uptake of 10 μM labeled E2EP3-I₁₀ fibrils. The black dots in upper right quadrant of the diagram indicate macrophages that have internalized E2EP3-I₁₀ fibrils. (E) Flow cytometry diagram showing the cellular uptake of E2EP3-I₁₀ fibrils in presence, or absence, of 1 mg/mL trypan blue used to quench extracellular fluorescence. (F) Data represent the relative mean fluorescence intensity of gated cells expressed as a percentage of the maximal fluorescence of 10 μM labeled E2EP3-I₁₀ fibrils.

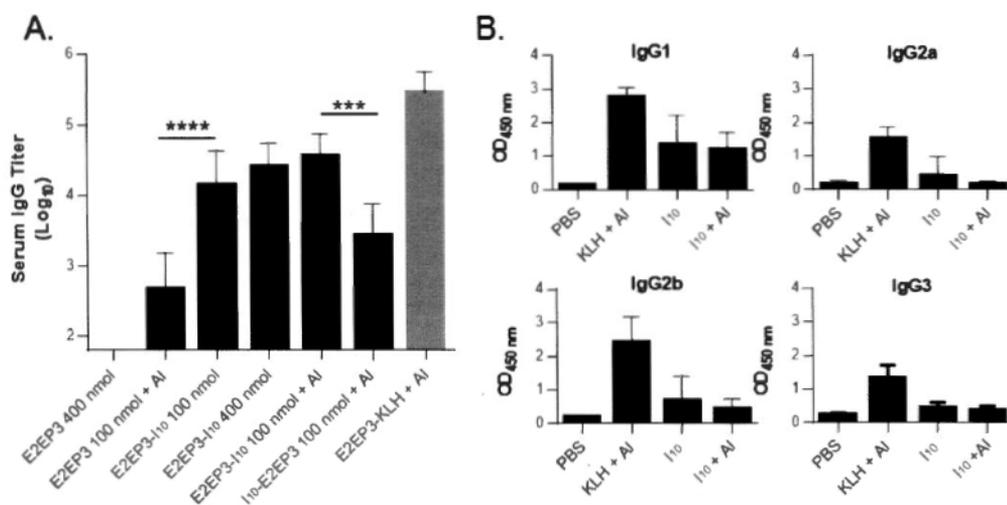


Figure 2.7 Adjuvanted IgG responses against E2EP3. (A) E2EP3-specific serum IgG antibody titers from the final bleed after immunization with monomeric peptide, amyloid fibrils (100 or 400 nmol) and E2EP3-KLH (100 μ mL), with or without Alum (AI), as indicated. Serum was collected 42 days after the initial injection and IgG titers were measured by ELISA on plates coated with E2EP3. Statistical analysis was performed using t-test between groups as represented; $p < 0.005$:***; $p < 0.0005$:****. (B) Levels of IgG isotypes in sera from immunized mice. I₁₀ corresponds to 100 nmol E2EP3-I₁₀ fibril.

2.8 Acknowledgements

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to S.B. and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR)/NSERC (Collaborative Health Research project) to D.A. We thank Soultan Al-Halifa and Claude Marchand for technical support and helpful discussions.

2.9 Supporting information

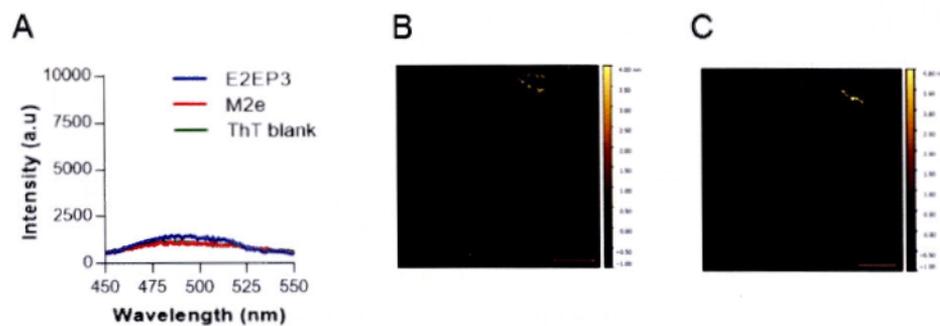


Figure 2.8 (A) ThT fluorescence and AFM images of (B) E2EP3 and (C) M2e peptide epitopes after 96 h. incubation under constant agitation in Tris-HCl (20 mM, pH 7.4). (B,C) Scale bar is 2 μm .

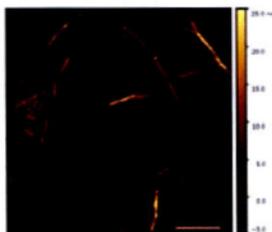


Figure 2.9 Representative AFM images of I_{10} amyloid assemblies after 96 h. incubation. Scale bar is 2 μm .

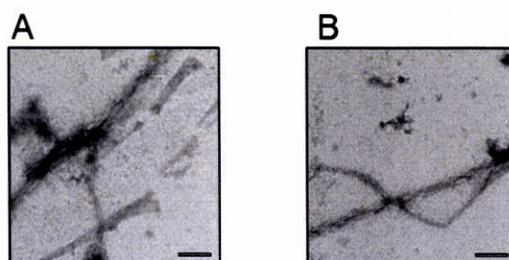


Figure 2.10 Immunogold labeling of I_{10} amyloid assemblies observed by transmission electron microscopy. (A) Anti-E2EP3 primary antibody and (B) Anti-M2e primary antibody. Scale bar is 200 nm.

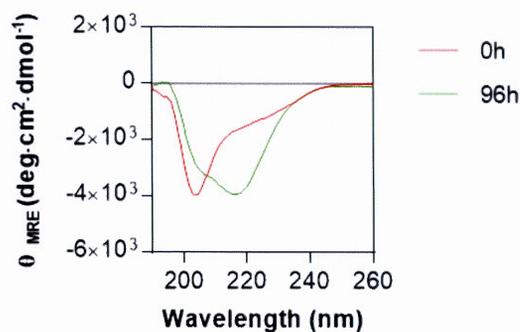


Figure 2.11 CD analysis of fluorescently labeled E2EP3- I_{10} fibrils (30% FITC-E2EP3- I_{10} and 70% E2EP3- I_{10}) before (0 h.) and after (96 h.) incubation under constant rotational agitation.

CHAPITRE III

DÉVELOPEMENT ET CARACTÉRISATION DE MICELLES CYLINDRIQUES

3.1 Mise en contexte

D'importants progrès ont récemment été réalisés dans le domaine de la bioingénierie. Au cours des dernières années, l'auto-assemblage de peptides amphiphiles en nanostructures, leurs propriétés physiques et leur bioactivité ont été étudiés par de nombreux laboratoires (Sur *et al.*, 2015; Tysseling-Mattiace *et al.*, 2008; Webber *et al.*, 2011). Compte tenu de leur nature amphiphile, soit un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe greffés sur la même molécule, le contrôle structural des nanostructures auto-assemblées et de leur comportement subséquent peut être réalisé par la manipulation des forces moléculaires qui contribuent au processus de formation (Sur *et al.*, 2013).

L'équipe du Professeur Stupp a développé et exploré le potentiel en génie tissulaire d'un peptide amphiphile composé d'une séquence de neuf résidus V₃A₃K₃ liée de manière covalente par son extrémité N-terminale à une chaîne alkyle composée de 16 atomes de carbone (C₁₆) (Sur *et al.*, 2015). Les principales forces intermoléculaires qui affectent la structure finale résultent en la répulsion des charges positives au niveau des trois lysines consécutives et des liaisons hydrogènes entre les séquences V₃A₃ pour former des nanofibres cylindriques rigides (Tantakitti *et al.*, 2016).

Dans le cadre de ce projet, nous nous intéressons aux applications de ces nanostructures fibrillaires en vaccination. Le présent travail a pour premier objectif d'étudier l'influence du pH sur l'auto-assemblage d'un peptide amphiphile. Le

deuxième objectif est d'étudier l'effet de la conjugaison d'un épitope attaché à l'extrémité C-terminale du peptide amphiphile sur ses propriétés d'auto-assemblage.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Synthèse, purification et caractérisation des peptides amphiphiles

Les peptides ont été synthétisés sur support solide via la chimie Fmoc comme décrit précédemment (De Carufel *et al.*, 2015). Les peptides bruts ont été purifiés par HPLC préparatif en utilisant une colonne C18 et un gradient linéaire d'acétonitrile dans H₂O/TFA (0,6% v/v). Les fractions recueillies ont été analysées par HPLC analytique en utilisant une colonne C18 et par spectrométrie de masse LC/MS-TOF. Les fractions correspondants au peptide désiré et affichant une pureté supérieure à 95% ont été regroupées et lyophilisées.

3.2.2 Préparation de fibrilles

Les peptides lyophilisés ont été solubilisés à 2 mM dans le tampon indiqué et soumis à un traitement aux ultrasons (sonication) pendant 5 minutes. L'assemblage des peptides amphiphiles a été réalisé à différents pH (4; 7; 7.4. et 10.4) et en présence de différentes forces ioniques.

3.2.3 Spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD)

Au temps d'incubation indiqué, les échantillons ont été dilués à une concentration finale de 80 μM et incorporés dans une cellule de quartz de 1 mm. Les spectres CD UV-lointains ont été enregistrés entre 190 à 260 nm en utilisant un spectropolarimètre CD J-815. Le cran de longueur d'onde a été réglé à 0,5 nm avec un temps moyen de 10 secondes/balayage à chaque longueur d'onde. Pour chaque spectre collecté, le spectre du tampon dépourvu de peptide a été soustrait.

3.2.4 Microscopie à force atomique

Les échantillons ont été dilués à 80 μM dans de l'acide acétique 1% et immédiatement appliqués à la surface du mica. Après lavage avec de l'eau distillée et filtrée à 0.2 μm , les micas ont été séchés à l'air pendant 24 h. Les images ont été acquises sur un AFM Veeco/Bruker multimode en utilisant un mode air-balayage avec un embout de silicium (rayon de pointe de 2-12 nm, constante de force de 0,4 N/m) sur un levier en nitrure. Les images ont été prises à 0,2 Hz et 1024 balayage/min.

3.3 Résultats et discussion

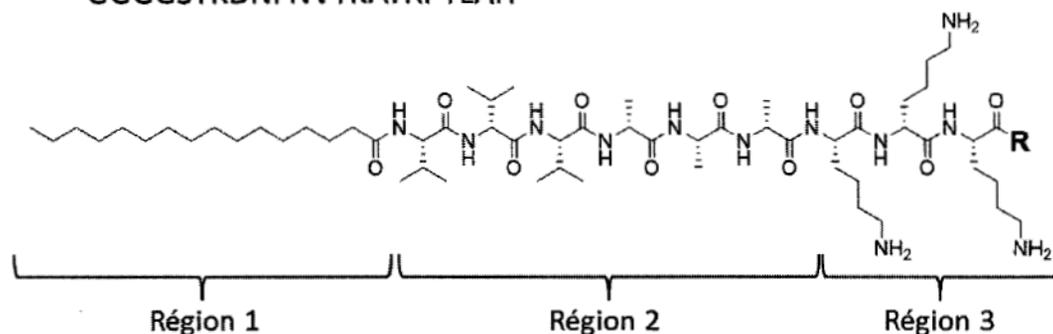
3.3.1 Auto-assemblage des peptides amphiphiles en fonction du pH

Dans cette étude, le peptide amphiphile $\text{C}_{16}\text{-V}_3\text{A}_3\text{K}_3$, initialement développé par le laboratoire du Professeur Stupp, a été utilisé (**Fig. 3.1A**). L'assemblage de ce peptide

est dirigé par les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène, pour former des micelles cylindriques et non des micelles sphériques. Le contrôle d'assemblage de ces molécules est dû aux interactions moléculaires dominantes qui commandent le processus d'assemblage et qui sont variables en fonction de la composition chimique. Il a été observé que la modification de la longueur de la queue hydrophobe et le nombre de résidus chargés n'affectent pas la forme cylindrique des nanofibres (Hartgerink *et al.*, 2002). Ceci permet de conclure que le segment peptidique V₃A₃ contient un nombre suffisant d'acides aminés pour former des feuillet-β stables (Pashuck *et al.*, 2010).

A. R : OH

GGGGSTKDNFNVYKATRPYLAH



B. PA : C₁₆ – VVVAACKK
PA – E2EP3: C₁₆ – VVVAACKK-GGGG-E2EP3

Figure 3.1 Schéma représentatif de la structure moléculaire et la séquence des peptides amphiphiles utilisés. Peptide amphiphile sans la molécule bioactive (A) et avec l'épitope E2EP3 (B). Les peptides amphiphiles possèdent un squelette similaire qui se compose de trois segments: une région hydrophobe de l'acide palmitique (région 1), une séquence peptidique de six résidus formant un feuillet-β (région 2), et un segment chargé de trois résidus de lysine consécutifs (région 3).

Pour étudier l'effet du pH sur les interactions complémentaires dans l'assemblage du peptide amphiphile et sur la structure finale des nanofibres, trois différents pH (4, 7, 10.4) ont été sélectionnés. Les structures formées après l'auto-assemblage de C₁₆-V₃A₃K₃ aux différents pH étudiés ont été évaluées par la spectroscopie de dichroïsme circulaire (**Fig. 3.2**). Lorsque la molécule est chirale ou soumise à un environnement chiral, le CD permet de mesurer des différences dans l'absorbance de la lumière polarisée à droite par rapport à la lumière polarisée à gauche. Les spectres obtenus pour les trois pH présentent des caractéristiques de feuillets- β mises en évidence par le minimum à 220 nm et un maximum autour de 200 nm (**Fig. 3.2**). De plus, aucune variation n'est observée suite à l'auto-assemblage de 5 jours, bien qu'il y ait quelques variations dans l'intensité du signal (**Fig. 3.2B**). Cette variation d'intensité sans décalage du pic peut être attribuée à une différence d'agrégation des nanofibres. Les résultats de CD suggèrent que l'assemblage du peptide C₁₆-V₃A₃K₃ est spontané et ne dépend pas du pH étudié.

L'auto-assemblage du peptide amphiphile a également été étudié par la technique d'imagerie AFM. Cette technique a permis de relever une différence importante au niveau morphologique. Malgré la présence majoritaire de feuillets- β en CD, peu de fibres à pH 4 et 10.4 ont été observées au temps initial. Suite à l'assemblage après 5 jours, un allongement des micelles cylindriques a été observé pour chaque pH, mais la différence de longueur entre les structures à différents pH demeure importante (**Fig. 3.3**). Ceci est en accord avec la différence de l'intensité au niveau de spectres CD. Le fait d'avoir des feuillets- β plus courts et/ou désordonnés à l'intérieur d'une nano-fibre peut avoir une influence sur le signal CD (Pashuck *et al.*, 2010). Selon les images AFM, il est clair que différentes structures morphologiques de C₁₆-V₃A₃K₃ sont formées à différents pH. Malgré le fait que la longueur et le diamètre des nanofibres soient influencés par le pH, la forme cylindrique des nanofibres reste identique. Les changements du pH peuvent avoir un impact sur les forces de la répulsion

électrostatique des lysines. L'augmentation progressive du pH de la solution peut neutraliser partiellement les charges de lysines dont le pK_a du groupement amine est autour de 10 et permettre les interactions entre les résidus de lysine, favorisant ainsi la formation de feuillets- β . Un des principaux facteurs influençant l'activité des ions en solution aqueuse est la force ionique critique. Suite aux études énergétiques et fonction des systèmes supramoléculaires par Stupp et collègues, ils ont associé un minimum de longueur de fibres en structure des feuillets- β à une faible force ionique (Tantakitti *et al.*, 2016). En raison de la compétition entre les forces d'attraction hydrophobe et de répulsion électrostatique, la longueur de fibre est presque indépendante de la concentration de sel. Par contre, à une concentration de sel critique, les fibres passent spontanément à une longueur infinie en raison de la formation de feuillets β qui devient l'interaction dominante (Tantakitti *et al.*, 2016). Xu et ses collègues à leur tour ont proposé un modèle selon lequel la morphologie du peptide amphiphile auto-assemblé passe par des micelles sphériques vers des nanofibres avec une concentration accrue du peptide amphiphile (Xu *et al.*, 2012).

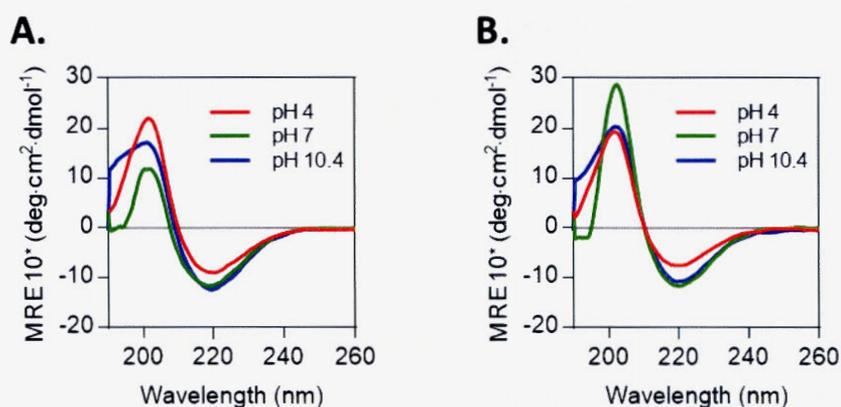


Figure 3.2 Spectres de dichroïsme circulaire du peptide amphiphile à différents pH en fonction du temps : (A) au début de l'auto-assemblage et (B) suite à l'auto-assemblage de 5 jours.

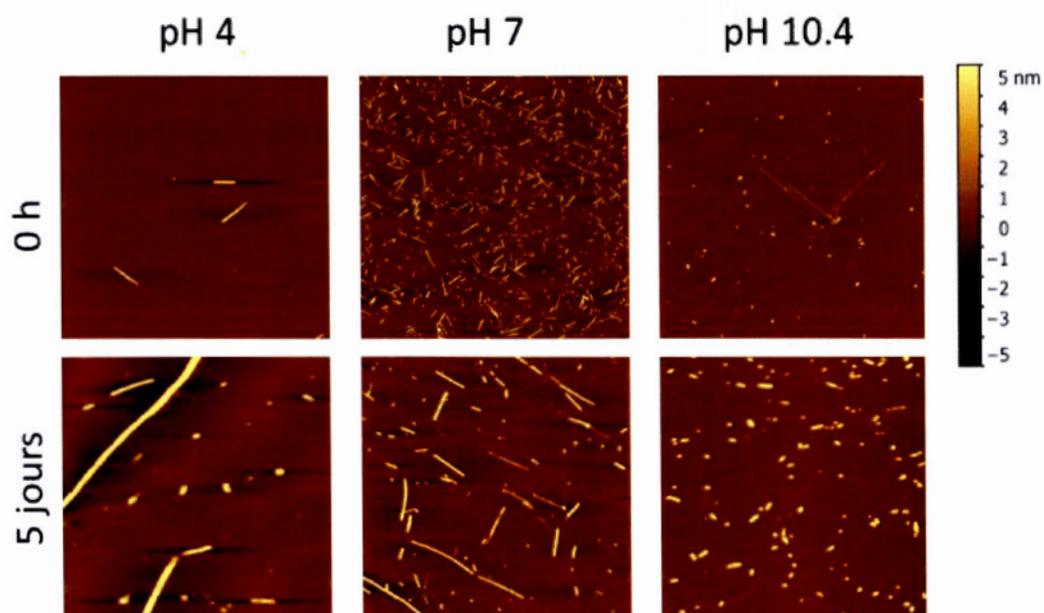


Figure 3.3 Analyse supramoléculaire par microscopie à force atomique (AFM) des peptides amphiphiles en fonction du pH.

3.3.2 Auto-assemblage du peptide amphiphile chimérique

Afin d'étudier le potentiel du peptide amphiphile $C_{16}-V_3A_3K_3$ en tant que plateforme de vaccination, un épitope peptidique linéaire E2EP3 dérivé du domaine N-terminal de la glycoprotéine E2 a été sélectionné comme un modèle d'antigène peptidique. Cette séquence est exposée sur l'enveloppe virale du virus Chikungunya (Kam, Y. W. *et al.*, 2012). Le peptide E2EP3 a été fusionné de façon covalente à l'extrémité C-terminale du peptide amphiphile via un bras flexible de tétra-glycine pour faciliter l'assemblage de la séquence peptidique chimérique (**Fig. 3.1**).

Suite à la solubilisation dans un tampon 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, une différence au niveau conformationnel a été observée par la technique du CD entre les peptides amphiphiles fonctionnalisés et non-fonctionnalisés. Le changement de tampon n'a pas affecté les propriétés d'auto-assemblage du peptide C₁₆-V₃A₃K₃ en structure riche en feuillets- β (**Fig. 3.4 vs Fig 3.2**). Les structures obtenues sont beaucoup plus courtes par rapport à celles obtenues par l'équipe du Professeur Stupp (Sur *et al.*, 2015). Ceci peut être dû à la différence de concentration du peptide et la force ionique du tampon. L'ajout de sels de CaCl₂ favorise le criblage des charges avec des cations divalents et conduit à la formation de nanofibres longues (Cui *et al.*, 2010; Greenfield *et al.*, 2010; Tantanakitti *et al.*, 2016). Également, l'augmentation de la concentration peptidique joue un rôle clé dans l'auto-assemblage des systèmes chargés. Il a été démontré que des fibres longues thermodynamiquement favorisées peuvent être obtenues à des concentrations entre 100 μ M et 10 mM, à condition que la force ionique totale soit supérieure à la force ionique critique (Tantanakitti *et al.*, 2016).

Dans nos études de CD à temps initial, il fut observé que le peptide chimérique possède principalement une structure secondaire aléatoire, tel que révélé par la présence d'un minimum unique entre 200 et 206 nm (**Fig. 3.4B**). Ceci démontre que l'ajout de l'épitope peptidique ralentit la formation d'une structure secondaire stable et que le peptide chimérique reste, probablement, sous un état monomérique. Ceci peut être dû au déplacement de l'équilibre entre les forces d'attraction des régions formant les feuillets- β , les interactions hydrophobes et les forces répulsives des résidus chargés suite à l'ajout de l'épitope E2EP3 chargé positivement. Suite à une incubation de 7 jours sous agitation constante, une transition conformationnelle vers une structure riche en feuillets- β a été observée. Cependant, les spectres CD obtenus étaient décalés vers le rouge par rapport à ceux de feuillets- β typiques avec un minimum négatif déplacé à 222nm. Ce déplacement fut attribué à l'augmentation du degré de torsion comparé au feuillet- β planaire standard qui mène à une augmentation

d'entropie dans le feuillet- β et à des liaisons hydrogène affaiblies (Manning *et al.*, 1988). Cette observation suggère que l'augmentation de la torsion et du désordre diminue les propriétés physico-chimiques de la plateforme $C_{16}-V_3A_3K_3$. Cela est en accord avec le modèle proposé par le Professeur Stupp stipulant que les feuillets- β plus tordus et désordonnés conduisent à la formation d'une micelle cylindrique moins stable en réduisant la rigidité des gels. (Pashuck *et al.*, 2010). La formation d'assemblages supramoléculaires des deux peptides à pH physiologique a été suivie par AFM. Les images obtenues (Fig. 3.5) étaient en adéquation avec les résultats obtenus par CD et ont démontré la présence de fibres linéaires et non-branchées caractérisées par une morphologie similaire et une polydispersité élevée.

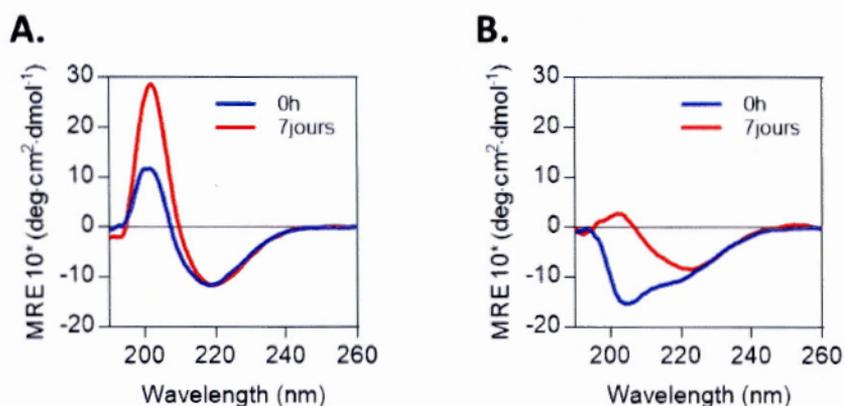


Figure 3.4 Spectres de dichroïsme circulaire du peptide amphiphile $C_{16}-V_3A_3K_3$ (A) et du peptide amphiphile fonctionnalisé avec l'épitope E2EP3 (B) au temps 0 et suite à 7 jours d'auto-assemblage dans un tampon 20 mM Tris-HCL à pH 7.4.

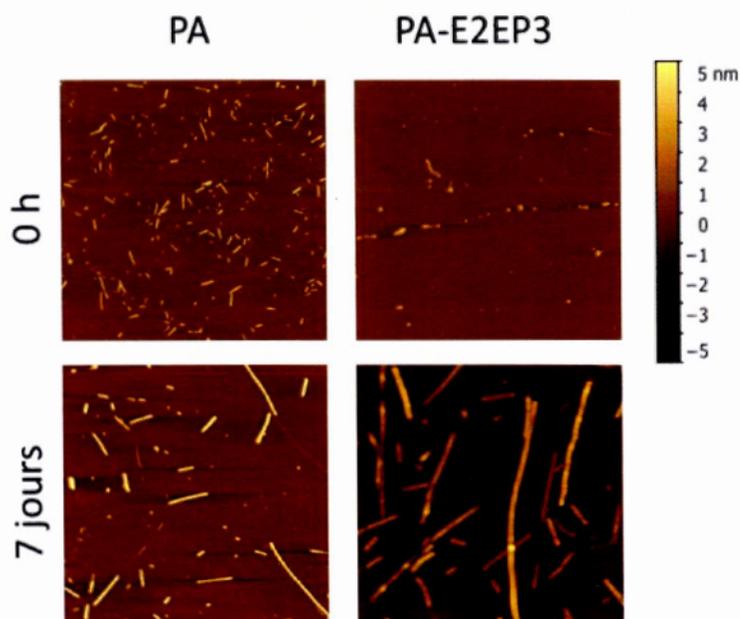


Figure 3.5 Analyse supramoléculaire par la microscopie à force atomique (AFM) du peptide amphiphile $C_{16}-V_3A_3K_3$ et du peptide amphiphile fonctionnalisé avec l'épitope E2EP3 au temps 0 et suite à 7 jours d'auto-assemblage dans un tampon 20mM Tris-HCL à pH 7.4.

3.3 Conclusion

Les peptides amphiphiles représentent un système supramoléculaire avec un fort potentiel en biomédecine. Le contrôle des nanostructures à base de peptide amphiphile peut être réalisé par la conception moléculaire, la variation des conditions d'assemblage (pH, force ionique, température, agitation) et l'introduction de molécules de co-assemblage. Dans le cadre de ce projet, l'auto-assemblage et la structure (supra)moléculaire ont été étudiées en fonction du pH de la solution. Nos résultats ont montré que l'auto-assemblage du peptide $C_{16}-V_3A_3K_3$ peut être modulé en fonction du pH de la solution. La fonctionnalisation de ce peptide avec un épitope

dérivé du virus Chikungunya, E2EP3, a un effet important sur l'initiation de l'auto-assemblage. Néanmoins, le peptide chimérique PA-E2EP3 a subi une transition conformationnelle secondaire d'une structure aléatoire vers une structure enrichie en feuillets- β suite à son incubation pendant de 7 jours. Conséquemment, ces résultats suggèrent que le peptide amphiphile C₁₆-V₃A₃K₃ constitue une séquence de choix pour la conception d'une nano-plateforme auto-assemblée pouvant présenter des épitopes immunogènes dans un mode multivalent.

CHAPITRE IV

DISCUSSION GÉNÉRALE

4.1 Discussion générale

Les progrès récents dans la manipulation et la compréhension de l'auto-assemblage moléculaire ont mis en évidence des applications potentielles pour la conception de nanovaccins. Les particules de type viral, ou VLPs, qui résultent de l'auto-assemblage de protéines de capsides virales, sont un bon exemple de l'utilisation de cette propriété pour le développement de nanovaccins. Afin de reconstruire une structure de type pathogène, comme celle du virus de la mosaïque du tabac, il est envisageable d'utiliser des peptides d'auto-assemblage comme unité de construction pour créer des nanostructures fibrillaires pour la vaccination. Ce concept résulte à la formation de nano-assemblages arborant une haute densité d'antigènes à leur surface. Ceci permet de surmonter les problèmes reliés à la très faible immunogénicité des vaccins à base de peptides. L'utilisation de peptides auto-assemblants présente plusieurs avantages tels que la facilité de production par voie chimique, la biodégradabilité, la faible cytotoxicité, le contrôle de la taille et la possibilité de fonctionnalisation de surface. L'auto-assemblage offre la flexibilité de développer de nouvelles particules avec des morphologies adaptées et des fonctions souhaitées par la modulation des séquences primaires.

Dans ce contexte, l'élaboration de nouvelles plateformes de vaccination à base de peptides auto-assemblants fut privilégiée dans cette étude. Afin d'y parvenir, deux différentes plateformes de vaccination fibrillaires riche en feuillets- β ont été développées. La première plateforme I₁₀ a été réalisée au moyen d'une courte séquence naturelle dérivée de l'hormone peptidique IAPP. De nombreuses études

suggèrent qu'une séquence penta- ou hexa-peptidique d'une composition d'acides aminés appropriés peut être suffisante pour former des feuillets- β similaires à ceux formés par des polypeptides complets (Balbach *et al.*, 2000; Tenidis *et al.*, 2000). Cependant, les études des différents peptides *de novo* suggèrent que la formation de fibres est favorisée lorsque la charge nette du peptide n'est pas trop grande (entre - 1 et +1) (Lopez De La Paz *et al.*, 2002). Notre modèle était composé du décapeptide I₁₀ (SNNFGAILSS), où le segment de 6 résidus NFGAIL est considéré comme le noyau amyloïdogénique de ce peptide et peut former des amyloïdes indépendamment du reste de la séquence (Tenidis *et al.*, 2000). Les résidus de sérine ont été ajoutés afin d'aider la solubilisation. Il a été rapporté que les fibres de l'hexa- et du décapeptide du noyau amyloïdogénique de l'IAPP présentaient une similarité au niveau structural (Andreasen *et al.*, 2012). Par contre, l'étude des relations entre la structure et la formation de fibres de IAPP₂₀₋₂₉ a montré un retard de la formation des fibres par rapport à l'IAPP natif. De ce fait, l'agitation a été employée pour déclencher la phase de nucléation des peptides solubles pour former les fibres amyloïdes en favorisant la formation des noyaux stables. Les études biophysiques par dichroïsme circulaire, par fluorescence de la ThT et par la microscopie électronique ont montré que I₁₀ s'auto-assemble en nanofibres riches en feuillets- β . La seconde plateforme est d'origine synthétique, soit le peptide amphiphile C₁₆-V₃A₃K₃. L'auto-assemblage de ce peptide résulte en un équilibre délicat entre les forces d'attraction hydrophobe et de répulsion électrostatique. La formation des structures quaternaires à base des peptides amphiphiles est spontanée, mais sensible au pH. Néanmoins, les structures formées résultent toujours en une forme cylindrique riche en feuillets- β , impliquant probablement le domaine V₃A₃. Au niveau morphologique, les structures formées par les deux peptides (amyloïdogénique et amphiphile) suite à leur auto-assemblage en solution aqueuse à pH physiologique affichent des diamètres entre 6 et 10 nm et des longueurs polydisperses pouvant atteindre près de 2 μ m.

Le potentiel de ces deux plateformes en tant que nanovaccin a été évalué à l'aide de deux épitopes antigéniques provenant respectivement du virus Chikungunya (E2EP3) et du virus de l'influenza aviaire (M2e). Les deux plateformes décrites ont été fonctionnalisées de manière covalente par les épitopes E2EP3 et, pour la plateforme des fibres amyloïdes, par l'épitope M2e. Les peptides chimériques ont initialement été préparés par la synthèse peptidique sur support solide. Des études précédentes de l'auto-assemblage de peptides amyloïdes ou amphiphiles ont démontré que l'ajout de biomolécules peut modifier considérablement la capacité d'auto-assemblage et les structures finales (Azmi *et al.*, 2014; Lopez *et al.*, 2014). Pour diminuer l'effet des biomolécules sur l'auto-assemblage moléculaire et pour réguler la distance entre l'épitope et le squelette peptidique, une courte séquence peptidique constituée de résidus de glycine a été utilisée comme bras flexible. Le choix de bras flexible demeure un aspect important à considérer, puisqu'une introduction d'un résidu chargé à l'extrémité N-terminale a une forte influence sur les charges de surface des nanofibres et peuvent significativement moduler les réponses immunitaires (Wen *et al.*, 2016). L'absence de chaîne latérale de la glycine permet d'éliminer les effets stériques ou de charge et de séparer l'épitope du squelette peptidique par une distance approximative d'environ 15 Å (Sur *et al.*, 2015).

En comparant les deux plateformes, il fut observé que la fonctionnalisation du peptide amphiphile C₁₆-V₃A₃K₃ ralentit de façon importante la cinétique de l'auto-assemblage, ce qui n'est le cas pour la plateforme amyloïdogénique I₁₀. L'utilisation de la plateforme amyloïde amène un autre avantage par rapport à la plateforme amphiphilique au niveau du design. L'amyloïde offre la possibilité d'utiliser l'extrémité N- ou C-terminale comme site d'ancrage des épitopes. De plus, les résultats du chapitre III démontrent que ni la charge nette (+2 pour E2EP3, -2 pour M2e), ni la longueur de l'épitope greffé, ni son orientation (N- ou C-terminale), n'affecte significativement la capacité du corps amyloïdogénique à s'assembler en

fibres morphologiquement similaires. Également, les essais d'ELISA et d'immunomarquage aux particules d'or ont confirmé la haute densité et l'accessibilité des épitopes sur la surface des fibres. Pompano et ses collègues ont aussi démontré la formation d'assemblages robustes suite au co-assemblage d'amyloïdes fonctionnalisés avec différents antigènes (Pompano *et al.*, 2014). Par souci de temps et de coût, les études *in vitro* et *in vivo* ont été effectuées seulement avec la plateforme amyloïdogénique I₁₀ fonctionnalisée avec l'épitope E2EP3.

La stimulation de la réponse immunitaire est initiée par l'internalisation des antigènes par les CPA. Le potentiel des I₁₀ en tant que système de délivrance d'antigène a été évalué par les tests d'internalisation en utilisant des macrophages J774A.1. Les analyses par microscopie confocale à fluorescence et par cytométrie en flux ont démontré une différence significative entre l'internalisation de l'épitope seul et de l'épitope fonctionnalisé sur la fibre amyloïde. Les nanoparticules fibrillaires étaient internalisées plus efficacement par les macrophages en comparaison avec le peptide E2EP3 monomérique. Les résultats similaires ont été obtenus par Waku et ses collègues à l'aide d'une séquence auto-assemblante dérivée de cristalline- α A en tant qu'une plateforme de délivrance d'antigène (Waku *et al.*, 2013). Ceci suggère que les assemblages de peptides antigéniques en nanofibres améliorent la délivrance d'antigène et pourraient permettre la présentation efficace de l'antigène par les CPA. Azmi et ses collègues ont démontré que la taille de la particule du vaccin a une influence significative sur le mécanisme de l'internalisation par les CPA. Les petites particules (20-100 nm de diamètre) sont généralement internalisées plus rapidement par les DC comparativement aux particules de grande taille (> 0,5 μ m) qui sont plutôt internalisées par les macrophages (Azmi *et al.*, 2014). Des expériences avec des DCs de culture primaire sont prévues pour confirmer les résultats obtenus avec les macrophages de la lignée continue J744A.1.

L'immunisation des souris avec les différentes constructions de E2EP3 a conduit à une forte production d'IgG contre l'épitope fonctionnalisé sur les structures amyloïdes. Particulièrement, cette réponse n'a pas nécessité l'utilisation d'un adjuvant supplémentaire, tel que les sels d'aluminium. En ce qui concerne l'épitope seul, une faible production d'IgG anti-E2EP3 a été détectée seulement en présence de l'adjuvant Alum. En effet, ceci souligne que la forte réponse immunitaire observée contre l'épitope dérivé du CHIKV dépendait de l'auto-assemblage. Ceci pourrait être relié à la différence de l'internalisation par des macrophages observée *in vitro*. Les résultats obtenus sont similaires à ceux du groupe de Collier, qui est le pionnier dans la conception d'amyloïdes en tant que nanovaccins potentiels. Leur travail était basé sur une séquence peptidique *de novo* composée de 11 acides aminés (Q11). La liaison de plusieurs épitopes immunogènes à la surface de la plate-forme auto-assemblée est effectuée dans le but d'augmenter la réponse immunitaire spécifique de l'antigène. Leurs travaux ont démontré que la réponse immunitaire chez les animaux vaccinés avec des nanofibres fonctionnalisées par l'épitope était supérieure à celle des animaux vaccinés avec l'antigène sous forme libre et était similaire à la réponse observée pour l'épitope peptidique livré avec les adjuvants de Freund (Rudra *et al.*, 2012; Rudra, J. S. *et al.*, 2010). Toutefois, la plateforme elle-même s'est révélée non immunogène, ce qui fut le cas de I₁₀.

En ce qui concerne l'orientation de l'épitope E2EP3 par rapport au cœur amyloïde, une différence importante au niveau de la réponse immunitaire entre les fibres I₁₀-E2EP3 et E2EP3-I₁₀ a été observée. Les fibres I₁₀-E2EP3 induisent un niveau significativement plus faible d'IgG dirigés contre l'épitope par rapport à la construction E2EP3-I₁₀. Étant donné que l'épitope E2EP3 est orienté de différentes façons dans les séquences primaires des deux peptides chimériques, il est possible que les épitopes ne soient pas exposés de la même façon sur les fibres. Ceci peut avoir un impact important sur la fragmentation des nanostructures fibrillaires I₁₀-

E2EP3 et E2EP3-I₁₀ par les CPA en peptides courts de taille variable (entre 12 et 25 acides aminés) pour les présenter, en association avec les molécules MHC II, aux récepteurs des cellules T auxiliaires. Il a été rapporté par Kam et collègues que la région de liaison au noyau de E2EP3 comprend le segment N-terminal 3-10 (STKDNFNVYK) qui est reconnu par des anticorps anti-E2EP3 isolés de patients infectés par CHIKV (Kam *et al.*, 2012). Donc, la fragmentation de cette séquence pourrait être responsable de la diminution de la réponse immunitaire.

Le potentiel de l'épitope E2EP3 en tant que cible vaccinale a aussi été évalué dans un modèle de souris par Kam et ses collègues. Dans leur étude la formulation immunogène utilisée contenait le peptide E2EP3 couplé à la KLH et administré avec l'adjuvant complet de Freund. Un titre significatif anti-E2EP3 a été détecté 19 jours après la vaccination suite au premier rappel avec l'adjuvant incomplet de Freund (**Fig. 4A**) et a été encore augmenté après le deuxième rappel à 27 jours après la vaccination (**Fig. 4B**) (Kam *et al.*, 2012). Les résultats obtenus pour la construction KLH-E2EP3 dans le cadre de nos études sont similaires à ceux de Kam et al. (2012). Par contre, une augmentation de titre plus importante fut observée après 42 jours de vaccination (**Fig. 4C**). Les études de Kam et collaborateurs ont été poursuivies avec les tests de détermination de l'activité neutralisante des anticorps produits. Les sérums obtenus 27 jours après la vaccination ont pu réduire l'infection de CHIKV *in vitro* d'environ 40% comparativement au groupe témoin inoculé avec le PBS. Ainsi, les activités *in vitro* des anticorps induits par E2EP3 n'ont entraîné qu'une réduction modeste de l'infection du CHIKV. Les auteurs suggèrent d'améliorer la conception du vaccin préclinique en utilisant de multiples peptides antigéniques, par exemple l'incorporation d'épitopes T auxiliaires de CHIKV pourrait également fournir une aide à la production efficace d'anticorps (Kam *et al.*, 2012). Leurs études ont été poursuivies avec le test de protection. Les souris immunisées avec E2EP3 ou inoculées avec du PBS (groupe témoin) ont été infectées avec la souche de Singapour (SGP11). Les résultats ont révélé une protection partielle par E2EP3 lorsque la

virémie était réduite de 4500 à 2000 pfu/ml 2 jours après l'infection. Cette réduction du titre viral a corrélé avec une réduction de l'inflammation par un facteur de deux dans le groupe vacciné avec E2EP3 par rapport au groupe témoin qui avait été inoculé avec le PBS.

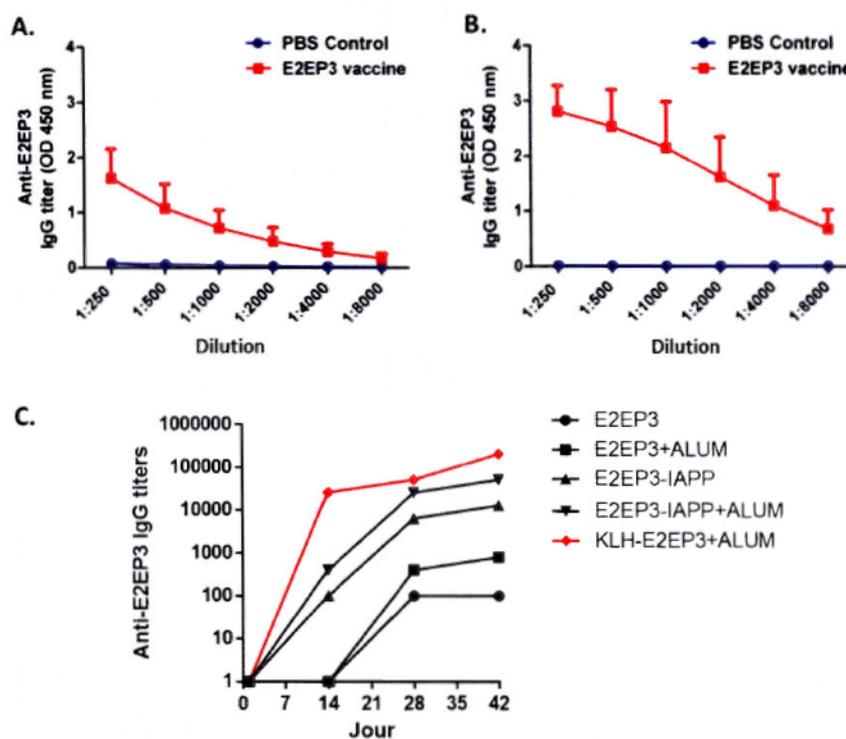


Figure 4.1 Comparaison de la réponse en anticorps induite par E2EP3 chez les souris vaccinées. (A,B) Un ELISA à base du peptide spécifique E2EP3 comme substrat antigénique a été utilisé pour mesurer le titre après (A) 19 jours ou (B) 27 jours de la vaccination par le peptide E2EP3 couplé à la KLH dans le laboratoire de Kam et ses collègues (2012). (C) Test ELISA à base de peptide spécifique E2EP3 effectué dans notre laboratoire pour mesurer les titres de la vaccination par différentes constructions à base de peptide E2EP3 en fonction de temps.

Les doses de préparations vaccinales fibrillaires employées lors de notre étude sont de l'ordre de centaines de nanomole/souris et sont comparables aux autres plateformes auto-assemblées étudiées pour le développement de nanovaccins, telles que Q11 et KFE8 (Friedrich *et al.*, 2016; Rudra, J. S. *et al.*, 2010). Par contre, les résultats ont montré qu'une injection de 100 nmol de E2EP3-I₁₀ provoquait une réponse IgG similaire à la dose plus importante de 400 nmol. Étant donné que les niveaux d'anticorps anti-E2EP3 obtenus après une immunisation avec les deux doses étaient comparables, il serait intéressant d'étudier la réponse immunitaire en fonction de doses plus faibles, afin de diminuer la quantité de la préparation vaccinale et les coûts de production. Toutefois, il est possiblement nécessaire d'avoir une dose plus élevée que la concentration minimale de fibrillation. Azmi et ses collègues ont démontré que l'absence de la formation de fibres peut entraîner une perte d'activité adjuvante du peptide (Azmi *et al.*, 2014). Également, Rudra et collègues ont observé l'importance du couplage covalent entre le domaine de fibrillation et l'épitope, car les propriétés adjuvantes du peptide auto-assemblant Q11 dépendaient aussi de sa fixation covalente au peptide épitope (Rudra *et al.*, 2010)

Dans l'ensemble, ces résultats préliminaires indiquent que la structure amyloïde à feuillets- β croisés constitue une plateforme de nanovaccin permettant d'améliorer la réponse immunitaire envers l'antigène peptidique ciblé.

4.2 Conclusion et perspectives

Dans le cadre de ce projet de recherche, deux stratégies visant à augmenter l'immunogénicité de vaccins à base de peptides synthétiques ont été développées. Tout d'abord, nous avons étudié l'auto-assemblage de peptides auto-assemblants qui, suite à leur association non-covalente, forment deux plateformes vaccinales affichant

l'épitope antigénique fonctionnel à leur surface. La fonctionnalisation pré-assemblage des peptides amyloïdogéniques et amphiphiles a eu des impacts différents sur leur capacité de s'associer en structure quaternaire organisée. La fusion de l'épitope dérivant de la glycoprotéine E2 du virus Chikungunya avait une influence plus importante sur les propriétés d'auto-assemblage de particules amphiphiles, car la formation des micelles cylindriques nécessitait une incubation de 7 jours. Le peptide amyloïde I₁₀ a mieux toléré la fonctionnalisation et le potentiel des assemblages amyloïdes en tant que nanovaccin a été évalué dans des études *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus montrent que la plate-forme de vaccination nanofibrillaire I₁₀ riche en feuillet- β -croisés est non-toxique et permet la présentation de l'antigène fonctionnel dans un mode multivalent, augmentant ainsi l'immunogénicité de l'antigène peptidique. Ces résultats suggèrent que cette approche constitue un moyen efficace et hautement prometteur afin de répondre aux limitations des vaccins à base de peptide, incluant les problèmes de très faible immunogénicité. Toutefois, il serait très important de confirmer que les anticorps produits sont neutralisants et/ou induisent une immunité protectrice.

Néanmoins, cette stratégie de préparation de nanovaccin affiche certaines limitations. Un des inconvénients de ces structures est attribuable à la taille et à la grande polydispersité des préparations fibrillaires. Les analyses supramoléculaires par AFM ont démontré un indice de polydispersité élevé, ce qui empêche de faire des conclusions concernant le mécanisme d'action précis de I₁₀. En effet, plusieurs travaux ont démontré que la taille est un paramètre clé pour contrôler le mécanisme de biodistribution, la voie de délivrance et les mécanismes d'action d'un (nano)vaccin. Les petites particules (20-200nm) sont capables de se déplacer librement et rapidement pour être internalisées par les DC résidant dans les ganglions lymphatiques (Bachmann et Jennings, 2010; Manolova *et al.*, 2008). En revanche, les particules plus grosses (500-1000 nm) demeurent associées aux DC et aux

macrophages au site d'injection pouvant alors être ensuite transportées par la suite vers les tissus lymphatiques (Manolova *et al.*, 2008). Il serait important de diminuer la polydispersité des nanofibres par l'optimisation du domaine d'auto-assemblage. Par exemple, une unité de répulsion de charge pourrait être ajoutée dans la séquence primaire. Les études biophysiques dans notre laboratoire ont démontré que l'ajout de résidus de lysine à l'extrémité N-terminale du peptide I₁₀ permet de former des nanofilaments hautement homogènes, courts et très bien définis.

La fonctionnalisation de peptides auto-assemblants peut aussi être limitée aux séquences peptidiques relativement courtes (moins de 30 acides aminés), car l'insertion de longues séquences peptidiques ou protéines entières structurées pourrait modifier la morphologie des nanoparticules et/ou empêcher dramatiquement l'auto-assemblage. De plus, ces longues séquences sont inaccessibles à la synthèse par voie chimique. Par contre, certains vaccins nécessitent l'utilisation de longs épitopes antigéniques. Dans ce contexte limitant, il serait souhaitable de fusionner les épitopes antigéniques de grande taille sur les nanoparticules déjà assemblées. Cette approche, dite de post-fonctionnalisation, permettrait de lier par liaison covalente de plus longs peptides ou des protéines entières sans compromettre l'état des particules en utilisant différentes méthodes chimiques ou enzymatiques (Guttenplan *et al.*, 2017; Hudalla *et al.*, 2013; Thérien *et al.*, 2017). De plus il serait possible de générer des particules multivalentes avec plusieurs biomolécules, incluant des agonistes des TLRs, afin d'augmenter et/ou de cibler la réponse immune, et également de protéger contre plus d'une infection à la fois.

BIBLIOGRAPHIE

Abedini, A., Plesner, A., Cao, P., Ridgway, Z., Zhang, J., Tu, L. H., Middleton, C. T., Chao, B., Sartori, D. J., Meng, F., Wang, H., Wong, A. G., Zanni, M. T., Verchere, C. B., Raleigh, D. P. et Schmidt, A. M. (2016). Time-resolved studies define the nature of toxic IAPP intermediates, providing insight for anti-amyloidosis therapeutics. *Elife*, 5:e12977.

Abedini, A. et Raleigh, D. P. (2005). Incorporation of pseudoproline derivatives allows the facile synthesis of human IAPP, a highly amyloidogenic and aggregation-prone polypeptide. *Organic Letters*, 7(4), 693-696.

Akira, S. (2011). Innate immunity and adjuvants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1579), 2748-2755.

Andreasen, M., Nielsen, S. B., Mittag, T., Bjerring, M., Nielsen, J. T., Zhang, S., Nielsen, E. H., Jeppesen, M., Christiansen, G., Besenbacher, F., Dong, M., Nielsen, N. C., Skrydstrup, T. et Otzen, D. E. (2012). Modulation of fibrillation of hIAPP core fragments by chemical modification of the peptide backbone. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824(2), 274-285.

Arosio, P., Knowles, T. P. J. et Linse, S. (2015). On the lag phase in amyloid fibril formation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(12), 7606-7618.

Audas, T. E., Audas, D. E., Jacob, M. D., Ho, J. J., Khacho, M., Wang, M., Perera, J. K., Gardiner, C., Bennett, C. A., Head, T., Kryvenko, O. N., Jorda, M., Daunert, S., Malhotra, A., Trinkle-Mulcahy, L., Gonzalgo, M. L. et Lee, S. (2016). Adaptation to Stressors by Systemic Protein Amyloidogenesis. *Developmental Cell*, 39(2), 155-168.

Azmi, F., Ahmad Fuaad, A. A., Giddam, A. K., Batzloff, M. R., Good, M. F., Skwarczynski, M. et Toth, I. (2014). Self-adjuvanting vaccine against group A streptococcus: application of fibrillized peptide and immunostimulatory lipid as adjuvant. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(22), 6401-6408.

Bachmann, M. F. et Jennings, G. T. (2010). Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology*, 10(11), 787-796.

Balbach, J. J., Ishii, Y., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Rizzo, N. W., Dyda, F., Reed, J. et Tycko, R. (2000). Amyloid fibril formation by A beta 16-22, a seven-

residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR. *Biochemistry*, 39(45), 13748-13759.

Ban, T., Hamada, D., Hasegawa, K., Naiki, H. et Goto, Y. (2003). Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 16462-16465.

Biancalana, M. et Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(7), 1405-1412.

Black, M., Trent, A., Tirrell, M. et Olive, C. (2010). Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on toll-like receptor agonists. *Expert Review of Vaccines*, 9(2), 157-173.

Blasius, A. L. et Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32(3), 305-315.

Boraschi, D. et Italiani, P. (2015). From Antigen Delivery System to Adjuvanticy: The Board Application of Nanoparticles in Vaccinology. *Vaccines (Basel)*, 3(4), 930-939.

Bouchard, M., Zurdo, J., Nettleton, E. J., Dobson, C. M. et Robinson, C. V. (2000). Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Science*, 9(10), 1960-1967.

Bouvier, N. M. et Palese, P. (2008). The biology of Influenza viruses. *Vaccine*, 26(Suppl 4), D49-D53.

Brito, L. A., Malyala, P. et O'Hagan, D. T. (2013). Vaccine adjuvant formulations: a pharmaceutical perspective. *Seminars in Immunology*, 25(2), 130-145.

Calder, L. J., Wasilewski, S., Berriman, J. A. et Rosenthal, P. B. (2010). Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(23), 10685.

Chiti, F. et Dobson, C. M. (2017). Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 27-68.

Cho, K. J., Schepens, B., Seok, J. H., Kim, S., Roose, K., Lee, J. H., Gallardo, R., Van Hamme, E., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Fiers, W., Saelens, X. et Kim, K. H. (2015). Structure of the extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus

in complex with a protective monoclonal antibody. *Journal of Virology*, 89(7), 3700-3711.

Coffman, R. L., Sher, A. et Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, 33(4), 492-503.

Cui, H., Webber, M. J. et Stupp, S. I. (2010). Self-assembly of peptide amphiphiles: from molecules to nanostructures to biomaterials. *Biopolymers*, 94(1), 1-18.

De Carufel, C. A., Quittot, N., Nguyen, P. T. et Bourgault, S. (2015). Delineating the Role of Helical Intermediates in Natively Unfolded Polypeptide Amyloid Assembly and Cytotoxicity. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(48), 14383-14387.

De Filette, M., Min Jou, W., Birkett, A., Lyons, K., Schultz, B., Tonkyro, A., Resch, S. et Fiers, W. (2005). Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology*, 337(1), 149-161.

Dehsorkhi, A., Castelletto, V. et Hamley, I. W. (2014). Self-assembling amphiphilic peptides. *Journal of Peptide Science*, 20(7), 453-467.

Deng, L., Cho, K. J., Fiers, W. et Saelens, X. (2015). M2e-Based Universal Influenza A Vaccines. *Vaccines*, 3(1), 105-136.

Ding, X., Liu, D., Booth, G., Gao, W. et Lu, Y. (2018). Virus-Like Particle Engineering: From Rational Design to Versatile Applications. *Biotechnology Journal*, 13(5):e1700324.

Donati, C. et Rappuoli, R. (2013). Reverse vaccinology in the 21st century: improvements over the original design. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1285, 115-132.

Foged, C., Hansen, J. et Agger, E. M. (2012). License to kill: Formulation requirements for optimal priming of CD8(+) CTL responses with particulate vaccine delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(4), 482-491.

Fowler, D. M., Koulov, A. V., Alory-Jost, C., Marks, M. S., Balch, W. E. et Kelly, J. W. (2006). Functional Amyloid Formation within Mammalian Tissue. *PLOS Biology*, 4(1), e6.

Fowler, D. M., Koulov, A. V., Balch, W. E. et Kelly, J. W. (2007). Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(5), 217-224.

- Friedrich, B. M., Beasley, D. W. C. et Rudra, J. S. (2016). Supramolecular peptide hydrogel adjuvanted subunit vaccine elicits protective antibody responses against West Nile virus. *Vaccine*, 34(46), 5479-5482.
- Garcia-Sastre, A. et Mena, I. (2013). Novel vaccine strategies against emerging viruses. *Current Opinion in Virology*, 3(2), 210-216.
- Gibbons, D. L., Erk, I., Reilly, B., Navaza, J., Kielian, M., Rey, F. A. et Lepault, J. (2003). Visualization of the Target-Membrane-Inserted Fusion Protein of Semliki Forest Virus by Combined Electron Microscopy and Crystallography. *Cell*, 114(5), 573-583.
- Gillam, J. E. et MacPhee, C. E. (2013). Modelling amyloid fibril formation kinetics: mechanisms of nucleation and growth. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 25(37), 373101.
- Goldsbury, C., Kistler, J., Aebi, U., Arvinte, T. et Cooper, G. J. (1999). Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 285(1), 33-39.
- Gomes, A. C., Mohsen, M. et Bachmann, M. F. (2017). Harnessing Nanoparticles for Immunomodulation and Vaccines. *Vaccines*, 5(1), 6.
- Gomes, A. C., Mohsen, M. et Bachmann, M. F. (2017). Harnessing Nanoparticles for Immunomodulation and Vaccines. *Vaccines (Basel)*, 5(1), 14;5(1).
- Greenfield, M. A., Hoffman, J. R., Olvera de la Cruz, M. et Stupp, S. I. (2010). Tunable Mechanics of Peptide Nanofiber Gels. *Langmuir*, 26(5), 3641-3647.
- Greenwald, J. et Riek, R. (2010). Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure*, 18(10), 1244-1260.
- Guttenplan, A. P. M., Young, L. J., Matak-Vinkovic, D., Kaminski, C. F., Knowles, T. P. J. et Itzhaki, L. S. (2017). Nanoscale click-reactive scaffolds from peptide self-assembly. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 70.
- Hartgerink, J. D., Beniash, E. et Stupp, S. I. (2001). Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science*, 294(5547), 1684-1688.
- Hartgerink, J. D., Beniash, E. et Stupp, S. I. (2002). Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5133-5138.

- He, Y., Barker, S. J., MacDonald, A. J., Yu, Y., Cao, L., Li, J., Parhar, R., Heck, S., Hartmann, S., Golenbock, D. T., Jiang, S., Libri, N. A., Semper, A. E., Rosenberg, W. M. et Lustigman, S. (2009). Recombinant Ov-ASP-1, a Th1-biased protein adjuvant derived from the helminth *Onchocerca volvulus*, can directly bind and activate antigen-presenting cells. *The Journal of Immunology*, *182*(7), 4005-4016.
- Herve, P. L., Raliou, M., Bourdieu, C., Dubuquoy, C., Petit-Camurdan, A., Bertho, N., Eléouët, J. F., Chevalier, C. et Riffault, S. (2014). A novel subnucleocapsid nanoplatform for mucosal vaccination against influenza virus that targets the ectodomain of matrix protein 2. *Journal of Virology*, *88*(1), 325-338.
- Houser, K. et Subbarao, K. (2015). Influenza vaccines: challenges and solutions. *Cell Host Microbe*, *17*(3), 295-300.
- Hu, Y., Lin, R., Zhang, P., Fern, J., Cheetham, A. G., Patel, K., Schulman, R., Kan, C. et Cui, H. (2016). Electrostatic-Driven Lamination and Untwisting of beta-Sheet Assemblies. *ACS Nano*, *10*(1), 880-888.
- Hudalla, G. A., Modica, J. A., Tian, Y. F., Rudra, J. S., Chong, A. S., Sun, T., Mrksich, M. et Collier, J. H. (2013). A self-adjuvanting supramolecular vaccine carrying a folded protein antigen. *Advanced Healthcare Materials*, *2*(8), 1114-1119.
- Jiménez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M. et Saibil, H. R. (2002). The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(14), 9196-9201.
- Jorquera, P. A. et Tripp, R. A. (2016). Synthetic Biodegradable Microparticle and Nanoparticle Vaccines against the Respiratory Syncytial Virus. *Vaccines (Basel)*, *4*(4).
- Kaiko, G. E., Horvat, J. C., Beagley, K. W. et Hansbro, P. M. (2008). Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*, *123*(3), 326-338.
- Kam, Y.-W., Lee, W. W. L., Simarmata, D., Le Grand, R., Tolou, H., Merits, A., Roques, P. et Ng, L. F. P. (2014). Unique Epitopes Recognized by Antibodies Induced in Chikungunya Virus-Infected Non-Human Primates: Implications for the Study of Immunopathology and Vaccine Development. *PLOS ONE*, *9*(4), e95647.
- Kam, Y. W., Lum, F. M., Teo, T. H., Lee, W. W., Simarmata, D., Harjanto, S., Chua CL, Chan YF, Wee JK, Chow A, Lin, R. T., Leo, Y. S., Le Grand, R., Sam, I.C., Tong, J. C., Roques, P., Wiesmüller, K. H., Rénia, L., Röttschke, O. et Ng, L. F. (2012). Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients

- targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Molecular Medicine*, 4(4), 330-343.
- Karch, C. P. et Burkhard, P. (2016). Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochemical Pharmacology*, 120, 1-14.
- Kawai, T. et Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373-384.
- Kawai, T. et Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), 637-650.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W. et Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300(5618), 486-489.
- Kielian, M. (2006). Class II virus membrane fusion proteins. *Virology*, 344(1), 38-47.
- Klunk, W. E., Jacob, R. F. et Mason, R. P. (1999). Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. *Methods in Enzymology*, 309, 285-305.
- Knowles, T. P. et Buehler, M. J. (2011). Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials. *Nature Nanotechnology*, 6(8), 469-479.
- Knowles, T. P., Waudby, C. A., Devlin, G. L., Cohen, S. I., Aguzzi, A., Vendruscolo, M., Terentjev, E. M., Welland, M. E. et Dobson, C. M. (2009). An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science*, 326(5959), 1533-1537.
- Kool, M., Fierens, K. et Lambrecht, B. N. (2012). Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt 7), 927-934.
- Kumar, H., Kawai, T. et Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30(1), 16-34.
- Liu, W. et Chen, Y. H. (2005). High epitope density in a single protein molecule significantly enhances antigenicity as well as immunogenicity: a novel strategy for modern vaccine development and a preliminary investigation about B cell discrimination of monomeric proteins. *European Journal of Immunology*, 35(2), 505-514.
- Lopez De La Paz, M., Goldie, K., Zurdo, J., Lacroix, E., Dobson, C. M., Hoenger, A. et Serrano, L. (2002). De novo designed peptide-based amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16052-16057.

- Lopez Deber, M. P., Hickman, D. T., Nand, D., Baldus, M., Pfeifer, A. et Muhs, A. (2014). Engineering amyloid-like assemblies from unstructured peptides via site-specific lipid conjugation. *PLoS One*, 9(9), e105641.
- Lumsden, W. H. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(1), 33-57.
- Luo, M., Samandi, L. Z., Wang, Z., Chen, Z. J. et Gao, J. (2017). Synthetic nanovaccines for immunotherapy. *Journal of Controlled Release*, 263, 200-210.
- Madine, J., Jack, E., Stockley, P. G., Radford, S. E., Serpell, L. C. et Middleton, D. A. (2008). Structural insights into the polymorphism of amyloid-like fibrils formed by region 20-29 of amylin revealed by solid-state NMR and X-ray fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 130(45), 14990-15001.
- Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A., Singru, P. S., Nilsson, K. P., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W. et Riek, R. (2009). Functional Amyloids as Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science*, 325(5938), 328-332.
- Makin, O. S. et Serpell, L. C. (2005). Structures for amyloid fibrils. *The FEBS Journal*, 272(23), 5950-5961.
- Mandal, D., Nasrolahi Shirazi, A. et Parang, K. (2014). Self-assembly of peptides to nanostructures. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12(22), 3544-3561.
- Manning, M. C., Illangasekare, M. et Woody, R. W. (1988). Circular dichroism studies of distorted alpha-helices, twisted beta-sheets, and beta turns. *Biophysical Chemistry*, 31(1-2), 77-86.
- Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P. et Bachmann, M. F. (2008). Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European Journal of Immunology*, 38(5), 1404-1413.
- Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A. et Mucke, L. (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*, 287(5456), 1265-1269.
- Mathis, C. A., Mason, N. S., Lopresti, B. J. et Klunk, W. E. (2012). Development of Positron Emission Tomography β -Amyloid Plaque Imaging Agents. *Seminars in nuclear medicine*, 42(6), 423-432.

- Matson, J. B. et Stupp, S. I. (2012). Self-assembling peptide scaffolds for regenerative medicine. *Chemical Communications*, 48(1), 26-33.
- Meng, Q., Kou, Y., Ma, X., Liang, Y., Guo, L., Ni, C. et Liu, K. (2012). Tunable self-assembled peptide amphiphile nanostructures. *Langmuir*, 28(11), 5017-5022.
- Mina-Osorio, P. et Ortega, E. (2005). Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγRs in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(6), 1008-1017.
- Mohsen, M. O., Zha, L., Cabral-Miranda, G. et Bachmann, M. F. (2017). Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminars in Immunology*, 34, 123-132.
- Moriarty, D. F. et Raleigh, D. P. (1999). Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin20-29. *Biochemistry*, 38(6), 1811-1818.
- Moser, M. et Leo, O. (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine*, 28, C2-C13.
- Mosmann, T. R. et Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7, 145-173.
- Moyle, P. M. (2015). Progress in vaccine development. *Current Protocols in Microbiology*, 36, 18 11 11-26.
- Moyle, P. M. (2017). Biotechnology approaches to produce potent, self-adjuvanting antigen-adjuvant fusion protein subunit vaccines. *Biotechnology Advances*, 35(3), 375-389.
- Moyle, P. M. et Toth, I. (2013). Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities. *ChemMedChem*, 8(3), 360-376.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M. et Takeda, T. (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Analytical Biochemistry*, 177(2), 244-249.
- Negahdaripour, M., Golkar, N., Hajighahramani, N., Kianpour, S., Nezafat, N. et Ghasemi, Y. (2017). Harnessing self-assembled peptide nanoparticles in epitope vaccine design. *Biotechnology Advances*, 35(5), 575-596.

- Nguyen, P. T., Andraka, N., De Carufel, C. A. et Bourgault, S. (2015). Mechanistic Contributions of Biological Cofactors in Islet Amyloid Polypeptide Amyloidogenesis. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 13.
- Nguyen, P. T., Zottig, X., Sebastiao, M. et Bourgault, S. (2017). Role of Site-Specific Asparagine Deamidation in Islet Amyloid Polypeptide Amyloidogenesis: Key Contributions of Residues 14 and 21. *Biochemistry*, 56(29), 3808-3817.
- Nilsson, M. R. (2004). Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, 34(1), 151-160.
- Normile, D. (2004). Infectious diseases. WHO ramps up bird flu vaccine efforts. *Science*, 303(5658), 609.
- O'Hagan, D. T. et Valiante, N. M. (2003). Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(9), 727-735.
- Outbreak and spread of chikungunya. (2007). *Weekly Epidemiological Record*, 82(47), 409-415.
- P Hendricks, M., Sato, K., Palmer, L. et I Stupp, S. (2017). *Supramolecular Assembly of Peptide Amphiphiles* (vol. 50).
- Pancer, Z. et Cooper, M. D. (2006). The evolution of adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*, 24, 497-518.
- Paramonov, S. E., Jun, H. W. et Hartgerink, J. D. (2006). Self-assembly of peptide-amphiphile nanofibers: the roles of hydrogen bonding and amphiphilic packing. *Journal of the American Chemical Society*, 128(22), 7291-7298.
- Pashuck, E. T., Cui, H. et Stupp, S. I. (2010). Tuning Supramolecular Rigidity of Peptide Fibers through Molecular Structure. *Journal of the American Chemical Society*, 132(17), 6041-6046.
- Patino, T., Soriano, J., Barrios, L., Ibanez, E. et Nogues, C. (2015). Surface modification of microparticles causes differential uptake responses in normal and tumoral human breast epithelial cells. *Scientific Reports*, 5, 11371.
- Pedersen, M. R., Hansen, E. W. et Christensen, J. D. (1994). Detection of lipopolysaccharide in the picogram range of tissue culture media by a kinetic chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 19(3), 189-194.

- Plotkin, S. A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine*, 11(4 Suppl), S5-11.
- Plotkin, S. A. et Plotkin, S. L. (2011). The development of vaccines: how the past led to the future. *Nature Reviews Microbiology*, 9(12), 889-893.
- Pompano, R. R., Chen, J., Verbus, E. A., Han, H., Fridman, A., McNeely, T., Collier, J. H. et Chong, A. S. (2014). Titrating T-Cell Epitopes within Self-Assembled Vaccines Optimizes CD4+ Helper T Cell and Antibody Outputs. *Advanced Healthcare Materials*, 3(11), 1898-1908.
- Quittot, N., Sebastiao, M., Al-Halifa, S. et Bourgault, S. (2018). Kinetic and Conformational Insights into Islet Amyloid Polypeptide Self-Assembly Using a Biarsenical Fluorogenic Probe. *Bioconjugate Chemistry*, 29(2), 517-527.
- Rappuoli, R., Pizza, M., Del Giudice, G. et De Gregorio, E. (2014). Vaccines, new opportunities for a new society. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(34), 12288-12293.
- Reichardt, P., Dornbach, B. et Gunzer, M. (2010). APC, T cells, and the immune synapse. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 340, 229-249.
- Rudra, J. S., Mishra, S., Chong, A. S., Mitchell, R. A., Nardin, E. H., Nussenzweig, V. et Collier, J. H. (2012). Self-assembled peptide nanofibers raising durable antibody responses against a malaria epitope. *Biomaterials*, 33(27), 6476-6484.
- Rudra, J. S., Tian, Y. F., Jung, J. P. et Collier, J. H. (2010). A self-assembling peptide acting as an immune adjuvant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 622-627.
- Salazar-Gonzalez, J. A., Angulo, C. et Rosales-Mendoza, S. (2015). Chikungunya virus vaccines: Current strategies and prospects for developing plant-made vaccines. *Vaccine*, 33(31), 3650-3658.
- Sebastiao, M., Quittot, N. et Bourgault, S. (2017). Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: Measurement frequency as a factor explaining irreproducibility. *Analytical Biochemistry*, 532, 83-86.
- Simizu, B., Yamamoto, K., Hashimoto, K. et Ogata, T. (1984). Structural proteins of Chikungunya virus. *Journal of Virology*, 51(1), 254-258.
- Skwarczynski, M. et Toth, I. (2011). Peptide-based subunit nanovaccines. *Current Drug Delivery*, 8(3), 282-289.

- Skwarczynski, M. et Toth, I. (2014). Recent advances in peptide-based subunit nanovaccines. *Nanomedicine*, 9(17), 2657-2669.
- Skwarczynski, M. et Toth, I. (2016). Peptide-based synthetic vaccines. *Chemical Science*, 7(2), 842-854.
- Smith, K. A. (2011). Edward Jenner and the Small Pox Vaccine. *Frontiers in Immunology*, 2, 21.
- Spiering, M. J. (2015). Primer on the Immune System. *Alcohol Research : Current Reviews*, 37(2), 171-175.
- Stevens, T. L., Bossie, A., Sanders, V. M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R. L., Mosmann, T. R. et Vitetta, E. S. (1988). Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature*, 334(6179), 255-258.
- Strauss, J. H. et Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*, 58(3), 491-562.
- Suarez, D. L., Perdue, M. L., Cox, N., Rowe, T., Bender, C., Huang, J. et Swayne, D. E. (1998). Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *Journal of Virology*, 72(8), 6678-6688.
- Sur, S., Newcomb, C. J., Webber, M. J. et Stupp, S. I. (2013). Tuning supramolecular mechanics to guide neuron development. *Biomaterials*, 34(20), 4749-4757.
- Sur, S., Tantakitti, F., Matson, J. B. et Stupp, S. I. (2015). Epitope topography controls bioactivity in supramolecular nanofibers. *Biomaterials science*, 3(3), 530-532.
- Tantakitti, F., Boekhoven, J., Wang, X., Kazantsev, R., Yu, T., Li, J., Zhuang, E., Zandi, R., Ortony, J. H., Newcomb, C. J., Palmer, L. C., Shekhawat, G. S., de la Cruz, M. O., Schatz, G. C. et Stupp, S. I. (2016). Energy landscapes and function of supramolecular systems. *Nature materials*, 15(4), 469-476.
- Teng, T.-S., Kam, Y.-W., Tan, J. J. L. et Ng, L. F. P. (2011). Host response to Chikungunya virus and perspectives for immune-based therapies. *Future Virology*, 6(8), 975-984.
- Tenidis, K., Waldner, M., Bernhagen, J., Fischle, W., Bergmann, M., Weber, M., Merkle, M. L., Voelter, W., Brunner, H. et Kapurniotu, A. (2000). Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties. *Journal of Molecular Biology*, 295(4), 1055-1071.

- Thérien, A., Bédard, M., Carignan, D., Rioux, G., Gauthier-Landry, L., Laliberté-Gagné, M.-È., Bolduc, M., Savard, P. et Leclerc, D. (2017). A versatile papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform based on sortase-mediated antigen coupling. *Journal of Nanobiotechnology*, 15, 54.
- Turvey, S. E. et Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S24-32.
- Tycko, R. (2014). Physical and structural basis for polymorphism in amyloid fibrils. *Protein Science*, 23(11), 1528-1539.
- Tycko, R. et Wickner, R. B. (2013). Molecular Structures of Amyloid and Prion Fibrils: Consensus versus Controversy. *Accounts of Chemical Research*, 46(7), 1487-1496.
- Tycko, R. et Wickner, R. B. (2013). Molecular structures of amyloid and prion fibrils: consensus versus controversy. *Accounts of Chemical Research*, 46(7), 1487-1496.
- Tysseling-Mattiace, V. M., Sahni, V., Niece, K. L., Birch, D., Czeisler, C., Fehlings, M. G., Stupp, S. I. et Kessler, J. A. (2008). Self-assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote axon elongation after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 28(14), 3814-3823.
- Waku, T., Kitagawa, Y., Kawabata, K., Nishigaki, S., Kunugi, S. et Tanaka, N. (2013). Self-assembled β -Sheet Peptide Nanofibers for Efficient Antigen Delivery. *Chemistry Letters*, 42(11), 1441-1443.
- Wang, M., Zhou, P., Wang, J., Zhao, Y., Ma, H., Lu, J. R. et Xu, H. (2017). Left or Right: How Does Amino Acid Chirality Affect the Handedness of Nanostructures Self-Assembled from Short Amphiphilic Peptides? *Journal of the American Chemical Society*, 139(11), 4185-4194.
- Webber, M. J., Appel, E. A., Meijer, E. W. et Langer, R. (2015). Supramolecular biomaterials. *Nature Materials*, 15, 13.
- Webber, M. J., Berns, E. J. et Stupp, S. I. (2013). Supramolecular Nanofibers of Peptide Amphiphiles for Medicine. *Israel Journal of Chemistry*, 53(8), 530-554.
- Webber, M. J., Tongers, J., Newcomb, C. J., Marquardt, K. T., Bauersachs, J., Losordo, D. W. et Stupp, S. I. (2011). Supramolecular nanostructures that mimic VEGF as a strategy for ischemic tissue repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), 13438-13443.

- Wei, G., Su, Z., Reynolds, N. P., Arosio, P., Hamley, I. W., Gazit, E. et Mezzenga, R. (2017). Self-assembling peptide and protein amyloids: from structure to tailored function in nanotechnology. *Chemical Society Reviews*, 46(15), 4661-4708.
- Wen, Y., Waltman, A., Han, H. et Collier, J. H. (2016). Switching the Immunogenicity of Peptide Assemblies Using Surface Properties. *ACS Nano*, 10(10), 9274-9286.
- Whitesides, G. M. et Grzybowski, B. (2002). Self-Assembly at All Scales. *Science*, 295(5564), 2418.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A., Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., Pham, E., Masliah, E., Gage, F. H. et Riek, R. (2011). In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(10), 4194-4199.
- Woolfson, D. N. et Mahmoud, Z. N. (2010). More than just bare scaffolds: towards multi-component and decorated fibrous biomaterials. *Chemical Society Reviews*, 39(9), 3464-3479.
- Xu, X.-D., Chen, J.-X., Cheng, H., Zhang, X.-Z. et Zhuo, R.-X. (2012). Controlled peptide coated nanostructures via the self-assembly of functional peptide building blocks. *Polymer Chemistry*, 3(9), 2479-2486.
- Xu, X. D., Jin, Y., Liu, Y., Zhang, X. Z. et Zhuo, R. X. (2010). Self-assembly behavior of peptide amphiphiles (PAs) with different length of hydrophobic alkyl tails. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 81(1), 329-335.
- Yang, H. et Kim, D. S. (2015). Peptide Immunotherapy in Vaccine Development: From Epitope to Adjuvant. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 99, 1-14.
- Yang, L., Li, W., Kirberger, M., Liao, W. et Ren, J. (2016). Design of nanomaterial based systems for novel vaccine development. *Biomaterials Science*, 4(5), 785-802.
- Zaman, M., Good, M. F. et Toth, I. (2013). Nanovaccines and their mode of action. *Methods*, 60(3), 226-231.
- Zebedee, S. L. et Lamb, R. A. (1988). Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *Journal of Virology*, 62(8), 2762-2772.

Zhao, G., Chandrudu, S., Skwarczynski, M. et Toth, I. (2017). The application of self-assembled nanostructures in peptide-based subunit vaccine development. *European Polymer Journal*, 93, 670-681.

Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C. X., Mitter, N. et Yu, C. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32(3):327-37.

Zhao, Q., Li, S., Yu, H., Xia, N. et Modis, Y. (2013). Virus-like particle-based human vaccines: quality assessment based on structural and functional properties. *Trends in Biotechnology*, 31(11), 654-663.

Zhu, J. (2015). T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*, 75(1), 14-24.