

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UNE NANOPATEFORME VACCINALE SYNTHÉTIQUE  
MULTIFONCTIONNALISÉE À BASE DE PEPTIDES D'AUTO-ASSEMBLAGE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

SALMA BRICHA

MARS 2023

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.04-2020). 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

En premier lieu je tiens à remercier mon directeur de maîtrise, le Professeur Steve Bourgault, ainsi que mon codirecteur, le Professeur Denis Archambault, de m'avoir offert une telle expérience, riche en connaissances et en émotions, avec une autonomie et une liberté scientifique considérable, tout en m'encadrant et en supervisant l'avancée de mes travaux. Merci de m'avoir accordé votre confiance, me permettant ainsi de découvrir le défi qu'est la science ainsi que l'euphorie de la résolution. Merci de m'avoir permis de corroborer mon attrait pour ce domaine. Et merci de m'avoir fait découvrir la science sous un autre angle. Je tiens également à vous remercier de m'avoir aidé à prendre conscience de mes forces et surtout de mes faiblesses. En d'autres termes, un très grand merci de m'avoir aidé à grandir et à évoluer autant sur un aspect professionnel que personnel.

J'aimerais également remercier les membres des laboratoires Bourgault et Archambault, ayant été d'un soutien autant scientifique que moral. Merci à Trang d'avoir supporté toutes mes requêtes avec le sourire. Merci à Félix, Nadjib, Mélanie et Margo pour les discussions passionnantes et stimulantes. Merci à Philippe, Vinay, Clément, Luis et Gian-Lucas d'avoir mis en place une ambiance de travail autant agréable, chaleureuse et drôle. Merci aussi à Vy, Laeticia, Frédérique, Mathilde et Mathew pour votre gentillesse et votre amabilité et votre complaisance.

Je voudrais également remercier mes parents et ma sœur, sans lesquels je n'aurais jamais atteint mes objectifs professionnels et personnels. Merci pour votre soutien moral et financier ainsi que pour votre amour inconditionnel qui me confère la force nécessaire pour défier les obstacles et avancer dans la vie. Un très grand merci à mes colocataires Hugo et Fortunat, sans qui cette maîtrise n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir traitée comme une princesse, de m'avoir rappelé de manger et de m'hydrater ainsi que de m'avoir réveillée les jours où j'allais être en retard. Merci aussi pour votre écoute, votre appui et vos encouragements.

Je tiens également à remercier les personnes ayant été impliquées de près ou de loin au niveau de la réussite de mon projet, notamment le personnel du magasin de Chimie, le personnel de l'animalerie et le personnel administratif de l'UQAM.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	ii
LISTE DES FIGURES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX .....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	ix
RÉSUMÉ .....	xii
CHAPITRE I INTRODUCTION .....	1
1.1 Vaccination .....	1
1.2 Système immunitaire .....	2
1.2.1 Système immunitaire inné .....	2
1.2.2 Système immunitaire adaptatif .....	7
1.2.2.1 Présentation d'antigènes aux lymphocytes T par les CPA .....	8
1.2.2.2 Lymphocytes T CD4+ .....	9
1.2.2.3 Lymphocytes T CD8+ .....	9
1.2.2.4 Lymphocytes B .....	10
1.3 Vaccination .....	14
1.3.1 Vaccins traditionnels .....	14
1.3.2 Vaccins de nouvelle génération .....	15
1.3.2.1 Plateformes de livraison vaccinale .....	18
1.3.2.1.1 Nanoparticules à base de protéines et peptides d'auto-assemblage .....	19
1.3.2.1.1.1 Nanofilaments en feuillets- $\beta$ -croisés .....	21
1.3.2.2 Adjuvants .....	23
1.3.2.2.1 Agonistes TLR .....	24
1.4 Virus de l'influenza .....	26
1.4.1 Types d'influenza .....	26
1.4.2 Génomique .....	27
1.4.3 Morphologie .....	28
1.4.4 Cycle de réplication .....	29
1.4.5 Transmission .....	31
1.4.6 Variation antigénique .....	31
1.4.7 Vaccination antigrippale .....	34
1.4.7.1 Vaccins passés et actuels .....	34
1.4.7.2 Vaccins futurs .....	36
1.5 Hypothèse et objectif .....	37
CHAPITRE II ARTICLE .....	39
2.1 Contribution des auteur.e.s : .....	40

2.2	Résumé .....	41
2.3	Abstract.....	42
2.4	Introduction.....	43
2.5	Results and Discussion .....	46
2.5.1	Design of multifunctional synthetic nanovaccines based on self-assembling peptides to fight influenza infection .....	46
2.5.2	Synthesis and preparation of multicomponent nanofilaments .....	48
2.5.3	Functionalized peptide nanofilaments are avidly uptaken by dendritic cells .....	51
2.5.4	IMQ and CpG ODN retain their capacity to activate their cognate TLRs upon their conjugation onto immunostimulatory cross- $\beta$ nanofilaments .....	53
2.5.5	Multicomponent nanofilaments stimulate dendritic cells <i>in vitro</i> .....	55
2.5.6	Multicomponent M2e-nanofilaments potentiate the M2e-specific antibody response and fully protect mice against an H1N1 influenza A infection.....	56
2.6	Conclusion .....	59
2.7	Materials and methods .....	60
2.7.1	Synthesis of N-(4-((4-amino-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)methyl)benzyl)-6-azidohexanamide (azido-IMQ).....	60
2.7.2	Synthesis, purification, and characterization of peptides.....	60
2.7.3	Conjugation of Azido-IMQ (9) to propargyl-I10.....	61
2.7.4	Conjugation of Alexa488 to M2e and M2e-I10 peptides.....	61
2.7.5	Self-assembly of I10 peptides into nanofilaments.....	61
2.7.6	Conjugation of 5'-thiolated CpG on assembled I10 nanofilaments.....	62
2.7.7	Fluorescence spectroscopy .....	62
2.7.8	Circular dichroism spectroscopy .....	62
2.7.9	Atomic force microscopy .....	63
2.7.10	Transmission electron microscopy.....	63
2.7.11	Enzyme-linked immunosorbent assay for epitope accessibility .....	63
2.7.12	Evaluation of TLR activation.....	64
2.7.13	Evaluation of cellular uptake by dendritic cells.....	64
2.7.14	Expression of co-stimulatory molecules and MHC II on dendritic cells.....	65
2.7.15	Mice immunization .....	65
2.7.16	Determination of anti-M2e IgG antibody titers .....	65
2.7.17	Influenza A viral experimental challenge .....	65
2.7.18	Data analysis .....	67
2.8	Supporting information.....	68
CHAPITRE III DISCUSSION.....		87
3.1	Design, synthèse et caractérisation d'une nanoplateforme vaccinale multifonctionnalisée et versatile .....	88
3.2	Les nanoplateformes vaccinales multifonctionnalisées sont cytocompatibles et permettent d'activer la réponse immunitaire innée <i>in vitro</i> . .....	89

3.3 Les nanoplateformes vaccinales multifonctionnalisées stimulent la réponse adaptative spécifique à l'antigène M2e et confèrent une protection complète contre une infection expérimentale par l'IAV..... 92

3.4 Limites et perspectives ..... 95

CONCLUSION ..... 99

BIBLIOGRAPHIE ..... 104

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Représentation schématique des TLRs .....	5
Figure 1.2 : Présentation d'antigènes aux lymphocytes T par les CPA .....	8
Figure 1.3 : Réponse immunitaire adaptative.....	13
Figure 1.4 : Principaux types de vaccins.....	17
Figure 1.5 : Nanoparticules protéiques/peptidiques ayant la capacité d'auto-assemblage .....	20
Figure 1.6 : Schématisation de la formation de fibres en feuillets- $\beta$ -croisés .....	22
Figure 1.7 : Génomique et morphologie du virus influenza A.....	28
Figure 1.8 : Cycle de reproduction du virus de la grippe .....	31
Figure 1.9 : Variation antigénique du virus de la grippe.....	33
Figure 2.1 : Schematic representation of the preparation of multifunctionalized nanofilaments ..	47
Figure 2.2 : Self-assembly of functionalized I <sub>10</sub> $\beta$ -peptide into cross- $\beta$ -sheet fibrils .....	50
Figure 2.3 : Cytocompatibility and cellular uptake of multicomponent nanofilaments by dendritic cells.....	52
Figure 2.4 : TLR activation by multicomponent cross- $\beta$ nanofilaments.....	54
Figure 2.5 : Stimulation of dendritic cells by multicomponent cross- $\beta$ nanofilaments .....	55
Figure 2.6 : Multicomponent cross- $\beta$ fibrils induce a robust antigen-specific immune response and protect mice against a lethal influenza infection .....	61
Figure S1 : <sup>1</sup> H NMR Spectrum of compound 9 (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz.....	72
Figure S2 : <sup>13</sup> C NMR Spectrum of compound 9 (CDCl <sub>3</sub> , 126 MHz).....	73
Figure S3 : COSY NMR Spectrum of compound 9.....	74
Figure S4 : HSQC NMR Spectrum of compound 9.....	75
Figure S5 : HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of M2e-I10 peptide.....	76
Figure S6 : HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of Pra-I10 peptide.....	77
Figure S7 : HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of IMQ-I10 peptide .....	78

Figure S8 : HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of maleimide-I10 peptide .....	79
Figure S9 : HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of M2e peptide .....	80
Figure S10: Representative AFM images .....	81
Figure S11: Flow cytometry histograms of DC2.4 cells uptake .....	82
Figure S12: Weight of immunized mice .....	83
Figure S13: Total IgG anti-M2e titer in sera of immunized mice.....	84
Figure S14: M2e-specific IgG isotypes in immunized mice.....	85
Figure S15: Protection against a lethal influenza A virus inoculation .....	86
Annexe 1 : Évaluation du co-assemblage de la plateforme vaccinale M2e-I10/Mal-I10 via zêta potentiel.....	101
Annexe 2 : Évaluation du co-assemblage de la plateforme vaccinale M2e-I10/IMQ-I10 via zêta potentiel.....	1022
Annexe 3 : Dosage D'IFN $\gamma$ sérique deux semaines après la dernière immunisation .....	1033



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Séquences de l'antigène M2e associées à diverses souches d'IAV infectant les espèces humaines, aviaires et porcines .....	37
Table S1 : Mass spectrometry analysis of peptides.....	91
Table S2 : Scale for clinical symptoms of influenza infection .....	92

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADCC	« <i>Antibody-dependant cell cytotoxicity</i> »; cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADCP	« <i>Antibody-dependant cell phagocytosis</i> »; phagocytose cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	ADN double brin
AFM	« <i>Atomic force microscopy</i> »; microscopie à force atomique
AGP	Aminoalkyl glucosaminide 4-phosphates
Alum	Sels d'aluminium
ANS	« <i>Anilinonaphthalene-8-Sulfonic Acid</i> »; acide anilinonaphtalène-8-sulfonique
ARN	Acide ribonucléique
BALF	« <i>Bronchoalveolar lavage fluid</i> »; liquide de lavage bronchoalvéolaire
BCR	« <i>B cell receptor</i> »; récepteur de cellule B
BCG	Bacille Calmette-Guérin vaccin contre la tuberculose
BSA	« <i>Bovin serum albumin</i> »; albumine de sérum bovin
CD	« <i>Circular dichroism</i> »; dichroïsme circulaire
CDC	« <i>Complement-dependant cytotoxicity</i> »; cytotoxicité dépendante du complément
CFSE	Ester succinimidyle de carboxyfluorescéine
CLR	« <i>C-type lectine receptor</i> »; récepteur de la lectine de type C
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA(APC)	Cellules présentatrices d'antigènes (antigen-presenting cells)
CpG	Cytosine phosphoguanosine
CTL	« <i>Cytotoxic T lymphocyte</i> »; lymphocyte T cytotoxique
DAMP	« <i>Damage-associated molecular pattern</i> »; motifs moléculaires associés aux dommages
DC	Cellules dendritiques
ELISA	« <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> »; méthode immunoenzymatique
Fab	Fragment antigen-binding
Fc	Fragment cristallisable

FDA	« <i>Food and drug administration</i> »; administration des aliments et des médicaments
GLA-SE	lipide glucopyranosyl
HA	Hémagglutinine
HbsAg	Protéine Core du virus de l'Hépatite B
HCTU	2-(6-chloro-1-H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiunhexafluorophosphate
HEF	Hemagglutinine-esterase fusion
HPLC	« <i>High performance liquid chromatography</i> »; chromatographie en phase liquide à haute performance
IAPP	« <i>Islet amyloid polypeptide</i> »; polypeptide amyloïde des îlots
IAV	« <i>Influenza A virus</i> »; virus de l'influenza A
IBV	« <i>Influenza B virus</i> »; virus de l'influenza B
ICV	« <i>Influenza C virus</i> »; virus de l'influenza C
IDV	« <i>Influenza D virus</i> »; virus de l'influenza D
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IMQ	Imidazoquinoline
IL	Interleukine
LB	Lymphocytes B
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Lymphocytes T
M1	Protéine matrice 1
M2	Protéine matrice 2
M2e	Ectodomaine de la protéine M2
MDCK	« <i>Madin Darby canine kidney cell</i> » ; cellule rénale canine de Madin Darby
MFI	« <i>Mean fluorescence intensity</i> »; intensité moyenne de fluorescence
MPLA	Lipide A monophosphorylé
MRE	« <i>Mean residue ellipticity</i> »; ellipticité moyenne des résidus
NA	Neuraminidase
NALF	« <i>Nasal lavage fluid</i> »; liquide de lavage nasal
NEP	« <i>Nuclear exportation protein</i> »; protéine d'exportation nucléaire

NK	Natural killer
NLR	« <i>Nod-like receptor</i> »; récepteur de type NOD
NMR	« <i>Nuclear magnetic resonance</i> »; résonance magnétique nucléaire
NP	Nucléoprotéine
ODN	Oligodésoxyribonucléique
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAMP	« <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> »; motifs moléculaires associés aux pathogènes
PCR	« <i>Polymerase chain reaction</i> »; réaction en chaîne par polymérase
Poly I :C	Acide polyinosinic:polycytidylic
PRR	« <i>Pattern recognition receptor</i> »; récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
RdRp	« <i>RNA dependant RNA polymerase</i> »; ARN polymérase dépendante de l'ARN
RLR	« <i>RIG-like receptor</i> »; récepteur de type RIG
RNP	Ribonucléoprotéine
ROR / RRO	Rougeole, oreillons, rubéole; vaccin contre la rubéole, oreillons et rougeole.
SRAS-CoV-2	Syndrome respiratoire sévère aigu-coronavirus de type 2
TCR	« <i>T cell receptor</i> »; récepteur de cellule T
TEM	« <i>Transmission electron microscopy</i> »; microscopie électronique à transmission
tGPI	Glycoprotéines transmembranaires des trypanosomes
Th1	« <i>T helper 1</i> »; T auxiliaire 1
Th2	« <i>T helper 2</i> »; T auxiliaire 2
THF	Tetrahydrofuran
ThT	Thioflavin T
TLR	« <i>Toll-like receptor</i> »; récepteur de type toll
TMB	3,3'-5,5'-tetramethyl 78 benzidine
TNF	« <i>Tumor necrosis factor</i> »; facteur de nécrose de tumeur
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLP	« <i>Virus-like particle</i> »; particule pseudo-virale
VPH	Virus du papillome humain

## RÉSUMÉ

La vaccination constitue l'approche la plus efficace pour lutter contre les maladies infectieuses. La majorité des vaccins actuellement employés sont constitués d'organismes entiers atténués ou inactivés. Un regain de virulence ou une inactivation incomplète demeurent des inconvénients majeurs associés à ce type de vaccins dits traditionnels. Ainsi, des alternatives plus sûres furent élaborées, notamment les vaccins sous-unitaires, lesquels se composent d'un ou plusieurs antigènes spécifiques à un pathogène. Néanmoins, ces vaccins de nouvelle génération sont faiblement immunogéniques et par conséquent, nécessitent l'utilisation de plateforme de livraison vaccinale et/ou la supplémentation d'adjuvants. À cet effet, les peptides ayant la capacité de s'auto-assembler en filaments avec une structure en feuillets- $\beta$ -croisés, tel que le peptide I10, ont démontré un certain potentiel. Considérant leur capacité à être fonctionnalisés avec un antigène ainsi qu'à stimuler intrinsèquement l'immunité innée, ces nanoassemblages servent d'une part de plateforme de livraison vaccinale et d'autre part d'adjuvant. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude consistait à utiliser le co-assemblage moléculaire de peptides I10 distinctement fonctionnalisés (*i.e.* conjugué à une molécule fonctionnelle) avec l'antigène grippal M2e et un agoniste des récepteurs Toll Like (TLR7 ou TLR9) en guise d'adjuvant afin d'élaborer des plateformes vaccinales multifonctionnalisées. Les agonistes des récepteurs TLR7 et TLR9 ont été fonctionnalisés sur différentes plateformes à l'aide de stratégies de conjugaison bioorthogonales soulignant ainsi la versatilité des nanoplateformes. Une caractérisation biophysique via spectroscopie et microscopie, entre autres, permis de confirmer la structure en feuillet- $\beta$ -croisés et la morphologie filamenteuse des plateformes multifonctionnalisées. Des essais *in vitro* sur des lignées cellulaires ont également été entrepris via cytométrie, microscopie et spectroscopie, révélant une importante internalisation des plateformes multifonctionnalisées par les cellules présentatrices d'antigènes ainsi que le maintien des activités biologiques des agonistes TLR à la suite de leur conjugaison, menant à une forte activation des cellules immunitaires innées. Une évaluation immunologique *in vivo* a ensuite été effectuée à l'aide du modèle murin balb/c, révélant l'induction d'une réponse immunitaire humorale robuste spécifique à l'antigène ainsi qu'une réponse cellulaire mixte Th1/Th2 par les plateformes multifonctionnalisées, aboutissant à une protection complète contre une infection expérimentale létale du virus influenza A (PR8 H1N1). Dans l'ensemble, ces plateformes multifonctionnalisées constituent une stratégie prometteuse pour améliorer l'efficacité de vaccins sous-unitaires et conduisent au développement de vaccins antigrippaux entièrement synthétiques et universels.

Mots clés : nanovaccins; peptides d'auto-assemblage; co-assemblage; feuillets- $\beta$ -croisés; nanoplateforme de livraison vaccinale; vaccins sous-unitaires; vaccins antigrippaux

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1.1 Vaccination

Au cours du dernier siècle, des millions d'individus sont décédés suite à la contraction de maladies infectieuses, faisant de ces dernières la 2<sup>e</sup> cause de mortalité chez l'humain (Huremović, 2019). De 1918 à aujourd'hui, six pandémies ont été déclarées dont cinq causées par le virus de la grippe et la dernière par le SARS-CoV-2. De plus, de nombreuses épidémies ont éclos durant cette période, notamment celles dues aux virus de l'immunodéficience humaine (VIH), Chikungunya, Zika, Dengue, Ebola, SRAS-CoV, MERS et la Variole du singe ayant lieu actuellement (Ciotti *et al.*, 2020; Mathers *et al.*, 2009; Reperant et Osterhaus, 2017; Zylberman, 2020). Ce nombre croissant de maladies infectieuses souligne l'importance de la vaccination. En effet, depuis les premiers écrits sur la vaccination au XVIII<sup>e</sup> siècle, la vaccination a permis de réduire considérablement le taux d'infection, de morbidité et de mortalité de nombreuses maladies infectieuses, et ce à l'échelle mondiale, tels que la peste, la variole, la poliomyélite, la diphtérie, la rougeole, le tétanos, la coqueluche et la rubéole (Janssens, 1992; Plummer et Manchester, 2011). Elle constitue donc l'approche la plus efficace au niveau de la prévention et du contrôle des maladies infectieuses. En plus d'être l'une des interventions sanitaires les plus efficaces, la vaccination constitue également une intervention sanitaire des plus rentables. Elle permet, entre autres, de limiter les pertes économiques découlant de la santé des animaux d'élevages se chiffrant en millions voire milliards de dollars (Rémy *et al.*, 2015). Cependant, malgré une meilleure compréhension de l'immunologie et de la virologie, de nombreux défis persistent, principalement associés à la complexité de mettre en place une protection à long terme contre certaines maladies infectieuses comme le paludisme et le VIH ainsi qu'à l'émergence et ré-émergence de nouveaux agents pathogènes, tel que le virus de la grippe et le coronavirus (Canoui et Launay, 2019). Par conséquent, de nouvelles approches vaccinales sûres et efficaces doivent être élaborées.

## 1.2 Système immunitaire

Le système immunitaire contribue au maintien de l'intégrité de l'organisme en le protégeant contre les agents pathogènes, les agressions physico-chimiques et les cellules anormales. Afin de simplifier la compréhension des mécanismes régissant la réponse immunitaire, le système immunitaire peut être divisé en deux grandes classes, soit l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée constitue la première ligne de défense, elle est donc rapide, mais peu spécifique. L'immunité adaptative, quant à elle, n'est induite que lorsque l'immunité innée seule ne suffit pas à éliminer le danger. Elle sert de seconde ligne de défense et est donc plus lente, mais plus efficace étant donné sa spécificité aux agents pathogènes. De plus, contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative permet la mise en place d'une protection à long terme contre un agent pathogène spécifique, phénomène communément appelé mémoire immunologique (Abbas *et al.*, 2011; Murphy, 2022).

### 1.2.1 Système immunitaire inné

L'immunité innée peut être subdivisée en trois éléments. Dans un premier temps, une barrière physique qui est assurée par les cellules épithéliales de la peau et des muqueuses (Murphy, 2022). Certains scientifiques promeuvent également l'appartenance du microbiote au niveau de la peau et des muqueuses au système immunitaire inné, puisque la présence de cette flore restreint la capacité d'agents pathogènes à proliférer en compétitionnant pour les ressources et en produisant certains métabolites (Sassone-Corsi et Raffatellu, 2015). Dans un second temps, l'immunité innée se compose d'effecteurs peptidiques/protéiques solubles qui circulent dans les fluides biologiques. Parmi eux, une cinquantaine de protéines sériques constituant ensemble le système du complément. Ce système participe à l'élimination des pathogènes en induisant l'inflammation, l'opsonisation et la lyse des cellules infectées et des agents infectieux (Murphy, 2022). De plus, d'autres peptides et protéines solubles possèdent un rôle antimicrobien, tels que les défensines et les cathélicidines (Hiemstra, 2007). Dans un tiers et dernier temps, l'immunité innée comporte des effecteurs cellulaires résidant au sein de divers tissus et circulant dans le sang, notamment les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles, mastocytes), les cellules *natural killer* (NK), les macrophages et les cellules dendritiques (Murphy, 2022). Les granulocytes sont les leucocytes les plus abondants, soit environ 40-70% des leucocytes du sang chez l'humain (Imhof et Dunon, 1995). Ces derniers peuvent être divisés en quatre types cellulaires distincts, soit les neutrophiles, les

éosinophiles, les basophiles et les mastocytes (Murphy, 2022). Les neutrophiles et les éosinophiles ont principalement des rôles dans la phagocytose et la libération d'antimicrobiens solubles (DeLeo et Allen, 2020; Salari Namin *et al.*, 2022). Les basophiles et mastocytes, quant à eux, sont impliqués au niveau de l'inflammation (Otsuka *et al.*, 2016). Les cellules NK ont principalement une fonction cytotoxique. Elles induisent la mort (apoptose ou lyse) de cellules infectées ou anormales à l'aide de leurs granules cytolytiques (Murphy, 2022). Les macrophages sont, pour leur part, des phagocytes spécialisés, en plus de leurs nombreux rôles, notamment inflammatoire (M1), anti-inflammatoire (M2) et dans la présentation d'antigène (Atri *et al.*, 2018; Kashem *et al.*, 2017; Murphy, 2022; Yunna *et al.*, 2020). Les cellules dendritiques, quant à elles, sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) spécialisées. Comme les macrophages, elles possèdent d'autres fonctions, telles que la phagocytose (Kashem *et al.*, 2017; Murphy, 2022). Finalement, les monocytes sont des cellules pouvant se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques. Outre leur capacité de différenciation, ces cellules exercent elles-mêmes certaines fonctions. À l'instar des macrophages et des cellules dendritiques, les monocytes sont également connus pour jouer un rôle dans la phagocytose et la présentation d'antigènes (Jakubzick *et al.*, 2017; Ohradanova-Repic *et al.*, 2016).

Ces effecteurs cellulaires de l'immunité innée agissent à la suite de la reconnaissance d'un *Pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) ou *Damage-associated molecular pattern* (DAMP) à l'aide de *pattern recognition receptor* (PRR). En effet, l'engagement d'un PRR par son ligand induit diverses cascades de signalisation aboutissant à l'activation et la maturation de la cellule comportant le PRR (Murphy, 2022). Les PAMPs sont des composantes généralement cruciales aux microorganismes. Elles sont donc hautement conservées chez ces derniers et ne peuvent, par conséquent, pas subir de modifications majeures pour l'échappement (Akira *et al.*, 2006). Les DAMPs sont, pour leur part, des composantes cellulaires de l'organisme hôte libérées lors de dommages ou de la mort cellulaire. Les PRR reconnaissant les PAMPs et les DAMPs peuvent être séparés selon leur localisation, notamment les PRR cytoplasmiques et les PRR transmembranaires (retrouvés à la surface cellulaire ou au niveau de vésicules endosomales). Les PRR cytoplasmiques comprennent les *NOD-Like receptors* (NLR) et les *RIG-like receptors* (RLR) (Murphy, 2022). Les NLR reconnaissent une variété de composantes bactériennes, tels que le muramyl dipeptide (un composant du peptidoglycane) et la flagelline. Les RLR détectent, pour leur



part, les acides ribonucléiques simple ou double brin viraux (Olive, 2012). Les PRR membranaires comprennent, quant à eux, les *C-type lectine receptor* (CLR) ainsi que les *Toll-like receptors* (TLRs). Les CLR détectent des carbohydrates répétitifs. Les TLR reconnaissent une grande diversité de PAMPs et DAMPs (Murphy, 2022; Olive, 2012; Osorio et Reis e Sousa, 2011). Chez l'humain, une dizaine de TLR ont été recensés, lesquels se distinguent par leurs séquences primaires et leurs spécificités pour différents PAMPs et DAMPs. Les récepteurs TLR retrouvés à la surface cellulaire (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10) reconnaissent des composantes extracellulaires des agents pathogènes. Le TLR2, en formant des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6, reconnaît entre autres les lipopeptides et lipoprotéines bactériens, les peptidoglycanes et les acides lipotéchoïques de bactéries gram positives, les lipoarabinomannanes des mycobactéries, le zymozan des *Saccharomyces cerevisiae*, les porines de *Neisseria*, les phospholipomannanes de *Candida albicans*, les Glucuronoxylomannane de *Cryptococcus neoformans*, les glycoprotéines transmembranaires des trypanosomes (tGPI-mutin) et les hémagglutinines du virus de la rougeole (Akira *et al.*, 2006; Kawai et Akira, 2011; Medzhitov, 2001; Murphy, 2022). Le TLR4 reconnaît principalement les lipopolysaccharides (LPS) bactériens des bactéries gram négatives mais aussi les mannanes des champignons, les glycoinositolphospholipides des parasites et certaines protéines structurales virales. Le TLR5 a une spécificité de reconnaissance pour les flagellines bactériennes (Akira *et al.*, 2006; Kawai et Akira, 2011; Medzhitov, 2001; Murphy, 2022). Le TLR10 ayant été découvert plus récemment a moindrement été étudié, il est connoté de récepteur orphelin. Certaines études ont révélé la capacité du TLR10 à interagir avec divers ligands suite à son hétéro-dimérisation avec d'autres TLR, notamment les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 8. Par exemple, en s'associant au TLR2, le TLR10 reconnaît les lipoprotéines diacylées synthétiques, le LPS, l'*Helicobacter pylori*, la *Borrelia burgdorferi* et la *Listeria monocytogenes*. De même, la dimérisation du TLR10 avec le TLR1, TLR5 ou TLR8 permet la reconnaissance de la protéine gp41 du VIH, la flagelline et la kératite virale respectivement. Les récepteurs TLR situés au niveau de vésicules endosomales (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) détectent, quant à eux, les composantes intracellulaires des agents pathogènes, notamment les acides nucléiques (Kawai et Akira, 2011; Su *et al.*, 2020). Le TLR3 reconnaît les acides ribonucléiques (ARN) doubles brins (db), associés aux infections virales. Les TLR7 et TLR8 reconnaissent les ARN simples brins (sb), particulièrement les ARN riches en purines, telle que la guanosine. Finalement, le TLR9 a une spécificité moléculaire pour l'ADN double brin (ADNdb) et plus particulièrement pour l'ADNdb composé de motifs CpG (cytidine «

C » suivi d'une guanosine « G » liée par une liaison phosphodiester ou phosphorothioate « p ») non méthylés associés aux bactéries (Davenne *et al.*, 2020; Kawai et Akira, 2011; Su *et al.*, 2020). Les TLR jouent donc un rôle crucial au niveau du déroulement de la réponse immunitaire innée étant donné qu'ils lui confèrent un niveau relatif de spécificité de reconnaissance et de réponse. De plus, les PRR, dont les TLR, ont également une importance pour la réponse immunitaire adaptative. En effet, ils constituent un lien clé entre l'immunité innée et adaptative et possèdent donc un rôle déterminant au niveau de la qualité et de l'ampleur de la réponse adaptative, et ce par le biais des CPA (Iwasaki, Akiko et Medzhitov, 2004).

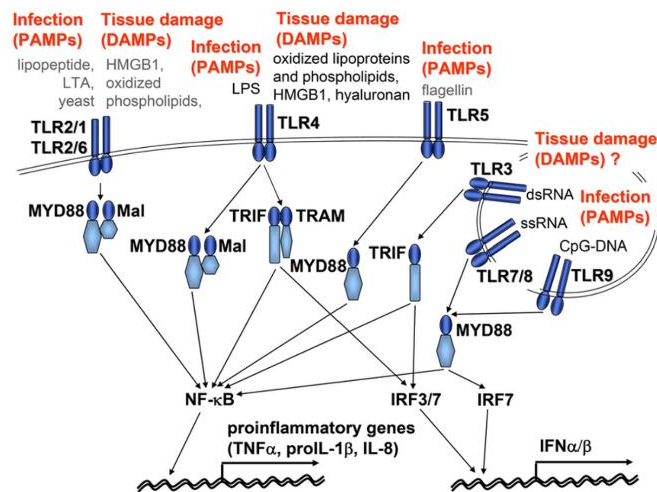


Figure 1.1 : Représentation schématique des TLRs. Les TLR sont situés au niveau des membranes plasmiques ou endosomales. Ils permettent aux cellules immunitaires de détecter les infections grâce à leur interaction avec les PAMPs et les DAMPs. En recrutant différentes molécules adaptatrices, les TLR activent des voies de signalisation qui aboutissent à l'expression de gènes pro-inflammatoires et/ou d'IFN de type I. Figure adaptée de (Suzuki *et al.*, 2005).

Les CPA ont pour fonction de traiter le matériel antigénique (molécules pouvant être ciblées par la réponse immunitaire adaptative) et de l'exposer à leur surface afin de le présenter aux cellules de l'immunité adaptative pour initier la réponse immunitaire adaptative. Elles agissent donc comme messagers entre l'immunité innée et adaptative. L'engagement d'un PRR par un PAMP au niveau des CPA mène à l'internalisation de l'agent pathogène par le biais de divers mécanismes, notamment l'endocytose, la phagocytose, ou la macropinocytose. Une fois internalisé, ce dernier est fragmenté en courts fragments peptidiques antigéniques lesquels sont acheminés et présentés à la surface des CPA. Cette présentation d'antigène à la surface cellulaire s'effectue grâce à la liaison des fragments antigéniques à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces

complexes antigènes:molécules du CMH présentés à la surface des CPA sont ensuite reconnus par les lymphocytes T de l'immunité adaptative (discuté plus bas) (Chaplin, 2010; Ito *et al.*, 2002; Murphy, 2022).

On distingue deux classes de CMH, soit les CMH de classe I et les CMH de classe II. Les CMH de classe I permettent la présentation d'antigènes dits endogènes (i.e. issus de la dégradation de composantes cellulaires). Ce mécanisme permet de vérifier l'état des cellules de l'hôte. Les molécules de CMH I sont donc exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées. Les molécules de CMH de classe II, quant à elles, exposent les antigènes exogènes (i.e. les antigènes issus de la dégradation de composantes internalisées par la cellule). Ce mécanisme contribue à l'échantillonnage de l'environnement permettant de surveiller et détecter la présence de substances étrangères au sein de l'organisme, un processus médié par les CPA (immunosurveillance). Les CMH de classe II sont donc exprimés exclusivement au niveau de ces cellules. Les CPA sont, par conséquent, les uniques cellules exprimant à la fois les CMH de classe I et II. Elles ont également comme particularité la capacité à présenter des antigènes exogènes sur les CMH de classe I. Ce processus appelé présentation croisée est crucial pour l'activation d'un type de cellules de l'immunité adaptative, notamment les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (discuté plus bas) (Chaplin, 2010; Ito *et al.*, 2002; Murphy, 2022).

La liaison d'un PRR par son ligand au niveau d'une CPA mène à une succession d'évènements moléculaires, notamment (1) l'expression de molécules du CMH exposant des fragments antigéniques du pathogène à la surface cellulaire, (2) l'expression de molécules de costimulation (CD80, CD86 et CD40) et (3) la production de diverses cytokines, telles que l'interleukine-4 (IL-4) et l'IL-12. Ces trois caractéristiques représentent l'activation/maturation des CPA et constituent les trois signaux nécessaires à la présentation de l'antigène par ces dernières. Une fois activées/matures, les CPA migrent vers les organes lymphoïdes secondaires afin d'y présenter l'antigène aux cellules de l'immunité adaptative et par conséquent d'initier et moduler la réponse immunitaire. Dépendamment, entre autres, du PRR engagé, du ligand lié, de la force de liaison entre le PRR et son ligand, les CPA expriment des niveaux relatifs de molécules du CMH et de costimulation et produisent différentes cytokines. Ces variations au niveau de l'activation des CPA modulent la qualité et l'ampleur de la réponse immunitaire adaptative (Abbas *et al.*, 2011; Kashem *et al.*, 2017; Murphy, 2022).

### 1.2.2 Système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire adaptatif comprend deux types de cellules, les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT). Les LT peuvent à leur tour être divisés en 2 sous-populations distinctes, soit les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+ dépendamment des marqueurs extracellulaires qu'ils expriment (CD4 ou CD8). Le développement des lymphocytes B et T a lieu au niveau des organes lymphoïdes primaires. Une fois matures, ces lymphocytes dits naïfs (i.e. : n'ayant pas encore rencontré leur antigène spécifique) migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où est initiée la réponse immunitaire adaptative. Les cellules de l'immunité adaptative se différencient des effecteurs cellulaires de l'immunité innée par le biais de deux caractéristiques majeures et propres au système immunitaire adaptatif. La première caractéristique est la spécificité de reconnaissance d'un agent pathogène, laquelle est conférée par des récepteurs spécifiques à un antigène, exposés à la surface cellulaire, appelés *B Cell Receptor* (BCR) chez les LB et *T Cell Receptor* (TCR) chez les LT. L'ensemble des BCR et TCR d'un individu forme son pool antigénique (i.e. ensemble des antigènes contre lesquels il peut engendrer une réponse immunitaire adaptative). La seconde caractéristique, quant à elle, est la mémoire immunologique, soit la capacité à mettre en place une réponse immunitaire considérablement plus rapide et plus efficace lors d'une seconde exposition à un pathogène spécifique comparativement à la première rencontre (primo-infection) (Abbas *et al.*, 2011; Minervina *et al.*, 2019; Murphy, 2022). En effet, l'activation des lymphocytes suite à la rencontre de leur antigène spécifique s'accompagne d'une expansion clonale (i.e. une prolifération intensive de ces derniers menant à la production de clones cellulaires identiques à la cellule mère). Une partie de ces clones constitue les lymphocytes effecteurs, soit les lymphocytes activés procédant à l'élimination du pathogène. L'autre partie des clones constitue, quant à elle, les lymphocytes mémoires (i.e. des lymphocytes quiescents possédant une durée de vie plus longue comparativement aux lymphocytes effecteurs), lesquels peuvent rapidement être réactivés lors d'une infection ultérieure par ce même pathogène. Ainsi, comme l'indique son nom, le système immunitaire adaptatif s'adapte et évolue en fonction des agents pathogènes rencontrés dans son environnement (Abbas *et al.*, 2011; Minervina *et al.*, 2019; Murphy, 2022).

### 1.2.2.1 Présentation d'antigènes aux lymphocytes T par les CPA

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les CPA présentent l'antigène chargé sur des molécules du CMH aux LT naïfs ( $CD4^+$  et  $CD8^+$ ) ayant un TCR spécifique à cet antigène, initiant et façonnant ainsi leur activité. Comme mentionné plus tôt, la liaison entre les TCR et les complexes antigène:CMH constitue le premier signal nécessaire à l'activation des lymphocytes T et mène à la formation d'une synapse immunologique permettant l'interaction entre les deux cellules. Le second signal est conféré par la liaison des molécules de costimulation (CD80/CD86 et CD40) sur les CPA aux co-récepteurs CD28 et CD40L sur les LT. Finalement, le troisième et dernier signal est transmis par le biais de diverses cytokines sécrétées par les CPA (Abbas *et al.*, 2011; Murphy, 2022).

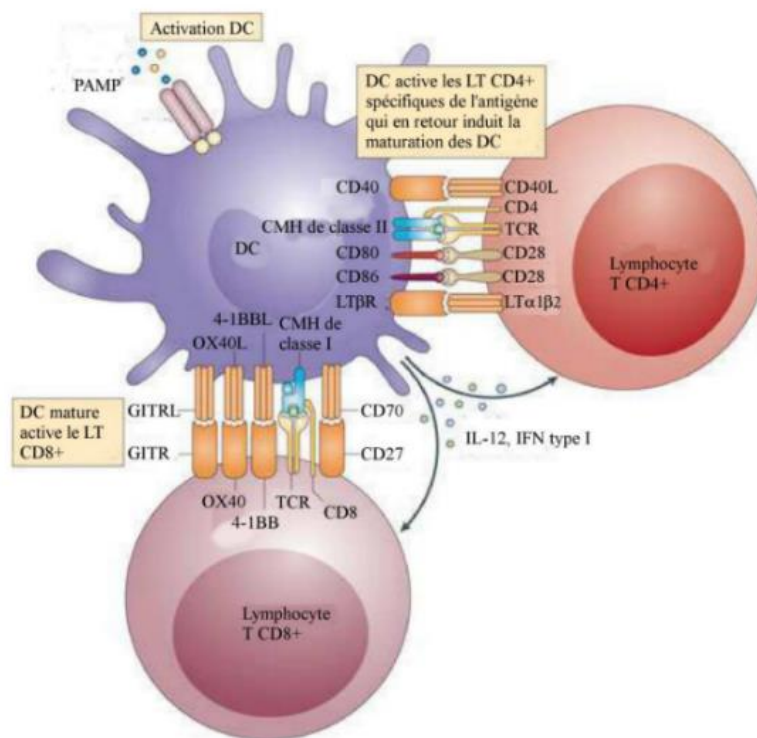


Figure 1.2 : Présentation d'antigènes aux lymphocytes T par les CPA. Les lymphocytes T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  nécessitent trois signaux pour leur activation. (1) La liaison des récepteurs de cellules T (TCR) aux complexes antigène:CMH des CPA; (2) la liaison des molécules de costimulation (CD80/CD86 et CD40) sur les CPA aux co-récepteurs (CD28 et CD40L) sur les lymphocytes T ; (3) la sécrétion de diverses cytokines. (Hua, 2014).

### 1.2.2.2 Lymphocytes T CD4+

Les LT CD4+ sont des cellules dites auxiliaires, c'est-à-dire qu'elles secrètent des cytokines afin d'initier et moduler l'activité des autres cellules du système immunitaire. La reconnaissance du complexe CMH de classe II:antigène par un lymphocyte T CD4+ engendre son activation, sa prolifération (expansion clonale) et sa différenciation en un sous-type cellulaire effecteur. En effet, la force et la durée du signal via le TCR, les cytokines sécrétées par les CPA ainsi que le type de CPA influent sur le phénotype de la cellule T CD4+ activé. Par exemple, la sécrétion d'IL-12 par les CPA induit la différenciation des cellules T CD4+ en lymphocytes *T helper 1* (Th1), tandis que la production d'IL-4 par les CPA mène à la différenciation des cellules T CD4+ en lymphocytes *T helper 2* (Th2). Ces différents sous-types de lymphocytes T CD4+ effecteurs ont différentes fonctions. En effet, les cellules Th1, via la sécrétion d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et d'IL-2, soutiennent la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire laquelle permet l'élimination d'agents pathogènes intracellulaires et est entreprise par les LT CD8+. Les cellules Th2, quant à elles, soutiennent la réponse immunitaire adaptative à médiation humorale via la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 laquelle permet principalement l'élimination d'agents pathogènes extracellulaires et est médiée par les lymphocytes B (Hilligan et Ronchese, 2020; Murphy, 2022; van Panhuys, 2016; Yoshimoto, 2018).

### 1.2.2.3 Lymphocytes T CD8+

Les LT CD8+ sont responsables de l'immunité adaptative à médiation cellulaire permettant l'élimination d'agents pathogènes intracellulaires (comme mentionné ci-haut). En effet, les lymphocytes T CD8+ sont des cellules dites cytotoxiques (i.e. ayant la capacité d'induire la mort de cellules infectées ou anormales via apoptose ou lyse cellulaire). La reconnaissance du complexe antigène:CMH de classe I sur les CPA ou les cellules infectées par des lymphocytes T CD8+ engendre leur activation. Néanmoins, afin d'éviter une dégradation tissulaire excessive, la formation d'une synapse immunologique avec les LT CD4+ auxiliaires, plus précisément avec les cellules Th1, ainsi que la présence de cytokines sécrétées par ces dernières (telle que l'IFN- $\gamma$ ) sont nécessaires pour l'expansion clonale des LT CD8+ activés. Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) effecteurs résultant de cette prolifération mènent à la destruction des cellules cibles via deux mécanismes principaux, soit la stimulation du récepteur de mort cellulaire Fas exprimé sur les cellules cibles à l'aide du récepteur FasL à la surface des CTL ainsi que le relargage de granules

composées de perforines et de granzymes. La perforine, étant une protéine cytolytique, s'oligomérisent au niveau de la membrane plasmique des cellules cibles et induit la formation de pores permettant un flux d'ions et d'eau conduisant ainsi à la lyse cellulaire. Les granzymes, quant à elles, sont des protéases qui entrent dans les cellules cibles à travers les pores formés par les perforines et induisent l'activité de caspases menant à l'apoptose cellulaire (Abbas *et al.*, 2011; Murphy, 2022); (Hassin *et al.*, 2011)).

#### 1.2.2.4 Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité adaptative à médiation humorale, laquelle est cruciale pour l'élimination d'agents pathogènes extracellulaires. Les lymphocytes B ont pour rôle la production et la sécrétion d'immunoglobulines (Ig), également appelées anticorps. Les immunoglobulines sont des protéines ayant une forme de Y et se composent de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères. Elles peuvent être séparées en deux régions distinctes, notamment la région de liaison à l'antigène (Fab – *fragment antigen-binding*) et la région cristallisable (Fc). Ces anticorps se retrouvent dans le plasma et le mucus. Ils ont pour fonction la neutralisation (*i.e.*: capacité à inhiber l'infectiosité et/ou pathogénicité d'un agent pathogène) et l'opsonisation (*i.e.*: capacité à recouvrir et favoriser la reconnaissance d'un agent pathogène et des cellules infectées par le système immunitaire) via leur liaison à des antigènes spécifiques. De plus, les immunoglobulines ont également la capacité d'être reconnues par des effecteurs de l'immunité innée et d'engendrer des mécanismes dits effecteurs contribuant à l'élimination de l'agent pathogène. En effet, lorsque la région Fab d'un anticorps est liée à un antigène, sa région Fc peut être reconnue par des protéines du système du complément. Ces protéines induisent une cascade du complément menant à la formation d'un complexe d'attaque membranaire et par conséquent à la lyse de la cellule ou du pathogène cible (CDC – *Complement-dependent cytotoxicity*). Les régions Fc peuvent également être reconnues par les macrophages et cellules NK à l'aide de récepteurs Fc (FcR), stimulant ainsi la phagocytose (ADCP – *antibody-dependant cell phagocytosis*) ou la cytotoxicité (ADCC – *antibody-dependant cell cytotoxicity*), respectivement (Abbas *et al.*, 2011; Murphy, 2022).

Les Igs peuvent être subdivisées en cinq classes (isotypes) en fonction de leur chaîne lourde. Les chaînes lourdes  $\delta$ ,  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ , et  $\epsilon$  correspondent respectivement aux immunoglobulines IgD, IgM,

IgG, IgA, et IgE. Il existe également des sous-classes d'IgG et d'IgA, notamment IgG1, 2, 3 et 4 chez l'humain (IgG1, 2a, 2b, 2c et 3 chez la souris) et IgA1 et IgA2 chez l'humain. Chaque lymphocyte B effecteur, appelé plasmocyte, ne sécrète qu'une seule classe d'anticorps. Les IgD et IgM sont les seules classes d'immunoglobulines retrouvées sous 2 formes distinctes. La forme membranaire qui sert de récepteur BCR et qui est donc essentielle à l'activation des lymphocytes B (Abbas *et al.*, 2011; Murphy, 2022). La forme sécrétée des IgM est connue pour être impliquée dans l'opsonisation et le mécanisme effecteur CDC, tandis que la forme sérique des IgD est associée à l'activation des basophiles et mastocytes. Les IgG, quant à eux, constituent la classe la plus abondante d'anticorps dans le sang et sont connus pour participer à la neutralisation et opsonisation des agents pathogènes ainsi qu'aux mécanismes effecteurs CDC, ADCC et ADCP. Les IgA se retrouvent plutôt dans les muqueuses et ont un rôle dans la neutralisation et l'opsonisation des pathogènes, empêchant ainsi l'infection des cellules de l'organisme hôte et conférant par conséquent un contrôle précoce de l'infection. Finalement, les IgE sont retrouvées dans le sérum, les muqueuses et la peau. Ils sont impliqués dans la neutralisation de parasites ainsi que dans la réponse inflammatoire, laquelle est généralement associée aux réactions allergiques (Abbas *et al.*, 2011; Chaplin, 2010; Collins, 2016; Murphy, 2022; Schroeder et Cavacini, 2010; Siracusa *et al.*, 2010).

Contrairement aux lymphocytes T, les lymphocytes B ne nécessitent pas une interaction directe avec les CPA afin d'induire leur activation et prolifération. En effet, les lymphocytes B ne requièrent pas la digestion préalable de l'antigène et sa présentation sur une molécule du CMH et peuvent reconnaître l'antigène sous sa forme native. Ils reconnaissent les antigènes directement sur l'agent pathogène ou lorsqu'ils sont captés de façon non spécifique à la surface de cellules dendritiques folliculaires ou encore lorsqu'ils diffusent sous forme soluble par drainage lymphatique (Abbas *et al.*, 2011; Murphy, 2022). Les lymphocytes B peuvent être activés selon deux voies distinctes, appelées thymo-dépendante et thymo-indépendante. Ces deux voies impliquent comme premier signal l'agglomération de nombreux BCR d'un lymphocyte B suite à la reconnaissance de plusieurs antigènes. La voie thymo-indépendante nécessite en guise de second signal l'activation d'un second récepteur immunitaire au niveau du lymphocyte B, notamment un PRR, afin d'initier l'activation et l'expansion clonale de cette cellule. La voie thymo-dépendante, quant à elle, requiert une interaction subséquente du lymphocyte B avec un lymphocyte T CD4+



auxiliaire préalablement sensibilisé au même antigène, plus particulièrement les Th2 (Abbas *et al.*, 2011; Murphy, 2022; Zinkernagel, 2003). En effet, les Th2 produisent et sécrètent des cytokines essentielles à la survie, prolifération et différenciation des lymphocytes B, telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-21 (Abbas *et al.*, 2011; Moens et Tangye, 2014; Murphy, 2022). Une fois activés, les lymphocytes B peuvent connaître trois devenir : (1) être des lymphocytes B mémoires, (2) se différencier en plasmocytes sécréteurs d'IgM de faible affinité afin d'engendrer une réponse immédiate contre les agents pathogènes; (3) établir un centre germinatif (CG). Au sein du CG, les lymphocytes B prolifèrent et subissent une hypermutation somatique (maturation d'affinité) augmentant l'affinité des anticorps pour leur antigène ainsi qu'une commutation isotypique permettant la substitution des isotypes d'Ig sécrétés (Abbas *et al.*, 2011; Moens et Tangye, 2014; Murphy, 2022). Cette commutation isotypique est modulée en fonction des cytokines produites principalement par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires. Par exemple, chez la souris, la production d'IL-4 et d'IL-5 par les cellules Th2 favorise la production d'IgG1 et d'IgE, tandis que la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 par les cellules Th1 favorise la production d'IgG2 et d'IgG3. Chez l'humain, la production d'IL-4 et d'IL-13 par les cellules Th2 favorise la production d'IgG1, IgG3, IgG4 et IgE, tandis que la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 par les cellules Th1 favorise la production d'IgG2. Les plasmocytes résultant de cette troisième voie produisent ainsi différentes classes d'anticorps de haute affinité permettant une réponse immunitaire plus efficace (Abbas *et al.*, 2011; Dessaint, 2004; Martinez *et al.*, 2005; Murphy, 2022; Snapper *et al.*, 1988; Wu, F. *et al.*, 2005).

Une telle séparation spatio-temporelle du système immunitaire constitue une simplification arbitraire essentielle à la compréhension des mécanismes impliqués dans la réponse immunitaire. Toutefois, cela n'empêche pas une importante interaction, coordination et collaboration entre les différents effecteurs des deux grandes classes immunitaires. En effet, l'immunité innée joue un rôle essentiel dans la modulation de la qualité et de l'ampleur de la réponse immunitaire adaptative. Ainsi, le fonctionnement finement orchestré du système immunitaire permet d'une part l'élimination spécifique des agents pathogènes et d'autre part l'établissement d'une mémoire immunologique (Abbas *et al.*, 2011; Murphy, 2022).

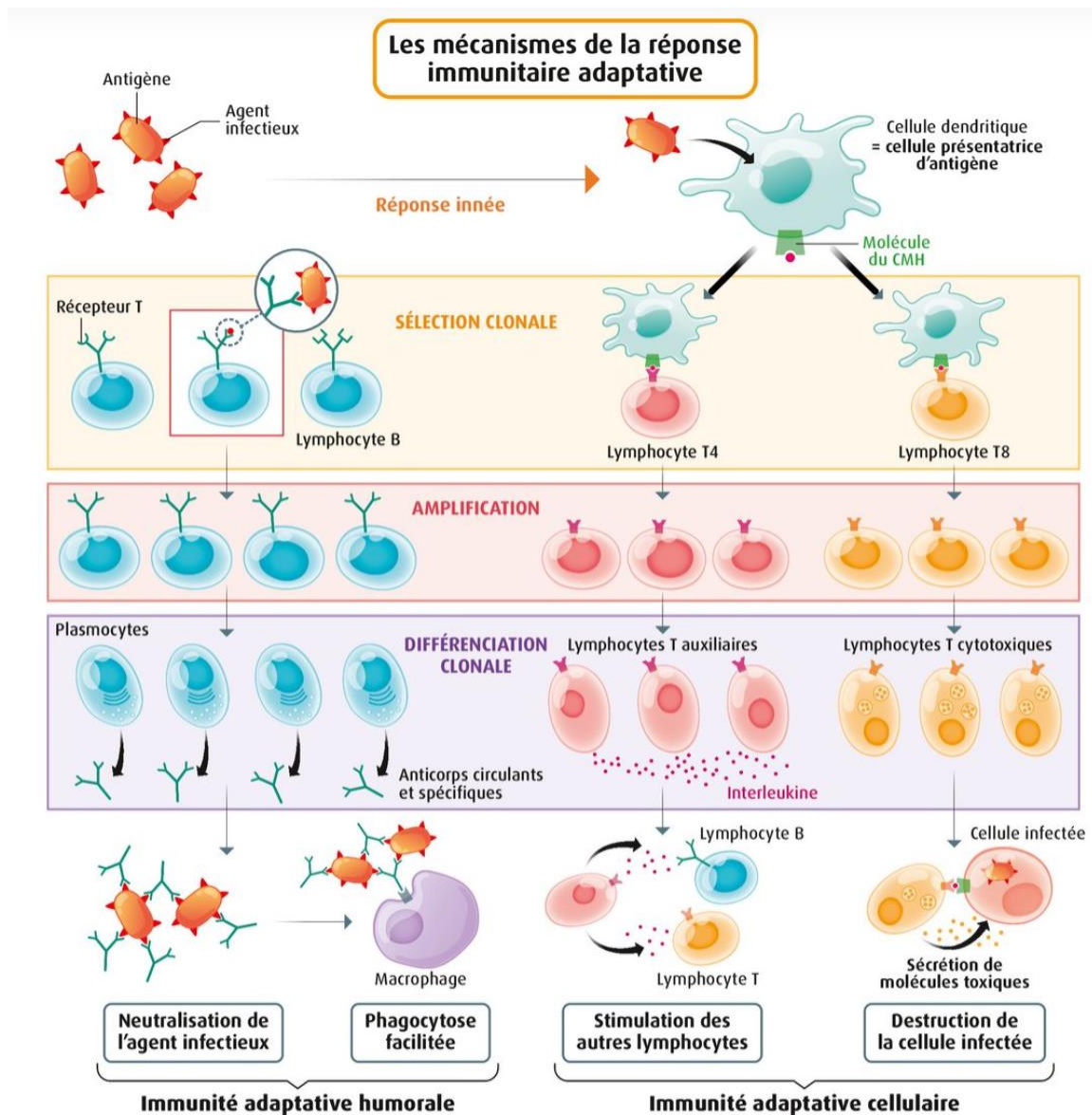


Figure 1.3 : Réponse immunitaire adaptative. Une fois activés de façon spécifique, les lymphocytes prolifèrent massivement (expansion ou amplification clonale). Une partie des clones constitue les lymphocytes mémoires et l'autre partie devient des lymphocytes effecteurs. Les lymphocytes T CD4+ sont des lymphocytes auxiliaires contribuant à l'activation des lymphocytes T CD8+ et lymphocytes B. Les lymphocytes T CD8+ sont responsables de la réponse adaptative cellulaire, ce sont des cellules cytotoxiques engendrant la mort des cellules infectées. Les lymphocytes B sont responsables de la réponse adaptative humorale. Ils produisent des anticorps sériques et muqueux permettant la neutralisation et l'opsonisation des agents pathogènes, favorisant ainsi les mécanismes effecteurs tels que l'ADCC, l'ADCP et la CDC. (Belin Éducation/Humensis SVT 1<sup>re</sup>, 2019)

### 1.3 Vaccination

L'établissement d'une mémoire immunologique spécifique à un antigène est à la base du concept de la vaccination. Le principe sous-jacent à la vaccination est l'administration de particules ou composantes d'un agent pathogène spécifique permettant l'induction volontaire d'une réponse immunitaire adaptative spécifique et par conséquent la mise en place d'une mémoire immunologique ciblée. Ceci vise à atténuer les symptômes cliniques associés à l'infection et à empêcher l'apparition de la maladie. Ainsi, la vaccination simule la primo-infection par un agent pathogène spécifique afin de conférer une protection efficace et relativement durable à un individu contre une exposition éventuelle à cet agent infectieux (Abbas *et al.*, 2011; Murphy, 2022).

#### 1.3.1 Vaccins traditionnels

Actuellement, la majorité des vaccins employés se composent d'organismes entiers, soit atténués ou inactivés. Ces derniers sont connotés de vaccins traditionnels. En effet, les vaccins contre la grippe, la polio, la tuberculose (BCG), la rougeole-oreillons-rubéole (RRO ou ROR), la varicelle, le zona et la fièvre jaune sont quasi exclusivement des vaccins traditionnels (Abbas *et al.*, 2011; Murphy, 2022; Pollard et Bijker, 2021).

Les vaccins dits atténués comportent des agents pathogènes dont la virulence est réduite afin de limiter leur capacité répliquative et donc empêcher une infection importante et les signes cliniques en découlant, mais tout en étant suffisante à l'induction d'une réponse immunitaire protectrice. La production de vaccins atténués est généralement entreprise par le biais d'une série de passages de l'agent pathogène dans des cellules appropriées et dans des conditions suboptimales permettant ainsi l'obtention de variants moins virulents chez l'humain. Néanmoins, ces variants peuvent subir des mutations, recombinaisons ou réassortiments génétiques leur conférant un regain de virulence chez l'individu vacciné, aboutissant ainsi à une réelle primo-infection pouvant être sévère et transmissible. Cela souligne les risques d'innocuité associés à ce type de vaccin (Abbas *et al.*, 2011; Ghattas *et al.*, 2021; Murphy, 2022). Les vaccins atténués comportent davantage de risques pour les individus ayant un système immunitaire moins compétent, notamment les personnes immunodéprimées, les personnes âgées et les enfants en bas âge (Baxter, 2007; Ghattas *et al.*, 2021).

Les vaccins dits inactivés se composent, quant à eux, d'agents pathogènes tués. Ils n'ont donc pas de capacité répliquative et constituent par conséquent une approche plus sûre comparativement aux vaccins atténués. L'inactivation des agents pathogènes peut être entreprise via des traitements physiques (chaleur, irradiations  $\gamma$  et expositions aux rayons UV) ou à l'aide de traitements chimiques (formaldéhyde, peroxyde d'hydrogène,  $\beta$ -propiolactone, dérivés d'éthylénimine, *etc*). Toutefois, ce type de vaccin ne stimule que faiblement le système immunitaire et nécessite par conséquent l'injection de doses élevées et/ou des doses de rappel ainsi que l'utilisation d'immunostimulants, appelés adjuvants (Ghattas *et al.*, 2021; Murphy, 2022). De plus, divers événements d'inactivation incomplète sont survenus antérieurement, notamment l'incident de Cutter en 1955 avec le vaccin antipoliomyélitique, révélant ainsi l'existence de certains risques liés à l'innocuité des vaccins inactivés (Day, 2009).

### 1.3.2 Vaccins de nouvelle génération

Des alternatives plus sûres aux vaccins traditionnels furent donc élaborées, notamment les vaccins sous-unitaires et les vaccins à base d'acides nucléiques. Contrairement aux vaccins traditionnels, ces vaccins de nouvelle génération ne se composent pas de l'organisme pathogène entier, mais seulement d'une ou plusieurs composantes moléculaires de ce dernier. Cette approche abolit tout risque associé à la capacité de réplication et d'infection de l'agent pathogène administré conférant, de ce fait, une innocuité inégalable. De plus, les vaccins de nouvelle génération constituent une formulation plus stable et requièrent des conditions d'entreposage et de distribution moins aliénantes comparativement aux vaccins traditionnels (Ghattas *et al.*, 2021; Murphy, 2022).

Les vaccins sous-unitaires sont composés d'une ou plusieurs sous-unités d'un agent pathogène spécifique, généralement de nature protéique, pouvant être ciblées par le système immunitaire adaptatif. Ces sous-unités sont appelées antigènes. Initialement, les antigènes vaccinaux étaient obtenus via la fragmentation d'agents pathogènes. Cela dit, pour des raisons sécuritaires et économiques, actuellement, les antigènes vaccinaux sont principalement produits par biotechnologie à l'aide de systèmes d'expression en culture cellulaire (cellules bactériennes, de levure, de mammifères, d'insectes ou de plantes). La synthèse chimique peut également être entreprise pour l'obtention d'antigènes vaccinaux (Chung *et al.*, 2022; Ghattas *et al.*, 2021; Murphy, 2022; Nemchinov *et al.*, 2000). Cette dernière approche est la plus sécuritaire étant donné qu'elle aboutit à la production de fractions hautement pures et limite grandement la possibilité de

contamination biologique. Néanmoins, c'est une méthode onéreuse (Robson, 2020). De nombreux vaccins sous-unitaires ont été approuvés pour leur utilisation chez l'humain et ce depuis une quarantaine d'années, tels que Recombivax-HB (*Merck*), Gardasil (*Merck*), Shingrix (*GSK*) et Flublok (*Protein Sciences Corporation*) contre le virus de l'hépatite B, le virus du papillome humain, le virus de la varicelle-zona, et le virus de l'influenza A (IAV), respectivement (Mukhopadhyay, 2010; Syed, 2018; Venters *et al.*, 2004; Zhai, L. et Tumban, 2016).

Quant à eux, les vaccins à acides nucléiques sont constitués de séquence d'acides désoxyribonucléiques (ADN) ou ribonucléiques (ARN) codants pour un antigène spécifique. Cette approche permet l'expression de l'antigène par les cellules de l'individu vacciné menant ainsi à une réponse immunitaire adaptative le ciblant. Comme pour les vaccins sous-unitaires, les vaccins à acides nucléiques sont également produits via synthèse chimique ou par le biais de biotechnologies (Ghattas *et al.*, 2021). Malgré d'importants progrès dans le domaine de la recherche sur les vaccins à acides nucléiques, le premier vaccin à ARN n'a été approuvé par la *food and drug administration* (FDA) que récemment, soit en 2020 dans le cadre de la pandémie du COVID-19 (Cominarty-Pfizer-BioNTech, SpikeVax-Moderna). Par ailleurs, ce vaccin a été accepté uniquement dans un contexte d'utilisation d'urgence (Banerji *et al.*, 2021; Gélinas *et al.*, 2020). En effet, divers défis et préoccupations sont liés à l'utilisation de vaccins à acides nucléiques. Les vaccins à ARN ont pour principal obstacle la nécessité d'une chaîne de froid pour leur conservation, soit - 80 °C pour un stockage prolongé et - 20 °C pour un stockage temporaire (Crommelin *et al.*, 2021). De plus, ils sont associés à un risque d'inflammation exacerbée (Ghattas *et al.*, 2021). De surcroît, des doutes au sujet de leur capacité à induire une mémoire immunologique durable chez l'humain ont été soulevés, ce qui pourrait entre autres expliquer leur faible efficacité démontrée par certaines études cliniques ainsi qu'au cours de la pandémie de COVID-19. (Lu *et al.*, 2008; Todorova *et al.*, 2017). De même, les inquiétudes associées aux vaccins à ADN comprennent, quant à eux, la persistance de l'ADN plasmidique sous forme extrachromosomique, son intégration aléatoire au sein du génome des cellules de l'individu vacciné ou encore la possibilité d'induire une réponse immunitaire ciblant un fragment d'ADN semblable au soi et ainsi développer une maladie auto-immune (G. Mor, 1997; Ghattas *et al.*, 2021).

Ainsi, les vaccins de nouvelle génération possèdent un excellent profil d'innocuité. Néanmoins, dans l'immédiat, l'utilisation de vaccins à base d'acides nucléiques reste limitée par les défis leur étant associés, lesquels découlent d'un manque de connaissances justifié par leur utilisation récente comparativement aux vaccins sous-unitaires. En effet, les premières études portant sur les vaccins à base d'acides nucléiques datent approximativement des années 1990 et ont abouti à un premier vaccin ARN en 2020, tandis que les études sur les vaccins sous-unitaires débutèrent vers les années 1960 et ont mené au premier vaccin recombinant en 1986 (Eckman, 1986; Ghattas *et al.*, 2021; Tauraso et O'Brien, 1970). Depuis lors, l'efficacité des vaccins sous-unitaires fut mise en évidence, et ce contre une grande variété d'agents pathogènes (Mukhopadhyay, 2010; Syed, 2018; Venters *et al.*, 2004; Zhai, L. et Tumban, 2016). De ce fait, dans l'immédiat, les vaccins sous-unitaires constituent l'approche idéale pour la formulation de nouveaux vaccins. Néanmoins, les vaccins sous-unitaires ne sont que faiblement immunogènes. Afin de contrer ce désavantage et d'augmenter leur immunogénicité, des plateformes de livraison vaccinale et/ou des adjuvants sont employés (Moyle et Toth, 2013; Vartak et Sucheck, 2016).

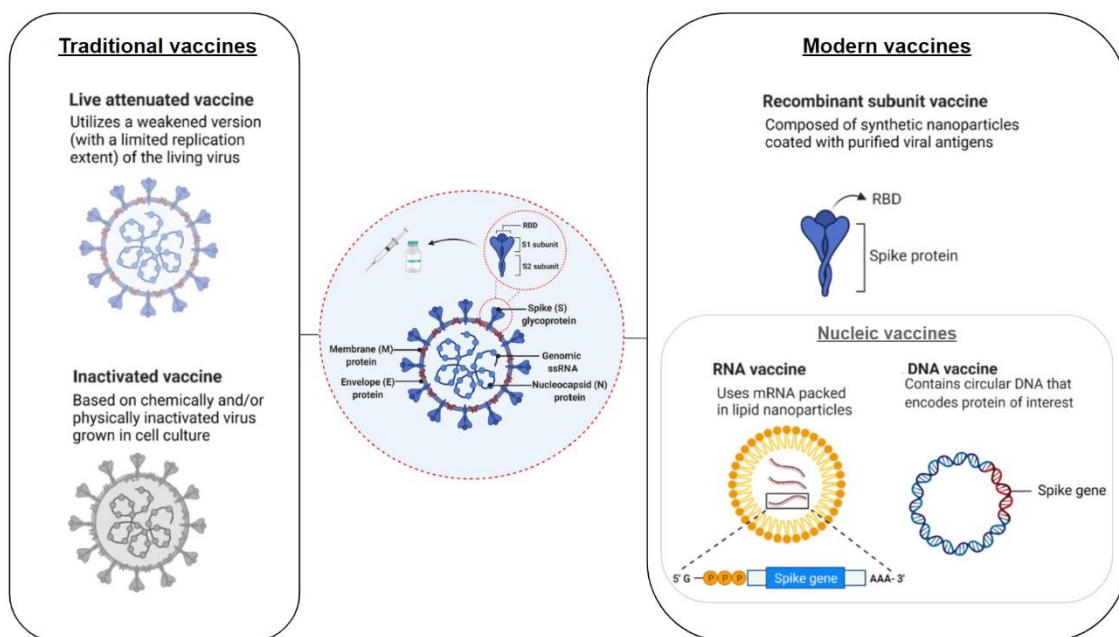


Figure 1.4 : Principaux types de vaccins. Les vaccins traditionnels se composent de l'agent pathogène entier soit atténué ou inactivé. Les vaccins de nouvelle génération, notamment les vaccins sous-unitaires et les vaccins à acides nucléiques, comportent une ou plusieurs molécules spécifiques de l'agent infectieux. Figure adaptée de (Al-Jighefee *et al.*, 2021).

### 1.3.2.1 Plateformes de livraison vaccinale

Les plateformes de livraison vaccinales sont des particules qui favorisent la livraison de l'antigène vaccinal aux cellules immunitaires. Elles augmentent l'immunogénicité des vaccins sous-unitaires en augmentant la stabilité des antigènes, en prolongeant leur temps de circulation et en favorisant leur drainage via le système lymphatique ainsi que leur internalisation par les CPA (Fehr *et al.*, 1997; Moyer *et al.*, 2016; Murphy, 2022; Taki et Smooker, 2015; Zhang, Y. N. *et al.*, 2019). En effet, les plateformes de livraison réduisent la dégradation des antigènes par les protéases extracellulaires, ce qui augmente leur stabilité et prolonge leur temps de circulation dans l'organisme (Moyer *et al.*, 2016; Murphy, 2022). De plus, les particules affichant des tailles de 20 à 200 nm diffusent par drainage lymphatique passif vers les organes lymphoïdes secondaires, où l'immunité adaptative est établie (Moyer *et al.*, 2016; Murphy, 2022; Taki et Smooker, 2015). L'accumulation et la rétention dans les organes lymphoïdes secondaires, allant de quelques jours à plusieurs semaines, ont également été démontrées pour les particules de cette taille, ce qui favorise l'induction d'une réponse immunitaire adaptative (Moyer *et al.*, 2016; Murphy, 2022; Taki et Smooker, 2015). À l'opposé, les molécules ayant une taille inférieure à 15 nm, tels que les antigènes protéiques solubles, diffusent dans le système vasculaire où elles sont rapidement éliminées. De surcroît, les particules allant de 20 à 200 nm favorisent l'internalisation des antigènes par les CPA (Moyer *et al.*, 2016; Murphy, 2022; Taki et Smooker, 2015). L'importante densité d'antigènes exposée par les plateformes de livraison vaccinale permet également aux CPA de présenter plusieurs copies d'un même antigène, contrairement aux antigènes solubles dont le nombre internalisé correspond au nombre de copies possibles à présenter. De même, la multimérisation des antigènes à la surface d'une plateforme de livraison permet l'engagement et la réticulation des BCR, laquelle est essentielle à l'activation des lymphocytes B. Ainsi, l'utilisation de plateforme de livraison dans le contexte de la vaccination permet d'engager efficacement une réponse immunitaire spécifique à l'antigène (Fehr *et al.*, 1997; Moyer *et al.*, 2016; Murphy, 2022; Taki et Smooker, 2015; Zhang, Y. N. *et al.*, 2019).

De nombreuses nanoparticules ont été développées en guise de plateforme de livraison vaccinale, notamment les nanoparticules inorganiques, polymériques, lipidiques ou encore protéiques/peptidiques (Taki et Smooker, 2015). Des systèmes nanoparticulaires plus complexes combinant différents nanomatériaux ont également été développés (Bernocchi, 2016). Néanmoins,

malgré leurs nombreux avantages, l'utilisation de nanoparticules inorganiques et polymériques est limitée par leur faible élimination et donc à leur biocompatibilité modérée et leur toxicité relative (Taki et Smooker, 2015). De même, l'utilisation de nanoparticules lipidiques est limitée par leur stabilité modérée, leur faible capacité d'encapsulation liée à une élasticité modérée ainsi qu'une libération relativement précoce des principes actifs (Pinto-Alphandary *et al.*, 2000). Les nanoparticules protéiques/peptidiques, quant à elles, connaissent un intérêt croissant en tant que plateforme de livraison vaccinale, étant donné leurs biocompatibilité, stabilité, versatilité, multivalence et spécificité moléculaire (Li, F. *et al.*, 2010; Zottig, X., 2020; Zottig, X. et 2021)

#### 1.3.2.1.1 Nanoparticules à base de protéines et peptides d'auto-assemblage

Plus particulièrement, les nanoparticules protéiques/peptidiques sont très prometteuses en guise de plateforme de livraison vaccinale. En effet, la synthèse de ces protéines/peptides et leurs propriétés d'auto-assemblage permettent de contrôler la taille, la forme, la charge de surface, l'hydrophobicité et la densité de chargement au niveau de l'architecture supramoléculaire finale. Ceci confère une polyvalence structurale et fonctionnelle. De surcroît, de par leur taille nanométrique, leur nature protéique et leur affichage répétitif des antigènes, ces nanoassemblages permettent d'imiter la morphologie de nombreux agents infectieux (Zottig, X., 2020; Zottig, X. et 2021)

Les protéiques/peptidiques ayant la capacité d'auto-assemblage sont des unités monomériques s'associant de façon spontanée dans des conditions données via des interactions non covalentes intra et intermoléculaires entre les chaînes latérales d'acides aminés et le squelette peptidique amidé. Ces interactions faibles comprennent des liaisons hydrogènes, des interactions aromatiques ( $\pi$ - $\pi$  et cation- $\pi$ ), hydrophobes, électrostatiques et des forces de van der Waals. Ce qui mène à la formation d'assemblages supramoléculaires stables et ordonnés avec une structure définie. Ces nanoassemblages se composent d'une quantité variable d'unités monomériques, allant d'une dizaine à plusieurs milliers de monomères (Wang *et al.*, 2019; Zottig, X., 2020; Zottig, X. et 2021).



Les nanoassemblages protéiques principalement étudiés en tant que plateforme de livraison vaccinale comprennent les nanostructures sphériques dont la ferritine et les *virus like particle* (VLP) ainsi que les nanoassemblages fibrillaires de type amyloïde (Nguyen, Q. D. *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2021; Roldão *et al.*, 2010; Vu *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2013; Zottig, X. *et al.*, 2021). En outre, plusieurs études ont montré que des protéines de ferritine fonctionnalisées avec des antigènes viraux s’auto-assemblent en nanocages sphériques octaédriques de 24 sous-unités exposant à leur surface les antigènes. Ces nanocages ont engendré une protection dans le cadre d’infections expérimentales contre l’influenza, le virus Epstein-Barr et le SARS-CoV2 (Kanekiyo *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2021). De plus, des nanoassemblages de ferritine fonctionnalisés avec l’antigène S du virus SARS-CoV-2 (SpFN) sont en cours d’essais cliniques de phase 1 (Rodrigues *et al.*, 2021; Vu *et al.*, 2021). D’innombrables études ont également démontré la capacité de certaines protéines de capsid virale à s’auto-assembler en nanostructures ayant des tailles et formes diverses, appelées VLP (Roldão *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2013). Ces protéines constituent à la fois la plateforme de livraison et l’antigène cible dans une formulation vaccinale. De plus, elles peuvent également être fonctionnalisées avec un autre antigène permettant ainsi la formulation de vaccins hétérologues. De surcroît, les VLP peuvent également servir à encapsuler des adjuvants. Des vaccins à base de VLP ont été approuvés par la FDA en 2006, notamment le vaccin Recombivax® et Gardasil®, lesquels sont constitués de l’antigène HbsAG du virus de l’hépatite B et de la protéine de capsid L1 du virus du papillome humain (VPH), respectivement (Roldão *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2013).

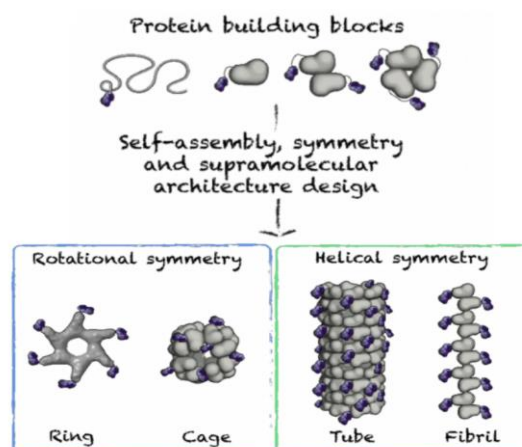


Figure 1.5 : Nanoparticules protéiques/peptidiques ayant la capacité d’auto-assemblage. La synthèse et les propriétés d’auto-assemblages des protéines/peptides d’auto-assemblage confère une polyvalence structurelle et fonctionnelle. (Zottig, X., 2020).

#### 1.3.2.1.1.1 Nanofilaments en feuillets $\beta$ -croisés

Les nanofilaments de type amyloïde englobent un ensemble de protéines et de peptides ayant la capacité de s'auto-assembler en structure supramoléculaire ayant une forme filamenteuse et une organisation quaternaire en feuillets- $\beta$ -croisés. Le processus de formation des fibres amyloïdes, appelé polymérisation nucléée, implique 3 phases distinctes; (1) la phase de latence, (2) la phase d'élongation et (3) la phase de plateau. Au cours de la phase de latence, les protéines/peptides monomériques dépliés ou partiellement dépliés interagissent ensemble de façon à former des noyaux oligomériques compétents, un phénomène thermodynamiquement défavorable nommé la nucléation primaire. S'ensuit la phase d'élongation (ou exponentielle) au cours de laquelle des monomères, ou oligomères, s'ajoutent aux extrémités des noyaux compétents aboutissant ainsi à la formation de protofilaments. Ces derniers interagissent ensemble pour former des fibres. La surface des fibres formées peut catalyser la formation de nouveaux noyaux compétents. De plus, les fibres formées peuvent subir une fragmentation, ce qui augmente le nombre d'extrémités nécessaires au recrutement de monomère et oligomères. De ce fait, au cours de la phase d'élongation, la cinétique d'assemblage des fibres s'accélère via un mécanisme de rétroaction positive appelé nucléation secondaire. Finalement, la phase de plateau représente l'atteinte d'un équilibre, où la quasi-totalité des monomères ont été convertis en fibres (Cheon *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2015; Gillam et MacPhee, 2013; Zottig, X. et 2021). Un second modèle appelé «conversion conformationnelle nucléée» fut introduit plus récemment afin de concorder à certaines observations expérimentales. Dans ce dernier, les monomères se convertissent en oligomères mal repliés et hautement désorganisés distincts des noyaux. Ces agrégats se réorganisent ultérieurement et d'autres oligomères désorganisés s'y ajoutent, lesquels se réorganiseront subséquemment pour former des fibres. Ces deux modèles du processus de formation des fibres amyloïdes ne sont pas mutuellement exclusifs (Cheon *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2015; Gillam et MacPhee, 2013).

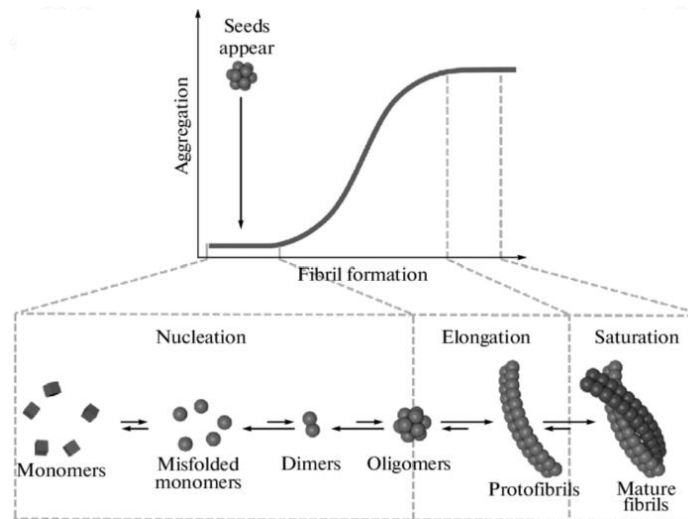


Figure 1.6 : Schématisation de la formation de fibres en feuillets- $\beta$ -croisés. La formation des fibres implique trois phases distinctes : (1) la phase de latence ou nucléation, (2) la phase d'élongation ou exponentielle et (3) la phase de plateau ou de saturation. (Kulikova *et al.*, 2015)

Dans le contexte de la vaccination, les fibres ayant une structure quaternaire en feuillets- $\beta$ -croisés peuvent faire office d'une part de plateforme de livraison vaccinale et d'autre part de potentialisateur immunitaire (Hudalla *et al.*, 2013; Nguyen, Q. D. *et al.*, 2021; Zottig, X. et 2021). En effet, les fibres amyloïdes possèdent une haute résistance à la dénaturation thermique, chimique et enzymatique, constituant ainsi une plateforme de livraison vaccinale ayant une stabilité améliorée (Epstein et Chapman, 2008; Maddelein, 2002; van den Heuvel *et al.*, 2011; Zottig, X. et 2021). De plus, des études ont montré la capacité de nombreux peptides et protéines de type amyloïdogéniques à être fonctionnalisés avec des antigènes viraux et à s'assembler en fibres exposant ces antigènes à leur surface, notamment les peptides IAPP20-29 ou I<sub>10</sub> (SNNFGAILSS), Q11 (QQKFQFQFEQQ) et KFE8 (FKFEFKFE) (Karan *et al.*, 2021; Nguyen, Q. D. *et al.*, 2021; Van Gerven *et al.*, 2011; Zottig, X. et 2021). Certaines de ces études ont également révélé le potentiel de ces fibres à stimuler un récepteur PRR transmembranaire de l'immunité innée, soit le TLR2 (Cheng *et al.*, 2008; Zottig, X. et 2021). Cela favorise l'internalisation de la formulation vaccinale par les CPA, l'activation et la maturation de ces dernières ainsi que l'induction directe et indirecte de la réponse immunitaire innée et adaptative (Abbas *et al.*, 2011; Medzhitov, 2001; Murphy, 2022). Par ailleurs, la capacité des fibres ayant une structure en feuillets- $\beta$ -croisés à

améliorer la réponse immunitaire spécifique à un antigène a indubitablement été démontrée pour une diversité d'agents pathogènes, tels que l'influenza, le VIH, le SARS-COV, le virus du Nil, le VPH, la tuberculose et le parasite de la malaria (Chesson, Charles B *et al.*, 2018; Friedrich *et al.*, 2016; Fries *et al.*, 2021; Morales, 2022; Pimentel *et al.*, 2009; Rudra, Mishra, *et al.*, 2012; Wang, Qimin *et al.*, 2020; Zottig, X. et 2021). Ainsi, les nanofilaments de type amyloïde sont très prometteurs dans le cadre des vaccins sous-unitaires. Néanmoins, dans l'immédiat, leur utilisation au niveau d'essai clinique reste limitée en raison de préoccupations liées à leur potentielle toxicité/pathogénicité et ce, malgré les nombreuses études récentes associant cette toxicité aux espèces oligomériques intermédiaires produites au cours de leur formation et non aux fibres directement (Glabe et Kaye, 2006; Habibi *et al.*, 2016; Schlamadinger et Miranker, 2014; Zottig, X. et 2021).

### 1.3.2.2 Adjuvants

Les adjuvants sont des molécules immunostimulantes ayant la capacité d'améliorer la réponse immunitaire spécifique à un antigène, en l'accéléralant, la prolongeant ou en l'augmentant et ce, sans présenter d'activité antigénique propre. L'emploi d'adjuvants en vaccination apporte également d'autres avantages, notamment une efficacité accrue du vaccin chez les personnes immunodéprimées, une réduction de la dose d'antigène, une diminution du nombre d'immunisations nécessaires à l'atteinte d'une immunité protectrice ainsi qu'un potentiel de protection contre une grande diversité d'agents pathogènes via l'élargissement de la réponse immunitaire (Kumar *et al.*, 2019; Luchner, Marina *et al.*, 2021; Sato-Kaneko *et al.*, 2020).

Les sels d'aluminium (hydroxyde d'aluminium, phosphate d'aluminium, *etc*) ont été les premiers adjuvants découverts en 1920 et ont longtemps été les seuls approuvés à des fins commerciales, soit de 1932 à 1997. Ils ont été utilisés pour des vaccins ciblant divers agents pathogènes. Subséquemment, les adjuvants à base d'émulsions d'huile dans de l'eau contenant du squalène, notamment MF59 et AS03, ont été approuvés en 1997 et 2009, respectivement. Ces derniers ont principalement été utilisés pour les vaccins antigrippaux (Mbow *et al.*, 2010; Pasquale *et al.*, 2015; Pulendran *et al.*, 2021). Malgré leur importance, les sels d'aluminium et les émulsions huile-dans-eau ont été développés de façon empirique et leurs mécanismes d'action ne sont que partiellement élucidés (Mbow *et al.*, 2010; Pulendran *et al.*, 2021; Wilkins *et al.*, 2017). Par ailleurs, des études tendent à montrer que l'inflammation et le recrutement de cellules immunitaires induits

par ces adjuvants sont en partie dus aux dommages tissulaires qu'ils causent et donc à leur toxicité (Kool *et al.*, 2008; Pulendran *et al.*, 2021). De plus, ces adjuvants ne permettent pas, ou que peu, l'induction d'une réponse immunitaire à médiation Th1, laquelle est cruciale à l'élimination d'agents pathogènes intracellulaires tels que les virus (Abbas *et al.*, 2011; Murphy, 2022); (Sato-Kaneko *et al.*, 2020). Ainsi, l'élaboration de nouvelles technologies adjuvantes plus efficaces et sécuritaires s'est avérée être nécessaire.

#### 1.3.2.2.1 Agonistes TLR

La découverte des TLR en 1996 suscita un intérêt croissant pour l'utilisation d'agonistes TLR en guise d'adjuvants vaccinaux (Chang, 2008). En effet, les PRR, dont les TLR, sont essentiels à l'induction de l'immunité innée et constituent un lien clé entre l'immunité innée et adaptative. Ils possèdent donc un rôle déterminant au niveau de la qualité et de l'ampleur de la réponse immunitaire adaptative et par conséquent au niveau de l'établissement d'une mémoire immunologique protectrice (Abbas *et al.*, 2011; Luchner, Marina *et al.*, 2021; Manicassamy et Pulendran, 2009; Murphy, 2022). Ainsi, l'utilisation d'agonistes TLR en tant qu'adjuvants confère la capacité à moduler quantitativement et qualitativement la réponse immunitaire spécifique à un antigène (Manicassamy et Pulendran, 2009). De plus, la présence d'un agoniste TLR de la membrane plasmique au sein d'une formulation vaccinale favorise l'internalisation de la préparation antigénique par les CPA ainsi que l'activation et la maturation de ces dernières. De surcroît, comme mentionné plus tôt, l'engagement des BCR et des PRR au niveau des lymphocytes B permet leur activation via la voie thymo-indépendante (Abbas *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2019; Murphy, 2022). Ainsi, l'utilisation d'agonistes TLR en guise d'adjuvant constitue une approche prometteuse dans le cadre de la vaccination (Luchner, Marina *et al.*, 2021; Manicassamy et Pulendran, 2009).

Le premier TLR découvert est le TLR4. Cela permit le développement du premier adjuvant vaccinal ciblant les TLR, notamment le lipide A monophosphorylé (MPL ou MPLA) dérivé du lipide A du lipopolysaccharide bactérien (LPS), un agoniste du TLR4 (Chang, 2008; Luchner, Marina *et al.*, 2021). Le MPLA, combiné à des sels d'aluminium ou à de la saponine, a conduit à l'élaboration d'adjuvants commerciaux acceptés par la FDA en 2009 et 2017, soit l'AS04 et AS01 B, respectivement (Luchner, Marina *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2019; Vacchelli *et al.*, 2012). Les adjuvants à base d'agoniste TLR4 ont démontré leur efficacité et innocuité dans le cadre de

nombreux vaccins ciblant une variété d'agents pathogènes, tels que le VPH, le virus de l'hépatite B, le virus varicelle-zona et le parasite de la malaria (Gumulira, 2021; Kundi, 2007; Sato-Kaneko *et al.*, 2020). Dès lors, diverses molécules agonistes du TLR4 furent développées et leur capacité adjuvante fut évaluée, notamment le glycolipide CCL-34, le lipide glucopyranosyl (GLA-SE) et les aminoalkyl glucosaminide 4-phosphates (AGP) (Cauwelaert *et al.*, 2016; Chou *et al.*, 2020; Evans *et al.*, 2003). De nombreux autres agonistes TLR ont également été étudiés et ont montré leur potentiel en guise d'adjuvant. Notamment, les lipopeptides synthétiques tri et diacylés Pam3CSK4 et Pam2CSK4 qui activent respectivement les hétérodimères TLR2/TLR1 et TLR2/TLR6 (Halliday *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2022). Diverses constructions de la flagelline sous différentes formes et issue de différents organismes, ont également été étudiées pour leur activité d'agoniste TLR5 (Cui *et al.*, 2018). De même, l'acide polyinosinic:polycytidylic (poly I:C) et ses dérivés tels que le poly(IC12U) et l'ARNAX, étant des analogues synthétiques de l'ARN double brin, ont été étudié pour leur capacité à stimuler le TLR3 (Luchner, Marina *et al.*, 2021; Takeda *et al.*, 2018). Les composés d'imidazoquinolines (IMQ), tel que l'imiquimod, le resiquimod et le gardiquimod, étant des analogues nucléosidiques, ont aussi été étudiés pour leur activité d'agoniste TLR7 et TLR8 (Goyal *et al.*, 2021; Luchner, Marina *et al.*, 2021). Finalement, les courtes molécules synthétiques d'ADN simple brin contenant des motifs CpG et étant non méthylées ont également été étudiées en tant qu'adjuvant pour leur activation du TLR9. Par ailleurs, un vaccin ciblant le SARS-COV2 (Covaxin) comportant un composé d'imidazoquinolines en guise d'adjuvant fut récemment accepté par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en fin 2021 (Vikkurthi *et al.*, 2022). De même, le CpG 1018 fut approuvé par la FDA en 2017 en tant qu'adjuvant pour le vaccin contre l'Hépatite B (Hepilisav-B). De plus, le CpG 7909 est employé dans un vaccin contre le virus de l'hépatite B présentement évalué dans un essai clinique de phase I (Lee, G.-H. et Lim, S.-G., 2021; Luchner, Marina *et al.*, 2021).

Néanmoins, l'utilisation d'agonistes TLR solubles dans la vaccination peut être limitée par leur clairance rapide, leur faible stabilité, une inflammation hors cible et/ou par le fait qu'ils doivent être transportés avec l'antigène vers les CPA. Afin de contrer ces désavantages, il est possible de fonctionnaliser les agonistes TLR sur une plateforme de livraison vaccinale (Fujita et Taguchi, 2012; Ignacio, Bob J *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018; Xu et Moyle, 2017).

## 1.4 Virus de l'influenza

La grippe est une maladie infectieuse causée par le virus influenza. Les symptômes grippaux sont généralement légers et comprennent de la fièvre, des maux de tête, des maux de gorge, de la toux, des douleurs musculaires et de la fatigue (Eccles, 2005; Vabret *et al.*, 2010). Lorsque l'infection est moindrement contrôlée chez un individu, le virus peut se disséminer dans l'organisme et induire une forte réponse inflammatoire. Ceci aboutit à des cas grippaux plus sévères pouvant évoluer vers une pneumonie, un syndrome de détresse respiratoire aiguë, une méningite, une encéphalite ou une encéphalomyélite aiguë disséminée. Ces complications peuvent ultimement mener à la mort de l'individu (Kalil et Thomas, 2019; Vabret *et al.*, 2010). Au cours d'une année, l'incidence du virus de la grippe varie entre 5% et 20% et jusqu'à 5 millions de cas sévères sont recensés, causant près d'un demi-million de décès chaque année selon l'OMS (Clayville, 2011; Krammer *et al.*, 2018; Tokars *et al.*, 2017).. Ces décès surviennent principalement au niveau des groupes à haut risque, notamment les enfants en bas âge, les personnes souffrant de maladies chroniques et les personnes âgées (Clayville, 2011; Krammer *et al.*, 2018; Meier *et al.*, 2000; Paget *et al.*, 2019).

### 1.4.1 Types d'influenza

Le virus de la grippe peut être séparé en quatre types ou genres; les alpha-influenza, les bêta-influenza, les gamma-influenza et les delta-influenza ou respectivement virus de la l'influenza A (IAV), B (IBV), C (ICV) et D (IDV). Les IAV possèdent un large éventail d'hôtes, notamment les oiseaux, certains mammifères marins tels que les dauphins et les baleines, ainsi que différents mammifères terrestres, dont les espèces humaines, canines, félines, porcines, équines et chiroptères (Amiel, 2010; Asha et Kumar, 2019; Devi et Sarala, 2021; DU CHAPITRE, 2021; Gonzalez *et al.*, 2014). Les IBV ont pour hôte principal l'humain, mais peuvent également infecter les porcs, les chiens, les chevaux et les phoques (Asha et Kumar, 2019; Devi et Sarala, 2021). Les ICV, quant à eux, peuvent infecter l'humain, les chiens et les porcs. Finalement les IDV infectent les bovins, les porcs, les chèvres, et les buffles (Asha et Kumar, 2019; Devi et Sarala, 2021; Zhai, S. L. *et al.*, 2017). Aucun virus de la grippe D n'a été détecté dans des isolats cliniques humains. Les IAV, IBV et ICV provoquent les épidémies saisonnières. Cela dit, seuls les virus de la grippe A sont responsables de l'ensemble des pandémies grippales étant survenues à ce jour. En effet, en partie en raison de leur large spectre d'hôtes, les virus de la grippe A subissent d'importantes variations

antigéniques pouvant mener à l'émergence et réémergence de virus grippaux suffisamment différents pour échapper au système immunitaire d'un individu sensibilisé. Par ailleurs, les IAV peuvent être subdivisés en différentes souches dépendamment de leurs sous-types de protéines antigéniques hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA). À ce jour, 18 sous-types de HA (H1-H18) et 11 sous-types de NA (N1-N11) ont été identifiés, offrant ainsi une multitude de combinaisons et donc de souches émergentes et réémergentes possibles. Contrairement aux IAV, les IBV et IDV sont subdivisés en seulement 2 lignées (B/Victoria et B/Yamagata ; D/Yamagata et D/Oklahoma), tandis que les ICV sont sous-classés en 6 lignées (C/Taylor, C/Mississippi, C/Aichi, C/Yamagata, C/Kanagawa et C/Sao Paulo)(Devi et Sarala, 2021; Francis *et al.*, 2019; Matsuzaki *et al.*, 2016).

#### 1.4.2 Génomique

Les virus de la grippe font partie de la famille des *Orthomyxoviridae*. Ce sont donc des virus enveloppés ayant un génome segmenté d'ARN monocaténaire de sens négatif. Les IAV et IBV ont 8 segments génomiques codants pour 10 protéines principales, tandis que les ICV et IDV ont 7 segments codants pour 9 protéines majeures. Trois de ces segments codent pour trois sous-unités distinctes du complexe d'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp), soit la sous-unité PB1, une transcriptase, la sous-unité PB2, qui reconnaît les coiffes en 5' et la sous-unité PA (P3 pour les ICV et IDV), une endonucléase. Un quatrième segment code pour la nucléoprotéine (NP) virale. Les protéines matricielles M1 et M2 sont, quant à elles, codées par un unique segment. De même, les protéines non structurales NS1 et NS2 (également appelé protéine d'exportation nucléaire NEP) sont codées par un segment. Finalement, les IAV et IBV possèdent 2 segments distincts codants pour l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). Les ICV et IDV, pour leur part, possèdent un unique segment codant pour une protéine de fusion hémagglutinine-estérase (HEF) ayant les fonctions de HA et NA (Devi et Sarala, 2021; Francis *et al.*, 2019; Matsuzaki *et al.*, 2016; Samji, 2009). D'autres protéines accessoires peuvent également être exprimées à l'aide de cadres de lecture ouverts ou par épissage, telles que les protéines PB1-F2, PB1-N40, PA-X et PA-N (Muramoto *et al.*, 2013).



### 1.4.3 Morphologie

Les virions du virus de la grippe sont pléomorphes, ils peuvent se présenter sous forme sphérique (ou ellipsoïdale) ou filamenteuse. Généralement, les particules virales ont un diamètre d'environ 100 nm, soit 100 nm à 120 nm pour les particules sphériques et 80 nm à 100 nm pour les particules filamenteuses. Ces dernières ont une longueur très variable allant de nanomètres à micromètres (Devi et Sarala, 2021; Nakatsu *et al.*, 2018). L'enveloppe virale consiste en une membrane à bicouche lipidique au sein de laquelle sont ancrés des pics glycoprotéiques s'étendant vers l'extérieur à partir de la surface de l'enveloppe, notamment les glycoprotéines HA et NA (ou HEF). Environ 500 spicules sont projetés à la surface des virions avec des densités de surface variables, interposant de façon irrégulière les glycoprotéines HA et NA (ou HEF) avec un rapport de 5:1 (HA:NA). La protéine M2 est également ancrée à la surface de l'enveloppe lipidique des particules virales. Cette enveloppe virale renferme les nucléocapsides, soit la capsid virale composée de la protéine matricielle M1 ainsi que les complexes ribonucléoprotéiques (RNP). Un complexe RNP se compose d'un segment génomique associé à une copie de RdRp (PB1, PB2 et PA) et lié par de nombreuses NP protégeant le génome viral des nucléases cellulaires (Devi et Sarala, 2021) (Samji, 2009). De faibles quantités de protéines non structurales, NS1 et NS2, sont également retrouvées au sein des virions grippaux (CHEUNG et POON, 2007; Pleschka, 2013; Richardson et Akkina, 1991).

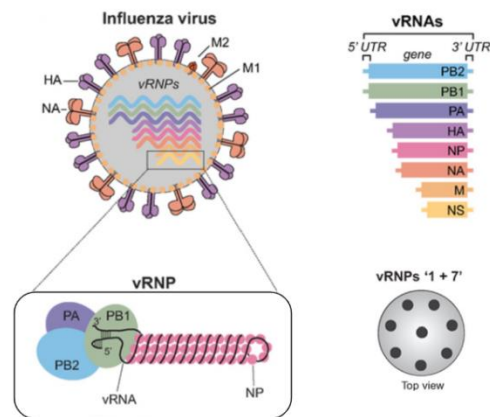


Figure 1.7 : Génomique et morphologie du virus influenza A. Les IAV possèdent 8 segments génomiques. Les protéines HA, NA et M2 sont ancrées dans l'enveloppe virale. Cette enveloppe renferme la nucléocapside virale, qui se compose de la protéine M1 en guise de capsid et de complexes ribonucléoprotéiques (RNP). Un complexe RNP consiste en un segment génomique associé à une copie de RdRp (PB1, PB2 et PA) et lié par de nombreuses nucléoprotéines (NP). (Dou, Dan *et al.*, 2018).

#### 1.4.4 Cycle de réplication

Suite à l'entrée du virus de la grippe dans les voies respiratoires, la glycoprotéine HA exposée à la surface de l'enveloppe virale interagit avec l'acide sialique situé à la surface membranaire des cellules épithéliales de l'organisme hôte, ce qui permet au virus de se fixer aux cellules cibles. Cet attachement induit alors l'endocytose du virus par les cellules permissives. À mesure que l'endosome progresse au sein de la cellule hôte, son pH diminue en raison de l'activité de l'ATPase vacuolaire (Akole et Warner, 2019; Pleschka, 2013; Samji, 2009; Watanabe *et al.*, 2010). L'acidification de l'endosome induit alors un changement conformationnel au niveau de la protéine HA, initiant ainsi la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale. Simultanément, les ions hydrogènes diffusent dans le virion à travers les canaux ioniques M2, perturbant ainsi les interactions protéines-protéines et résultant en la libération du matériel génétique viral (complexes RNP) dans le cytosol de la cellule hôte. Subséquemment, les RNP, ayant des signaux de localisation nucléaire (NLS), sont importées au sein du noyau à l'aide de la machinerie d'importation nucléaire cellulaire. Au sein du noyau, la RdRp s'empare des coiffes en 5' des ARNm cellulaires afin d'amorcer la synthèse de l'ARNm viral en utilisant l'ARN génomique de sens négatif comme matrice. Ce phénomène, appelé *cap snatching*, permet la transcription de l'ARNm viral, son transport vers le cytoplasme ainsi que sa traduction par les ribosomes de l'hôte (Li, L. *et al.*, 2020; Pleschka, 2013; Samji, 2009). Dans le noyau, la RdRp entreprend également la réplication du matériel génétique du virus en utilisant les ARNm nouvellement formés comme matrices afin de synthétiser des copies du génome viral de sens négatif. Les protéines virales nouvellement synthétisées (dont les sous-unités de la RdRp et les protéines NP) sont importées dans le noyau afin, d'une part, augmenter le taux de transcription et réplication virale, et d'autre part, permettre la formation des RNP (Dou, D. *et al.*, 2018; Pleschka, 2013; Samji, 2009). À l'aide des protéines NS2 (ou NEP) et M1, les RNP sont exportées du noyau vers le cytosol de la cellule. Simultanément, les glycoprotéines HA et NA nouvellement synthétisées migrent vers la membrane plasmique apicale où elles s'insèrent. L'apposition et l'accumulation ultérieure des protéines M1 et M2 au niveau de cette région membranaire remaniée permettent le recrutement de la nucléocapside, finalisant ainsi l'assemblage des composantes virales. Les virions subissent ensuite une maturation et acquièrent leur enveloppe virale à mesure qu'ils bourgeonnent à travers la membrane plasmique pour sortir de la cellule hôte (Buisson *et al.*, 2007; Pleschka, 2013; Samji, 2009). À la fin du bourgeonnement, les protéines HA de l'enveloppe

virale demeurent attachées à l'acide sialique situé à la surface cellulaire. Finalement, l'activité enzymatique des protéines NA permet le clivage protéolytique des acides sialiques et donc la libération des virions à partir de la cellule hôte infectée (Dou, D. *et al.*, 2018; Pleschka, 2013; Samji, 2009). Ces virus nouvellement formés et libérés peuvent alors à nouveau initier un cycle infectieux au niveau d'autres cellules saines de l'organisme hôte.

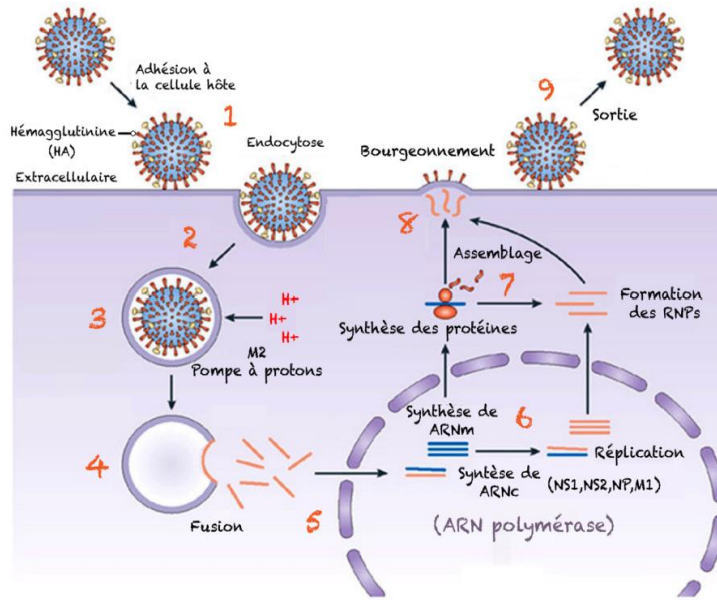


Figure 1.8 : Cycle de reproduction du virus de la grippe. Le virus de la grippe s'attache à la cellule permissive (à l'aide de la glycoprotéine HA). L'attachement engendre l'endocytose du virus. L'acidité de l'endosome engendre la libération du génome viral dans le cytosol. L'ARN génomique viral de sens négatif est ensuite importé dans le noyau, où il est transcrit en ARNm. Cet ARNm sert à la fois de matrice pour la réplication du génome viral et pour la synthèse de nouvelles protéines. Les génomes et les protéines nouvellement synthétisés sont assemblés au niveau de la membrane plasmique puis le virus de la grippe acquiert son enveloppe virale en bourgeonnant de la cellule. (Zottig, X. A., 2021)

#### 1.4.5 Transmission

La transmission du virus de la grippe d'un individu infecté à un individu sain s'établit principalement par voie aérienne. En effet, chez l'humain, l'influenza se transmet généralement par le biais de gouttelettes respiratoires et d'aérosols produits par la toux et les éternuements. Les gouttelettes respiratoires sont des particules de relativement grande taille parcourant moins de deux mètres avant d'atterrir sur les surfaces voisines. Les aérosols sont des particules plus petites ayant la capacité de rester en suspension dans l'air plus longtemps et peuvent donc voyager sur de plus

longues distances comparativement aux gouttelettes respiratoires. La transmission du virus influenza peut également survenir de façon indirecte, suite au contact d'objets ou de surfaces contaminées (fomites), étant donné que la capacité infectieuse du virus peut être conservée durant 24 heures sur des surfaces inertes (Iwasaki, A. et Pillai, 2014; Vabret *et al.*, 2010; Zhang, N. et Li, 2018) (Greatorex *et al.*, 2011). Un individu infecté peut transmettre la grippe un jour avant l'apparition des symptômes et jusqu'à 5 à 10 jours après. Généralement, un adulte en bonne santé est contagieux pendant 3 à 5 jours. Néanmoins, les personnes à haut risque, tels que les jeunes enfants et les personnes immunodéprimées, peuvent excréter et transmettre le virus pendant plusieurs semaines (Vabret *et al.*, 2010).

#### 1.4.6 Variation antigénique

L'augmentation rapide du taux de transmission du virus de la grippe sur une période et un lieu donné peut résulter en des épidémies et pandémies. Cela est principalement dû à l'émergence et réémergence de virus ayant subi une variation antigénique (i.e. une évolution/modification itérative de leurs antigènes majeurs suffisamment importante pour leur conférer la capacité d'échapper au système immunitaire d'individus préalablement sensibilisés) (Berthélémy, 2015; Carrat et Flahault, 2007). Cette variation antigénique découle de 2 mécanismes distincts appelés dérive antigénique (*drift*) et déplacement antigénique (*shift*) (Bouvier et Palese, 2008; Devi et Sarala, 2021).

La dérive antigénique est une variation mineure, lente et progressive du génome viral et par conséquent des gènes codant pour les antigènes viraux, laquelle découle d'une accumulation de mutations (Ahmed *et al.*, 2007; Devi et Sarala, 2021). Cette accumulation de mutations est la conséquence du caractère peu fidèle de la RdRp ainsi que de la pression sélective exercée par le système immunitaire de l'hôte et à moindre mesure par les conditions environnementales (Amiel, 2010). En effet, la RdRp peut commettre des erreurs de lecture lors de la réplication virale, lesquelles ne sont pas réparées étant donné qu'elle ne possède pas d'activité exonucléase 3'→ 5', aboutissant, ainsi, à des mutations ponctuelles dans le génome viral et par conséquent à des modifications au niveau des protéines pour lesquelles il code (Ahmed *et al.*, 2007; Amiel, 2010; Pleschka, 2013). De plus, ces mutations peuvent influencer ou non sur les propriétés infectieuses du virus. Elles peuvent donc lui être néfastes (virus défectueux) ou bénéfiques. Les mutations bénéfiques améliorent les propriétés infectieuses du virus et leur concèdent un avantage sélectif.

Par exemple, certaines mutations peuvent conférer aux virus une capacité répliquative plus importante ou la capacité à échapper au système immunitaire. En conséquence, les virus en résultant se multiplient davantage comparativement aux virus initiaux et sont alors sélectionnés (pression sélective) (Bessière, 2021; Carrat et Flahault, 2007; Marchoux et Gebre-Selassie, 1989). Ainsi, la réponse immunitaire étant principalement dirigée contre les antigènes HA et NA, cela explique l'importante accumulation de mutations au niveau de ces glycoprotéines (pression sélective par le système immunitaire) (Amiel, 2010; Krammer *et al.*, 2018). De ce fait, la dérive antigénique mène à l'émergence et ré-émergence successive de nouvelles souches virales au sein d'un même sous-type de virus de la grippe, lesquelles diffèrent progressivement de la souche d'origine. Par exemple, les variants actuels du virus H3N2 se distinguent notablement de la souche H3N2 initiale circulant en 1968 et peuvent donc échapper à la réponse immunitaire d'un individu sensibilisé à la souche H3N2 initiale (Amiel, 2010). Par conséquent, la dérive antigénique constitue une cause majeure des épidémies grippales saisonnières. Toutefois, elle ne peut aboutir à elle seule à l'établissement d'une pandémie, étant donné qu'elle ne permet qu'un échappement immunitaire partiel du virus (Boni *et al.*, 2004; Carrat et Flahault, 2007; Devi et Sarala, 2021).

Le déplacement (ou changement) antigénique, quant à lui, est une modification majeure et soudaine du génome viral et par conséquent des gènes codants pour les antigènes viraux (Devi et Sarala, 2021). Ce phénomène résulte principalement du réassortiment génétique entre des virus grippaux (Carrat et Flahault, 2007). Le réassortiment génétique est possible grâce au caractère segmenté du génome des virus grippaux et consiste au remplacement d'un segment complet d'un sous-type viral par le segment équivalent d'un autre sous-type viral. Ce phénomène survient lorsque différents sous-types de virus grippaux (2 ou plus), ayant généralement différentes espèces pour hôte, co-infectent une même cellule (Bouvier et Palese, 2008; Krammer *et al.*, 2018; Pleschka, 2013). Le réassortiment génétique peut ainsi mener à l'émergence de nouveaux sous-types de virus grippaux pouvant interagir avec différentes composantes cellulaires. Ceci leur confère la capacité d'infecter et de se transmettre au sein de nouvelles espèces et par conséquent à engendrer des épidémies et pandémies (Devi et Sarala, 2021; Pleschka, 2013) (Amiel, 2010). Un bon exemple est le réassortiment génétique entre un virus grippal aviaire (H3NX) et le virus grippal humain (H2N2) ayant conduit à l'émergence du virus de Hong Kong (H3N2) responsable de la pandémie en 1968,

lequel se compose du segment HA du virus aviaire et du segment NA du virus humain (Amiel, 2010).

Ainsi, la variation antigénique du virus de la grippe a mené à l'émergence et réémergence de nombreux virus grippaux responsables de cinq pandémies au cours de ce siècle, notamment la grippe espagnole en 1918, la grippe asiatique en 1957, la grippe de Hong Kong en 1968, la grippe russe en 1977 et la grippe porcine en 2009. Sans oublier, les nombreuses épidémies ayant également eu lieu durant cette période (Amiel, 2010; Chastel, 2004; Francis *et al.*, 2019). Cette émergence et réémergence de l'IAV souligne indéniablement la nécessité de mettre en place des outils permettant de contrôler cette maladie infectieuse étant donné les conséquences socio-économiques désastreuses lui étant associées (Clayville, 2011; Krammer *et al.*, 2018; Rémy *et al.*, 2015).

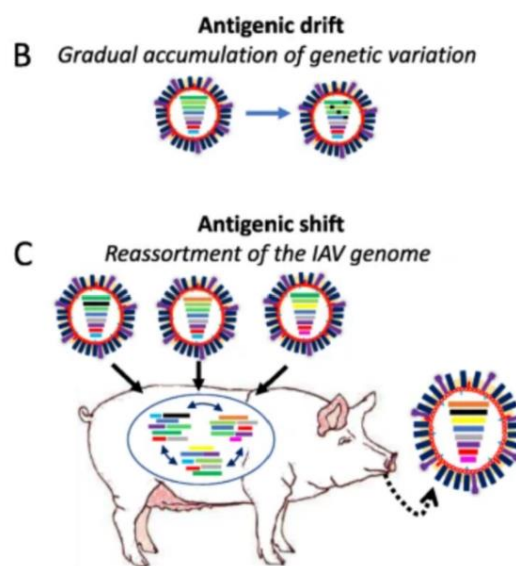


Figure 1.9 : Variation antigénique du virus de la grippe. A) La dérive antigénique (*antigenic drift*) est une variation mineure de l'antigène due à l'accumulation de mutations dans le génome du virus au cours du temps. B) Le déplacement antigénique (*antigenic shift*) est une modification majeure résultant d'un réassortiment génétique entre deux ou plus sous-types de virus grippaux différents ayant coïnfecté une même cellule hôte.

#### 1.4.7 Vaccination antigrippale

La vaccination constitue l'approche la plus efficace pour le contrôle de maladies infectieuses, telle que la grippe. À mesure du développement des technologies vaccinales et de l'amélioration des connaissances sur la pathogénicité du virus influenza, la vaccination antigrippale a considérablement évolué afin de s'adapter aux diverses limitations rencontrées. Néanmoins, certains défis persistent et l'élaboration de nouvelles approches vaccinales ciblant la grippe demeure essentielle, tel que discuté au niveau de la section "vaccins futurs".

##### 1.4.7.1 Vaccins passés et actuels

L'isolement du virus de la grippe A en 1933 permit rapidement l'élaboration du premier vaccin antigrippal monovalent en 1936. Ce dernier se composait d'une souche H1N1 atténuée suite à 30 passages en série dans des œufs de poule. Subséquemment, l'isolation d'un virus grippal antigéniquement différent en 1940, soit de type B, aboutit en 1942 à la substitution des vaccins monovalents par des vaccins bivalents ciblant les virus grippaux A (H1N1) et B (Francis *et al.*, 2019; Hannoun, 2013; Mosnier *et al.*, 2018). Parallèlement, en raison des risques de regain de virulence associés aux vaccins atténués, des vaccins chimiquement inactivés furent homologués en 1945 (Francis *et al.*, 2019; Krammer *et al.*, 2018). Ultérieurement, suite aux pandémies de la grippe asiatique (H2N2) et la grippe de Hong Kong (H3N2) en 1957 et 1968 respectivement, les vaccins bivalents ont été modifiés pour inclure consécutivement ces sous-types grippaux en plus du type B. La réémergence du virus H1N1 en 1977 mena ensuite à l'élaboration de vaccins antigrippaux trivalents en 1978, composés de deux souches de type A (H3N2 et H1N1) et du virus de la grippe de type B (B/Lee). Au cours des années 1980, les virus de type B ont divergé en deux lignées antigéniquement distinctes. Dès lors, ces dernières circulent de façon concomitante ou alternative (Francis *et al.*, 2019; Krammer *et al.*, 2018; Mosnier *et al.*, 2018). L'efficacité protectrice des vaccins antigrippaux trivalents est considérablement réduite lors des saisons épidémiques où ces deux lignées B co-circulent ou encore lorsque la lignée circulante dominante ne concorde pas à la souche vaccinale (Carrat et Flahault, 2007; Mosnier *et al.*, 2018). Or un mésappariement entre les recommandations de l'OMS pour les vaccins antigrippaux et les souches circulantes fut révélé pour 11 saisons sur 36 saisons. Ainsi, afin de pallier cette imprévisibilité de la lignée circulante, des vaccins quadrivalents ont été formulés en 2012, incluant les deux lignées B en plus des deux souches de type A (H3N2 et H1N1) (Hannoun, 2013; Krammer *et al.*, 2018; Mosnier *et al.*, 2018).

Étant donné les limites associées aux vaccins comportant l'agent pathogène entier (vaccins traditionnels discutés plus haut), l'élaboration de formulations vaccinales antigrippales de nouvelle génération s'avéra nécessaire, notamment les vaccins sous-unitaires. Le premier vaccin sous-unitaire antigrippal trivalent à base de glycoprotéines HA et NA fut développé en Suisse en 1997, appelé Inflexal V, et est actuellement autorisé dans 25 pays (Mischler et Metcalfe, 2002). Le premier vaccin sous-unitaire antigrippal approuvé par la FDA en 2013 est Flublok, lequel se compose uniquement de la protéine HA (trivalent puis quadrivalent) (Cox, M. M. J., 2021; Devi et Sarala, 2021; Krammer *et al.*, 2018). L'utilisation de la protéine HA en guise d'antigène cible dans ces formulations vaccinales sous-unitaires constitue un choix rationnel basé, entre autres, sur l'abondance relative de cette glycoprotéine à la surface des virus de la grippe ainsi que sa capacité à induire des anticorps neutralisants (Devi et Sarala, 2021; Samji, 2009). De plus, l'infection naturelle par le virus de la grippe ou la vaccination avec des agents pathogènes entiers engendrent majoritairement des anticorps dirigés contre l'antigène HA. Ces anticorps anti-HA ciblent soit le domaine globulaire (pointant vers l'extérieur du virion) soit le domaine de la tige (ancré dans l'enveloppe virale) des monomères de HA. Les anticorps ciblant le domaine globulaire de HA sont connus pour inhiber l'attachement des virions aux cellules hôtes, empêchant ainsi leur entrée (Krammer *et al.*, 2018). Les anticorps dirigés contre le domaine de la tige HA inhibent la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale, empêchant ainsi la libération du matériel génétique viral au sein de la cellule hôte (Imai *et al.*, 1998). Ainsi, les vaccins sous-unitaires antigrippaux à base de HA se sont révélés être aussi efficaces pour générer une réponse immunitaire protectrice en comparaison aux vaccins antigrippaux traditionnels et sont davantage sécuritaires (Mallajosyula *et al.*, 2014).

Néanmoins, le virus de la grippe, plus particulièrement le domaine globulaire de HA, est soumis à une variation antigénique importante (Krammer *et al.*, 2018). En conséquence, les vaccins antigrippaux traditionnels et de nouvelle génération doivent être réévalués et reformulés annuellement afin de concorder avec la souche circulante et donc protéger les populations lors des saisons grippales. En effet, depuis 1973 l'OMS publie des recommandations annuelles pour chacun des deux hémisphères (nord et sud) au sujet de la composition des vaccins antigrippaux sur la base des informations fournies par les systèmes de surveillance identifiant les souches et les lignées grippales en circulation (Devi et Sarala, 2021; Hannoun, 2013; Mosnier *et al.*, 2018).



#### 1.4.7.2 Vaccins futurs

Afin de pallier cette imprévisibilité et les risques associés à l'émergence de nouveaux virus grippaux, de nombreuses études concentrent leurs efforts à l'identification et l'évaluation d'antigènes grippaux conservés, lesquels permettraient l'élaboration de vaccins sous-unitaires dits universels, pouvant conférer une protection à large spectre (i.e. contre une multitude de souches et sous-types grippaux) (Carrat et Flahault, 2007; Staneková et Varečková, 2010). À ce jour, divers antigènes relativement conservés chez différentes souches et sous-types grippaux ont été évalués, notamment les protéines internes NP et M1, le site enzymatique de la glycoprotéine NA, le domaine de la tige de la protéine HA ainsi que l'ectodomaine de la protéine M2 (M2e) (Carrat et Flahault, 2007; Chen *et al.*, 2018; Krammer *et al.*, 2018; Staneková et Varečková, 2010).

L'antigène M2e se compose de 23 acides aminés, soit les résidus 2 à 24 de la région N-terminale de la protéine M2. Ces derniers sont hautement conservés entre les différentes souches et sous-types d'influenza A humaines, aviaires et porcines, particulièrement au niveau des résidus 2 à 10 (SLLTEVETP), faisant de cet antigène une cible attrayante pour des vaccins antigrippaux universels. De plus, M2e est exprimé de façon abondante à la surface des cellules infectées. Les anticorps anti-M2e ne possèdent pas d'activité neutralisante, mais sont pourvus d'un fort potentiel opsonisant, favorisant, d'une part, la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées à travers les mécanismes effecteurs CDC, ADCP et ADCC, et d'autre part, l'inhibition du bourgeonnement de particules virales dans la matrice extracellulaire (El Bakkouri *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2003; Mezhenskaya *et al.*, 2019; Staneková et Varečková, 2010). De surcroît, contrairement à l'antigène HA, l'antigène M2e ne comporte pas de site de glycosylation, ce qui facilite la production (Sethuraman et Stadheim, 2006; Turley *et al.*, 2011). Néanmoins, en raison de sa petite taille, l'antigène M2e est faiblement immunogène. Afin de contrer ce désavantage, diverses stratégies furent mises en place, notamment l'utilisation de plateforme de livraison et/ou d'adjuvants (comme discuté ci-haut), ainsi que l'usage de trois à cinq répétitions en tandem de cet épitope. Par ailleurs, quelques vaccins sous-unitaires à base d'antigène M2e furent l'objet d'essais cliniques de phase I ou II, tels que VaxInnate (NCT00921206), ACAM-FLU-A (NCT00819013) et Uniflu (NCT03789539) (Fiers *et al.*, 2009; Mezhenskaya *et al.*, 2019; Shokouhi *et al.*, 2018; Staneková et Varečková, 2010).

Tableau 1.1\_: Séquences de l'antigène M2e associées à diverses souches d'IAV infectants les espèces humaines, aviaires et porcines. (Coté-Cyr, 2022)

Souche d'influenza A	Séquence
Human/Puerto Rico/8/1934 H1N1	SLLTEVETP <b>I</b> RNEWGCR <b>C</b> NGSSD
Human/Beijing/132/2010 H1N1	SLLTEVETP <b>T</b> SEW <b>E</b> CR <b>C</b> SDSSD
Human/South Carolina/1/1918 H1N1	SLLTEVETP <b>T</b> RNEWGCR <b>C</b> NDSSD
Chicken/Pennsylvania/1/1983 H5N2	SLLTEVETL <b>T</b> RNGW <b>E</b> CK <b>C</b> SDSSD
Turkey/Oregon/1971 H7N3	SLLTEVETP <b>T</b> RNGW <b>E</b> CK <b>C</b> SDSSD
Chicken/Victoria/1/1985 H7N7	SLLTEVETP <b>T</b> RNGW <b>E</b> CK <b>C</b> SDSSD
Swine/Hong Kong/127/1982 H3N2	SLLTEVETP <b>T</b> RNGW <b>E</b> CK <b>C</b> SDSSD
Swine/Ontario/2/1981 H1N1	SLLTEVETP <b>I</b> RNEWGCR <b>C</b> NDSSD

X (rouge): Résidus montrant le plus de variation d'une souche à l'autre

## 1.5 Hypothèse et objectifs

Le développement d'une réponse immunitaire robuste et à long terme spécifique à un antigène requiert l'internalisation de l'antigène et de l'adjuvant par une même CPA (Ignacio, Bob J *et al.*, 2018). Afin de favoriser ce processus relativement hasardeux, l'élaboration d'une plateforme de livraison multifonctionnalisée s'avère prometteuse (*i.e.* une plateforme exposant à sa surface des molécules distinctes ayant différentes fonctions, en l'occurrence l'antigène et l'adjuvant). Cette approche permettrait une nette amélioration de la réponse immunitaire spécifique à un antigène, une réduction des quantités nécessaires à une immunisation efficace ainsi qu'une diminution des risques d'inflammation hors cible liés aux agonistes TLR solubles. Néanmoins, la conception d'une plateforme de livraison multifonctionnalisée constitue un processus complexe et rencontre certaines limitations. Le co-assemblage moléculaire de peptides distinctement fonctionnalisés (soit conjugués à des molécules fonctionnelles différentes), permet de concevoir des assemblages supramoléculaires polyfonctionnels (*i.e.* combinant la propriété fonctionnelle des molécules bioactives). De plus, ces assemblages supramoléculaires exposent à leur surface une densité contrôlée des molécules bioactives, pouvant être ajustée en modulant le rapport molaire relatif des peptides fonctionnalisés dans le mélange de co-assemblage (Hudalla *et al.*, 2014; Mora-Solano *et al.*, 2017). Ainsi, le co-assemblage moléculaire constitue une stratégie prometteuse pour l'élaboration de plateformes de livraison vaccinales multifonctionnalisées et versatiles.

De ce fait, l'objectif principal de ce projet de maîtrise vise à utiliser le co-assemblage moléculaire de peptides distinctement fonctionnalisés afin d'élaborer une plateforme de livraison nanovaccinale multifonctionnalisée (polyfonctionnels). La fonctionnalisation de l'antigène grippal conservé, M2e, ainsi que d'adjuvants biaisant la réponse immunitaire en Th1, les agonistes TLR7

ou 9, sur notre plateforme nanovaccinale à base du peptide d'auto-assemblage I<sub>10</sub>, vise à développer des nanovaccins antigrippaux synthétiques potentiellement universels. Afin de répondre à cet objectif, trois objectifs spécifiques ont été mis en place :

- 1) Synthétiser et caractériser biophysiquement les plateformes nanovaccinales multifonctionnalisées.
- 2) Examiner à l'aide de modèles cellulaires l'activité immunologique des plateformes nanovaccinales (*in vitro*).
- 3) Évaluer l'efficacité des plateformes nanovaccinales contre une infection expérimentale par la souche IAV H1N1 (A/PR8/1934) chez la souris (*in vivo*).

## CHAPITRE II

### ARTICLE

#### **Synthetic Multicomponent Nanovaccines Based on the Molecular Co-Assembly of $\beta$ -Peptides Protect Against Influenza Infection**

Salma Bricha<sup>1,2,3,4,5</sup>, Mélanie Côté-Cyr<sup>1,2,3,4,5</sup>, Thomas Tremblay<sup>3,6</sup>, Phuong Trang Nguyen<sup>1,3,4,5</sup>, Philippe St-Louis<sup>2,4,5</sup>, Denis Giguère<sup>3,6</sup>, Denis Archambault<sup>2,4,5,\*</sup>, Steve Bourgault<sup>1,3,4,5,\*</sup>

<sup>1</sup> *Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal. C.P.8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, H3C 3P8, Canada*

<sup>2</sup> *Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal. C.P.8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, H3C 3P8, Canada*

<sup>3</sup> *Quebec Network for Research on Protein Function, Engineering and Applications (PROTEO), Québec, Canada*

<sup>4</sup> *The Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre (CRIPA), Saint-Hyacinthe, Canada*

<sup>5</sup> *The Center of Excellence in Research on Orphan Diseases – Fondation Courtois (CERMO-FC), Montréal, Canada*

<sup>6</sup> *Department of Chemistry, Université Laval. 1045 av. De la Médecine, Université Laval, Québec City, QC G1V 0A6, Canada*

## 2.1 Contribution des auteur.e.s :

Salma Bricha: Expérimentation (synthèse; purification et conjugaison des peptides; caractérisation biophysique; caractérisation cellulaire; évaluation in vivo). Recherches bibliographiques. Rédaction de l'article.

Mélanie Côté-Cyr: Expérimentation (Analyse TEM; support technique pour immunisation et infection expérimentale).

Thomas Tremblay: Expérimentation (synthèse en solution de l'IMQ).

Trang Phuong Nguyen: Expérimentation (synthèse; purification et analyse MS peptides; support technique immunisation et infection expérimentale).

Philippe St-Louis: Expérimentation (support technique pour immunisation et infection expérimentale ainsi que pour analyse FACS).

Denis Giguère: Conceptualisation, révision du manuscrit, supervision et obtention du financement

Denis Archambault: Conceptualisation, révision du manuscrit, supervision et obtention du financement

Steve Bourgault: Conceptualisation, révision du manuscrit, supervision et obtention du financement

## 2.2 Résumé

Les peptides synthétiques capables de s'auto-assembler en nanoparticules sont apparus comme une approche attrayante pour la conception de plateformes de livraison d'antigènes pour les vaccins sous-unitaires. En outre, alors que les agonistes des récepteurs de type péage (TLR) sont des immunostimulants prometteurs, leur utilisation en tant qu'adjuvants est limitée par leur clairance rapide, leur inflammation hors cible et leur toxicité potentielle. Ici, nous avons exploité le co-assemblage moléculaire pour préparer des nanofilaments peptidiques multifonctionnalisés à feuillets- $\beta$ -croisés exposant un épitope antigénique dérivé du virus de la grippe A et un agoniste du TLR. L'imiquimod agoniste du TLR7 et le CpG agoniste du TLR9 ont été respectivement fonctionnalisés sur les nanofilaments au moyen d'une stratégie de conjugaison bioorthogonale pré-assemblage ou post-assemblage. Les nanofilaments résultantes ont été avidement internalisées par les cellules dendritiques et le CpG conjugué et l'imiquimod ont conservé leur capacité à activer leur récepteur endosomal apparenté, conduisant à une stimulation des cellules immunitaires. Les nanovaccins multifonctionnalisés ont induit une réponse immunitaire robuste spécifique à l'épitope et ont complètement protégé les souris immunisées d'une infection grippale létale. Cette approche ascendante polyvalente de co-assemblage est prometteuse pour la préparation de vaccins entièrement synthétiques avec une ampleur et une polarisation personnalisées des réponses immunitaires.

**MOTS-CLÉS** : *auto-assemblage peptidique, nanovaccin, nanofilaments, agonistes TLR, virus influenza A*

## 2.3 Abstract

Peptides with the ability to self-assemble into nanoparticles have emerged as an attractive strategy to design antigen delivery platforms for subunit vaccines. While toll-like receptor (TLR) agonists are promising immunostimulants, their use as soluble agents is limited by their rapid clearance and off-target inflammation. Herein, we harnessed molecular co-assembly to prepare multicomponent cross- $\beta$ -sheet peptide nanofilaments exposing an antigenic epitope derived from the influenza A virus and a TLR agonist. The TLR7 agonist imiquimod and the TLR9 agonist CpG were respectively functionalize on the assemblies by means of an orthogonal pre-, or post-assembly, conjugation strategy. The nanofilaments were readily uptaken by dendritic cells and the TLR agonists retained their activity. Multicomponent nanovaccines induced a robust epitope-specific immune response and completely protected immunized mice from a lethal influenza A virus inoculation. This versatile bottom-up approach is promising for the preparation of synthetic vaccines with customized magnitude and polarization of the immune responses.

**KEYWORDS:** *peptide self-assembly, nanovaccine, nanofilaments, TLR agonists, conjugation*

## 2.4 Introduction

To address potential safety concerns of conventional vaccines based on live-attenuated and inactivated microorganisms, including reversion to virulence and incomplete inactivation, respectively, vaccination strategies have evolved towards the usage of defined microbial molecular components. Subunit-based vaccines consisting of isolated specific antigen(s) from pathogens have been shown to be safe formulations, although they tend to be weakly immunogenic and to require the use of delivery systems and/or immunostimulatory agents to induce a protective immune response (Gregory *et al.*, 2013). Delivery vehicles for subunit vaccines increase the physicochemical and metabolic stability of the antigens, prolong their biological half-life, promote their drainage through the lymphatic system and facilitate their uptake by antigen-presenting cells (APCs), ultimately increasing their immunogenicity (Al-Halifa *et al.*, 2019; Lynn *et al.*, 2015; Manolova *et al.*, 2008). Over the past two decades, numerous nanoparticles have been evaluated and/or used in the clinics as delivery vehicles for antigenic materials, including polymeric (Demento *et al.*, 2012) and inorganic (Dhar *et al.*, 2009) nanoparticles, liposomes (Karkada *et al.*, 2010), immune stimulating complexes (ISCOMs) (Cox, J. C. *et al.*, 1998), bacterial self-assembling proteins like ferritin and lumazine synthase (Carmen *et al.*, 2021; Lamontagne *et al.*, 2022; Zhang, B. *et al.*, 2020) as well as virus-like particles (VLPs) (Garg *et al.*, 2020; Roldao *et al.*, 2010). For instance, VLPs are used as antigen delivery nanosystems in vaccines against the human papillomavirus (Kjaer *et al.*, 2020), the hepatitis B virus (Mendy *et al.*, 2013) and the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Ward *et al.*, 2021). Notwithstanding the conjugation of the antigen to the nanoparticle surface, or its encapsulation within, the addition of an immunostimulatory agent, or adjuvant, in the formulations is usually required to promote robust and long-lasting immune responses. Despite their importance, most adjuvants used in human vaccines are still based on aluminum salts, or Alum, which do not trigger the induction of a strong Th1 immune response (Awate *et al.*, 2013; Lefeber *et al.*, 2003). Thus, the identification of effective adjuvant technologies with the ability to precisely polarize the immune response remains important, and usage of agonists of Toll-like receptors (TLRs) constitutes an effective adjuvant strategy for subunit vaccines. For instance, unmethylated cytosine-phosphate-guanine (CpG) (CpG 1018), a TLR9 agonist, is currently used as an adjuvant in a Hepatitis B vaccine (HEPISLAV-B, 2017)(Lee, G. H. et Lim, S. G., 2021). Although TLRs play key roles in bridging the innate and adaptive immunity(Awate *et al.*, 2013), the use of soluble TLR agonists in vaccination is often



limited by their rapid clearance, poor metabolic stability, potential off-target inflammation, toxicity, and/or the fact that they should be ideally delivered with the antigen(s) to the same APCs (Ignacio, B. J. *et al.*, 2018; Wu, T. Y. *et al.*, 2014). Accordingly, the conjugation of TLR agonists with the antigenic determinant on a single nanoparticle appears as a promising strategy to mitigate potential adverse effects of TLR agonists, while potentiating their immunomodulating activities in the context of vaccination. For example, conjugation of CpG to nanoparticles has been shown to improve the cellular immune response and to enhance the immunogenicity of the adjuvants while requiring a low dose (Ballester *et al.*, 2015; de Titta, A. *et al.*, 2013). Nonetheless, the concurrent conjugation of different molecular identities, such as antigenic determinants and TLR agonists, on the same nanoparticle with orthogonality and defined stoichiometry remains challenging.

Molecular self-assembly, which consists of the spontaneous self-recognition and organized non-covalent aggregation of monomeric units, appears especially promising for the rational design of multi-functional nanoscale antigen delivery vehicles (Zottig, X. *et al.*, 2020). Particularly, synthetic peptides have emerged as key building blocks for the construction of defined supramolecular nanostructures due to their biocompatibility, biodegradability as well as straightforward synthesis and characterization (Branco *et al.*, 2011; Eskandari *et al.*, 2017; O'Neill *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2017). By changing amino acid sequences, different supramolecular architectures with custom physicochemical and biological properties can be obtained. Amongst peptide-based non-covalent assemblies, amphiphilic micelles (Joo *et al.*, 2018; Zaman, Abdel-Aal, Fujita, Phillipps, *et al.*, 2012; Zaman, Abdel-Aal, Fujita, Ziora, *et al.*, 2012; Zhang, R. *et al.*, 2018), synthetic coiled-coil VLPs (Ghasparian *et al.*, 2011; Riedel *et al.*, 2011; Tamborrini *et al.*, 2015) and nanofilaments (Babych *et al.*, 2018; Pompano *et al.*, 2014; Rudra, Mishra, *et al.*, 2012; Rudra, Sun, *et al.*, 2012; Rudra, Jai S. *et al.*, 2010; Wen et Collier, 2015) have shown to boost the immunogenicity of the grafted antigens. For instance, long and linear peptide fibrils with cross- $\beta$ -sheet quaternary structure and decorated with 17 to 24-residues long epitopes, induced high epitope-specific antibody titers in immunized mice, likely by inducing a depot effect, increasing APC uptake, stimulating APCs via the activation of TLR2 and/or the inflammasome, and/or protecting the antigenic determinants from proteolytic degradation (Al-Halifa *et al.*, 2020; Wen et Collier, 2015; Zottig, X. *et al.*, 2020). These filamentous nanostructures are formed by the self-assembly of  $\beta$ -peptides, through a delicate balance of intermolecular non-covalent interactions,

including hydrogen bonds,  $\pi$ - $\pi$  and cation- $\pi$  stackings, hydrophobic and electrostatic interactions, and van der Waals forces (Chesson, C. B. *et al.*, 2017). Interestingly, co-assembly of  $\beta$ -peptide building blocks functionalized with different sequences, can result in supramolecular assemblies exposing distinct molecular motifs on their surface. For instance, by successively conjugating the self-assembling Q11 sequence (QQKFQFQFEQQ) with B-cell and T-cell epitopes, fibrils with controlled density of these epitopes were obtained simply by tuning the relative molar ratio of the peptide building blocks in the self-assembly mixture (Mora-Solano *et al.*, 2017). Notwithstanding their usage for the preparation of nanoparticles simultaneously decorated with different antigenic determinants, the usage of self-assembling  $\beta$ -peptides as scaffolds for the construction of multicomponent fully synthetic vaccines concurrently comprising antigen(s) and TLR agonist(s) has never been reported so far.

In this context, we harnessed the high capacity of a 10-mer peptide sequence ( $I_{10}$ ) to self-assemble into intrinsically immunostimulating nanofilaments organized in a quaternary cross- $\beta$ -sheet architecture to prepare multicomponent vaccines. We have previously reported that the self-assembly of the  $I_{10}$  sequence into immunostimulatory cross- $\beta$  nanofilaments tolerates the addition of long peptide epitopes (Al-Halifa *et al.*, 2020; Babych *et al.*, 2018) and of bulky hydrophobic compounds (Kihal *et al.*, 2023). Herein, by adjusting the stoichiometry of the peptide monomeric building blocks, the relative density of the antigen and the TLR agonist on the nanostructure could be controlled. These multicomponent nanofilaments induced a robust epitope-specific immune response and completely protected immunized mice from a lethal viral inoculation. This novel co-assembly strategy is particularly attracting for the preparation of fully synthetic nanovaccines, in which the magnitude and/or polarization of immune responses can be easily fine-tuned using a versatile bottom-up approach.

## 2.5 Results and Discussion

### 2.5.1 Design of multifunctional synthetic nanovaccines based on self-assembling peptides to fight influenza A virus

The influenza A virus causes important human illness and vaccination strategies targeting conserved antigenic proteins are needed to identify universal influenza vaccines based on cross-protection (Paules *et al.*, 2018). Interestingly, the 23-residue *N*-terminal domain of the matrix protein 2 (M2) (M2e) is remarkably conserved among influenza A strains (Mezhenskaya *et al.*, 2019) and contains a T-helper recognition sequence (Eliasson *et al.*, 2018). M2e-specific antibodies can confer protection through Fc-mediated effector functions, such as antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) (Jegerlehner *et al.*, 2004; Simhadri *et al.*, 2015). However, the M2e sequence is poorly immunogenic, requiring the use of delivery systems and/or potent adjuvants (Tsybalova *et al.*, 2018). We and others have recently shown that the delivery of the M2e antigenic determinant on the surface of self-assembled cross- $\beta$ -sheet peptidic assemblies induced a humoral M2e-specific response (Al-Halifa *et al.*, 2020; Wang, Q. *et al.*, 2020; Zottig, X. *et al.*, 2021), leading to some protection against an experimental challenge upon intraperitoneal (Wang, Q. *et al.*, 2020), or intranasal (Zottig, X. *et al.*, 2021) immunizations. In the context of an M2e-based immunization strategy against the influenza A virus, it is critical to induce a mixed Th1/Th2 response for mediating the Fc effector function needed for M2e-associated immune responses (Bruhns, 2012). However, cross- $\beta$ -sheet peptide nanocarriers were shown to partially bias the immune response towards Th2 (Babych *et al.*, 2018; Rudra, J. S. *et al.*, 2010). Thus, including TLR agonists known to promote Th1 immune response on  $\beta$ -peptide nanoassemblies decorated with the M2e epitope could promote such a balanced Th1/Th2 immune response and, ultimately, a complete protection against viral inoculation. Among TLRs, the endosomal TLR7 and TLR9 are well-known to potentiate the Th1 immune response (Bode *et al.*, 2011; Chu, R. S. *et al.*, 1997; Gorden *et al.*, 2006; Stanley, M. A., 2002) and to increase the antigen-specific humoral response (Ignacio, B. J. *et al.*, 2018). Accordingly, herein, we conceived multicomponent peptide nanofilaments decorated with the M2e epitope and respectively functionalized with a controlled density of the TLR7 agonist Imiquimod (IMQ) and the TLR9 agonist unmethylated CpG oligodeoxynucleotides (ODNs). For IMQ-functionalized cross- $\beta$  filaments, the M2e-I<sub>10</sub> chimeric peptide was co-assembled with IMQ-I<sub>10</sub> peptide at a 1:2 molar ratio

(**Figure 2.1A**). Considering that the bulky and highly charged class B CpG ODN 1826 could likely preclude the organized self-assembly of the I<sub>10</sub> scaffold through steric hindrance and/or electrostatic repulsion, a post-assembly conjugation strategy based on thiol-maleimide chemistry was used (**Figure 2.1B**). The molar ratios between the TLR agonist and the M2e epitope were selected to maintain the amount of the antigenic determinant constant for the immunization, while being within the range of the doses of IMQ and CpG used in mice. For all peptides, a Lys residue, spaced by a GSGS linker, was incorporated at the N-terminus of the I<sub>10</sub> self-assembling unit (SNNFGAILSS) to facilitate purification, handling and solubilization in aqueous solution (Zottig, X. *et al.*, 2019).

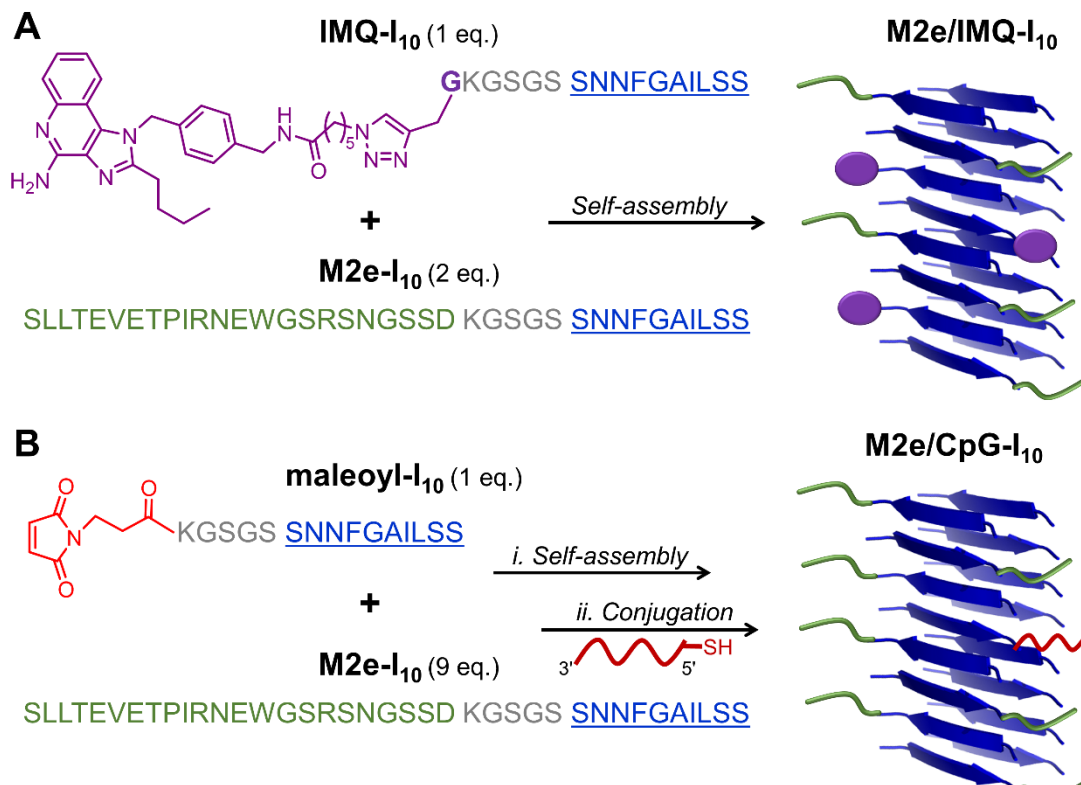
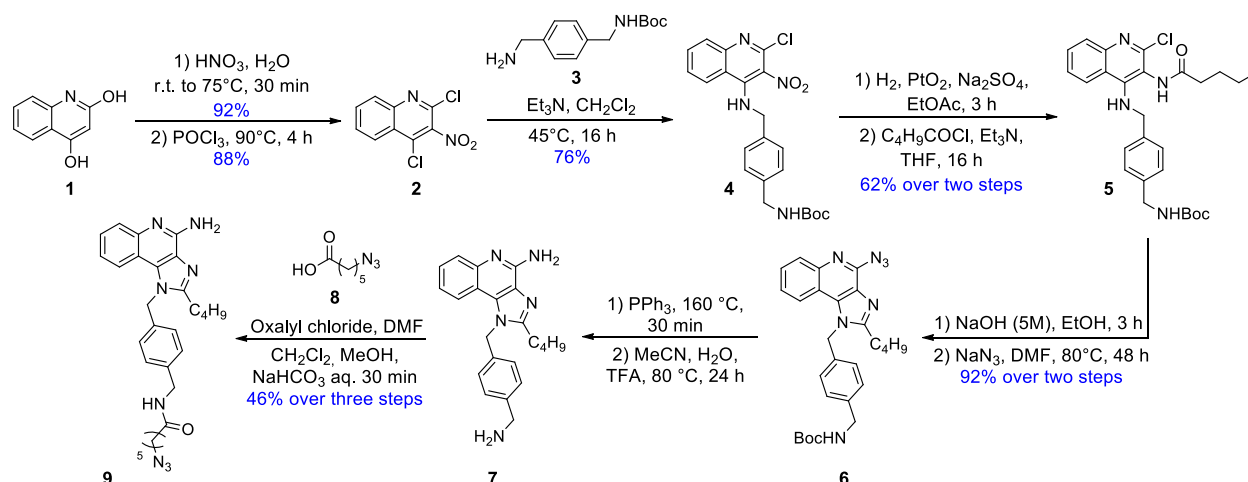


Figure 2.1 : Schematic representation of the preparation of multifunctionalized nanofilaments. (A) The I<sub>10</sub> self-assembling peptide (in blue) was respectively functionalized with the M2e epitope (in green) and IMQ (in purple) prior to molecular co-assembly at a 1:2 molar ratio. (B) In the post-assembly functionalization approach, M2e-I<sub>10</sub> and maleoyl-I<sub>10</sub> chimeric peptides were first co-assembled at a 1:9 molar ratio before the 5'-thiolated CpG oligodeoxynucleotide 1826 (in red) was conjugated on nanostructure through thiol-maleimide coupling. (A,B) A short KGSGS linker (in grey) was added between the self-assembling unit and the functionalized unit.

of IMQ-I<sub>10</sub>, the TLR7 agonist was first synthesized with an azido group before its conjugation to the side chain of a *N*-terminal propargylglycine of I<sub>10</sub> peptide through copper-catalyzed cycloaddition. To avoid interfering with the binding and activation of TLR7 by the IMQ functionalized on the nanoassemblies, the azido conjugating group was located distant to the pharmacophoric elements through the incorporation of a short aliphatic spacer at the free amine function of IMQ, as previously reported (Shukla, Malladi, *et al.*, 2010; Shukla, Mutz, *et al.*, 2010). IMQ-bearing an azide group was obtained using the synthetic route presented in **Scheme 2.1** and described in detail in the supporting information. Briefly, 2,4-quinolinediol **1** was engaged in a nitration reaction followed by a bis-chlorination providing intermediate **2** in high yield (Gao *et al.*, 2016). A regioselective mono S<sub>N</sub>Ar reaction using amine **3** generated compound **4** in 76% yield (Shukla, Mutz, *et al.*, 2010). Then, a platinum-catalysed reduction of the nitro group was developed using platinum(IV) oxide under high H<sub>2</sub> pressure leading to the corresponding amine. The crude amine was treated with valeroyl chloride under basic conditions providing amide **5** in 62% yield over two steps. A cyclisation was achieved under basic conditions leading to the imidazole intermediate treatment with NaN<sub>3</sub> furnished compound **6** in 92% yield over two steps. Finally, compound **6** was subjected to a 3-step sequence: iminophosphorane formation, Staudinger reaction, and amide formation leading to the target compound **9** in 46% yield over three steps after a single flash chromatography purification (**Figures S1 to S4**). Concurrently, I<sub>10</sub> peptides were elongated on Rink amide support by standard Fmoc chemistry, purified by HPLC and identity was confirmed by mass spectrometry (**Figures S5 to S9**). The resulting purified azido-IMQ (**9**) was conjugated to propargyl-I<sub>10</sub> in DMSO:H<sub>2</sub>O (5:1) in presence of 1 eq. of ascorbic acid and 0.5 eq. of CuSO<sub>4</sub> for 4 h at RT. The reaction mixture was purified by reverse phase HPLC and highly pure IMQ-I<sub>10</sub> peptide (>98%) was obtained. Class B CpG containing a reactive thiol group at the 5' terminus was accessed using phosphoramidite DNA synthesis, whereas I<sub>10</sub> was functionalized with a maleimide group at its N-terminus through the incorporation of a *N*-maleoyl-β-Ala on the peptidyl-resin.



**Scheme 2.1.** Synthesis of the TLR7 agonist IMQ functionalized with an azido group.

Peptide self-assembly was initiated by the dispersion of the different monomerized I<sub>10</sub> building blocks in aqueous solution (50 mM Tris-HCl pH 7.4) at a final concentration of 500  $\mu$ M. Peptides were incubated under constant rotary agitation (40 rpm) at room temperature and periodically analyzed by circular dichroism (CD) spectroscopy, fluorescence of thioflavin T (ThT) and of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate (ANS), transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM). In agreement with our previous work (Al-Halifa *et al.*, 2020), self-assembly of M2e-I<sub>10</sub> peptide reached an equilibrium after 96 h, as highlighted by the complete shift of the CD signal and the plateau in ThT and ANS fluorescence (**Figure 2.2A**). In contrast, M2e/IMQ fibrils originating from IMQ-I<sub>10</sub> and M2e-I<sub>10</sub> peptides (1:2 molar ratio) were obtained after a shorter incubation period of 48 h, since the hydrophobicity and potential  $\pi$ - $\pi$  stacking conferred by the IMQ units accelerated self-assembly and promoted the formation of large filament clumps that tend to precipitate and/or stick to surface after prolonged incubation time, *i.e.* longer than 96 h. As observed by CD spectroscopy, a distinct shift from a random coil conformation (minimum at 200 nm) to a  $\beta$ -sheet secondary structure was observed upon co-assembly of the M2e-I<sub>10</sub> and IMQ-I<sub>10</sub> peptides, which was associated with ThT- and ANS-positive signals (**Figure 2.2A**). Co-assembly of M2e-I<sub>10</sub> and maleoyl-I<sub>10</sub> was associated with a sharp increase of ThT fluorescence and the appearance of  $\beta$ -sheet-rich CD signal. The resulting nanofilaments co-functionalized with M2e epitope and maleimide were isolated by centrifugation and the assemblies were incubated with 0.9 eq of thiol-CpG in a phosphate buffer, pH 8, comprising 100 mM of DTT under constant

agitation for 4 h at RT. The resulting nanofilaments conserved their molecular suprastructural organization, as inferred from CD and fluorescence spectroscopy (**Figure 2.2A**). The accessibility of the M2e epitope at the surface of the nanofilaments was evaluated by means of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using M2e-specific antibody. ELISA results indicated that the M2e epitope was exposed on the surface of the fibrils and accessible to the M2e-antibody to the same extent between all assemblies (**Figure 2.2B**). TEM imaging confirmed the formation a dense network of unbranched fibrils with diameter ranging between 4 and 10 nm. Interestingly, the conjugation of CpG to nanofilaments did not significantly affect the supramolecular architectures of M2e-I<sub>10</sub>/maleoyl-I<sub>10</sub> fibrils (**Figure 2.2C**). The supramolecular morphology of the multicomponent nanovaccines was also examined by AFM and the resulting images revealed an heterogenous population of unbranched and linear fibrils with length varying from 100 nm to 1 μm (**Figure S10**).

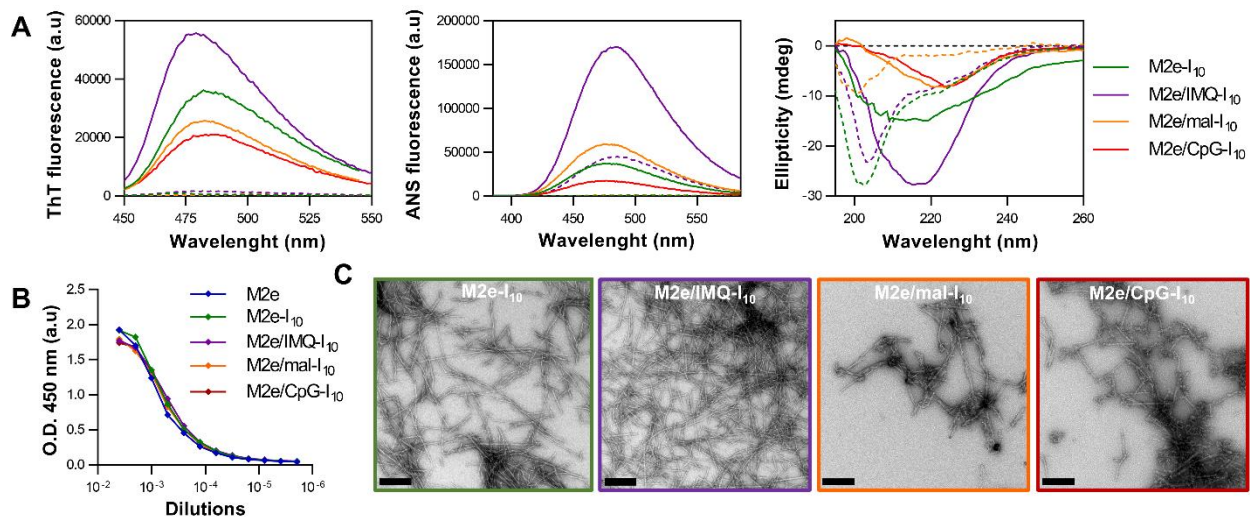


Figure 2.2 : Self-assembly of functionalized I<sub>10</sub>  $\beta$ -peptide into cross- $\beta$ -sheet fibrils. (A) ThT and ANS fluorescence and CD spectra of peptide assembling mixtures immediately after their resuspension (time=0h; dashed line) and after 48 h (M2e-IMQ-I<sub>10</sub>), or 96 h (M2e-I<sub>10</sub> and M2e/mal-I<sub>10</sub>) incubation at RT under constant rotary agitation. M2e/CpG-I<sub>10</sub> was obtained after reacting M2e/mal-I<sub>10</sub> with thiol-CpG. (B) Accessibility of the M2e epitope antigen within I<sub>10</sub>-based nanoassemblies by indirect ELISA. (C) Representative negative stain electron microscopy of the self-assembly mixtures after 48 h incubation (M2e/IMQ-I<sub>10</sub>), after 96 h incubation (M2e-I<sub>10</sub> and M2e/mal-I<sub>10</sub>) or after CpG conjugation (M2e/CpG-I<sub>10</sub>). Scale bar is 200 nm.

### 2.5.3 Functionalized peptide nanofilaments are fully cytocompatible and are avidly uptaken by dendritic cells

As cross- $\beta$ -sheet nanostructures are reminiscent of amyloid fibrils, which have been historically associated with protein misfolding disorders, we first evaluated the cytocompatibility of these assemblies. It is worth mentioning that abundant studies have reported that the toxicity associated with amyloids is caused by the transient oligomers formed during the process of amyloid formation and that well-defined cross- $\beta$ -sheet fibrils are non-toxic (Bourgault *et al.*, 2011; De Carufel *et al.*, 2015; Kaye, R. *et al.*, 2003; Nguyen, P. T. *et al.*, 2021). Moreover, we have previously shown that I<sub>10</sub>-based filaments are not causing any cytotoxicity (Al-Halifa *et al.*, 2020; Babych *et al.*, 2018; Zottig, X. *et al.*, 2021). Nonetheless, we wanted to confirm that the functionalization of these cross- $\beta$  nanostructures with TLR agonists do not alter their cytocompatibility using dendritic-like cells (DC2.4). As observed using the resazurin-based metabolic assay, none of these assemblies decreased the cellular viability upon 24 h treatment with a high concentration of 100  $\mu$ M (**Figure 2.3A**), encouraging further *in vitro* and *in vivo* immunological characterization. Next, the TLR7 and TLR9 are endosomal receptors that naturally recognize intracellular components of invading pathogens, such as single-stranded RNA and unmethylated CpG DNA motifs, respectively (Luchner, M. *et al.*, 2021). We have previously shown that cross- $\beta$  fibrils are efficiently internalized by APCs and markedly increase the internalization of the grafted immunogenic epitope (Babych *et al.*, 2018). Herein, we first confirmed the cellular uptake of the different nanoassemblies by DCs by means of confocal fluorescence microscopy and flow cytometry, a prerequisite for the activation of endosomal TLRs. Fluorescent fibrils were obtained by incorporating M2e-I<sub>10</sub> (0.05 eq.) peptide labelled at its N-terminus with an Alexa488 fluorophore (Alexa488-M2e-I<sub>10</sub>) in the co-assembly process. By confocal microscopy, we observed green fluorescence puncta within the cytosol of DC2.4 cells that were incubated for 4 h with the multicomponent fibrils M2e/IMQ-I<sub>10</sub> and M2e/CpG-I<sub>10</sub>, like cells treated with the monovalent M2e-I<sub>10</sub> filaments (**Figure 2.3A**). Despite extensive washes, some large fluorescent puncta could also be observed on the surface of DCs, suggesting that the nanofilaments also interact tightly with the cell plasma membrane. As previously reported, monomeric M2e peptide was poorly endocytosed by DC2.4 cells (**Figure 2.3A**). Cellular uptake was quantified by flow cytometry and this experiment revealed that all Alexa488-labelled fibrils were uptaken by DCs to similar levels, albeit the internalization of M2e/IMQ-I<sub>10</sub> was significantly lower compared to M2e-



I<sub>10</sub> assemblies (**Figure 2.3B**; **Figure S11**). It is worth mentioning that 1 mg/mL Trypan Blue was added to the cell sorting PBS buffer just before flow cytometry analysis to quench fluorescence signal associated with membrane-bound fibrils. While these results revealed that the I<sub>10</sub> multifunctional nanofilaments can be uptaken by DC-like cells *in vitro*, it will be important to evaluate their *in vivo* trafficking, including their delivery in the lymph nodes, either through direct drainage or transport by matured DCs.

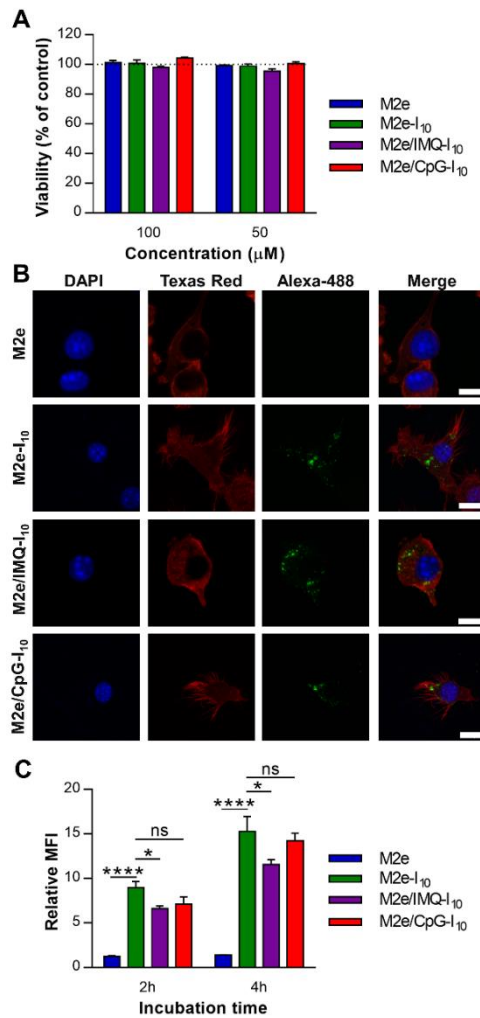


Figure 2.3 : Cytocompatibility and cellular uptake of multicomponent nanofilaments by dendritic cells. (A) DC.2.4 cells were treated for 16 h with 100 μM fibrils (monomer equivalent) and cellular viability was measured by resazurin reduction. (B) Representative confocal microscopy images of DC2.4 cells incubated with 30 μM of Alexa488-labeled assemblies, or monomeric M2e equivalent, for 4 h at 37°C. Scale bar is 10 μm. (C) Mean fluorescence intensity (MFI) of DC.2.4 cells incubated for 2 h and 4 h with 30 μM of Alexa488-labelled assemblies, or monomeric M2e equivalent. MFI data are expressed relative to PBS-treated cells. Statistical significance was determined by multiple *t*-test (\**P* < 0.05; \*\*\*\**P* < 0.0001; ns: not significant).

#### 2.5.4 IMQ and CpG ODN retain their capacity to activate their cognate TLRs upon their conjugation onto immunostimulatory cross- $\beta$ nanofilaments

The cellular uptake of IMQ and CpG functionalized fibrils suggests that these nanoassemblies could respectively engage the intracellular TLR7 and TLR9. Nonetheless, the conjugation of these TLR agonists to peptide nanostructures could preclude their binding to TLRs and/or subsequent activation. Accordingly, we evaluated the capacity of the multicomponent fibrils to activate their cognate TLR using HEK-Blue reporter cell lines. These cell lines, stably expressing a specific TLR and a NF- $\kappa$ B/AP1-inducible SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) reporter gene, are perfectly suited to evaluate the activity of TLR agonists. First, M2e/IMQ-I<sub>10</sub> fibrils led to a concentration-dependent activation of NF- $\kappa$ B in HEK-Blue mTLR7 cells, with SEAP signal at 630 nm being equivalent to soluble IMQ at 50 and 5  $\mu$ M (**Figure 2.4A**). Interestingly, the synthesized azido-IMQ (**9**) showed a similar capacity to the commercial positive control resiquimod to activate TLR7. The activation of endosomal TLR7 was specific to the presence of IMQ on the fibril surface, as nanofilaments exclusively decorated with M2e (M2e-I<sub>10</sub>) did not lead to a significant increase of absorbance at the highest concentration evaluated, *i.e.* 50  $\mu$ M. Secondly, conjugation of the CpG ODN 1826 on the peptide nanofilaments through its 5' extremity did not significantly affect its capacity to activate the TLR9, as observed with the comparable concentration-dependent NF- $\kappa$ B activation between CpG/M2e-I<sub>10</sub> and soluble CpG (**Figure 2.4B**). Again, activation of TLR9 by CpG/M2e-I<sub>10</sub> assemblies was specific to the presence of CpG on the fibrils, as the monovalent M2e-I<sub>10</sub> nanovaccine did not lead to a detectable level of NF- $\kappa$ B activation (**Figure 2.4B**). Finally, previous studies have revealed that the cross- $\beta$ -sheet supramolecular motif can activate the membrane-bound TLR2 (Al-Halifa *et al.*, 2020; Tukul *et al.*, 2009; Zottig, X. *et al.*, 2021), which is associated with the immunostimulatory properties of amyloid-like assemblies. Thus, we evaluated if the display of the bulky hydrophobic molecule IMQ, or the highly charged hydrophilic CpG ODN, could affect the capacity of the cross- $\beta$  filaments to activate the heterodimeric TLR2/TLR6. HEK-Blue hTLR2-TLR6 cells were incubated for 16 h with increasing concentrations of the different multicomponent fibrils and NF- $\kappa$ B activation was evaluated by measuring the absorbance at 630 nm. Interestingly, all quaternary assemblies readily activated the TLR2/TLR6, with the IMQ/M2e-I<sub>10</sub> being the more potent and the CpG/M2e-I<sub>10</sub> being less active (**Figure 2.4C**). As the endogenous ligands of the heterodimeric TLR2/TLR6 are diacyl-lipopeptides, the higher capacity of the IMQ/M2e-I<sub>10</sub> filaments to engage the TLR2-TLR6 could

be attributed to the increase surface hydrophobicity of the assemblies. Overall, these results revealed that the orthogonal conjugation of IMQ and CpG on the filaments do not preclude their potency to activate their cognate receptor, while the intrinsic immunostimulatory properties of the cross- $\beta$  supramolecular architecture are retained.

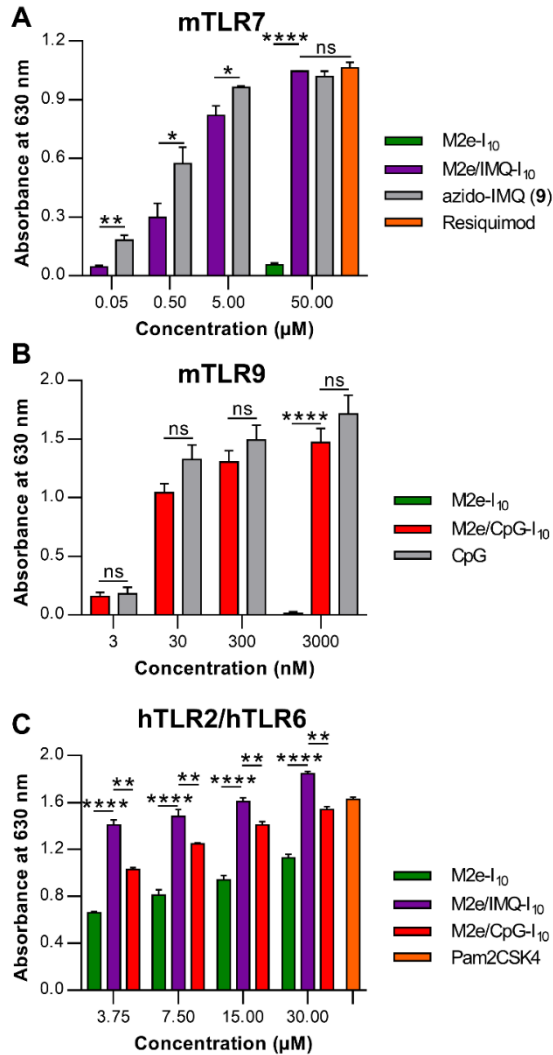
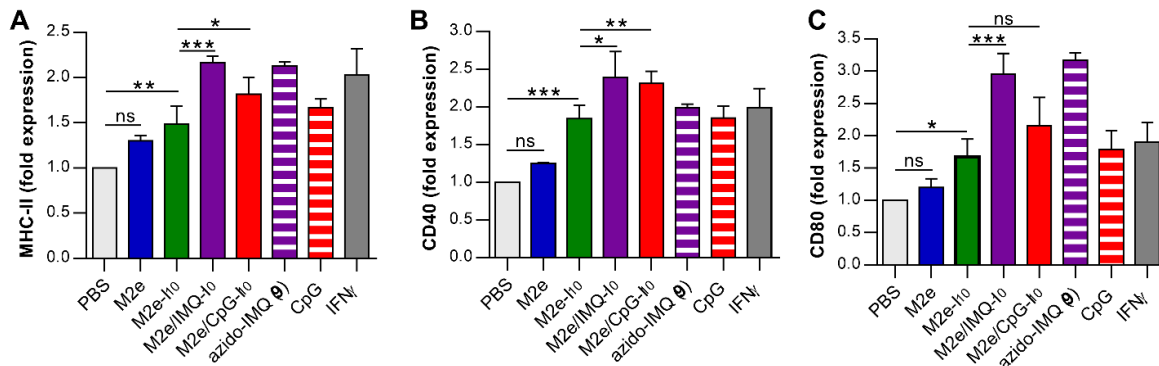


Figure 2.4 : TLR activation by multicomponent cross- $\beta$  nanofilaments. (A) HEK-Blue mTLR7 cells, (B) HEK-Blue mTLR9 cells and (C) HEK-Blue hTLR2-TLR6 cells were respectively incubated with nanofilaments, or soluble TLR agonists, for 16 h at 37°C and activation was assessed using SEAP reporter by measuring the absorbance at 630 nm. (C) Pam2CSK4 positive control was used at 10 ng/ml. (A-C) Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of at least three independent experiments performed in triplicate and statistical significance was assessed by means of one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns: not significant).

### 2.5.5 Multicomponent nanofilaments stimulate dendritic cells *in vitro*

While HEK-Blue cells are useful tools to rapidly interrogate the activity of TLR agonists, these genetically modified cells do not recapitulate the complexity of cellular signaling involved in the activation of immune responses. Among immune cells, DCs are critical players in the establishment of an antigen-specific responses owing to their roles in presenting the immunogenic determinants through MHC I and MHC II. Thus, we evaluated the capacity of the multicomponent nanofilaments to induce the maturation of DC-like cells by measuring the expression of cell-surface MHC II and of the co-stimulatory molecules CD40 and CD80 by flow cytometry. As previously reported for cross- $\beta$  nanorods (Zottig, X. *et al.*, 2021), the monovalent M2e nanofilament (M2e-I<sub>10</sub>) formulation led to a significant increase of the expression of MHC II (**Figure 2.5A**). Interestingly, upon conjugation of CpG and IMQ to the M2e-nanofilaments, the level of MHC II increased by 1.8 to 2.2-fold compared to the buffer control DCs. Upregulation of the co-stimulatory molecules CD40 and CD80, which are key indicators of the activation of DCs, was also observed on the surface DC2.4 cells treated for 16 h with 90  $\mu$ M M2e-I<sub>10</sub> assemblies (**Figure 2.5B, 2.5C**). As observed for MHC II, the respective addition of IMQ and CpG on the assemblies potentiated the fibril-induced expression of CD40 and CD80. These observations revealed that cross- $\beta$ -sheet filaments have intrinsic immunostimulatory properties, which can be further enhanced by functionalizing TLR agonists. Nevertheless, it remains critical to validate the immunostimulatory properties of these multifunctional nanofilaments using isolated bone marrow derived DCs and



macrophages.

### 2.5.6 Multicomponent M2e-nanofilaments potentiate the M2e-specific antibody response and fully protect mice against an H1N1 influenza A inoculation.

Bearing in mind that the multicomponent M2e-nanovaccine specifically activated TLRs, promoted the maturation of DC-like cells and were efficiently uptaken by APCs, we evaluated the M2e-specific antibody response and the protection against an experimental viral challenge in immunized mice. Female BALB/c mice were immunized 3 times intramuscularly (IM), with 14 days between each immunization, with equivalent dose of the M2e antigenic materials, in absence of any additional adjuvants. As for the cell-based assays, peptides were assembled into fibrils under sterile and endotoxin-free conditions and 100  $\mu$ L was IM injected to mice, *i.e.* equivalent of 30 nmol/dose of M2e, either monomeric or exposed on the fibril surface. All immunized mice did not lose any weight upon vaccine administration, a preliminary indication of the innocuity of the formulations (**Figure S12**). ELISA of sera from mice immunized with the soluble M2e collected at days 14, 28 and 42 post-primary immunization (PPI) revealed the poor immunogenicity of the monomeric peptide (**Figure 2.6A**). In sharp contrast, the display of the M2e peptide on I<sub>10</sub> filaments led to a robust production of anti-M2e total IgG after the first immunization, with a slight increase of antibody titers after the first and second boosts. These M2e-specific antibody titers were higher than the ones previously reported for similar M2e-nanoassemblies injected subcutaneously (SC) to mice (Al-Halifa *et al.*, 2020; Zottig, X. *et al.*, 2021), suggesting that using the IM route for such nanoplatform induces a more robust M2e-specific humoral response. Interestingly, coupling of the TLR7 agonist IMQ on the cross- $\beta$  fibrils significantly increased the anti-M2e IgG titers upon mice immunization, compared to immunized with M2e-I<sub>10</sub>, at 14, 28 and 42 PPI (**Figure 2.6A**). Similar results were obtained for the mice immunized with the M2e/CpG-I<sub>10</sub>. To evaluate the importance of conjugating the TLR agonist to the antigen delivery platform for the M2e-specific humoral immune response, mice were immunized the M2e-I<sub>10</sub> nanofilaments with the addition of 20  $\mu$ g soluble CpG (equivalent CpG dose to the M2e/CpG-I<sub>10</sub> formulation). The addition of soluble CpG to the M2e-I<sub>10</sub> formulations did not lead to significant increase of anti-M2e IgG (**Figure S13**). In contrast, the covalent conjugation of CpG on the self-assembling peptide, *i.e.* M2e/CpG-I<sub>10</sub>, led to a significant increase of anti-M2e total IgG at days 14, 28 and 42 PPI, compared to the M2e-I<sub>10</sub> formulation (**Figure 2.6**). Interestingly, at day 28 PPI, the M2e/CpG-I<sub>10</sub> vaccine induced a significantly higher total IgG titer compared to the M2e-I<sub>10</sub> formulation supplemented with soluble CpG (**Figure S13**). These observations indicate that the addition of a TLR agonist on cross- $\beta$ -sheet

filaments potentiate the antigen-specific humoral response, in agreement with previous studies using other nanosized delivery system (de Titta, A. *et al.*, 2013; Ignacio, B. J. *et al.*, 2018). Finally, using the CpG supplemented vaccine formulations, we determined the IgG isotypes to obtain an indication of the polarization of the immune response induced by the TLR agonist. As expected, the conjugation of CpG onto the M2-I<sub>10</sub> nanofilaments (M2e/CpG-I<sub>10</sub>), or the addition of soluble CpG into the M2-I<sub>10</sub> formulation, increased the levels of IgG2a, IgG2b and IgG3 compared to the M2e-I<sub>10</sub> vaccine (**Figure S14**). The IgG2a, IgG2b and IgG3 are prototypical of a Th1 cellular response (Stevens *et al.*, 1988). However, we did not observe any significant differences in the IgG isotype titers between mice immunized with the M2e/CpG-I<sub>10</sub> nanofilaments and the M2e-I<sub>10</sub> nanofilaments + soluble CpG formulation. This observation indicates that thorough immunological characterization would be necessary to clearly delineate the importance of conjugating the TLR agonist on the antigen delivery platform, in comparison to their co-administration.

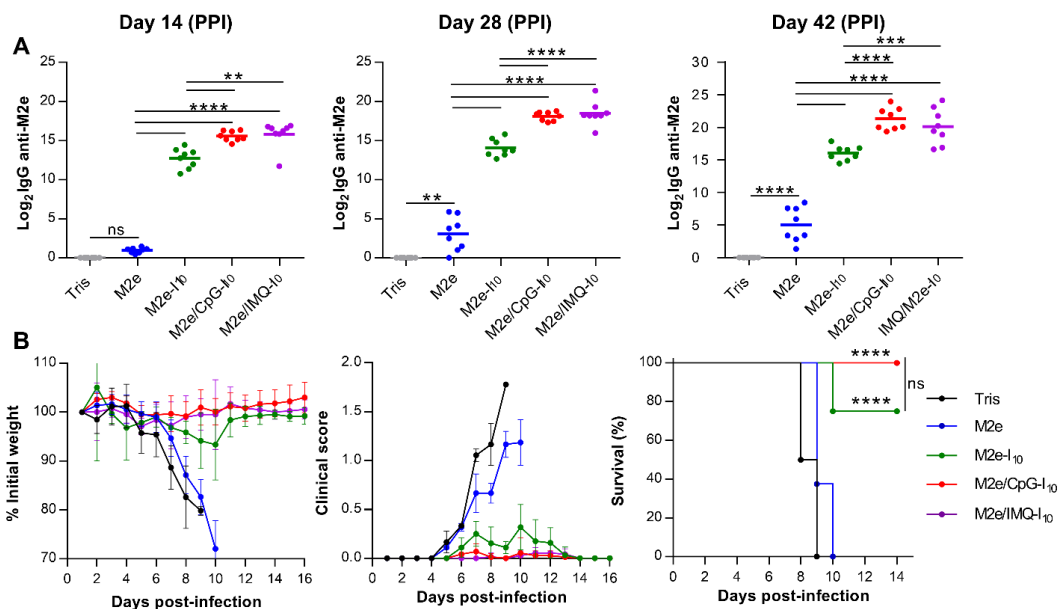


Figure 2.6 : Multicomponent cross- $\beta$  fibrils induce a robust antigen-specific immune response and protect mice against a lethal influenza A virus inoculation. (A) Total IgG anti-M2e titer in sera of immunized mice 14 days after primary immunization (day 14 PPI), 1<sup>st</sup> boost (day 28 PPI), and 2<sup>nd</sup> boost (day 42 PPI). Mice were immunized intramuscularly with 100  $\mu$ L of sterile 50 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 30 nmol/mouse of M2e antigen. Control mice received sterile 50 mM Tris-HCl pH 7.4. (B) Two weeks after the 2<sup>nd</sup> boost, 5  $\times$  LD<sub>50</sub> of IAV H1N1 was administrated intranasally to mice. Weight and clinical scores were monitored daily, and survival of infected mice was expressed as percentage of mice that survived the challenged in each vaccination group. (A-B) Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. and statistical significance between groups ( $n = 8$  mice) was assessed using one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns: not significant).

Fourteen days after the last immunization, mice were experimentally inoculated with  $5 \times \text{LD}_{50}$  of A/PR8/1934 H1N1 influenza A virus by intranasal instillation. Mice that were immunized with the soluble M2e peptide, or with the vehicle Tris buffer, showed a sharp increase of weight loss and clinical signs (temperature, activity, posture, response to stimuli, fur, ears position, dehydration feces) 7 days after the inoculation (**Figure 2.6B**). All these mice reached a weight loss of 20% or more of their initial weight and were sacrificed 9 to 10 days post-inoculation (**Figure 2.6B**). In sharp contrast, mice that received the M2e-I<sub>10</sub> nanofilament formulation showed an average weight loss of 6% after 10 days, which correlated with mild clinical symptoms. Challenged mice immunized with the M2e-I<sub>10</sub> nanofilament showed 75% of survival. Remarkably, mice respectively vaccinated with the multifunctional nanofilaments M2e/IMQ-I<sub>10</sub> and M2e/CpG-I<sub>10</sub> showed no significant weight loss and total absence of clinical symptoms, leading to 100% survival (**Figure 2.6B**). This complete protection conferred by the M2e-I<sub>10</sub> filaments functionalized with IMQ, or CpG, is likely associated with the well-known capacity of these TLR agonists to trigger a Th1 response (Heeg, K. et Zimmermann, S., 2000; Stanley, M. A., 2002), which is critical for the induction of Fc effector functions ADCC and CDC needed for M2e-associated protective response. For instance, it has been shown that the addition of CpG into vaccine formulations triggers a robust Th1 humoral and cell-mediated against antigens from hepatitis B virus (Brazolot Millan *et al.*, 1998) and promotes Th1 protective responses in murine leishmaniasis (Zimmermann *et al.*, 1998). As a matter of fact, mice immunized with the M2e-I<sub>10</sub> formulation supplemented with soluble CpG showed 100% survival with absence of weight loss and clinical symptoms (**Figure S15**), highlighting the importance of a Th1-biased immune response to fight influenza virus. Overall, data obtained from mice immunization and subsequent experimental challenge with the H1N1 virus revealed that the functionalization of cross- $\beta$ -sheet fibrils with TLR agonists through molecular co-assembly of peptide building blocks is a promising strategy to increase the efficacy of M2e-based influenza vaccines. While these observations are encouraging, it remains important to evaluate the long-term immune protection induced by these multifunctional nanovaccines. Moreover, it will be critical to further investigate potential tissue damage at the injection sites as well as adverse overactivation of the inflammatory response upon administration of these multifunctional nanostructures combining an antigenic determinant and a TLR agonist.

## 2.6 Conclusion

Herein, we report that fully synthetic and intrinsically immunostimulating  $\beta$ -peptide nanoparticles simultaneously functionalized with a TLR agonist and an antigenic determinant can be designed by harnessing molecular self-assembly. First, by means of co-assembly of different self-assembling peptides, cross- $\beta$ -sheet nanofilaments exposing the M2e epitope from the influenza virus and the TLR7 agonist IMQ were obtained with a precise stoichiometric control. Second, using a post-assembly conjugating strategy based on thiol-maleimide chemistry, M2e-functionalized fibrils displaying the TLR9 agonist CpG were obtained, again with stoichiometric control. Interestingly, owing to the cell penetrating ability of the fibrils, the conjugated CpG and IMQ retained their capacity to engage their cognate endosomal receptor, which led to the activation of immune cells. Above all, intramuscular immunization of these multicomponent nanovaccines induced a robust M2e-specific immune response and fully protected immunized mice from a lethal H1N1 influenza inoculation, with quasi-absence of clinical signs. Nonetheless, it will now be important to further characterize the cellular immune responses induced by these co-assembled nanofilaments to elucidate the mechanisms leading to protection. Moreover, study of the *in vivo* trafficking upon immunization of these nanofilaments as well as complete evaluation of long-term *in vivo* safety, including blood biochemistry and potential tissue damage at the injection site, will need to be performed before moving forward to any clinical translation. Synthetic peptides offer key advantages for the preparation of vaccines including biocompatibility, easy synthesis, purification and characterization, high purity, scalable production as well as storage stability under the lyophilized form. However, peptides are generally poorly immunogenic and showed poor metabolic stability, requiring the usage of potent adjuvants and/or delivery systems. As previously reported by us and others, assembling peptide building blocks into nanostructures constitute an efficient strategy to increase their immunogenicity and biological stability. Above all, as shown in this study, spontaneous and controlled peptide molecular co-assembly offers unique opportunities to construct nanoscale platforms exposing different functionalities on their surface, opening to innovative applications in vaccinology and beyond.



## 2.7 Materials and methods

### 2.7.1 Synthesis of N-(4-((4-amino-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c]6quinoline-1-yl)methyl)benzyl)-6-azidohexanamide (azido-IMQ)

All reactions were carried out under an argon atmosphere with dry solvents under anhydrous conditions, unless otherwise noted. Methylene chloride ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) and tetrahydrofuran (THF) were purified using a Vacuum Atmospheres Inc. Solvent Purification System. Yields refer to chromatographically and spectroscopically ( $^1\text{H}$  NMR) homogeneous materials, unless otherwise stated. Reagents were purchased at the highest commercial quality available and used without further purification, unless otherwise stated. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) carried out on 0.25 mm E. Merck silica gel plates (60F-254) using UV light as visualizing agent. SiliaFlash® P60 40-63  $\mu\text{m}$  (230- 400 mesh) was used for flash column chromatography. NMR spectra were recorded with an Agilent DD2 500 MHz spectrometer and calibrated using residual undeuterated solvent (Chloroform-d:  $^1\text{H}$   $\delta$  = 7.26 ppm,  $^{13}\text{C}$   $\delta$  = 77.16 ppm) as an internal reference. Coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz), and the following abbreviations were used to designate multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, p = quintet, m = multiplet, br = broad. Assignments of NMR signals were made by homonuclear (COSY) and heteronuclear (HSQC, HMBC) two-dimensional correlation spectroscopy. Infrared spectra were recorded using an Aminco Bowman Adrid Zone infrared spectrometer with a NaCl crystal matrix. High resolution mass spectra (HRMS) were measured with an Agilent 6210 LC Time of Flight mass spectrometer in electrospray mode. Either protonated molecular ions  $[\text{M} + \text{nH}]^{\text{n}+}$ , sodium adducts  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  or ammonium adducts  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  were used for empirical formula confirmation. See the **Supporting Information** for detailed synthetic procedures and  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY and HSQC NMR spectra.

### 2.7.2 Synthesis, purification, and characterization of peptides

The peptides M2e, M2e-I<sub>10</sub>, maleimide-I<sub>10</sub> and propargyl-I<sub>10</sub> were obtained via solid phase peptide synthesis using 2-(6-chloro-1-H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammoniumhexafluorophosphate (HCTU) as a coupling agent and a Rink amide support, as previously described (Nguyen *et al.*, 2017). Reverse phase preparative high performance liquid chromatography (HPLC) using a C18 column with a linear gradient of acetonitrile in  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$

(0.6% v/v) was employed to purify crude peptides after their cleavage from the solid support. Collected fractions were analyzed by analytical HPLC and LC/ESI-TOF mass spectrometry and fractions with purity greater than 95% were pooled and lyophilized. The peptides were kept under powder form at -20°C until use.

### 2.7.3 Conjugation of Azido-IMQ (9) to propargyl-I10

Azido-IMQ was mixed with 1.2 eq. of propargyl-I<sub>10</sub> in DMSO:H<sub>2</sub>O (5:1) in presence of 1 eq. ascorbic acid and 0.5 eq. of CuSO<sub>4</sub>. The mixture was left for 4 h at RT under constant agitation. The reaction mixture was purified by reverse phase HPLC and the identity of IMQ-I<sub>10</sub> was confirmed by LC-ESI-TOF mass spectrometry.

### 2.7.4 Conjugation of Alexa488 to M2e and M2e-I<sub>10</sub> peptides

M2e and M2e-K-I<sub>10</sub> peptides were respectively solubilized in H<sub>2</sub>O:acetonitrile (1:1) and the pH was adjusted to 9 with 4-methylmorpholine. Next, Alexa488 succinimidyl-ester was added at a molar ratio of 1.5:1 (Alexa488:Peptide) and the reaction mixture was incubated under constant rotary agitation at RT for 2 h. The labelled peptides were purified by HPLC and lyophilized.

### 2.7.5 Self-assembly of I<sub>10</sub> peptides into nanofilaments

For M2e-functionalized nanofilaments, the lyophilized M2e-I<sub>10</sub> peptide was dissolved at 500 µM in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 and sonicated for 5 min. Self-assembly was carried out under constant rotary agitation at 40 rpm at RT for 96 h. Multicomponent IMQ/M2e fibrils were obtained by mixing 1 eq. M2e-I<sub>10</sub> (solubilized in 50 mM Tris-HCl pH 7.4) with 2 eq. of IMQ-I<sub>10</sub> (solubilized in 3 % DMSO Tris-HCl 50 mM pH 7.4) to reach a final peptide concentration of 1 mM. After 5 min sonication, the self-assembly reaction was carried out under constant rotary agitation at 40 rpm at room temperature for 48 h. Finally, for the preparation of CpG conjugated filaments, 1 eq. of maleimide-I<sub>10</sub> (solubilized in 10% DMSO Tris-HCl 50 mM pH 7.4) was mixed with 9 eq. of M2e-I<sub>10</sub> to reach a peptide concentration of 500 µM. Molecular co-assembly was performed under constant rotary agitation at 40 rpm at RT for 96 h before CpG conjugation.

### 2.7.6 Conjugation of 5'-thiolated CpG on assembled I<sub>10</sub> nanofilaments

The 5'-thiolated CpG ODN 1826 (obtained from MilliporeSigma) was dissolved in a 100 mM phosphate, 100 mM DTT, pH 8, and incubated under constant rotary stirring at RT for 2 h. Reduced CpG was purified using a NAP-10 column (MilliporeSigma) with equilibration and elution buffer consisting of 100 mM phosphate, pH 6.0. The CpG ODN was mixed with pre-assembled filaments at a ratio of 1:1 relative to the maleimide conjugating unit, *i.e.* 30  $\mu$ M CpG and 300  $\mu$ M of peptide. The conjugation reaction was then undertaken under constant rotary stirring at RT and assumed to be completed after for 4 h.

### 2.7.7 Fluorescence spectroscopy

Molecular self-assembly was monitored by fluorescence measurements with ThT and ANS. The peptide mixtures were diluted in nanopure water to reach a final concentration of 100  $\mu$ M (monomeric eq.). ThT solution (1 mM in H<sub>2</sub>O) was added to obtain a final concentration of 40  $\mu$ M. For ANS, a final concentration of 450  $\mu$ M was used. ThT emission spectra was recorded from 450 nm to 550 nm with an excitation at 440 nm. For ANS, the excitation wavelength was 355 nm, and the emission spectra was recorded from 385 nm to 585 nm. Experiments were performed in triplicate, with different samples, and representative data are presented.

### 2.7.8 Circular dichroism spectroscopy

Peptide assembly mixtures were diluted in H<sub>2</sub>O to reach a concentration of 100  $\mu$ M. CD analysis was performed using a 1 mm path length quartz cell and spectra were recorded between 190 and 260 nm with a wavelength step of 0.5 nm. The average time per scan for each wavelength step was set at 10 s. Background was subtracted from the spectra using the spectrum obtained with the respective buffer control, *i.e.* without peptide. Considering molecular co-assembly, data are presented in mdeg and not in mean residue ellipticity (MRE). Experiments were performed in triplicate, with different samples, and representative data are presented.

### 2.7.9 Atomic force microscopy

Peptide assemblies were diluted in 1% acetic acid (vol/vol) to reach a concentration of 25  $\mu\text{M}$ . The mixture was immediately deposited on a freshly cleaved mica. After 2 min absorption, the surface was washed several times with filtered deionized water and air-dried for 24 h. The Veeco/Bruker Scan-Assyst multimode AFM in air mode with a silicon tip (tip radius 2-12 nm, constant force  $0.4 \text{ N m}^{-1}$ ) on a nitride lever was used to obtain images, at 0.9 Hz and 512 scans/min. The images obtained were then analyzed using the Gwyddion software.

### 2.7.10 Transmission electron microscopy

Peptide samples were diluted in  $\text{H}_2\text{O}$  to reach 50  $\mu\text{M}$ . and deposited on a 400 mesh grid coated with glow discharge copper carbon. Negative staining of the samples was achieved by applying 1.5% (w/v) uranyl formate for 1 min, followed by air drying for 24 h. An FEI Tecnai 12 BioTwin microscope set to 120 kV and equipped with an AMT XR80C CCD camera system was used to image the grids.

### 2.7.11 Enzyme-linked immunosorbent assay for epitope accessibility

The accessibility of the M2e epitope on the fibrils was evaluated by indirect ELISA. High-binding 96-well plates were respectively coated with 2  $\mu\text{g}$  of M2e peptide, or with M2e molar equivalent of assembled M2e-I<sub>10</sub>, IMQ-M2e-I<sub>10</sub> and CpG-M2e-I<sub>10</sub> assemblies overnight at 4 °C. Plates were then washed with PBS 0.05% Tween-20 (PBS-T), blocked for 1 h at RT PBS-T containing 1% (w/v) of BSA. After washes, plates were incubated at RT for 3 h with primary monoclonal anti-M2 antibody (14C2) using serial dilutions from 1:250 to 1:512000. After extensive washes with PBS-T, rabbit anti-IgG conjugated to peroxidase was added at a dilution of 1:10 000 and plates were incubated for 1 h at RT. Peroxidase activity was revealed by the addition of 3,3'-5,5'-tetramethyl 78 benzidine (TMB) for 20 min at RT and the reaction was stopped with  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Absorbance was measured at 450 nm and the mean absorbance of the blank (well with no coating) was subtracted.

#### 32.2.4 Cellular viability

DC.2.4 cells were seeded in 96-well plates at a density of 30 000 cells/well and incubated for 24 h with 100  $\mu$ M I<sub>10</sub>-based functionalized fibrils. Resazurin (50  $\mu$ M) was added and, after 3 h incubation, the absorbance at 570 nm was measured. Cell viability (in %) was calculated from the ratio of the fluorescence of the treated sample to the Tris-HCl control-treated cells.

#### 2.7.12 Evaluation of TLR activation

HEK-Blue mTLR7 and HEK-Blue mTLR9 cells (Invivogen) were cultured in DMEM medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 4.5 g/L glucose, 10% (v/v) fetal bovine serum, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 100 U/mL of penicillin, 100  $\mu$ g/mL of normocin, 10  $\mu$ g/ml of blasticidin and 100  $\mu$ g/ml of zeocin. HEK-Blue hTLR2-TLR6 cells were cultured in DMEM medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 4.5 g/L glucose, 10% (v/v) fetal bovine serum, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL normocin, and 1X HEK-Blue selection. When confluence was between 50-80%, HEK-Blue cells were seeded in 96-well plate in HEK-Blue detection medium in presence of equal volume of peptides mixtures, or buffer vehicle control. HEK-Blue hTLR2-TLR6 cells were seeded at a density of 280 000 cells/mL whereas mTLR9 and mTLR7 cells were seeded at a 220 000 cells/mL. For TLR7 activity, concentrations of nanofilaments (as monomeric units) ranging from 80  $\mu$ M to 80 nM were used. Soluble azido-IMQ was evaluated at concentrations equivalent to the concentration of IMQ in the nanofilament preparation, *i.e.* 54  $\mu$ M to 54 nM. Resiquimod positive control was used at 54  $\mu$ M. For the TLR9 activity, nanofilament concentration of 30  $\mu$ M to 30 nM (as monomeric units) were used. CpG ODN 1826 was evaluated at concentrations ranging from 3  $\mu$ M to 3 nM, which corresponds to the concentrations present in the nanofilament mixtures. For the TLR2-TLR6 activity, fibrils and M2e were added at an equivalent M2e concentrations ranging from 27  $\mu$ M to 3.375  $\mu$ M. Pam2CSK4 positive control was used at 10 ng/ml. After 16 h incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, the absorbance was measured at 630 nm. Experiment was carried with at least three times in triplicate and data were average and expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

### 2.7.13 Evaluation of cellular uptake by dendritic cells

For flow cytometry analysis, DC2.4 (MilliporeSigma, SCC142) cells were cultured in 24-well plate at a density of 50 000 cells/well. The following day, fluorescently labelled M2e peptide and assemblies were added to reach an equivalent fluorophore concentration. After 2 to 4 h, cells were extensively washed with ice-cold PBS before being resuspended in PBS. One mg/mL trypan blue was added prior to analysis to quench extracellular fluorescence immediately. Flow cytometry analysis was performed using a CYTOFLEX instrument and 10,000 gated events were used. The excitation wavelength was set at 488 nm and an emission at 530 nm. Data were analyzed using the Cytexpert software. This experiment was carried with at least three times in triplicate and data were average and expressed as mean  $\pm$  S.E.M. For confocal microscopy analysis, DC2.4 cells were plated in 8-well coverslip-plate at a density of 50 000 cells/well and after 4 h incubation with fluorescently labelled peptides, or fibrils, cells were extensively washed with ice-cold PBS before being fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde. Fixed cells were stained with 2  $\mu$ g/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) and 1 U/mL of Texas Phalloidin Red-X. Cells were washed three times with PBS and 1:1 10 mM Tris-HCl:glycerol (v:v) was added. Fluorescence images were obtained using an inverted confocal microscope Nikon A1R and a 60 $\times$  oil immersion lens. Images were analyzed using the Fiji Image J software and representative images are shown.

### 2.7.14 Expression of co-stimulatory molecules and MHC II on dendritic cells

DC2.4 cells were cultured in 24-well plates at a density of 30 000 cells/well overnight. Cells were respectively treated with 90  $\mu$ M of multifunctional fibrils and equal amount of soluble CpG, M2e peptide and IMQ was used. IFN $\gamma$  was used at a concentration of 20 ng/ml. After 16 h incubation, cells were mechanically detached and washed with PBS via centrifugation at 300g for 5 min. Cells were incubated for 30 min in FC blocking buffer before being washed with FACS buffer (PBS, 2% FBS (v/v), 2 mM EDTA). Immunolabeling of MHC II, CD86 and CD80 was done by incubating the cells for 45 min with anti-mouse MHCII (M5/114.15.2)/PE-Cyanine5 at 1:500, anti-CD40 (1C10)/PE mouse at 1:500 anti-mouse and CD80 (16-10A1)/PE-Cyanine 7 anti-mouse at 1:500, respectively, in FACS buffer. After washed, flow cytometry analysis was undertaken using CYTOFLEX, on 10,000 gated cells/samples with the corresponding filters for PE, PE-Cy7

and PE-Cy5. Data were analyzed using the Cytexpert software and results expressed as a ‘fold change’ relative to the average fluorescence of the control cells treated with buffer alone. Experiment was carried with at least three times in triplicate and data were average and expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

#### 2.7.15 Mice immunization

All protocols were approved by the institutional committee (CIPA: institutional committee for the protection and use of animals of the Université du Québec à Montréal) according to the regulations of the Canadian Council on Animal Care. Eight-week-old female BALB/c mice (8 mice/group) were immunized intramuscularly with 100  $\mu$ L (30 nmol/mouse) of soluble M2e antigen or fibrils, in presence or absence of 20  $\mu$ g of CpG 1826. Control mice received sterile 50 mM Tris-HCl pH 7.4. This immunization was undertaken 3 times, with a period of 2 weeks between each immunization, *i.e.* at day 1, day 15, and day 29. Body weight was monitored daily. Blood samples from the saphenous vein were taken the day before each immunization, *i.e.* at day 0, day 14, and day 28.

#### 2.7.16 Determination of anti-M2e IgG antibody titers

M2e-specific IgG antibody titers were obtained by indirect ELISA. High-binding 96-well plates were coated with 2  $\mu$ g/well of M2e peptide solubilized in 0.05 M sodium carbonate buffer pH 9.6 overnight at 4°C. Plates were extensively washed with PBS-T, blocked for 1 h with 1% (w/v) BSA and washed with PBS-T. Determination of titers was performed using serial dilutions (1/2) of mouse sera starting at 1:65 in PBS-T (1% BSA). After 3 h incubation, plates were washed four times with PBS-T and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:10,000), IgG1 (1:10,000), IgG2a (1:5,000), IgG2b (1:5,000) or IgG3 (1:5,000) was added in PBS-T for 1 h. After an additional wash, TMB/peroxide substrate was added for 20 min and the reaction was stopped by the addition of 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance at 450 nm was measured. By plotting a regression curve ( $y = (b + cx)/(1 + ax)$ ) of the different serum dilutions as a function of the OD, the antibody titers were obtained. Endpoint titers represent the largest dilution point having an optical density 2-fold higher than the respective blanks (*i.e.* without serum).

### 2.7.17 Influenza A viral experimental challenge

This experiment took place under biocontainment level 2. Two weeks following the final immunization, an intranasal instillation of  $5 \times LD_{50}$  of influenza A/PuertoRico/8/1934 H1N1 virus (GenBank accession number: ABD77677.1) in endotoxin-free PBS was performed in mice previously anesthetized by isoflurane inhalation. Body weights and clinical signs were recorded twice daily. The clinical score scale (0, normal state, no symptoms; 1, slightly ruffled fur; 2, ruffled fur but active mouse; 3, ruffled fur and inactive mouse) (**Table S1**) were monitored daily. Mice that reached a clinical score of 3, or showed a lost of over 20% of their initially weight, were euthanized.

### 2.7.18 Data analysis

Data were expressed as means  $\pm$  standard errors of the means (S.E.M.). One-way and two-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey's correction with multiple comparisons were performed using GraphPad Prism software. Values of  $P < 0.01$  were considered significant. Significance levels are represented using asterisks with \*,  $P = 0.01$ ; \*\*,  $P=0.001$ ; \*\*\*,  $P=0.0001$ ; and \*\*\*\*,  $P<0.0001$ .

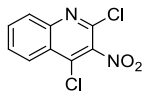
## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funding from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grants RGPIN-2018-06209 (S.B.) and RGPN-2016-06532 (D.A.), from the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) grant 296556 (D.G., D.A, S.B.), and from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant 448306 (D.A, S.B.). M.C-C. acknowledges a fellowships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

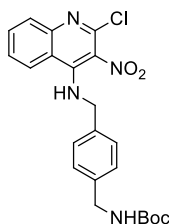


## 2.8 Supporting information

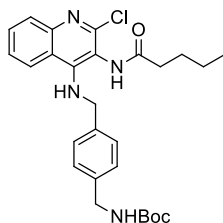
### **Synthesis of N-(4-((4-amino-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c]quinoline-1-yl)methyl)benzyl)-6-azidohexanamide (9; azido-IMQ)**



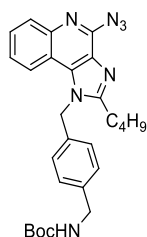
**2,4-Dichloro-3-nitroquinoline (2)** was prepared according to known protocol.<sup>i</sup>



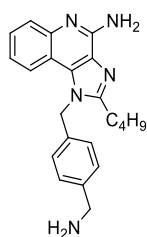
**Tert-butyl 4-(((2-chloro-3-nitroquinolin-4-yl)amino)methyl)benzyl)carbamate (4)** was prepared according to known protocol.<sup>ii</sup>



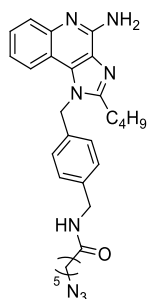
**Tert-butyl 4-(((2-chloro-3-pentanamidoquinolin-4-yl)amino)methyl)benzyl)carbamate (5)** To a solution of **4** (807.2 mg, 1.823 mmol) in EtOAc (10 mL), were added platinum (IV) oxide (41.4 mg, 0.182 mmol, 0.1 equiv.) and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25.9 mg, 0.182 mmol, 0.1 equiv.). The mixture was subjected to hydrogenation at 50 psi hydrogen pressure overnight. The mixture was then filtered through celite and the filtrate was evaporated under vacuum providing the amine intermediate. To the crude amine dissolved in anhydrous THF (57 mL) was added triethylamine (0.33 mL, 2.369 mmol, 1.3 equiv.) and valeroyl chloride (0.24 mL, 2.004 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was dissolved in EtOAc (25 mL) and washed with water (15 mL). The organic fraction was then dried using Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography (silica gel, EtOAc/CHCl<sub>3</sub>, 1:9-1:3) to give **5** as a white amorphous solid (560.6 mg, 1.130 mmol, 62% over three steps). The spectroscopic data derived from compound **5** match with those reported in the literature.<sup>iii</sup>



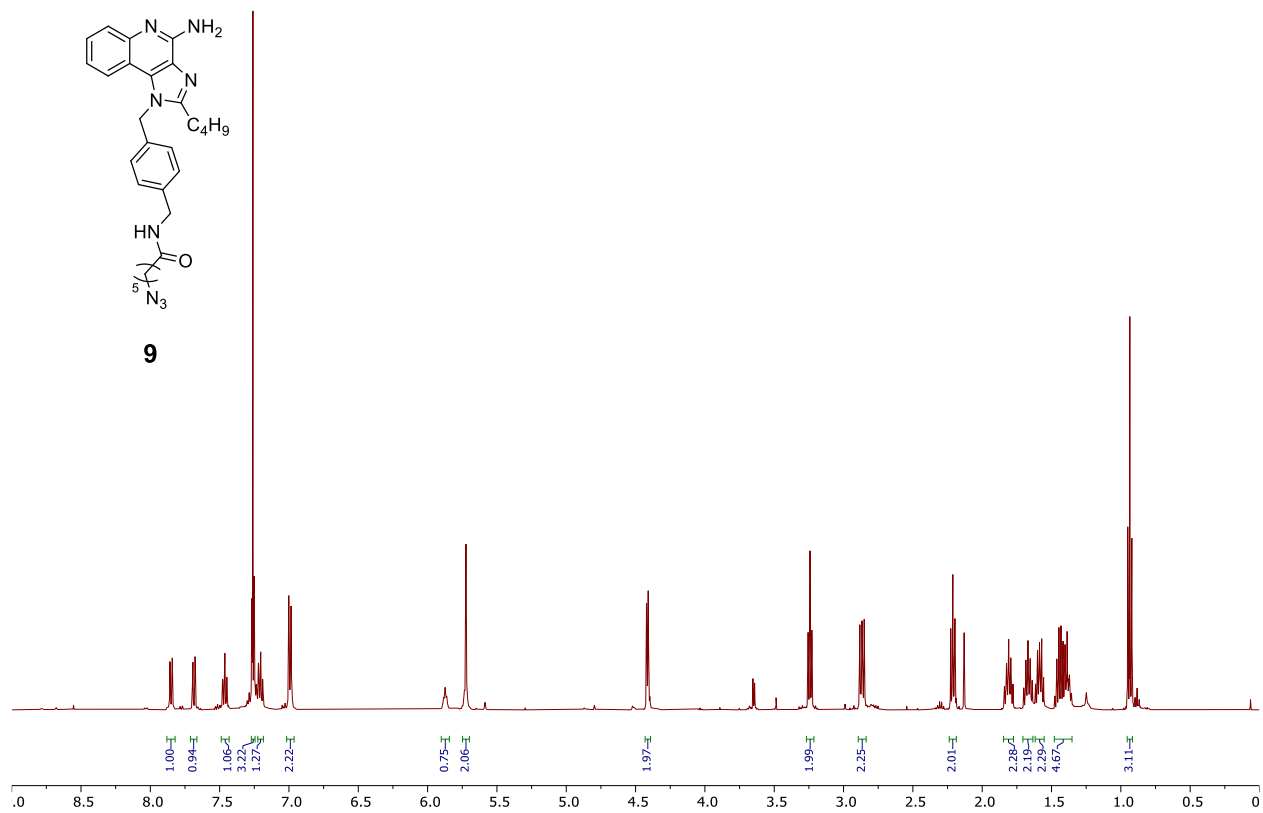
**Tert-butyl (4-((4-azido-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c]6,9-quinoline-1-yl)methyl)benzyl)carbamate (6)** was prepared according to known protocol.<sup>3</sup>



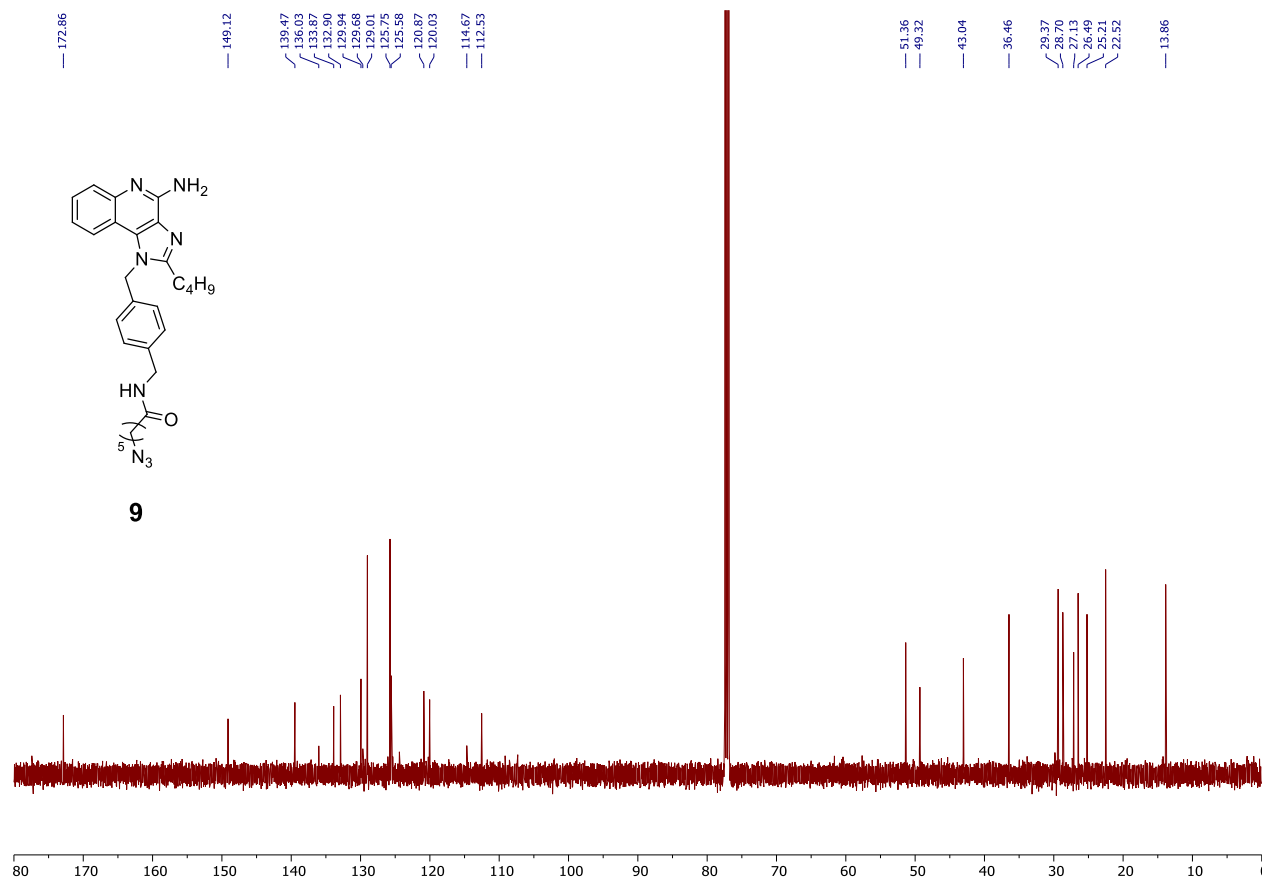
**1-(4-(Aminomethyl)benzyl)-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c]6,9-quinoline-4-amine (7)** was prepared according to known protocol<sup>3</sup> and used without further purification.



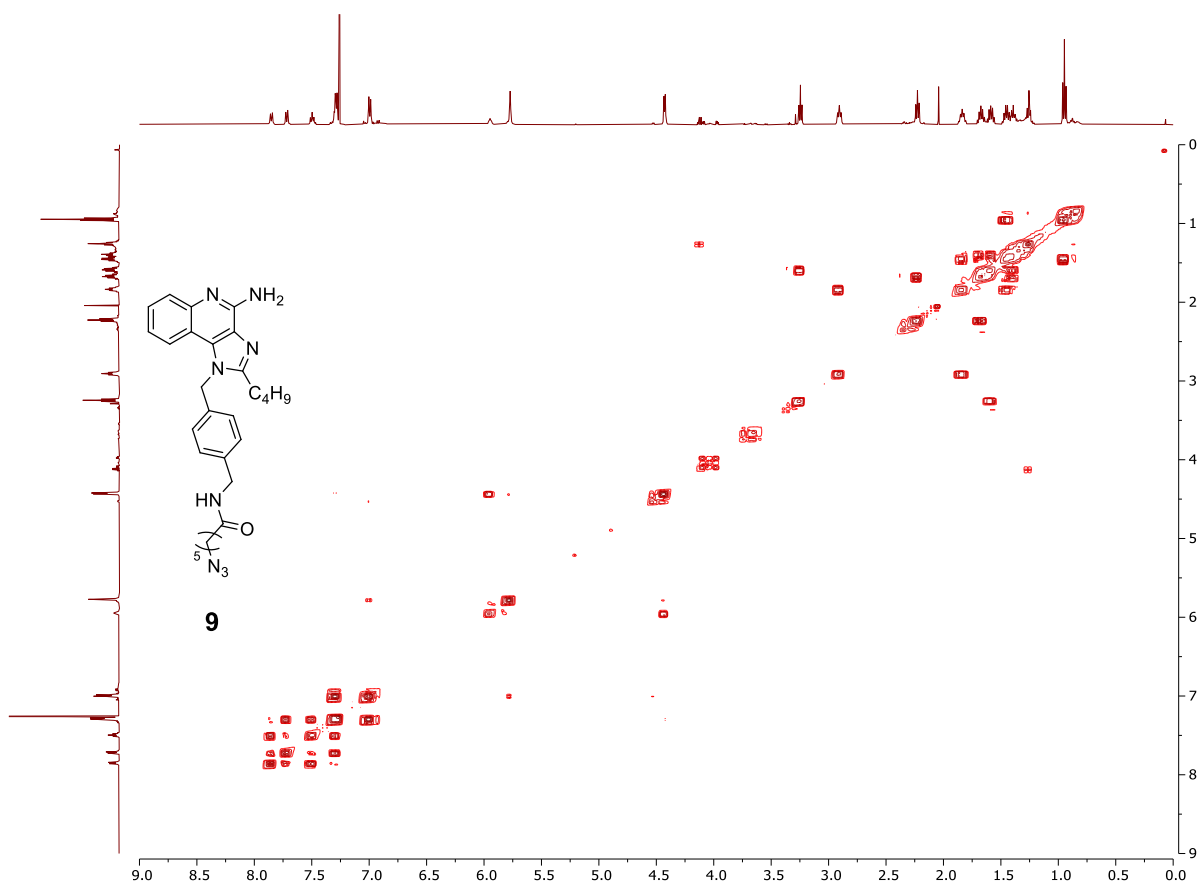
**N-(4-((4-amino-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c]6,9-quinoline-1-yl)methyl)benzyl)-6-azidohexanamide (9)** : To a solution of 6-azido-hexanoic acid (8) (60.0 mg, 0.3785 mmol, 1.1 equiv.) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> at 0°C was added oxalyl chloride (32 μL, 0.3785 mmol, 1.1 equiv.) and 2 drops of DMF. The solution was stirred 20 minutes at 0°C. This solution was added to a solution of compound 7 in MeOH (1.55 mL) and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (0.30 mL) at room temperature. The mixture was stirred 30 minutes at this temperature, concentrated under reduced pressure and the crude solid was purified by flash column chromatography (silica gel, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:49-1:9) to give 9 as a white amorphous solid (63.3 mg, 0.1270 mmol, 46% over three steps); R<sub>f</sub> = 0.34 (silica, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:19); IR (ATR, NaCl) ν 3276, 2934, 2096, 1653, 1558, 909, 732 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.85 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.50 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.32 – 7.27 (m, 3H), 6.99 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 5.95 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 5.77 (s, 2H), 4.43 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.25 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.91 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.23 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.84 (p, J = 7.7 Hz, 2H), 1.67 (p, J = 7.6 Hz, 2H), 1.59 (p, J = 7.3 Hz, 2H), 1.49 – 1.36 (m, 4H), 0.95 (t, J = 7.4 Hz, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.9, 149.1, 139.5, 136.0, 133.9, 132.9, 129.9, 129.7, 129.0, 125.8, 125.6, 120.9, 120.0, 114.7, 112.5, 51.4, 49.3, 43.0, 36.5, 29.4, 28.7, 27.1, 26.5, 25.2, 22.5, 13.9 ppm; HRMS (ESI) m/z : [M + H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>8</sub>O<sup>+</sup> 499.2928, found 499.2942.



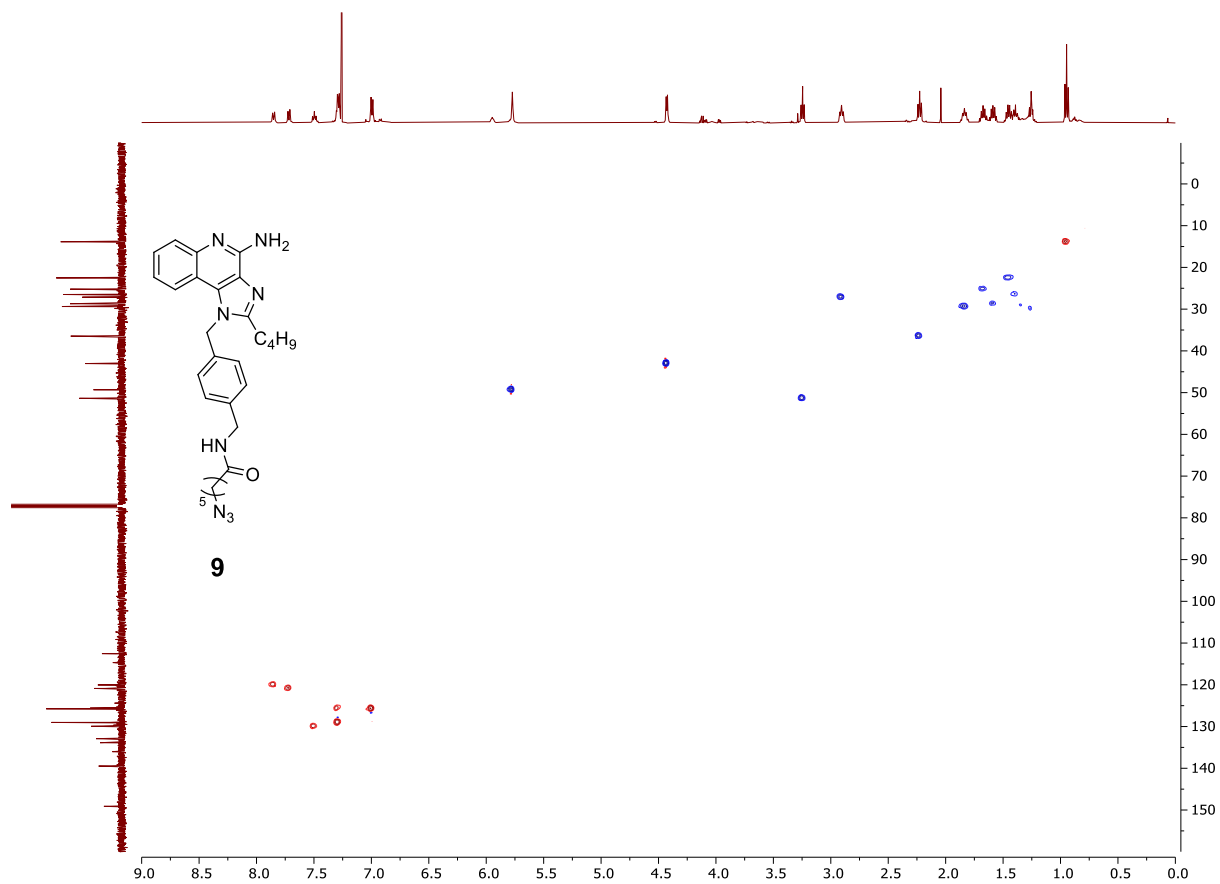
**Figure S1.** <sup>1</sup>H NMR Spectrum of compound 9 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).



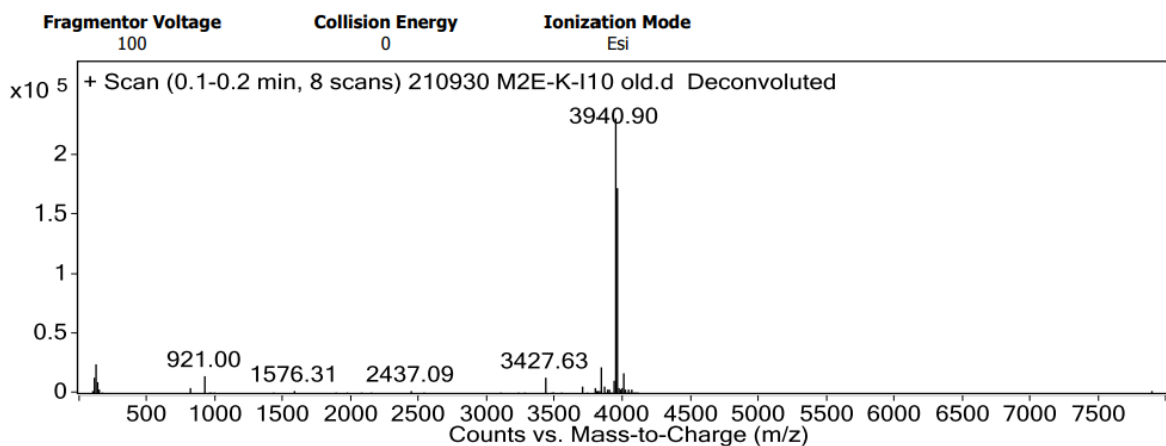
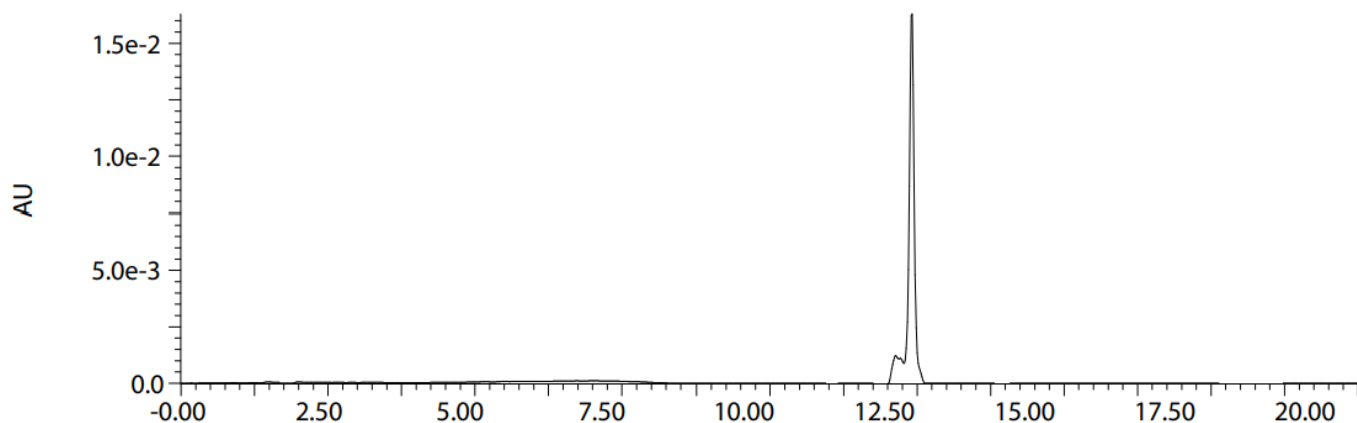
**Figure S2.** <sup>13</sup>C NMR Spectrum of compound 9 (CDCl<sub>3</sub>, 126 MHz).



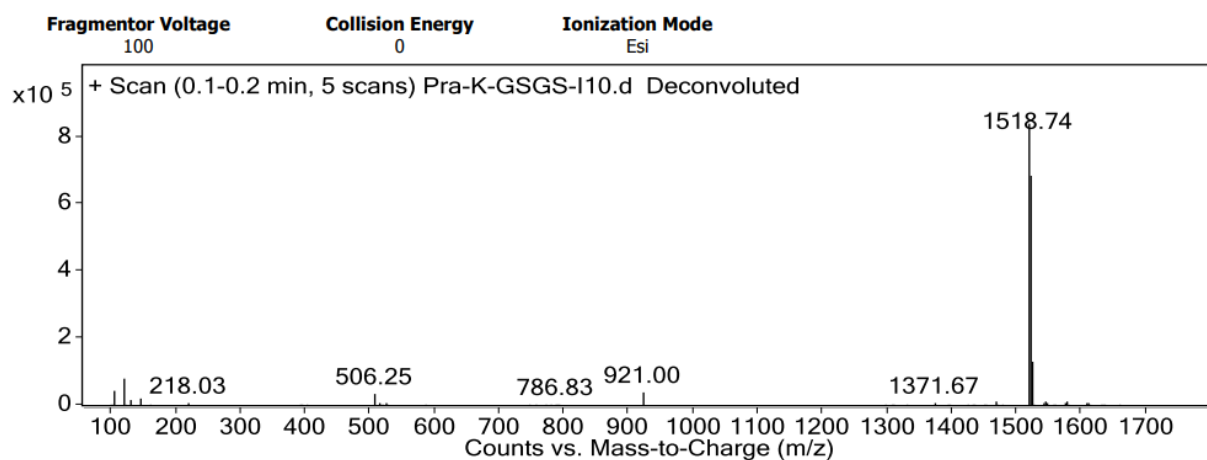
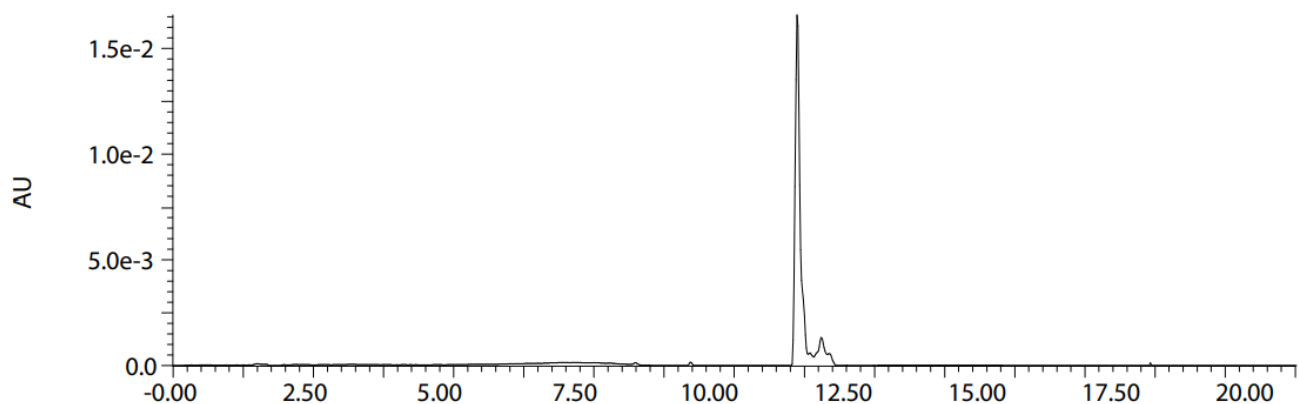
**Figure S3.** COSY NMR Spectrum of compound **9**.



**Figure S4.** HSQC NMR Spectrum of compound **9**.

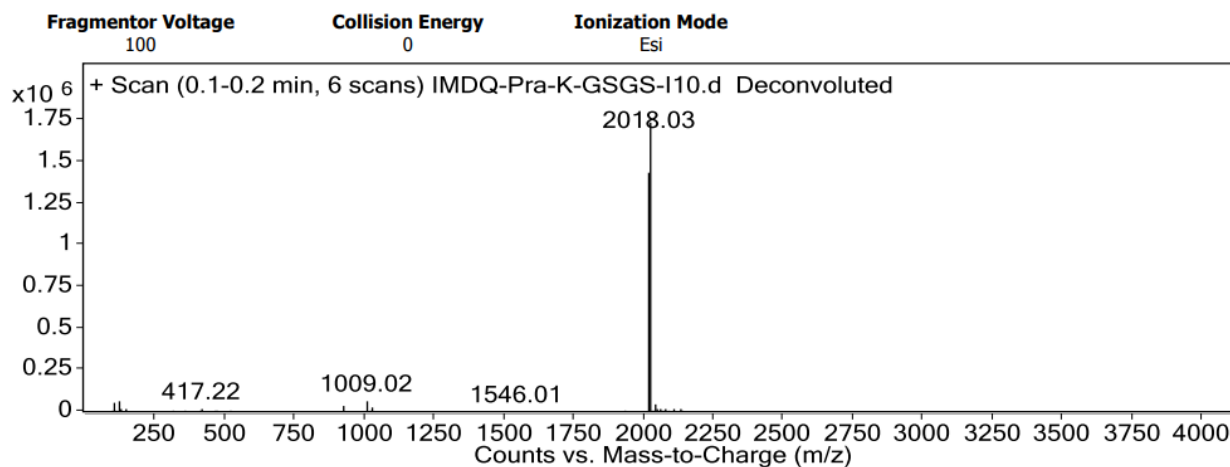
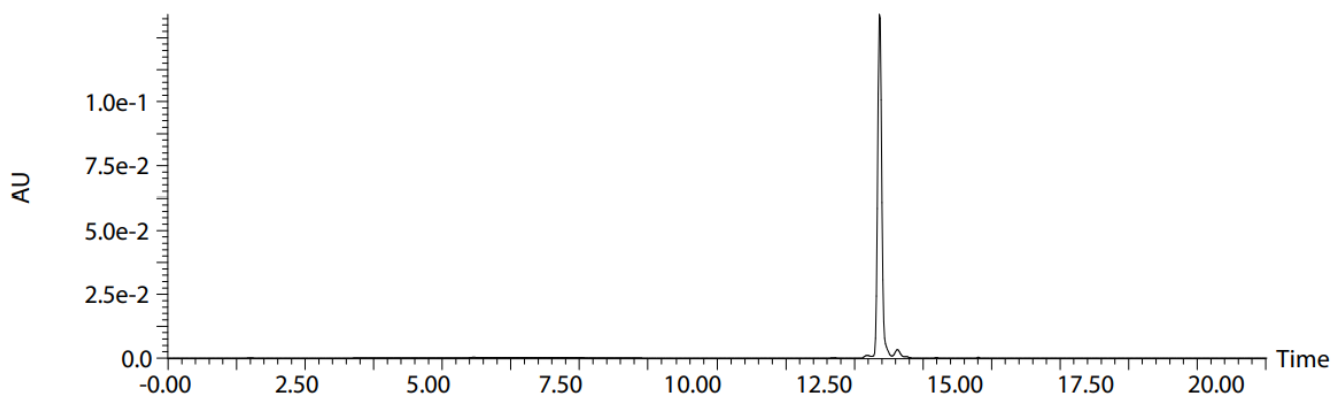


**Figure S5.** HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of M2e-I<sub>10</sub> peptide. HPLC analysis was carried out using a linear gradient of 20% to 60% acetonitrile in H<sub>2</sub>O/TFA (0.06%) for 20 min. with a C<sub>18</sub> column and absorbance was measured at 229nm. Mass spectrometric analysis was undertaken using an ESI-TOF mass spectrometer.

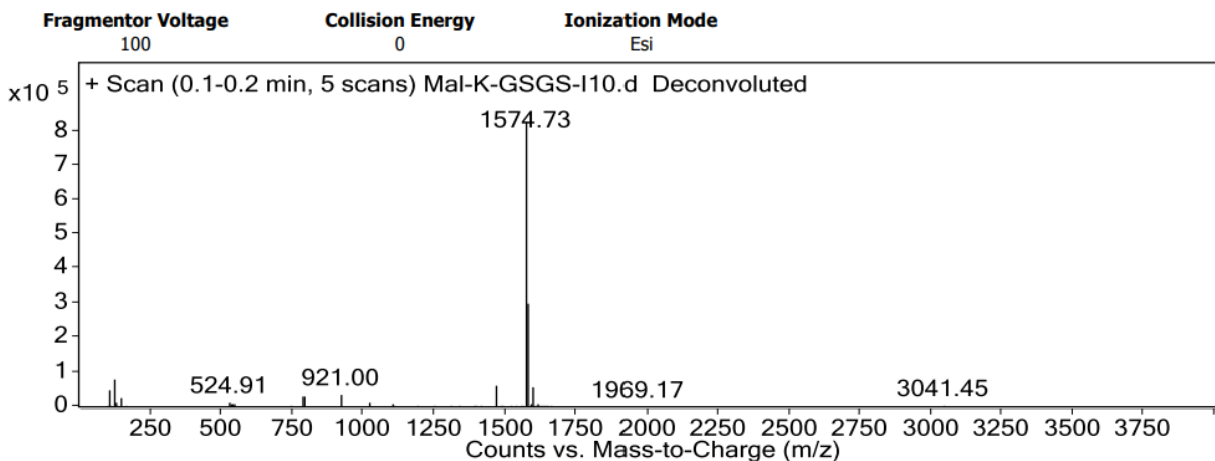
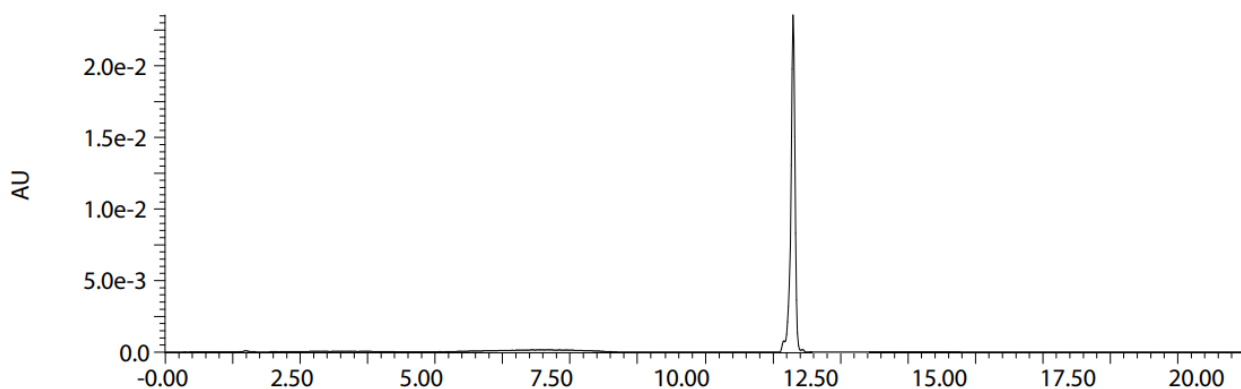


**Figure S6.** HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of Pra-I<sub>10</sub> peptide. HPLC analysis was carried out using a linear gradient of 20% to 60% acetonitrile in H<sub>2</sub>O/TFA (0.06%) for 20 min. with a C<sub>18</sub> column and absorbance was measured at 229nm. Mass spectrometric analysis was undertaken using an ESI-TOF mass spectrometer.

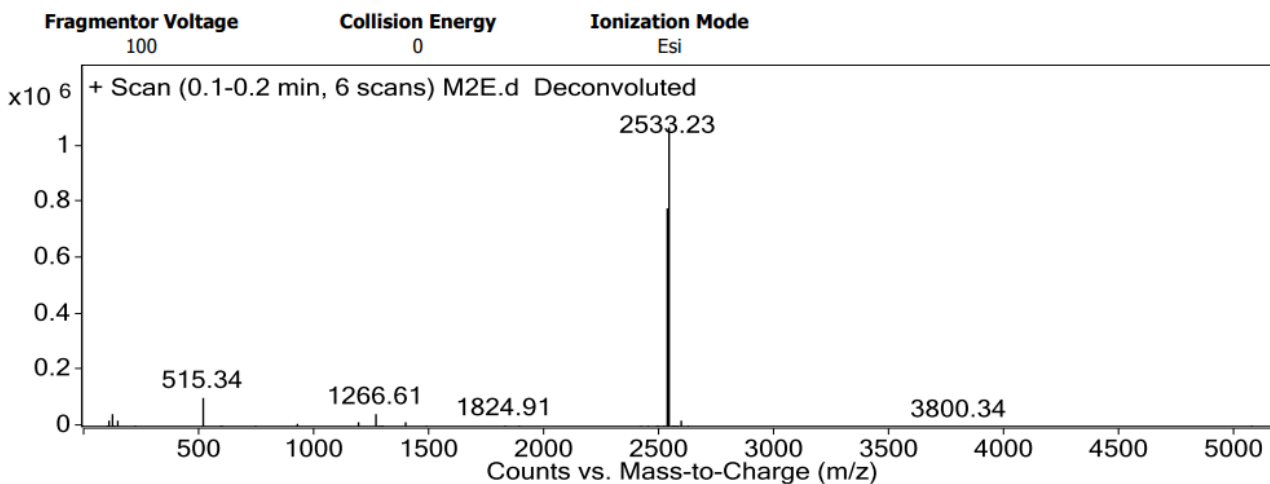
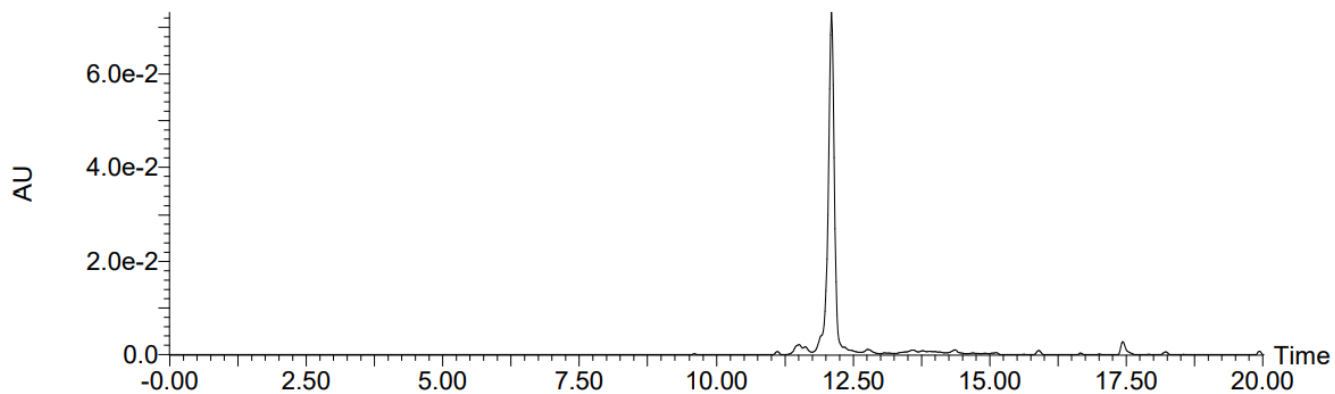




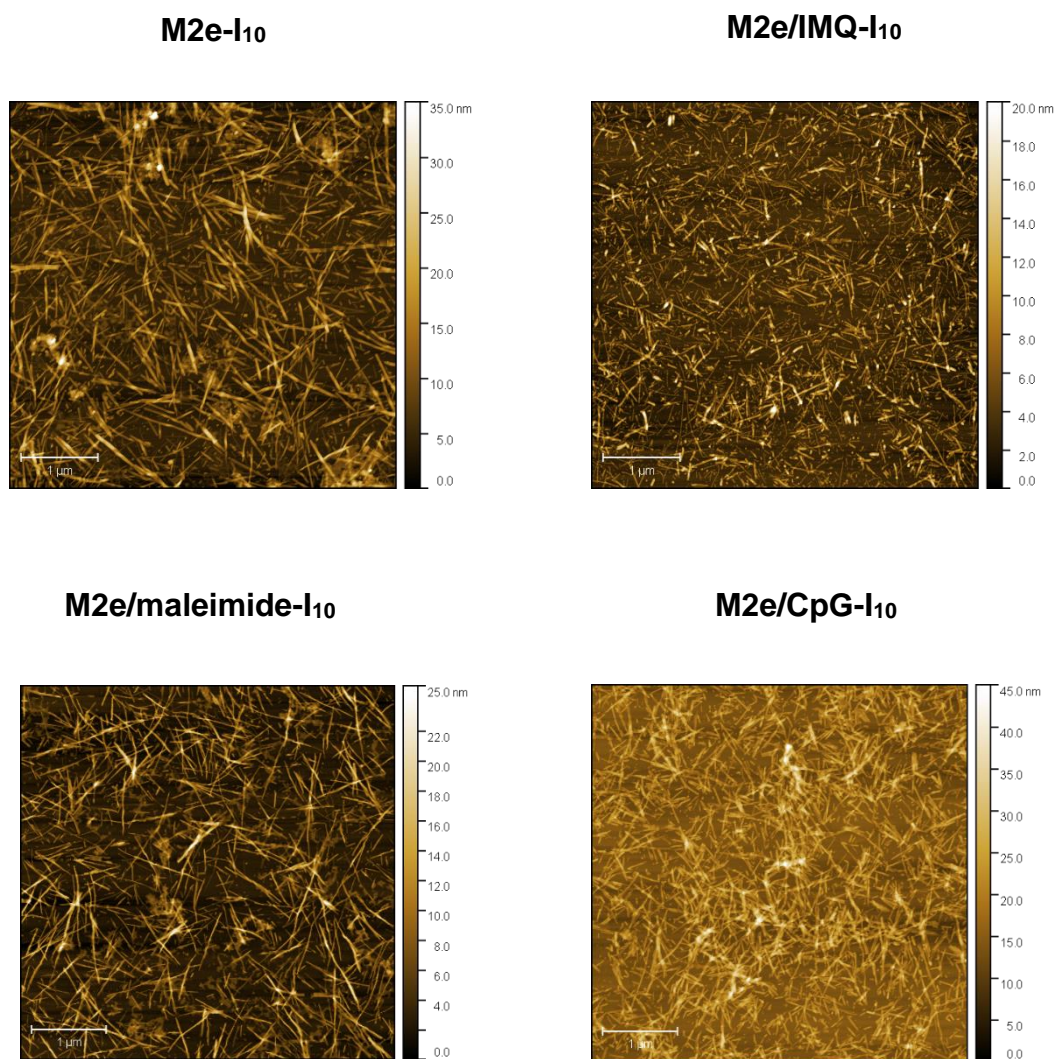
**Figure S7.** HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of IMQ-I<sub>10</sub> peptide. HPLC analysis was carried out using a linear gradient of 20% to 60% acetonitrile in H<sub>2</sub>O/TFA (0.06%) for 20 min. with a C<sub>18</sub> column and absorbance was measured at 229nm. Mass spectrometric analysis was undertaken using an ESI-TOF mass spectrometer.



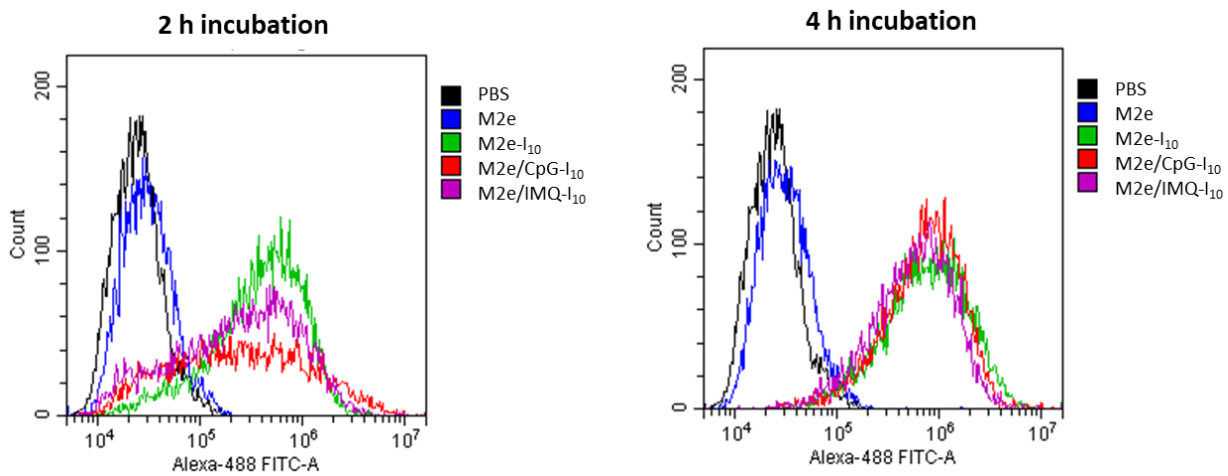
**Figure S8:** HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of maleimide-I<sub>10</sub> peptide. HPLC analysis was carried out using a linear gradient of 20% to 60% acetonitrile in H<sub>2</sub>O/TFA (0.06%) for 20 min. with a C<sub>18</sub> column and absorbance was measured at 229nm. Mass spectrometric analysis was undertaken using an ESI-TOF mass spectrometer.



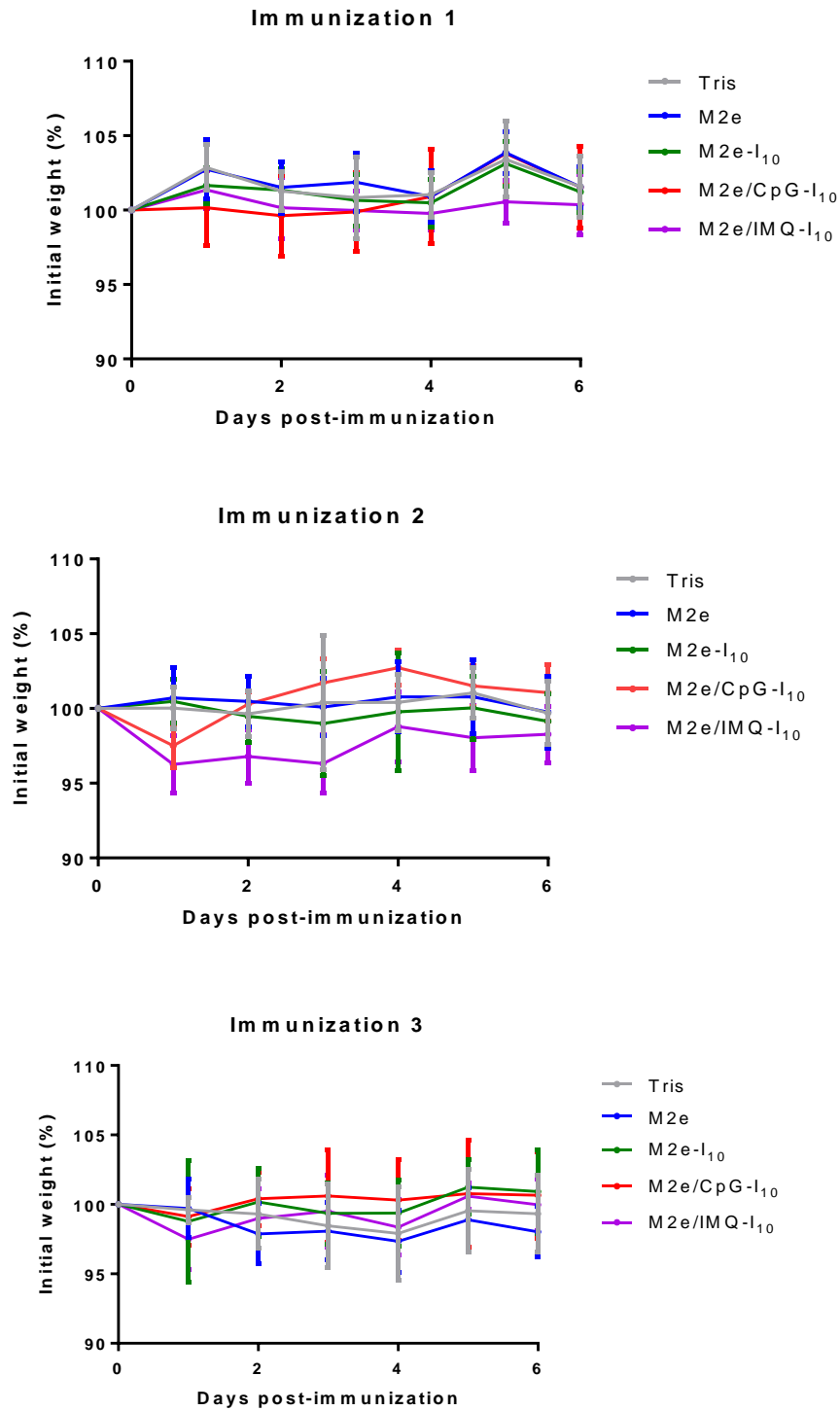
**Figure S9.** HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of M2e peptide. HPLC analysis was carried out using a linear gradient of 20% to 60% acetonitrile in H<sub>2</sub>O/TFA (0.06%) for 20 min. with a C<sub>18</sub> column and absorbance was measured at 229nm. Mass spectrometric analysis was undertaken using an ESI-TOF mass spectrometer.



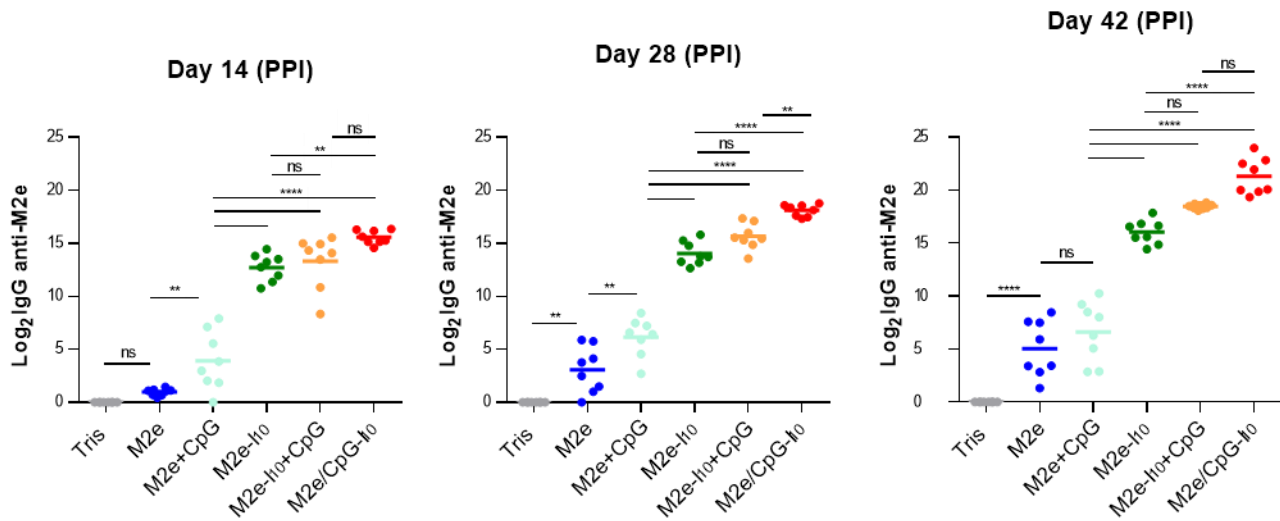
**Figure S10.** Representative AFM images of I<sub>10</sub> nanofilaments. M2e-I<sub>10</sub> and IMQ-I<sub>10</sub> were co-assembled (M2e/IMQ-I<sub>10</sub>) for 48 h while the M2e-I<sub>10</sub>, M2e/maleimide-I<sub>10</sub> and M2e/CpG-I<sub>10</sub> assemblies were obtained after 96 h RT incubation under constant agitation. Scale bar is 1 μm.



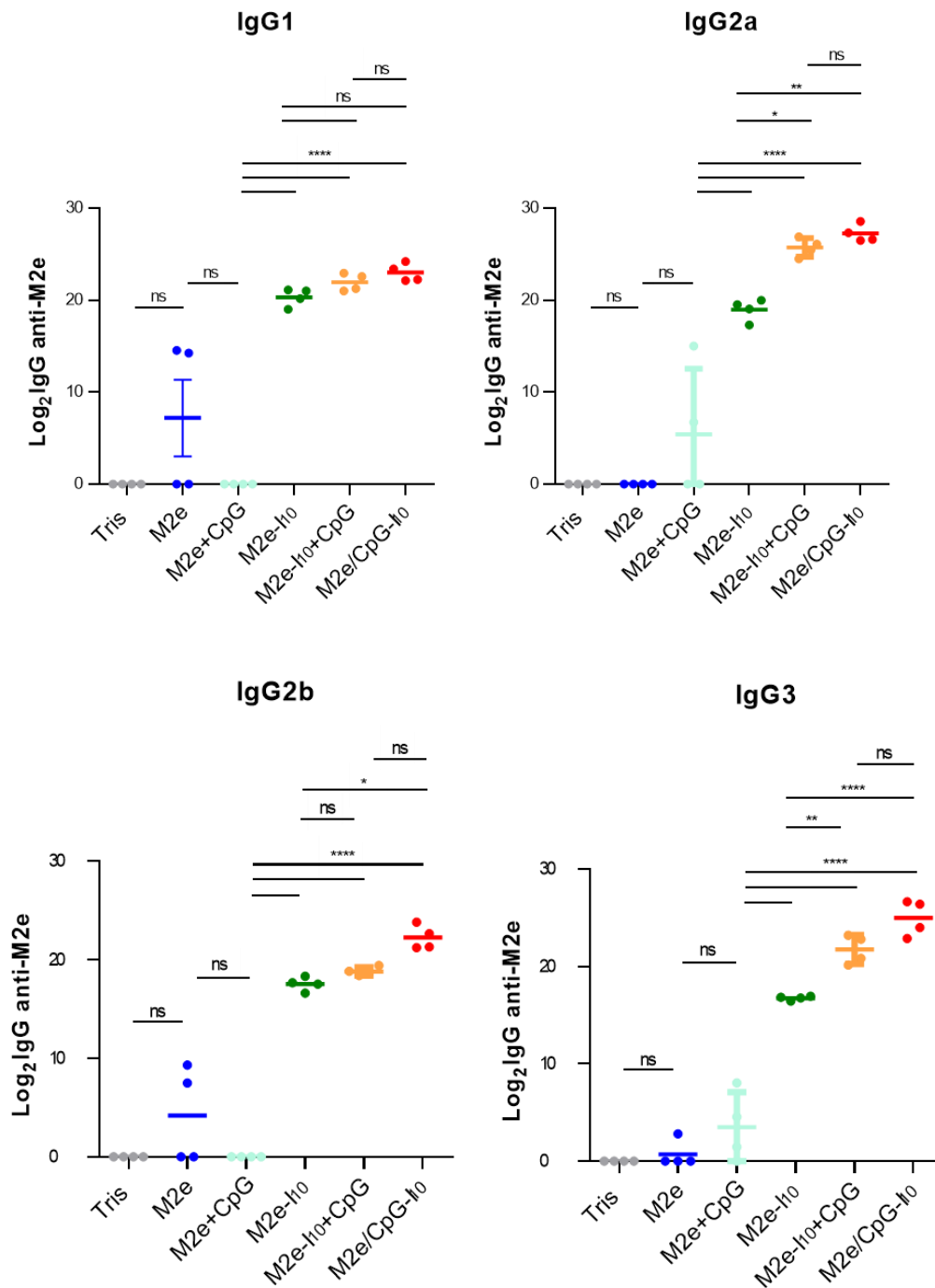
**Figure S11.** Flow cytometry histograms of DC2.4 cells incubated for 2 h and 4 h with 30  $\mu$ M of assemblies, or molar equivalent of Alexa488-M2e monomeric peptide.



**Figure S12.** Weight of immunized mice. Mice were immunized intramuscularly with 100  $\mu$ L of sterile 50 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 30 nmol/mouse of M2e antigen. Control mice received sterile 50 mM Tris-HCl pH 7.4. Following each immunization, the body weight of the mice were measured daily for 6 days upon immunization.

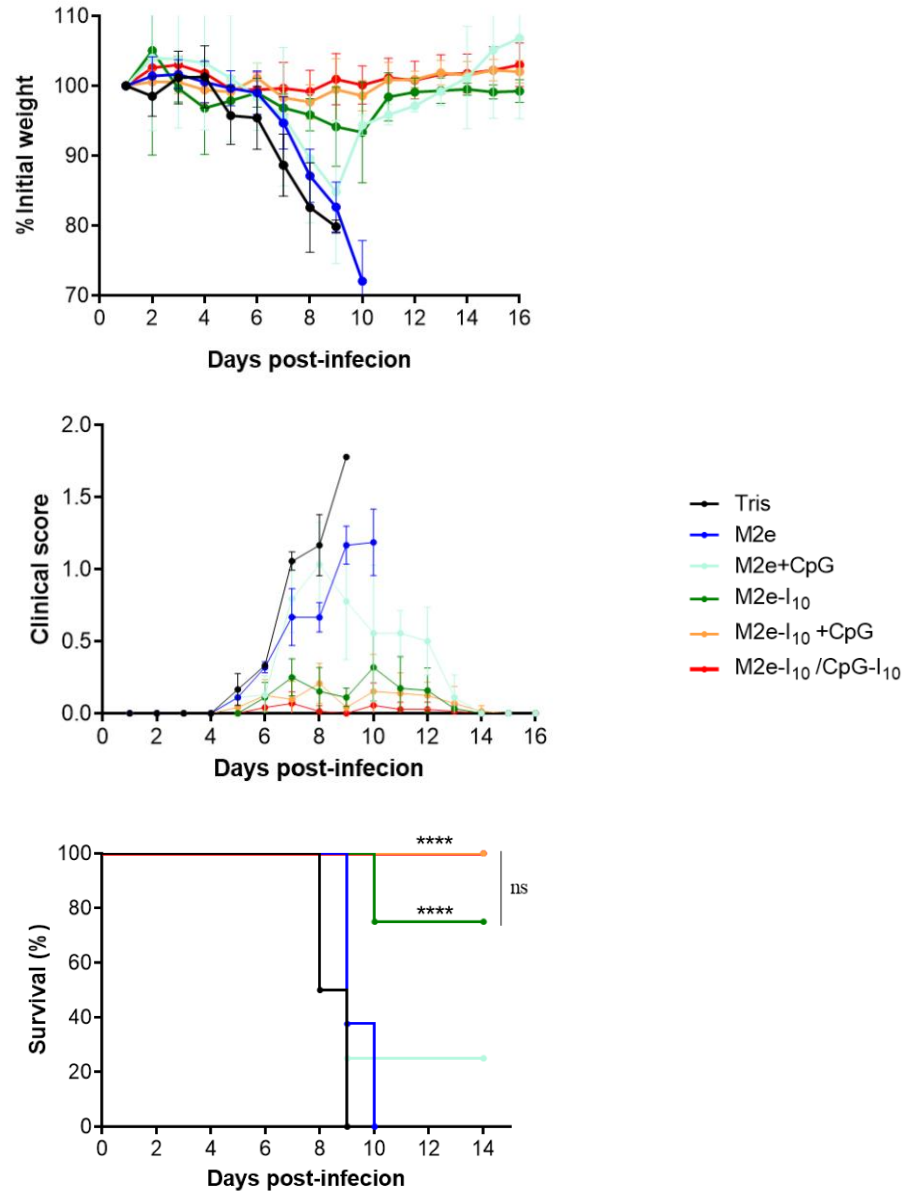


**Figure S13.** Total IgG anti-M2e titer in sera of immunized mice 14 days after primary immunization (day 14 PPI), 1<sup>st</sup> boost (day 28 PPI), and 2<sup>nd</sup> boost (day 42 PPI). Mice were immunized intramuscularly with 100  $\mu$ L of sterile 50 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 30 nmol/mouse of M2e antigen, with or without 20  $\mu$ g of soluble CpG (molar equivalent to the M2e/CpG-I<sub>10</sub>). Control mice received sterile 50 mM Tris-HCl pH 7.4. Data represent the mean and statistical significance between groups ( $n = 8$  mice) was assessed using one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns: not significant).



**Figure S14.** M2e-specific IgG isotypes in mice sera following the 3<sup>rd</sup> immunization. Evaluation of IgG isotypes was undertaken using indirect ELISA. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. and statistical significance between groups ( $n = 4$  mice) was assessed using one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns: not significant).





**Figure S15.** Protection against a lethal influenza A virus inoculation. Mice were immunized intramuscularly with 100  $\mu$ L of sterile 50 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 30 nmol/mouse of M2e antigen. Control mice received sterile 50 mM Tris-HCl pH 7.4. (B) Two weeks after the 2<sup>nd</sup> boost,  $5 \times$  LD<sub>50</sub> of IAV H1N1 was administered intranasally to mice. Weight and clinical scores were monitored daily, and survival of infected mice was expressed as percentage of mice that survived the challenged in each vaccination group. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. and statistical significance between groups ( $n = 8$  mice) was assessed using one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns: not significant).

**Table S1.** Mass spectrometry analysis of peptides

<b>Peptide</b>	<b>Formula</b>	<b>Exact mass (Da)</b>	<b>Observed mass (Da)</b>
M2e	C <sub>105</sub> H <sub>169</sub> N <sub>33</sub> O <sub>40</sub>	2533.70	2533.23
M2e-I <sub>10</sub>	C <sub>164</sub> H <sub>263</sub> N <sub>51</sub> O <sub>62</sub>	3941.20	3940.90
Pra-I <sub>10</sub>	C <sub>64</sub> H <sub>102</sub> N <sub>20</sub> O <sub>23</sub>	1519.64	1518.74
IMQ-I <sub>10</sub>	C <sub>92</sub> H <sub>136</sub> N <sub>28</sub> O <sub>24</sub>	2018.27	2018.03
Mal-I <sub>10</sub>	C <sub>66</sub> H <sub>102</sub> N <sub>20</sub> O <sub>25</sub>	1575.66	1574.73

**Table S2.** Scale for clinical symptoms of influenza infection

<b>Intensity</b>	<b>Temperature</b>  (°C)	<b>Fur</b>	<b>Posture</b>	<b>Eyes</b>	<b>Ears</b>	<b>Response to stimuli</b>	<b>Activity</b>	<b>Feces</b>	<b>Dehydration</b>  (Pinch on skin)
<b>0</b>  (absent)	> 36	Smooth and even	Normal	Open	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
<b>1</b>  (light)	35-36	Fur loss	Slightly hunched back	Half-closed	Bent	Calm, curious	Reduced	Soft	Skin rapidly recovers
<b>2</b>  (moderate)	32-35					Delay in response	Immobile, reactive	Sticky	Skin slowly recovers
<b>3</b>  (severe)	< 32	Ruffled fur	Hunched back	Closed	Laid down	Inactive	Lethargic	Liquid	No recovery

## CHAPITRE III

### DISCUSSION

La vaccination constitue l'approche la plus efficace pour la prévention et le contrôle des maladies infectieuses, dont les infections respiratoires causées par le virus influenza (Janssens, 1992; Plummer et Manchester, 2011). À mesure du développement des technologies vaccinales et de l'avancement des connaissances sur le virus de la grippe, la vaccination antigrippale a considérablement évolué dans le temps afin de s'adapter aux divers défis rencontrés. Néanmoins, certaines limitations persistent, principalement en raison de l'importante variation antigénique des virus grippaux (Francis *et al.*, 2019; Hannoun, 2013; Krammer *et al.*, 2018; Mosnier *et al.*, 2018). Afin de pallier cette contrainte, les recherches concentrent leurs efforts à l'évaluation d'antigènes grippaux conservés, tel que l'antigène M2e. Cependant, les vaccins sous-unitaires constitués de peptides solubles sont faiblement immunogéniques et nécessitent l'utilisation de plateformes de livraison vaccinales et/ou la supplémentation d'adjuvants. À cet effet, les peptides ayant la capacité de s'auto-assembler en filaments avec une structure quaternaire en feuillets- $\beta$ -croisés sont prometteurs. Dans ce contexte, l'objectif principal de ce projet de maîtrise visait à utiliser le co-assemblage moléculaire de peptides distinctement fonctionnalisés afin d'élaborer une plateforme de livraison nanovaccinale multifonctionnalisée. La fonctionnalisation de l'antigène M2e ainsi que d'adjuvants biaisant la réponse immunitaire en Th1, soit les agonistes des récepteurs TLR7 ou TLR9, sur notre plateforme nanovaccinale à base de peptides d'auto-assemblage I<sub>10</sub> (IAPP20-29), visait à développer des nanovaccins antigrippaux universels entièrement synthétiques. Deux agonistes TLR synthétiques de nature et de taille différentes, nécessitant donc des approches différentes pour leur fonctionnalisation orthogonale sur la plateforme nanovaccinale, ont été employés, soulignant ainsi la versatilité et la robustesse de la plateforme nanovaccinale. De par sa petite taille, l'agoniste TLR7/8 (IMQ) a pu être fonctionnalisé directement sur le monomère peptidique d'auto-assemblage I<sub>10</sub>, soit avant le co-assemblage, à l'aide de la chimie click azide-alcyne. À l'opposé, l'agoniste TLR9 (CpG), a été fonctionnalisé sur la plateforme vaccinale pré-assemblée, soit suite au co-assemblage, à l'aide d'une méthode de conjugaison thiol-maléimide, en raison de sa taille moléculaire élevée et de sa haute densité de charges négatives pouvant empêcher l'auto-assemblage.

### 3.1 Design, synthèse et caractérisation d'une nanoplateforme vaccinale multifonctionnalisée et versatile

Les analyses MS et HPLC ont permis de confirmer l'identité et la pureté des peptides M2e-I<sub>10</sub>, Mal-I<sub>10</sub> et IMQ-I<sub>10</sub> (Figures S5 à S9 et tableau S1). Par la suite, les résultats obtenus via la spectroscopie de DC, la spectrophotométrie (ThT et ANS) et la microscopie (TEM et AFM) ont permis de mettre en évidence la conversion des peptides monomériques fonctionnalisés en nanofilaments avec une structure en feuillets- $\beta$ -croisés après 96 h pour les plateformes nanovaccinales M2e-I<sub>10</sub> et M2e-I<sub>10</sub>/CpG-I10 et après 48h pour M2e-I10/IMQ-I10 (Figures 2.2 et S10). Ainsi, la fonctionnalisation des nanoparticules peptidiques I<sub>10</sub> en N-terminal n'interfère pas avec leur capacité d'auto-assemblage/de repliement. L'analyse ELISA des plateformes vaccinales formées permis, quant à elle, de mettre en valeur l'accessibilité des antigènes M2e à la surface de ces nanofilaments (Figure 2.2). Néanmoins, il aurait été pertinent d'également évaluer l'accessibilité des adjuvants, par exemple via spectroscopie infrarouge, particulièrement pour l'IMQ étant donné que son importante hydrophobicité peut mener à son enfouissement au sein des nanoassemblages; ce phénomène étant moins probable pour l'adjuvant CpG étant donné sa polarité et sa densité de charge élevée.

L'analyse du zêta potentiel des plateformes vaccinales permet de révéler différentes charges au niveau des plateformes co-assemblées ou mélangées après l'assemblage (Annexe 1 et 2). En somme, ces résultats soulignent indirectement le co-assemblage et non l'auto-assemblage de façon distincte des peptides monomériques M2e-I<sub>10</sub> et IMQ-I<sub>10</sub> ou Mal-I10. Malgré que certaines études ont préalablement démontré l'efficacité du co-assemblage supramoléculaire, il aurait été pertinent d'évaluer le co-assemblage de nos plateformes vaccinales de façon plus directe. De plus, il aurait été intéressant d'évaluer si les plateformes multifonctionnalisées s'assemblent en suivant le ratio stœchiométrique utilisé pour le co-assemblage. Ces essais auraient pu être entrepris par le biais d'un test immunomarquage aux particules d'or anti-M2e à l'aide de microscopie TEM (Taş *et al.*, 2022).

La conjugaison du CpG à la plateforme M2e-I<sub>10</sub>/Mal-I<sub>10</sub> pour former M2e-I<sub>10</sub>/CpG-I10 fut également confirmée à l'aide du zêta potentiel ainsi que par électrophorèse et HPLC. Ainsi, les deux stratégies entreprises pour l'élaboration des plateformes vaccinales multifonctionnalisées M2e-I10/IMQ-I10 et M2e-I10/CpG-I10 ont indéniablement fonctionné, soulignant ainsi la

versatilité de notre plateforme. Cela dit, l'approche de conjugaison post-assemblage possède certaines limites. En effet, il aurait été pertinent de déterminer le degré de conjugaison du CpG sur la plateforme et donc la proportion de CpG soluble contenue dans les fractions M2e-I<sub>10</sub>/CpG-I<sub>10</sub>. Cela aurait pu être entrepris via traitement des images d'électrophorèse par des logiciels de quantification tel que ImageJ, ou en dosant via spectroscopie la quantité de CpG retrouvé dans le surnageant à la suite d'une centrifugation, ou encore en mesurant la proportion de maléimide demeurant libre par spectroscopie infrarouge.

### 3.2 Les nanoplateformes vaccinales multifonctionnalisées sont cytocompatibles et permettent d'activer la réponse immunitaire innée *in vitro*.

Les fibres amyloïdes ont longtemps été considérées comme toxiques chez l'humain. Toutefois, les études plus récentes associent cette toxicité à l'amyloïdogenèse et plus particulièrement aux oligomères transitoires formés au cours de ce processus et non aux fibres matures (Habibi *et al.*, 2016; Kaye, Rakez *et al.*, 2003; Kaye et Lasagna-Reeves, 2013; Sakono et Zako, 2010; Zottig, X. et 2021). Afin d'assurer l'innocuité de nos plateformes vaccinales, leur biocompatibilité fut confirmée par le biais de tests métaboliques *in vitro*, lesquels ont révélé une viabilité de 100% pour les cellules exposées aux nanoplateformes multifonctionnalisées M2e-I<sub>10</sub>/IMQ-I<sub>10</sub> et M2e-I<sub>10</sub>/CpG-I<sub>10</sub> (Annexe 3). Il aurait été intéressant d'également évaluer la cytotoxicité des espèces monomériques et oligomériques de ces nanoplateformes.

L'utilisation de lignées HEK-Blue TLR2/6 possédant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur NF- $\kappa$ B/AP-1 a permis de démontrer l'activation dose-dépendante du TLR2 par les nanofilaments multifonctionnalisés M2e-I<sub>10</sub>/IMQ-I<sub>10</sub> et M2e-I<sub>10</sub>/CpG-I<sub>10</sub>. Ainsi, malgré la fonctionnalisation de l'antigène M2e et d'adjuvants de relativement grande taille sur les nanofilaments, ces derniers conservent leur capacité à activer le TLR2 (Figure 2.4). De ce fait, les nanoplateformes élaborées sont plurivalentes, puisqu'elles servent à la fois de système de livraison pour l'antigène et l'adjuvant, ainsi que d'immunostimulateur.

L'internalisation des nanofilaments multifonctionnalisés M2e-I<sub>10</sub>/IMQ-I<sub>10</sub> et M2e-I<sub>10</sub>/CpG-I<sub>10</sub> par les CPA a été évaluée étant donné que ce processus est primordial pour l'induction de la réponse immunitaire adaptative spécifique à M2e ainsi que pour l'activation des TLR7 et TLR9 endosomaux. Les résultats obtenus par cytométrie en flux et microscopie confocale ont

montré une internalisation accrue de ces nanoplateformes et ce de façon considérablement plus importante comparativement à l'antigène M2e soluble (Figures 2.3 et S11). Cette importante internalisation peut être associée à la capacité intrinsèque des nanofilaments avec une structure en feuillets- $\beta$ -croisés à activer le récepteur TLR2 ainsi qu'à leur taille supramoléculaire. En effet, l'activation d'un PRR extracellulaire est connue pour favoriser l'internalisation par les CPA (Abbas *et al.*, 2011; Jeannin *et al.*, 2008). De même, de nombreuses études ont montré que les nanoparticules ayant une taille supérieure à 15 nm favorisent l'internalisation par les CPA (Taki et Smooker, 2015; Zhang, Y. N. *et al.*, 2019). Malencontreusement, il est difficile de dissocier l'effet de l'activation du TLR2 et l'effet de la taille sur l'internalisation des nanoplateformes par les CPA, étant donné que nos nanoplateformes vaccinales possèdent des tailles différentes et hétérogènes au sein d'un même échantillon.

Des lignées HEK-Blue TLR7 et HEK-Blue TLR9 ont à leur tour permis de mettre en évidence l'activation dose-dépendante de ces récepteurs par les nanoplateformes multifonctionnalisées M2e-I<sub>10</sub>/IMQ-I<sub>10</sub> et M2e-I<sub>10</sub>/CpG-I<sub>10</sub>, respectivement (Figure 2.4). Ces tests ont révélé une faible diminution de l'activation des TLR7 et TLR9 suite à la fonctionnalisation des adjuvants comparativement à leur équivalent soluble. Toutefois, leur activité d'agoniste TLR est largement conservée malgré leur fonctionnalisation sur la nanoplateforme.

Finalement, nous avons évalué si cette internalisation et activation des TLR permettait d'aboutir à l'activation des CPA par les nanoplateformes multifonctionnalisées. Cette activation des cellules immunitaires innées fut déterminée en mesurant l'expression de marqueurs de stimulation et de costimulation à la surface des CPA nécessaires à la présentation d'antigènes, notamment le CMHII, le CD80 et le CD40 (Figure 2.5). Les résultats obtenus par le biais de la cytométrie en flux ont permis de confirmer le caractère immunostimulant des nanoplateformes multifonctionnalisées, lesquelles ont doublé voire triplé l'expression des marqueurs d'activation à la surface des CPA. De plus, ces résultats ont également souligné l'importance de la multifonctionnalisation, étant donné que M2e-I<sub>10</sub>/IMQ-I<sub>10</sub> et M2e-I<sub>10</sub>/CpG-I<sub>10</sub> activent les CPA de façon significativement plus importante comparativement à la plateforme monovalente M2e-I<sub>10</sub>. Il aurait été intéressant d'également évaluer l'immunogénicité des nanoplateformes élaborées au niveau de cellules immunitaires adaptatives. Notamment via l'évaluation de la prolifération de

lymphocytes B et T à l'aide de l'étiquetage à l'ester succinimidyle de carboxyfluorescéine (CFSE) par le biais de cytométrie en flux (Muul *et al.*, 2011).

### 3.3 Les nanoplateformes vaccinales multifonctionnalisées stimulent la réponse adaptative spécifique à l'antigène M2e et confèrent une protection complète contre une infection expérimentale par l'IAV.

L'immunisation intramusculaire de souris Balb/c à trois reprises n'engendra aucune perte significative de poids, ce qui suggère une certaine innocuité de nos nanoplateformes vaccinales (Figure S12). De plus, une inflammation exacerbée peut conduire à de nombreuses complications et certaines études ont montré que la supplémentation de PAMP, tel que les agonistes TLR, au sein d'une formulation vaccinale pouvait mener à une inflammation relativement importante (Sabroe *et al.*, 2008; Scheenstra *et al.*, 2020). De ce fait, il aurait été pertinent d'également évaluer la réponse inflammatoire 2 h, 4 h, 6 h et 24 h suite aux immunisations, notamment via le dosage des cytokines IL-6 et TNF- $\alpha$  dans le sang et les muqueuses (BALF et NALF) par le biais d'ELISA (Coté-Cyr, 2022).

Les nanoplateformes vaccinales supplémentées ou non de CpG ont considérablement augmenté les titres d'anticorps M2e-spécifiques comparativement à l'antigène M2e soluble et au mélange M2e+CpG solubles, respectivement (Figures 2.6 et S13). Ces résultats soulignent l'importance de fonctionnaliser l'antigène viral sur une plateforme de livraison vaccinale. De fait, les nanoplateformes multifonctionnalisées, en l'occurrence M2e-I10/CpG-I10 et M2e-I10/IMQ-I10, ont nettement amélioré la réponse humorale comparativement à la nanoplateforme M2e-I10. Or, la nanoplateforme monovalente M2e-I10 supplémentée de CpG soluble (M2e-I10+CpG), n'a pas augmenté les titres d'anti-M2e de façon significative en comparaison à la plateforme monovalente seule, révélant ainsi l'intérêt et l'importance d'une telle multifonctionnalisation (Figure S13). Cette multifonctionnalisation possède de nombreux avantages, notamment l'amélioration de l'immunogénicité due à la co-livraison de l'antigène et de l'adjuvant ainsi qu'un degré plus élevé d'innocuité à travers la diminution de la toxicité hors cible liée aux agonistes TLR solubles (De Titta, A. , 2013; Irvine *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2019). De plus, la co-livraison d'antigènes et d'adjuvants permet de réduire les doses nécessaires à une immunisation efficace (De Titta, A. , 2013; Irvine *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2019).



Subséquentement, les souris furent soumises à une infection virale expérimentale avec  $5 \times LD_{50}$  du virus influenza PR8/H1N1. Les souris ayant été immunisées avec les nanoplateformes multifonctionnalisées n'ont pas eu de perte de poids ni de signes cliniques significatifs, contrairement aux souris immunisées avec l'antigène M2e soluble, le mélange M2e + CpG solubles, ainsi que la plateforme monovalente M2e-I10 (Figure 2.6 et S15). Ceci démontre leur capacité à contrôler l'infection, et ce de façon relativement précoce.

Ce contrôle de l'infection a conduit à la protection complète (100% de survie) des souris immunisées avec les nanoplateformes multifonctionnalisées M2e-I10/CpG-I10 et M2e-I10/IMQ-I10 face à l'infection létale, tandis que les souris immunisées avec la plateforme monovalente M2e-I10 et le mélange de M2e et CpG solubles (M2e+CpG) ont eu un taux de survie de 75% et 25%, respectivement. Les souris immunisées avec M2e ou CpG seul ont, quant à elles, été sacrifiées au jour 10 suivant l'infection (0% de survie) (Figure 2.6 et S15). Ces résultats sont sensiblement similaires à ceux obtenus dans le contexte d'autres études retrouvées dans la littérature. En effet, l'étude de Tao et al (2014) a rapporté un taux de survie de 100% pour les souris immunisées avec des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec l'antigène M2e et mélangé au CpG (M2e-AuNP+CpG), 65% de survie pour les souris immunisées avec la plateforme sans adjuvant (M2e-AuNP), 20% de survie pour M2e+CpG et 0% de survie pour l'antigène seul soluble (M2e), suite à une infection expérimentale utilisant une souche et une  $LD_{50}$  similaires à notre expérience (Tao *et al.*, 2014). Toutefois, le présent projet diffère de cette dernière étude à travers l'approche de multifonctionnalisation entreprise par le biais de co-assemblage de nanoparticules peptidiques, ce qui constitue une méthode plus sécuritaire étant donné la fonctionnalisation de l'agoniste TLR et l'utilisation de nanoparticules ayant une plus grande biocompatibilité. De plus, notre approche pourrait être sensiblement plus efficace étant donné la nature adjuvante intrinsèque des nanofilaments (activation TLR2/6) ainsi que la co-livraison d'antigène et d'adjuvant aux cellules immunitaires.

La protection complète conférée par les nanofilaments multifonctionnalisés révèle l'importance d'utiliser une plateforme de livraison vaccinale ainsi qu'un agoniste TLR en guise d'adjuvant. Les agonistes TLR7 et TLR9, IMQ et CpG respectivement, permettent l'augmentation, l'accélération et la prolongation de la réponse immunitaire spécifique à l'antigène. En effet,

diverses études ont montré une importante augmentation de la réponse humorale spécifique à l'antigène suite à l'immunisation de souris avec l'imiquimod (Li, C. *et al.*, 2018). De même, de nombreuses études ont démontré que le CpG permet une augmentation considérable de la réponse humorale illustrée par des titres d'anticorps plus importants jusqu'à trois ordres de grandeur, ainsi qu'une élévation de la réponse cellulaire représentée par des quantités de lymphocytes T CD4+ et T CD8+ de deux à trois fois plus importantes (Bode *et al.*, 2011; Mendez *et al.*, 2003). L'étude de Li et al (2018) révéla, quant à elle, une activation des lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques et la rate seulement 18 h après l'immunisation avec l'IMQ, laquelle permit une protection complète des souris suite à une infection expérimentale précoce, soit 3 jours après l'immunisation (Li, C. *et al.*, 2018). De même, l'étude de Klinman et al (2007) permit de mettre en évidence une immunité protectrice trois fois plus rapide, soit après 5 jours versus après 15 jours, suite à l'immunisation de souris avec un mélange d'AVA et de CpG comparativement à l'AVA seule (Bode *et al.*, 2011; Klinman *et al.*, 2007). Finalement, l'étude de Li et al (2018) a mis en valeur la longévité des réponses immunitaires lorsque l'IMQ est utilisé comme adjuvant vaccinal, illustrée par une réponse en anticorps qui dure plus de 1 an après l'immunisation (Li, C. *et al.*, 2018). Des avantages similaires ont été révélés pour le CpG en guise d'adjuvant, notamment au niveau de l'étude de Mendez et al (2003) ayant montré une prolongation de la protection suite à une réinfection 6 mois après l'immunisation (Mendez *et al.*, 2003). Un autre effet crucial de l'IMQ et du CpG pouvant contribuer à la protection complète conférée par les nanoplateformes multifonctionnalisées, est leur capacité à induire une réponse Th1 (Chu, Rose S *et al.*, 1997; Heeg, Klaus et Zimmermann, Stefan, 2000; Schön et Schön, 2007; Stanley, M., 2002). Cette réponse Th1 est importante pour une protection contre un agent pathogène intracellulaire tel que les virus, et plus particulièrement pour le virus de la grippe (Abbas *et al.*, 2011; Tamura *et al.*, 1996). En effet, les cellules auxiliaires T de type 1 (Th1) produisent de l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ), de l'interleukine 2 (IL-2) et du facteur de nécrose tumorale bêta (TNF- $\beta$ ) (Romagnani, 1999). L'IFN $\gamma$  est un médiateur antiviral permettant l'inhibition de la réplication virale à travers divers mécanismes. Par exemple, il diminue l'agglomération de l'acide sialique à la surface des cellules des voies respiratoires ce qui limite l'entrée du virus de la grippe (Chesler et Reiss, 2002; Fong *et al.*, 2022; Kang, S. *et al.*, 2018). De plus, cette cytokine augmente la présentation d'antigène, la phagocytose et l'activité lysosomique des macrophages, dont les macrophages alvéolaires étant cruciaux pour les infections respiratoires, et éminemment pour la grippe (Marodi *et al.*, 1993; Schneider *et al.*,

2014; Wong *et al.*, 1983). De surcroît, l'IFN $\gamma$  induit l'activation de cellules dendritiques, favorisant ainsi la présentation d'antigène et par conséquent l'engagement d'une réponse immunitaire adaptative (Walzer *et al.*, 2005). L'interféron gamma soutient également l'immunité adaptative de façon plus directe, notamment en favorisant l'établissement d'une mémoire immunologique, en augmentant la prolifération des lymphocytes T CD8+, ainsi qu'en induisant la différenciation des lymphocytes B naïfs en plasmocytes (Colonna *et al.*, 2004; de Dabrun, 2014; Lande et Gilliet, 2010). L'IFN $\gamma$  module également la commutation de classe des anticorps, favorisant ainsi la production d'IgG2a, IgG2b et IgG3 (Li, C. *et al.*, 2018). Or, l'IgG2a est l'isotype interagissant le plus efficacement avec les récepteurs Fc (Gessner *et al.*, 1998; Kang, S. M. *et al.*, 2011). Cette interaction est nécessaire aux mécanismes effecteurs, tels que l'ADCP et l'ADCC, lesquels sont primordiaux pour la protection vaccinale médiée par M2e, comme mentionné plus tôt (Bournazos *et al.*, 2015; DiLillo *et al.*, 2016; El Bakkouri *et al.*, 2011; Park et Taubenberger, 2016; Pincetic *et al.*, 2014; Vanderven et Kent, 2020). De plus, les IgG2a sont également connus pour être les principaux inducteurs du mécanisme CDC, lequel est également important pour la protection vaccinale conférée par l'antigène M2e (Macagno *et al.*, 2022). Par ailleurs, des études relativement récentes ont démontré une plus grande efficacité des IgG2a murins au niveau de la protection contre une infection grippale comparativement aux IgG1 ciblant une région similaire au niveau de l'antigène M2e (Van den Hoecke *et al.*, 2021; Van den Hoecke *et al.*, 2017). Ainsi, la supplémentation d'agonistes TLR biaisant la réponse en Th1 au sein d'une formulation vaccinale constitue une approche pertinente dans le cadre de la vaccination sous-unitaire antivirale, et plus particulièrement pour la protection vaccinale médiée par l'antigène M2e.

L'analyse du profil d'isotypes IgG entreprise par ELISA suggère la capacité du CpG à biaiser la réponse en Th1 ainsi que l'importance d'une telle réponse au niveau de la protection vaccinale. De fait, les souris immunisées avec l'antigène M2e seule ont révélé une réponse strictement Th2 illustrée par la présence d'IgG1 et l'absence d'IgG2, laquelle mena à 0% de survie. L'ajout de CpG (M2e+CpG) permit de biaiser la réponse en Th1, représentée par la présence d'IgG2 et l'absence d'IgG1, et a aboutit à la survie de 25% des souris (Figure 2.6 et S14). De même, comparativement à la plateforme monovalente M2e-I<sub>10</sub> ayant mené à 75% de survie, la plateforme multifonctionnalisée M2e-I<sub>10</sub>/CpG-I<sub>10</sub> a augmenté uniquement les isotypes IgG2a, IgG2b et IgG3 associés à la réponse Th1 et a résulté à une protection complète des souris (100% de survie) (Figure 2.6). De plus, les souris ayant reçu une formulation vaccinale comportant du CpG ont été les seules

à montrer la présence d'IFN $\gamma$  sérique associé à la réponse Th1 deux semaines après la dernière immunisation (Annexe 3).

Malgré l'importance de la réponse Th1 pour les infections virales respiratoires, une réponse strictement Th1 est cliniquement associée à des risques d'auto-immunité (i.e. réponse immunitaire spécifique contre des cellules saines de son propre organisme). De même, une réponse uniquement Th2 peut mener à des réactions allergiques (Tau et Rothman, 1999). Ainsi, une formulation vaccinale idéale permettrait l'induction d'une réponse mixte Th1/Th2, conférant ainsi un équilibre entre protection et immunopathologie (Singh *et al.*, 1999). Ceci est le cas de notre plateforme multifonctionnalisée comme le souligne l'analyse du profil isotypiques d'IgG montrant la présence des quatre isotypes IgG (Figure S14). L'addition de CpG ou d'IMQ a permis l'induction d'une réponse Th1 à travers l'activation du TLR9 ou TLR7 respectivement, tandis que la morphologie filamenteuse avec une structure quaternaire en feuillets- $\beta$ -croisés de notre plateforme vaccinale a permis l'induction d'une réponse Th2 possiblement via l'activation du TLR2/6. Par ailleurs, Duggan et al (2011) ont montré l'intérêt de co-stimuler les récepteurs TLR2/6 et TLR9 pour la résistance à l'infection pulmonaire chez la souris (Duggan *et al.*, 2011).

Malheureusement, l'analyse du profil d'isotypes IgG et le dosage d'IFN $\gamma$  sérique n'ont pas pu être entrepris pour les souris immunisées avec l'agoniste TLR7, étant donné la limitation associée à la longue durée de ce type d'expérimentation *in vivo*.

### 3.4 Limites et perspectives

Étant donné l'importance de la polarisation Th1/Th2, il aurait été pertinent d'évaluer cette réponse de façon plus directe, en évaluant la production de cytokines IFN $\gamma$  et IL-4 par les splénocytes des souris immunisées exposés à l'antigène M2e via ELISPOT, cytométrie en flux et/ou ELISA (Calzas *et al.*, 2021). De plus, il aurait également été intéressant d'évaluer l'implication des mécanismes ADCC, ADCP et CDC au niveau de la protection complète conférée par les plateformes multifonctionnalisées. Cela aurait pu être entrepris de façon *in vitro* et/ou *in vivo*. *In vitro*, il aurait été possible d'exposer des cellules MDCK pré-infectées avec le virus de la grippe et par conséquent exposant le M2e à leur surface, aux sérums des souris immunisées contenant des anticorps anti-M2e, puis de mesurer la viabilité cellulaire (Duensing et Watson, 2018). Il aurait également été possible d'exposer les sérums des souris immunisées à des cellules

Jurkat-NFAT comportant un gène rapporteur associé à la voie de signalisation de récepteurs FcγR, afin de mettre en évidence l'efficacité des différents sérums à engager de tels récepteurs et donc à induire des mécanismes effecteurs (Parekh *et al.*, 2012). De façon *in vivo*, il aurait été possible d'évaluer la protection vaccinale conférée par l'immunisation au niveau de souris de type sauvage comparativement à l'immunisation de souris FcγR knock-out (FcγR<sup>-/-</sup>) (El Bakkouri *et al.*, 2011; Vanderven et Kent, 2020).

L'évaluation de la mémoire immunologique aurait également pu être pertinente. En effet, de nombreuses études ont révélé l'importance d'établir une réponse mémoire pour une protection vaccinale contre le virus de la grippe ainsi que l'amélioration de cette mémoire immunologique par l'ajout d'adjuvant tels que les agonistes TLR9 ou TLR7 (Dormitzer *et al.*, 2011; Li, C. *et al.*, 2018; Mendez *et al.*, 2003). Une telle évaluation aurait pu être entreprise via le dosage relatif du marqueur CD62L, CD44 et CCR7 au niveau des lymphocytes issus de la rate des souris immunisées par le biais de cytométrie en flux (Gerberick *et al.*, 1997; Ghenassia, 2015; Unsoeld et Pircher, 2005). De plus, l'évaluation de lymphocytes mémoires résidents au niveau des tissus lymphoïdes associés au nez et aux bronches (NALT et BALT) aurait aussi été intéressante. En effet, des études ont montré que l'administration intramusculaire d'une formulation vaccinale comportant des agonistes TLR9 ou TLR7 pouvait induire une réponse immunitaire mucoale (Gutjahr *et al.*, 2016; Mohsen *et al.*, 2020). Pour des raisons similaires, l'évaluation d'une réponse mucoale humorale (IgG et IgA) au niveau des fluides bronchoalvéolaires (BALF) via ELISA aurait également été pertinente afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la protection complète conférée par notre plateforme multifonctionnalisée (Ando *et al.*, 1986; Lombana *et al.*, 2019).

En plus de caractériser la réponse immunitaire adaptative mémoire, il aurait également été intéressant d'évaluer l'immunité entraînée, étant une sorte de mémoire immunologique de la réponse immunitaire innée. En effet, un nombre croissant d'études démontre la capacité du système immunitaire inné à répondre de façon plus rapide et plus efficace suite à la rencontre ultérieure d'un agoniste PRR préalablement rencontré. Ce processus biologique est régi par des modifications épigénétiques au sein des cellules immunitaires innées, aboutissant à une reprogrammation fonctionnelle à relativement long terme (Netea *et al.*, 2020; van der Heijden *et al.*, 2018). Ainsi, une analyse épigénétique ou métabolique des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et/ou des NK issus de souris immunisées aurait été pertinente afin d'évaluer

l'importance de ce phénomène au niveau de la protection médiée par notre plateforme multifonctionnalisée (Arts *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2022). Par ailleurs, notre plateforme multifonctionnalisée étant agoniste du TLR2/6 et agoniste du TLR9 ou TLR7, l'utilisation de cette plateforme pour la vaccination contre différents agents pathogènes (changement d'antigènes viraux) pourrait engendrer une immunité entraînée et par conséquent améliorer les réponses immunitaires des différents vaccins. Ceci souligne l'importance d'évaluer l'immunité entraînée dans le cadre d'un tel projet.

Étant donné l'existence de l'immunité entraînée, de la mémoire immunologique, ainsi que la capacité de l'IMQ et du CpG à accélérer les réponses immunitaires, il aurait été adéquat d'évaluer l'aptitude de notre plateforme vaccinale multifonctionnalisée à induire un contrôle précoce de l'infection virale. Pour ce faire, il aurait été possible d'effectuer une cinétique des titres viraux dans les poumons suite à la provocation virale, notamment par le biais de RT-PCR au niveau des BALF (Roberts *et al.*, 2007).

Une autre limitation de notre étude est l'utilisation d'une unique souche pour la provocation virale mortelle, soit A/PR8/1934 H1N1. En effet, ayant utilisé un antigène grippal conservé, en l'occurrence M2e, il aurait été approprié d'évaluer la capacité de notre plateforme vaccinale multifonctionnalisée à engendrer une protection croisée (ex : contre les souches H3N2, H5N1, H6N6); cela nous empêche de conclure sur le potentiel universel des vaccins antigrippaux développés (Stepanova *et al.*, 2015; Watkins *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2019). Néanmoins, de nombreuses études ont préalablement démontré la capacité de l'antigène M2e à conférer une protection hétérologue (Stepanova *et al.*, 2015; Watkins *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2019).

Étant donné la persistance d'IFN $\gamma$  sérique au niveau des souris immunisées avec le CpG deux semaines après la dernière immunisation (Annexe 3) ainsi que la capacité préalablement démontrée de l'IMQ et du CpG à prolonger la réponse immunitaire (Li, C. *et al.*, 2018; Mendez *et al.*, 2003), il aurait été intéressant d'évaluer l'aptitude des plateformes vaccinales multifonctionnalisées à conférer une protection à long terme. Cela aurait pu être entrepris en évaluant la protection contre une réinfection grippale 6 mois après la dernière immunisation (Li, C. *et al.*, 2018; Mendez *et al.*, 2003).

L'administration par voie intranasale est connue pour induire une immunité locale et mucoale, soit au niveau des voies d'entrée du virus, ce qui permet de prévenir l'établissement d'un foyer infectieux et offre, par conséquent, une meilleure protection contre les infections respiratoires (Alu *et al.*, 2022; Qi *et al.*, 2018). La nature hydrophobe ainsi que la taille de notre plateforme vaccinale multifonctionnalisée peuvent favoriser sa rétention au niveau des voies respiratoires (Cossette *et al.*, 2020). De plus, des études ont montré la possibilité d'administrer le CpG et l'IMQ de façon intranasale (McCluskie et Davis, 2000; Primard *et al.*, 2013). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la capacité de notre plateforme vaccinale multifonctionnalisée à être administrée de façon intranasale.

La plateforme multifonctionnalisée M2e-I<sub>10</sub>/CpG-I<sub>10</sub> induit des niveaux d'anticorps significativement plus élevés comparativement à la plateforme monovalente M2e-I<sub>10</sub> mélangée au CpG soluble (M2e-I<sub>10</sub> + CpG), soit respectivement environ 21 log<sub>2</sub> versus 18 log<sub>2</sub> après trois immunisations. Néanmoins, aucune différence de survie n'a été révélée pour ces deux plateformes, les deux conférant une protection complète. Après seulement deux immunisations, les plateformes M2e-I<sub>10</sub>/CpG-I<sub>10</sub> et M2e-I<sub>10</sub> + CpG ont engendré des titres d'anticorps d'environ 18 log<sub>2</sub> et 16 log<sub>2</sub>, respectivement (Figure S13). La plateforme multifonctionnalisée M2e-I<sub>10</sub>/CpG-I<sub>10</sub> a donc induit une réponse humorale robuste et potentiellement suffisante pour une protection complète après un seul rappel. Cela dit, après deux immunisations, la plateforme M2e-I<sub>10</sub> + CpG a induit des niveaux d'anticorps équivalents à ceux engendrés par la plateforme monovalente M2e-I<sub>10</sub> seule après trois immunisations (environ 16 log<sub>2</sub>), laquelle a mené à un taux de survie de seulement 75% (Figure S13 et S15). Ainsi, afin de mettre en évidence une différence au niveau de la protection conférée par ces deux plateformes et par conséquent mettre en valeur l'intérêt de la multifonctionnalisation, il aurait été intéressant d'effectuer une infection expérimentale létale après seulement deux immunisations à la place de trois.

Des études ont démontré que la modulation du rapport stœchiométrique utilisé pour le co-assemblage confère la capacité à former des nanoassemblages avec des propriétés polyfonctionnelles finement régulées (Hudalla *et al.*, 2014; Makam et Gazit, 2018). Il serait donc pertinent d'évaluer si la modulation du rapport stœchiométrique utilisé pour le co-assemblage de la plateforme vaccinale multifonctionnalisée permettrait de contrôler la réponse immunitaire spécifique à un pathogène.

## CONCLUSION

Le présent projet visait l'élaboration d'une plateforme vaccinale versatile multifonctionnalisée avec un antigène et un agoniste TLR, ayant une morphologie filamenteuse et une structure en feuillets- $\beta$ -croisés, et ce par le biais du co-assemblage moléculaire de blocs de construction peptidiques. Dans un premier temps, les travaux rapportés ont permis de mettre en évidence la versatilité de cette plateforme. En effet, des molécules de nature et de taille diverses ont été fonctionnalisées sur la plateforme via différentes stratégies, et ce sans altérer sa capacité d'assemblage et par conséquent sa structure, sa morphologie et sa fonction. Ainsi, sa capacité à activer le TLR2/6 a été conservée. De même, l'activité des agonistes TLR7 ou TLR9 conjugués à la plateforme a également été maintenue. La plateforme vaccinale multifonctionnalisée a été internalisée par les cellules immunitaires et a induit leur activation de façon importante comparativement à l'antigène seul. Dans un second temps, cette étude a permis de mettre en valeur l'efficacité d'une telle plateforme multifonctionnalisée, en évaluant la réponse immunitaire induite dans un modèle murin ainsi qu'en évaluant la protection conférée suite à une infection expérimentale à l'IAV. Dans l'ensemble, les données obtenues ont révélé que notre plateforme multifonctionnalisée engendre une réponse immunitaire humorale robuste spécifique à l'antigène ainsi qu'une réponse cellulaire mixte de type Th1/Th2, aboutissant à une protection complète contre la provocation grippale mortelle. Notre plateforme multifonctionnalisée constitue ainsi une stratégie prometteuse pour améliorer l'efficacité de vaccins sous-unitaires, particulièrement ceux basés sur M2e. Cette étude résulte, de ce fait, en le développement de vaccins antigrippaux potentiellement universels. De plus, cette plateforme vaccinale peut être adaptée et dirigée contre un nombre considérable d'agents pathogènes, et ce autant dans un contexte prophylactique que thérapeutique. De surcroît, la modulation du rapport stœchiométrique des blocs de construction peptidiques distinctement fonctionnalisés utilisé pour le co-assemblage pourrait permettre l'élaboration de plateformes multivalentes avec un contrôle précis sur le ratio d'antigène et d'adjuvants incorporé au sein des nanofilaments. Cela pourrait conférer un contrôle quantitatif et qualitatif au niveau de la réponse immunitaire spécifique à un antigène. Ainsi, notre plateforme vaccinale constitue un outil prometteur dans la lutte contre les maladies infectieuses, voire en oncologie. Néanmoins, étant donné la nature préliminaire de cette étude, de nombreux aspects restent à évaluer, notamment au niveau de la caractérisation biophysique et immunologique, afin

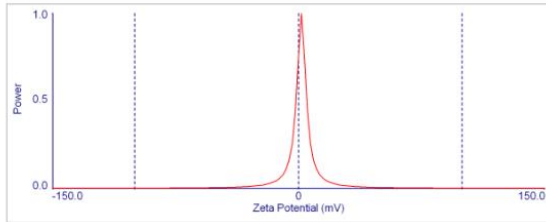


de mieux élucider les mécanismes régissant le co-assemblage ainsi que les mécanismes responsables de la protection contre une infection expérimentale létale. Nonobstant, le présent projet constitue une avancée conséquente dans le contexte de la vaccination sous-unitaire.

## ANNEXE 1

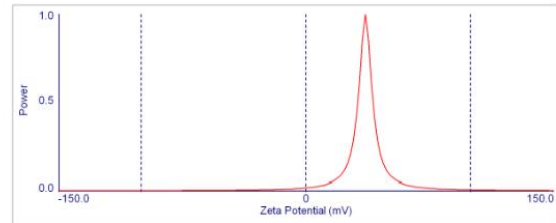
### Évaluation du co-assemblage de la plateforme vaccinale M2e-I10/Mal-I10 via zêta potentiel.

#### Mal-I10



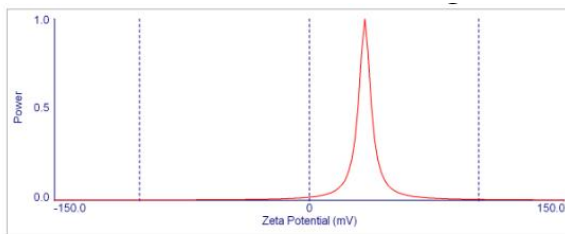
Run	Zeta Potential (mV)	Half Width (mV)
1	-3.97	3.50
2	-0.27	3.53
3	5.55	3.74
4	7.41	3.66
5	-9.52	3.55
6	-0.27	3.67
7	-9.54	3.62
8	5.55	3.23
9	4.63	3.67
10	1.95	3.26
Mean	0.14	3.56
Std. Error	1.94	0.06

#### M2e-I10



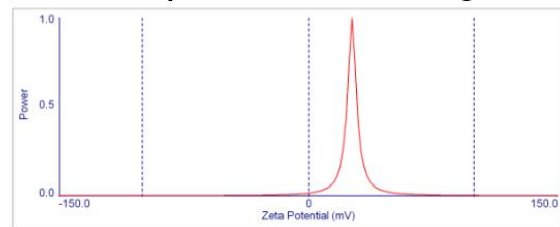
Run	Zeta Potential (mV)	Half Width (mV)
1	34.34	3.19
2	37.09	3.68
3	35.26	3.31
4	38.85	3.09
5	36.21	3.07
6	38.88	3.15
7	38.92	3.71
8	37.06	3.70
9	35.27	3.17
10	36.23	4.55
Mean	36.81	3.46
Std. Error	0.52	0.15

#### M2e-I10/Mal-I10 co-assemblés



Run	Zeta Potential (mV)	Half Width (mV)
1	22.86	3.20
2	34.73	3.27
3	33.77	4.15
4	36.63	3.65
5	35.71	4.09
6	37.60	3.48
7	37.64	3.39
8	34.72	3.59
9	36.63	6.71
10	32.78	4.08
Mean	34.31	3.96
Std. Error	1.37	0.32

#### M2e-I10 + Mal-I10 mélangés



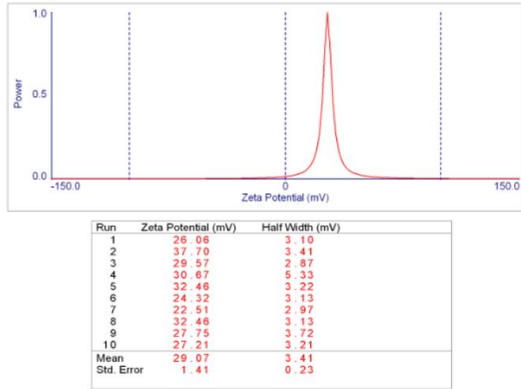
Run	Zeta Potential (mV)	Half Width (mV)
1	25.33	3.43
2	29.00	3.41
3	23.47	3.04
4	28.04	3.66
5	25.33	3.24
6	29.00	3.29
7	28.05	3.08
8	26.25	4.93
9	26.25	3.12
10	26.25	3.11
Mean	26.70	3.43
Std. Error	0.57	0.18

**Annexe 1** : La mesure de Zeta potentiel fut entreprise à une concentration peptidique de 150uM dans du Tris-HCl 50 mM pH 7,4 à température ambiante et ce à l'aide d'un instrument ZetaPlus. Chaque mesure comporte 10 runs/analyses. Ces mesures furent réalisées à trois reprises sur les fibres Mal-I10, M2e-I10, M2e-I10/Mal-I10 co-assemblés et M2e-I10+Mal-I10 mélangés post-assemblage. Seules des données représentatives ont été présentées.

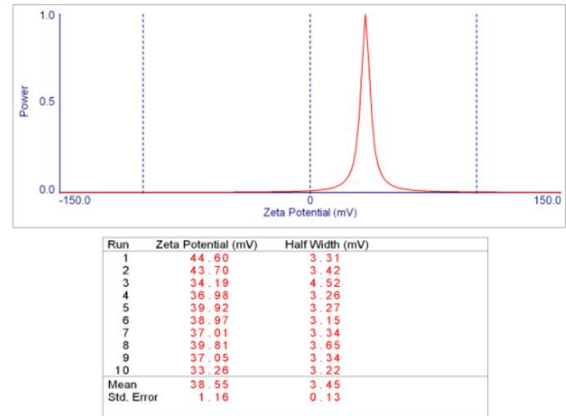
## ANNEXE 2

### Évaluation du co-assemblage de la plateforme vaccinale M2e-I10/IMQ-I10 via zêta potentiel

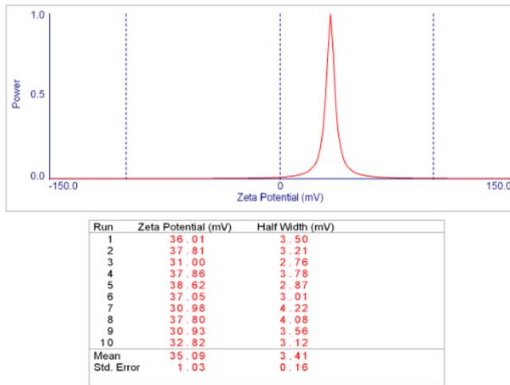
#### IMQ-I10



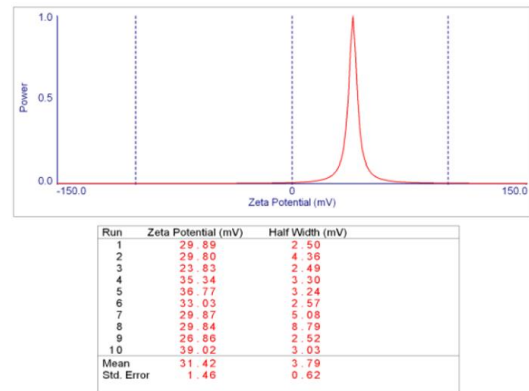
#### M2e-I10



#### M2e-I10/IMQ-I10 co-assemblés



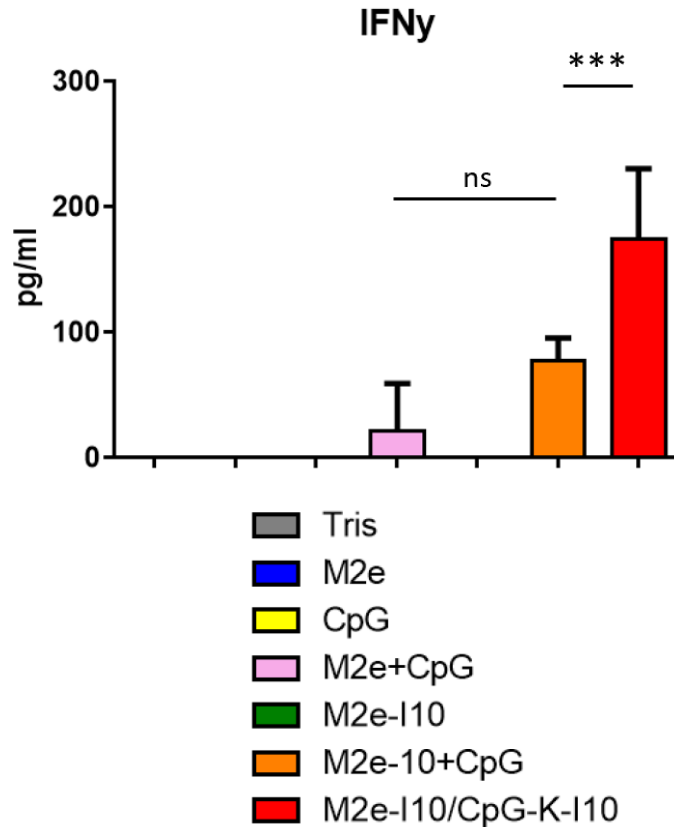
#### M2e-I10 + IMQ-I10 mélangés



**Annexe 2 :** La mesure de Zeta potentiel fut entreprise à une concentration peptidique de 150uM dans du Tris-HCl 50 mM pH 7,4 à température ambiante et ce à l'aide d'un instrument ZetaPlus. Chaque mesure comporte 10 runs/analyses. Ces mesures furent réalisées à trois reprises sur les fibres IMQ-I10, M2e-I10, M2e-I10/IMQ-I10 co-assemblés et M2e-I10+IMQ-I10 mélangés post-assemblage. Seules des données représentatives ont été présentées.

### ANNEXE 3

#### Dosage d'IFN $\gamma$ sérique deux semaines après la dernière immunisation



**Annexe 3** : Le dosage d'IFN $\gamma$  plasmatique fut établi par le biais d'ELISA sandwich. Les sérums furent analysés à différentes concentrations (non dilué et dilué 1:1 dans du PBS-T 1 % BSA). Les concentrations d'IFN $\gamma$  en pg/ml furent calculées à partir des densités optiques obtenues à l'aide d'une courbe standard exprimant la concentration d'IFN $\gamma$  en fonction de la densité optique. Pour un même échantillon, la concentration d'IFN $\gamma$  fut déterminée en faisant la moyenne des concentrations obtenues au niveau des différentes dilutions. Les résultats ont été analysés à l'aide du test de comparaison multiple ANOVA de Tukey et la différence statistique (entre les cellules témoins et les cellules traitées) a été établie à (\*) 0,01 ; (\*\*) 0,001 ; (\*\*\*) 0,0001 ; (\*\*\*\*) < 0,0001.

## Bibliographie

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. et Pillai, S. (2011). Cellular and Molecular Immunology E-Book. Elsevier Health Sciences. <https://books.google.ca/books?id=qtJY05rIUkQC>
- Ahmed, R., Oldstone, M. B. A. et Palese, P. (2007, 2007/11/01). Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic. *Nature Immunology*, 8(11), 1188-1193. <https://doi.org/10.1038/ni1530>
- Akira, S., Uematsu, S. et Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Akole, A. et Warner, J. M. (2019). Model of influenza virus acidification. *PLOS ONE*, 14(4), e0214448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214448>
- Al-Halifa, S., Gauthier, L., Arpin, D., Bourgault, S. et Archambault, D. (2019). Nanoparticle-Based Vaccines Against Respiratory Viruses [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Front Immunol*, 10, 22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00022>
- Al-Halifa, S., Zottig, X., Babych, M., Cote-Cyr, M., Bourgault, S. et Archambault, D. (2020). Harnessing the Activation of Toll-Like Receptor 2/6 by Self-Assembled Cross-beta Fibrils to Design Adjuvanted Nanovaccines. *Nanomaterials (Basel)*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/nano10101981>
- Al-Jighefee, H. T., Najjar, H., Ahmed, M. N., Qush, A., Awwad, S. et Kamareddine, L. (2021). COVID-19 Vaccine Platforms: Challenges and Safety Contemplations. *Vaccines*, 9(10), 1196. <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/10/1196>
- Alu, A., Chen, L., Lei, H., Wei, Y., Tian, X. et Wei, X. (2022). Intranasal COVID-19 vaccines: From bench to bed. *eBioMedicine*, 76, 103841.
- Amiel, C. (2010). Virus de la grippe et barrière d'espèce. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2010(423), 55-62. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(10\)70560-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1773-035X(10)70560-8)
- Ando, M., Yoshida, K., Soda, K. et Araki, S. (1986). Specific bronchoalveolar lavage IgA antibody in patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis induced by *Trichosporon cutaneum*. *American Review of Respiratory Disease*, 134(1), 177-179.
- Arts, R. J., Novakovic, B., Ter Horst, R., Carvalho, A., Bekkering, S., Lachmandas, E., Rodrigues, F., Silvestre, R., Cheng, S.-C. et Wang, S.-Y. (2016). Glutaminolysis and fumarate accumulation integrate immunometabolic and epigenetic programs in trained immunity. *Cell metabolism*, 24(6), 807-819.

- Asha, K. et Kumar, B. (2019). Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far! *J Clin Med*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/jcm8020192>
- Atri, C., Guerfali, F. Z. et Laouini, D. (2018). Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>
- Awate, S., Babiuk, L. A. et Mutwiri, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol*, 4, 114. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00114>
- Babych, M., Bertheau-Mailhot, G., Zottig, X., Dion, J., Gauthier, L., Archambault, D. et Bourgault, S. (2018). Engineering and evaluation of amyloid assemblies as a nanovaccine against the Chikungunya virus. *Nanoscale*, 10(41), 19547-19556. <https://doi.org/10.1039/c8nr05948a>
- Ballester, M., Jeanbart, L., de Titta, A., Nembrini, C., Marsland, B. J., Hubbell, J. A. et Swartz, M. A. (2015). Nanoparticle conjugation enhances the immunomodulatory effects of intranasally delivered CpG in house dust mite-allergic mice. *Sci Rep*, 5, 14274. <https://doi.org/10.1038/srep14274>
- Banerji, A., Wickner, P. G., Saff, R., Stone, C. A., Robinson, L. B., Long, A. A., Wolfson, A. R., Williams, P., Khan, D. A., Phillips, E. et Blumenthal, K. G. (2021). mRNA Vaccines to Prevent COVID-19 Disease and Reported Allergic Reactions: Current Evidence and Suggested Approach. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 9(4), 1423-1437. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.12.047>
- Baxter, D. (2007). Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occup Med (Lond)*, 57(8), 552-556. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqm110>
- Bernocchi, B. (2016). Porous maltodextrin nanoparticles for the intranasal delivery of vaccines. Nanoparticules de maltodextrine pour l'administration intranasale des vaccins (Publication no 2016LIL2S010) Université du Droit et de la Santé - Lille II]. *InsermStar*. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01480950>
- Berthélémy, S. (2015). Prévention et traitement de la grippe. *Actualités Pharmaceutiques*, 54(542), 36-39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actpha.2014.11.007>
- Bessière, P. (2021). Highly pathogenic avian influenza viruses' emergence : he host, microbiota and virus triad. Émergence de virus influenza aviaires hautement pathogènes : la triade hôte, microbiote et virus (Publication no 2021TOU30114) Université Paul Sabatier - Toulouse III]. *Inpt.Star.Agreenium.Inrae.Inraeoccitanietoulouse Ut3-toulouseinp*. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03590810>

- Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T. et Klinman, D. M. (2011). CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*, 10(4), 499-511. <https://doi.org/10.1586/erv.10.174>
- Boni, M. F., Gog, J. R., Andreasen, V. et Christiansen, F. B. (2004). Influenza drift and epidemic size: the race between generating and escaping immunity. *Theoretical Population Biology*, 65(2), 179-191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tpb.2003.10.002>
- Bourgault, S., Choi, S., Buxbaum, J. N., Kelly, J. W., Price, J. L. et Reixach, N. (2011). Mechanisms of transthyretin cardiomyocyte toxicity inhibition by resveratrol analogs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 410(4), 707-713. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.133>
- Bournazos, S., DiLillo, D. J. et Ravetch, J. V. (2015). The role of Fc–FcγR interactions in IgG-mediated microbial neutralization. *Journal of Experimental Medicine*, 212(9), 1361-1369.
- Bouvier, N. M. et Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26 Suppl 4(Suppl 4), D49-53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>
- Branco, M. C., Sigano, D. M. et Schneider, J. P. (2011). Materials from peptide assembly: towards the treatment of cancer and transmittable disease [Review]. *Curr Opin Chem Biol*, 15(3), 427-434. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.03.021>
- Brazolot Millan, C. L., Weeratna, R., Krieg, A. M., Siegrist, C. A. et Davis, H. L. (1998). CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(26), 15553-15558. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15553>
- Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*, 119(24), 5640-5649. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-380121>
- Buisson, Y., Nicand, É. et Saliou, P. (2007). *La grippe en face*. Xavier Montauban SA.
- Calzas, C., Mao, M., Turpaud, M., Viboud, Q., Mettier, J., Figueroa, T., Bessière, P., Mangin, A., Sedano, L. et Hervé, P.-L. (2021). Immunogenicity and Protective Potential of Mucosal Vaccine Formulations Based on Conserved Epitopes of Influenza A Viruses Fused to an Innovative Ring Nanoplatfom in Mice and Chickens. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Canoui, E. et Launay, O. (2019). [History and principles of vaccination]. *Rev Mal Respir*, 36(1), 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.02.015> (Histoire et principes de la vaccination.)
- Carmen, J. M., Shrivastava, S., Lu, Z., Anderson, A., Morrison, E. B., Sankhala, R. S., Chen, W. H., Chang, W. C., Bolton, J. S., Matyas, G. R., Michael, N. L., Joyce, M. G., Modjarrad, K., Currier, J. R., Bergmann-Leitner, E., Malloy, A. M. W. et Rao, M. (2021, Dec 13).

- SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccine induces robust innate immune activity driving polyfunctional spike-specific T cell responses. *NPJ Vaccines*, 6(1), 151. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00414-4>
- Carrat, F. et Flahault, A. (2007). Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine*, 25(39), 6852-6862. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.027>
- Cauwelaert, N. D., Desbien, A. L., Hudson, T. E., Pine, S. O., Reed, S. G., Coler, R. N. et Orr, M. T. (2016). The TLR4 Agonist Vaccine Adjuvant, GLA-SE, Requires Canonical and Atypical Mechanisms of Action for TH1 Induction. *PLOS ONE*, 11(1), e0146372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146372>
- Chang, Z. (2008). Role of toll-like receptors in regulatory functions of T and B cells. *Chinese Science Bulletin*, 53(8), 1121-1127. <https://doi.org/10.1007/s11434-008-0184-x>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S3-S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Chastel, C. (2004). Émergence de virus nouveaux en Asie : les changements climatiques sont-ils en cause ? *Médecine et Maladies Infectieuses*, 34(11), 499-505. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.medmal.2004.07.027>
- Chen, Y.-Q., Wohlbold, T. J., Zheng, N.-Y., Huang, M., Huang, Y., Neu, K. E., Lee, J., Wan, H., Rojas, K. T., Kirkpatrick, E., Henry, C., Palm, A.-K. E., Stamper, C. T., Lan, L. Y.-L., Topham, D. J., Treanor, J., Wrarmert, J., Ahmed, R., Eichelberger, M. C., Georgiou, G., Krammer, F. et Wilson, P. C. (2018/). Influenza Infection in Humans Induces Broadly Cross-Reactive and Protective Neuraminidase-Reactive Antibodies. *Cell*, 173(2), 417-429.e410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.030>
- Cheng, N., He, R., Tian, J., Patrick, P. Y. et Richard, D. Y. (2008). Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *The Journal of Immunology*, 181(1), 22-26.
- Cheon, M., Chang, I., Mohanty, S., Luheshi, L. M., Dobson, C. M., Vendruscolo, M. et Favrin, G. (2007). Structural Reorganisation and Potential Toxicity of Oligomeric Species Formed during the Assembly of Amyloid Fibrils. *PLOS Computational Biology*, 3(9), e173. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030173>
- Chesler, D. A. et Reiss, C. S. (2002). The role of IFN-gamma in immune responses to viral infections of the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(6), 441-454. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(02\)00044-8](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(02)00044-8)



- Chesson, C. B., Ekpo-Otu, S., Endsley, J. J. et Rudra, J. S. (2017). Biomaterials-Based Vaccination Strategies for the Induction of CD8(+)T Cell Responses. *ACS Biomater Sci Eng*, 3(2), 126-143. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.6b00412>
- Chesson, C. B., Huante, M., Nusbaum, R. J., Walker, A. G., Clover, T. M., Chinnaswamy, J., Endsley, J. J. et Rudra, J. S. (2018). Nanoscale peptide self-assemblies boost BCG-primed cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports*, 8(1), 1-14.
- CHEUNG, T. K. W. et POON, L. L. M. (2007). Biology of Influenza A Virus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1102(1), 1-25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1196/annals.1408.001>
- Chou, Y.-J., Lin, C.-C., Dzhagalov, I., Chen, N.-J., Lin, C.-H., Lin, C.-C., Chen, S.-T., Chen, K.-H. et Fu, S.-L. (2020). Vaccine adjuvant activity of a TLR4-activating synthetic glycolipid by promoting autophagy. *Scientific Reports*, 10(1), 8422. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65422-1>
- Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V. et Harding, C. V. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med*, 186(10), 1623-1631. <https://doi.org/10.1084/jem.186.10.1623>
- Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V. et Harding, C. V. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *The Journal of experimental medicine*, 186(10), 1623-1631.
- Chung, Y. H., Church, D., Koellhoffer, E. C., Osota, E., Shukla, S., Rybicki, E. P., Pokorski, J. K. et Steinmetz, N. F. (2022). Integrating plant molecular farming and materials research for next-generation vaccines. *Nature Reviews Materials*, 7(5), 372-388. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00399-5>
- Ciotti, M., Ciccozzi, M., Terrinoni, A., Jiang, W.-C., Wang, C.-B. et Bernardini, S. (2020). The COVID-19 pandemic. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 57(6), 365-388. <https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1783198>
- Clayville, L. R. (2011). Influenza update: a review of currently available vaccines. *P t*, 36(10), 659-684.
- Collins, A. M. (2016). IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunol Cell Biol*, 94(10), 949-954. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.65>
- Colonna, M., Trinchieri, G. et Liu, Y.-J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology*, 5(12), 1219-1226.

- Cossette, B., Kelly, S. H. et Collier, J. H. (2020). Intranasal subunit vaccination strategies employing nanomaterials and biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(5), 1765-1779.
- Coté-Cyr, M. (2022). FLAGELLINES BACTÉRIENNES EN TANT QU'ADJUVANTS ET NANOSTRUCTURES POUR LA LIVRAISON D'ANTIGÈNES VACCINAUX.
- Cox, J. C., Sjolander, A. et Barr, I. G. (1998). ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev*, 32(3), 247-271. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(98\)00013-1](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(98)00013-1)
- Cox, M. M. J. (2021). Innovations in the Insect Cell Expression System for Industrial Recombinant Vaccine Antigen Production. *Vaccines (Basel)*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/vaccines9121504>
- Crommelin, D. J. A., Anchordoquy, T. J., Volkin, D. B., Jiskoot, W. et Mastrobattista, E. (2021). Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(3), 997-1001. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.12.006>
- Cui, B., Liu, X., Fang, Y., Zhou, P., Zhang, Y. et Wang, Y. (2018). Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines*, 17(4), 335-349. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1457443>
- Davenne, T., Bridgeman, A., Rigby, R. E. et Rehwinkel, J. (2020). Deoxyguanosine is a TLR7 agonist. *Eur J Immunol*, 50(1), 56-62. <https://doi.org/10.1002/eji.201948151>
- Day, A. (2009). 'An American Tragedy'. The Cutter Incident and its Implications for the Salk Polio Vaccine in New Zealand 1955-1960. *Health and History*, 11(2), 42-61. <http://www.jstor.org/stable/20700566>
- 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. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54(48), 14383-14387. <https://doi.org/10.1002/anie.201507092>
- de Dabrun, M. O. (2014). Étude du recrutement et de l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans un modèle de tumeur murin.
- De Titta, A. (2013). Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(49), 19902-19907.
- de Titta, A., Ballester, M., Julier, Z., Nembrini, C., Jeanbart, L., van der Vlies, A. J., Swartz, M. A. et Hubbell, J. A. (2013). Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular

immunity and memory recall at low dose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(49), 19902-19907.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1313152110>

DeLeo, F. R. et Allen, L. H. (2020). Phagocytosis and neutrophil extracellular traps. *Fac Rev*, 9, 25. <https://doi.org/10.12703/r/9-25>

Demento, S. L., Cui, W., Criscione, J. M., Stern, E., Tulipan, J., Kaech, S. M. et Fahmy, T. M. (2012). Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype. *Biomaterials*, 33(19), 4957-4964.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.041>

Dessaint, J.-P. (2004). Modulation de la synthèse de l'IgE chez l'homme. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 44(3), 236-244.

Devi, A. B. et Sarala, R. (2021). Substantial effect of phytochemical constituents against the pandemic disease influenza—a review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00269-5>

Dhar, S., Daniel, W. L., Giljohann, D. A., Mirkin, C. A. et Lippard, S. J. (2009). Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum(IV) warheads. *J Am Chem Soc*, 131(41), 14652-14653. <https://doi.org/10.1021/ja9071282>

DiLillo, D. J., Palese, P., Wilson, P. C. et Ravetch, J. V. (2016). Broadly neutralizing anti-influenza antibodies require Fc receptor engagement for in vivo protection. *The Journal of clinical investigation*, 126(2), 605-610.

Dormitzer, P. R., Galli, G., Castellino, F., Golding, H., Khurana, S., Del Giudice, G. et Rappuoli, R. (2011). Influenza vaccine immunology. *Immunological reviews*, 239(1), 167-177.

Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H. et Daniels, R. (2018). Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Frontiers in Immunology*, 1581.

Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H. et Daniels, R. (2018). Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front Immunol*, 9, 1581.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01581>

DU CHAPITRE, P. (2021). Virus influenza: grippe. *Les Virus en ORL: Rapport SFORL 2021*, 144, 139.

Duensing, T. D. et Watson, S. R. (2018). Complement-dependent cytotoxicity assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(2), pdb. prot093799.

- Duggan, J. M., You, D., Cleaver, J. O., Larson, D. T., Garza, R. J., Guzmán Pruneda, F. A., Tuvim, M. J., Zhang, J., Dickey, B. F. et Evans, S. E. (2011). Synergistic interactions of TLR2/6 and TLR9 induce a high level of resistance to lung infection in mice. *The Journal of Immunology*, 186(10), 5916-5926.
- Eccles, R. (2005, 2005/11/01/). Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(11), 718-725. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70270-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70270-X)
- Eckman, S. (1986). The new recombinant hepatitis B vaccine *Patient Care* (vol. 20, p. 13).
- El Bakkouri, K., Descamps, F., De Filette, M., Smet, A., Festjens, E., Birkett, A., Van Rooijen, N., Verbeek, S., Fiers, W. et Saelens, X. (2011). Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *The Journal of Immunology*, 186(2), 1022-1031.
- Eliasson, D. G., Omokanye, A., Schon, K., Wenzel, U. A., Bernasconi, V., Bemark, M., Kolpe, A., El Bakkouri, K., Ysenbaert, T., Deng, L., Fiers, W., Saelens, X. et Lycke, N. (2018). M2e-tetramer-specific memory CD4 T cells are broadly protective against influenza infection. *Mucosal Immunol*, 11(1), 273-289. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.14>
- Epstein, E. A. et Chapman, M. R. (2008). Polymerizing the fibre between bacteria and host cells: the biogenesis of functional amyloid fibres. *Cellular Microbiology*, 10(7), 1413-1420. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01148.x>
- Eskandari, S., Guerin, T., Toth, I. et Stephenson, R. J. (2017). Recent advances in self-assembled peptides: Implications for targeted drug delivery and vaccine engineering [Review]. *Adv Drug Deliv Rev*, 110-111, 169-187. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.013>
- Evans, J. T., Cluff, C. W., Johnson, D. A., Lacy, M. J., Persing, D. H. et Baldrige, J. R. (2003). Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL™ adjuvant and Ribi.529. *Expert Review of Vaccines*, 2(2), 219-229. <https://doi.org/10.1586/14760584.2.2.219>
- Fehr, T., Bachmann, M. F., Bucher, E., Kalinke, U., Di Padova, F. E., Lang, A. B., Hengartner, H. et Zinkernagel, R. M. (1997). Role of repetitive antigen patterns for induction of antibodies against antibodies. *J Exp Med*, 185(10), 1785-1792. <https://doi.org/10.1084/jem.185.10.1785>
- Fiers, W., De Filette, M., Bakkouri, K. E., Schepens, B., Roose, K., Schotsaert, M., Birkett, A. et Saelens, X. (2009). M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine*, 27(45), 6280-6283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.007>

- Fong, C. H.-Y., Lu, L., Chen, L.-L., Yeung, M.-L., Zhang, A. J., Zhao, H., Yuen, K.-Y. et To, K. K.-W. (2022). Interferon-gamma inhibits influenza A virus cellular attachment by reducing sialic acid cluster size. *Iscience*, 25(4), 104037.
- Francis, M. E., King, M. L. et Kelvin, A. A. (2019). Back to the Future for Influenza Preimmunity-Looking Back at Influenza Virus History to Infer the Outcome of Future Infections. *Viruses*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/v11020122>
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.044>
- Fries, C. N., Chen, J.-L., Dennis, M. L., Votaw, N. L., Eudailey, J., Watts, B. E., Hainline, K. M., Cain, D. W., Barfield, R., Chan, C., Moody, M. A., Haynes, B. F., Saunders, K. O., Permar, S. R., Fouda, G. G. et Collier, J. H. (2021). HIV envelope antigen valency on peptide nanofibers modulates antibody magnitude and binding breadth. *Scientific Reports*, 11(1), 14494. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93702-x>
- Fu, Z., Aucoin, D., Davis, J., Van Nostrand, W. E. et Smith, S. O. (2015). Mechanism of Nucleated Conformational Conversion of A $\beta$ 42. *Biochemistry*, 54(27), 4197-4207. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00467>
- Fujita, Y. et Taguchi, H. (2012). Overview and outlook of Toll-like receptor ligand–antigen conjugate vaccines. *Therapeutic delivery*, 3(6), 749-760.
- G. Mor, M. S., A. D. Steinberg, S. L. Hoffman, K. Okuda, D. M. Klinman. (1997). Do DNA Vaccines Induce Autoimmune Disease? *Human Gene Therapy*, 8(3), 293-300. <https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.3-293>
- Gao, D., Xiao, Q., Zhang, M. et Li, Y. (2016). Design, synthesis and biological evaluation of benzyloxyphenyl-methylaminophenol derivatives as STAT3 signaling pathway inhibitors. *Bioorg Med Chem*. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.04.022>
- Garg, H., Mehmetoglu-Gurbuz, T. et Joshi, A. (2020). Virus Like Particles (VLP) as multivalent vaccine candidate against Chikungunya, Japanese Encephalitis, Yellow Fever and Zika Virus. *Sci Rep*, 10(1), 4017. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61103-1>
- Gélinas, J.-F., Kiesslich, S., Gilbert, R. et Kamen, A. A. (2020). Titration methods for rVSV-based vaccine manufacturing. *MethodsX*, 7, 100806. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100806>
- Gerberick, G. F., Cruse, L. W., Miller, C. M., Sikorski, E. E. et Ridder, G. M. (1997). Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node

- cells following allergen and irritant treatment. *Toxicology and applied pharmacology*, 146(1), 1-10.
- Gessner, J., Heiken, H., Tamm, A. et Schmidt, R. (1998). The IgG fc receptor family. *Annals of hematology*, 76(6), 231-248.
- Ghasparian, A., Riedel, T., Koomullil, J., Moehle, K., Gorba, C., Svergun, D. I., Perriman, A. W., Mann, S., Tamborrini, M., Pluschke, G. et Robinson, J. A. (2011). Engineered synthetic virus-like particles and their use in vaccine delivery [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Chembiochem*, 12(1), 100-109. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000536>
- Ghattas, M., Dwivedi, G., Lavertu, M. et Alameh, M.-G. (2021). Vaccine Technologies and Platforms for Infectious Diseases: Current Progress, Challenges, and Opportunities. *Vaccines*, 9(12), 1490. <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/12/1490>
- Ghenassia, A. (2015). Induction de réponses mémoires lymphocytaires T CD8 et protection vaccinale après transfert de gènes par le vecteur AAV recombinant Sorbonne Paris Cité].
- Gillam, J. E. et MacPhee, C. E. (2013). Modelling amyloid fibril formation kinetics: mechanisms of nucleation and growth. *J Phys Condens Matter*, 25(37), 373101. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/25/37/373101>
- Glabe, C. G. et Kaye, R. (2006). Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. *Neurology*, 66(1 suppl 1), S74-S78. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000192103.24796.42>
- Gonzalez, G., Marshall, J. F., Morrell, J., Robb, D., McCauley, J. W., Perez, D. R., Parrish, C. R. et Murcia, P. R. (2014). Infection and pathogenesis of canine, equine, and human influenza viruses in canine tracheas. *J Virol*, 88(16), 9208-9219. <https://doi.org/10.1128/jvi.00887-14>
- Gorden, K. K., Qiu, X., Battiste, J. J., Wightman, P. P., Vasilakos, J. P. et Alkan, S. S. (2006). Oligodeoxynucleotides differentially modulate activation of TLR7 and TLR8 by imidazoquinolines. *J Immunol*, 177(11), 8164-8170. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.8164>
- Goyal, D. K., Keshav, P. et Kaur, S. (2021). Adjuvant effects of TLR agonist gardiquimod admixed with Leishmania vaccine in mice model of visceral leishmaniasis. *Infection, Genetics and Evolution*, 93, 104947. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104947>
- Greatorex, J. S., Digard, P., Curran, M. D., Moynihan, R., Wensley, H., Wreghitt, T., Varsani, H., Garcia, F., Enstone, J. et Nguyen-Van-Tam, J. S. (2011). Survival of influenza A (H1N1) on materials found in households: implications for infection control. *PLOS ONE*, 6(11), e27932.

- Gregory, A. E., Titball, R. et Williamson, D. (2013). Vaccine delivery using nanoparticles. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00013>
- Gumulira, A. (2021). Malaria vaccine approval: A step change for global health. *Lancet*, 398, 1381.
- Gutjahr, A., Tiraby, G., Perouzel, E., Verrier, B. et Paul, S. (2016). Triggering intracellular receptors for vaccine adjuvantation. *Trends in immunology*, 37(9), 573-587.
- Habibi, N., Kamaly, N., Memic, A. et Shafiee, H. (2016). Self-assembled peptide-based nanostructures: Smart nanomaterials toward targeted drug delivery. *Nano Today*, 11(1), 41-60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.02.004>
- Halliday, A., Turner, J. D., Guimarães, A., Bates, P. A. et Taylor, M. J. (2016). The TLR2/6 ligand PAM2CSK4 is a Th2 polarizing adjuvant in *Leishmania major* and *Brugia malayi* murine vaccine models. *Parasites & Vectors*, 9(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1381-0>
- Hannoun, C. (2013). The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 12(9), 1085-1094. <https://doi.org/10.1586/14760584.2013.824709>
- Hassin, D., Garber, O. G., Meiraz, A., Schiffenbauer, Y. S. et Berke, G. (2011). Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology*, 133(2), 190-196.
- Heeg, K. et Zimmermann, S. (2000). CpG DNA as a Th1 trigger. *Int Arch Allergy Immunol*, 121(2), 87-97. <https://doi.org/10.1159/000024303>
- Heeg, K. et Zimmermann, S. (2000). CpG DNA as a Th1 trigger. *International archives of allergy and immunology*, 121(2), 87-97.
- Hiemstra, P. S. (2007). The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Exp Lung Res*, 33(10), 537-542. <https://doi.org/10.1080/01902140701756687>
- Hilligan, K. L. et Ronchese, F. (2020). Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cell Mol Immunol*, 17(6), 587-599. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0465-0>
- Hua, S. (2014). Caractérisation des lymphocytes T CD8+ spécifiques du VIH chez les «HIV controllers» Paris 11].
- 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. *Adv Healthc Mater*, 2(8), 1114-1119. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200435>

- Hudalla, G. A., Sun, T., Gasiorowski, J. Z., Han, H., Tian, Y. F., Chong, A. S. et Collier, J. H. (2014). Gradated assembly of multiple proteins into supramolecular nanomaterials. *Nat Mater*, 13(8), 829-836. <https://doi.org/10.1038/nmat3998>
- Huremović, D. (2019). Brief History of Pandemics (Pandemics Throughout History). Dans D. Huremović (dir.), *Psychiatry of Pandemics: A Mental Health Response to Infection Outbreak* (p. 7-35). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-15346-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-15346-5_2).
- Ignacio, B. J., Albin, T. J., Esser-Kahn, A. P. et Verdoes, M. (2018). Toll-like Receptor Agonist Conjugation: A Chemical Perspective. *Bioconjug Chem*, 29(3), 587-603. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00808>
- Ignacio, B. J., Albin, T. J., Esser-Kahn, A. P. et Verdoes, M. (2018). Toll-like receptor agonist conjugation: a chemical perspective. *Bioconjugate Chemistry*, 29(3), 587-603.
- Imai, M., Sugimoto, K., Okazaki, K. et Kida, H. (1998). Fusion of influenza virus with the endosomal membrane is inhibited by monoclonal antibodies to defined epitopes on the hemagglutinin. *Virus Research*, 53(2), 129-139. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(97\)00143-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1702(97)00143-3)
- Imhof, B. A. et Dunon, D. (1995). Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol*, 58, 345-416. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60623-9](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60623-9)
- Irvine, D. J., Swartz, M. A. et Szeto, G. L. (2013). Engineering synthetic vaccines using cues from natural immunity. *Nature materials*, 12(11), 978-990.
- Ito, T., Amakawa, R. et Fukuhara, S. (2002). Roles of toll-like receptors in natural interferon-producing cells as sensors in immune surveillance. *Human Immunology*, 63(12), 1120-1125. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(02\)00750-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0198-8859(02)00750-4)
- Iwasaki, A. et Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5(10), 987-995. <https://doi.org/10.1038/ni1112>
- Iwasaki, A. et Pillai, P. S. (2014). Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol*, 14(5), 315-328. <https://doi.org/10.1038/nri3665>
- Jakubzick, C. V., Randolph, G. J. et Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*, 17(6), 349-362. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.28>
- Janssens, P. (1992). Orthopoxviroses (monkeypox et variole). *Médecine et hygiène en Afrique Centrale de 1885 à nos jours*.



- Jeannin, P., Jaillon, S. et Delneste, Y. (2008). Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Current Opinion in Immunology*, 20(5), 530-537.
- Jegerlehner, A., Schmitz, N., Storni, T. et Bachmann, M. F. (2004). Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J Immunol*, 172(9), 5598-5605. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5598>
- Joo, J., Poon, C., Yoo, S. P. et Chung, E. J. (2018). Shape Effects of Peptide Amphiphile Micelles for Targeting Monocytes. *Molecules*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/molecules23112786>
- Kalil, A. C. et Thomas, P. G. (2019). Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. *Critical Care*, 23(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2539-x>
- Kanekiyo, M., Wei, C.-J., Yassine, H. M., McTamney, P. M., Boyington, J. C., Whittle, J. R. R., Rao, S. S., Kong, W.-P., Wang, L. et Nabel, G. J. (2013). Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature*, 499(7456), 102-106. <https://doi.org/10.1038/nature12202>
- Kang, S., Brown, H. M. et Hwang, S. (2018). Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma. *Immune Netw*, 18(5), e33. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e33>
- Kang, S. M., Song, J. M. et Compans, R. W. (2011). Novel vaccines against influenza viruses. *Virus Res*, 162(1-2), 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.037>
- Karan, S., Choudhury, D. et Dixit, A. (2021). Immunogenic characterization and protective efficacy of recombinant CsgA, major subunit of curli fibers, against *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(2), 599-616. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11038-4>
- Karkada, M., Weir, G. M., Quinton, T., Fuentes-Ortega, A. et Mansour, M. (2010). A liposome-based platform, VacciMax, and its modified water-free platform DepoVax enhance efficacy of in vivo nucleic acid delivery. *Vaccine*, 28(38), 6176-6182. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.025>
- Kashem, S. W., Haniffa, M. et Kaplan, D. H. (2017). Antigen-Presenting Cells in the Skin. *Annu Rev Immunol*, 35, 469-499. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052215>
- Kaur, A., Piplani, S., Kaushik, D., Fung, J., Sakala, I. G., Honda-Okubo, Y., Mehta, S. K., Petrovsky, N. et Salunke, D. B. (2022). Stereoisomeric Pam 2 CS based TLR2 agonists: synthesis, structural modelling and activity as vaccine adjuvants. *RSC Medicinal Chemistry*, 13(5), 622-637.

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1079469>
- 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.
- Kayed, R. et Lasagna-Reeves, C. A. (2013). Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33(s1), S67-S78.
- Kihal, N., Cote-Cyr, M., Nazemi, A. et Bourgault, S. (2023). Semiconductive and Biocompatible Nanofibrils from the Self-Assembly of Amyloid pi-Conjugated Peptides. *Biomacromolecules*, 24(3), 1417-1431. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01438>
- Kim, H., Sehgal, D., Kucaba, T. A., Ferguson, D. M., Griffith, T. S. et Panyam, J. (2018). Acidic pH-responsive polymer nanoparticles as a TLR7/8 agonist delivery platform for cancer immunotherapy [10.1039/C8NR07201A]. *Nanoscale*, 10(44), 20851-20862. <https://doi.org/10.1039/C8NR07201A>
- Kjaer, S. K., Nygard, M., Sundstrom, K., Dillner, J., Tryggvadottir, L., Munk, C., Berger, S., Enerly, E., Hortlund, M., Agustsson, A. I., Bjelkenkrantz, K., Fridrich, K., Guethmundsdottir, I., Sorbye, S. W., Bautista, O., Group, T., Luxembourg, A., Marshall, J. B., Radley, D., Yang, Y. S., Badshah, C. et Saah, A. (2020). Final analysis of a 14-year long-term follow-up study of the effectiveness and immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus vaccine in women from four nordic countries. *EClinicalMedicine*, 23, 100401. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100401>
- Klinman, D. M., Currie, D., Lee, G., Grippe, V. et Merkel, T. (2007). Systemic but not mucosal immunity induced by AVA prevents inhalational anthrax. *Microbes Infect*, 9(12-13), 1478-1483. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.08.002>
- Kool, M., Soullié, T., van Nimwegen, M., Willart, M. A., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H. C., Hammad, H. et Lambrecht, B. N. (2008). Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*, 205(4), 869-882. <https://doi.org/10.1084/jem.20071087>
- Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., Palese, P., Shaw, M. L., Treanor, J., Webster, R. G. et García-Sastre, A. (2018, 2018/06/28).

Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>

- Kulikova, A. A., Makarov, A. A. et Kozin, S. (2015). Roles of zinc ions and structural polymorphism of  $\beta$ -amyloid in the development of Alzheimer's disease. *Molecular Biology*, 49(2), 217-230.
- Kumar, S., Sunagar, R. et Gosselin, E. (2019). Bacterial protein toll-like-receptor agonists: a novel perspective on vaccine adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 10, 1144.
- Kundi, M. (2007). New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system. *Expert Rev Vaccines*, 6(2), 133-140. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.2.133>
- Lamontagne, F., Khatri, V., St-Louis, P., Bourgault, S. et Archambault, D. (2022). Vaccination Strategies Based on Bacterial Self-Assembling Proteins as Antigen Delivery Nanoscaffolds. *Vaccines (Basel)*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/vaccines10111920>
- Lande, R. et Gilliet, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1183(1), 89-103.
- Lee, G.-H. et Lim, S.-G. (2021). CpG-Adjuvanted Hepatitis B Vaccine (HEPLISAV-B®) Update. *Expert Review of Vaccines*, 20(5), 487-495. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1908133>
- Lee, G. H. et Lim, S. G. (2021). CpG-Adjuvanted Hepatitis B Vaccine (HEPLISAV-B(R)) Update. *Expert Rev Vaccines*, 20(5), 487-495. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1908133>
- Lefeber, D. J., Benaissa-Trouw, B., Vliegenthart, J. F., Kamerling, J. P., Jansen, W. T., Kraaijeveld, K. et Snippe, H. (2003). Th1-directing adjuvants increase the immunogenicity of oligosaccharide-protein conjugate vaccines related to *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Infect Immun*, 71(12), 6915-6920. <https://doi.org/10.1128/iai.71.12.6915-6920.2003>
- Li, C., To, K. K., Zhang, A. J., Lee, A. C., Zhu, H., Mak, W. W., Hung, I. F. et Yuen, K.-Y. (2018). Co-stimulation with TLR7 agonist imiquimod and inactivated influenza virus particles promotes mouse B cell activation, differentiation, and accelerated antigen specific antibody production. *Frontiers in Immunology*, 9, 2370.
- Li, F., Li, K., Cui, Z.-Q., Zhang, Z.-P., Wei, H.-P., Gao, D., Deng, J.-Y. et Zhang, X.-E. (2010). Viral Coat Proteins as Flexible Nano-Building-Blocks for Nanoparticle Encapsulation. *Small*, 6(20), 2301-2308. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/sml.201001078>

- Li, L., Dai, H., Nguyen, A. P., Hai, R. et Gu, W. (2020). Influenza A virus utilizes noncanonical cap-snatching to diversify its mRNA/ncRNA. *Rna*, 26(9), 1170-1183. <https://doi.org/10.1261/rna.073866.119>
- Liu, W., Li, H. et Chen, Y.-H. (2003). N-terminus of M2 protein could induce antibodies with inhibitory activity against influenza virus replication. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(2), 141-146.
- Lombana, T. N., Rajan, S., Zorn, J. A., Mandikian, D., Chen, E. C., Estevez, A., Yip, V., Bravo, D. D., Phung, W. et Farahi, F. (2019). Production, characterization, and in vivo half-life extension of polymeric IgA molecules in mice. (p. 1122-1138). *MAbs*, Taylor & Francis.
- Lu, S., Wang, S. et Grimes-Serrano, J. M. (2008). Current progress of DNA vaccine studies in humans. *Expert Rev Vaccines*, 7(2), 175-191. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.2.175>
- Luchner, M., Reinke, S. et Milicic, A. (2021). TLR Agonists as Vaccine Adjuvants Targeting Cancer and Infectious Diseases. *Pharmaceutics*, 13(2), 142. <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/2/142>
- Luchner, M., Reinke, S. et Milicic, A. (2021). TLR Agonists as Vaccine Adjuvants Targeting Cancer and Infectious Diseases. *Pharmaceutics*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020142>
- Lynn, G. M., Laga, R., Darrah, P. A., Ishizuka, A. S., Balaci, A. J., Dulcey, A. E., Pechar, M., Pola, R., Gerner, M. Y., Yamamoto, A., Buechler, C. R., Quinn, K. M., Smelkinson, M. G., Vanek, O., Cawood, R., Hills, T., Vasalatiy, O., Kastenmuller, K., Francica, J. R., Stutts, L., Tom, J. K., Ryu, K. A., Esser-Kahn, A. P., Etrych, T., Fisher, K. D., Seymour, L. W. et Seder, R. A. (2015). In vivo characterization of the physicochemical properties of polymer-linked TLR agonists that enhance vaccine immunogenicity. *Nat Biotechnol*, 33(11), 1201-1210. <https://doi.org/10.1038/nbt.3371>
- Macagno, M., Bandini, S., Bolli, E., Bello, A., Riccardo, F., Barutello, G., Merighi, I. F., Forni, G., Lamolinara, A., Del Pizzo, F., Iezzi, M., Cavallo, F., Conti, L. et Quaglino, E. (2022). Role of ADCC, CDC, and CDCC in Vaccine-Mediated Protection against Her2 Mammary Carcinogenesis. *Biomedicines*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020230>
- Maddelein, M.-L. (2002). Les agrégats amyloïdes de la protéine prion HET-s sont infectieux. *Med Sci (Paris)*, 18(12), 1187-1189. <https://doi.org/10.1051/medsci/200218121187>
- Makam, P. et Gazit, E. (2018). Minimalistic peptide supramolecular co-assembly: expanding the conformational space for nanotechnology. *Chem Soc Rev*, 47(10), 3406-3420. <https://doi.org/10.1039/c7cs00827a>

- Mallajosyula, J. K., Hiatt, E., Hume, S., Johnson, A., Jeevan, T., Chikwamba, R., Pogue, G. P., Bratcher, B., Haydon, H. et Webby, R. J. (2014). Single-dose monomeric HA subunit vaccine generates full protection from influenza challenge. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(3), 586-595.
- Manicassamy, S. et Pulendran, B. (2009). Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*, 21(4), 185-193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.05.005>
- 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. *Eur J Immunol*, 38(5), 1404-1413. <https://doi.org/10.1002/eji.200737984>
- Marchoux, G. et Gebre-Selassie, K. (1989). Variability of viruses in market-garden Solanaceae crops. *Phytoma (France)*.
- Marodi, L., Schreiber, S., Anderson, D., MacDermott, R., Korchak, H. et Johnston, R. (1993). Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *The Journal of clinical investigation*, 91(6), 2596-2601.
- Martinez, V., Costagliola, D., Bonduelle, O., N'go, N., Schnuriger, A., Théodorou, I., Clauvel, J.-P., Sicard, D., Agut, H. et Debré, P. (2005). Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression. *Journal of Infectious Diseases*, 191(12), 2053-2063.
- Mathers, C. D., Boerma, T. et Ma Fat, D. (2009). Global and regional causes of death. *British Medical Bulletin*, 92(1), 7-32. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldp028>
- Matsuzaki, Y., Sugawara, K., Furuse, Y., Shimotai, Y., Hongo, S., Oshitani, H., Mizuta, K. et Nishimura, H. (2016, Sep 15). Genetic Lineage and Reassortment of Influenza C Viruses Circulating between 1947 and 2014. *J Virol*, 90(18), 8251-8265. <https://doi.org/10.1128/jvi.00969-16>
- Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M. et Rappuoli, R. (2010). New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 22(3), 411-416. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.04.004>
- McCluskie, M. J. et Davis, H. L. (2000). Oral, intrarectal and intranasal immunizations using CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Vaccine*, 19(4-5), 413-422.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1(2), 135-145. <https://doi.org/10.1038/35100529>

- Meier, C. R., Napalkov, P. N., Wegmüller, Y., Jefferson, T. et Jick, H. (2000). Population-Based Study on Incidence, Risk Factors, Clinical Complications and Drug Utilisation Associated with Influenza in the United Kingdom. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(11), 834-842. <https://doi.org/10.1007/s100960000376>
- Mendez, S., Tabbara, K., Belkaid, Y., Bertholet, S., Verthelyi, D., Klinman, D., Seder, R. A. et Sacks, D. L. (2003). Coinjection with CpG-containing immunostimulatory oligodeoxynucleotides reduces the pathogenicity of a live vaccine against cutaneous Leishmaniasis but maintains its potency and durability. *Infect Immun*, 71(9), 5121-5129. <https://doi.org/10.1128/iai.71.9.5121-5129.2003>
- Mendy, M., Peterson, I., Hossin, S., Peto, T., Jobarteh, M. L., Jeng-Barry, A., Sidibeh, M., Jatta, A., Moore, S. E., Hall, A. J. et Whittle, H. (2013). Observational study of vaccine efficacy 24 years after the start of hepatitis B vaccination in two Gambian villages: no need for a booster dose. *PLoS One*, 8(3), e58029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058029>
- Mezhenskaya, D., Isakova-Sivak, I. et Rudenko, L. (2019). M2e-based universal influenza vaccines: a historical overview and new approaches to development. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0572-3>
- Minervina, A., Pogorelyy, M. et Mamedov, I. (2019). T-cell receptor and B-cell receptor repertoire profiling in adaptive immunity. *Transplant International*, 32(11), 1111-1123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tri.13475>
- Mischler, R. et Metcalfe, I. C. (2002). Inflexal® V a trivalent virosome subunit influenza vaccine: production. *Vaccine*, 20, B17-B23.
- Moens, L. et Tangye, S. G. (2014). Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front Immunol*, 5, 65. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00065>
- Mohsen, M. O., Augusto, G. et Bachmann, M. F. (2020). The 3Ds in virus-like particle based-vaccines:“Design, Delivery and Dynamics”. *Immunological reviews*, 296(1), 155-168.
- Mora-Solano, C., Wen, Y., Han, H., Chen, J., Chong, A. S., Miller, M. L., Pompano, R. R. et Collier, J. H. (2017). Active immunotherapy for TNF-mediated inflammation using self-assembled peptide nanofibers. *Biomaterials*, 149, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.031>
- Morales, C. G. (2022). Using Self-Assembling Peptides as a Platform to Create New Human Papillomavirus Vaccine Candidates (Publication no 29206996) [M.S., Northern Arizona University]. ProQuest Dissertations & Theses Global. Ann Arbor. <https://www.proquest.com/dissertations-theses/using-self-assembling-peptides-as-platform-create/docview/2671706502/se-2?accountid=14719>. <https://uqam-bib.on.worldcat.org/atoztitles/link?sid=ProQ:&issn=&volume=&issue=&title=Using+Sel>

Assembling+Peptides+as+a+Platform+to+Create+New+Human+Papillomavirus+Vaccine  
+Candidates&spage=&date=2022-01-01&atitle=Using+Self-  
Assembling+Peptides+as+a+Platform+to+Create+New+Human+Papillomavirus+Vaccine  
+Candidates&au=Morales%2C+Crystal+G.&id=doi:

- Mosnier, A., Launay, O., Martinez, L., Gavazzi, G., Josset, L., Crepey, P., Hannoun, C., Weil-Olivier, C. et Gaillat, J. (2018). Vaccin grippal quadrivalent : quels changements pour quels bénéfices ? *La Presse Médicale*, 47(10), 842-853. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lpm.2018.06.013>
- Moyer, T. J., Zmolek, A. C. et Irvine, D. J. (2016). Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *J Clin Invest*, 126(3), 799-808. <https://doi.org/10.1172/jci81083>
- Moyle, P. M. et Toth, I. (2013). Modern Subunit Vaccines: Development, Components, and Research Opportunities. *ChemMedChem*, 8(3), 360-376. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cmdc.201200487>
- Mukhopadhyay, T. K. (2010, 2010/02/01). Vaccines Europe 2009. *Expert Review of Vaccines*, 9(2), 125-128. <https://doi.org/10.1586/erv.09.162>
- Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R. et Kawaoka, Y. (2013). Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *Journal of virology*, 87(5), 2455-2462.
- Murphy, K. M., Weaver, Casey. (2022). *Janeway's Immunobiology*. Dans *Janeway's Immunobiology*, Ninth Edition (10th éd.). W.W. Norton & Company.
- Muul, L. M., Heine, G., Silvin, C., James, S. P., Candotti, F., Radbruch, A. et Worm, M. (2011). Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes. *Current protocols in immunology*, 94(1), 7.10. 11-17.10. 26.
- Nakatsu, S., Murakami, S., Shindo, K., Horimoto, T., Sagara, H., Noda, T. et Kawaoka, Y. (2018, Mar 15). Influenza C and D Viruses Package Eight Organized Ribonucleoprotein Complexes. *J Virol*, 92(6). <https://doi.org/10.1128/jvi.02084-17>
- Nemchinov, L., Liang, T., Rifaat, M., Mazyad, H., Hadidi, A. et Keith, J. (2000). Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus. *Archives of Virology*, 145(12), 2557-2573.
- Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Mhlanga, M. M., Mulder, W. J. M., Riksen, N. P., Schlitzer, A., Schultze, J. L., Stabell Benn, C., Sun, J. C., Xavier, R. J. et Latz, E. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 20(6), 375-388. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6>

- Nguyen, P. T., Zottig, X., Sebastiao, M., Arnold, A. A., Marcotte, I. et Bourgault, S. (2021). Identification of transmissible proteotoxic oligomer-like fibrils that expand conformational diversity of amyloid assemblies. *Commun Biol*, 4(1), 939. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02466-7>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00209>
- Nguyen, Q. D., Kikuchi, K., Maity, B. et Ueno, T. (2021). The Versatile Manipulations of Self-Assembled Proteins in Vaccine Design. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1934. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/1934>
- O'Neill, C. L., Shrimali, P. C., Clapacs, Z. P., Files, M. A. et Rudra, J. S. (2021). Peptide-based supramolecular vaccine systems(). *Acta Biomater.* <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.003>
- Ohradanova-Repic, A., Machacek, C., Fischer, M. B. et Stockinger, H. (2016). Differentiation of human monocytes and derived subsets of macrophages and dendritic cells by the HLDA10 monoclonal antibody panel. *Clin Transl Immunology*, 5(1), e55. <https://doi.org/10.1038/cti.2015.39>
- Olive, C. (2012). Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines*, 11(2), 237-256. <https://doi.org/10.1586/erv.11.189>
- Osorio, F. et Reis e Sousa, C. (2011). Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. *Immunity*, 34(5), 651-664. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.001>
- Otsuka, A., Nonomura, Y. et Kabashima, K. (2016). Roles of basophils and mast cells in cutaneous inflammation. *Seminars in Immunopathology*, 38(5), 563-570. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0570-4>
- Paget, J., Spreuwenberg, P., Charu, V., Taylor, R. J., Iuliano, A. D., Bresee, J., Simonsen, L. et Viboud, C. (2019). Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project. *J Glob Health*, 9(2), 020421. <https://doi.org/10.7189/jogh.09.020421>
- Parekh, B. S., Berger, E., Sibley, S., Cahya, S., Xiao, L., LaCerte, M. A., Vaillancourt, P., Wooden, S. et Gately, D. (2012). Development and validation of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-reporter gene assay. (p. 310-318). *MAbs*, Taylor & Francis.
- Park, J.-K. et Taubenberger, J. K. (2016). Universal influenza vaccines: To dream the possible dream? *ACS infectious diseases*, 2(1), 5-7.



- Pasquale, A. D., Preiss, S., Silva, F. T. D. et Garçon, N. (2015). Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*, 3(2), 320-343. <https://www.mdpi.com/2076-393X/3/2/320>
- Paules, C. I., Sullivan, S. G., Subbarao, K. et Fauci, A. S. (2018). Chasing Seasonal Influenza - The Need for a Universal Influenza Vaccine. *N Engl J Med*, 378(1), 7-9. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1714916>
- Peng, G., Keshavan, S., Delogu, L., Shin, Y., Casiraghi, C. et Fadeel, B. (2022). Two-Dimensional Transition Metal Dichalcogenides Trigger Trained Immunity in Human Macrophages through Epigenetic and Metabolic Pathways. *Small*, 18(20), 2107816.
- Pimentel, T. A. P. F., Yan, Z., Jeffers, S. A., Holmes, K. V., Hodges, R. S. et Burkhard, P. (2009). Peptide Nanoparticles as Novel Immunogens: Design and Analysis of a Prototypic Severe Acute Respiratory Syndrome Vaccine. *Chemical Biology & Drug Design*, 73(1), 53-61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00746.x>
- Pincetic, A., Bournazos, S., DiLillo, D. J., Maamary, J., Wang, T. T., Dahan, R., Fiebiger, B.-M. et Ravetch, J. V. (2014). Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*, 15(8), 707-716.
- Pinto-Alphandary, H., Andremont, A. et Couvreur, P. (2000). Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13(3), 155-168. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00121-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00121-1)
- Pleschka, S. (2013). Overview of influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 370, 1-20. [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_272](https://doi.org/10.1007/82_2012_272)
- Plummer, E. M. et Manchester, M. (2011). Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3(2), 174-196. <https://doi.org/10.1002/wnan.119>
- Pollard, A. J. et Bijker, E. M. (2021). A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*, 21(2), 83-100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>
- 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. *Adv Healthc Mater*, 3(11), 1898-1908. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400137>
- Primard, C., Poecheim, J., Heuking, S., Sublet, E., Esmaeili, F. et Borchard, G. (2013). Multifunctional PLGA-based nanoparticles encapsulating simultaneously hydrophilic

antigen and hydrophobic immunomodulator for mucosal immunization. *Molecular Pharmaceutics*, 10(8), 2996-3004.

- Pulendran, B., S. Arunachalam, P. et O'Hagan, D. T. (2021). Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(6), 454-475. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00163-y>
- Qi, M., Zhang, X. E., Sun, X., Zhang, X., Yao, Y., Liu, S., Chen, Z., Li, W., Zhang, Z. et Chen, J. (2018). Intranasal nanovaccine confers homo-and hetero-subtypic influenza protection. *Small*, 14(13), 1703207.
- Rémy, V., Zöllner, Y. et Heckmann, U. (2015). Vaccination: the cornerstone of an efficient healthcare system. *J Mark Access Health Policy*, 3. <https://doi.org/10.3402/jmahp.v3.27041>
- Reperant, L. A. et Osterhaus, A. D. M. E. (2017). AIDS, Avian flu, SARS, MERS, Ebola, Zika... what next? *Vaccine*, 35(35, Part A), 4470-4474. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.082>
- Richardson, J. C. et Akkina, R. K. (1991). NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Archives of Virology*, 116(1), 69-80. <https://doi.org/10.1007/BF01319232>
- Riedel, T., Ghasparian, A., Moehle, K., Rusert, P., Trkola, A. et Robinson, J. A. (2011). Synthetic virus-like particles and conformationally constrained peptidomimetics in vaccine design [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Chembiochem*, 12(18), 2829-2836. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100586>
- Roberts, A., Deming, D., Paddock, C. D., Cheng, A., Yount, B., Vogel, L., Herman, B. D., Sheahan, T., Heise, M. et Genrich, G. L. (2007). A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS pathogens*, 3(1), e5.
- Robson, B. (2020). COVID-19 Coronavirus spike protein analysis for synthetic vaccines, a peptidomimetic antagonist, and therapeutic drugs, and analysis of a proposed achilles' heel conserved region to minimize probability of escape mutations and drug resistance. *Computers in Biology and Medicine*, 121, 103749. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2020.103749>
- Rodrigues, M. Q., Alves, P. M. et Roldão, A. (2021). Functionalizing Ferritin Nanoparticles for Vaccine Development. *Pharmaceutics*, 13(10), 1621. <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/10/1621>
- Roldao, A., Mellado, M. C., Castilho, L. R., Carrondo, M. J. et Alves, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 9(10), 1149-1176. <https://doi.org/10.1586/erv.10.115>

- Roldão, A., Mellado, M. C. M., Castilho, L. R., Carrondo, M. J. T. et Alves, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 9(10), 1149-1176. <https://doi.org/10.1586/erv.10.115>
- Romagnani, S. (1999). Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*, 5(4), 285-294. <https://doi.org/10.1097/00054725-199911000-00009>
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.041>
- Rudra, J. S., Sun, T., Bird, K. C., Daniels, M. D., Gasiorowski, J. Z., Chong, A. S. et Collier, J. H. (2012). Modulating Adaptive Immune Responses to Peptide Self-Assemblies. *ACS Nano*, 6(2), 1557-1564. <https://doi.org/10.1021/nn204530r>
- Rudra, J. S., Tian, Y. F., Jung, J. P. et Collier, J. H. (2010, January 12, 2010). A self-assembling peptide acting as an immune adjuvant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 622-627. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912124107>
- Rudra, J. S., Tian, Y. F., Jung, J. P. et Collier, J. H. (2010). A self-assembling peptide acting as an immune adjuvant [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(2), 622-627. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912124107>
- Sabroe, I., Parker, L., Dower, S. et Whyte, M. (2008). The role of TLR activation in inflammation. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 214(2), 126-135.
- Sakono, M. et Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of A $\beta$  oligomers. *The FEBS journal*, 277(6), 1348-1358.
- Salari Namin, S., Francis, E. et Heinrich, V. (2022). Eosinophil phagocytosis of IgG-coated targets depends on the presence of serum. *Biophysical Journal*, 121, 119a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.11.2132>
- Samji, T. (2009). Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med*, 82(4), 153-159.
- Sassone-Corsi, M. et Raffatellu, M. (2015). No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. *J Immunol*, 194(9), 4081-4087. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403169>
- Sato-Kaneko, F., Yao, S., Lao, F. S., Shpigelman, J., Messer, K., Pu, M., Shukla, N. M., Cottam, H. B., Chan, M. et Chu, P. J. (2020). A novel synthetic dual agonistic liposomal TLR4/7

adjuvant promotes broad immune responses in an influenza vaccine with minimal reactogenicity. *Frontiers in Immunology*, 11, 1207.

Scheenstra, M. R., Van Harten, R. M., Veldhuizen, E. J., Haagsman, H. P. et Coorens, M. (2020). Cathelicidins modulate TLR-activation and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 11, 1137.

Schlamadinger, D. E. et Miranker, A. D. (2014). Fiber-dependent and-independent toxicity of islet amyloid polypeptide. *Biophysical Journal*, 107(11), 2559-2566.

Schneider, C., Nobs, S. P., Heer, A. K., Kurrer, M., Klinke, G., Van Rooijen, N., Vogel, J. et Kopf, M. (2014). Alveolar macrophages are essential for protection from respiratory failure and associated morbidity following influenza virus infection. *PLoS pathogens*, 10(4), e1004053.

Schön, M. et Schön, M. (2007). Imiquimod: mode of action. *British Journal of Dermatology*, 157, 8-13.

Schroeder, H. W., Jr. et Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S41-S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>

Sethuraman, N. et Stadheim, T. A. (2006). Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4), 341-346. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.010>

Shi, S., Zhu, H., Xia, X., Liang, Z., Ma, X. et Sun, B. (2019). Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*, 37(24), 3167-3178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.055>

Shokouhi, H., Farahmand, B., Ghaemi, A., Mazaheri, V. et Fotouhi, F. (2018). Vaccination with three tandem repeats of M2 extracellular domain fused to *Leishmania major* HSP70 protects mice against influenza A virus challenge. *Virus Research*, 251, 40-46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.05.003>

Shukla, N. M., Malladi, S. S., Mutz, C. A., Balakrishna, R. et David, S. A. (2010, Jun 10). Structure-activity relationships in human toll-like receptor 7-active imidazoquinoline analogues. *J Med Chem*, 53(11), 4450-4465. <https://doi.org/10.1021/jm100358c>

Shukla, N. M., Mutz, C. A., Ukani, R., Warshakoon, H. J., Moore, D. S. et David, S. A. (2010). Syntheses of fluorescent imidazoquinoline conjugates as probes of Toll-like receptor 7. *Bioorg Med Chem Lett*, 20(22), 6384-6386. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.09.093>

- Simhadri, V. R., Dimitrova, M., Mariano, J. L., Zenarruzabeitia, O., Zhong, W., Ozawa, T., Muraguchi, A., Kishi, H., Eichelberger, M. C. et Borrego, F. (2015). A Human Anti-M2 Antibody Mediates Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) and Cytokine Secretion by Resting and Cytokine-Preactivated Natural Killer (NK) Cells. *PLoS One*, 10(4), e0124677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124677>
- Singh, V. K., Mehrotra, S. et Agarwal, S. S. (1999). The paradigm of Th1 and Th2 cytokines. *Immunologic Research*, 20(3), 147-161. <https://doi.org/10.1007/BF02786470>
- Siracusa, M. C., Perrigoue, J. G., Comeau, M. R. et Artis, D. (2010). New paradigms in basophil development, regulation and function. *Immunology & Cell Biology*, 88(3), 275-284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/icb.2010.1>
- Snapper, C. M., Finkelman, F. D. et Paul, W. E. (1988). Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *Journal of Experimental Medicine*, 167(1), 183-196. <https://doi.org/10.1084/jem.167.1.183>
- Staneková, Z. et Varečková, E. (2010). Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virology Journal*, 7(1), 351. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-351>
- Stanley, M. (2002). Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clinical and experimental dermatology*, 27(7), 571-577.
- Stanley, M. A. (2002). Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol*, 27(7), 571-577. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2002.01151.x>
- Stepanova, L. A., Kotlyarov, R. Y., Kovaleva, A. A., Potapchuk, M. V., Korotkov, A. V., Sergeeva, M. V., Kasianenko, M. A., Kuprianov, V. V., Ravin, N. V. et Tsybalova, L. M. (2015). Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin. *PLOS ONE*, 10(3), e0119520.
- 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. <https://doi.org/10.1038/334255a0>
- Su, S.-B., Tao, L., Deng, Z. P., Chen, W., Qin, S.-Y. et Jiang, H. (2020). TLR10: Insights, controversies and potential utility as a therapeutic target. *Scandinavian Journal of Immunology*, 93.

- Suzuki, K., Suda, T., Naito, T., Ide, K., Chida, K. et Nakamura, H. (2005). Impaired toll-like receptor 9 expression in alveolar macrophages with no sensitivity to CpG DNA. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 171(7), 707-713.
- Syed, Y. Y. (2018). Recombinant Zoster Vaccine (Shingrix®): A Review in Herpes Zoster. *Drugs & Aging*, 35(12), 1031-1040. <https://doi.org/10.1007/s40266-018-0603-x>
- Takeda, Y., Yoshida, S., Takashima, K., Ishii-Mugikura, N., Shime, H., Seya, T. et Matsumoto, M. (2018). Vaccine immunotherapy with ARNAX induces tumor-specific memory T cells and durable anti-tumor immunity in mouse models. *Cancer science*, 109(7), 2119-2129.
- Taki, A. et Smooker, P. (2015). Small Wonders-The Use of Nanoparticles for Delivering Antigen. *Vaccines (Basel)*, 3(3), 638-661. <https://doi.org/10.3390/vaccines3030638>
- Tamborrini, M., Geib, N., Marrero-Nodarse, A., Jud, M., Hauser, J., Aho, C., Lamelas, A., Zuniga, A., Pluschke, G., Ghasparian, A. et Robinson, J. A. (2015). A Synthetic Virus-Like Particle Streptococcal Vaccine Candidate Using B-Cell Epitopes from the Proline-Rich Region of Pneumococcal Surface Protein A. *Vaccines (Basel)*, 3(4), 850-874. <https://doi.org/10.3390/vaccines3040850>
- Tamura, S.-i., Miyata, K., Matsuo, K., Asanuma, H., Takahashi, H., Nakajima, K., Suzuki, Y., Aizawa, C. et Kurata, T. (1996). Acceleration of influenza virus clearance by Th1 cells in the nasal site of mice immunized intranasally with adjuvant-combined recombinant nucleoprotein. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156(10), 3892-3900.
- Tang, S., Liu, Z., Xu, W., Li, Q., Han, T., Pan, D., Yue, N., Wu, M., Liu, Q. et Yuan, W. (2019). Versatile functionalization of ferritin nanoparticles by intein-mediated trans-splicing for antigen/adjuvant co-delivery. *Nano Letters*, 19(8), 5469-5475.
- Tao, W., Ziemer, K. S. et Gill, H. S. (2014). Gold nanoparticle-M2e conjugate coformulated with CpG induces protective immunity against influenza A virus. *Nanomedicine (Lond)*, 9(2), 237-251. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.58>
- Taş, K., Volta, B. D., Lindner, C., El Bounkari, O., Hille, K., Tian, Y., Puig-Bosch, X., Ballmann, M., Hornung, S. et Ortner, M. (2022). Designed peptides as nanomolar cross-amyloid inhibitors acting via supramolecular nanofiber co-assembly. *Nature Communications*, 13(1), 5004.
- Tau, G. et Rothman, P. (1999). Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy*, 54(12), 1233-1251. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.1999.00099.x>
- Tauraso, N. M. et O'Brien, T. C. (1970). Comparison of the haemagglutinin production of influenza A2 Hong Kong variant and recombinant strains. *Bull World Health Organ*, 43(2), 275-279.

- Todorova, B., Adam, L., Culina, S., Boisgard, R., Martinon, F., Cosma, A., Ustav, M., Kortulewski, T., Le Grand, R. et Chapon, C. (2017, 2017/06/23). Electroporation as a vaccine delivery system and a natural adjuvant to intradermal administration of plasmid DNA in macaques. *Scientific Reports*, 7(1), 4122. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04547-2>
- Tokars, J. I., Olsen, S. J. et Reed, C. (2017). Seasonal Incidence of Symptomatic Influenza in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 66(10), 1511-1518. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1060>
- Tsybalova, L. M., Stepanova, L. A., Shuklina, M. A., Mardanova, E. S., Kotlyarov, R. Y., Potapchuk, M. V., Petrov, S. A., Blokhina, E. A. et Ravin, N. V. (2018). Combination of M2e peptide with stalk HA epitopes of influenza A virus enhances protective properties of recombinant vaccine [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS One*, 13(8), e0201429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201429>
- Tukel, C., Wilson, R. P., Nishimori, J. H., Pezeshki, M., Chromy, B. A. et Baumler, A. J. (2009, Jul 23). Responses to amyloids of microbial and host origin are mediated through toll-like receptor 2 [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Host Microbe*, 6(1), 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.020>
- Turley, C. B., Rupp, R. E., Johnson, C., Taylor, D. N., Wolfson, J., Tussey, L., Kavita, U., Stanberry, L. et Shaw, A. (2011). Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine*, 29(32), 5145-5152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.041>
- Unsoeld, H. et Pircher, H. (2005). Complex memory T-cell phenotypes revealed by coexpression of CD62L and CCR7. *Journal of virology*, 79(7), 4510-4513.
- Vabret, A., Dina, J., Cuvillon-Nimal, D., Nguyen, E., Gouarin, S., Petitjean, J., Brouard, J. et Freymuth, F. (2010). La grippe saisonnière. *Pathologie Biologie*, 58(2), e51-e57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.patbio.2010.01.009>
- Vacchelli, E., Galluzzi, L., Eggermont, A., Fridman, W. H., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L. et Kroemer, G. (2012). Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *OncoImmunology*, 1(6), 894-907. <https://doi.org/10.4161/onci.20931>
- van den Heuvel, M., Baptist, H., Venema, P., van der Linden, E., Löwik, D. W. P. M. et van Hest, J. C. M. (2011). Mechanical and thermal stabilities of peptide amphiphile fibres [10.1039/C1SM05642E]. *Soft Matter*, 7(20), 9737-9743. <https://doi.org/10.1039/C1SM05642E>
- Van den Hoecke, S., Ballegeer, M., Vrancken, B., Deng, L., Job, E. R., Roose, K., Schepens, B., Van Hoecke, L., Lemey, P. et Saelens, X. (2021). In Vivo Therapy with M2e-Specific IgG

- Selects for an Influenza A Virus Mutant with Delayed Matrix Protein 2 Expression. *Mbio*, 12(4), e00745-00721.
- Van den Hoecke, S., Ehrhardt, K., Kolpe, A., El Bakkouri, K., Deng, L., Grootaert, H., Schoonoghe, S., Smet, A., Bentahir, M. et Roose, K. (2017). Hierarchical and redundant roles of activating FcγRs in protection against influenza disease by M2e-specific IgG1 and IgG2a antibodies. *Journal of virology*, 91(7), e02500-02516.
- van der Heijden, C. D., Noz, M. P., Joosten, L. A., Netea, M. G., Riksen, N. P. et Keating, S. T. (2018). Epigenetics and trained immunity. *Antioxidants & redox signaling*, 29(11), 1023-1040.
- Van Gerven, N., Waksman, G. et Remaut, H. (2011). Chapter 2 - Pili and Flagella: Biology, Structure, and Biotechnological Applications. Dans S. Howorka (dir.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (vol. 103, p. 21-72). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415906-8.00005-4>.
- van Panhuys, N. (2016). TCR Signal Strength Alters T–DC Activation and Interaction Times and Directs the Outcome of Differentiation [Hypothesis and Theory]. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00006>
- Vandervan, H. A. et Kent, S. J. (2020). The protective potential of Fc-mediated antibody functions against influenza virus and other viral pathogens. *Immunology and Cell Biology*, 98(4), 253-263.
- Vartak, A. et Sucheck, S. J. (2016). Recent Advances in Subunit Vaccine Carriers. *Vaccines*, 4(2), 12. <https://www.mdpi.com/2076-393X/4/2/12>
- Venters, C., Graham, W. et Cassidy, W. (2004). Recombivax-HB: perspectives past, present and future. *Expert Review of Vaccines*, 3(2), 119-129. <https://doi.org/10.1586/14760584.3.2.119>
- Vikkurthi, R., Ansari, A., Pai, A. R., Jha, S. N., Sachan, S., Pandit, S., Nikam, B., Kalia, A., Jit, B. P., Parray, H. A., Singh, S., Kshetrapal, P., Wadhwa, N., Shrivastava, T., Coshic, P., Kumar, S., Sharma, P., Sharma, N., Taneja, J., Pandey, A. K., Sharma, A., Thiruvengadam, R., Grifoni, A., Weiskopf, D., Sette, A., Bhatnagar, S. et Gupta, N. (2022). Inactivated whole-virion vaccine BBV152/Covaxin elicits robust cellular immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Nature Microbiology*, 7(7), 974-985. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01161-5>
- Vu, M. N., Kelly, H. G., Kent, S. J. et Wheatley, A. K. (2021). Current and future nanoparticle vaccines for COVID-19. *eBioMedicine*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103699>



- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L. et Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood*, 106(7), 2252-2258.
- Wang, L., Gong, C., Yuan, X. et Wei, G. (2019). Controlling the Self-Assembly of Biomolecules into Functional Nanomaterials through Internal Interactions and External Stimulations: A Review. *Nanomaterials (Basel)*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/nano9020285>
- Wang, Q., Zhang, Y., Zou, P., Wang, M., Fu, W., She, J., Song, Z., Xu, J., Huang, J. et Wu, F. (2020). Self-assembly M2e-based peptide nanovaccine confers broad protection against influenza viruses. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1961.
- Wang, Q., Zhang, Y., Zou, P., Wang, M., Fu, W., She, J., Song, Z., Xu, J., Huang, J. et Wu, F. (2020). Self-Assembly M2e-Based Peptide Nanovaccine Confers Broad Protection Against Influenza Viruses. *Front Microbiol*, 11, 1961. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01961>
- Ward, B. J., Gobeil, P., Seguin, A., Atkins, J., Boulay, I., Charbonneau, P. Y., Couture, M., D'Aoust, M. A., Dhaliwall, J., Finkle, C., Hager, K., Mahmood, A., Makarkov, A., Cheng, M. P., Pillet, S., Schimke, P., St-Martin, S., Trepanier, S. et Landry, N. (2021). Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. *Nat Med*, 27(6), 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01370-1>
- Watanabe, T., Watanabe, S. et Kawaoka, Y. (2010/). Cellular Networks Involved in the Influenza Virus Life Cycle. *Cell Host & Microbe*, 7(6), 427-439. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.008>
- Watkins, H. C., Rappazzo, C. G., Higgins, J. S., Sun, X., Brock, N., Chau, A., Misra, A., Cannizzo, J. P., King, M. R. et Maines, T. R. (2017). Safe recombinant outer membrane vesicles that display M2e elicit heterologous influenza protection. *Molecular Therapy*, 25(4), 989-1002.
- 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 [10.1039/C6CS00542J]. *Chemical Society Reviews*, 46(15), 4661-4708. <https://doi.org/10.1039/C6CS00542J>
- Wen, Y. et Collier, J. H. (2015, Aug). Supramolecular peptide vaccines: tuning adaptive immunity [Research Support, N.I.H., Extramural/Review]. *Curr Opin Immunol*, 35, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.06.007>
- Wilkins, A. L., Kazmin, D., Napolitani, G., Clutterbuck, E. A., Pulendran, B., Siegrist, C. A. et Pollard, A. J. (2017). AS03- and MF59-Adjuvanted Influenza Vaccines in Children. *Front Immunol*, 8, 1760. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01760>

- Wong, G., Clark-Lewis, I., McKimm-Breschkin, L., Harris, A. et Schrader, J. (1983). Interferon-gamma induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid, macrophage, and myeloid cell lines. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 131(2), 788-793.
- Wu, F., Oka, Y., Tsuboi, A., Elisseeva, O. A., Ogata, K., Nakajima, H., Fujiki, F., Masuda, T., Murakami, M., Yoshihara, S., Ikegame, K., Hosen, N., Kawakami, M., Nakagawa, M., Kubota, T., Soma, T., Yamagami, T., Tsukaguchi, M., Ogawa, H., Oji, Y., Hamaoka, T., Kawase, I. et Sugiyama, H. (2005). Th1-biased humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in the patients with hematopoietic malignancies. *Leukemia*, 19(2), 268-274. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403539>
- Wu, T. Y., Singh, M., Miller, A. T., De Gregorio, E., Doro, F., D'Oro, U., Skibinski, D. A., Mbow, M. L., Bufali, S., Herman, A. E., Cortez, A., Li, Y., Nayak, B. P., Tritto, E., Filippi, C. M., Otten, G. R., Brito, L. A., Monaci, E., Li, C., Aprea, S., Valentini, S., Calabromicron, S., Laera, D., Brunelli, B., Caproni, E., Malyala, P., Panchal, R. G., Warren, T. K., Bavari, S., O'Hagan, D. T., Cooke, M. P. et Valiante, N. M. (2014). Rational design of small molecules as vaccine adjuvants. *Sci Transl Med*, 6(263), 263ra160. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009980>
- Xu, Z. et Moyle, P. M. (2017). Bioconjugation approaches to producing subunit vaccines composed of protein or peptide antigens and covalently attached toll-like receptor ligands. *Bioconjugate Chemistry*, 29(3), 572-586.
- Yao, Y., Wang, H., Chen, J., Shao, Z., He, B., Chen, J., Lan, J., Chen, Q. et Chen, Z. (2019). Protection against homo and hetero-subtypic influenza A virus by optimized M2e DNA vaccine. *Emerging Microbes & Infections*, 8(1), 45-54.
- Yoshimoto, T. (2018). The hunt for the source of primary interleukin-4: how we discovered that natural killer T cells and basophils determine T helper type 2 cell differentiation in vivo. *Frontiers in Immunology*, 9, 716.
- Yunna, C., Mengru, H., Lei, W. et Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European journal of pharmacology*, 877, 173090.
- Zaman, M., Abdel-Aal, A. B., Fujita, Y., Phillipps, K. S., Batzloff, M. R., Good, M. F. et Toth, I. (2012). Immunological evaluation of lipopeptide group A streptococcus (GAS) vaccine: structure-activity relationship [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS One*, 7(1), e30146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030146>
- Zaman, M., Abdel-Aal, A. B., Fujita, Y., Ziora, Z. M., Batzloff, M. R., Good, M. F. et Toth, I. (2012). Structure-activity relationship for the development of a self-adjuvanting mucosally active lipopeptide vaccine against *Streptococcus pyogenes* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Med Chem*, 55(19), 8515-8523. <https://doi.org/10.1021/jm301074n>

- Zhai, L. et Tumban, E. (2016/). Gardasil-9: A global survey of projected efficacy. *Antiviral Research*, 130, 101-109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.016>
- Zhai, S. L., Zhang, H., Chen, S. N., Zhou, X., Lin, T., Liu, R., Lv, D. H., Wen, X. H., Wei, W. K., Wang, D. et Li, F. (2017). Influenza D Virus in Animal Species in Guangdong Province, Southern China. *Emerg Infect Dis*, 23(8), 1392-1396. <https://doi.org/10.3201/eid2308.170059>
- Zhang, B., Chao, C. W., Tsybovsky, Y., Abiona, O. M., Hutchinson, G. B., Moliva, J. I., Olia, A. S., Pegu, A., Phung, E., Stewart-Jones, G. B. E., Verardi, R., Wang, L., Wang, S., Werner, A., Yang, E. S., Yap, C., Zhou, T., Mascola, J. R., Sullivan, N. J., Graham, B. S., Corbett, K. S. et Kwong, P. D. (2020). A platform incorporating trimeric antigens into self-assembling nanoparticles reveals SARS-CoV-2-spike nanoparticles to elicit substantially higher neutralizing responses than spike alone. *Sci Rep*, 10(1), 18149. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74949-2>
- Zhang, N. et Li, Y. (2018). Transmission of Influenza A in a Student Office Based on Realistic Person-to-Person Contact and Surface Touch Behaviour. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(8), 1699. <https://www.mdpi.com/1660-4601/15/8/1699>
- Zhang, R., Kramer, J. S., Smith, J. D., Allen, B. N., Leeper, C. N., Li, X., Morton, L. D., Gallazzi, F. et Ulery, B. D. (2018). Vaccine Adjuvant Incorporation Strategy Dictates Peptide Amphiphile Micelle Immunostimulatory Capacity. *AAPS J*, 20(4), 73. <https://doi.org/10.1208/s12248-018-0233-6>
- Zhang, Y. N., Lazarovits, J., Poon, W., Ouyang, B., Nguyen, L. N. M., Kingston, B. R. et Chan, W. C. W. (2019). Nanoparticle Size Influences Antigen Retention and Presentation in Lymph Node Follicles for Humoral Immunity. *Nano Lett*, 19(10), 7226-7235. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02834>
- 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 Biotechnol*, 31(11), 654-663. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.002>
- Zimmermann, S., Egeter, O., Hausmann, S., Lipford, G. B., Rocken, M., Wagner, H. et Heeg, K. (1998). CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol*, 160(8), 3627-3630. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9558060>
- Zinkernagel, R. M. (2003). On natural and artificial vaccinations. *Annu Rev Immunol*, 21, 515-546. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141045>

- Zottig, X. (2020). Protein Supramolecular Structures: From Self-Assembly to Nanovaccine Design. *Nanomaterials* (Basel), 10(5). <https://doi.org/10.3390/nano10051008>
- Zottig, X. et (2021). Self-assembled peptide nanorod vaccine confers protection against influenza A virus. *Biomaterials*, 269, 120672. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120672>
- Zottig, X., Al-Halifa, S., Babych, M., Quittot, N., Archambault, D. et Bourgault, S. (2019). Guiding the Morphology of Amyloid Assemblies by Electrostatic Capping: from Polymorphic Twisted Fibrils to Uniform Nanorods [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Small*, 15(33), e1901806. <https://doi.org/10.1002/smll.201901806>
- Zottig, X., Al-Halifa, S., Cote-Cyr, M., Calzas, C., Le Goffic, R., Chevalier, C., Archambault, D. et Bourgault, S. (2021). Self-assembled peptide nanorod vaccine confers protection against influenza A virus. *Biomaterials*, 269, 120672. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120672>
- Zottig, X., Cote-Cyr, M., Arpin, D., Archambault, D. et Bourgault, S. (2020). Protein Supramolecular Structures: From Self-Assembly to Nanovaccine Design [Review]. *Nanomaterials* (Basel), 10(5). <https://doi.org/10.3390/nano10051008>
- Zottig, X. A. (2021). Modulation de l'auto-assemblage de peptides en nanostructures protéiques à des fins vaccinales.
- Zylberman, P. (2020). Un siècle de pandémies grippales (1889-1970). *Les Tribunes de la santé*, 66(4), 35-54. <https://doi.org/10.3917/seve1.066.0035>
-