

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉVALUATION DE MICELLES CYLINDRIQUES À BASE DE BETA-PEPTIDES
AMPHIPHILES SYNTHÉTIQUES EN TANT QUE NANOPATEFORME VACCINALE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

CLÉMENT MARTIN

AVRIL 2025

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.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche le professeur Denis Archambault ainsi que mon codirecteur le professeur Steve Bourgault pour leur aide et leur soutien inestimables. J'ai eu la chance grâce à eux de réaliser une maîtrise extrêmement stimulante où j'ai pu recevoir de leur part un encadrement poussé, des conseils avisés ainsi qu'un soutien tout au long de mon projet de recherche. Je vous remercie pour tout l'apprentissage que vous m'avez offert ainsi que la confiance que vous avez placée en moi.

J'aimerais également remercier l'ensemble des membres des laboratoires Archambault et Bourgault pour l'aide et le soutien qu'ils ont pu fournir. Merci à Philippe Saint-Louis d'avoir pris le temps pour m'aider à monter et réaliser un grand nombre d'expériences, et ce, toujours avec bonne humeur. Merci à Trang d'avoir synthétisé mes peptides et de m'avoir aidé avec les souris. Merci à Mélanie pour les analyses de microscopie électronique et pour son aide avec les souris. J'aimerais remercier aussi Margo, Laetitia, Marie-Jeanne, Vy, Frederic, Vinay, Mathew et Najib pour leur amabilité et leur complaisance.

J'aimerais remercier mes parents et mes frères et sœurs pour leur aide et leur soutien sans failles. Merci pour votre soutien financier, votre confiance ainsi que pour tout l'amour que vous m'avez toujours porté. C'est l'une de mes plus grandes forces.

J'aimerais terminer ces mots pour toi Salma. Merci pour l'amour incommensurable que tu me donnes chaque jour. Merci pour ta douceur ainsi que ta joie qui me font retomber en enfance à chaque fois. Merci pour ta responsabilité et tes apprentissages qui me font grandir et me rendent plus sage. Merci pour ta gentillesse et ton intelligence qui m'inspirent. Enfin merci d'avoir cru en ce petit étudiant qui n'avait plus envie et pas confiance en ses capacités. Tu as tout changé.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	vii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 Système immunitaire	3
1.1.1 Réponse immunitaire innée	3
1.1.1.1 Les cytokines	8
1.1.1.2 Présentation antigénique	10
1.1.2 Réponse immunitaire adaptative	13
1.1.2.1 Lymphocyte TCD4+	14
1.1.2.2 Lymphocytes TCD8+	14
1.1.2.3 Lymphocytes B	15
1.2 Vaccination	16
1.2.1 Vaccins traditionnels	17
1.2.2 Nouvelles technologies vaccinales	17
1.2.3 Les nanoparticules en vaccination	19
1.2.4 Peptide amphiphile en vaccination	20
1.2.5 β -peptides en vaccination	21
1.2.6 β -peptides amphiphiles	22
1.3 Les adjuvants dans la réponse immunitaire	23
1.3.1 Agonistes TLR	24
1.4 Virus de l'influenza	25
1.4.1 Types d'influenza virus	25
1.4.2 Génome	26
1.4.3 Morphologie	26
1.4.4 Cycle de réplication	27
1.4.5 Antigène M2e	28
1.4.6 Vaccination grippale innovante	28
1.5 Hypothèse et objectifs	29
CHAPITRE 2 ARTICLE: Evaluation of cylindrical micelles assembled from amphiphilic β -peptides as antigen delivery nanostructures	30
2.1 Contribution des auteurs	31
2.2 Résumé	32

2.3	Abstract.....	33
2.4	Introduction.....	34
2.5	Materials and Methods	36
2.5.1	Synthesis, purification and self-assembly of peptides	36
2.5.2	Fluorescence spectroscopy	37
2.5.3	Circular dichroism spectroscopy	37
2.5.4	Atomic force microscopy	38
2.5.5	Transmission electron microscopy	38
2.5.6	Evaluation of epitope accessibility by ELISA	38
2.5.7	Cell viability	39
2.5.8	Evaluation of TLR2/TLR6 activation	39
2.5.9	Cellular uptake by dendritic cells.....	40
2.5.10	Mice immunization	40
2.5.11	Determination of M2e-specific antibody titers	41
2.5.12	Experimental challenge with H1N1 influenza A virus	41
2.6	Results and discussion	42
2.6.1	Design, self-assembly and characterization of amphiphilic cylindrical micelles	42
2.6.2	Cytocompatible M2e-conjugated filaments are uptaken by dendritic cells and activate the heterodimeric TLR2/TLR6.....	45
2.6.3	PA-M2e cylindrical micelles induce a robust antigen-specific response in mice.....	48
2.7	Conclusion	51
2.8	Supporting information.....	53
	CHAPITRE 3 DISCUSSION	63
3.1	Synthèse et caractérisation des assemblages micellaires PA-M2e	63
3.2	Les assemblages micellaires PA-M2e sont biocompatibles et activent les voies immunitaires innées dans des systèmes <i>in vitro</i>	64
3.3	Les assemblages PA-M2e stimulent une réponse humorale forte mais n'offre pas de protection aux souris face à une infection grippale mortelle	66
	CONCLUSION	73
	BIBLIOGRAPHIE	74

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Schéma représentatif des TLR.....	8
Figure 1.2 : Représentation de la présentation antigénique par les CMH	12
Figure 1.3 : Différents types de vaccins	19
Figure 1.4 : Nanoparticules formés par des protéines d'autoassemblage.....	20
Figure 1.5 : Structure et génome des influenza A, B, C et D	27
Figure 2.1 : Design of cylindrical micelles based on the self-assembly of amphiphilic β -peptide as antigen delivery nanoplatfrom.....	43
Figure 2.2 : Self-assembly of amphiphilic β -peptides.....	45
Figure 2.3 : Biological characterization of M2e-PA amphiphilic peptide filaments.....	47
Figure 2.4 : Cylindric micelles induce a robust production of antigen-specific antibodies upon mice immunization	49
Figure 2.5 : Intramuscular immunization with of PA-M2e assemblies does not protect mice against influenza A virus	50
Figure 2.6 HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of PA-M2e.	53
Figure 2.7 HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of PA.	54
Figure 2.8 HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of M2e.....	55
Figure 2.9 Spectre CD of PA-M2e and PA	56
Figure 2.10 Representative of atomic force microscopy and size distribution of PA-M2e and PA.....	57
Figure 2.11 Spectre CD and representative of atomic force microscopy and size distribution of PA-M2e-alexa488.....	58
Figure 2.12 Followed the weight of the mice after each immunization with PA-M2e	59
Figure 2.13 Elispot IFN- γ	60
Figure 2.14 Elispot IL-4.	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Scale for clinical symptoms of influenza infection	62
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADCC	« Antibody-dependant cell cytotoxicity »; cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADCP	« Antibody-dependant cell phagocytosis »; phagocytose cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	ADN double brin
AFM	« Atomic force microscopy »; microscopie à force atomique
Alum	Sels d'aluminium
AMP	Peptides antimicrobiens
ANS	« Anilinonaphthalene-8-Sulfonic Acid »; acide anilinonaphtalène-8-sulfonique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BCR	« B cell receptor »; récepteur de cellule B
CD	« Circular dichroism »; dichroïsme circulaire
CDC	« Complement-dependant cytotoxicity »; cytotoxicité dépendante du complément
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV5	Cytomégalovirus humain de type 5
CPA (APC)	Cellules présentatrices d'antigènes (antigen-presenting cells)
CpG	Cytosine phosphoguanosine

DAMP	« Damage-associated molecular pattern »; motifs moléculaires associés aux dommages
DC	Cellules dendritiques
ELISA	« Enzyme-linked immunosorbent assay »; méthode immunoenzymatique
Fab	Fragment antigen-binding
Fc	Fragment cristallisable
FcR	Récepteur de fragment Fc
FDA	« Food and drug administration »; administration des aliments et des médicaments
HA	Hémagglutinine
HPLC	« High performance liquid chromatography »; chromatographie en phase liquide à haute performance
IAV	« Influenza A virus »; virus de l'influenza A
IBV	« Influenza B virus »; virus de l'influenza B
ICV	« Influenza C virus »; virus de l'influenza C
IDV	« Influenza D virus »; virus de l'influenza D
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LB	Lymphocytes B
LGL	« Large Granular Lymphocytes »

LPS	Lipopolysaccharides
LT	Lymphocytes T
M1	Protéine matrice 1
M2	Protéine matrice 2
M2e	Ectodomaine de la protéine M2
MALT	« Mucosa-associated lymphoid tissue » tissus lymphoïdes associés aux muqueuses
MAP	« Mitogen-activated protein kinase »
MFI	« Mean fluorescence intensity »; intensité moyenne de fluorescence
MPLA	Lipide A monophosphorylé
MRE	« Mean residue ellipticity »; ellipticité moyenne des résidus
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NA	Neuraminidase
NALT	« Nose-associated lymphoid tissue »; tissus lymphoïdes associés au nez
NF- κ B	« Nuclear factor-kappa B »
NK	Natural killer
NLR	« Nod-like receptor »; récepteur de type NOD
PA	Peptide amphiphile
PAMP	« Pathogen-associated molecular pattern »; motifs moléculaires associés aux pathogènes
Poly I :C	Acide polyinosinic:polycytidylic

PRR	« Pattern recognition receptor »; récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
RdRp	« RNA dependant RNA polymerase »; ARN polymérase dépendante de l'ARN
RLR	« RIG-like receptor »; récepteur de type RIG
RNP	Ribonucléoprotéine
SPR	Résonance plasmonique de surface
SRAS-CoV-2	Syndrome respiratoire sévère aigu-coronavirus de type 2
TCR	« T cell receptor »; récepteur de cellule T
TEM	« Transmission electron microscopy »; microscopie électronique à transmission
TGF	« Transforming growth factor »; facteur de croissance transformant
Th1	« T helper 1 »; T auxiliaire 1
Th2	« T helper 2 »; T auxiliaire 2
Th17	« T helper 17 »; T auxiliaire 17
ThT	Thioflavin T
TLR	« Toll-like receptor »; récepteur de type toll
TMB	3,3'-5,5'-tetramethyl 78 benzidine
TNF	« Tumor necrosis factor »; facteur de nécrose de tumeur
Treg	Cellules T régulatrices
TRIF	La signalisation dépendante de l'IFN- β
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

VLP	« Virus-like particle »; particule pseudo-virale
VPH	Virus du papillome humain

RÉSUMÉ

La vaccination demeure l'une des avancées biomédicales les plus efficaces pour prévenir et lutter contre les maladies infectieuses. Les vaccins ont longtemps été constitués d'organismes pathogènes entiers, inactivés ou atténués, mais des problèmes de sécurité liés à ce type de vaccins ont incité le développement d'alternatives plus sûres, comme les vaccins sous-unitaires, qui se composent d'un ou de plusieurs antigènes, et non du pathogène entier. Néanmoins, ces nouvelles technologies vaccinales provoquent une faible réponse immunitaire et, par conséquent, il est généralement nécessaire d'utiliser des adjuvants ou des plateformes de livraison antigénique. Les nanostructures supramoléculaires formées à partir de peptides synthétiques offrent des perspectives prometteuses pour la livraison d'antigènes. Les peptides amphiphiles et les β -peptides d'auto-assemblage ont démontré leur capacité à protéger les épitopes antigéniques contre la dégradation, à faciliter leur endocytose par les cellules présentatrices d'antigènes et à activer le système immunitaire inné. De ce fait, ces peptides peuvent être utilisés pour former des plateformes servant à la fois à délivrer l'antigène et à activer le système immunitaire. Plusieurs études ont démontré l'intérêt de l'utilisation de plateformes formées par l'autoassemblage de β -peptides amphiphiles dans le transport de médicaments, mais aucune ne l'a fait dans le domaine de la vaccination. Dans cette étude, nous avons donc exploré l'utilisation de micelles cylindriques issues de l'autoassemblage du β -peptide amphiphile C16V3A3K3. L'ectodomaine de la protéine de matrice 2 (M2e) du virus de la grippe A a été utilisé comme antigène. Ce dernier a été greffé à l'extrémité C-terminale du peptide par synthèse peptidique sur support solide. Une caractérisation par microscopie électronique et à force atomique, par spectroscopie et test immuno-enzymatique a permis de confirmer l'assemblage du peptide C16V3A3K3-M2e en micelles cylindriques exposant à leur surface l'antigène M2e. Des essais sur des lignées cellulaires ont confirmé que les structures formées étaient efficacement internalisées par les cellules dendritiques et activaient le récepteur Toll-like 2/6. Les micelles cylindriques ainsi produites ont généré une réponse humorale robuste et spécifique à M2e après l'immunisation intramusculaire chez la souris, avec la présence d'isotypes variés. Bien que cette réponse humorale n'ait pas conduit à une protection contre une infection mortelle par le virus de la grippe H1N1, ces structures auto-assemblées représentent une nouvelle plateforme auto-adjuvante pour favoriser la production d'anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques.

Mots clés : nanovaccin; plateforme de livraison antigénique; peptides d'autoassemblage; peptide β amphiphile; vaccins sous-unitaires; vaccins antigrippaux

INTRODUCTION

La vaccination demeure aujourd'hui l'approche la plus efficace pour prévenir et contrôler les maladies infectieuses, tant chez l'homme que chez les animaux domestiques. Cependant, malgré les avancées majeures en immunologie, les vaccins traditionnels fondés sur des pathogènes inactivés ou atténués continuent de présenter des limites, notamment liées à leur sécurité (Murphy et Weaver, 2016). Face à ces enjeux, les vaccins sous-unitaires, reposant sur l'utilisation d'antigènes spécifiques dérivés d'agents pathogènes, se sont imposés comme une alternative plus sûre. Toutefois, ces formulations se révèlent souvent peu immunogènes et nécessitent le recours à des adjuvants ou à des systèmes d'administration sophistiqués pour induire une réponse immunitaire robuste et durable (Vartak et Suchack, 2016). Le développement de systèmes d'administration d'antigènes s'est donc imposé comme une stratégie centrale pour surmonter ces limites. Ces dispositifs permettent non seulement de stabiliser les antigènes sur le plan physicochimique et d'en prolonger la demi-vie biologique, mais aussi d'en optimiser la distribution vers les ganglions lymphatiques et d'en favoriser l'absorption par les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) (Al - Halifa *et al.*, 2019). Parallèlement, l'ajout d'adjuvants permet de potentialiser la réponse immunitaire, en activant spécifiquement les voies de reconnaissance du système immunitaire inné, et en stimulant les réponses des lymphocytes T et B (Chatzikleanthous *et al.*, 2021). Ces dernières années, les structures supramoléculaires formées par l'auto-assemblage de peptides synthétiques suscitent un intérêt croissant. Ces systèmes présentent plusieurs avantages : une biocompatibilité élevée, une biodégradabilité naturelle, une production relativement simple et une bonne stabilité sous forme lyophilisée (Gebre *et al.*, 2021). La modularité des séquences peptidiques offre par ailleurs la possibilité de concevoir une grande diversité de structures aux propriétés chimiques et biologiques variées (Fan, J. *et al.*, 2024). En greffant des épitopes antigéniques sur des séquences auto-assemblantes, il est possible de générer des nanostructures capables d'assurer simultanément la présentation et la protection de ces antigènes. Plusieurs travaux ont démontré que des fibrilles de type *cross- β -sheet*, formées par des β -peptides amyloïdes, peuvent amplifier la réponse immunitaire dirigée contre

l'épitope qu'elles transportent (Babych *et al.*, 2018; Bricha *et al.*, 2023). D'autre part, les peptides amphiphiles, caractérisés par la présence d'un domaine hydrophile et d'une queue hydrophobe, sont connus pour s'auto-assembler en nanoparticules micellaires sphériques. Ces dernières protègent les antigènes contre la dégradation enzymatique, augmentent leur biodisponibilité et facilitent leur acheminement vers les ganglions lymphatiques (Barrett et Tirrell, 2018; Trent *et al.*, 2015). Certaines études ont mis en évidence les propriétés immunostimulantes de ces structures, notamment l'activation des TLRs et la maturation des cellules dendritiques (Castelletto *et al.*, 2016; Trent *et al.*, 2015). Malgré l'efficacité démontrée des fibrilles *cross-β* et des micelles sphériques dans la vectorisation des épitopes, l'utilisation de micelles de forme cylindrique, issues de l'auto-assemblage de β -peptides amphiphiles, reste peu explorée en contexte vaccinal. Pourtant, ces peptides, biocompatibles et modulables, ont déjà fait l'objet d'investigations dans d'autres applications biomédicales, telles que la régénération tissulaire (Webber *et al.*, 2013; Webber *et al.*, 2010) ou la délivrance de principes actifs (Fuertes-Llanos *et al.*, 2024; Webber *et al.*, 2013). Dans ce contexte, ce travail s'intéresse à l'évaluation des micelles cylindriques auto-assemblées à partir du peptide amphiphile C16-V3A3K3 (PA) en tant que système de transport et de présentation d'épitopes antigéniques. Pour cela, l'épitope M2e, correspondant à l'ectodomaine de la protéine matrice 2 du virus influenza A, a été fusionné au peptide PA. Les micelles ainsi modifiées ont montré une capacité à activer le récepteur TLR2/TLR6 et à être efficacement internalisées par les cellules présentatrices d'antigènes, induisant une réponse humorale marquée contre M2e chez la souris. Ces résultats mettent en évidence le potentiel des micelles cylindriques comme une nouvelle plateforme vaccinale auto-adjuvante pour optimiser l'immunogénicité des épitopes peptidiques.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Système immunitaire

Le corps humain est constamment soumis à des agressions externes de la part de microorganismes pathogènes. Certaines de ces agressions peuvent engendrer des maladies causant de graves dommages à l'organisme pouvant parfois lui être fatal. Heureusement des mécanismes de défenses appelés réponse immunitaire existent et permettent de protéger l'hôte contre les pathogènes. Ces mécanismes peuvent être divisés en deux catégories, la réponse innée et la réponse adaptative (Chaplin, 2010). La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense, et permet l'élimination rapide et de manière non spécifique d'un pathogène (Koenderman *et al.*, 2014). L'immunité adaptative survient lorsque l'immunité innée ne suffit pas à endiguer la menace. Plus longue à se mettre en place mais néanmoins plus efficace, la réponse adaptative permet à l'hôte infecté de se défendre contre un pathogène spécifique et d'engendrer une protection sur une longue durée grâce à une mémoire immunitaire (Murphy et Weaver, 2016).

1.1.1 Réponse immunitaire innée

Le système de l'immunité innée intervient dès qu'un pathogène infecte un tissu. Il permet, par de nombreux mécanismes, d'endiguer et/ou d'éliminer les éléments pathogènes dans les premiers temps après l'infection. Dès son entrée dans l'organisme, le pathogène est ciblé par des effecteurs peptidiques/protéiques extracellulaires présents dans l'ensemble des tissus (Murphy et Weaver, 2016). Le système du complément par exemple, qui est un ensemble de protéines, participe à l'élimination du pathogène grâce à la mise en place de l'inflammation, de l'opsonisation et/ou de la lyse des organismes infectieux et des cellules infectées (Lo et Woodruff, 2020). Une fois activé, le système du complément permet aussi le recrutement d'effecteurs cellulaires (Sarma et Ward, 2011). Ces effecteurs cellulaires aussi appelés cellules sentinelles, détectent et éliminent les agents pathogènes via notamment l'activation de récepteurs non spécifiques. On y retrouve les macrophages, les cellules "Natural Killer" (NK), les granulocytes et les cellules dendritiques (DC) (Murphy et Weaver, 2016).

Les macrophages, qui ont pour origine les monocytes sanguins et qui sont présents dans les tissus, sont capables d'ingérer et de détruire directement les agents pathogènes. Une fois activés, ils englobent les agents infectieux, les enferment dans des compartiments internes et les digèrent avec des enzymes spécifiques. Les macrophages produisent également des molécules de signalisation qui favorisent l'inflammation et attirent d'autres cellules immunitaires sur le site de l'infection, facilitant ainsi une réponse coordonnée. Ils peuvent également présenter des fragments d'agents pathogènes, appelés peptides antigéniques à d'autres cellules immunitaires, les lymphocytes T (LT), pour les aider à reconnaître plus spécifiquement l'envahisseur (Atri *et al.*, 2018; Kashem *et al.*, 2017; Murphy et Weaver, 2016). Les cellules NK sont des "Large Granular Lymphocytes" (LGL) de l'immunité innée qui détruisent les cellules infectées par des virus ainsi que les cellules tumorales. Elles détectent les cellules anormales grâce à un équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs, notamment ceux portés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), peu présent à la surface des cellules infectées ou cancéreuses. En absence de signal inhibiteur, les cellules NK libèrent des granules cytotoxiques contenant des perforines et des granzymes qui pénètrent et induisent l'apoptose des cellules cibles. Les cellules NK sécrètent aussi des cytokines, telles que l'interféron- γ (IFN- γ), qui stimulent l'activité des macrophages et renforcent la réponse immunitaire, notamment en stimulant l'activation de lymphocytes T (Morandi *et al.*, 2006; Murphy et Weaver, 2016; Tosi, 2005; Vivier *et al.*, 2008). Les granulocytes forment une ligne de défense rapide contre les agents infectieux en phagocytant les pathogènes, en libérant des substances toxiques et en déclenchant une inflammation locale. Ils sont ainsi nommés en raison de leurs granules cytoplasmiques, visible par une coloration hématoxiline-éosine des cellules, qui contiennent diverses enzymes et molécules toxiques utilisées pour neutraliser les agents pathogènes. Les granulocytes comprennent les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les mastocytes, chacun ayant des fonctions spécialisées (Kantari *et al.*, 2008; Murphy et Weaver, 2016). Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) spécialisées. Elles capturent les agents pathogènes et migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques pour signaler la présence d'une infection. En plus de jouer ce rôle de messagers, les cellules dendritiques libèrent des signaux chimiques pour stimuler d'autres cellules de l'immunité innée et adaptative, coordonnant ainsi une réponse immunitaire spécifique optimale (Banchereau *et al.*, 2000; Murphy et Weaver, 2016).

Les peptides antimicrobiens (AMP) sont des composants essentiels de l'immunité innée qui agissent rapidement contre les agents pathogènes grâce à leurs propriétés bactériostatiques, microbicides et cytolytiques. Parmi les principaux AMP humains, on retrouve les défensines, les cathélicidines et les histatines, qui offrent une défense contre un large spectre de microbes, incluant les bactéries, les champignons et certains virus. Les défensines sont divisées en deux groupes principaux : les α et β -défensines. Les α -défensines possèdent entre 29 et 35 résidus d'acides aminés avec des liaisons disulfures spécifiques et se trouvent sous forme de propeptides dans les cellules de Paneth ou de peptides actifs dans les neutrophiles (Pasupuleti *et al.*, 2012). Ces molécules agissent en perturbant les membranes microbiennes, ce qui entraîne la lyse des agents pathogènes (Hazlett et Wu, 2011). Les β -défensines, quant à elles, contiennent entre 36 et 42 acides aminés et se distinguent par une région N-terminale plus longue. On en a identifié quatre types principaux chez l'humain, présents dans le plasma, les cellules épithéliales, les testicules et les neutrophiles (Hazlett et Wu, 2011). Outre leurs propriétés antimicrobiennes directes, les défensines jouent également un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire adaptative, en favorisant le recrutement des cellules dendritiques et T mémoire sur le site d'infection, renforçant ainsi la défense de l'hôte (De Smet et Contreras, 2005; Pasupuleti *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 1999). Les cathélicidines forment un autre groupe important d'AMP. Elles sont produites sous forme de propeptides, activés par un clivage en deux étapes, et se composent de trois régions : une extrémité N-terminale, une région centrale conservée et une région C-terminale variable (Giuliani *et al.*, 2007). En raison de leur nature amphipathique, elles interagissent avec les membranes des agents pathogènes, notamment les bactéries, en se liant aux lipopolysaccharides (LPS) de leur paroi, ce qui mène à la destruction cellulaire (De Smet et Contreras, 2005; Pasupuleti *et al.*, 2012). Les cathélicidines sont exprimées dans divers types de cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages, cellules B et T) et dans des cellules épithéliales comme celles de la peau et des poumons. Elles contribuent également à la réponse immunitaire en attirant des neutrophiles sur les sites d'infection pour renforcer l'action antimicrobienne (Giuliani *et al.*, 2007). Les histatines sont des peptides riches en résidus d'histidine produits par les glandes salivaires. Elles présentent une activité antimicrobienne à large spectre qui dépasse la simple perméabilisation des membranes (Pasupuleti *et al.*, 2012). Les histatines ciblent aussi les mitochondries des pathogènes, en particulier en perturbant les fonctions de l'ATPase F₀F₁, ce qui entraîne une fuite d'ATP et une diminution de l'énergie intracellulaire du pathogène menant à sa destruction (De Smet et Contreras,

2005). Leur rôle est crucial dans le maintien de la santé buccale, car elles agissent directement dans la cavité buccale contre de nombreux micro-organismes.

Les récepteur de type « Pattern recognition receptors » (PRR) occupent une place centrale dans l'immunité innée, offrant à l'organisme une défense immédiate et non spécifique contre les infections microbiennes. En détectant les « Pathogen-associated molecular pattern » (PAMP), des structures conservées spécifiques aux microbes, ainsi que les « Damage-associated molecular pattern » (DAMP), composantes cellulaires de l'organisme hôte libérées lors de dommages ou de la mort cellulaire, les PRR déclenchent une cascade de signaux qui activent rapidement la réponse immunitaire de l'hôte (Murphy et Weaver, 2016). Plusieurs familles de PRR jouent des rôles clés dans cette défense. Les « RIG-I-like receptors » (RLR), par exemple, sont des récepteurs d'ARN viral présents dans le cytoplasme. Les RLR, notamment RIG-I et MDA5, reconnaissent l'ARN viral et déclenchent la production d'interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires (Aoshi *et al.*, 2011). Ces signaux recrutent et activent des cellules immunitaires telles que les macrophages et les cellules dendritiques, amplifiant ainsi la réponse innée (Kumar *et al.*, 2011). Les « NOD like receptors » (NLR) détectent une large gamme de ligands dans le cytoplasme, ce qui leur permet d'activer la voie NF- κ B et les « mitogen-activated protein kinase » (MAP), deux voies importantes pour la production de cytokines inflammatoires. Une sous-famille de NLR initie la formation de l'inflammasome, un complexe multiprotéique qui active les caspases pour produire des cytokines inflammatoires, tel que les interleukines (IL) IL-1 β et IL-18, et déclencher la mort cellulaire programmée (Kumar *et al.*, 2011). Ce mécanisme est particulièrement efficace contre les agents pathogènes intracellulaires. Parmi les PRR, les récepteurs de type Toll, ou « Toll-like receptors » (TLR), représentent la principale famille de PRR dans la reconnaissance des pathogènes. Découverts à l'origine chez la mouche *Drosophila melanogaster*, les TLR ont été identifiés chez les mammifères, avec dix membres chez l'homme et douze chez la souris (Kumar *et al.*, 2011). Ces récepteurs sont uniques dans leur localisation et leur spécialisation : certains TLR sont exprimés à la surface cellulaire pour reconnaître des composants microbiens extérieurs, tandis que d'autres se situent dans les compartiments intracellulaires, détectant principalement des acides nucléiques viraux ou bactériens (Aoshi *et al.*, 2011). Les TLR extracellulaires, comme les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, et TLR6, détectent divers PAMP dérivés de bactéries, champignons et protozoaires. Par exemple, le TLR4 est le principal récepteur de LPS, une molécule clé des bactéries à Gram négatif,

tandis que le TLR2, qui a la capacité de former des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6, reconnaît entre autres les lipoprotéines et les peptidoglycanes des bactéries à Gram positif. Le TLR5, quant à lui, détecte la flagelline, une protéine structurale des flagelles bactériens (El-Zayat *et al.*, 2019; Murphy et Weaver, 2016). Les TLR intracellulaires, comme les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9, détectent principalement les acides nucléiques. Le TLR3 reconnaît l'ARN double brin, tandis que les TLR7 et TLR8 détectent l'ARN simple brin et des composés antiviraux synthétiques. Le TLR9 est spécialisé dans la reconnaissance de l'ADN riche en motifs CpG, comme celui du virus de l'herpès simplex (HSV) (El-Zayat *et al.*, 2019; Murphy et Weaver, 2016). Ces TLR intracellulaires activent les voies de signalisation conduisant à la production d'interférons de type I, une cytokine qui bloque la réplication virale et active les cellules immunitaires. La signalisation des TLR repose sur le recrutement de molécules adaptatrices spécifiques, telles que MyD88 et TRIF (Kawasaki et Kawai, 2014). Ce recrutement permet l'activation de facteurs de transcription comme le NF- κ B, l'IRF3 et l'IRF7 qui régulent la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons de type I (Kumar *et al.*, 2011). En particulier, MyD88 est impliqué dans la signalisation de presque tous les TLR (à l'exception de TLR3), tandis que TRIF est principalement associé au TLR3 et TLR4 (Kumar *et al.*, 2011). Cette signalisation modulaire permet aux TLR d'orchestrer des réponses distinctes en fonction du type de pathogène détecté.

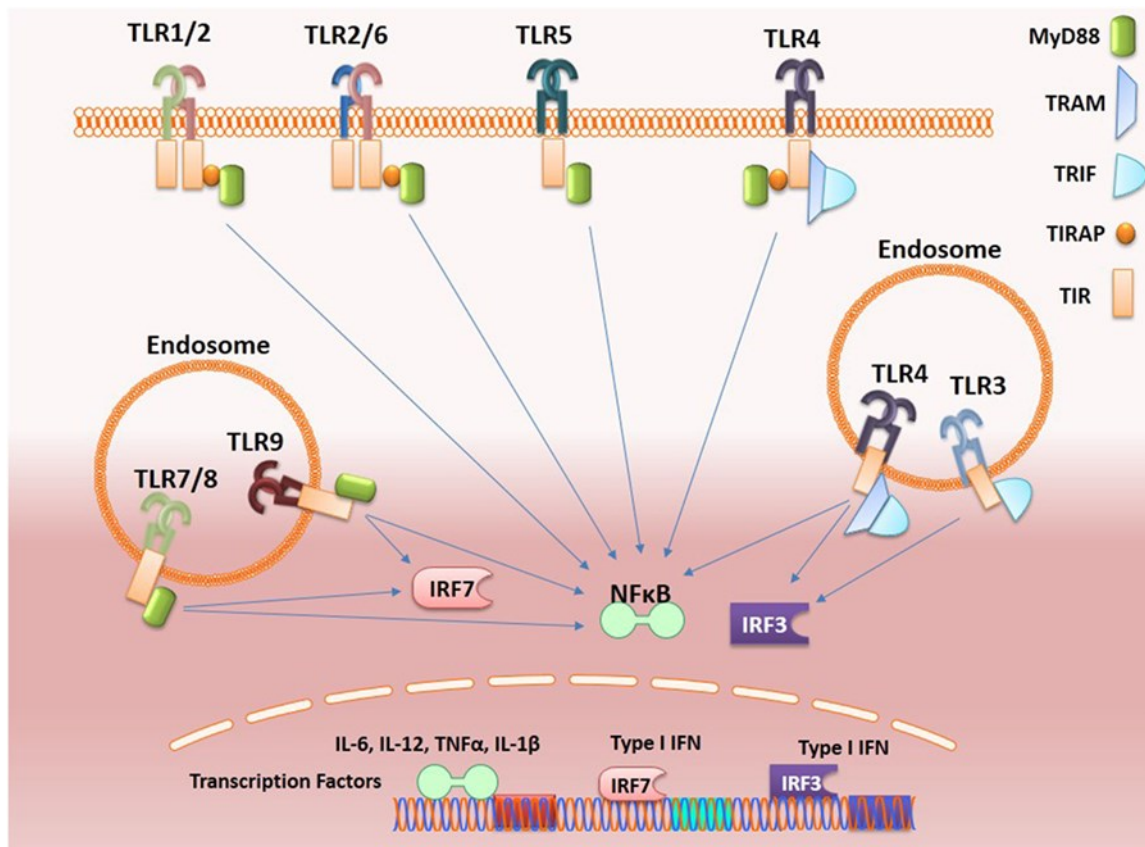


Figure 1.1 : Schéma représentatif des TLR

Les TLR situés au niveau des membranes plasmiques ou endosomales peuvent être activés via deux voies principales, après avoir interagit avec les PAMP et les DAMP, soit la voie dépendantes de MyD88 ou de TRIF. Lorsqu'ils sont activés, la plupart des TLR s'associent sous forme d'homodimères, à l'exception de TLR2, qui peut également former des hétérodimères avec le TLR6 ou le TLR1. Ces mécanismes de signalisation conduisent à l'activation de facteurs de transcription tels que NF-κB et les IRF. NF-κB stimule la production de cytokines inflammatoires, tandis que les IRF favorisent la synthèse d'interférons de type I (IFN). Tiré de (Zakeri et Russo, 2018).

1.1.1.1 Les cytokines

Les cytokines jouent un rôle fondamental dans la régulation et la coordination de la réponse immunitaire. Ce sont des protéines de signalisation sécrétées principalement par les cellules immunitaires, mais aussi par d'autres types cellulaires en réponse à des infections ou à des lésions (Thomson et Lotze, 2003). Les cytokines agissent comme des médiateurs de communication intercellulaire, orchestrant les réponses immunitaires innée et adaptative (Murphy et Weaver, 2016). Leur influence peut être locale dans le microenvironnement d'une infection ou systémique au niveau de plusieurs tissus et organes de l'organisme (Thomson et Lotze, 2003). Les cytokines se

classent en plusieurs catégories, chacune ayant des fonctions spécifiques dans l'immunité. Les interleukines favorisent l'interaction entre les globules blancs, modulant ainsi l'activité et la différenciation des cellules immunitaires. Par exemple, l'IL-1 et l'IL-6 sont des cytokines pro-inflammatoires qui stimulent l'inflammation en favorisant le recrutement de cellules immunitaires comme les neutrophiles et les macrophages vers le site de l'infection (Gabay, 2006; Gabay *et al.*, 2010). D'autres interleukines, comme l'IL-10, agissent comme des régulateurs pour réguler négativement la réponse immunitaire et éviter les réactions excessives qui pourraient endommager les tissus de l'hôte (Sabat *et al.*, 2010). Les interférons sont une autre classe de cytokines importantes, jouant un rôle essentiel dans la réponse antivirale (Dunn *et al.*, 2006). Ils agissent pour limiter la réplication virale en activant des gènes qui créent un état antiviral dans les cellules avoisinantes. L'IFN- γ , un interféron de type II, est principalement produit par les lymphocytes T et les cellules NK. L'IFN- γ joue un rôle clé en favorisant le traitement et la présentation des antigènes, en augmentant le trafic leucocytaire, en induisant un état antiviral, en renforçant les fonctions antimicrobiennes et en régulant la prolifération cellulaire ainsi que l'apoptose (Kak *et al.*, 2018). Les chimiokines sont des cytokines spécialisées dans le guidage des cellules immunitaires vers les sites d'infection ou vers les lésions. Elles créent un gradient de concentration qui attire les cellules immunitaires, notamment les neutrophiles et les monocytes, vers les zones infectées, où elles peuvent phagocyter et détruire les pathogènes (Murphy et Weaver, 2016). Ce processus, appelé chimiotaxie, est crucial pour contenir les infections et prévenir leur propagation dans l'organisme. D'autres cytokines comme le facteur de nécrose tumorale (TNF) sont des médiateurs de la réponse inflammatoire aiguë. Par exemple, le TNF- α est produit en réponse à des infections et à des dommages tissulaires et constitue un régulateur central de l'inflammation (Murphy et Weaver, 2016). Cependant, une production excessive de TNF- α peut entraîner une inflammation systémique, comme dans le cas du choc septique, où la réponse immunitaire devient incontrôlable et potentiellement dangereuse pour l'hôte.

Dans le cadre de l'immunité adaptative, certaines cytokines jouent un rôle clé dans la différenciation et la prolifération des lymphocytes T et B. Par exemple, l'IL-2 stimule la prolifération des lymphocytes T activés, permettant l'expansion des cellules spécifiques à un pathogène (Malek, 2008). Les cytokines produites par les cellules T auxiliaires, comme l'IL-4, l'IL-12 et l'IL-17, influencent également la différenciation des sous-populations de lymphocytes T, ce

qui conditionne le type de réponse immunitaire adapté au pathogène en cause (par exemple, une réponse humorale contre les bactéries et parasites ou une réponse cytotoxique contre les infections virales) (Murphy et Weaver, 2016). En somme, les cytokines agissent comme les "chefs d'orchestre" de la réponse immunitaire en coordonnant l'action des différentes cellules immunitaires et en adaptant les réponses de l'hôte en fonction des types de pathogènes ou de dommages tissulaires engendrés à la suite d'une infection. Bien que vitales pour la défense de l'organisme, un dérèglement de la production de cytokines peut entraîner des maladies auto-immunes, des allergies et d'autres désordres inflammatoires (Elenkov *et al.*, 2005). Ainsi, comprendre les mécanismes de régulation des cytokines est essentiel pour développer des thérapies ciblées visant à moduler la réponse immunitaire impliquée dans de nombreuses pathologies.

1.1.1.2 Présentation antigénique

La présentation antigénique joue un rôle fondamental dans l'activation du système immunitaire adaptatif. Ce processus est essentiel pour la détection et l'élimination des agents pathogènes, des cellules infectées ou des cellules tumorales, en permettant au système immunitaire de distinguer entre le soi et le non-soi (Murphy et Weaver, 2016).

L'engagement des PRR en réponse aux PAMP par les cellules présentatrices d'antigène déclenche l'internalisation de l'agent pathogène par divers mécanismes tels que l'endocytose, la phagocytose ou la macropinocytose (Kumar *et al.*, 2011). Ces CPA endocytosent et digèrent les antigènes pour les exposer à la surface cellulaire sous forme de fragments, associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B, considérés comme des CPA professionnelles, sont particulièrement efficaces pour activer les lymphocytes T (Murphy et Weaver, 2016). Alors que toutes les cellules nucléées peuvent présenter des antigènes endogènes via les molécules de CMH de classe I aux lymphocytes T cytotoxiques CD8+, seules les CPA professionnelles ont la capacité de présenter des antigènes exogènes via les molécules de CMH de classe II aux lymphocytes T auxiliaires CD4+. Ce processus nécessite également la présence de signaux co-stimulants, tels que les molécules CD86 et CD83, qui permettent une activation complète des lymphocytes T (Chaplin, 2010). Le rôle des CPA est crucial non seulement pour la présentation de l'antigène, mais également pour la stimulation des lymphocytes T par la production de cytokines et de chimiokines. Notamment, les cellules

dendritiques sont reconnues pour leur capacité à effectuer la présentation dite croisée où elles exposent des antigènes d'origine intracellulaire, ce qui les rend particulièrement aptes à activer les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (Guermonprez *et al.*, 2002). Cette capacité est vitale pour la réponse immunitaire contre des infections virales ou des cellules tumorales qui, autrement, peuvent être difficiles à détecter. Une fois activées, les CPA spécialisées migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour y exposer l'antigène aux lymphocytes, ce qui initie et dirige la réponse immunitaire (Murphy et Weaver, 2016). La nature de cette réponse dépend de plusieurs facteurs, tels que le type de PRR activé, le ligand spécifique qui s'y lie et l'intensité de cette liaison. Ces variables influencent les niveaux d'expression des molécules du CMH et des molécules de costimulation, ainsi que le profil des cytokines produites, modifiant ainsi la qualité et l'intensité de la réponse immunitaire adaptative qui s'ensuit.

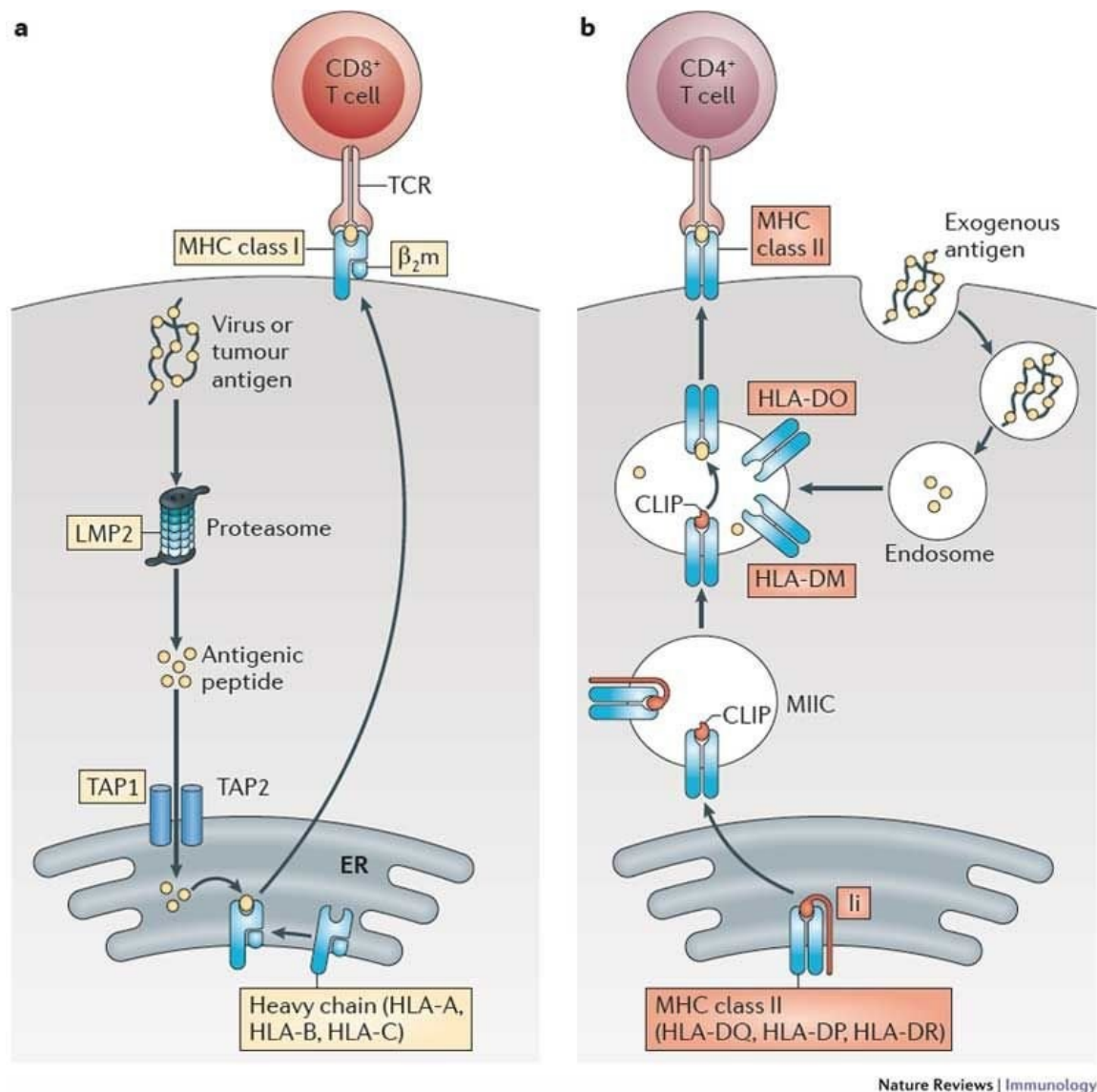


Figure 1.2 : Représentation de la présentation antigénique par les CMH

Le CMH I permet d'exposer des morceaux d'antigènes provenant de l'intérieur des cellules (par exemple, des virus ou des protéines anormales produites par des cellules tumorales) aux cellules T CD8⁺. Les protéines intracellulaires anormales ou étrangères sont découpées par le protéasome. Elles sont ensuite chargées sur le CMH I au niveau de réticulum endoplasmique. Le complexe CMH I-peptide migre ensuite à la surface de la cellule pour être reconnu par les cellules T CD8⁺. Le CMH II présente des morceaux d'antigènes provenant de l'extérieur des cellules (par exemple, des bactéries ou des parasites) aux cellules T CD4⁺. Les CPA capturent les agents étrangers et les dégradent dans des vésicules appelées endolysosomes. Ces peptides se fixent ensuite sur les molécules du CMH II avant que le complexe soit transporté à la surface des cellules. Tiré de (Kobayashi et Van Den Elsen, 2012).

1.1.2 Réponse immunitaire adaptative

L'immunité adaptative constitue un système de défense hautement spécialisé et flexible, capable de cibler une multitude d'antigènes grâce à des récepteurs spécifiques générés par recombinaison somatique. Contrairement aux récepteurs du système immunitaire inné, codés directement dans le génome germlinal pour reconnaître des motifs moléculaires communs, les récepteurs des lymphocytes T (TCR) et B (BCR) sont uniques à chaque cellule et permettent une reconnaissance précise des agents pathogènes. Cette spécificité confère à l'immunité adaptative la capacité de répondre de manière ciblée et d'assurer une mémoire immunologique, un atout majeur pour une réponse plus rapide et efficace lors d'une réexposition à un même pathogène (Bonilla et Oettgen, 2010; Murphy et Weaver, 2016).

Les lymphocytes T et les lymphocytes B (LB) sont les principaux acteurs de l'immunité adaptative. Ils se développent dans les organes lymphoïdes primaires, *i.e.* thymus pour les LT et moelle osseuse chez les mammifères pour les LB, avant de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques et la rate (Bonilla et Oettgen, 2010; Murphy et Weaver, 2016). Ces sites constituent des environnements où les cellules immunitaires rencontrent les antigènes capturés et présentés par les CPA, un processus permettant d'activer les lymphocytes naïfs reconnaissant via leur TCR ou BCR l'antigène présenté sur une molécule CMH de classe II. La présentation des antigènes aux lymphocytes T est un processus clé pour l'activation de l'immunité adaptative. Les molécules du CMH de classe I présentent des antigènes endogènes (provenant de l'intérieur de la cellule) aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, tandis que les molécules du CMH de classe II présentent des antigènes exogènes (provenant de l'extérieur de la cellule) aux lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (Bonilla et Oettgen, 2010; Murphy et Weaver, 2016). Pour activer pleinement les lymphocytes T, trois signaux sont nécessaires : (1) la reconnaissance spécifique du complexe CMH-antigène par le TCR du lymphocyte; (2) la costimulation, assurée par l'interaction de molécules comme CD80/CD86 sur les CPA avec CD28 sur les lymphocytes T; et (3) la sécrétion de cytokines par les CPA, modulant la différenciation et l'expansion des lymphocytes T (Bonilla et Oettgen, 2010; Murphy et Weaver, 2016). Ce mécanisme précis et coordonné garantit que seuls les lymphocytes spécifiques à l'antigène sont activés, évitant ainsi des réponses indésirables voire auto-immunes. Une fois activés, les lymphocytes T prolifèrent, se différencient en cellules

effectrices ou mémoires et migrent vers le site d'infection ou d'inflammation pour exercer leurs fonctions immunitaires.

1.1.2.1 Lymphocyte TCD4+

Les lymphocytes T CD4+, également appelés cellules T auxiliaires, jouent un rôle central dans la coordination et la régulation de la réponse immunitaire adaptative. Une fois activés par l'interaction spécifique entre leur TCR et un antigène présenté par une CPA sur des molécules du CMH de classe II, ces lymphocytes se différencient en sous-types fonctionnels en fonction du contexte immunologique et des cytokines présentes. Parmi ces sous-types, on retrouve les cellules Th1 (apparaissant lors de la présence d'IL-12), qui favorisent les réponses cellulaires contre les pathogènes intracellulaires en stimulant les lymphocytes T CD8+; les cellules Th2 (apparaissant lors de la présence d'IL-4), qui soutiennent les réponses humorales en activant les lymphocytes B et en favorisant la production d'anticorps ; les cellules Th17 (apparaissant lors de la présence d'IL-6 et du « Transforming growth factor » TGF- β), impliquées dans la défense contre les infections extracellulaires; et les cellules T régulatrices (Treg) (apparaissant lors de la présence de TGF- β), qui maintiennent la tolérance immunitaire en supprimant les réponses auto-immunes et inflammatoires excessives (Afzali *et al.*, 2007; Murphy et Weaver, 2016; Wan *et al.*, 2020). Les lymphocytes T CD4+ sécrètent une grande variété de cytokines pour amplifier et orienter l'activité des autres cellules immunitaires telles que les macrophages, les lymphocytes B, et les lymphocytes T CD8+ (Murphy et Weaver, 2016). Leur dysfonctionnement peut entraîner des immunodéficiences, comme dans le cas de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ou des désordres auto-immuns, soulignant leur importance pour l'équilibre et l'efficacité du système immunitaire.

1.1.2.2 Lymphocytes TCD8+

Les lymphocytes T CD8+, également appelés cellules T cytotoxiques, sont essentiels pour l'élimination des cellules infectées par des pathogènes intracellulaires et les cellules tumorales. Leur activation repose sur la reconnaissance spécifique d'un complexe CMH de classe I. Pour atteindre leur plein potentiel cytotoxique, ils nécessitent également des signaux additionnels, fournis par des lymphocytes T CD4+ auxiliaires via la sécrétion de cytokines telles que l'IL-2. Une fois activés, les lymphocytes T CD8+ prolifèrent (expansion clonale) et se différencient en cellules

cytotoxiques effectrices capables de détruire leurs cibles (Murphy et Weaver, 2016). Leur mécanisme d'action repose principalement sur deux voies. D'une part, ils libèrent des granules cytotoxiques contenant des protéines telles la perforine, qui forme des pores dans la membrane des cellules cibles et les granzymes, qui induisent l'apoptose (Yasukawa *et al.*, 2000). D'autre part, ils utilisent des interactions de type récepteur-ligand comme celle entre Fas (sur la cellule cible) et FasL (sur le lymphocyte T CD8+), pour déclencher également l'apoptose (Stenger *et al.*, 1997). Les lymphocytes T CD8+ jouent ainsi un rôle central dans l'immunité adaptative à médiation cellulaire en assurant l'élimination ciblée des cellules altérées tout en préservant les tissus sains. Leur activité est finement régulée pour prévenir des dommages collatéraux aux tissus environnants et éviter les réponses auto-immunes. Une fois leur mission accomplie, une partie de ces cellules devient des lymphocytes T mémoires, permettant une réponse plus rapide et efficace lors d'une réinfection future (Murphy et Weaver, 2016).

1.1.2.3 Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont des acteurs majeurs de l'immunité adaptative à médiation humorale par la production d'immunoglobulines (Ig) ou anticorps qui neutralisent les agents pathogènes extracellulaires. Ces anticorps ne se contentent pas de lier les antigènes via leur « fragment antigen binding region » (région Fab). Ils activent également, via leur domaine « fragment crystallizable region » (région Fc) des mécanismes effecteurs de l'immunité innée. Par exemple, la liaison d'un anticorps à un antigène permet à sa région Fc d'interagir avec des protéines du système du complément, déclenchant une cascade conduisant à la formation d'un complexe d'attaque membranaire et à la lyse de la cellule cible (cytotoxicité dépendante du complément ou CDC) (LeBien et Tedder, 2008). De plus, les régions Fc peuvent être reconnues par des récepteurs Fc (FcR) présent à la surface des macrophages ou des cellules NK, favorisant, respectivement, la phagocytose dépendante des anticorps (ADCP) et la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) (Murphy et Weaver, 2016). L'activation des lymphocytes B, initiée par la reconnaissance d'antigènes spécifiques, entraîne leur prolifération (expansion clonale) et leur différenciation en deux types cellulaires : les plasmocytes et les lymphocytes B mémoires. Les plasmocytes produisent des anticorps en grande quantité et les lymphocytes B mémoires, de leur côté, assurent une réponse rapide et amplifiée lors d'une nouvelle exposition au même antigène (LeBien et Tedder, 2008). Sous l'influence de cytokines et des interactions avec les cellules T, les lymphocytes B

subissent également une maturation d'affinité et une commutation isotypique, augmentant la spécificité et la diversité fonctionnelle des anticorps produits (Murphy et Weaver, 2016). Par exemple, des anticorps de type IgG assurent une diffusion dans les tissus, tandis que les IgA protègent les muqueuses. Ainsi, les lymphocytes B jouent un rôle indispensable dans le maintien d'une réponse immunitaire humorale efficace et durable.

Chez l'humain et la souris, les anticorps sont classés en plusieurs isotypes, définis par leur région Fc, qui détermine leurs fonctions biologiques et leur localisation. Ces isotypes incluent IgG, IgA, IgM, IgE et IgD, présents dans les deux espèces, bien que leurs sous-types varient légèrement. Le premier isotype produit lors d'une réponse immunitaire sont les IgM qui sont impliquées dans l'opsonisation et le mécanisme effecteur CDC. Les IgG se divisent chez l'humain en quatre sous-types (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), tandis que celles de la souris sont divisées en IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c et les IgG3. Les IgG sont les anticorps les plus abondants dans le sérum et permettent la neutralisation et l'opsonisation des agents pathogènes ainsi que la mise en place des mécanismes effecteurs CDC, ADCC et ADCP. Les IgA, spécialisées dans la défense des muqueuses, existent en deux sous-types (IgA1 et IgA2) chez l'humain, alors que la souris ne possède qu'un seul type d'IgA. Les IgE sont impliquées dans les réponses allergiques et la défense contre les parasites. IgD joue un rôle encore mal défini dans l'activation initiale des lymphocytes B (Abbas *et al.*, 2011; Chaplin, 2010; Collins, 2016; Murphy et Weaver, 2016).

1.2 Vaccination

La vaccination est une stratégie de prévention qui repose sur l'induction d'une mémoire immunologique spécifique à un antigène, permettant à l'organisme de se protéger efficacement contre une exposition future à un pathogène donné. En simulant une primo-infection par l'administration de particules ou de composantes d'un agent pathogène, la vaccination déclenche une réponse immunitaire adaptative et durable, atténuant ainsi les symptômes cliniques ou empêchant l'apparition de la maladie. Depuis son origine au XVIII^e siècle, elle a réduit de manière spectaculaire la prévalence, la morbidité et la mortalité de nombreuses maladies infectieuses, notamment la variole, la poliomyélite, la diphtérie et la rougeole. Elle constitue ainsi l'une des interventions sanitaires les plus efficaces et rentables à ce jour (Ghattas *et al.*, 2021; Plotkin, 2005).

1.2.1 Vaccins traditionnels

La majorité des vaccins utilisés aujourd'hui sont composés d'organismes entiers, atténués ou inactivés. Ces vaccins sont appelés vaccins traditionnels car ils ont été les deux premières stratégies vaccinales à avoir été mise en place.

Les vaccins vivants atténués utilisent une version affaiblie de l'agent pathogène, capable de déclencher une réponse immunitaire, sans provoquer la maladie chez les individus immunocompétents. Cette atténuation est obtenue en modifiant génétiquement ou en cultivant le micro-organisme dans des conditions qui réduisent sa virulence. Ces vaccins sont particulièrement efficaces car ils imitent étroitement une infection naturelle, stimulant une réponse immunitaire robuste et durable. Cependant, ils présentent des limitations, notamment le risque de réversion à la virulence et les contre-indications chez les personnes immunodéprimées. Des exemples de vaccins vivants atténués incluent ceux contre la rougeole, la rubéole, les oreillons et la varicelle chez l'homme (Ghattas *et al.*, 2021; Murphy et Weaver, 2016).

Les vaccins inactivés sont fabriqués à partir d'agents pathogènes qui ont été tués ou rendus incapables de se répliquer. Cette méthode élimine tout risque de réversion à la virulence, offrant une sécurité accrue par rapport aux vaccins vivants. L'inactivation est obtenue par des méthodes de traitements chimique (par exemple à la suite d'un traitement avec la formaline) ou bien physique (comme un traitement à une température élevée). Toutefois, ces vaccins nécessitent généralement des adjuvants (immunostimulants) pour renforcer leur immunogénicité (capacité à provoquer une réponse immunitaire) et des doses de rappel pour maintenir une protection durable, car ils induisent principalement une réponse humorale et une mémoire immunitaire plus limitée. Bien qu'ils soient bien tolérés et appropriés pour les populations vulnérables, des accidents d'inactivations incomplètes sont apparus au cours du temps comme lors de l'incident de Cutter survenu aux États-Unis en 1955 où près de 200 enfants ont été paralysés à la suite de l'inoculation de dose de poliovirus partiellement inactivé (Murphy et Weaver, 2016; Sanders *et al.*, 2015; Treanor, 2006).

1.2.2 Nouvelles technologies vaccinales

Les vaccins sous-unités contiennent uniquement des parties de l'agent pathogène, telles que des protéines de surface ou encore des toxines élaborées par cet agent au lieu de l'organisme entier.

Ces vaccins sont plus sécuritaires que les vaccins vivants atténués ou inactivés car ils ne contiennent pas de matériel génétique infectieux. Cependant, tout comme les vaccins inactivés, ils induisent majoritairement une réponse humorale et nécessitent l'ajout d'un adjuvant dans la préparation vaccinale. Les protéines antigéniques peuvent être obtenues par des techniques de fractionnement à partir du pathogène entier ou, encore mieux, peuvent être produites sous forme de protéines recombinantes à partir de divers systèmes d'expression tels que des bactéries (*Escherichia coli*), des levures ou des cellules d'insectes et de mammifères (Moyle et Toth, 2013).

Les particules pseudo-virales, ou « *Virus-Like Particles* » (VLP), représentent une avancée importante en immunologie grâce à leur capacité à reproduire la structure des virus tout en étant dépourvues de matériel génétique infectieux, ce qui les rend sécuritaires pour une utilisation vaccinale (Zeltins, 2013). Ces structures nanométriques, composées de protéines virales structurales, s'auto-assemblent pour former des particules qui imitent la morphologie des virus, offrant une forte immunogénicité (Roldão *et al.*, 2010). Les VLP peuvent être produites dans divers systèmes d'expression, qu'ils soient eucaryotes ou procaryotes. Leur capacité à induire des réponses immunitaires humorales et cellulaires puissantes les rend particulièrement intéressants pour le développement de vaccins (Roldão *et al.*, 2010). Déjà employées dans des vaccins commerciaux contre l'hépatite B et le papillomavirus humain (Zeltins, 2013), elles sont également explorées pour lutter contre des maladies émergentes comme le COVID-19, grâce à leur efficacité à présenter des épitopes (Ward, B. J. *et al.*, 2021).

Les vaccins à base d'ADN et d'ARN constituent une approche innovante qui consiste à introduire directement des acides nucléiques dans les cellules d'un hôte immunisé pour produire des antigènes et déclencher une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Les vaccins à ADN font référence à des plasmides nus contenant en outre un promoteur eucaryote fort comme par exemple celui dérivant du cytomégalo virus humain de type 5 (CMV5), des oligodésoxynucléotides CpG servant d'agent immunostimulant et le gène exprimant le matériel vaccinal d'intérêt (Liu, M. A., 2003). Les vaccins à base d'ARN messager (ARNm), quant à eux, ont été récemment développés et utilisés avec succès, notamment pour la vaccination contre la COVID-19 chez l'homme. Cette technologie fait appel à des modifications nucléotidiques de l'ARNm pour en augmenter la stabilité et optimiser sa traduction. Ce type de vaccin fait aussi appel à une structure lipidique entourant la molécule d'ARN elle-même, formant ainsi une nanoparticule lipidique, afin de protéger l'ARNm

des ribonucléases et de favoriser son internalisation dans la cellule où elle sera traduite ensuite en protéine (Couvreur, 2022).

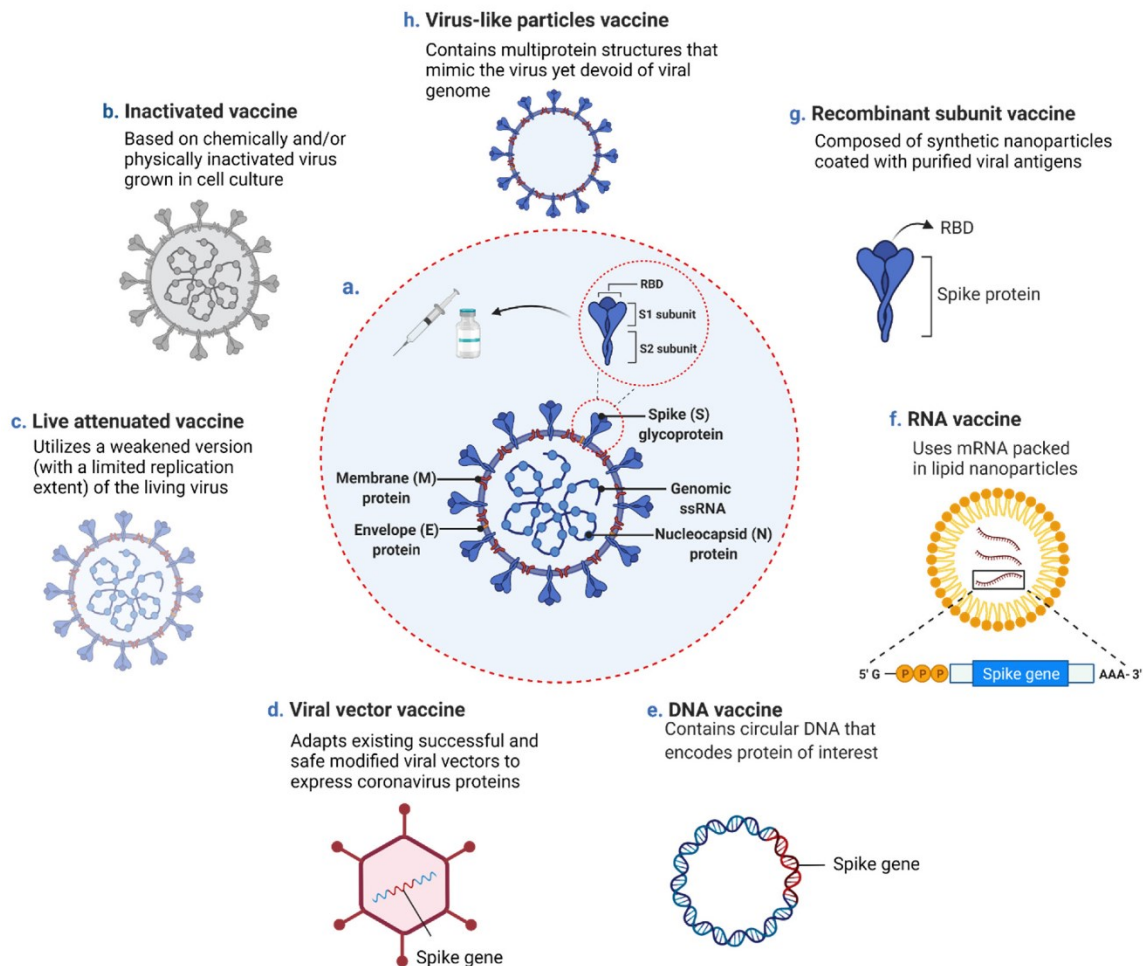


Figure 1.3 : Différents types de vaccins

Les vaccins traditionnels formés à partir des organismes pathogènes entiers, soit atténués ou inactivés. Les vaccins de nouvelle génération formés à partir d'une ou plusieurs molécules spécifiques au pathogène. On y retrouve les vaccins «Virus like particle» (VLP), les vaccins à vecteur viral, les vaccins à ADN ou ARN ainsi que les vaccins sous-unitaires recombinant. Tiré de (Al-Jighefee *et al.*, 2021).

1.2.3 Les nanoparticules en vaccination

Les nanoparticules formées à partir de protéines d'autoassemblage constituent une avancée majeure dans le développement des vaccins sous-unitaires, grâce notamment à leur faible toxicité, leur biocompatibilité et leur versatilité. Ces structures permettent de protéger les antigènes de la

dégradation tout en augmentant l'internalisation par les CPA et ce, grâce à une taille optimale comprise entre 20 et 200 nm. (Taki et Smooker, 2015; Zhang, Y.-N. *et al.*, 2019). Les nanoparticules peuvent stimuler une réponse immunitaire adaptative puissante en prolongeant la disponibilité des antigènes et en facilitant leur capture par les CPA. De plus, ces nanoparticules offrent une présentation améliorée des antigènes aux lymphocytes B et T, grâce à une haute densité d'antigènes exposés à leur surface, ce qui est crucial pour activer efficacement le système immunitaire (Bricha *et al.*, 2023).

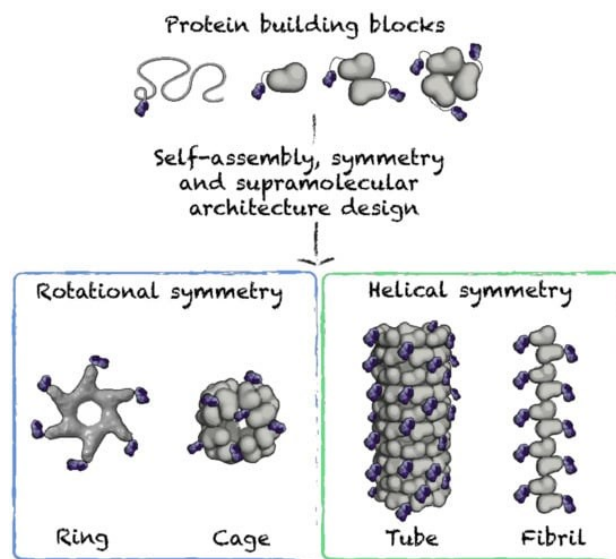


Figure 1.4 : Nanoparticules formés par des protéines d'autoassemblage

Les constructions formées à partir d'assemblages protéiques peuvent être variées grâce aux propriétés physicochimiques et structurales des blocs de construction. Tiré de (Zottig *et al.*, 2020).

1.2.4 Peptide amphiphile en vaccination

Les peptides amphiphiles, grâce à leur structure unique combinant des segments hydrophiles et hydrophobes, peuvent s'auto-assembler en nanoparticules micellaires dans des environnements aqueux. Ces micelles offrent des avantages significatifs en vaccination en servant de plateformes efficaces pour la délivrance d'antigènes, protégeant ces derniers de la dégradation enzymatique et améliorant leur biodisponibilité (Barrett et Tirrell, 2018). L'efficacité des vaccins amphiphiles peptidiques est influencée par plusieurs facteurs comme la taille des micelles, la charge et la présence de fragments hydrophobes. Ces facteurs affectent l'accumulation dans les ganglions lymphatiques, l'absorption cellulaire et l'immunogénicité globale (Zhang, R. *et al.*, 2018). Par

exemple, il a été constaté que la taille et la charge des micelles influencent de manière significative la bioactivité des micelles amphiphiles peptidiques, ce qui permet de comprendre comment ces matériaux peuvent être optimisés pour de meilleures réponses immunitaires. De plus, ils jouent un rôle d'auto-adjuvant, renforçant la réponse immunitaire grâce à des propriétés immunostimulantes intrinsèques (Trent *et al.*, 2015). Ils activent des récepteurs Toll-like, notamment le TLR2, stimulant l'immunité innée essentielle pour initier une réponse adaptative efficace. Des études expérimentales sur des modèles murins ont démontré leur capacité à induire une réponse humorale robuste, ce qui en fait des candidats prometteurs pour le développement de vaccins sous-unitaires (Trent *et al.*, 2015; Zhang, Y.-N. *et al.*, 2019).

Sur le plan moléculaire, leur amphiphilicité repose sur une queue hydrophobe combinée à des acides aminés chargés, favorisant leur solubilité dans l'eau et permettant des ajustements structuraux en réponse aux variations de pH ou de concentration en sels. Leur extrémité hydrophile peut être fonctionnalisée, offrant ainsi une grande flexibilité pour intégrer des épitopes peptidiques ou des agents pharmacologiques (Cui *et al.*, 2010). Cependant, malgré ces avantages, les peptides amphiphiles présentent certaines limites. Leur production à grande échelle peut être coûteuse et techniquement complexe, bien que des techniques telles que la synthèse en phase solide puissent atténuer ce problème. La stabilité des structures auto-assemblées peut varier en fonction des conditions physiologiques, ce qui pose aussi des défis pour leur utilisation *in vivo*.

1.2.5 β -peptides en vaccination

Les nanostructures auto-assemblées en feuillets- β -croisés représentent une avancée prometteuse dans le domaine de la vaccination. Ces structures, formées par des peptides auto-assemblés, offrent une biocompatibilité élevée et une remarquable stabilité contre la dégradation enzymatique, des qualités essentielles pour des plateformes vaccinales robustes (Negahdaripour *et al.*, 2017). En plus de leur capacité à protéger les antigènes, ces nanostructures agissent comme adjuvants naturels, éliminant ainsi le besoin d'adjuvants chimiques potentiellement toxiques (Bricha *et al.*, 2023; Negahdaripour *et al.*, 2017). Ces nanostructures en feuillets- β -croisés peuvent conférer, lorsqu'utilisées en vaccination, une protection efficace contre des virus tels que le virus de la grippe A et le virus Chikungunya, en induisant une réponse immunitaire efficace et spécifique à l'épitope (Babych *et al.*, 2018; Bricha *et al.*, 2023; Zottig *et al.*, 2021)

Sur le plan moléculaire, les peptides peuvent être modulés pour adopter différentes structures nanométriques, telles que des nanofibres ou des nanoparticules, en fonction des besoins spécifiques (Negahdaripour *et al.*, 2017). Leur multivalence permet un affichage répétitif et ordonné des antigènes, renforçant ainsi l'immunogénicité (Bricha *et al.*, 2023; Negahdaripour *et al.*, 2017). De plus, l'utilisation de motifs de coiffage électrostatiques et d'autres stratégies d'ingénierie permet de contrôler précisément l'autoassemblage des peptides, assurant une uniformité et une efficacité accrue des vaccins (Bricha *et al.*, 2023; Zottig *et al.*, 2021). Cependant, ces avancées s'accompagnent de défis, notamment le polymorphisme des fibrilles et leur similarité avec des structures amyloïdes pouvant être considérées comme pathologiques, ce qui pourrait limiter leur usage clinique (Zottig *et al.*, 2021).

1.2.6 β -peptides amphiphiles

Ces peptides amphiphiles se composent généralement de quatre éléments structuraux distincts : (1) une queue alkyle hydrophobe, conférant aux peptides une capacité d'autoassemblage en solution aqueuse ; (2) une séquence peptidique possédant une forte propension à établir des liaisons hydrogène intermoléculaires, permettant la formation de feuillets- β -croisés intermoléculaires ; (3) une région d'acides aminés chargés qui assure la solubilité dans l'eau, génère des forces de répulsion électrostatiques et permet des changements structuraux contrôlés en réponse à des variations de pH ou à l'ajout de sels; et (4) une extrémité fonctionnelle qui peut être modifiée pour incorporer une molécule bioactive, telle qu'un épitope peptidique immunogène ou un agent pharmacologique spécifique. Cette architecture confère aux peptides amphiphiles une polyvalence unique pour des applications biomédicales (Cui *et al.*, 2010; Webber *et al.*, 2013). Bien que des peptides comme le C16-V3A3K3 développé par le groupe du Professeur Samuel Stupp, aient été largement utilisés pour la délivrance de médicaments et la régénération tissulaire, leur potentiel dans la formulation vaccinale reste encore à explorer (Hartgerink *et al.*, 2001; Webber *et al.*, 2013).

L'utilisation de β -peptides amphiphiles comme plateforme vaccinale pourrait aboutir à des structures hybrides combinant les avantages des nanostructures en feuillets- β -croisés et des nanostructures micellaires. Les feuillets- β -croisés offrent une stabilité mécanique accrue grâce au réseau de liaisons hydrogènes, augmentant la résistance à la dégradation enzymatique dans les environnements biologiques. En parallèle, les micelles formées par des peptides amphiphiles

permettent une délivrance efficace des antigènes en protégeant ces derniers de la dégradation et en améliorant leur biodisponibilité. Ces structures hybrides surmontent également deux grandes limitations: (1) la faible stabilité *in vivo* des nanostructures micellaires est compensée par la robustesse mécanique des feuillettes- β ; et (2) les préoccupations liées au polymorphisme des feuillettes β et à leur similitude avec des amyloïdes pathologiques sont réduites grâce à la présence de queues hydrophobes et d'autres éléments structuraux distincts. De plus, ces assemblages pourraient permettre une activation ciblée des TLR, notamment le TLR2 qui reconnaît sélectivement les peptides lipophiles, renforçant ainsi les réponses immunitaires innée et adaptative.

Les β -peptides amphiphiles représentent une solution prometteuse pour le développement de vaccins efficaces, stables et polyvalents. En intégrant un antigène sur le peptide C16-V3A3K3, il serait possible de concevoir un vaccin combinant autoassemblage, robustesse physique, biocompatibilité et immunostimulation optimisée, ouvrant la voie à une nouvelle génération de plateformes vaccinales innovantes. La séquence du β -peptide (C16-V3A3K3) a été choisie en raison de ses propriétés structurales favorisant l'auto-assemblage en micelles cylindriques et de son potentiel immunogène. Cette séquence spécifique est capable de former des liaisons hydrogène intermoléculaires, ce qui conduit à l'organisation en feuillettes β . Cette structure favorise l'élongation des micelles en micelles cylindriques et augmente la stabilité des nanostructures formées (Dehsorkhi *et al.*, 2014). Le choix du peptide C16-V3A3K3 repose également sur son utilisation étendue dans diverses applications biomédicales. Cependant, à notre connaissance, ce peptide n'avait jamais été utilisé dans le cadre de la vaccination. De plus, sa structure étant proche de celle du PAM2CSK4, un agoniste connu des récepteurs Toll-like 2 et 6 (TLR2/6), cela nous a conduit à formuler l'hypothèse que le peptide C16-V3A3K3 pourrait également activer ces récepteurs. Nos résultats expérimentaux ont confirmé cette capacité, renforçant ainsi l'intérêt de ce peptide en tant que plateforme vaccinale potentiellement immunogène.

1.3 Les adjuvants dans la réponse immunitaire

Les adjuvants sont des composés essentiels intégrés aux vaccins pour en améliorer l'immunogénicité, c'est-à-dire leur capacité à induire une réponse immunitaire efficace. Ils agissent en stimulant la réponse immunitaire innée grâce à divers mécanismes : la formation d'un dépôt local au site d'injection, qui prolongent la libération des antigènes, l'induction de cytokines et

chimiokines pour attirer les cellules immunitaires au dit site d'injection et l'amélioration de la capture et de la présentation des antigènes par les cellules dendritiques (Awate *et al.*, 2013). Ces processus créent un environnement local favorable qui influence directement la qualité et la spécificité des réponses immunitaires adaptatives. Les sels d'aluminium, tels que l'hydroxyde et le phosphate d'aluminium, ainsi que le phosphate de calcium comptent parmi les adjuvants les plus couramment utilisés. D'autres adjuvants, comme les émulsions huile-dans-eau, les liposomes et les produits dérivés de bactéries ont également été introduits. Cependant, leur développement empirique a laissé des zones d'ombre concernant leurs mécanismes d'action. De plus, certains de ces adjuvants peuvent provoquer des inflammations systémiques non-désirées et des recrutements cellulaires liés à des dommages tissulaires locaux, reflétant une certaine toxicité (Awate *et al.*, 2013; McKee et Marrack, 2017; Murphy et Weaver, 2016).

Pour répondre à cette limite, de nouveaux adjuvants comme le monophosphoryl lipid A (MPL-A), les ISCOMs (complexes immunostimulants) et des formulations avancées comme le système adjuvant AS01 ont été développés. Par exemple, AS01, qui associe le MPL-A et QS-21, un adjuvant extrait de l'arbre *Quillaja saponaria*, favorise l'activation des cellules dendritiques et stimule des réponses immunitaires médiées par les cellules T CD4⁺. Ces innovations ouvrent la voie à des vaccins plus ciblés, sécuritaires et efficaces, en optimisant les réponses immunitaires tout en minimisant les effets secondaires (Shi *et al.*, 2019). Avec l'émergence de vaccins de nouvelle génération, notamment ceux à base d'ARNm ou de nanoparticules, le développement de technologies adjuvantes avancées devient incontournable pour relever les défis des maladies infectieuses complexes.

1.3.1 Agonistes TLR

Les récepteurs Toll-like jouent un rôle central dans l'immunité innée en reconnaissant des PAMP et en déclenchant des voies de signalisation conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. Cette capacité des TLR à activer rapidement l'immunité innée a suscité un intérêt croissant pour leur utilisation comme cibles d'adjuvants dans les formulations vaccinales. Les agonistes des TLR, en modulant quantitativement et qualitativement la réponse immunitaire spécifique à un antigène, favorisent l'activation et la maturation des CPA ainsi que l'internalisation et la présentation des antigènes (Ignacio *et al.*, 2018; Luchner *et al.*, 2021).

Le TLR4, premier TLR identifié, a conduit au développement d'adjuvants vaccinaux tels que MPL-A, un agoniste dérivé du lipopolysaccharide bactérien. D'autres agonistes TLR ont également été explorés : par exemple, les oligodésoxynucléotides CpG (TLR9) pour stimuler des réponses Th1, le Poly I (TLR3) pour sa capacité à imiter des infections virales, et l'imiquimod (TLR7) pour des applications topiques. Plus récemment, des molécules innovantes telles que les diprovocims ciblant TLR1/TLR2 ont élargi les possibilités pour des applications vaccinales. Ces agonistes permettent de diversifier les stratégies adjuvantes en fonction du type de réponse immunitaire souhaitée, tout en offrant une base pour concevoir des vaccins plus efficaces et spécifiques contre divers pathogènes (Ignacio *et al.*, 2018).

1.4 Virus de l'influenza

La grippe est une maladie infectieuse provoquée par le virus de l'influenza. Elle se manifeste généralement par des symptômes tels que la fièvre, les maux de tête, les maux de gorge, la toux, les douleurs musculaires et la fatigue (Eccles, 2005). Cependant, lorsque l'infection n'est pas efficacement contrôlée, le virus peut se propager dans l'organisme, entraînant une réponse inflammatoire exacerbée. Cela peut conduire à des complications graves comme une pneumonie, un syndrome de détresse respiratoire aiguë, des atteintes neurologiques (méningite, encéphalite, encéphalomyélite aiguë disséminée) et, dans certains cas, au décès (Kalil et Thomas, 2019). Chaque année, la grippe touche une grande proportion de la population mondiale, avec près de 5 millions de cas sévères et environ un demi-million de décès, principalement chez les groupes vulnérables : jeunes enfants, personnes âgées et individus atteints de maladies chroniques (Kuster *et al.*, 2011; Tokars *et al.*, 2018).

1.4.1 Types d'influenza virus

Le virus de l'influenza, ou virus de la grippe, appartient à la famille des *Orthomyxoviridae* et constitue un pathogène majeur responsable d'infections respiratoires saisonnières chez l'homme, ainsi que chez de nombreux animaux et oiseaux (Short *et al.*, 2015). Il est classé en quatre types ou genres : A, B, C et D. Les influenza A (IAV) sont les plus étudiés en raison de leur capacité à infecter une grande variété d'hôtes, notamment les humains, les oiseaux et certains mammifères, et à provoquer des pandémies comme celle de la grippe espagnole de 1918. Ces virus sont classés en sous-types en fonction des combinaisons de deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine

(HA) et la neuraminidase (NA) (Devi et Sarala, 2021). Il existe 18 sous-types de HA (H1- H18) et 11 sous-types de NA (N1-N11), ce qui permet à l'IAV de former une multitude de combinaisons provoquant l'émergence de nouvelles souches ou bien la réémergence d'anciennes souches. Les souches aviaires sont classées en virus faiblement pathogènes « Low pathogenicity avian influenza » (LPAI) ou fortement pathogènes « Highly pathogenic avian influenza » (HPAI), selon leur impact chez les gallinacés. Les HPAI, en particulier les sous-types H5 issues de la lignée Gs/Gd, causent actuellement des pertes considérables dans l'industrie avicole mondiale et commencent à s'adapter à des mammifères, comme les phoques, les chiens et plus récemment les chats et les vaches (Caliendo *et al.*, 2022; Pantin-Jackwood et Swayne, 2009). Cette évolution souligne leur potentiel zoonotique et pandémique, faisant de ces virus une menace majeure potentielle. Les influenza B (IBV) infectent principalement les humains et provoquent des épidémies saisonnières, mais sans pandémie (Devi et Sarala, 2021; Koutsakos *et al.*, 2016). Les influenza C (ICV), bien qu'infectant également les humains, causent des formes plus légères de la maladie, tandis que l'influenza D (IDV) infecte principalement les bovins et n'affecte pas directement les humains (Devi et Sarala, 2021).

1.4.2 Génome

Le virus de l'influenza est un virus à ARN segmenté, son génome étant composé de huit segments d'ARN simple brin de polarité négative pour les types A et B, et de sept segments pour les type C et D (Devi et Sarala, 2021). Ces segments codent pour les protéines structurales et non structurales essentielles à sa réplication et à sa propagation, notamment l'hémagglutinine, la neuraminidase, et des protéines internes comme la nucléoprotéine (NP) et les polymérases virales (PA, PB1, PB2) ainsi que les protéines matricielles M1 et M2 (Devi et Sarala, 2021). Cette structure segmentée permet des échanges génétiques entre souches lors d'une co-infection, un phénomène appelé réassortiment, qui peut conduire à l'apparition de nouvelles souches potentiellement problématique.

1.4.3 Morphologie

Morphologiquement, le virus de l'influenza est enveloppé et présente une forme sphérique ou filamentaire (Devi et Sarala, 2021). Son enveloppe lipidique, dérivée de la membrane de l'hôte, est ornée des glycoprotéines HA et NA qui jouent un rôle crucial dans l'infection et la dissémination. La HA permet l'attachement du virus aux cellules cibles via les récepteurs d'acide sialique présents

à leur surface (Skehel et Wiley, 2000), tandis que la NA facilite le relâchement des nouveaux virions en clivant ces récepteurs (Wen, F. et Wan, 2019). Il est également connu que l'inhibition de la NA réduit significativement l'efficacité de l'infection, ce qui suggère que la NA est impliquée dans l'étape d'entrée du virus. La protéine M2 se retrouve également à la surface des virions. Cette dernière est multifonctionnelle et joue notamment un rôle essentiel dans le transport de protons, le bourgeonnement et la scission des particules virales (Pinto *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 2013). À l'intérieur de l'enveloppe, les segments d'ARN viral sont encapsidés par la nucléoprotéine et associés à un complexe de polymérases, formant des ribonucléoprotéines.

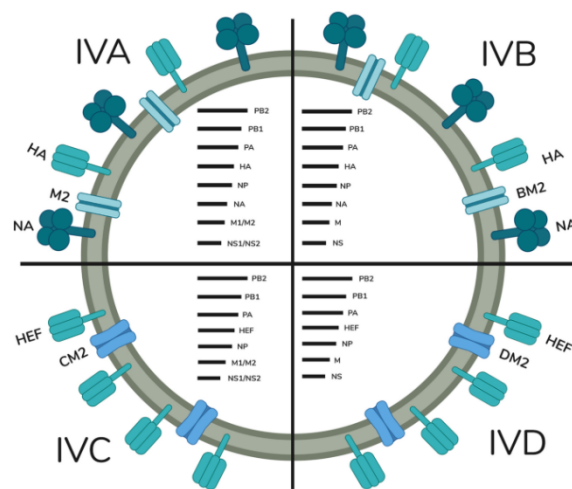


Figure 1.5 : Structure et génome des influenza A, B, C et D

Représentation schématisée des protéines HA, NA et M2 de l'influenza A et de leur équivalent chez l'influenza B, C et D. Les segments génomiques de chaque grand type d'influenza virus sont également représentés. Tiré de (Devi et Sarala, 2021).

1.4.4 Cycle de réplication

Le cycle de réplication du virus débute par l'attachement de la HA aux récepteurs d'acide sialique des cellules épithéliales respiratoires de l'hôte (Skehel et Wiley, 2000). Une fois internalisé par endocytose, le virus utilise les conditions acides de l'endosome pour activer la fusion de son enveloppe avec la membrane de l'endosome, libérant ainsi son génome dans le cytoplasme (Carter et Iqbal, 2024). Les segments d'ARN sont ensuite transportés dans le noyau cellulaire, où la transcription et la réplication ont lieu grâce au complexe polymérasique viral. Les ARN messagers viraux sont traduits en protéines virales par les ribosomes cellulaires, tandis que les segments

d'ARN génomique sont encapsidés et assemblés en nouveaux virions (Carter et Iqbal, 2024). Ces derniers bourgeonnent à travers la membrane plasmique, emportant avec eux des fragments de la membrane de l'hôte pour former leur enveloppe.

1.4.5 Antigène M2e

La HA, fortement immunogène, induit la production d'anticorps neutralisants. Néanmoins sa partie globulaire (HA1) est sujette à des variations antigéniques dues à la dérive antigénique ("antigenic drift") ou au réassortiment génétique ("antigenic shift"). Il en va de même pour la NA qui induit la production d'anticorps neutralisant, mais qui est également sujette à des variations antigéniques, ce qui complique le développement d'un vaccin universel. En revanche, l'épitope M2e de la protéine M2 est une cible prometteuse pour l'élaboration de vaccins à large spectre (Jang et Seong, 2019; Mezhenkaya *et al.*, 2019). Sa haute conservation entre les différentes souches du virus de la grippe A en fait un candidat idéal pour surmonter les limitations des vaccins actuels qui nécessitent une reformulation annuelle en raison des mutations rapides du virus. En induisant des réponses immunitaires larges et durables, les vaccins basés sur M2e ont démontré leur capacité à protéger efficacement contre une variété de souches grippales. Cependant, en raison de sa faible immunogénicité intrinsèque et du peu de copies de la protéine M2 à la surface du virion, l'épitope M2e nécessite des formulations optimisées incluant des adjuvants ou des plateformes de délivrance comme les nanoparticules pour stimuler une réponse immunitaire robuste, incluant des anticorps spécifiques à M2e et des réponses des cellules T.

1.4.6 Vaccination grippale innovante

Plusieurs approches innovantes ont été développées pour la livraison de l'épitope M2e dans des préparations vaccinales. Par exemple, le vaccin recombinant STF2.4xM2e combine quatre copies de M2e avec la flagelline de type 2 de *Salmonella typhimurium* (STF2) comme adjuvant, activant les TLR5 pour induire une réponse immunitaire puissante (Turley *et al.*, 2011). Une autre stratégie utilise des nanoparticules d'or décorées avec M2e, qui ont permis une induction significative d'anticorps et une protection des souris face à une infection létale renforçant ainsi l'intérêt pour cette plateforme (Tao et Gill, 2015). D'autres exemples, dans des modèles murins, incluent des nanofilaments peptidiques multicomposants en feuillets- β croisés exposant un épitope antigénique dérivé du virus de la grippe A et un agoniste TLR, respectivement l'agoniste TLR7, imiquimod, et

l'agoniste TLR9, CpG (Bricha *et al.*, 2023). Ces avancées soulignent le potentiel de M2e non seulement pour améliorer la protection contre les infections grippales, mais également pour jouer un rôle clé dans la conception de vaccins universels plus efficaces et accessibles.

1.5 Hypothèse et objectifs

Les β -peptides amphiphiles, grâce à leurs propriétés uniques d'autoassemblage en structures nanométriques, leur biocompatibilité et leur capacité à intégrer des antigènes spécifiques, pourraient représenter une plateforme vaccinale prometteuse. Ces nanoparticules peuvent améliorer la stabilité physique et métabolique de l'antigène, augmenter son immunogénicité et générer des réponses immunitaires spécifiques et durables, incluant des anticorps spécifiques (réponse humorale) et une activation des cellules T (réponse cellulaire). En vaccination, ces peptides pourraient à la fois contrer les faiblesses de stabilité *in vivo* des nanostructures amphiphiles grâce à la stabilité des constructions en feuillets- β ainsi que la limite des nanostructures en feuillets- β -croisés trop similaire aux structures amyloïdes, notamment grâce à l'ajout des chaînes alkyles. En outre, les micelles cylindriques engendrées combindraient les propriétés déjà reconnues des deux nanostructures en tant que plateforme de livraison antigénique pouvant stimuler le système immunitaire.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet de maîtrise est d'évaluer l'utilisation de micelles cylindriques auto-assemblées à partir du peptide amphiphile C16-V3A3K3 en tant que plateforme auto-adjuvante pour la délivrance d'antigènes. Afin de répondre à cet objectif, trois sous-objectifs ont été retenus :

- 1) Concevoir, synthétiser et caractériser des plateformes nanovaccinales à base de peptides β -amphiphiles.
- 2) Étudier à l'aide de modèles cellulaires l'activité immunomodulatrice des plateformes nanovaccinales..
- 3) Évaluer l'efficacité des plateformes nanovaccinales à induire des réponses immunitaires humorale et cellulaire spécifiques à l'antigène et à protéger les souris immunisées contre une infection expérimentale par le virus influenza H1N1.

CHAPITRE 2

ARTICLE: Evaluation of cylindrical micelles assembled from amphiphilic β -peptides as antigen delivery nanostructures

Clément Martin^{1,2,3,4}, Mélanie Côté-Cyr^{1,3,4}, Phuong Trang Nguyen^{1,3,4}, Denis Archambault^{2,3,4}, Steve Bourgault^{1,3,4}

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

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

³*Quebec Network for Research on Protein Function, Engineering and Applications (PROTEO), Québec, H3C 3P8, Canada*

⁴*The Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre (CRIPA), Saint-Hyacinthe, J2S 2M2 Canada*

Manuscrit publié dans Nanoscale Advances

2.1 Contribution des auteurs

Clément Martin : Expérimentation: caractérisation biophysique (ThT, ANS, dichroïsme circulaire, AFM, ELISA); caractérisation in vitro (test TLR2/6, test d'internalisation par cytométrie et microscopie confocale, test de viabilité cellulaire) ; caractérisation in vivo (immunisation, signes vitaux IgG totaux, IgG isotypes, IFN γ dosage, IL-4 dosage, infection expérimentale H1N1).
Recherche bibliographique, préparation des figures et rédaction de l'article.

Côté-Cyr Mélanie : Expérimentation: Caractérisation par microscopie électronique; participation à l'immunisation et au challenge expérimental.

Ngyuen Phuong Trang : Expérimentation: Synthèse, purification et caractérisation des peptides ; support technique pour souris et caractérisation biophysique.

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

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

2.2 Résumé

Les nanostructures supramoléculaires auto-assemblées à partir de peptides synthétiques constituent des plateformes à fort potentiel pour la livraison d'antigènes dans le développement de vaccins. Les peptides amphiphiles et les β -peptides d'autoassemblage ont démontré leur capacité à protéger les épitopes antigéniques de la dégradation métabolique, à favoriser leur endocytose par les cellules présentatrices d'antigènes et à stimuler le système immunitaire inné. Dans cette étude, nous avons évalué l'utilisation de micelles cylindriques formées à partir du β -peptide amphiphile C16V3A3K3. L'ectodomaine de la protéine de matrice 2 (M2e) du virus de la grippe A a été conjugué via un bras espaceur tétra-Gly au niveau de l'extrémité C-terminale du peptide C16V3A3K3. Le peptide chimérique s'est assemblé en nanofilaments biocompatibles non ramifiés exposant l'antigène à leur surface, qui ont été internalisés efficacement par les cellules dendritiques et ont activé les récepteurs Toll-like 2/6. Ces micelles cylindriques ont induit une réponse humorale robuste spécifique à M2e chez les souris après une immunisation intramusculaire, sans nécessiter de co-administration avec des adjuvants. Bien que cette réponse humorale robuste n'ait pas permis une protection contre une infection létale par le virus de la grippe H1N1, ces micelles cylindriques assemblées à partir de β -peptides amphiphiles représentent une nouvelle nanoplatforme auto-adjuvante pour renforcer la production d'anticorps contre des épitopes peptidiques.

MOTS-CLÉS : nanovaccins, β -peptides amphiphiles, micelles cylindriques, autoassemblage, réponses immunitaires, virus de la grippe A

2.3 Abstract

Supramolecular nanostructures assembled from synthetic peptides constitute promising scaffolds for the delivery of antigens for vaccine development. Amphiphilic peptides and self-assembling β -peptides have shown to protect antigenic epitopes from degradation, to promote their uptake by antigen-presenting cells and to stimulate the innate immune system. In this study, we evaluated the use of cylindrical micelles assembled from the amphiphilic β -peptide C16V3A3K3. The ectodomain of the matrix 2 protein (M2e) of the influenza A virus was conjugated by a tetra-Gly linker at the C-terminus of C16V3A3K3. The chimeric peptide assembled into biocompatible unbranched filaments that expose the antigen on the surface, which were readily internalized by dendritic cells and activated the toll-like receptor 2/6. These cylindrical micelles induced a robust M2e-specific humoral immune response upon mice intramuscular immunization without the need of co-administration with adjuvants. Albeit this robust humoral response did not translate into protection against a lethal infection of the H1N1 influenza virus, these cylindrical micelles assembled from amphiphilic β -peptides represent a novel self-adjuvanted nanoplatform to enhance the antibody production against peptide epitopes.

KEYWORDS : nanovaccines, amphiphilic β -peptides, cylindrical micelles, self-assembly, immune responses, influenza A virus

2.4 Introduction

Vaccination constitutes the most effective strategy to fight infectious diseases afflicting both humans and domesticated animals. Nonetheless, issues with safety and/or efficacy remain, notably with conventional vaccines based on inactivated or attenuated whole microorganisms (Gebre *et al.*, 2021). Over the last decades, subunit vaccines composed of specific microbial antigens have been increasingly used due to their high safety, even though they tend to be weakly immunogenic and need to be administered with delivery vehicles and/or immunostimulatory agents to induce a robust and long-lasting antigen-specific immune response (Vartak et Sucheck, 2016). Antigen delivery systems are known to increase the physicochemical stability of antigens, their biological half-life, their drainage to lymphatic nodes, and/or their internalization by antigen-presenting cells (APCs) (Al - Halifa *et al.*, 2019; Chatzikleanthous *et al.*, 2021; Gregory *et al.*, 2013). Adjuvants act mainly by enhancing T and/or B cell responses through engagement of specific components of the innate immune system (Chatzikleanthous *et al.*, 2021; Coffman *et al.*, 2010). Interestingly, several proteinaceous nanoparticles used for the delivery of antigens in vaccines, including virus-like particles (VLPs) and peptide-based assemblies, have shown intrinsic adjuvant properties through different mechanisms, including activation of Toll-like receptors (TLRs) and engagement of inflammasome (Castelletto *et al.*, 2016; Eskandari *et al.*, 2017; Rudra *et al.*, 2010; Zhao, G. *et al.*, 2017; Zottig *et al.*, 2020).

Notably, supramolecular nanostructures obtained from the spontaneous self-assembly of synthetic peptides have shown potential for the development of subunit vaccines due to their biocompatibility, biodegradability, straightforward synthesis, easy characterization, and storage stability under the lyophilized powder form (Gebre *et al.*, 2021). By varying the sequence of the peptide building block, a large array of mesoscopic architectures with tailored chemical and

biological properties can be obtained (Fan, J. *et al.*, 2024; Fan, T. *et al.*, 2017; Gazit, 2007). Through attachment of an antigenic epitope to a self-assembling sequence, the resulting peptide nanostructures act as nanoplatforms for the presentation and delivery of antigenic determinants. For instance, several studies have shown that unbranched cross- β -sheet nanofibrils, which are obtained from the self-assembly of amyloid-like β -peptides, increase the antigen-specific immune response against the conjugated peptide epitopes (Babych *et al.*, 2018; Bricha *et al.*, 2023; Chen, J.-L. *et al.*, 2022; Rudra *et al.*, 2012; Rudra *et al.*, 2010; Zottig *et al.*, 2021). The cross- β -sheet quaternary organization of these fibrils is known to activate the heterodimeric TLR2/TLR6 (Al-Halifa *et al.*, 2020; Kihal *et al.*, 2024; Tükel *et al.*, 2009), as well as engaging cytosolic NLRP3 inflammasome (Lamontagne *et al.*, 2023), conferring self-adjuvantivity to these assemblies. Besides, amphiphilic peptides composed of a hydrophilic segment and a hydrophobic tail are known to self-assemble into micellar nanoparticles, which offer several advantages for antigen delivery. These spherical peptide micelles can protect the antigens from enzymatic degradation, enhance their bioavailability, and promote accumulation in the lymph nodes (Barrett *et al.*, 2017; Trent *et al.*, 2015). Nanostructures assembled from amphiphilic peptides have shown immunostimulatory properties, including TLR2 activation and maturation of dendritic cells (Castelletto *et al.*, 2016; Trent *et al.*, 2015). Accordingly, it was observed in mice that peptide micelles induce an amplified antigen-specific humoral response against a peptide epitope grafted onto the surface (Trent *et al.*, 2015; Zhang, R. *et al.*, 2018).

While cross- β filaments and spherical amphiphilic micelles assembled from synthetic peptides have proven to be effective as epitope delivery systems, the use of cylindrical micelles based on the self-assembly of amphiphilic β -peptides as vaccine scaffolds has not been investigated so far. These biocompatible peptides have already been evaluated for different biomedical applications,

including tissue regeneration (Webber *et al.*, 2013; Webber *et al.*, 2010) and drug delivery (Fuentes-Llanos *et al.*, 2024; Habibi *et al.*, 2016; Webber *et al.*, 2013; Zhao, C. *et al.*, 2021). Amphiphilic β -peptides are composed of four domains: (i) a hydrophobic alkyl chain, (ii) a short hydrophobic sequence with a strong propensity to form intermolecular hydrogen bond ladders into cross- β -sheets, (iii) a highly charged region and (iv) a functional group that dictate the activity of the nanostructure. Herein, we investigated the use of cylindrical micelles assembled from the C16-V3A3K3 amphiphilic peptide (PA) to deliver antigenic epitopes for vaccines. Towards this goal, the ectodomain of the matrix 2 protein (M2e) of the influenza A virus (IAV) was elongated at the C-terminus of PA by standard solid phase synthesis. The resulting elongated micelles engaged the heterodimeric TLR2-TLR6 and were avidly internalized by APCs, leading to robust M2e-specific humoral response upon mice immunization. Taken together, this study identifies cylindrical micelles as a novel self-adjuvanted nanoplatform to enhance the immunogenicity of peptide epitopes.

2.5 Materials and Methods

2.5.1 Synthesis, purification and self-assembly of peptides

Peptides were synthesized on solid support using Fmoc chemistry and a coupling method involving *N,N*-diisopropylethylamine as a base and 2-(6-chloro-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate (HCTU), as previously described (Babych *et al.*, 2024). Crude peptides were purified by HPLC using a C18 column with a linear gradient of acetonitrile in H₂O/TFA (0.6% v/v). Fractions containing the desired peptide, validated by time-of-flight mass spectrometry (LC/MS-TOF) with a purity greater than 95% were pooled and lyophilized (Fig 2.6, Fig. 2.7, Fig. 2.8). Peptides were dissolved at a concentration of 1.5 mM in 20 mM Tris-HCl, 1.5 mM NaCl pH 7.4, and sonicated for 5 min. Self-assembly was carried out under constant rotary

agitation at 40 rpm at room temperature for 96 h. For conjugation of the Alexa488 fluorophore, M2e and PA-M2e peptides were solubilized in H₂O:acetonitrile (1:1) and pH was adjusted to 9 with 4-methylmorpholine. Alexa488 succinimidyl ester was added at a molar ratio of 0.8:1 (Alexa488:peptide), and the reaction mixture was incubated under constant rotary agitation at room temperature for 2 h before being purified by HPLC.

2.5.2 Fluorescence spectroscopy

Molecular self-assembly was monitored by measuring the extrinsic fluorescence using 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid (ANS) and thioflavin T (ThT). At the desired time, peptide solutions were diluted in nanopure water to reach a final concentration of 50 μ M. ANS and ThT were respectively added to a final concentration of 450 μ M and 40 μ M. ANS excitation was carried out at 355 nm, and the emission spectra were recorded from 385 to 585 nm. ThT emission spectra were recorded from 450 to 550 nm after excitation at 440 nm. Experiments were performed at least in triplicate with different peptide samples, and representative data are presented.

2.5.3 Circular dichroism spectroscopy

Peptide solutions were diluted in nanopure water to achieve a concentration of 50 μ M. Circular dichroism (CD) analysis was conducted using a quartz cuvette with a 2-mm path length and spectra were recorded from 190 to 260 nm with a wavelength increment of 0.5 nm. The averaging time for each scan at each wavelength step was set to 10 sec. Considering the presence of the lipid tail, the data are presented in mdeg rather than mean residue ellipticity (MRE). Experiments were performed at least in triplicate with different peptide samples, and representative data are shown.

2.5.4 Atomic force microscopy

Peptide assemblies were diluted in 1% (v/v) acetic acid to reach a final concentration of 25 μ M and the resulting mixture was immediately applied to a freshly cleaved mica surface. After thorough washes with deionized water, samples were allowed to air dry for 24 h. Images were captured using a Veeco/Bruker Scan-Assyst multimode AFM in air mode, equipped with a silicon tip (tip radius of 2-12 nm, constant force of 0.4 N/m) mounted on a nitride lever, operating at a frequency of 0.9 Hz and 512 scans per minute. Images were analyzed using Gwyddion software.

2.5.5 Transmission electron microscopy

Peptide samples were diluted in H₂O to a concentration of 50 μ M and placed onto a glow-discharged, copper-carbon-coated 400 mesh grids. Negative staining was performed by applying 1.5% (w/v) uranyl formate for 1 min, followed by air drying for 24 h. Analyses were conducted using a FEI Tecnai G2 Spirit Twin TEM microscope operating at 120 kV and equipped with a Gatan Ultrascan 4000 4k $\times$ 4k CCD camera system.

2.5.6 Evaluation of epitope accessibility by ELISA

The accessibility of the M2e epitope on the peptide assemblies was assessed using an indirect ELISA. Briefly, high-binding 96-well plates were coated overnight at 4°C with 2 μ g of M2e peptide or an equivalent molar amount of PA-M2e assemblies. Plates were washed with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) and blocked for 1 h at room temperature with PBS-T containing 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA). After washing, the plates were incubated for 3 h at room temperature with a primary anti-M2 monoclonal antibody (14C2), diluted serially from 1:250 to 1:512 000. After extensive washing with PBS-T, rabbit anti-IgG conjugated to peroxidase was added at a dilution of 1:20 000, and plates were incubated for 1 h at room temperature. Peroxidase

activity was measured by adding 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and allowing the reaction to proceed for 20 min at room temperature before stopping it with H₂SO₄. Absorbance was measured at 450 nm, and the average absorbance of the blank was subtracted.

2.5.7 Cell viability

DC. 2.4. cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 25 mM HEPES buffer solution and 0.05 mM β -Mercaptoethanol. DC.2.4 cells were plated in 96-well plates at a density of 30 000 cells per well and incubated for 16 h with varying concentrations of PA or PA-M2e assemblies. After incubation, 50 μ M of resazurin was added, and cells were incubated for an additional 3 h before measuring absorbance at 570 nm. Cell viability (%) was determined by calculating the fluorescence ratio of the treated cells compared to control cells treated with the vehicle buffer (20 mM Tris-HCl, 1.5 mM NaCl pH 7.4).

2.5.8 Evaluation of TLR2/TLR6 activation

HEK-Blue hTLR2-TLR6 cells were maintained in DMEM enriched with 2 mM l-glutamine, 4.5 g/L glucose, 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 μ g/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL normocin, and 1 $\times$ HEK-Blue selection. Once the cell confluence reached around 60 to 80%, cells were plated in a 96-well plate using HEK-Blue detection medium, mixed with equal volumes of peptide mixtures or buffer. Cells were seeded at a density of 280,000 cells/mL and 180 μ l of the cell suspension was added per well. For measuring TLR2-TLR6 activity, peptide cylindrical micelles were incubated at concentrations ranging from 0.15 to 150 μ M, with Pam2CSK4 used as a positive control at a concentration of 10 ng/mL. After a 16 h incubation at 37 °C in 5% CO₂, the absorbance

was measured at 630 nm. The experiment was conducted at least three times in triplicate, and data were averaged and expressed as mean $\pm$ S.E.M.

2.5.9 Cellular uptake by dendritic cells

For flow cytometry analysis, DC2.4 cells were cultured in 24-well plates at a density of 50 000 cells per well. The following day, fluorescently labeled peptides were added to achieve an equimolar concentration of fluorophore. After 2 to 4 h incubation at 37°C, cells were thoroughly washed with ice-cold PBS and resuspended in PBS. Flow cytometry was performed using a CytoFLEX instrument, recording 10 000 synchronized events. Excitation wavelength was set at 488 nm, with emission detected at 530 nm. Collected data were analyzed using CytExpert software. This experiment was conducted at least three times in triplicate, and results were averaged and presented as mean $\pm$ S.E.M. For confocal microscopy analysis, DC2.4 cells were cultured overnight in 8-well ibidi chamber slides at a density of 50 000 cells per well. The following day, after 4 h incubation with fluorescently labeled peptides or micelles, the cells were thoroughly washed with ice-cold PBS and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde. Fixed cells were then stained with 50 ng/mL of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dichloride, and 1 U/mL of Texas Red-X Phalloidin. Cells were washed with PBS, and a 10 mM Tris-HCl/glycerol solution (1:1 v/v) was added. Fluorescence images were captured using a Nikon A1R inverted confocal microscope with a 60 $\times$ oil immersion lens, resulting in images created through Z-axis stacking. Images were analyzed using Fiji ImageJ software, and representative images are presented.

2.5.10 Mice immunization

All protocols were approved by the institutional committee for animal protection and use of the Université du Québec à Montréal in accordance with the regulations of the Canadian council on

animal care. Eight-week-old female BALB/c mice (8 mice per group) were intramuscularly immunized with 100 μ L of soluble M2e antigen or cylindrical PA-M2e micelles (500 μ M). Control mice received 100 μ L of filtered sterilized 20 mM Tris-HCl, 1.5 mM NaCl at pH 7.4. Immunization was conducted three times, with a 2-week interval between each injection. Weights and clinical signs were monitored every day following each immunization. Blood samples were collected from the saphenous vein the day before each immunization, *i.e.* days 0, 14, and 28.

2.5.11 Determination of M2e-specific antibody titers

M2e-specific IgG antibody titers were assessed using indirect ELISA. High-binding 96-well plates were coated with 2 μ g of M2e peptide per well, solubilized in 0.05 M sodium carbonate buffer at pH 9.6. Plates were washed thoroughly with PBS-T, blocked for 1 h with 1% (w/v) BSA, and then washed again with PBS-T. For titer determination, serial dilutions (1:2) of mouse sera, starting from 1:65 in PBS-T (1% BSA), were applied. After 3 h of incubation, plates were washed four times with PBS-T, followed by the addition of goat anti-mouse IgG conjugated to HRP (1:20,000), IgG1 (1:10,000), IgG2a (1:5000), IgG2b (1:5000), or IgG3 (1:5000) in PBS-T for 1 h. After washes, TMB/peroxide substrate was added for 20 minutes, and the reaction was terminated by the addition of 1N H₂SO₄. Absorbance was measured at 450 nm. Antibody titers were determined by plotting a regression curve [$y = (b + cx)/(1 + ax)$] of the different serum dilutions against optical density (OD). The final titers were defined as the highest dilution point that exhibited an optical density two times greater than that of the corresponding blanks, *i.e.* without serum.

2.5.12 Experimental challenge with H1N1 influenza A virus

This experiment was carried out under biosafety level 2 containment. Two weeks following the final immunization, mice were intranasally instilled with $5 \times \text{LD}_{50}$ of the influenza A/Puerto

Rico/8/1934 H1N1 virus in endotoxin-free PBS. Body weight and clinical signs were recorded twice daily, and clinical scores (**Table 2.1**), ranging from 0 to 3, were monitored each day. Mice that achieved a clinical score of 3 or experienced a weight loss exceeding 20% of their initial weight were euthanized.

2.6 Results and discussion

2.6.1 Design, self-assembly and characterization of amphiphilic cylindrical micelles

To study the potential of cylindrical micelles assembled from amphiphilic β -peptide as antigen delivery nanoplatforms, the M2e epitope was fused to the C-terminus of the C16-V3A3K3 self-assembling peptide (PA) via a flexible tetra-Gly spacer (Fig. 2.1). The M2e epitope, *i.e.* the ectodomain of the matrix 2 protein, is highly conserved among various strains of the influenza A virus, making M2e an attractive target for the development of universal flu vaccines (Deng *et al.*, 2015). However, as a short and soluble peptide, the M2e epitope is poorly immunogenic when used alone, requiring the addition of adjuvants and/or conjugation to delivery nanosystems to induce robust antigen-specific immune response. Herein, as supported by our previous works using cross- β -sheet filaments (Bricha *et al.*, 2023; Lamontagne *et al.*, 2023; St-Louis *et al.*, 2024; Zottig *et al.*, 2021), we hypothesized that the conjugation of M2e to PA will increase the immunogenicity by stabilizing the epitope, by promoting a depot effect at the immunization site, by facilitating internalization by APCs and/or by stimulating immune cells.

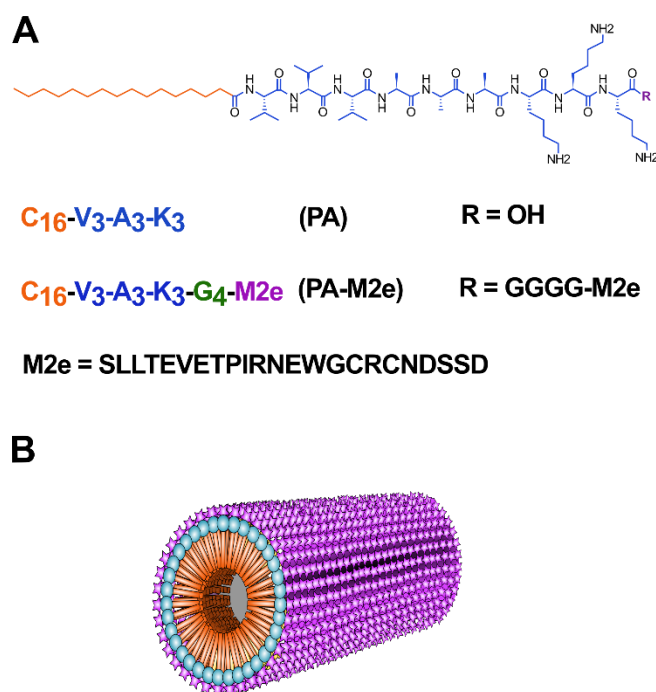


Figure 2.1 : Design of cylindrical micelles based on the self-assembly of amphiphilic β -peptide as antigen delivery nanoplatform

(A) Molecular structure and sequences of peptides with the M2e epitope in purple, the GGGG linker in green, the self-assembling sequence in blue and the alkyl tail in orange, and. (B) Schematic representation of the cylindrical micelle with the M2e epitope located on the surface.

Peptide self-assembly was initiated by dispersing the lyophilized peptide at a concentration of 1.5 mM in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, supplemented with 1.5 mM NaCl. Self-assembly performed under constant rotary agitation (40 rpm) was monitored by circular dichroism (CD) spectroscopy, thioflavin T (ThT) fluorescence, and 1-anilino-8-naphthalenesulfonate (ANS) fluorescence. Immediately after solubilisation, *i.e.* time 0 h, the CD spectrum of PA showed a minimum around 218 nm, indicative of a β -sheet-rich conformation, while the CD spectrum of PA-M2e indicated a random coil conformation, which progressively shifted into β -sheet signal upon 96 h incubation (Fig. 2.2A, Fig. S2.9). Thus, the presence of the M2e antigen at the C-terminus of PA slowed down

self-assembly in β -sheet-rich conformation. According to CD analyses (Fig. S2.9), PA-M2e self-assembly reached equilibrium after 96 h and this incubation time was selected to prepare the nanovaccine. Both peptides were characterized by a decrease in ANS fluorescence upon 96 h incubation (Fig. 2.2B). ANS is a probe that emits fluorescence upon binding to hydrophobic interfaces, although it tends to remain on the surface of nanostructures without penetrating their core (Liu, X. *et al.*, 2013). Thus, the decrease in the ANS signal during assembly could be associated with the fact that the hydrophobic tails are becoming more buried into the micelles upon elongation. The formation of the cross- β -sheet quaternary structure involving the V₃A₃ region was analyzed using ThT fluorescence. This benzothiazole dye shows a significant increase in its fluorescence quantum yield upon binding to cross- β -sheet quaternary structures (Naiki *et al.*, 1989; Sebastiao *et al.*, 2017). For both peptides, an increase in the ThT fluorescence signal was recorded between time 0 and 96 h of incubation, indicative of the formation of cross- β organization during assembly (Fig. 2.2C). The accessibility of the M2e epitope on the surface of the filament was evaluated by ELISA. Results showed that the ELISA signal of the cylindrical micellar assemblies was comparable to the signal observed for the soluble M2e peptide, indicating high accessibility of the antigen on the PA-M2e assemblies (Fig. 2.2D). The nanostructures obtained after 96 h incubation were observed by transmission electron microscopy (TEM) (Fig. 2.2E) and atomic force microscopy (AFM) (Fig. S2.10). The obtained images confirmed the formation of long and unbranched filaments, as cylindrical micelles previously reported (Hartgerink *et al.*, 2001, 2002), with the addition of the M2e epitope not affecting significantly the morphology nor the size of the nanostructures (Fig. 2.2E). In fact, quantification and distribution of length of the filaments from AFM images revealed a similar average length for both peptide assemblies, with an average of 0.472 $\pm$ 0.021 μ m for PA-M2e and of 0.419 $\pm$ 0.023 μ m for PA (Figure S2.10).

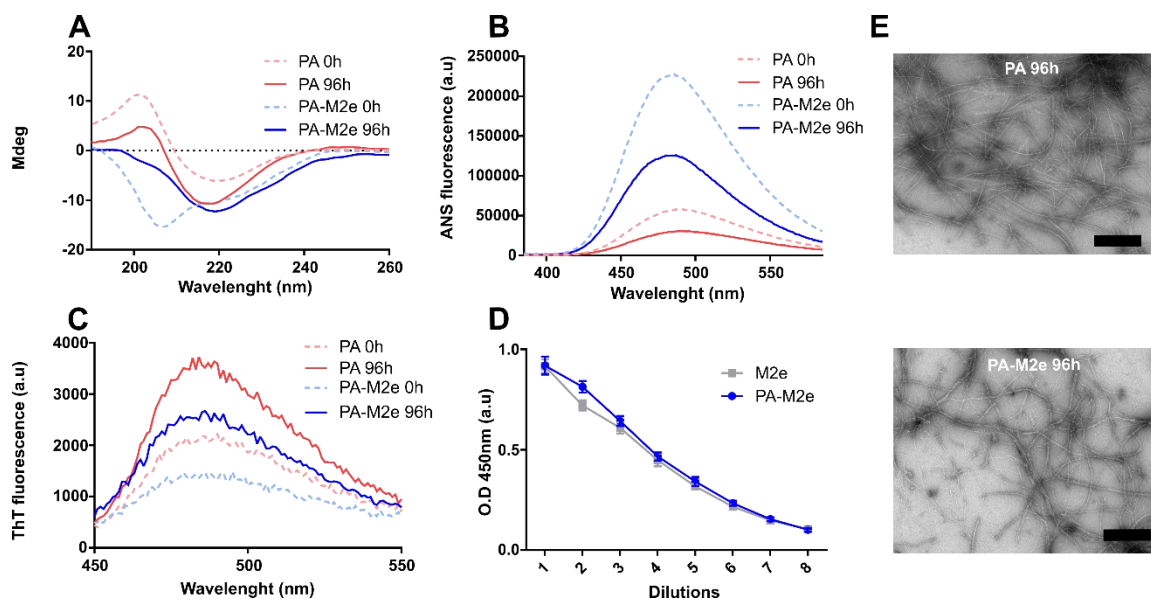


Figure 2.2 : Self-assembly of amphiphilic β -peptides

(A) CD spectra of peptide solutions. (B) ANS fluorescence spectra of peptide solutions. (C) ThT fluorescence spectra of peptide solutions. (A,B,C) Analysis was performed immediately after resuspension (time = 0 h; dotted line) and after 96 h of incubation at room temperature under constant rotary agitation. (D) Accessibility of the M2e epitope on PA-M2e assemblies by indirect ELISA. (E) Representative negative-stain TEM images of PA and PA-M2e after 96 h incubation under constant rotary agitation. Scale bar is 500 nm.

2.6.2 Cytocompatible M2e-conjugated filaments are uptaken by dendritic cells and activate the heterodimeric TLR2/TLR6

Micellar filaments assembled from C16V3A3K3 amphiphilic peptides are known for their high biocompatibility, prompting their usage for different biomedical applications (Singh *et al.*, 2024). Nonetheless, before moving forward with mice immunization, we evaluated if the addition of the M2e peptide did not lead to unexpected cytotoxicity. The dendritic cells DC2.4 were incubated with increasing concentrations of pre-assembled micellar assemblies for 16 h, and metabolic activity was assessed by resazurin reduction. PA-M2e assemblies did not significantly decrease cell viability, even at the highest concentration evaluated, *i.e.* 100 μ M (Fig 2.3A). Live-dead cell

assay using confocal microscopy further confirmed the biocompatibility of PA-M2e assemblies upon treatment dendritic cells (Fig 2.3B).

Dendritic cells play a critical role in bridging innate and adaptive immunity and are important antigen-presenting cells (APCs) associated with the establishment of immunological memory (Cabeza-Cabrerizo *et al.*, 2021). Thus, uptake of antigens by dendritic cells constitutes a key step in the formation of a robust and long-lasting immune response. Accordingly, we evaluated internalization of cylindrical micelles decorated with the M2e peptide by dendritic cells by confocal fluorescence microscopy and flow cytometry. Fluorescent cylindrical micelles were obtained by co-assembling fluorescently labelled PA-M2e peptide (0.05 eq.) with unlabelled PA-M2e, leading to the formation of unbranched filaments (Fig. S2.10). Dendritic cells were incubated for 4 h in presence of fluorescent PA-M2e assemblies and confocal microscopy imaging revealed green fluorescence puncta within the cytoplasm (Fig. 2.3C). In sharp contrast, no significant fluorescence could be detected within dendritic cells after treatment with an equivalent molar amount of soluble M2e labeled with the Alexa488 fluorophore. Internalization by DC.2.4 cells was further evaluated by flow cytometry, and the results confirmed that the M2e-functionalized assemblies were significantly more internalized compared to their monomeric counterpart (Fig. 2.3D). As previously reported for cross- β -sheet fibrils (Al-Halifa *et al.*, 2020; Bricha *et al.*, 2023; Lamontagne *et al.*, 2023) and spherical amphiphilic micelles (Trent *et al.*, 2015; Wen, Y. et Collier, 2015), peptide nanostructures can activate receptors of the innate immune systems, notably the heterodimeric TLR2/TLR6 membrane receptor. Accordingly, we evaluated the activation of TLR2/TLR6 by PA-M2e assemblies using the HEK-Blue hTLR2-TLR6 cells, which express TLR2-TLR6 along with an NF- κ B-inducible SEAP reporter gene. Results showed that pre-

assembled PA-M2e filaments activated the hTLR2-6 signaling pathway in a concentration-dependent manner, while the soluble M2e peptide did not lead to NF- κ B activation (Fig. 2.3E).

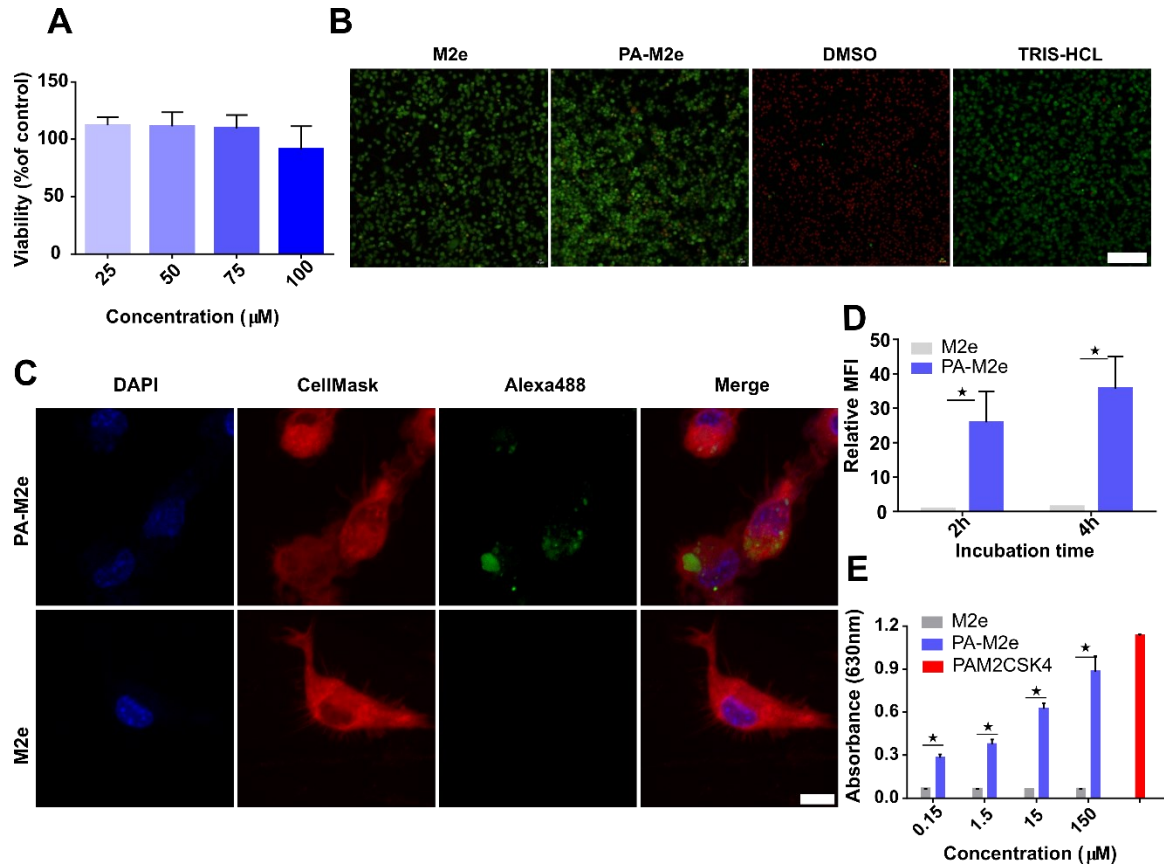


Figure 2.3 : Biological characterization of M2e-PA amphiphilic peptide filaments

(A) Viability of DC2.4 cells after treatment with peptide. Cells were exposed to cylindrical micelles for 16 h, and metabolic activity was assessed by resazurin reduction. (B) Representative fluorescence microscopy images showing the distribution of live (green) and dead (red) DC2.4 cells after treatment with 100 μ M peptide assemblies for 16 h. Scale bar is 100 μ m (C) Representative confocal microscopy images of DC2.4 cells respectively incubated with 100 μ M of Alexa488-labeled assemblies and molar equivalent of monomeric labelled M2e for 4 h at 37°C. Scale bar is 10 μ m. (D) Mean fluorescence intensity (MFI) of DC2.4 cells incubated for 2 and 4 h with 100 μ M of Alexa488-labeled assemblies or molar equivalent of monomeric M2e. MFI values are expressed relative to PBS-treated cells. Statistical significance was determined by multiple t-test (* $P < 0.05$; **** $P < 0.0001$). (E) Activation of TLR2-TLR6 by PA-M2e assemblies. HEK-Blue cells expressing the hTLR2-TLR6 were incubated with nanofilaments for 16 h, and activation was measured using the SEAP reporter. Statistical significance was assessed by multiple t-test (* $P < 0.05$)

2.6.3 PA-M2e cylindrical micelles induce a robust antigen-specific response in mice

After confirming that the PA-M2e peptide assembles into biocompatible filamentous nanostructures displaying the M2e antigen on their surface, we evaluated the M2e-specific humoral response and the potential protection against an experimental viral challenge in mice. Female BALB/c mice were immunized three times intramuscularly at 14-day intervals, and sera were collected one day before each immunization (Fig 2.4A). Upon immunization, none of the mice experienced weight loss or developed any noticeable clinical sign (data not shown), indicative of the innocuity of the vaccine formulation. Sera from mice immunized with the soluble M2e antigen revealed no M2e-specific IgG antibodies, even after the second boost (Fig. 2.4B), consistent with the low immunogenicity of soluble peptides (Deng *et al.*, 2015). In contrast, after the second immunization, all PA-M2e immunized mice produced high level of anti-M2e IgG. Notably, two mice immunized with PA-M2e filaments showed significant level of M2e-specific antibodies after the primary immunization. Second boost further increased the M2e-specific antigen response, raising the average antibody titer up to 16 log₂ (Fig. 2.4B). Moreover, mice immunized with the PA-M2e assemblies produced significant levels of M2e-specific IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 isotypes (Fig. 2.4C), suggesting a balanced Th1/Th2 immune response (Hovden *et al.*, 2005; Huber *et al.*, 2006).

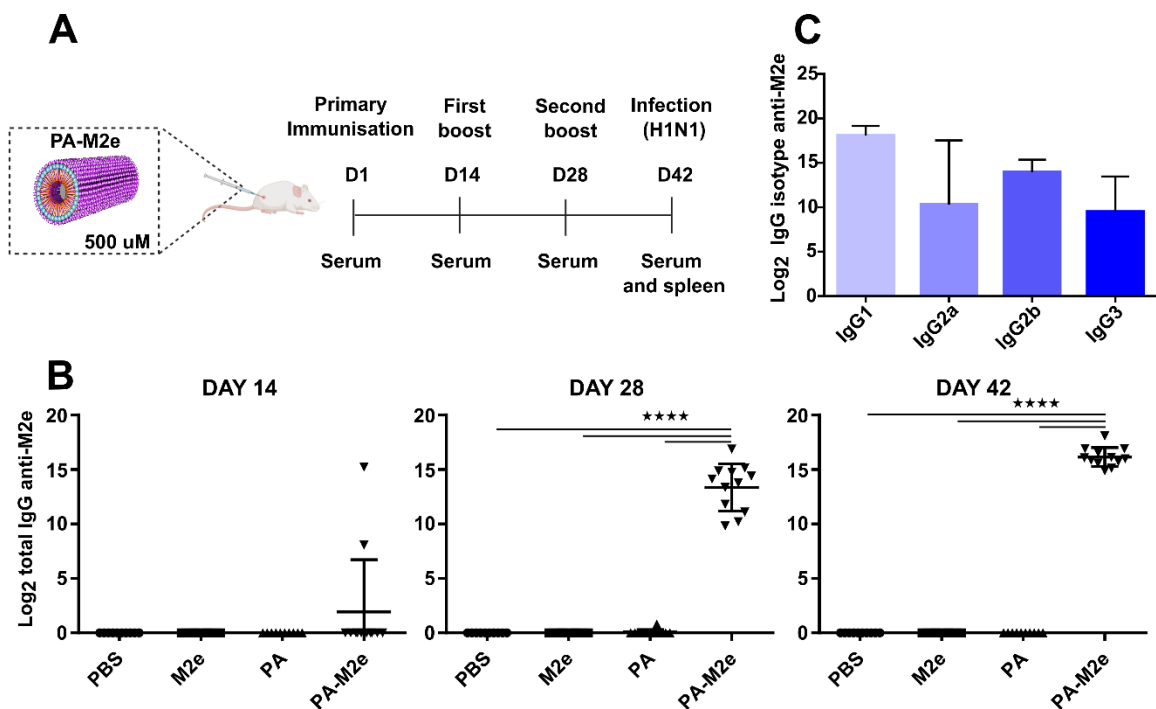


Figure 2.4 : Cylindric micelles induce a robust production of antigen-specific antibodies upon mice immunization

(A) Immunization, sampling, and infection schedule in mice. (B) Total IgG titers from mouse serum after the first, second, and third immunization, measured by indirect anti-M2e ELISA. (C) Serum IgG isotypes determined by indirect ELISA. Data represent the mean $\pm$ S.E.M. and statistical significance between groups was assessed using one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test (**** $P < 0.0001$).

Despite a robust and balanced antigen-specific humoral response in mice immunized with PA-M2e in absence of supplemented adjuvant, none of them survived to a lethal infection with $5 \times LD_{50}$ of influenza A H1N1 virus (Fig. 2.5). These results contrast with observations reported in the literature, where several antigen delivery nanoplatforms demonstrated protection in immunized mice against fatal influenza infections via an M2e-specific immune response (Bricha *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2020). This absence of protection was unexpected, considering that previous studies have indicated that a robust M2e-specific humoral response is sufficient to provide protection, at

least partial, to H1N1 infection (El Bakkouri *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2023). It is known that IgG2a antibodies play a crucial role in inducing ADCC and/or ADCP mechanisms, which are essential for anti-M2e protection (El Bakkouri *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2023; Van den Hoecke *et al.*, 2017). Our results revealed lower IgG2a production compared to IgG1 and IgG2b, which could explain the lack of observed protection. Nevertheless, an in-depth evaluation of the ability of IgG2a, induced against the PA-M2e nanovaccine, to trigger ADCC and ADCP mechanisms would be critical.

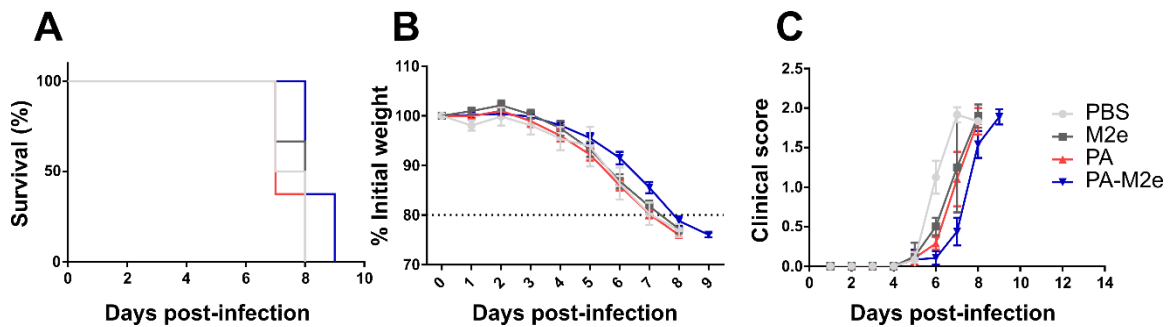


Figure 2.5 : Intramuscular immunization with of PA-M2e assemblies does not protect mice against influenza A virus

(A) Survival, (B) weight loss and (C) clinical score of immunized mice following infection with $5 \times LD_{50}$ of influenza A/Puerto Rico/8/1934 virus.

Considering that cytotoxic T cells also play an important role in combating influenza virus infection (Van den Hoecke *et al.*, 2017; Zykova *et al.*, 2022), we characterized activated lymphocyte populations in the spleen of immunized mice by exposing isolated splenocytes to the M2e antigen and measuring production of IFN- γ and IL-4. Using ELISpot, PA-M2e-immunized mice did not produce significantly more splenocytes secreting IFN- γ or IL-4 than mice that received the control PBS vehicle alone (Fig. S2.11, Fig. S2.12). These observations indicate the absence of M2e-responsive T cells in the spleen of immunized mice, which could possibly explain the lack of

protection observed despite high levels of anti-M2e antibodies. The mechanisms underlying M2e-mediated protection appear to be diverse. For instance, it has been demonstrated that the presence of Th17 cells and alveolar macrophages alone can protect against lethal influenza infections, even in the absence of a humoral response (Eliasson *et al.*, 2018). Further analysis to characterize the presence and activation of these cells in response to the M2e antigen, particularly through the secretion of specific cytokines, could help clarify the unexpected results of this study.

2.7 Conclusion

Herein, we reported that nanostructures assembled from the amphiphilic β -peptide C16V3A3K3 constitute interesting candidate as antigen delivery nanoplatforms due to high biocompatibility, ability to be functionalized with peptide epitopes, intrinsic immunostimulatory properties, and capacity to promote a robust antigen-specific systemic humoral response in mice. It is noteworthy that the isotype profile of the humoral response obtained by immunizing mice with PA-M2e was strong and diverse, with the presence of IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3. However, this robust and balanced humoral response was not sufficient to protect immunized mice infected with $5 \times \text{LD}_{50}$ of the H1N1 influenza virus. Notably, data regarding the results on the cellular response profile following immunization showed an absence of cellular immunity, which could explain the lack of protection against an experimental challenge. Further studies will be needed to better characterize the immune responses following immunization with PA-M2e and to clarify the mechanisms leading to immunological protection. Moreover, as the length, and size of the antigen delivery nanosystems are known to affect significantly the immune responses (Zottig *et al.*, 2020), it will be critical to further investigate how the macroscopic heterogeneity of the cylindrical micelle formulation affect its immunogenicity. The elucidation of the relationships between the length of the peptide nanofilaments and their immunomodulatory properties remains particularly important.

Although this study did not demonstrate protection against influenza infection, antigen-specific antibodies remain key effectors in combating many infectious agents, such as rotavirus causing neonatal diarrhea (Ward, R. L., 1996) and human respiratory syncytial virus (Galvez *et al.*, 2020). The nanostructures based on amphiphilic β -peptides described here remains promising for vaccine applications. Moreover, fully synthetic peptide nanoplateforms offer notable advantages, including stability, versatility and biocompatibility. It would be feasible to co-assemble two modified versions of PA, one carrying the M2e antigen and the other an adjuvant such as CpG, known for inducing a strong cellular response (Bricha *et al.*, 2023; Kocabas *et al.*, 2020). Such an approach could stimulate a robust humoral and cellular immune responses, thereby providing effective protection against the influenza A virus.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to D. A. and S.B. We thank Philippe St-Louis and Marie-Jeanne Archambault for their technical support and helpful discussions.

2.8 Supporting information

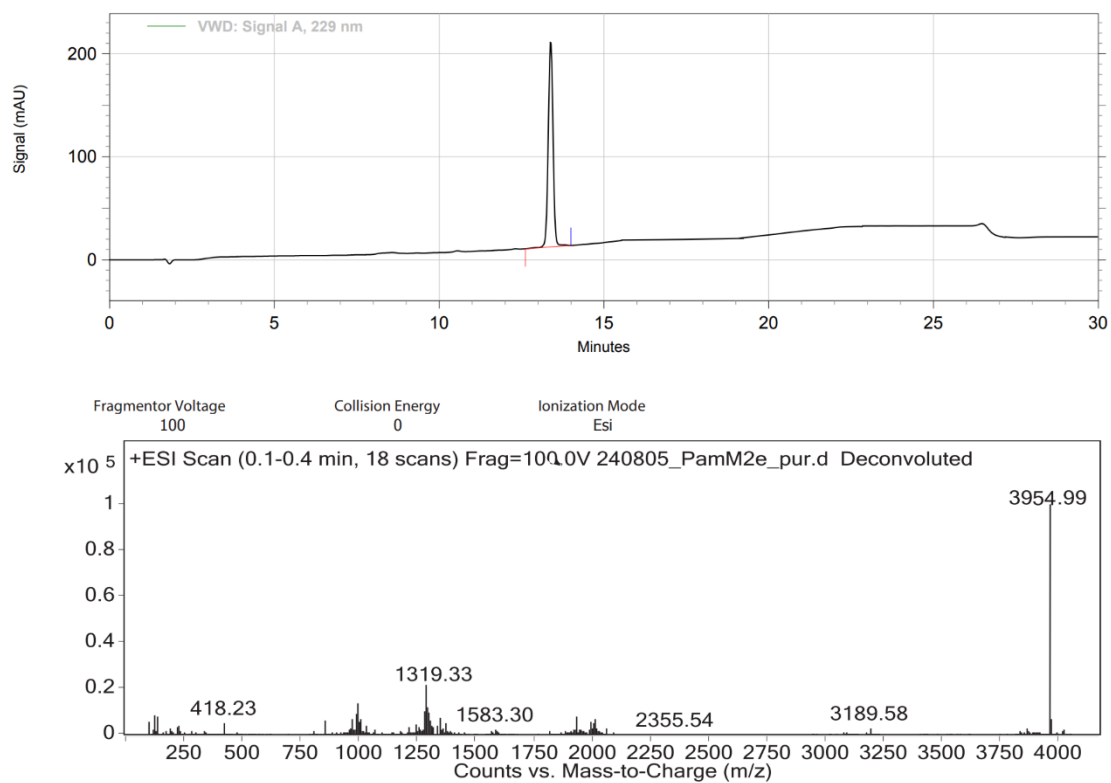


Figure 2.6 HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of PA-M2e.

HPLC analysis was performed using a C18 column with a linear gradient of 20% to 60% acetonitrile in H₂O/TFA (0.06%) over 20 minutes, while absorbance was monitored at 229 nm. Mass spectrometric analysis was conducted using an ESI-TOF mass spectrometer.

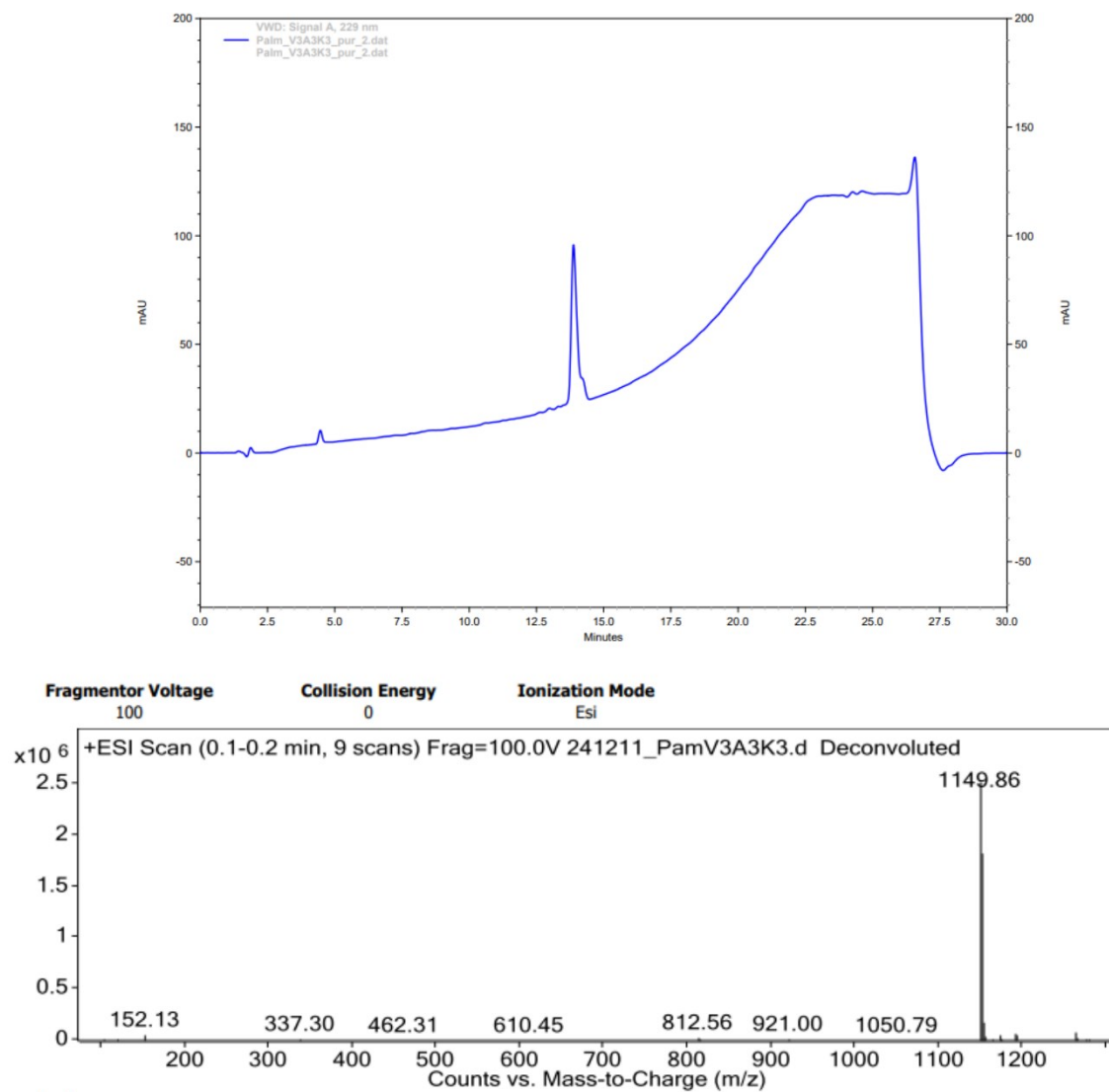


Figure 2.7 HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of PA.

HPLC analysis was performed using a C18 column with a linear gradient of 20% to 60% acetonitrile in H₂O/TFA (0.06%) over 20 minutes, while absorbance was monitored at 229 nm. Mass spectrometric analysis was conducted using an ESI-TOF mass spectrometer.

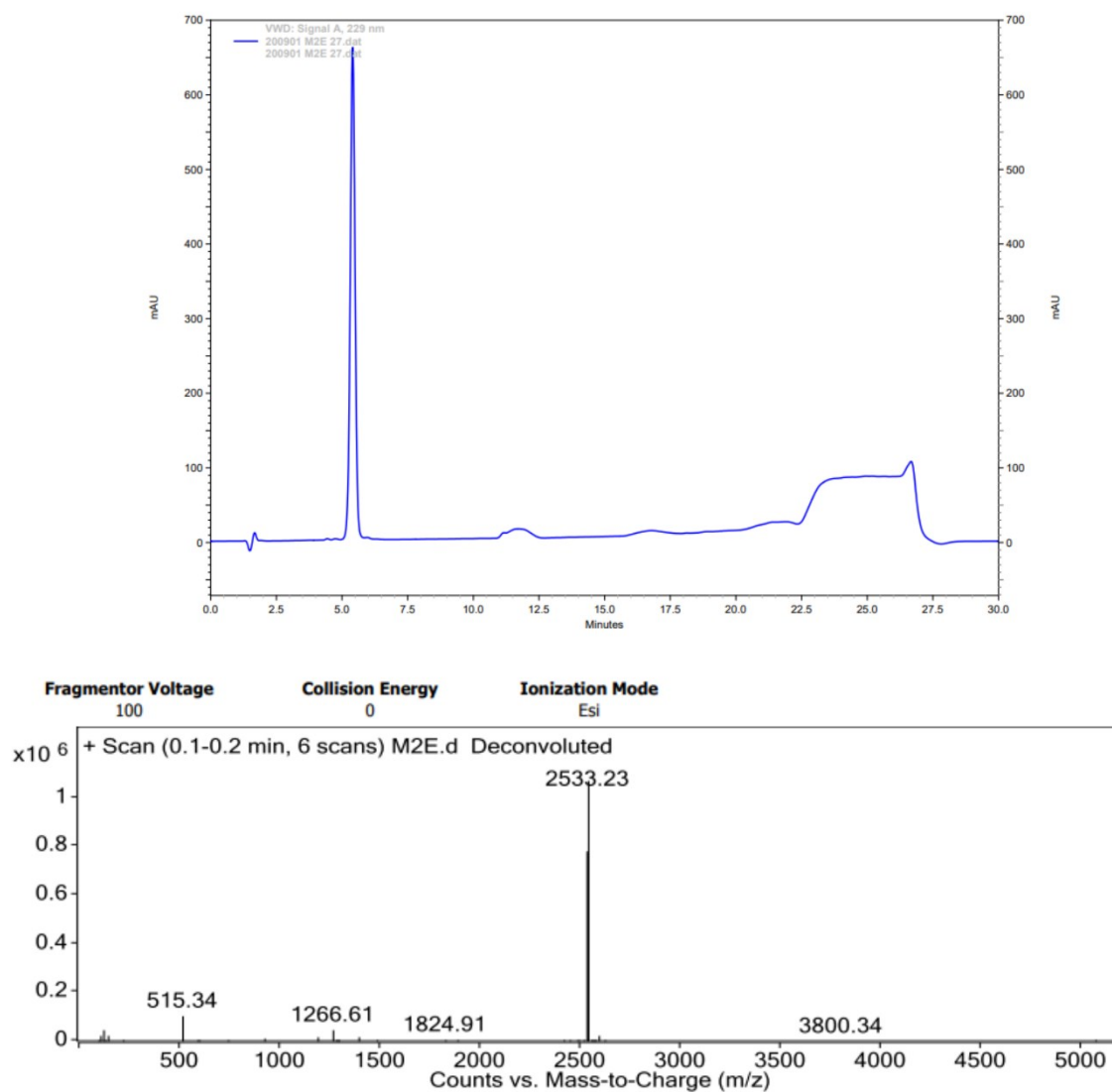


Figure 2.8 HPLC chromatogram and MS-TOF spectra of M2e.

HPLC analysis was performed using a C18 column with a linear gradient of 20% to 60% acetonitrile in H₂O/TFA (0.06%) over 20 minutes, while absorbance was monitored at 229 nm. Mass spectrometric analysis was conducted using an ESI-TOF mass spectrometer.

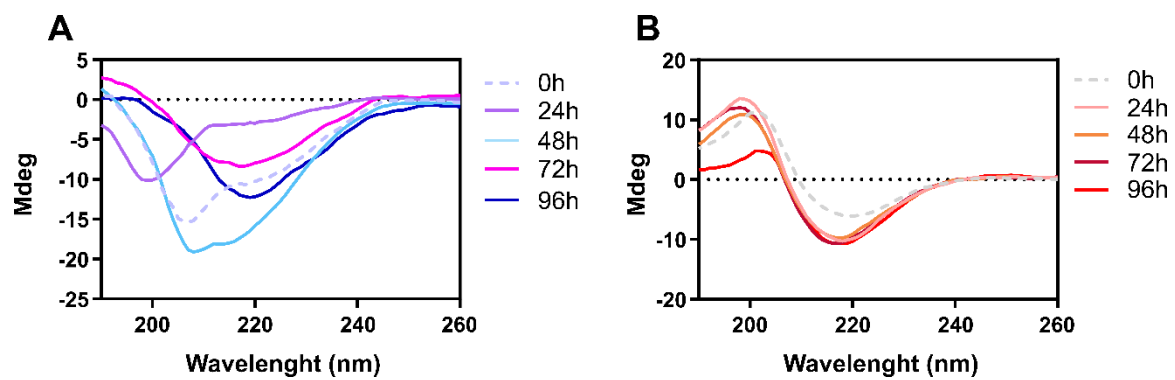


Figure 2.9 Spectre CD of PA-M2e (A) and PA (B)

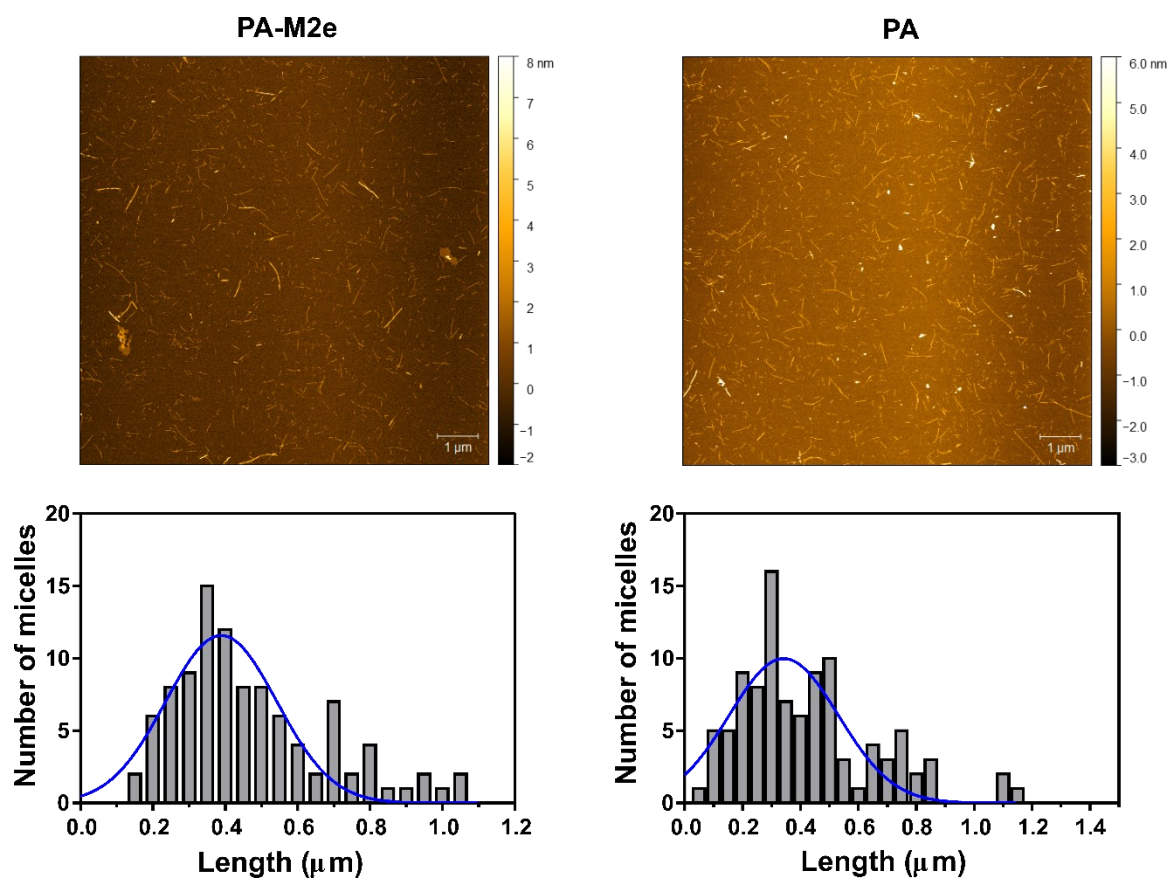


Figure 2.10 Representative of atomic force microscopy and size distribution of PA-M2e and PA. Assemblies were obtained after 96h RT incubation under constant agitation. Scale bar is 1 μm .

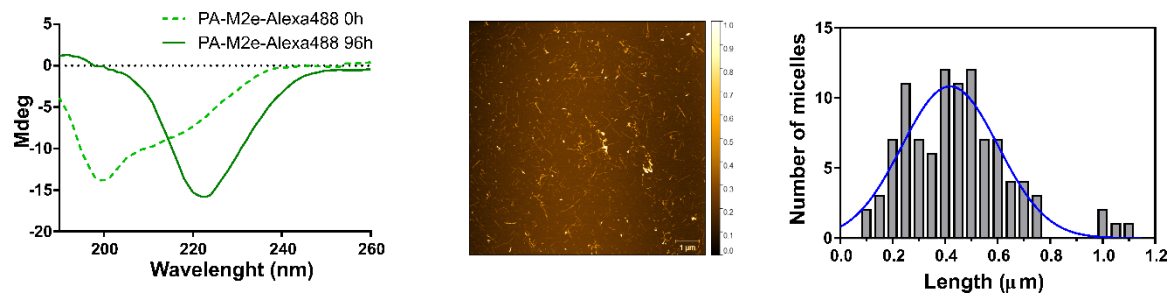


Figure 2.11 Spectre CD and representative of atomic force microscopy and size distribution of PA-M2e-alexa488.

Assemblies were obtained after 96h RT incubation under constant agitation. Scale bar is 1 μm.

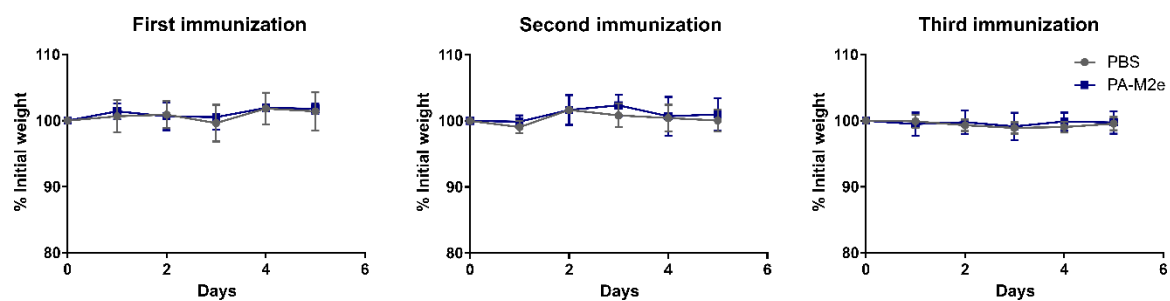


Figure 2.12 Followed the weight of the mice after each immunization with PA-M2e

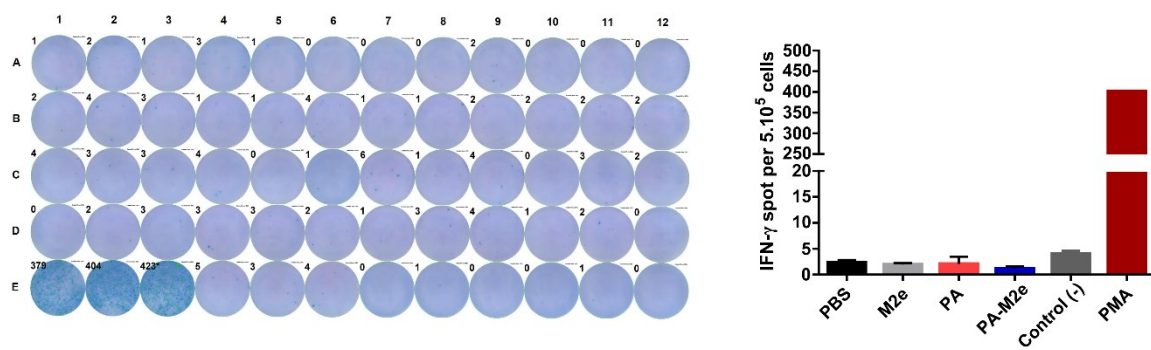


Figure 2.13 ELISpot IFN- γ .

ELISpot analysis of IFN γ from ex vivo splenocytes stimulated for 36 h with 2 μ g of M2e peptide.

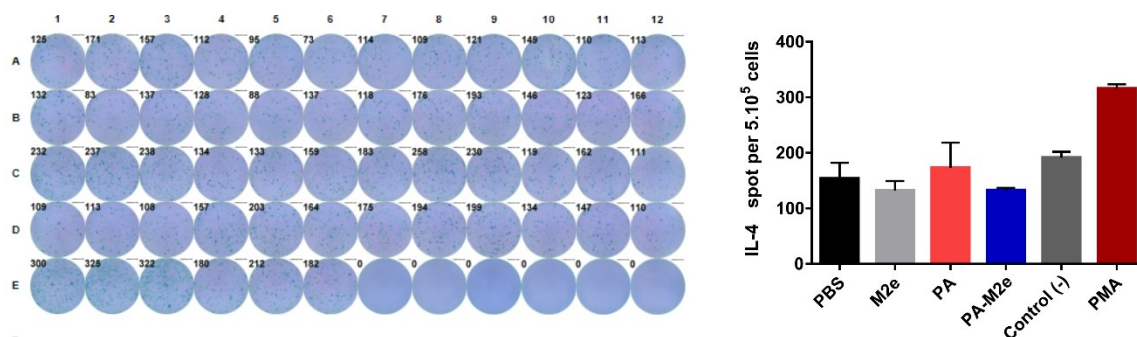


Figure 2.14 ELISpot IL-4.

ELISpot analysis of IL-4 from ex vivo splenocytes stimulated for 36 h with 2 µg of M2e peptide.

Tableau 2.1 Scale for clinical symptoms of influenza infection

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

CHAPITRE 3

DISCUSSION

La vaccination constitue l'une des avancées médicales les plus importantes et efficaces de l'histoire, ayant permis de réduire considérablement la prévalence, la morbidité et la mortalité associées à de nombreuses maladies infectieuses. Cependant, certaines maladies restent à ce jour sans vaccins efficaces pour prévenir l'infection et/ou les symptômes de la maladie. Notamment, cette limite peut être associée à la variation antigénique des virus, tel que pour le virus influenza, obligeant les chercheurs à reformuler les vaccins chaque année. L'utilisation d'antigènes conservés comme l'ectodomaine de la protéine M offre une piste prometteuse pour développer un vaccin offrant une protection élargie contre différents sous-types de virus grippaux. Néanmoins, l'antigène M2e est moins immunogène que d'autres antigènes, comme l'hémagglutinine. En conséquence, il devient nécessaire d'utiliser une plateforme de présentation antigénique et un adjuvant pour renforcer la réponse immunitaire contre l'épitope M2e. L'utilisation de β -peptides amphiphiles, capables de s'auto-assembler en micelles cylindriques présentant l'antigène à leur surface et capables d'activer les voies de signalisation immunitaire via les récepteurs TLR2, représente une stratégie intéressante. L'objectif principal de ce projet de maîtrise était ainsi d'évaluer les assemblages micellaires formés à partir de PA comme plateforme de présentation antigénique, en utilisant l'antigène M2e du virus de l'influenza comme modèle.

3.1 Synthèse et caractérisation des assemblages micellaires PA-M2e

Les résultats obtenus par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ont confirmé la pureté de la solution peptidique obtenue suite à la synthèse et aux étapes de purification. De plus, les analyses par spectrométrie de masse (MS) ont validé que le peptide purifié correspondait bien au peptide d'intérêt, PA-M2e. L'assemblage de PA-M2e a ensuite été confirmé après 96 heures d'agitation dans un tampon Tris-NaCl à l'aide de diverses méthodes : spectroscopie CD, spectrophotométrie (ThT, ANS) et microscopie (AFM et TEM). Ces résultats ont montré que l'ajout de l'épitope M2e à l'extrémité C-terminale n'empêchait pas l'autoassemblage du PA-M2e en micelles cylindriques. Cependant, des analyses similaires réalisées avec les assemblages de PA seuls ont révélé que les micelles cylindriques se formaient dans les premières heures d'assemblage. Ainsi, l'ajout de l'épitope M2e ralentit la cinétique d'assemblage des PA en micelles cylindriques.

Par ailleurs, l'analyse par la méthode ELISA a permis d'évaluer l'accessibilité de l'antigène M2e à la surface des micelles cylindriques. Les résultats ont montré que l'antigène M2e exposé sur les assemblages était aussi accessible pour les anticorps que le M2e sous forme soluble.

Malgré les informations détaillées obtenues grâce aux techniques utilisées (CD, ThT, ANS, AFM, TEM et ELISA), certaines limites persistent dans la caractérisation des micelles cylindriques et de la présentation antigénique. Par exemple, bien que l'ELISA confirme l'accessibilité de l'antigène à la surface des micelles, cette technique ne fournit pas d'informations précises sur la densité d'exposition de l'antigène ni sur la cinétique d'interaction entre M2e et les anticorps anti-M2e. L'intégration de techniques complémentaires, telles que la résonance plasmonique de surface (SPR) pourrait permettre de mesurer les constantes d'association et de dissociation entre les anticorps anti-M2e et les antigènes M2e présents à la surface des micelles, fournissant ainsi des données précieuses sur l'affinité et la stabilité de cette interaction (Khurana *et al.*, 2014; Narayan *et al.*, 2023). Ces résultats pourraient ensuite être comparés à d'autres systèmes de présentation antigénique, tels que des nanoparticules d'or ou d'autres assemblages peptidiques, comme le M2e-I10 (Bricha *et al.*, 2023), pour mieux évaluer l'effet de la densité de surface sur l'accessibilité des antigènes sur ces plateformes. D'autres part, l'utilisation de la microscopie électronique cryogénique (Cryo-TEM) offrirait une observation des micelles dans leur état natif et hydraté, apportant une validation supplémentaire de leur morphologie cylindrique tout en permettant une évaluation plus fine de leur homogénéité structurale (Kuntsche *et al.*, 2011). La combinaison de ces approches améliorerait significativement notre compréhension des propriétés physicochimiques et structurales de cette nouvelle plateforme vaccinale.

3.2 Les assemblages micellaires PA-M2e sont biocompatibles et activent les voies immunitaires innées dans des systèmes *in vitro*

Lors de l'élaboration d'un vaccin, l'une des caractéristiques primordiales à respecter est l'innocuité, particulièrement lorsque l'on parle de plateforme assemblée en feuillets- β -croisés, étant proches des structures amyloïdes associées parfois à une toxicité. Dans ce contexte, des tests de biocompatibilités *in vitro* ont été mis en place pour s'assurer de l'innocuité des assemblages micellaires. Les tests ont révélé une viabilité cellulaire proche de 100% pour les cellules exposées aux micelles PA-M2e. Néanmoins bien que notre étude rapporte une viabilité cellulaire proche de 100 % lors des tests *in vitro*, cela n'élimine pas la possibilité d'effets indésirables à long terme.

L'accumulation des micelles PA-M2e dans certains tissus ou organes pourrait conduire à une toxicité sur une période prolongée, en particulier si les micelles ne sont pas entièrement dégradées et éliminées de l'organisme, ou si leurs sous-produits sont nocifs (Chung *et al.*, 2015). Par ailleurs, des réponses immunitaires aberrantes, comme une inflammation chronique ou une auto-immunité, pourraient survenir en cas d'exposition prolongée. Cela pourrait être évalué via l'analyse du niveau d'expression systémique de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ et le TNF- α (Gherardi *et al.*, 2019; Hirsiger *et al.*, 2021). Ces aspects ne peuvent être évalués qu'à travers des études de longue durée chez l'animal, incluant des analyses détaillées de la biodistribution et de la cinétique d'élimination des micelles (Chung *et al.*, 2015). En l'absence de ces données, il demeure difficile d'assurer que cette plateforme vaccinale soit suffisamment sécuritaire pour une utilisation clinique, tant chez les animaux que chez l'humain. Néanmoins, les études existantes indiquent que les PA, lorsqu'ils sont utilisés pour la délivrance de peptides thérapeutiques, présentent une toxicité minimale (Chen, J. et Zou, 2019; Fuertes-Llanos *et al.*, 2024). Ces résultats suggèrent que l'utilisation de micelles cylindriques pour présenter des antigènes, est une approche sûre avec un risque d'effets secondaires réduit.

Les cellules de la lignée cellulaire HEK-hTLR2/TLR6, qui ont été génétiquement modifiées pour exprimer les récepteurs TLR2 et TLR6 humains, ont été utilisées pour évaluer l'activation de ces TLR par les assemblages micellaires PA-M2e. Dans ces cellules l'activation du TLR2/TLR6 permet le recrutement de la protéine MyD88 qui déclenche une cascade de signalisation jusqu'à l'activation du facteur de transcription NF- κ B/AP1 (Rosenberg *et al.*, 2010). Un gène rapporteur est placé sous le contrôle du promoteur NF- κ B/AP1, ce qui permet d'observer l'activation des récepteurs TLR (Rosenberg *et al.*, 2010). Ainsi il a été possible d'observer que les constructions micellaires de PA-M2e activaient les TLR2/TLR6 et ce, de manière dépendante de la concentration d'assemblage dans le milieu. Les assemblages micellaires de PA-M2e peuvent donc être considérés comme étant des plateformes de livraison antigénique auto-adjuvantes.

L'un des mécanismes clés dans le démarrage de la réponse adaptative est l'internalisation de l'antigène par les CPA. Pour évaluer l'amélioration de l'internalisation par les CPA que les constructions micellaires apportent, nous avons étiqueté nos assemblages avec un fluorophore, l'Alexa488, afin de pouvoir déterminer leur internalisation par des cellules dendritiques via cytométrie et microscopie à fluorescence. Les résultats obtenus par ces deux méthodes ont montré

une internalisation bien supérieure pour les assemblages PA-M2e comparativement à l'antigène M2e soluble seul. L'augmentation de l'internalisation peut être due à la capacité intrinsèque qu'ont les micelles PA-M2e à activer les TLR2/TLR6. Effectivement l'activation des récepteurs TLR2/6 peut augmenter l'internalisation chez les cellules dendritiques en facilitant leur activation et leur maturation (Uehori *et al.*, 2005). Il est également possible que la taille des assemblages micellaire ait participé à l'augmentation de l'internalisation. Plusieurs études ont prouvé qu'une taille supérieure à 20 nm permettait une augmentation de l'internalisation des plateformes de présentation antigénique par les CPA (Reddy *et al.*, 2006; Taki et Smooker, 2015).

Les tests rapportés ici se concentrent sur les cellules dendritiques, ce qui limite la compréhension globale de la réponse immunitaire et biologique. Les cellules dendritiques sont certes des acteurs clés de l'initiation de la réponse adaptative, mais elles ne représentent qu'une partie du paysage immunitaire. D'autres CPA, comme les macrophages et les lymphocytes B, pourraient réagir différemment aux micelles PA-M2e. Ces différences pourraient influencer la nature de la réponse immunitaire et des réactions biologiques. Par exemple, les macrophages peuvent activer des voies immunitaires différentes des cellules dendritiques (Giacomini *et al.*, 2001) et il en va de même pour les lymphocytes B (Barr *et al.*, 2007). Étudier l'internalisation ainsi que la toxicité de PA-M2e sur un spectre plus large de CPA permettrait d'élargir la compréhension des mécanismes immunitaires déclenchés par les micelles PA-M2e et de s'assurer de leur biocompatibilité.

Les tests de biocompatibilité, d'activation des TLR2/TLR6 et d'internalisation ont été réalisés exclusivement *in vitro*, dans un environnement simplifié qui ne reflète pas les interactions complexes d'un organisme vivant. En effet, les conditions physiologiques *in vivo* impliquent des facteurs tels que la biodistribution, l'élimination par le système immunitaire, et la variabilité des réponses biologiques entre les tissus et les espèces (Baxter *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2018). Ceci pourrait avoir un impact sur la toxicité ainsi que sur l'activation des voies immunitaires.

3.3 Les assemblages PA-M2e stimulent une réponse humorale forte mais n'offre pas de protection aux souris face à une infection grippale mortelle

L'administration des assemblages micellaires PA-M2e aux souris Balb/c à trois reprises par voie intramusculaire n'a engendré aucune variation significative de poids. Cette observation suggère une innocuité potentielle de nos constructions micellaires. Néanmoins, comme mentionné

précédemment, l'administration de vaccin, spécifiquement lorsque ces derniers peuvent activer des PRR tel que les TLR, n'est jamais sans risque et peut mener à des réactions inflammatoires exacerbées (Bricha *et al.*, 2023). L'évaluation de la réponse inflammatoire durant les 24 premières heures après l'immunisation par le dosage des cytokines IL-6 et TNF- α dans le sérum des souris aurait pu nous permettre d'évaluer de manière plus précise la sécurité de nos assemblages en tant que plateforme vaccinale (Cote-Cyr *et al.*, 2022).

L'administration aux souris des plateformes vaccinales PA-M2e a induit la production de niveaux d'anticorps spécifiques à l'antigène M2e significativement supérieurs à l'antigène M2e soluble. De plus, les souris immunisées avec PA-M2e ont produit un spectre varié d'anticorps, avec la présence des isotypes IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3. Il est important de noter que la production d'IgG1 est généralement rattaché à une réponse Th2, tandis que la production de IgG2a, IgG2b et IgG3 est associé à une réponse Th1. Ces résultats suggèrent que la plateforme vaccinale PA-M2e permet l'induction d'une réponse humorale anti-M2e chez la souris, et que cela pouvait être partiellement dû aux caractéristiques auto-adjuvantes de la plateforme.

Après avoir été immunisées, les souris ont été soumises à une infection virale expérimentale avec $5 \times \text{LD}_{50}$ du virus influenza H1N1. Malheureusement aucune souris n'a survécu suite à l'infection. Il en va de même pour les souris immunisées avec la plateforme PA-M2e qui ont également obtenu un taux de survie de 0%. Les réponses immunitaires obtenues grâce à l'immunisation de PA-M2e n'ont donc pas permis d'offrir une protection face à une infection mortelle du virus influenza. Ces résultats diffèrent des données publiées dans la littérature, où des plateformes de présentation antigénique ont montré une efficacité protectrice chez des souris immunisées contre des infections grippales mortelles grâce à une réponse immunitaire ciblant M2e (Bricha *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2020).

Les cellules T cytotoxiques jouent un rôle essentiel dans la défense contre le virus de la grippe (Van den Hoecke *et al.*, 2017; Zykova *et al.*, 2022). Pour évaluer leur implication dans la réponse immunitaire des souris immunisées, nous avons examiné l'activation des lymphocytes de la rate, soit les splénocytes, à une exposition à l'antigène M2e. Les splénocytes isolés ont été exposés à M2e et la sécrétion de cytokines IFN- γ et IL-4 a été mesurée par ELISpot. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent être classés en sous-populations Th1 et Th2 en fonction de leur profil de production

de cytokines. Les cellules Th1 produisent principalement de l'IFN- γ , tandis que les cellules Th2 produisent de l'IL-4 une fois activé (Elson *et al.*, 1995). Nos analyses montrent que les souris immunisées avec PA-M2e n'ont pas produit de splénocytes sécrétant significativement plus d'IFN- γ ou d'IL-4 que les souris témoins ayant reçu uniquement la plateforme sans M2e (Fig. S2.11 et S2.12). Ces résultats révèlent l'absence de cellules T spécifiques de M2e dans la rate des souris immunisées, ce qui pourrait expliquer pourquoi ces souris ne bénéficient d'aucune protection, en dépit de niveaux élevés d'anticorps anti-M2e.

Bien qu'aucune réponse cellulaire significative ne fût observée via la récupération des splénocytes, il n'est pas à exclure qu'une réponse cellulaire ait pu s'opérer au niveau d'organe lymphoïde secondaire autre, tel que les ganglions lymphatiques. L'analyse des populations cellulaires et des cytokines sécrétées au sein des ganglions lymphatiques aurait permis de mieux définir la réponse cellulaire réelle provoquée chez les souris immunisées. De plus il est important de noter qu'il est possible qu'une réponse humorale indépendante des lymphocytes T se fasse. Effectivement les cellules B peuvent produire des anticorps sans l'aide des cellules T. La réponse humorale indépendante des lymphocytes T permet une production rapide d'anticorps en réponse à des pathogènes, en utilisant des mécanismes qui impliquent la signalisation des récepteurs des cellules B, l'activation par les TLR, et le soutien du système immunitaire inné (Fagarasan et Honjo, 2000; Snapper et Mond, 1996). Ce qui pourrait expliquer la présence d'une réponse humorale sans l'observation de réponse cellulaire significativement plus élevée dans rate

Néanmoins, bien qu'il soit clair que le manque de cellules T spécifiques à l'antigène M2e constitue l'une des principales causes de l'absence de protection observée chez les souris immunisées, certaines interrogations persistent. Par exemple, il est largement établi que les isotypes IgG2a jouent un rôle clé dans l'induction des mécanismes « antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity » (ADCC) et « antibody-dependent cellular phagocytosis » (ADCP), et que leur présence suffit généralement à conférer aux souris une protection, au moins partielle, contre une infection mortelle par le virus de l'influenza (El Bakkouri *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2023; Van den Hoecke *et al.*, 2017). Cependant, lors de notre étude, aucune protection n'a été observée chez les souris immunisées nonobstant la présence d'IgG2a.

Il serait donc pertinent d'évaluer la capacité des anticorps présents dans le sérum de ces souris à initier les mécanismes d'ADCC et d'ADCP. Pour ce faire, l'utilisation de lignées cellulaires exprimant les récepteurs Fc impliqués dans ces mécanismes pourrait permettre une analyse fonctionnelle détaillée (Cheng *et al.*, 2017). Par ailleurs, la force d'interaction entre la région Fc des anticorps et les récepteurs Fc (FcR) responsables de l'induction de l'ADCC et de l'ADCP pourrait être mesurée par SPR. Ces données seraient ensuite comparées à la littérature ou à des anticorps issus d'une vaccination ayant démontré une protection, tels que ceux générés par M2e-I10. Cette analyse approfondie permettrait de mieux comprendre les limitations observées et d'identifier des stratégies pour améliorer l'efficacité des réponses humores anti-M2e.

Lors d'un projet expérimental de vaccination, le choix de la dose, du nombre d'immunisations et de la voie d'administration est aussi important que la conception de la formulation vaccinale. Augmenter la dose pourrait fournir une meilleure protection aux souris immunisées, mais il est important de s'assurer que la sécurité du vaccin est préservée. Le nombre d'immunisations est également connu pour influencer la réponse immunitaire, mais au vu de la faible différence des titres d'IgG sérique anti-M2e obtenus entre la seconde et la troisième immunisation dans cette étude, il est possible de se questionner sur la pertinence d'effectuer une immunisation supplémentaire. La voie d'administration sélectionnée influence de manière significative le type de réponse immunitaire obtenue, et par conséquent, le niveau de protection des sujets testés. La vaccination intranasale se distingue par sa capacité à induire simultanément une réponse immunitaire systémique et muqueuse, en ciblant directement les surfaces muqueuses des voies respiratoires, principales portes d'entrée des pathogènes respiratoires tels que le virus de l'influenza. Cette méthode repose sur l'activation des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT), en particulier du tissu lymphoïde associé au nez (NALT), où les lymphocytes T et B sont amorcés (Hartwell *et al.*, 2022). Cela permet non seulement de protéger les muqueuses locales, mais également d'étendre l'immunité à d'autres muqueuses grâce au système immunitaire commun des muqueuses (Zaman *et al.*, 2013).

Malgré ces avantages, le développement de formulations vaccinales intranasales reste freiné par plusieurs défis techniques. L'absorption des antigènes est limitée par des facteurs tels que leur dégradation rapide par des enzymes protéolytiques, les conditions acides des muqueuses, une clairance élevée et les jonctions serrées de la monocouche épithéliale, qui entravent leur diffusion

(Hartwell *et al.*, 2022; Zaman *et al.*, 2013). Toutefois, des stratégies innovantes, comme l'utilisation de polymères amphiphiles pour améliorer l'absorption transmuqueuse, ont montré des résultats prometteurs en augmentant les réponses immunitaires (Hartwell *et al.*, 2022). À ce titre, l'évaluation des réponses immunitaires induites par le PA-M2e lors d'une immunisation intranasale chez des souris pourrait être particulièrement intéressante. Ce peptide amphiphile présente des caractéristiques idéales pour cette voie d'administration. De plus, le développement de vaccins sous-unitaires pour une utilisation intranasale devient essentiel, car à ce jour, seuls des vaccins traditionnels utilisant des pathogènes entiers sont disponibles en clinique chez l'humain (Xu *et al.*, 2021). Ces derniers présentent des limites importantes, notamment des problèmes de sécurité, de conservation, et une inadéquation pour les personnes immunodéprimées, comme mentionné au début de ce mémoire.

Un autre point intéressant à relever dans l'application d'une immunisation intranasale c'est que cette dernière est amplement reconnue pour conduire des réponses immunitaires biaisées en Th17 (Si *et al.*, 2020; St-Louis *et al.*, 2024; Zygmunt *et al.*, 2009) et que la présence de cellules Th17 activées peut protéger contre une infection du virus influenza. (Eliasson *et al.*, 2018). De plus, cette méthode de vaccination peut permettre l'activation et le recrutement de macrophages alvéolaires, eux aussi important dans la protection grippale (St-Louis *et al.*, 2024). Ce point soutient d'autant plus l'intérêt d'évaluer l'administration de notre plateforme vaccination par voie intranasale, mais aussi il avance l'idée qu'une analyse plus poussée sur les populations lymphocytaires et de macrophages présents dans les MALT pourrait permettre d'obtenir une meilleure compréhension sur les résultats inattendus observé dans cette étude.

L'absence de protection contre l'infection au virus H1N1 pourrait être liée à un manque d'affinité des anticorps en raison de l'orientation de l'épitope sur les micelles cylindriques. En effet, plusieurs études montrent que l'orientation des épitopes sur des nanoparticules influence directement la réponse immunitaire (Ding *et al.*, 2017; Schneider *et al.*, 2021). Par exemple, dans le cas du circovirus porcin de type 2, une orientation optimisée des épitopes sur des nanoparticules d'or a permis d'améliorer la phagocytose et d'augmenter les niveaux d'anticorps neutralisants (Ding *et al.*, 2017). Dans une autre étude, il a été démontré que l'affinité des anticorps dirigés contre un épitope pouvait être influencée par sa position sur un peptide synthétique. Notamment, qu'un positionnement de l'épitope à l'extrémité N-terminale pourrait favoriser une affinité plus élevée des

anticorps spécifiques à l'épitope (Partidos *et al.*, 1992). Une étude utilisant le peptide synthétique I10 couplé à l'antigène M2e au niveau de son extrémité N-terminale a montré une protection de 70 % des souris immunisées, tout en induisant une réponse humorale similaire à celle observée avec le peptide PA-M2e (Bricha *et al.*, 2023). Étant donné que cette étude ne comporte aucune caractérisation de la réponse cellulaire. Il est donc difficile de déterminer si la différence de protection est attribuable à l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire spécifique. Néanmoins, une étude comparative entre ces deux plateformes serait particulièrement pertinente pour analyser l'impact de l'orientation de l'épitope sur la spécificité des anticorps produits.

Bien que notre étude n'ait pas démontré une protection notable, possiblement en raison d'une activation insuffisante des lymphocytes T, on ne peut pas pour autant dénigrer le rôle central des anticorps dans la lutte contre divers agents infectieux. Ces derniers sont essentiels pour neutraliser des pathogènes tels que le rotavirus, principal responsable de diarrhées sévères chez les nouveau-nés (Ward, R. L., 1996), ou encore le virus respiratoire syncytial humain (Galvez *et al.*, 2020), particulièrement dangereux pour les populations âgées et immunodéficientes. Il a également été prouvé que l'administration d'anticorps monoclonaux peut permettre de fournir une protection à des hamsters ou des souris contre une infection mortelle du virus du Nil et du virus de l'encéphalite japonaise (Morrey *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2018). L'intérêt pour le développement de nouvelles plateformes vaccinales, notamment celles basées sur des technologies innovantes comme les peptides amphiphiles, étant toujours croissant. L'évaluation des assemblages micellaires formés par PA pour la livraison d'antigène de pathogène reconnu comme étant éliminé par la présence d'une réponse humorale serait pertinente. Ces structures synthétiques offrent une grande flexibilité et permettent un contrôle précis des paramètres d'assemblage, ouvrant ainsi des perspectives pour des applications plus sophistiquées.

Une avancée stratégique pourrait consister à co-assembler des modules de PA conçus pour porter simultanément un antigène spécifique, comme le M2e, et un adjuvant puissant tel que le CpG (Bricha *et al.*, 2023). Une telle combinaison pourrait stimuler à la fois des réponses humorales, via la production d'anticorps, et des réponses cellulaires robustes, favorisant une protection immunitaire étendue (Chung *et al.*, 2015). Cette approche illustre l'opportunité qu'offrent les nanotechnologies pour pallier les limites des vaccins traditionnels, notamment leur capacité à induire des réponses immunitaires équilibrées. En intégrant ces principes, ces plateformes

pourraient constituer une alternative efficace pour la prévention des maladies infectieuses telles que la grippe, tout en offrant des solutions adaptées aux besoins actuels en matière de sécurité et de tolérance vaccinale.

CONCLUSION

L'objectif de ce projet de recherche était d'évaluer l'utilisation du peptide C16V3A3K3, déjà exploité dans le domaine biomédical, en tant que plateforme de livraison antigénique. Les études réalisées ont d'abord démontré que le β -peptide amphiphile pouvait être fonctionnalisé avec l'antigène M2e sans compromettre sa capacité à s'auto-assembler en micelles cylindriques. Par la suite, nous avons confirmé que ces micelles exposaient l'antigène M2e à leur surface, activaient les récepteurs TLR2/TLR6 et étaient efficacement internalisées par des cellules dendritiques. L'immunisation à l'aide d'un modèle murin a montré que l'administration intramusculaire de PA-M2e induisait une réponse humorale anti-M2e caractérisée par une diversité isotypique. Cependant, cette réponse humorale s'est révélée insuffisante pour protéger les souris d'une infection mortelle par le virus de la grippe H1N1. Bien que ces résultats puissent paraître décevants au premier abord, ils apportent des informations cruciales pour la compréhension des mécanismes de protection liés à M2e. En effet, une partie importante de la littérature actuelle suggère que la seule présence d'une réponse humorale robuste, en particulier d'IgG2a, pourrait conférer une protection partielle chez les souris. Toutefois, notre étude démontre que la seule présence d'anticorps ne suffit pas et que des mécanismes supplémentaires sont indispensables pour obtenir une protection efficace contre M2e. Il serait donc nécessaire d'évaluer l'importance de la réponse cellulaire ainsi que de l'affinité des anticorps dans la protection contre M2e. L'application de PA dans un contexte vaccinal ne doit pas pour autant être écartée. Ces peptides pourraient s'avérer particulièrement prometteurs dans le cadre de la livraison d'antigènes capables d'induire des anticorps neutralisants ou dans les cas où la réponse humorale seule assure une protection adéquate des hôtes. Cette approche ouvre ainsi des perspectives intéressantes pour cibler d'autres pathogènes dans le cadre de stratégies vaccinales de nouvelle génération.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. et Pillai, S. (2011). *Cellular and Molecular Immunology E-Book: Cellular and Molecular Immunology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R. et Lord, G. (2007). The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 148(1), 32-46.
- Al-Halifa, S., Zottig, X., Babych, M., Côté-Cyr, M., Bourgault, S. et Archambault, D. (2020). Harnessing the activation of toll-like receptor 2/6 by self-assembled cross- β fibrils to design adjuvanted nanovaccines. *Nanomaterials*, 10(10), 1981.
- 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.
- Al-Halifa, S., Babych, M., Zottig, X., Archambault, D. et Bourgault, S. (2019). Amyloid self-assembling peptides: Potential applications in nanovaccine engineering and biosensing. *Peptide Science*, 111(1), e24095.
- Aoshi, T., Koyama, S., Kobiyama, K., Akira, S. et Ishii, K. J. (2011). Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Current opinion in virology*, 1(4), 226-232.
- Atri, C., Guerfali, F. Z. et Laouini, D. (2018). Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1801.
- Awate, S., Babiuk, L. A. et Mutwiri, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in immunology*, 4, 114.
- 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.
- Babych, M., Garelja, M. L., Nguyen, P. T., Hay, D. L. et Bourgault, S. (2024). Converting the Amyloidogenic Islet Amyloid Polypeptide into a Potent Nonaggregating Peptide Ligand by Side Chain-to-Side Chain Macrocyclization. *Journal of the American Chemical Society*, 146(37), 25513-25526.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B. et Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, 18(1), 767-811.

- Barr, T. A., Brown, S., Ryan, G., Zhao, J. et Gray, D. (2007). TLR-mediated stimulation of APC: distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *European journal of immunology*, 37(11), 3040-3053.
- Barrett, J. C. et Tirrell, M. V. (2018). Peptide amphiphile micelles for vaccine delivery. *Protein Scaffolds: Design, Synthesis, and Applications*, 277-292.
- Barrett, J. C., Ulery, B. D., Trent, A., Liang, S., David, N. A. et Tirrell, M. V. (2017). Modular peptide amphiphile micelles improving an antibody-mediated immune response to group A streptococcus. *ACS biomaterials science & engineering*, 3(2), 144-152.
- Baxter, L. T., Zhu, H., Mackensen, D. G., Butler, W. F. et Jain, R. K. (1995). Biodistribution of monoclonal antibodies: scale-up from mouse to human using a physiologically based pharmacokinetic model. *Cancer research*, 55(20), 4611-4622.
- Bonilla, F. A. et Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2), S33-S40.
- Bricha, S., Côté-Cyr, M., Tremblay, T., Nguyen, P. T., St-Louis, P., Giguère, D., Archambault, D. et Bourgault, S. (2023). Synthetic Multicomponent Nanovaccines Based on the Molecular Co-assembly of β -Peptides Protect against Influenza A Virus. *ACS Infectious Diseases*, 9(6), 1232-1244.
- Cabeza-Cabrerizo, M., Cardoso, A., Minutti, C. M., Pereira da Costa, M. et Reis e Sousa, C. (2021). Dendritic cells revisited. *Annual review of immunology*, 39(1), 131-166.
- Caliendo, V., Lewis, N., Pohlmann, A., Baillie, S., Banyard, A., Beer, M., Brown, I., Fouchier, R., Hansen, R. et Lameris, T. (2022). Transatlantic spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 by wild birds from Europe to North America in 2021. *Scientific reports*, 12(1), 11729.
- Carter, T. et Iqbal, M. (2024). The Influenza A Virus Replication Cycle: A Comprehensive Review. *Viruses*, 16(2), 316.
- Castelletto, V., Kirkham, S., Hamley, I. W., Kowalczyk, R., Rabe, M., Reza, M. et Ruokolainen, J. (2016). Self-assembly of the toll-like receptor agonist macrophage-activating lipopeptide MALP-2 and of its constituent peptide. *Biomacromolecules*, 17(2), 631-640.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2), S3-S23.
- Chatzikleanthous, D., O'Hagan, D. T. et Adamo, R. (2021). Lipid-based nanoparticles for delivery of vaccine adjuvants and antigens: toward multicomponent vaccines. *Molecular pharmaceutics*, 18(8), 2867-2888.
- Chen, J.-L., Fries, C. N., Berendam, S. J., Rodgers, N. S., Roe, E. F., Wu, Y., Li, S. H., Jain, R., Watts, B. et Eudailey, J. (2022). Self-assembling peptide nanofiber HIV vaccine elicits

- robust vaccine-induced antibody functions and modulates Fc glycosylation. *Science Advances*, 8(38), eabq0273.
- Chen, J. et Zou, X. (2019). Self-assemble peptide biomaterials and their biomedical applications. *Bioactive materials*, 4, 120-131.
- Cheng, Z.-J. J., Moravec, R., Paguio, A., Garvin, D., Krishnan, G. B., Fan, F. et Cong, M. (2017). Fc effector bioassays enable faster and quantitative measurement of ADCC and ADCP mechanisms of action. *Cancer research*, 77(13_Supplement), 4693-4693.
- Chung, E. J., Mlinar, L. B., Sugimoto, M. J., Nord, K., Roman, B. B. et Tirrell, M. (2015). In vivo biodistribution and clearance of peptide amphiphile micelles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(2), 479-487.
- Coffman, R. L., Sher, A. et Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, 33(4), 492-503.
- Collins, A. M. (2016). IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunology and cell biology*, 94(10), 949-954.
- Cote-Cyr, M., Zottig, X., Gauthier, L., Archambault, D. et Bourgault, S. (2022). Self-assembly of flagellin into immunostimulatory ring-like nanostructures as an antigen delivery system. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 8(2), 694-707.
- Couvreux, P. (2022). Délivrance de l'ARN à l'aide de nanoparticules lipidiques. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 206(9), 1208-1213.
- Cui, H., Webber, M. J. et Stupp, S. I. (2010). Self-assembly of peptide amphiphiles: From molecules to nanostructures to biomaterials. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 94(1), 1-18.
- De Smet, K. et Contreras, R. (2005). Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology letters*, 27, 1337-1347.
- Dehsorkhi, A., Castelletto, V. et Hamley, I. W. (2014). Self-assembling amphiphilic peptides. *Journal of Peptide Science*, 20(7), 453-467.
- Deng, L., Cho, K. J., Fiers, W. et Saelens, X. (2015). M2e-based universal influenza A vaccines. *Vaccines*, 3(1), 105-136.
- 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.
- Ding, P., Zhang, T., Li, Y., Teng, M., Sun, Y., Liu, X., Chai, S., Zhou, E., Jin, Q. et Zhang, G. (2017). Nanoparticle orientationally displayed antigen epitopes improve neutralizing antibody level in a model of porcine circovirus type 2. *International Journal of Nanomedicine*, 5239-5254.

- Dunn, G. P., Koebel, C. M. et Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 6(11), 836-848.
- Eccles, R. (2005). Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *The Lancet infectious diseases*, 5(11), 718-725.
- El-Zayat, S. R., Sibaii, H. et Mannaa, F. A. (2019). Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-12.
- 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.
- Elenkov, I. J., Iezzoni, D. G., Daly, A., Harris, A. G. et Chrousos, G. P. (2005). Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. *Neuroimmunomodulation*, 12(5), 255-269.
- Eliasson, D., Omokanye, A., Schön, K., Wenzel, U., Bernasconi, V., Bemark, M., Kolpe, A., El Bakkouri, K., Ysenbaert, T. et Deng, L. (2018). M2e-tetramer-specific memory CD4 T cells are broadly protective against influenza infection. *Mucosal immunology*, 11(1), 273-289.
- Elson, L. H., Nutman, T. B., Metcalfe, D. D. et Prussin, C. (1995). Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4⁺ CD27-lymphocyte subpopulation. *Journal of immunology*, 154(9), 4294-4301.
- 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. *Advanced drug delivery reviews*, 110, 169-187.
- Fagarasan, S. et Honjo, T. (2000). T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science*, 290(5489), 89-92.
- Fan, J., Toth, I. et Stephenson, R. J. (2024). Self-Assembling Peptides for Vaccine Adjuvant Discovery. *Immuno*, 4(4), 325-343.
- Fan, T., Yu, X., Shen, B. et Sun, L. (2017). Peptide self-assembled nanostructures for drug delivery applications. *Journal of Nanomaterials*, 2017(1), 4562474.
- Fuertes-Llanos, M. A., Gómara, M. J., Haro, I. et Sánchez-López, E. (2024). Peptide amphiphiles for pharmaceutical applications. *Current Medicinal Chemistry*, 31(11), 1332-1347.
- Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis research & therapy*, 8, 1-6.
- Gabay, C., Lamacchia, C. et Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(4), 232-241.

- Galvez, N., Soto, J. A., Bueno, S. M. et Kalergis, A. M. (2020). The humoral immune response elicited upon immunization with recombinant BCG vaccines protects against hRSV and hMPV in a murine preclinical model. *The Journal of Immunology*, 204(1_Supplement), 245.223.
- Gazit, E. (2007). Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization. *Chemical Society Reviews*, 36(8), 1263-1269.
- Gebre, M. S., Brito, L. A., Tostanoski, L. H., Edwards, D. K., Carfi, A. et Barouch, D. H. (2021). Novel approaches for vaccine development. *cell*, 184(6), 1589-1603.
- 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.
- Gherardi, R. K., Crépeaux, G. et Authier, F.-J. (2019). Myalgia and chronic fatigue syndrome following immunization: macrophagic myofasciitis and animal studies support linkage to aluminum adjuvant persistency and diffusion in the immune system. *Autoimmunity Reviews*, 18(7), 691-705.
- Giacomini, E., Iona, E., Ferroni, L., Miettinen, M., Fattorini, L., Orefici, G., Julkunen, I. et Coccia, E. M. (2001). Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *The Journal of Immunology*, 166(12), 7033-7041.
- Giuliani, A., Pirri, G. et Nicoletto, S. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, 2(1), 1-33.
- Gregory, A. E., Titball, R. et Williamson, D. (2013). Vaccine delivery using nanoparticles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 13.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. et Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology*, 20(1), 621-667.
- 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.
- Hartgerink, J. D., Beniash, E. et Stupp, S. I. (2001). Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science*, 294(5547), 1684-1688.
- Hartgerink, J. D., Beniash, E. et Stupp, S. I. (2002). Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5133-5138.
- Hartwell, B. L., Melo, M. B., Xiao, P., Lemnios, A. A., Li, N., Chang, J. Y., Yu, J., Gebre, M. S., Chang, A. et Maiorino, L. (2022). Intranasal vaccination with lipid-conjugated

- immunogens promotes antigen transmucosal uptake to drive mucosal and systemic immunity. *Science translational medicine*, 14(654), eabn1413.
- Hazlett, L. et Wu, M. (2011). Defensins in innate immunity. *Cell and tissue research*, 343, 175-188.
- Hirsiger, J. R., Tamborrini, G., Harder, D., Bantug, G. R., Hoenger, G., Recher, M., Marx, C., Li, Q.-Z., Martin, I. et Hess, C. (2021). Chronic inflammation and extracellular matrix-specific autoimmunity following inadvertent periarticular influenza vaccination. *Journal of Autoimmunity*, 124, 102714.
- Hovden, A. O., Cox, R. et Haaheim, L. (2005). Whole influenza virus vaccine is more immunogenic than split influenza virus vaccine and induces primarily an IgG2a response in BALB/c mice. *Scandinavian journal of immunology*, 62(1), 36-44.
- Huber, V. C., McKeon, R. M., Brackin, M. N., Miller, L. A., Keating, R., Brown, S. A., Makarova, N., Perez, D. R., MacDonald, G. H. et McCullers, J. A. (2006). Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. *Clinical and vaccine immunology*, 13(9), 981-990.
- 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.
- Jang, Y. H. et Seong, B. L. (2019). The quest for a truly universal influenza vaccine. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 344.
- Kak, G., Raza, M. et Tiwari, B. K. (2018). Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular concepts*, 9(1), 64-79.
- Kalil, A. C. et Thomas, P. G. (2019). Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. *Critical care*, 23(1), 258.
- Kantari, C., Pederzoli-Ribeil, M. et Witko-Sarsat, V. (2008). The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Trends in innate immunity*, 15, 118-146.
- Kashem, S. W., Haniffa, M. et Kaplan, D. H. (2017). Antigen-presenting cells in the skin. *Annual review of immunology*, 35(1), 469-499.
- Kawasaki, T. et Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5, 461.
- Khurana, S., King, L. R., Manischewitz, J., Coyle, E. M. et Golding, H. (2014). Novel antibody-independent receptor-binding SPR-based assay for rapid measurement of influenza vaccine potency. *Vaccine*, 32(19), 2188-2197.
- Kihal, N., Archambault, M.-J., Babych, M., Nazemi, A. et Bourgault, S. (2024). Probing the molecular determinants of the activation of toll-like receptor 2/6 by amyloid nanostructures through directed peptide self-assembly. *Soft Matter*, 20(39), 7821-7831.

- Kobayashi, K. S. et Van Den Elsen, P. J. (2012). NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 12(12), 813-820.
- Kocabas, B. B., Almacioglu, K., Bulut, E. A., Gucluler, G., Tincer, G., Bayik, D., Gursel, M. et Gursel, I. (2020). Dual-adjuvant effect of pH-sensitive liposomes loaded with STING and TLR9 agonists regress tumor development by enhancing Th1 immune response. *Journal of Controlled Release*, 328, 587-595.
- Koenderman, L., Buurman, W. et Daha, M. R. (2014). The innate immune response. *Immunology letters*, 162(2), 95-102.
- Koutsakos, M., Nguyen, T. H., Barclay, W. S. et Kedzierska, K. (2016). Knowns and unknowns of influenza B viruses. *Future microbiology*, 11(1), 119-135.
- Kumar, H., Kawai, T. et Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, 30(1), 16-34.
- Kuntsche, J., Horst, J. C. et Bunjes, H. (2011). Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*, 417(1-2), 120-137.
- Kuster, S. P., Shah, P. S., Coleman, B. L., Lam, P.-P., Tong, A., Wormsbecker, A. et McGeer, A. (2011). Incidence of influenza in healthy adults and healthcare workers: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 6(10), e26239.
- Lamontagne, F., Arpin, D., Côté-Cyr, M., Khatri, V., St-Louis, P., Gauthier, L., Archambault, D. et Bourgault, S. (2023). Engineered Curli Nanofilaments as a Self-Adjuvanted Antigen Delivery Platform. *Advanced Healthcare Materials*, 12(21), 2300224.
- LeBien, T. W. et Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 112(5), 1570-1580.
- Liu, M. A. (2003). DNA vaccines: a review. *Journal of internal medicine*, 253(4), 402-410.
- Liu, X., Gao, H., Huang, F., Pei, X., An, Y., Zhang, Z. et Shi, L. (2013). Structure change of mixed shell polymeric micelles and its interaction with bio-targets as probed by the 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) fluorescence. *Polymer*, 54(14), 3633-3640.
- Lo, M. W. et Woodruff, T. M. (2020). Complement: Bridging the innate and adaptive immune systems in sterile inflammation. *Journal of Leucocyte Biology*, 108(1), 339-351.
- Luchner, M., Reinke, S. et Milicic, A. (2021). TLR agonists as vaccine adjuvants targeting cancer and infectious diseases. *Pharmaceutics*, 13(2), 142.
- Malek, T. R. (2008). The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.*, 26(1), 453-479.
- McKee, A. S. et Marrack, P. (2017). Old and new adjuvants. *Current opinion in immunology*, 47, 44-51.

- 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.
- Morandi, B., Bougras, G., Muller, W. A., Ferlazzo, G. et Münz, C. (2006). NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN- γ secretion. *European journal of immunology*, 36(9), 2394-2400.
- Morrey, J. D., Siddharthan, V., Olsen, A. L., Roper, G. Y., Wang, H., Baldwin, T. J., Koenig, S., Johnson, S., Nordstrom, J. L. et Diamond, M. S. (2006). Humanized monoclonal antibody against West Nile virus envelope protein administered after neuronal infection protects against lethal encephalitis in hamsters. *The Journal of infectious diseases*, 194(9), 1300-1308.
- Moyle, P. M. et Toth, I. (2013). Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities. *ChemMedChem*, 8(3), 360-376.
- Murphy, K. et Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology*. Garland science.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M. et Takeda, T. (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T. *Analytical biochemistry*, 177(2), 244-249.
- Narayan, K., Paduraru, C., Blake, T. et Arunachalam, A. B. (2023). Rapid determination of influenza vaccine potency by an SPR-based method using subtype or lineage-specific monoclonal antibodies. *Frontiers in immunology*, 14, 1128683.
- Negahdaripour, M., Golkar, N., Hajighahramani, N., Kianpour, S., Nezafat, N. et Ghasemi, Y. (2017). Harnessing self-assembled peptide nanoparticles in epitope vaccine design. *Biotechnology advances*, 35(5), 575-596.
- Pantin-Jackwood, M. J. et Swayne, D. (2009). Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 28(1), 113-136.
- Partidos, C., Stanley, C. et Steward, M. (1992). The effect of orientation of epitopes on the immunogenicity of chimeric synthetic peptides representing measles virus protein sequences. *Molecular immunology*, 29(5), 651-658.
- Pasupuleti, M., Schmidtchen, A. et Malmsten, M. (2012). Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical reviews in biotechnology*, 32(2), 143-171.
- Pinto, L. H., Holsinger, L. J. et Lamb, R. A. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *cell*, 69(3), 517-528.
- Plotkin, S. A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nature medicine*, 11(Suppl 4), S5-S11.

- Qiu, X., Lei, Y., Yang, P., Gao, Q., Wang, N., Cao, L., Yuan, S., Huang, X., Deng, Y. et Ma, W. (2018). Structural basis for neutralization of Japanese encephalitis virus by two potent therapeutic antibodies. *Nature microbiology*, 3(3), 287-294.
- Reddy, S. T., Rehor, A., Schmoekel, H. G., Hubbell, J. A. et Swartz, M. A. (2006). In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly (propylene sulfide) nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 112(1), 26-34.
- Roldão, A., Mellado, M. C. M., Castilho, L. R., Carrondo, M. J. et Alves, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert review of vaccines*, 9(10), 1149-1176.
- Rosenberg, J., Lee, H.-K., Singh, G., Andrew, K. et Singh, S. (2010). TLR reporter cell lines for screening TLR agonists and antagonists (136.20). *The Journal of Immunology*, 184(1_Supplement), 136.120-136.120.
- Rudra, J. S., Mishra, S., Chong, A. S., Mitchell, R. A., Nardin, E. H., Nussenzweig, V. et Collier, J. H. (2012). Self-assembled peptide nanofibers raising durable antibody responses against a malaria epitope. *Biomaterials*, 33(27), 6476-6484.
- Rudra, J. S., Tian, Y. F., Jung, J. P. et Collier, J. H. (2010). A self-assembling peptide acting as an immune adjuvant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 622-627.
- Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K. et Geginat, J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine & growth factor reviews*, 21(5), 331-344.
- Sanders, B., Koldijk, M. et Schuitemaker, H. (2015). Inactivated viral vaccines. *Vaccine analysis: strategies, principles, and control*, 45-80.
- Sarma, J. V. et Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell and tissue research*, 343(1), 227-235.
- Schmidt, N. W., Mishra, A., Wang, J., DeGrado, W. F. et Wong, G. C. (2013). Influenza virus A M2 protein generates negative Gaussian membrane curvature necessary for budding and scission. *Journal of the American Chemical Society*, 135(37), 13710-13719.
- Schneider, C. G., Taylor, J. A., Sibilo, M. Q., Miura, K., Mallory, K. L., Mann, C., Karch, C., Beck, Z., Matyas, G. R. et Long, C. A. (2021). Orientation of antigen display on self-assembling protein nanoparticles influences immunogenicity. *Vaccines*, 9(2), 103.
- Sebastiao, M., Quittot, N. et Bourgault, S. (2017, Sep 1). Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: Measurement frequency as a factor explaining irreproducibility. *Anal Biochem*, 532, 83-86.
- 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.

- Short, K. R., Richard, M., Verhagen, J. H., van Riel, D., Schrauwen, E. J., van den Brand, J. M., Mänz, B., Bodewes, R. et Herfst, S. (2015). One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus. *One health*, 1, 1-13.
- Si, Y., Tian, Q., Zhao, F., Kelly, S. H., Shores, L. S., Camacho, D. F., Sperling, A. I., Andrade, M. S., Collier, J. H. et Chong, A. S. (2020). Adjuvant-free nanofiber vaccine induces in situ lung dendritic cell activation and TH17 responses. *Science advances*, 6(32), eaba0995.
- Singh, R., Sharma, S., Kautu, A. et Joshi, K. B. (2024). Self-assembling short peptide amphiphiles as versatile delivery agents: a new frontier in antibacterial research. *Chemical Communications*, 60(60), 7687-7696.
- Skehel, J. J. et Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 531-569.
- Snapper, C. M. et Mond, J. J. (1996). A model for induction of T cell-independent humoral immunity in response to polysaccharide antigens. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 157(6), 2229-2233.
- St-Louis, P., Martin, C., Khatri, V., Bourgault, S. et Archambault, D. (2024). Intranasal delivery of a self-adjuvanted nanovaccine composed of the curli filaments and the highly conserved M2e epitope confers protection against influenza a virus in mice. *Vaccine*, 42(9), 2144-2149.
- Stenger, S., Mazzaccaro, R. J., Uyemura, K., Cho, S., Barnes, P. F., Rosat, J.-P., Sette, A., Brenner, M. B., Porcelli, S. A. et Bloom, B. R. (1997). Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science*, 276(5319), 1684-1687.
- Sun, T., Wang, Y., Zou, P., Wang, Q., Liu, J., Liu, W., Huang, J. et Wu, F. (2023). M2e-specific antibodies protect against influenza PR8 virus in an isotype and route dependent manner. *Journal of Medical Virology*, 95(4), e28721.
- Taki, A. et Smooker, P. (2015). Small wonders—The use of nanoparticles for delivering antigen. *Vaccines*, 3(3), 638-661.
- Tao, W. et Gill, H. S. (2015). M2e-immobilized gold nanoparticles as influenza A vaccine: Role of soluble M2e and longevity of protection. *Vaccine*, 33(20), 2307-2315.
- Thomson, A. W. et Lotze, M. T. (2003). *The cytokine handbook, two-volume set*. Elsevier.
- Tokars, J. I., Olsen, S. J. et Reed, C. (2018). Seasonal incidence of symptomatic influenza in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 66(10), 1511-1518.
- Tosi, M. F. (2005). Innate immune responses to infection. *Journal of allergy and clinical immunology*, 116(2), 241-249.

- Treanor, J. (2006). *The cutter incident: how America's first polio vaccine led to the growing vaccine crisis* : National Institute of Environmental Health Sciences.
- Trent, A., Ulery, B. D., Black, M. J., Barrett, J. C., Liang, S., Kostenko, Y., David, N. A. et Tirrell, M. V. (2015). Peptide amphiphile micelles self-adjuvant group A streptococcal vaccination. *The AAPS journal*, 17, 380-388.
- Tükel, Ç., Wilson, R. P., Nishimori, J. H., Pezeshki, M., Chromy, B. A. et Bäumlér, A. J. (2009). Responses to amyloids of microbial and host origin are mediated through toll-like receptor 2. *Cell host & microbe*, 6(1), 45-53.
- 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.
- Uehori, J., Fukase, K., Akazawa, T., Uematsu, S., Akira, S., Funami, K., Shingai, M., Matsumoto, M., Azuma, I. et Toyoshima, K. (2005). Dendritic cell maturation induced by muramyl dipeptide (MDP) derivatives: monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *The Journal of Immunology*, 174(11), 7096-7103.
- Van den Hoecke, S., Ehrhardt, K., Kolpe, A., El Bakkouri, K., Deng, L., Grootaert, H., Schoonooghe, 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), 10.1128/jvi. 02500-02516.
- Vartak, A. et Sucheck, S. J. (2016). Recent advances in subunit vaccine carriers. *Vaccines*, 4(2), 12.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. et Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature immunology*, 9(5), 503-510.
- Wan, Z., Zhou, Z., Liu, Y., Lai, Y., Luo, Y., Peng, X. et Zou, W. (2020). Regulatory T cells and T helper 17 cells in viral infection. *Scandinavian Journal of Immunology*, 91(5), e12873.
- 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.
- Ward, B. J., Gobeil, P., Séguin, A., Atkins, J., Boulay, I., Charbonneau, P.-Y., Couture, M., D'Aoust, M.-A., Dhaliwall, J. et Finkle, C. (2021). Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. *Nature medicine*, 27(6), 1071-1078.
- Ward, R. L. (1996). Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. *Journal of Infectious Diseases*, 174(Supplement_1), S51-S58.
- Webber, M. J., Berns, E. J. et Stupp, S. I. (2013). Supramolecular nanofibers of peptide amphiphiles for medicine. *Israel journal of chemistry*, 53(8), 530-554.

- Webber, M. J., Kessler, J. et Stupp, S. (2010). Emerging peptide nanomedicine to regenerate tissues and organs. *Journal of internal medicine*, 267(1), 71-88.
- Wei, Y., Quan, L., Zhou, C. et Zhan, Q. (2018). Factors relating to the biodistribution & clearance of nanoparticles & their effects on in vivo application. *Nanomedicine*, 13(12), 1495-1512.
- Wen, F. et Wan, X.-F. (2019). Influenza neuraminidase: Underrated role in receptor binding. *Trends in microbiology*, 27(6), 477-479.
- Wen, Y. et Collier, J. H. (2015). Supramolecular peptide vaccines: tuning adaptive immunity. *Current opinion in immunology*, 35, 73-79.
- Xu, H., Cai, L., Hufnagel, S. et Cui, Z. (2021). Intranasal vaccine: Factors to consider in research and development. *International journal of pharmaceuticals*, 609, 121180.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S., Chen, Q., Buffo, M., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J., Wang, J. et Howard, O. (1999). β -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, 286(5439), 525-528.
- Yasukawa, M., Ohminami, H., Arai, J., Kasahara, Y., Ishida, Y. et Fujita, S. (2000). Granule exocytosis, and not the Fas/Fas ligand system, is the main pathway of cytotoxicity mediated by alloantigen-specific CD4⁺ as well as CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in humans. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95(7), 2352-2355.
- Zakeri, A. et Russo, M. (2018). Dual role of toll-like receptors in human and experimental asthma models. *Frontiers in immunology*, 9, 1027.
- Zaman, M., Chandrudu, S. et Toth, I. (2013). Strategies for intranasal delivery of vaccines. *Drug delivery and translational research*, 3, 100-109.
- Zeltins, A. (2013). Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Molecular biotechnology*, 53(1), 92-107.
- Zhang, R., Smith, J. D., Allen, B. N., Kramer, J. S., Schauflinger, M. et Ulery, B. D. (2018). Peptide amphiphile micelle vaccine size and charge influence the host antibody response. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(7), 2463-2472.
- Zhang, Y.-N., Lazarovits, J., Poon, W., Ouyang, B., Nguyen, L. N., Kingston, B. R. et Chan, W. C. (2019). Nanoparticle size influences antigen retention and presentation in lymph node follicles for humoral immunity. *Nano letters*, 19(10), 7226-7235.
- Zhao, C., Chen, H., Wang, F. et Zhang, X. (2021). Amphiphilic self-assembly peptides: Rational strategies to design and delivery for drugs in biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 112040.

- Zhao, G., Chandrudu, S., Skwarczynski, M. et Toth, I. (2017). The application of self-assembled nanostructures in peptide-based subunit vaccine development. *European polymer journal*, 93, 670-681.
- Zottig, X., Al-Halifa, S., Côté-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.
- Zottig, X., Côté-Cyr, M., Arpin, D., Archambault, D. et Bourgault, S. (2020). Protein supramolecular structures: from self-assembly to nanovaccine design. *Nanomaterials*, 10(5), 1008.
- Zygmunt, B. M., Rharbaoui, F., Groebe, L. et Guzman, C. A. (2009). Intranasal immunization promotes th17 immune responses. *The Journal of Immunology*, 183(11), 6933-6938.
- Zykova, A. A., Blokhina, E. A., Stepanova, L. A., Shuklina, M. A., Tsybalova, L. M., Kuprianov, V. V. et Ravin, N. V. (2022). Nanoparticles based on artificial self-assembling peptide and displaying M2e peptide and stalk HA epitopes of influenza A virus induce potent humoral and T-cell responses and protect against the viral infection. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 39, 102463.