UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

## FLAGELLINES BACTÉRIENNES EN TANT QU'ADJUVANTS ET NANOSTRUCTURES POUR LA LIVRAISON D'ANTIGÈNES VACCINAUX

## MÉMOIRE PRÉSENTÉ COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

## PAR MÉLANIE CÔTÉ-CYR

AVRIL 2022

#### UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

#### Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

#### REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de maîtrise, le Professeur Steve Bourgault, ainsi que mon codirecteur, le Professeur Denis Archambault, de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires et d'avoir aidé à façonner ma vision de la science chacun à leur façon. Je souhaite remercier Steve de m'avoir fait confiance et d'avoir été présent aux moments opportuns lors des dernières années, tout en me laissant la liberté d'explorer, de me tromper et d'apprendre. Merci d'avoir contribué à ma formation et à mon épanouissement dans le domaine de la recherche. Je souhaite également remercier Denis de m'avoir initiée au monde fascinant de l'immunologie et pour ses judicieux conseils scientifiques.

J'aimerais aussi remercier les membres des laboratoires Bourgault et Archambault que j'ai eu la chance de côtoyer dans les dernières années, Trang, Mathilde, Laurie, Dannick, Jenna, Oussama, Félix, Mathew, Noé, Guillaume, Nadjib, Salma, Vinay, Élizabeth, Vy, Dominic et Soultan. Vous avez tous contribué à rendre les dernières années agréables, dynamiques et pleines de surprises. Un merci particulier à Margaryta pour son esprit scientifique aiguisé, ses conseils et son écoute. Par-dessus tout, merci à Ximena d'avoir mêlé ses élans d'imagination aux miens et de m'avoir poussée sans cesse à m'améliorer en tant que scientifique et à rehausser la qualité de ma recherche.

Je remercie également mes ami.es et mes collègues de l'AESS, qui ont été présent.es pour moi tout au long de mes études. Votre support et vos conseils m'ont motivée dans les moments difficiles. Vous êtes pour moi une deuxième famille. Je souhaite remercier ma famille. Merci à mes frères, Alex et Will, pour votre grande curiosité et votre intérêt pour les sciences. Vous avez toujours répondu à l'appel lorsque j'ai eu besoin de vous. Je souhaite adresser ma plus grande gratitude à ma mère, une femme qui ne cesse de repousser les limites du possible. Tu es depuis toujours un modèle pour moi et une des plus grandes artisanes de ma réussite.

Finalement, je tiens à souligner le support financier du Centre de Recherches pour le Développement International (CRDI) pour la réalisation de ce projet de recherche ainsi que le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et le Fonds de recherche du Québec - nature et technologie (FRQNT) pour les bourses de recherche.

# TABLE DES MATIÈRES

LIST	È DES FIGURES	VII
LIST	È DES TABLEAUX	IX
LIST	E DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	X
RÉS	UMÉX	III
CHA	PITRE I INTRODUCTION	1
1.1	La vaccination	1
	<ul><li>1.1.1 De l'immunité innée à l'immunité adaptative</li><li>1.1.2 Évolution et diversification des vaccins</li><li>1.1.3 Les adjuvants</li></ul>	2 9 .10
1.2	Flagelline	.12
	<ul><li>1.2.1 Propriétés immunostimulantes de la flagelline</li><li>1.2.2 Flagelle bactérien et assemblages de flagelline</li><li>1.2.3 Utilisation de la flagelline en vaccination</li></ul>	14 16 18
1.3	Nanovaccins	.21
	<ul><li>1.3.1 Particules pseudovirales</li><li>1.3.2 Nanoparticules protéiques</li><li>1.3.3 Modulation de la réponse immunitaire par les nanovaccins</li></ul>	22 23 25
1.4	Virus influenza	.27
	<ul><li>1.4.1 Composition et réplication du virus.</li><li>1.4.2 Antigènes de surface.</li><li>1.4.3 Des épitopes conservés.</li></ul>	. 27 . 29 . 31
1.5	Problématique, hypothèse et objectifs	.34
	1.5.1 Hypothèses 1.5.2 Objectifs	.35 .35

CHA FLA PRO ENT	PITRE II ARTICLE I: « RECOMBINANT <i>BACILLUS SUBTILIS</i> GELLIN HAG IS A POTENT IMMUNOSTIMULANT WITH REDUCED INFLAMMATORY PROPERTIES COMPARED TO <i>SALMONELLA</i> <i>ERICA</i> SEROVAR TYPHIMURIUM FLJB »
2.1	Résumé
2.2	Abstract
2.3	Introduction
2.4	Materials and methods
	2.4.1 Expression and purification of proteins432.4.2 Circular dichroism spectroscopy442.4.3 TLR5 activation442.4.4 Evaluation of proinflammatory responses in mice452.4.5 Intramuscular immunization452.4.6 Indirect ELISA46
2.5	Results and discussion
	2.5.1 Hag shows reduced potency to activate TLR5 compared to FljB
2.6	Conclusion
2.7	Supporting information
CHA IMM DEL	PITRE III ARTICLE II: « SELF-ASSEMBLY OF FLAGELLIN INTO UNOSTIMULATORY RING-LIKE STRUCTURES AS ANTIGEN IVERY SYSTEM »
3.1	Résumé
3.2	Abstract
3.3	Introduction
3.4	Materials and Methods
	3.4.1 Protein Expression and Purification 65   3.4.2 Self-Assembly of Flagellin into Nanostructures 66   3.4.3 Transmission Electron Microscopy (TEM) 66   3.4.4 Dynamic Light Scattering (DLS) 67   3.4.5 Epitope Accessibility by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 67   3.4.6 UV-visible and Circular Dichroism (CD) Spectroscopy 68
	3.4.7 Fluorescence Labeling of Proteins

	3.4.8 Cellular Uptake by APCs	59 70
	3.4.10 Innate Immune Response in Mice	70
	3.4.11 Immunization of Mice	71
	3.4.12 Experimental Challenge	72
	3.4.13 Indirect ELISA for Titer Determination	72
3.5	Results and Discussion	73
	3.5.1 Altering the Elongation of Flagellin Filaments into Low Aspect Ratio	77
	$3.5.2$ Flagellin-based Nanostructures are $\alpha$ -Helix-Rich Structures Exposing the	/3 3
	Antigens at their Surface	77 30
	3.5.4 Flagellin-Based Assemblies Stimulate the Immune Receptor TLR5 <i>in</i>	22
	3.5.5 Flagellin-based Nanoparticles Activate the Innate Immune System	33 34
	3.5.6 Immunogenicity of nRings-3M2e upon Intramuscular Immunization	36
	Nanoassemblies	<b>)</b> 1
3.6	Conclusion	<b>)</b> 5
3.7	Supporting information	€
CHA	PITRE IV DISCUSSION10	)4
	4.1 La flagelline de <i>Bacillus subtilis</i> induit une réponse inflammatoire réduite	75
	4.2 Les flagellines de <i>Bacillus</i> et <i>Salmonella</i> induisent des réponses similaires	5
	en anticorps spécifiques dirigés contre le M2e10 4.3 Le positionnement sélectif de l'antigène 3M2e dans la séquence de Hag	)8
	permet le contrôle de son assemblage en différentes nanostructures11	0
	4.4 Les nanoparticules de flagelline sont efficacement internalisées par les	14
	4.5 Les nanoparticules de flagelline activent le système immunitaire inné	15
	4.6 Les nanoparticules de flagelline augmentent la réponse immunitaire	
	spécifique à l'anticorps greffé11	16
CON	CLUSION ET PERSPECTIVES12	20
יחום		าา
DIDI	$_{\rm IUUKAF\Pi IC}$	<u>'</u>

## LISTE DES FIGURES

# Figure

## Page

Présentation de l'antigène et génération de la réponse immunitaire adaptative suivant la vaccination
Principaux types de vaccins
Représentation schématique de la structure tridimensionnelle et de la séquence des flagellines bactériennes et identification des domaines
Arrangement des monomères de flagelline dans le flagelle bactérien 18
Exemples de capsides virales utilisées pour la conception de vaccins à base de particules pseudovirales (VLP)
Exemples de nanoparticules protéiques évaluées en vaccination25
Composition du virus influenza A
Comparison of amino acid sequence and secondary structure of recombinant flagellins derived from <i>B. subtilis</i> (Hag) and <i>S.</i> Typhimurium (FljB)
TLR5 signaling activities of Hag and FljB
Flagellin Hag shows reduced proinflammatory properties in comparison to FljB
Hag-3M2e induces reduced weight loss and equivalent potentiation of the M2e-specific immune response compared to FljB-3M2e
Anti-M2e western blot analysis of Hag and FljB flagellins and 3xM2e protein
Résumé graphique de l'article II
Design of chimeric flagellins and their assembly into nanostructures
Characterization of Hag-3M2e <sub>Ct</sub> self-assembly into nRings-3M2e79
Cellular uptake of Hag-3M2ect and nRings-3M2e by APCs
TLR5 stimulation by Hag-3M2e <sub>Ct</sub> and nRings-3M2e

3.6	Evaluation of the innate immune response induced by monomeric and assembled Hag flagellin
3.7	Immunogenicity of monomeric and assembled Hag-3M2e <sub>Ct</sub>
3.8	Specific antibody response directed against Hag
3.9	Specific anti-M2e immune response and experimental challenge against the influenza A virus
3.S1	Coomassie Blue stained SDS-PAGE (left) and anti-M2e western blot (right) analysis of the proteins
3.S2	Diameter of the flagellin-based nanotubes determined by TEM imaging 99
3.83	Representative TEM negatively stained images of low aspect ratio nanostructures obtained from the assembly of Hag-3M2e <sub>Ct</sub> in presence of 400 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
3.S4	Representative TEM negatively stained images of nanotubes formed by the assembly of Hag-3M2e <sub>Ct</sub> in presence of 800 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 101
3.85	Far-UV and near-UV CD spectra of monomeric flagellin and assembled nanotubes
3.S6	Representative TEM negatively stained images of Alexa488-labeled nRings- 3M2e
4.1	Images des assemblages de flagellines avec la séquence 3M2e en C-terminal par microscopie électronique transmission
4.2	Pourcentage de survie des souris immunisées après infection expérimentale avec le virus influenza A H1N1

## LISTE DES TABLEAUX

Table	eau P	age
1.1	Adjuvants approuvés chez l'humain et leurs mécanismes	. 12
1.2	Principales cytokines sécrétées suivant l'activation du TLR5 par la flagelline et leurs fonctions	. 16
1.3	Exemples d'utilisation des flagellines dans les formulations vaccinales	. 20
1.4	Séquences de l'épitope M2e de souches du virus influenza A humaines, aviaires et porcines	. 33
3.S1	Scale for clinical symptoms of influenza infection	. 97

# LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADCC	« <i>Antibody-dependant cell cytotoxicity</i> »; cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps					
ADN	Acide désoxyribonucléique					
Alum	Sels d'aluminium					
ARN	Acide ribonucléique					
BCR	« <i>B cell receptor</i> »; récepteur de cellule B					
CD	« Circular dichroism »; dichroïsme circulaire					
CDC	« Complement-dependant cytotoxicity »; cytotoxicité dépendante du complément					
СМН	Complexe majeur d'histocompatibilité					
CPA(APC)	Cellules présentatrices d'antigènes (antigen-presenting cells)					
CpG	Cytosine phosphoguanosine					
DC	Cellule dendritique					
ELISA	« Enzyme-linked immunosorbent assay »; méthode immuno- enzymatique					
Fc	Fragment cristallisable					
НА	Hémagglutinine					
HbcAg	Protéine Core du virus de l'Hépatite B					
IFN	Interféron					
Ig	Immunoglobuline					

i.m.	Intramusculaire
i.n.	Intranasal
i.p.	Intrapéritonéal
IL	Interleukine
M1	Protéine matrice 1
M2	Protéine matrice 2
MIP	« Macrophage inflammatory protein »; protéine inflammatoire des macrophages
NA	Neuraminidase
NLR	« Nod-like receptor »; récepteur de type NOD
NK	« Natural killer »
PAMP	« Pathogen-associated molecular pattern »; motifs moléculaires associés aux pathogènes
ppi	Post première immunisation
PRR	« <i>Pattern recognition receptor</i> »; récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
SAPN	« <i>Self-assembling protein nanoparticle</i> »; nanoparticule de protéines d'autoassemblage
Tc	T cytotoxique
TCR	« <i>T cell receptor</i> »; récepteur de cellule T
Th	« <i>T helper</i> »; T auxiliaire
TLR	« Toll-like receptor »; récepteur de type toll
TMV	« Tobacco mosaic virus »; virus de la mosaïque du tabac
TNF	« Tumor necrosis factor »; facteur de nécrose tumorale

# VIH Virus de l'immunodéficience humaine

VLP « Virus-like particle »; particule pseudo-virale

## RÉSUMÉ

La vaccination est une des pratiques de santé publique les plus efficaces pour lutter contre les maladies infectieuses. Les vaccins de nouvelle génération, incluant les vaccins sous-unitaires, sont plus sécuritaires que les vaccins traditionnels. Ils sont cependant faiblement immunogènes et requièrent l'utilisation de molécules adjuvantes augmentant la réponse immunitaire. À ce jour, peu d'adjuvants sont approuvés pour l'utilisation chez l'humain. Les flagellines, protéines s'autoassemblant en flagelles bactériens, ont montré un fort potentiel adjuvant via l'activation du récepteur de type toll 5 (TLR5). Leur utilisation en vaccination demeure toutefois limitée par les effets inflammatoires et les réponses hors-cible et dirigée contre la flagelline qu'elles induisent chez l'organisme hôte. Considérant les capacités adjuvantes robustes de ces protéines et le besoin grandissant de molécules adjuvantes, il devient primordial d'explorer de nouvelles avenues pour l'utilisation efficace et sécuritaire des flagellines en vaccination. À ce jour, les études sur les propriétés adjuvantes des flagellines se sont majoritairement limitées aux flagellines de Salmonella enterica, FliC et FljB, et leur capacité d'autoassemblage a été très peu exploitée pour la conception de nanovaccins, nanostructures présentant de nombreux avantages en vaccination. Dans ce contexte, nous avons étudié les propriétés immunostimulantes de la flagelline de Bacillus subtilis, Hag, conjuguée à trois copies de l'épitope modèle M2e conservé entre les souches du virus influenza A, ainsi que celles de nanostructures dérivées de son assemblage. Cette flagelline dite « minimale » ne contient que les domaines protéiques nécessaires à son autoassemblage et à l'activation du TLR5, sans les principaux domaines cibles de la réponse immunitaire spécifique contre FliC et FljB. Les résultats indiquent que Hag présente une capacité immunostimulante spécifique équivalente et une réponse inflammatoire aiguë diminuée par rapport à FljB chez les souris immunisées. Ces travaux montrent également la modulation de l'assemblage de Hag en nanostructures ayant une taille optimale pour la vaccination par le positionnement de la séquence antigénique 3M2e en C-terminal de la protéine. Ces nanostructures ont montré des capacités adjuvantes intrinsèques robustes et induit une forte immunité spécifique et protectrice contre une infection au virus influenza A. Globalement, ces travaux ouvrent de nouvelles voies vers l'utilisation des flagellines minimales et de leurs assemblages en tant qu'adjuvants et nanostructures porteuses d'antigènes en vaccination.

Mots clés : Flagelline, adjuvants, nanovaccins, virus de l'influenza A, récepteur de type toll 5

#### CHAPITRE I

#### INTRODUCTION

#### 1.1 La vaccination

Le contexte actuel, où la pandémie de la COVID-19 continue de faire des victimes à l'échelle planétaire deux ans après son apparition, souligne encore une fois l'importance de la vaccination dans la lutte contre les maladies infectieuses (Rodrigues et Plotkin, 2020). Or, la vaccination est un concept qui existe depuis quelques milliers d'années. Les premières traces d'immunisation prophylactique contre la variole remontent au X<sup>e</sup> siècle en Chine (Canouï et Launay, 2019). Le terme « vaccination » est cependant né vers la fin du XVIIIe siècle, alors qu'Edward Jenner a découvert que l'administration de la vaccine, ou variole de la vache, aux humains permettait de les protéger contre la variole. Les travaux de Louis Pasteur et de ses étudiants ont ensuite permis d'étendre la vaccination à d'autres pathogènes incluant le choléra du poulet et la rage (Canouï et Launay, 2019). Grâce à ces avancées, la variole est aujourd'hui éradiquée, et la vaccination constitue un outil crucial dans la lutte contre les maladies infectieuses émergentes. On estime que la vaccination permet de sauver des millions de vies humaines annuellement tout en évitant des pertes économiques majeures liées à la productivité et à la santé des animaux d'élevage (Orenstein et Ahmed, 2017; Rodrigues et Plotkin, 2020).

#### 1.1.1 De l'immunité innée à l'immunité adaptative

Le système immunitaire est responsable de l'élimination des pathogènes et des substances étrangères de l'organisme. Pour mieux comprendre la complexité des mécanismes impliqués dans la réponse immunitaire, celle-ci est souvent divisée en deux grandes catégories, soit l'immunité innée et l'immunité adaptative (Vivier et Malissen, 2005). L'immunité innée intervient rapidement et de manière peu spécifique lors d'une infection ou en présence de substances étrangères. L'immunité adaptative intervient temporellement à la suite de l'immunité innée et génère des réponses d'une plus grande spécificité à la substance ou à l'organisme à éliminer (Chaplin, 2010; Iwasaki et Medzhitov, 2010). La réponse immunitaire adaptative comprend aussi la génération d'une réponse mémoire qui est d'une importance critique en vaccination (Pollard et Bijker, 2021).

Le système immunitaire inné comprend d'abord de nombreuses barrières empêchant l'entrée de pathogènes dans l'organisme, telles que la peau et les muqueuses (Chaplin, 2010; Holmgren et Czerkinsky, 2005). Il comprend aussi le système du complément, qui consiste en une série de protéines dans le sang et les fluides corporels causant la lyse de cellules infectées et l'opsonisation des pathogènes, et de nombreux types cellulaires, tels que les macrophages, les cellules dendritiques (DC – *dendritic cells*), les neutrophiles et les *Natural Killers* (NK) (Janeway et Medzhitov, 2002). Les macrophages, les DC et certaines cellules épithéliales ont la capacité de reconnaitre les pathogènes de manière plus ou moins spécifique à l'aide de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR – *pattern recognition receptors*) (Akira *et al.*, 2006). Les PRR reconnaissent des composantes communes chez les pathogènes, appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP – *pathogen-associated molecular pattern*), et sont divisés en plusieurs familles. Une des familles de PRR les plus répandues est celle des récepteurs de type toll (TLR – *toll-like receptors*), qui sont

transmembranaires et qui reconnaissent une grande variété de PAMP. Par exemple, les TLR 1, 2 et 6 se trouvent à la surface cellulaire et reconnaissent majoritairement des composantes lipidiques de bactéries, parasites ou virus, alors que les TLR 7, 8 et 9 sont intracellulaires, ancrés dans la membrane des endosomes, et reconnaissent les acides nucléiques. Les récepteurs de type NOD (NLR – *NOD-like receptors*) sont une autre famille de PRR intracellulaires qui reconnaissent une variété de composantes bactériennes (Olive, 2012). Les autres familles de PRR comprennent les récepteurs de type RIG (RLR – *RIG-like receptors*), récepteurs intracellulaires qui lient spécifiquement les acides nucléiques de virus, et les récepteurs lectines de type C (CLR – *C-type Lectin Receptors*), récepteurs transmembranaires qui reconnaissent des sucres (Iwasaki et Medzhitov, 2010). Lorsqu'un PAMP se lie à l'un de ces PRR, différentes cascades de signalisation mènent à la maturation et l'activation de la cellule, ainsi qu'à la production de cytokines et de chimiokines, molécules de nature protéique impliquées dans la réponse inflammatoire et dans le recrutement et la maturation d'autres cellules immunitaires (Kaisho et Akira, 2001; Olive, 2012).

En plus de leur capacité à reconnaitre les pathogènes à l'aide de PRR, les macrophages et les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et permettent de faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Trombetta et Mellman, 2004). L'activation de PRR à leur surface induit leur maturation, qui se traduit dans un premier temps par la surexpression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et des molécules de costimulation CD80 et CD86 (Figure 1.1). (Giraldo *et al.*, 2015; Medzhitov *et al.*, 1997). Les CPA matures jouent un rôle crucial dans l'activation de cellules de l'immunité adaptative Elles ont la capacité d'internaliser les pathogènes et les particules vaccinales pour ensuite en présenter de courts segments, des peptides immunogéniques, aussi appelés antigènes, à leur surface, liés à des molécules de CMH. Les CPA sont les seules cellules à exprimer des molécules de CHM de classe II et présentent habituellement les antigènes internalisés sur ces molécules. Le CMH de

classe I est exprimé à la surface de toutes les cellules nucléées et seulement les cellules infectées y présentent des antigènes de pathogènes à combattre. Cependant, par le processus de présentation croisée, les DC ont la particularité de pouvoir présenter des antigènes extracellulaires, comme ceux provenant de la vaccination, sur des molécules de CMH I (Trombetta et Mellman, 2004; Yewdell *et al.*, 1999). Les CPA terminent leur maturation en migrant vers les ganglions lymphatiques, distribués partout dans le corps, ou la rate, où elles vont présenter les antigènes et activer des cellules de l'immunité adaptative (Stoll *et al.*, 2002).



Figure 1.1 Présentation de l'antigène et génération de la réponse immunitaire adaptative suivant la vaccination. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), tel les cellules dendritiques (DC) font le lien entre l'immunité innée et adaptative. (1) Les antigènes dans le vaccin peuvent être internalisés par les DC. (2) La reconnaissance d'un adjuvant par un récepteur de motif moléculaire associé aux pathogènes (PRR) à la surface des DC stimule leur migration dans les ganglions lymphatiques et la présentation de

l'antigène. (3) Les antigènes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CHM II) et I (CMH I) sont reconnus par le récepteur de cellules T (TCR) des cellules T auxiliaires (Th) CD4<sup>+</sup> et des cellules T cytotoxiques (Tc) CD8<sup>+</sup>, respectivement. La liaison des molécules de costimulation CD80 ou CD86 à la surface des DC par le CD28 fournit un second signal d'activation aux cellules T. (4) Les cellules Th activées se différencient en Th1 ou Th2. Les Th1 aident à l'activation des Tc et d'autres cellules telles les macrophages et les cellules NK, et peuvent induire la production d'anticorps favorisant la phagocytose. Les Th2 aident à l'activation des cellules B dont le BCR est lié à un antigène soluble. (5) Les cellules B activées prolifèrent et se différencient en cellules B mémoires et en plasmocytes, qui produisent des anticorps. (6) Les cellules T activées prolifèrent et se différencient adaptée de (Pollard et Bijker, 2021).

Le système immunitaire adaptatif comprend majoritairement deux types cellulaires, les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les lymphocytes B et T maturent dans la moelle osseuse et le thymus, respectivement, puis migrent de ces organes lymphoïdes primaires vers les organes lymphoïdes secondaires, dont la rate et les ganglions lymphatiques (Hampton et Chtanova, 2019; Lai et Kondo, 2008). Chaque lymphocyte B et T mature exprime à sa surface des récepteurs spécifiques à un antigène, les récepteurs de cellules B (BCR – *B cell receptor*) ou les récepteurs de cellules T (TCR - T cell receptor). Les lymphocytes T sont souvent séparés en deux grandes catégories selon les marqueurs de surface qu'ils expriment suivant leur maturation. Les cellules T exprimant à leur surface le marqueur CD4 (T CD4<sup>+</sup>) sont généralement catégorisées comme des cellules T auxiliaires (Th - T helper), alors que celles exprimant le marqueur CD8 (T CD8<sup>+</sup>) sont classées comme des cellules T cytotoxiques (Tc) (Pennock et al., 2013). Les CPA ayant migré dans les organes lymphoïdes secondaires et présentant un antigène sur des molécules de CMH II peuvent stimuler des cellules Th possédant un TCR spécifique à cet antigène. Le TCR se lie alors au complexe antigène-CMH II et les molécules de costimulation, CD80 ou CD86, à la surface des CPA se lient au CD28 à la surface des cellules T (Guermonprez et al., 2002; Swain, 1995). Ces deux signaux, ainsi que la présence de cytokines sécrétées par les CPA et autres cellules immunitaires, sont requis pour l'activation et la polarisation des

lymphocytes Th (Guermonprez et al., 2002; Pennock et al., 2013). La présence d'interleukine 12 (IL-12) induit habituellement la polarisation en Th1, qui aident à l'activation subséquente des lymphocytes Tc, des macrophages et d'autres cellules phagocytaires, et induisent donc une immunité à médiation cellulaire permettant l'élimination de cellules infectées. Les cellules Th1 induisent aussi une certaine immunité humorale en favorisant la production d'anticorps opsonisants et fixant le complément, qui aident à la phagocytose et augmentent donc l'efficacité de l'immunité à médiation cellulaire (Santarlasci et al., 2013; Spellberg et Edwards, 2001). La présence d'IL-4 permet la polarisation en Th2 qui activent ensuite les lymphocytes B et induisent une immunité humorale. Alors que la réponse Th2 permet l'élimination de pathogènes extracellulaires comme les parasites, la réponse Th1 est connue pour faciliter l'élimination des pathogènes intracellulaires tels que les virus (Swain, 1995). Les anticorps résultant de la réponse Th1 jouent cependant aussi un rôle dans l'élimination des pathogènes extracellulaires en favorisant leur phagocytose et leur élimination par le système du complément (Santarlasci et al., 2013; Spellberg et Edwards, 2001).

Les cellules Th1 aident notamment à l'activation des cellules Tc en stimulant la surexpression de molécules de costimulation à la surface des CPA et en sécrétant de l'IL-2 qui stimule la prolifération des Tc. Alors que la présentation par les CPA d'un antigène sur le CMH I permet la stimulation de lymphocytes Tc par l'interaction avec un TCR spécifique à l'antigène, la liaison des molécules de costimulation au CD28 fournit un second signal d'activation aux cellules Tc. Les cytokines, notamment l'IL-2 et IL-12, constituent le troisième signal d'activation (Guermonprez *et al.*, 2002; Trombetta et Mellman, 2004). Les Tc peuvent alors se différencier en cellules mémoires ou en Tc effectrices circulantes qui provoquent la lyse de cellules infectées présentant à leur surface les antigènes cibles liés à leur CMH I (Pennock *et al.*, 2013). Les cellules Th1 peuvent aussi aider les Tc à accomplir leur fonction effectrice par la

sécrétion d'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), qui régule à la hausse la présentation de complexes antigènes-CMH I à la surface des cellules infectés, augmentant ainsi leur reconnaissance et leur élimination par les Tc (Swain *et al.*, 2012).

Les cellules Th2, ainsi que les cellules Th1, médient la réponse immunitaire humorale et aident à l'activation des lymphocytes B. Contrairement aux lymphocytes T, les lymphocytes B, à l'aide de leur BCR, reconnaissent des antigènes spécifiques qui n'ont pas été digérés par des CPA et qui ne sont pas associés à des molécules de CMH. Les antigènes reconnus sont plutôt solubles ou captés de manière non spécifique à la surface de cellules dendritiques folliculaires (FDC) résidentes des organes lymphoïdes secondaires (Allen et al., 2007; Heesters et al., 2016). Les FDC ne sont pas issues de la même lignée que les DC conventionnelles et ne sont pas des CPA (Aguzzi et al., 2014; Heesters et al., 2013). Les lymphocytes Th1 et Th2 activés jouent un rôle crucial dans l'activation des cellules B (Santarlasci et al., 2013). En effet, les cellules Th1 ou Th2 préalablement activées ayant un TCR de spécificité appropriée se lient à l'antigène à la surface de la cellule B et produisent diverses cytokines comme l'IL-4 et l'IL-21 impliquées dans la survie et la différenciation des cellules B (Crotty, 2015). Les cellules B activées prolifèrent rapidement et forment un centre germinatif, où les BCR subissent une maturation d'affinité envers l'antigène et se différencient en cellules mémoires ou effectrices, les plasmocytes. Les plasmocytes sécrètent ensuite des immunoglobulines (Ig), aussi nommées anticorps (Nutt et al., 2015).

Les anticorps sont des protéines en forme de Y contenant deux chaînes légères et deux chaînes lourdes. Ils peuvent être divisés en deux fragments, le fragment de liaison à l'antigène (Fab – *fragment antigen-binding*) et le fragment cristallisable (Fc). Chez les mammifères, il existe cinq classes d'anticorps définis par le type de la chaîne lourde, les IgM, les IgD, les IgG, les IgA et les IgE. Chaque plasmocyte ne sécrète qu'une seule classe d'anticorps suite au processus de commutation de classe dans le centre

germinatif (Chaplin, 2010). Les IgM sont souvent exprimés à la surface des lymphocytes B naïfs, et font alors partie des BCR. Ils sont aussi connus pour leur forme sécrétée pentamérique, qui peut induire la cascade du complément, résultant ainsi en la lyse de la cellule reconnue par les anticorps (CDC - complement-dependant *cytotoxicity*). Comme les IgM, les IgD sont exprimés à la surface des cellules B naïves et agissent comme des BCR, mais leur forme sécrétée est retrouvée en très faibles concentrations dans le sérum. Les IgG sont la classe la plus abondante d'anticorps sécrétés et sont divisés en plusieurs sous-classes, soit les IgG1, 2, 3 et 4 chez l'humain, ou les IgG1, 2a, 2b, 2c et 3 chez la souris. Ils jouent un rôle dans la neutralisation et l'opsonisation des pathogènes et la fixation du complément (Collins, 2016; de Taeve et al., 2019; Vidarsson et al., 2014). Le domaine Fc des IgG formant un complexe immun avec un antigène peut aussi être reconnus par les récepteurs Fc pour IgG (Fc $\gamma$ R) de certaines cellules immunitaires, ce qui induit la phagocytose (ADP - antibodydependant phagocytosis) par les macrophages ou la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC - antibody-dependant cell cytotoxicity) médiée par les cellules NK (de Taeye et al., 2020; Tay et al., 2019). Les IgA sont majoritaires dans les muqueuses, où ils sont habituellement retrouvés sous forme de dimères, et jouent un rôle central dans la neutralisation des pathogènes pour empêcher l'infection des cellules de l'hôte. Les IgE se trouvent en très faibles concentrations dans le sérum et sont généralement associés aux réactions allergiques ou à une réponse immunitaire contre certains helminthes (Chaplin, 2010; Schroeder et Cavacini, 2010).

Le chevauchement entre l'immunité innée et l'immunité adaptative est d'une grande importance en infectiologie et en vaccination. Il permet non seulement de générer de nombreuses cellules effectrices, mais aussi plusieurs cellules B et T mémoires. L'établissement de cette réponse mémoire est le but premier en vaccination afin de permettre ultimement une réponse adaptative rapide lors d'une exposition subséquente au pathogène cible (Pollard et Bijker, 2021).

#### 1.1.2 Évolution et diversification des vaccins

Historiquement, les vaccins étaient composés de pathogènes vivants atténués (Figure 1.2). Leur atténuation les rend assez peu virulent pour ne pas engendrer une infection importante chez la plupart des patients vaccinés, mais assez immunogènes pour induire une forte réponse immunitaire. La majorité des vaccins utilisés en clinique reposent sur cette approche, tel que le vaccin de la rougeole et certains vaccins contre l'influenza (Pollard et Bijker, 2021). Néanmoins, ces formulations vaccinales présentent des risques de retour à la virulence, pouvant causer des problèmes de santé, surtout chez les patients immunodéprimés (Kenney et al., 2011). Les vaccins non-vivants ne contiennent pas de composantes permettant la réplication du pathogène et sont donc plus sécuritaires. Les premiers vaccins non-vivants ayant été développés consistent en des pathogènes inactivés ou tués. Cette stratégie est notamment utilisée dans les vaccins contre la rage (Hicks et al., 2012). Cependant, les vaccins non-vivants de nouvelle génération permettent de cibler un antigène spécifique, et leur formulation est généralement plus stable que celle des vaccins atténués ou inactivés. Deux exemples de vaccins de nouvelle génération sont les vaccins à acides nucléiques et les vaccins à sous-unité recombinante, utilisés respectivement dans les formulations contre la COVID-19 et l'hépatite B (Corbett et al., 2020; Keating et Noble, 2003). Les vaccins à acides nucléiques sont constitués de séquences d'acides désoxyribonucléiques (ADN) ou ribonucléiques (ARN) codant pour une protéine spécifique, qui sera exprimée par les cellules de l'organisme hôte et constituera l'antigène cible de la réponse immunitaire (Pollard et Bijker, 2021). Les vaccins sous-unitaires sont principalement constitués d'un antigène spécifique, souvent de nature protéique, contre lequel on souhaite diriger la réponse immunitaire adaptative (Zhang et al., 2014). Ces vaccins ont l'avantage de nécessiter des conditions de stockage et de transport moins contraignantes que les vaccins à ADN et ARN (Cohen et al., 2007; Crommelin et al., 2021). Cependant, comme la plupart des vaccins non-vivants, ils sont faiblement

immunogènes et nécessitent donc l'administration de doses de rappel et/ou la coadministration avec des substances permettant d'augmenter la réponse immunitaire, connues sous le nom d'adjuvant (Reed *et al.*, 2013).



Figure 1.2 Principaux types de vaccins. Les premiers vaccins développés étaient composés de pathogènes atténués ou inactivés. Les vaccins de nouvelle génération sont à base d'acides nucléiques (ADN ou ARN) ou de sous-unités protéiques. Figure adaptée de (Gorry *et al.*, 2007).

#### 1.1.3 Les adjuvants

Les adjuvants immunitaires sont des substances de nature organique ou inorganique qui augmentent la durée et/ou l'amplitude de la réponse immunitaire. Leur utilisation dans des formulations vaccinales permet de réduire la dose de vaccin et/ou le nombre d'administrations nécessaires, en plus d'augmenter l'efficacité du vaccin chez les populations affichant un système immunitaire affaibli, telles les personnes âgées et les personnes immunodéprimées (Pasquale *et al.*, 2015; Reed *et al.*, 2013). Selon les principes mentionnés plus haut, pour induire une réponse immunitaire efficace, un vaccin doit être constitué minimalement d'un antigène cible et d'une composante

activant le système immunitaire inné. Les adjuvants ont des mécanismes d'action diversifiés, mais plusieurs adjuvants sont reconnus pour induire une réponse immunitaire innée robuste via l'activation d'un ou de plusieurs PRR. Cette activation résulte en un recrutement de cellules immunitaires au site d'injection et une activation des CPA (Kumar et al., 2019; Reed et al., 2013). Le premier adjuvant approuvé pour son utilisation chez les humains était les sels d'aluminiums (alum), dont les propriétés adjuvantes ont été découvertes dans les années 1920. Ses mécanismes d'action demeurent encore aujourd'hui l'objet d'actifs débats, mais des études indiquent qu'il activerait l'inflammasome NLRP3 et induirait le recrutement de cellules immunitaires et une augmentation de la présentation d'antigènes (Tableau 1.1) (Kool et al., 2008). L'alum est utilisé dans de nombreuses formulations vaccinales comme les vaccins contre l'hépatite A et contre la diphtérie-coqueluche-tétanos (Kool et al., 2012). Il existe quelques autres adjuvants approuvés pour l'utilisation chez l'humain, tels que l'AS04, AS03 et l'AS01, trois formulations contenant du 3-O-desacyl-4monophosphoryl lipid A (MPL), un PAMP activant le TLR4. Ces formulations sont utilisées dans les vaccins contre l'hépatite B (Fendrix®), l'influenza (Pandemrix®) et le zona (Shingrix®) (Cohet et al., 2019; Pulendran et al., 2021). Les autres adjuvants approuvés chez l'humain sont le MF59, une émulsion huile-eau, qui induit une réponse inflammatoire et active les CPA au site d'injection par des mécanismes peu documentés, et le cytosine phosphoguanosine (CpG) 1018, un agoniste du TLR9 (Pulendran et al., 2021). Malgré la grande diversité de molécules immunostimulantes découvertes dans les trois dernières décennies, peu d'entre elles sont aujourd'hui autorisées pour l'utilisation chez l'humain. Une faible proportion d'entre elles sont efficaces pour l'administration mucosale, une voie d'immunisation particulièrement intéressante pour combattre les infections respiratoires, telles que celles associées à la COVID-19 et à la grippe (Kumar et al., 2019).

Tableau 1.1 Adjuvants approuvés chez l'humain et leurs mécanismes. Adapté de (Pulendran et al., 2021).

Adjuvant	Mécanismes connus		
Alum Hydroxyde d'aluminium Phosphate d'aluminium	Réponse d'anticorps indépendante de la signalisation TLR. Activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages et DC. Recrutement rapide des cellules immunitaires.		
MF59 Squalène Tween 80 Span 85	Activation des macrophages et les DC au site d'injection. Induction de la sécrétion de chimiokines. Réponses en anticorps et en lymphocytes T CD4+. Activation des voies de l'apoptose indépendante des PRR.		
AS04 Alum MPL	Présentation améliorée de l'antigène par les DC activées par AS04 en comparaison avec l'alum. Activation du TLR4 par MPL. Prolongation de la réponse TLR4 par l'alum.		
AS03 Squalence α-tocophérol Tween 80	Potentielle activation d'un récepteur de l'immunité innée. Sécrétion locale de chimiokines et diffusion dans les vaisseaux lymphatiques. Activation des monocytes humains et macrophages.		
AS01 MPL QS-21 Liposomes	Sécrétion locale de chimiokines et d'IFN-γ par les cellules NK et dans les ganglions lymphatiques par les cellules T CD8+. Activation du TLR4 et des cellules immunitaires. Activation des DC et autres APC et augmentation de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T		
CpG 1018 ADN simple brin à 22 bases azotées	Activation du TLR9. Sécrétion de cytokines antivirales.		

TLR: récepteur de type toll, NLR : récepteur de type NOD, DC : cellule dendritiques, MPL : monophosphoryl lipid A, APC : cellule présentatrice d'antigène, CpG : cytosine phosphoguanosine

#### 1.2 Flagelline

Les flagellines sont des protéines qui composent la tige du flagelle bactérien, organelle responsable de la mobilité des bactéries. La structure et la séquence des flagellines varient selon l'espèce bactérienne. Elles sont composées au minimum de deux domaines, D0 et D1, et au maximum de quatre domaines, soit les domaines D0 à D3 (Maki-Yonekura *et al.*, 2010). Par exemple, les flagellines des bactéries du genre

Bacillus contiennent seulement les domaines D0 et D1, alors que celles des bactéries du genre Salmonella affichent les domaines D0 à D3 (Figure 1.3). Les domaines D0 et D1 présentent une grande homologie de séquence entre les espèces bactériennes et une structure secondaire riche en hélice  $\alpha$ . À l'opposé les domaines D2 et D3, lorsque présents, sont hypervariables et affichent une structure secondaire en feuillets  $\beta$  chez les Salmonella (Wang et al., 2017). Les flagellines composées des quatre domaines ont une structure tertiaire ressemblant à un « L » inversé, dans laquelle les résidus en N- et en C-terminal de la séquence primaire interagissent et forment le domaine D0 et D1, et les résidus en milieu de séquence forment les domaines D2 et D3 (Yonekura et al., 2003). Dans la séquence primaire, les domaines D0 à D2 sont donc discontinus et la séquence constituant le domaine D3, ou un domaine charnière pour les flagellines ne contenant pas les domaines D2 et D3, est continue. Les domaines D0 et D1 peuvent être divisés en domaines ND0 et ND1, et CD0 et CD1 pour distinguer les hélices constituées des résidus en N- et en C-terminal. Dans les deux dernières décennies, les flagellines ont fait l'objet de nombreuses études non seulement concernant la structure. détermination de leur mais également sur leurs propriétés immunostimulantes pour des applications en vaccinologie



Figure 1.3 Représentation schématique de la structure tridimensionnelle et de la séquence des flagellines bactériennes et identification des domaines. (a) Flagelline du genre *Salmonella*, FljB (PDB: 6RGV). (b) Flagelline du genre *Bacillus*, Hag (PDB: 5WJT)

#### 1.2.1 Propriétés immunostimulantes de la flagelline

La flagelline est reconnue comme étant un fort activateur de l'immunité innée pouvant favoriser une réponse immunitaire mixte Th1/Th2 (Girard *et al.*, 2011; Hajam *et al.*, 2017). En effet, la flagelline est le principal agoniste du récepteur TLR5, en plus d'induire l'activation de l'inflammasome NLRC4 lorsqu'elle se retrouve dans l'espace cytoplasmique (Hayashi *et al.*, 2001; Matusiak *et al.*, 2015; Mizel et Bates, 2010). La capacité immunostimulante de la flagelline en vaccination est principalement due à l'activation du TLR5, qui est exprimé à la surface des cellules épithéliales et de plusieurs cellules de l'immunité innée, incluant les DC et les macrophages (Andreu *et al.*, 2017; Gewirtz *et al.*, 2001; Means *et al.*, 2003). La flagelline se lie à ce récepteur par deux interfaces situées dans ses domaines D0 et D1, fortement conservés entre les espèces bactériennes (Song *et al.*, 2017; Yoon *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015a). Le domaine C-terminal, particulièrement bien conservé entre les flagellines, joue également un rôle clé dans l'activation du TLR5 (Lu et Swartz, 2016). Suite à la liaison

de la flagelline, les complexes TLR5-flagelline dimérisent (Yoon et al., 2012), ce qui active une cascade de signalisation cellulaire passant par la protéine adaptatrice MyD88 et permettant ultimement la translocation des facteurs de transcription NF-κB et AP-1 au noyau (Hajam et al., 2017). Ces facteurs de transcription induisent la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines par les cellules stimulées, telles que l'IL-6, le facteur de nécrose tumorale (TNF – *Tumor necrosis* factor)  $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , l'IL-12 p40, ainsi que les protéines inflammatoires des macrophages (MIP) 1a et 2 (Tableau 1.2) (Eaves-Pyles et al., 2001; Feuillet et al., 2006). L'IL-6, le TNF-α et l'IL-1 sont des cytokines ayant des effets pro-inflammatoires et agissant sur de nombreux types cellulaires, incluant les lymphocytes B et T. Les chimiokines MIP-1 $\alpha$  et 2 et les cytokines de la famille de l'IL-12 sont quant à elles impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires, tel que des DC au site d'injection (Vignali et Kuchroo, 2012; Zhang et An, 2007). La translocation de NF- $\kappa$ B au noyau suite à l'activation du TLR5 par la flagelline des DC stimule aussi leur maturation, qui se traduit par une surexpression des molécules de CMH II et de costimulation CD80 et 86 à leur surface (Didierlaurent et al., 2004; Feuillet et al., 2006; Means et al., 2003). Cette capacité à activer l'immunité innée et à stimuler la maturation des CPA font de la flagelline un adjuvant intéressant pour la vaccination. De plus, la forte expression du récepteur TLR5 à la surface des cellules épithéliales tapissant les muqueuses fait de la flagelline un adjuvant de choix pour l'administration de formulations vaccinales par la voie mucosale (Wang et al., 2012).

Cytokines Principales cellules		Activités		
	sécrétrices			
IL-6	Cellules Th2 activées,	Réponse inflammatoire aiguë,		
	CPA, cellules	prolifération des cellules B, synergie		
	épithéliales et autres	avec IL-1 et TNF- $\alpha$ , activation de		
		cellules immunitaires		
TNF-α	Macrophages, cellules	Apoptose, recrutement de cellules		
	NK et autres	immunitaires, inflammation, douleur		
<b>IL-1</b> <i>α</i> Macrophages et autres		Costimulaion des CPA et des cellules T,		
<b>ΙL-1β</b> CPA		fièvre et inflammation, phase aiguë		
IL-12	Macrophages, DC et	Chimiotractant, recrutement de CPA,		
	cellules B	inflammation (Cooper et Khader, 2007)		
MIP-1a	Macrophages, DC et	Chimiotractants, recrutement de cellules		
MIP-2 cellules NK		immunitaires		

Tableau	1.2	Principales	cytokines	s sécrétées	suivant	l'activation	du	TLR5	par	la
flagellin	e et l	eurs fonctior	ns. Adapté	de (Zhang	et An, 20	007).				

IL : Interleukine, TNF : Facteur de nécrose tumorale, MIP : Protéine inflammatoire des macrophages

#### 1.2.2 Flagelle bactérien et assemblages de flagelline

En plus de ses capacités immunostimulantes importantes, la flagelline est reconnue pour s'autoassembler en filaments. Suivant son expression par la bactérie, la flagelline est sécrétée à la surface en diffusant à travers le canal central du système de sécrétion flagellaire de type III et s'assemble en flagelle (Minamino *et al.*, 2021). Le flagelle bactérien peut atteindre quelques µm de longueur et son diamètre varie entre 12 et 25 nm, dépendant de l'espèce bactérienne et du nombre de domaines constituant les sous-unités de flagelline. Les flagelles, organisés en nanotubes, sont caractérisés par une cavité centrale d'environ 2,5 nm de diamètre. Ils sont composés de milliers de sous-

unités de flagelline organisées en 11 protofilaments (Figure 1.4). Chaque sous-unité de flagelline dans le flagelle montre une translation vers le haut et une rotation par rapport à l'axe du flagelle comparé à la sous-unité précédente (Yonekura et al., 2003). Les sous-unités de flagelline dans le flagelle forment un motif d'assemblage en superhélice et sont retenues ensemble par des interactions non-covalentes. Les domaines D0 et D1 sont nécessaires et suffisants pour l'assemblage du flagelle. Ils forment son cœur, tandis que les domaines D2 et D3, lorsque présents, sont exposés à sa surface (Wang et al., 2017; Yonekura et al., 2003). Les protofilaments y sont retenus ensemble par des interactions hydrophobes et des ponts hydrogènes entre les domaines ND1 des sous-unités de flagelline adjacentes, alors que l'élongation des protofilaments est assurée par des interactions entre le domaine D1 d'une sous-unité et le domaine D0 de la sous-unité suivante dans le protofilament. (Maki-Yonekura et al., 2010; Wang et al., 2017). Outre la voie d'assemblage chez les bactéries, des méthodes d'autoassemblage de la flagelline in vitro ont été développées dès les années 1960. Tout d'abord, des études ont montré la possibilité d'assembler des monomères de flagelline à partir de fragments issus de la sonication de flagelles, appelés *seeds*, ou par changement de pH près du point isoélectrique de la protéine (Abram et Koffler, 1964; Asakura et al., 1964). Par la suite, plusieurs études ont montré l'assemblage de flagellines en structures similaires aux flagelles natifs par précipitation avec des sels comme le citrate de sodium et le sulfate d'ammonium (NH4)2SO4 à pH physiologique (Ikeda et al., 1984; Lino, 1974; Sheffery et Newton, 1977; Wakabayashi et al., 1969). Des concentrations de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de l'ordre 0,3 M, équivalent à un pouvoir ionique de 0,9 M, sont suffisantes pour induire l'assemblage, qui est d'autant plus favorisé lorsque la concentration de flagelline monomérique ou de sels augmente (Lino, 1974; Uratani, 1974; Wakabayashi et al., 1969). De plus récentes études ont montré que les domaines D2 et D3 peuvent être remplacés par d'autres séquences protéiques, ayant des fonctions de reconnaissance, de catalyse ou autres, sans altérer l'assemblage en filaments, pour créer des biomatériaux fonctionnels (Klein et al., 2018; Kumara et al., 2006).



Figure 1.4 Arrangement des monomères de flagelline dans le flagelle bactérien. Figure adaptée de (Lu et Swartz, 2016).

#### 1.2.3 Utilisation de la flagelline en vaccination

Plusieurs études ont rapporté l'induction de fortes réponses immunitaires spécifiques chez des modèles animaux lors de l'administration de flagelline. Il a été démontré que les flagellines ont un fort potentiel non seulement en tant qu'adjuvant systémique, mais aussi en tant qu'adjuvant mucosal (Bates *et al.*, 2008; Honko et Mizel, 2004; Honko *et al.*, 2006). Les flagellines non-modifiées, comme celles de *Clostridium difficile* (Bruxelle *et al.*, 2017), *Pseudomonas aeruginosa* (Campodónico *et al.*, 2010), *Yersinia pestis* (Honko *et al.*, 2006), *Salmonella enterica* (Okamura *et al.*, 2012), administrées en tant qu'adjuvant et antigène (Tableau 1.3), ont montré une capacité à induire des réponses immunitaires spécifiques et protectrices contre une infection homologue. Les flagellines peuvent aussi servir d'adjuvants pour induire une réponse spécifique à un antigène par sa simple co-administration avec une flagelline, la réponse immune

spécifique envers cet antigène est plus élevée lorsque la flagelline est exprimée en fusion avec l'antigène cible (Huleatt et al., 2007b). La majorité des études de vaccination ont ciblé l'utilisation de formes monomériques des flagellines provenant du genre Salmonella, FliC et FljB, en fusion avec des antigènes hétérologues de nature protéique (Hajam et al., 2017). La fusion de ces flagellines avec des antigènes provenant de pathogènes bactériens ou de parasites, comme la protéine circumsporozoïte de Plasmodium vivax, a permis d'obtenir de fortes réponses en anticorps spécifiques à l'antigène suite à l'immunisation, protégeant ainsi l'hôte immunisé face à une infection subséquente (Camacho et al., 2011). Les flagellines de Salmonella se sont montrées particulièrement efficaces en fusion avec des antigènes viraux (Tableau 1.3), comme le domaine EII de la protéine de l'enveloppe du virus du Nil occidental (Huleatt et al., 2007a) et l'antigène M2e du virus influenza A (Huleatt et al., 2008) pour induire une immunité spécifique et protectrice contre une infection par ces virus. La flagelline FljB de S. enterica sérotype Typhimurium s'est aussi montrée efficace pour induire une réponse mémoire, alors que sa fusion avec des épitopes HA et M2e de virus influenza permettait d'augmenter la production de cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> mémoires contre ces épitopes suite à l'immunisation de souris (Stepanova et al., 2018). Des formulations vaccinales à base de protéines chimériques FljB fusionnée avec des épitopes du virus influenza A, ont d'ailleurs fait l'objet d'études cliniques chez l'humain (NCT00921947, NCT00730457, NCT01560793). Malgré la forte réponse spécifique qu'elles induisent, ces formulations vaccinales ne sont toujours pas approuvées par les instances règlementaires pour leur utilisation chez les humains et les animaux, puisqu'elles induisent une réponse inflammatoire prolongée accompagnée d'effets secondaires indésirables, comme une douleur importante au site d'injection, des douleurs musculaires et des maux de tête (Treanor et al., 2010; Turley et al., 2011).

Туре		Flagelline/	Pathogène	Antigène	Référence	
		Provenance	cible	cible		
vant et antigène		C. difficile	C. difficile	N/A	(Bruxelle <i>et al.</i> , 2017)	
		P. aeruginosa	P. aeruginosa	N/A	(Campodónico et al., 2010)	
		Y. pestis	Y. pestis	N/A	(Honko <i>et al.</i> , 2006)	
-::P V	AdJu	S. enterica	S. enterica	N/A	(Okamura <i>et al.</i> , 2012)	
	Co-ad.	S. Typhimurium	N/A	Ovalbumine	(Huleatt <i>et al.</i> , 2007b)	
semblé	Protéine de fusion	S. Typhimurium	N/A	Ovalbumine	(Huleatt <i>et al.</i> , 2007b)	
Adjuvant non ass			Virus du Nil occidental	Protéine d'enveloppe (Domaine EII)	(Huleatt <i>et al.</i> , 2007a)	
			Virus Influenza A	4 x M2e	(Huleatt <i>et al.</i> , 2008)	
		Proté	P. vivax	Protéine circumsporozoïte (Domaine C- term)	(Camacho <i>et al.</i> , 2011)	
blage	Co-ad.	S. Typhimurium	Virus Influenza A	Virus Influenza A (PR8) inactivé	(Skountzou <i>et al.</i> , 2010)	
Assem	Fusion	S. Typhimurium	Virus de la Dengue	DENV2	(Bennett <i>et al.</i> , 2015)	

Tableau 1.3 Exemples d'utilisation des flagellines dans les formulations vaccinales.

Co-ad: Co-administration, S. Typhimurium: Salmonella enterica sérotype Typhimurium

De façon surprenante, peu d'études ont été réalisées concernant l'utilisation de la flagelline assemblée en tant qu'adjuvant. Alors que les filaments montrent une capacité d'activation du TLR5 réduite par rapport à la flagelline monomérique (Smith *et al.*,

2003), ceux-ci conservent leurs propriétés adjuvantes. En effet, lorsque co-administrés par voie mucosale avec le virus influenza A (PR8) inactivé adapté aux souris, les filaments de flagelline augmentent la sécrétion de cytokines et chimiokines comme l'IL-12, l'IFN- $\gamma$  et le MIP-2, ainsi que la réponse protectrice (Skountzou *et al.*, 2010). En outre, il a été rapporté que des filaments à base de FliC exposant à leur surface un antigène du virus de la dengue, DENV2 (Tableau 1.3), en remplacement du domaine D3 augmentent la réponse en IgG et IgM spécifiques à cet antigène lorsqu'administrés par voie intrapéritonéale (i.p.), et la réponse en IgA spécifiques lorsqu'administrés par voie intranasale (Bennett *et al.*, 2015). Ces études préliminaires suggèrent que des assemblages de flagelline pourraient être employés pour concevoir des nanoparticules protéiques intrinsèquement immunostimulantes pour la livraison d'antigènes.

#### 1.3 Nanovaccins

Outre l'utilisations d'adjuvants, une autre approche permettant d'augmenter l'immunogénicité des vaccins sous-unitaires est l'utilisation de nanoparticules pour la livraison des antigènes. Ces nanoparticules stabilisent les antigènes et présentent une taille, une morphologie et/ou une organisation imitant celles de particules pathogéniques, sans présenter les risques associés aux vaccins vivants. Ils sont composés de particules présentant plusieurs copies de l'antigène à leur surface ou encapsulées à l'intérieur (López-Sagaseta *et al.*, 2016). Ce type de nanovaccins comprend des particules de nature inorganique, telles que les particules d'or (Dykman, 2020), de nature lipidique (Moon *et al.*, 2011), polymérique ou protéique (Zottig *et al.*, 2020). Étant donné leur biocompatibilité ainsi que leur capacité à imiter efficacement les virus et à induire des réponses immunitaires spécifiques à un antigène cible, les nanovaccins de nature protéique ont fait l'objet de nombreuses études de vaccination dans les deux dernières décennies. Ces nanoplateformes de livraison de déterminants

antigéniques incluent les particules pseudovirales, mieux connues sous l'abréviation VLP (*Virus-like nanoparticles*) et les nanoparticules protéiques (Brisse *et al.*, 2020).

#### 1.3.1 Particules pseudovirales

Les VLP sont composées de plusieurs copies de protéines virales s'autoassemblant en nanoparticules affichant typiquement un diamètre de 10 à 200 nm. Elles présentent à leur surface de multiples copies d'un antigène cible pour la vaccination (Zepeda-Cervantes et al., 2020). Plusieurs vaccins à base de VLP se sont montrés efficace contre des infections homologues par le virus dont la protéine d'assemblage est extraite. Par exemple, les vaccins Gardasil® et Recombivax®, deux vaccins à base de VLP constitués respectivement de la protéine de capside L1 du virus du papillome humain (VPH) et de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HbsAG), sont commercialement disponibles pour lutter contre l'infection par ces deux virus (Zhao et al., 2014; Zhao et al., 2011a). Dans ces formulations vaccinales, la protéine virale utilisée sert à la fois d'unité d'autoassemblage et d'antigène cible. Cependant, les VLP peuvent aussi être conçues de manière à présenter des antigènes hétérologues. Les antigènes peuvent être liés directement à la protéine d'assemblage lors de l'expression recombinante ou liés à des particules pré-assemblées à l'aide de diverses méthodes de conjugaison orthogonale. Des exemples de protéines virales communément utilisées pour la conception de VLP présentant des antigènes hétérologues incluent la protéine Core du virus de l'Hépatite B (HbcAg) et les protéines de capside de virus infectant les plantes, comme le virus de la mosaïque du tabac (TMV - Tobacco mosaic virus) et le virus de la mosaïque du niébé (CPMV - Cowpea mosaic virus) (Figure 1.5) (Chen et Lai, 2013; Frietze et al., 2016). Par exemple, des études ont montré que la présentation de répétitions de l'épitope M2e du virus influenza à la surface de VLP assemblées de la protéine HbcAg permettait d'augmenter la réponse en anticorps dirigés contre M2e par rapport à l'inoculation avec l'épitope soluble chez la souris (Blokhina et al., 2013).
De même, des études avec le TMV et le CPMV conjugués avec des épitopes de *Pseudomonas aeruginosa* ont aussi montré leur capacité à induire une immunité protectrice contre une infection par cette bactérie (Brennan *et al.*, 1999; Staczek *et al.*, 2000). Bien que les VLP existent sous une variété de formes et de tailles, la diversité de nanovaccins protéiques est élargie par les nanoparticules provenant de l'assemblage de protéines d'origine virale et non virale.



Figure 1.5 Exemples de capsides virales utilisées pour la conception de vaccins à base de particules pseudovirales (VLP). Figure adaptée de (Plummer et Manchester, 2011).

## 1.3.2 Nanoparticules protéiques

Les nanoparticules protéiques utilisées pour la vaccination sont généralement issues de l'autoassemblage de protéines ou de peptides en plusieurs structures et architectures, tel que les fibres et les filaments ou des particules ayant un plus faible rapport de forme comme les cages (Zottig *et al.*, 2020). Les nanoparticules protéiques sont utilisées la

plupart du temps pour présenter des antigènes hétérologues. Les protéines et peptides d'autoassemblage utilisées pour la conception de nanovaccins peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Un exemple de protéine d'origine naturelle largement étudiée pour la vaccination est la ferritine, protéine présente chez une variété d'organismes, autant les bactéries que les plantes et les mammifères. La fonction biologique principale des ferritines est l'encapsulation du fer et celles-ci s'assemblent en cages octaédrales d'environ 20 nm de diamètre contenant chacune 24 sous-unités de ferritine (Figure 1.6) (Zhang et Orner, 2011). De nombreuses études ont montré la capacité de formulations vaccinales à base de nanocages de ferritines à induire une forte réponse immunitaire spécifique et protectrice lorsque conjuguées à des épitopes de divers pathogènes comme les virus Epstein-Barr, influenza et de l'immunodéficience humaine (VIH) (Kanekiyo et al., 2015; Kanekiyo et al., 2013; Sliepen et al., 2019). Des particules de ferritine conjuguées à la protéine de surface hémagglutinine (HA) d'un virus influenza ont d'ailleurs fait l'objet d'études cliniques chez l'humain qui ont été complétées en 2020 (NCT03186781) et affichent des résultats prometteurs. De plus, les fibres formées par l'assemblage du peptide Q11 (QQKFQFQFQQ) et les nanoparticules de protéines d'autoassemblage (SAPN - Self-assembling protein nanoparticles) sont des exemples de particules à base de peptides synthétiques étudiées en vaccination (Kaba et al., 2009; Rudra et al., 2010). Les fibres de Q11, affichant un diamètre de 5-10 nm et quelques centaines de nm de longueur, se sont montrées efficaces pour induire de fortes réponses spécifiques aux antigènes conjugués à leur surface, comme des épitopes du parasite de la malaria, Plasmodium falciparum, (Rudra et al., 2012) du VIH (Fries et al., 2021) et de streptocoques du groupe A (Azmi et al., 2014). Les SAPN, qui s'assemblent en particules icosaédrales d'environ 20 nm, ont aussi prouvé leur efficacité à augmenter la réponse immunitaire spécifique à divers épitopes des parasites de la malaria (Kaba et al., 2009; Kaba et al., 2012), et des épitopes provenant du SARS-CoV-1 (Pimentel et al., 2009), du VIH (Wahome et al., 2012) et plusieurs autres agents infectieux (Li et al., 2019; Wang et al., 2020).



Figure 1.6 Exemples de nanoparticules protéiques évaluées en vaccination. (a) Nanoparticules de ferritine conjuguées à l'épitope gp350 du virus Epstein-Barr. Figure tirée de (Kanekiyo *et al.*, 2015). (b) SAPN conjuguées à des épitopes du parasite de la malaria *Plasmodium falciparum*. Figure tirée de (Kaba *et al.*, 2012). (c) Fibres de Q11 conjuguées à l'épitope NANP de *P. falciparum*. Figures tirées de (Fries *et al.*, 2021; Rudra *et al.*, 2012).

1.3.3 Modulation de la réponse immunitaire par les nanovaccins

Les nanovaccins de nature protéique permettent d'augmenter la réponse immunitaire par plusieurs mécanismes. Leur taille de 10 à 200 nm est optimale pour la diffusion passive dans les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux ganglions lymphatiques, où est générée une grande partie de l'immunité adaptative. De même, cette taille favorise leur internalisation par les CPA, acteurs clés pour faire le lien entre l'immunité innée et adaptative (Bachmann et Jennings, 2010; Fifis et al., 2004; Lee et Wang, 2006). L'organisation répétitive et la grande densité d'antigènes à la surface de ces nanoparticules peuvent aussi contribuer à l'activation de lymphocytes B par la liaison de plusieurs BCR à la surface des cellules. Les lymphocytes B peuvent alors aussi agir comme CPA dans les ganglions lymphatiques et augmenter la réponse immunitaire adaptative (Bachmann Martin et al., 1993; Chaplin, 2010; Fehr et al., 1997). La grande densité d'épitopes à la surface des particules permet aussi une présentation de plusieurs copies d'un antigène par les CPA à la suite de l'internalisation d'une seule particule, contrairement à l'internalisation d'antigènes solubles et monomériques, pour laquelle le nombre d'antigènes est égal au nombre de particules internalisées (Fehr et al., 1997; Zottig et al., 2020). Les nanoparticules protéiques peuvent aussi être fonctionnalisées et/ou co-administrées avec des molécules immunomodulatrices pour augmenter ou polariser la réponse immunitaire. Par exemple, les formulations vaccinales à base de VLP Recombivax® et Gardasil® précédemment mentionnées contiennent également de l'alum (Cimica et Galarza, 2017). De plus, une grande partie des VLP étudiées encapsulent des acides nucléiques provenant de l'organisme dans lequel elles sont exprimées ou des molécules de CpG qui activent le TLR9, ce qui augmente l'activation des DC et induit une polarisation Th1 de la réponse immunitaire (Frietze et al., 2016; Zepeda-Cervantes et al., 2020). Des études chez les souris ont aussi montré que la conjugaison de la flagelline à la surface de particules de HA-ferritine, semblables aux particules faisant l'objet d'essais cliniques mentionnées plus haut, augmente la réponse en anticorps et l'immunité protectrice induites (Lee et al., 2019). En effet, malgré leur capacité à augmenter la réponse immunitaire, les formulations vaccinales à base de nanoparticules protéiques doivent souvent inclure un adjuvant pour induire une immunité protectrice robuste (Hervé et al., 2014; Lee et al., 2019).

## 1.4 Virus influenza

Les virus influenza A et B sont les agents étiologiques de l'influenza chez l'humain, communément appelé la grippe. Ces virus infectent les voies respiratoires et sont responsables des épidémies saisonnières de grippe. Alors que la propagation des virus influenza B est limitée aux humains, les virus influenza A peuvent aussi infecter les animaux (Arbeitskreis Blut, 2009). Ces derniers ont aussi été à l'origine de quelques pandémies majeures de grippe dans l'histoire dont celles de 1918 et de 2009. Les symptômes communs de l'influenza incluent de la fièvre, des maux de tête, des douleurs musculaires et de la toux (Krammer et al., 2018). Dans des cas plus sévères, le virus peut aussi infecter les voies respiratoires inférieures et induire une forte réponse inflammatoire ainsi que l'infiltration de cellules immunitaires, ce qui cause ensuite l'apoptose des cellules épithéliales et la destruction des tissus pulmonaires. Les patients peuvent alors développer une pneumonie ou une détresse respiratoire aigüe, ce qui peut ultimement engendrer la mort du patient (Kalil et Thomas, 2019). L'organisation mondiale de la santé estime que l'influenza cause chaque année près d'un demi-million de décès (Iuliano et al., 2018). Les virus influenza se transmettent majoritairement entre les individus par voie aérienne. En plus des souches d'influenza A humaines, il existe des souches d'influenza A aviaires, porcines et équines. Il arrive parfois que des souches d'influenza A d'origine aviaire ou porcine mutent et soient transmises à l'humain, puis transmises entre humains, pouvant alors causer des pandémies (Ozawa et Kawaoka, 2013).

#### 1.4.1 Composition et réplication du virus

Les virus influenza A sont des virus à ARN avec une enveloppe lipidique. Les particules virales peuvent être filamenteuses ou sphériques avec un diamètre d'environ 100 nm. Le génome des virus influenza est composé de huit segments d'ARN simple

brin négatif qui servent éventuellement d'ARN messager pour la synthèse de protéines. Les segments d'ARN 1 à 6 contiennent le code génétique pour la polymérase basique 2 (PB2), la polymérase basique 1 (PB1), la polymérase acide (PA), l'hémagglutinine (HA), la nucléoprotéine (NP) et la neuraminidase (NA), respectivement. Le segment 7 code pour les protéines de matrice 1 (M1) et 2 (M2), alors que le segment 8 code pour les protéines non structurales 1 (NS1) et 2 (NS2) (Figure 1.7) (Bouvier et Palese, 2008).



Figure 1.7 Composition du virus influenza A. HA : Hémagglutinine, M1 : Protéine matrice 1, M2 : Protéine matrice 2, NA : Neuraminidase, NP : Nucléoprotéine, NS2 : Protéine non-structurale 2, PA : Polymérase acide, PB : Polymérase basique (1 ou 2). Figure adaptée de (Mancera Gracia *et al.*, 2020).

Les protéines M2, NA et HA se trouvent à la surface des particules virales, encrées dans l'enveloppe lipidique. Lors de l'entrée du virus dans les voies respiratoires, la glycoprotéine HA permet l'attachement à l'acide sialique retrouvé à la surface des cellules épithéliales de l'organisme hôte, qui est suivi par l'endocytose du virus par la cellule. Le pH acide dans les endosomes induit un changement conformationnel de la protéine HA, qui permet sa fusion avec la membrane endosomale et l'export du matériel génétique dans le cytoplasme de la cellule. La protéine M2, qui forme un canal à protons, permet d'équilibrer le pH de part et autre de la particule virale lors de cette

étape et lors des étapes de la synthèse et la maturation des particules virales (Pielak et Chou, 2011). La protéine virale HA permet également l'ancrage des particules virales matures à la surface de la cellule hôte. La glycoprotéine NA a une fonction sialidase et permet la libération du virus dans l'organisme par le clivage de l'acide sialique (Bouvier et Palese, 2008). Les protéines NP, NS2 et M1 sont impliquées dans l'import et l'export de l'ARN viral à travers la membrane nucléaire de la cellule infectée, alors que la réplication du matériel génétique du virus se fait dans le noyau de celle-ci. La protéine M1 est aussi une composante structurale importante des particules virales, dans lesquelles elle est assemblée en un manteau protéique, lui-même recouvert de l'enveloppe de phospholipides (Bouvier et Palese, 2008). Les polymérases PB1, PB2 et PA forment une polymérase trimérique responsable de la réplication du matériel génétique du virus. La traduction de l'ARN viral en protéines est assurée par les ribosomes de la cellule hôte (te Velthuis et Fodor, 2016). La protéine NS1 est un antagoniste du récepteur de l'IFN- $\beta$ , une cytokines antivirale produite par les cellules infectées, et protège les virus contre l'action de cette cytokine (Kochs *et al.*, 2007).

#### 1.4.2 Antigènes de surface

Les principaux antigènes de surface du virus influenza sont les glycoprotéines HA et NA. La protéine HA est l'antigène le plus abondant à la surface des particules virales, où il se retrouve sous forme homotrimérique (Wu et Wilson, 2020). Lors de sa synthèse, chaque monomère de HA est clivé en deux parties, les sous-unités HA1 et HA2, qui demeurent liées par un pont disulfure. À la surface de la particule virale, chaque monomère de HA présente un domaine globulaire pointant vers l'extérieur et un domaine tige ancré dans l'enveloppe. Le domaine globulaire comprend le domaine de liaison à l'acide sialique et est composé d'une partie de HA1, tandis que le domaine tige est composé de la sous-unité HA2 et d'une partie de HA1 (Sriwilaijaroen et Suzuki, 2012). L'infection ou la vaccination avec le virus influenza entier résulte en une

réponse en anticorps majoritairement dirigée contre la protéine HA. Plus précisément, les anticorps anti-HA sont majoritairement dirigés contre le domaine globulaire de cette protéine et inhibent donc l'attachement du virus aux cellules à infecter ainsi que son entrée dans la cellule. Certains anticorps anti-HA sont dirigés contre le domaine tige. Bien qu'ils n'inhibent pas l'entrée du virus dans les cellules, ils peuvent toutefois empêcher la fusion avec les membranes endosomales et la libération subséquente de l'ARN viral dans la cellule (Krammer, 2019). L'infection ou la vaccination peut aussi générer des anticorps contre la protéine NA, qui est présente en plus faible proportion à la surface du virus, où elle est retrouvée sous forme homotétramérique. Chaque monomètre contient une tête catalytique, une tige, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (McAuley et al., 2019). Les anticorps anti-NA, surtout dirigés contre la tête catalytique de cette protéine, peuvent empêcher la libération des virus à la membrane de la cellule infectée en inhibant l'activité sialidase de la protéine. En plus de ces fonctions de neutralisation, les anticorps dirigés contre HA et NA peuvent aussi favoriser l'élimination du virus et des cellules infectées par la CDC et l'ADCC (Krammer, 2019).

Les anticorps dirigés contre la tête de HA sont particulièrement efficaces pour empêcher l'infection et plusieurs nanovaccins et vaccins sous-unitaires ciblant cette région se sont montrés efficaces pour induire une immunité protectrice contre une infection au virus influenza (Liu *et al.*, 2012; Mallajosyula *et al.*, 2014). Cependant, les virus influenza subissent constamment des modifications génétiques, ce qui leur permet d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire par la modification de leurs protéines de surface. En effet, la polymérase du virus influenza réplique l'ARN avec une faible fidélité, ce qui introduit fréquemment des mutations ponctuelles, notamment dans les segments codant pour la protéine HA et la tête globulaire de NA. La segmentation du génome permet aussi le réassortiment ou l'échange de segments entre différentes variations du virus pour créer de nouvelles souches (Shao *et al.*, 2017). Il

existe 18 sous-types de HA (H1 à H18) et 11 sous-types de NA (N1 à N11) répertoriés, et les souches du virus influenza A sont classées selon la variation des protéines de surfaces qu'elles présentent. Par exemple, les souches H1N1 présentent la variation 1 des protéines de surface HA et NA (Bouvier et Palese, 2008). La réponse immunitaire adaptative dirigée contre les têtes de HA et NA d'une souche comme la H1N1 ayant causé l'épidémie de 2009 chez l'humain sont souvent inefficaces face à l'infection par une souche contenant d'autres variations de ces protéines comme la souche H3N2. Il existe aussi des variations antigéniques assez importantes entre souches de même soustype de sorte qu'une souche puisse échapper à la reconnaissance par des anticorps dirigés contre une autre souche du même sous-type (Yasuhara *et al.*, 2017). C'est pourquoi les vaccins contre l'influenza, majoritairement à base de virus entiers atténués, demeurent saisonniers.

## 1.4.3. Des épitopes conservés

Pour adresser les limitations associées à la variation antigénique du virus influenza, plusieurs groupes de recherche se sont tournés vers l'utilisation d'antigènes conservés dans les formulations vaccinales pour la conception de vaccins dits universels. Contrairement à la tête globulaire de HA, son domaine tige montre peu de variation d'une souche d'influenza à l'autre, et ce domaine tige, ainsi que le sous-domaine HA2, ont donc été évalués pour la conception de vaccins universels. Plusieurs études ont montré la capacité de ces vaccins à induire une immunité protectrice contre des souches de virus présentant différentes variations des protéines HA et NA (Fan *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2013b; Margine *et al.*, 2013). Le canal ionique M2 est aussi un candidat pour la conception de vaccins universels contre les cystéines aux positions 17 et 19. Chaque monomère comprend un domaine C-terminal intracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire (M2e) N-terminal

composé de 23 résidus (Pielak et Chou, 2011; Schnell et Chou, 2008). L'épitope M2e, comprenant les résidus 2 à 24 de la protéine M2, montre une conservation de séquence importante entre les différentes souches d'influenza humaines, aviaires et porcines, particulièrement pour les résidus 2 à 10 (SLLTEVETP) (Tableau 1.4) (Mezhenskaya et al., 2019). Cette conservation de séquence serait due en partie à la faible immunogénicité de cet épitope, causant une faible pression de sélection sur celui-ci (Cho et al., 2015). De plus, la séquence de nucléotides codant pour M2e code aussi pour les résidus 1 à 9 et 239 à 252 de la protéine M1, une composante structurale du virus, et montre donc une importante conservation (Ito et al., 1991). Contrairement à la tige de HA, l'épitope M2e n'est pas glycosylé et sa production est donc compatible avec l'expression recombinante chez les bactéries (Boyoglu-Barnum et al., 2020; Lamb et al., 1985). Des séquences consensus de l'épitope M2e ont donc été utilisées dans plusieurs études en vaccination. Dans la plupart de ces études, les cystéines aux positions 17 et 19 sont substituées par des sérines pour éviter la formation de ponts disulfures des M2e sans affecter l'antigénicité de l'épitope (Mezhenskaya et al., 2019; Mozdzanowska et al., 2003). Malgré le faible pouvoir immunogène de cet épitope, des études ont montré que sa conjugaison à la surface de particules comme des VLP à base de HbcAg ou de TMV, ou des fibres à base du peptide synthétique Q11, permet d'induire une forte production d'anticorps spécifiques et une protection croisée contre l'infection à plusieurs souches d'influenza (Neirynck et al., 1999; Petukhova et al., 2013; Wang et al., 2020). De plus, l'utilisation de trois à cinq répétitions en tandem de l'épitope à la surface de particules permet d'accroitre la réponse en anticorps dirigés contre cet épitope (Hervé et al., 2014; Mezhenskaya et al., 2019). La reconnaissance de cet antigène à la surface des particules virales est plus difficile que celle des glycoprotéines HA et NA et ne permet pas de neutraliser l'entrée du virus dans la cellule de l'hôte (Krammer, 2019). Cependant, lors de la réplication du virus, la cellule infectée exprime à sa surface une certaine quantité de M2, à laquelle les IgG anti-M2e peuvent se lier. Le fragment Fc des anticorps peut alors être reconnu par les récepteurs

Fc des cellules immunitaires ou lié par le complément. La reconnaissance par les macrophages et les NK mène à la phagocytose et à l'élimination de la cellule par le phénomène d'ADCC, respectivement, alors que la reconnaissance par le système du complément permet l'élimination de la cellule par le mécanisme de CDC (Lee *et al.*, 2014; Saelens, 2019). Plusieurs études ont aussi montré l'importance des cellules Th et Tc dans la protection induite par la vaccination avec cet épitope sans toutefois en élucider le mécanisme (Kim *et al.*, 2014; Tompkins *et al.*, 2007). L'amplitude et la durée de la réponse restent toutefois limitées et la plupart des formulations vaccinales à base de M2e nécessitent la co-administration avec un adjuvant pour induire une immunité protectrice (Saelens, 2019). Quelques formulations vaccinale à base de M2e ont fait l'objet d'essais cliniques, mais encore aucun vaccin à base de cet épitope n'est utilisé commercialement (Mezhenskaya *et al.*, 2019).

Tableau 1.4 Séquences de l'épitope M2e de souches du virus influenza A humaines, aviaires et porcines.

a mines er peremest	
Souche d'influenza A	Séquence
Human/Puerto Rico/8/1934 H1N1	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD
Human/Beijing/132/2010 H1N1	SLLTEVETPTRSEWECRCSDSSD
Human/South Carolina/1/1918 H1N1	SLLTEVETPTRNEWGCRCNDSSD
Chicken/Pennsylvania/1/1983 H5N2	SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD
Turkey/Oregon/1971 H7N3	SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD
Chicken/Victoria/1/1985 H7N7	SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD
Swine/Hong Kong/127/1982 H3N2	SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD
Swine/Ontario/2/1981 H1N1	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD

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

## 1.5 Problématique, hypothèse et objectifs

À ce jour, la vaccination demeure une des pratiques de santé publique ayant le plus de retombées positives sur la santé humaine et animale (Ehreth, 2003; Rodrigues et Plotkin, 2020). Les vaccins de nouvelle génération, comme les vaccins sous-unitaires ou les vaccins à ARN, quoique plus sécuritaires que les vaccins classiques, sont peu immunogènes (Finco et Rappuoli, 2014; Zhang et al., 2015b). L'identification de nouvelles molécules adjuvantes prend donc de plus en plus d'importance. Encore aujourd'hui, peu d'adjuvants sont approuvés pour l'utilisation chez les humains et peu d'entre eux conviennent à l'administration par voie mucosale, voie prometteuse pour la vaccination contre les virus respiratoires, comme l'influenza et le SARS-CoV2 (Awate et al., 2013; Reed et al., 2013). La flagelline bactérienne a montré un fort potentiel en tant qu'adjuvant systémique et mucosal (Cui et al., 2018). Alors que ses capacités à stimuler le système immunitaire inné et à induire une réponse spécifique à un antigène greffé ont été abondamment démontrées, son utilisation demeure toutefois limitée. D'une part, la flagelline induit des effets indésirables chez les patients vaccinés, dû à une réponse inflammatoire de grande amplitude et de longue durée (Treanor et al., 2010; Turley et al., 2011). Or, une partie de la réponse immunitaire spécifique induite est hors cible et dirigée contre la flagelline elle-même (Biedma et al., 2019). D'autre part, sa capacité à s'autoassembler demeure peu exploitée pour la conception de nanovaccins protéiques, qui offrent divers avantages pour la génération d'une réponse immunitaire ciblée, tels que la stabilisation et la présentation de multiples copies d'un antigène, ainsi qu'une diffusion passive améliorée dans le système lymphatique jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (Zottig et al., 2020). Malgré le grand nombre d'études montrant l'effet adjuvant de flagellines monomériques contenant les quatre domaines typiques, D0 à D3, tel que FljB et FliC, peu d'études ont documenté l'utilisation d'autres flagellines et l'impact de leur assemblage en structure supramoléculaire sur la réponse immunitaire (Bennett et al., 2015). Considérant le

potentiel des flagellines en tant qu'adjuvant, il demeure primordial d'étudier des alternatives permettant d'assurer une exploitation maximale de leurs capacités immunostimulantes en vaccination tout en réduisant les réponses immunitaires hors cible.

#### 1.5.1 Hypothèses

Nous émettons l'hypothèse que l'utilisation d'une flagelline minimale ne contenant que les domaines D0 et D1 responsables de son interaction avec le TLR5, induit une réponse spécifique à l'épitope greffé équivalente à celle induite par une flagelline contenant les domaines D0 à D3, tout en potentiellement réduisant la réponse inflammatoire hors cible. De même, nous considérons que l'assemblage de la flagelline en nanostructures ayant une morphologie s'approchant de celles de nanoparticules virales favorise le traitement de l'antigène et l'établissement d'une immunité spécifique. De plus, l'enfouissement des domaines immunostimulants D0 et D1 au sein des nanostructures réduit la réponse inflammatoire hors cible.

## 1.5.2 Objectifs

L'objectif global de ce projet de maîtrise est d'explorer de nouvelles avenues pour l'utilisation efficace et sécuritaire des flagellines bactériennes en tant que molécules adjuvantes et nanoparticules porteuses d'antigènes en vaccination. Ce projet comprend les deux objectifs spécifiques suivants :

1. Comparer les propriétés immunostimulantes et pro-inflammatoires d'une flagelline minimale, Hag, ne contenant que les domaines D0 et D1 à celles d'une flagelline à quatre domaines, FljB, couramment étudiée en vaccination. 2. Évaluer le potentiel de nanoparticules à base de flagellines en tant que système de livraison d'antigènes ayant une capacité intrinsèque à stimuler le système immunitaire inné et à induire une réponse immunitaire spécifique.

## CHAPITRE II

## ARTICLE I

# RECOMBINANT *BACILLUS SUBTILIS* FLAGELLIN HAG IS A POTENT IMMUNOSTIMULANT WITH REDUCED PROINFLAMMATORY PROPERTIES COMPARED TO *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM FLJB

Mélanie Côté-Cyr<sup>a, b, c, d</sup>, Laurie Gauthier<sup>b, c, d</sup>, Ximena Zottig<sup>a, b, c, d</sup>, Steve Bourgault<sup>a, b, d</sup> et Denis Archambault<sup>c, d</sup>

<sup>a</sup> Chemistry Department, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada

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

<sup>c</sup> Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada

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

Manuscrit publié dans la revue Vaccine, doi: 10.1016/j.vaccine.2021.11.049

Contribution des auteur.e.s:

Mélanie Côté-Cyr: Conceptualisation, design des constructions protéiques, recherche bibliographique, optimisation de l'expression et la purification des protéines, production, analyses de dichroïsme circulaire, tests cellulaires, immunisations des souris, ELISA pour mesure des cytokines et des anticorps, analyse des données, création des figures, écriture du manuscrit.

Laurie Gauthier : Design des constructions protéiques, support à optimisation de l'expression des protéines, manipulation des souris.

Ximena Zottig : Design des constructions protéiques, support à l'optimisation de l'expression et de la purification des protéines.

Steve Bourgault : Conceptualisation, révision du manuscrit et supervision des travaux.

Denis Archambault : Conceptualisation, révision du manuscrit et supervision des travaux.

## 2.1 Résumé

La flagelline constitue un adjuvant potentiel pour les vaccins en raison de ses propriétés immunostimulantes robustes. Cependant, des essais cliniques ont révélé que la flagelline dérivée de Salmonella enterica sérotype Typhimurium induit des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires et des effets indésirables importants. La flagelline de Bacillus subtilis, Hag, partage une homologie de séquence élevée avec la flagelline de Salmonella, FljB, dans les domaines D0 et D1 responsables de l'activation du TLR5, tandis que les domaines D2 et D3 souvent associés à une réponse immunitaire hors cible sont absents. Par conséquent, nous avons comparé les propriétés immunostimulantes et pro-inflammatoires de Hag avec celles de FljB en utilisant un déterminant antigénique de la protéine matrice 2 (M2e) du virus influenza. Les deux flagellines ont activé le TLR5, FljB montrant une capacité d'activation 2,5 fois plus élevée que Hag. L'inoculation des souris a montré une solide réponse en anticorps spécifiques à M2e induite par FljB et Hag. Particulièrement, Hag a montré une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et une perte de poids réduite en comparaison à FljB. Cette étude a donc révélé que la flagelline Hag est un puissant adjuvant immunitaire avec des propriétés pro-inflammatoires réduites.

#### 2.2 Abstract

Flagellin constitutes a potential adjuvant for vaccines owing to its robust immunostimulatory properties. However, clinical trials have revealed that flagellin derived from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induces high levels of proinflammatory markers and substantial adverse effects. The flagellin from *Bacillus subtilis*, Hag, shares high sequence homology with *Salmonella* FljB within the D0 and D1 domains responsible for TLR5 engagement, while the D2 and D3 domains associated with an off-target immune response are absent. Accordingly, we compared

the immunostimulatory and proinflammatory properties of Hag with FljB by harnessing an epitope from the matrix 2 protein (M2e) of the influenza virus. Both flagellins engaged TLR5, with FljB showing a 2.5-fold higher potency than Hag. Mice inoculation showed a robust FljB- or Hag-induced M2e-specific antibody response, with Hag demonstrating a decreased secretion of proinflammatory markers and reduced weight loss. This study revealed that flagellin Hag is a potent immunoadjuvant with reduced proinflammatory properties.

## 2.3 Introduction

The protein flagellin is the main component of the bacterial flagellum. As a potent tolllike receptor 5 (TLR5) agonist, this protein has gained attention for its usage as an adjuvant in vaccine formulations (Hayashi et al., 2001; Mizel et Bates, 2010). Mixing of proteins with or fusion of proteins or antigenic determinants to flagellin is known to enhance the specific immune responses against the mixed or grafted antigens (Huleatt et al., 2008; Skountzou et al., 2010). Broad distribution of TLR5 on epithelial and immune cells such as macrophages and dendritic cells (DCs), supports the utilization of flagellin as an immunomodulatory agent (Hajam et al., 2017; Mizel et Bates, 2010; Tsujimoto et al., 2005). Activation of TLR5 signaling pathways induces production of cytokines, including interleukin 12 (IL-12) involved in T cell stimulation and differentiation, and chemokines, such as CCL20 and IL-8, leading to recruitment of macrophages, DCs and lymphocytes T and B (Hajam et al., 2017; Mizel et Bates, 2010; Tsujimoto et al., 2005). Besides, it has been shown that flagellin can induce the assembly of NLR family CARD domain containing 4 (NLRC4) inflammasome, leading to cytokine expression and secretion (Matusiak et al., 2015). Notwithstanding these immunostimulatory properties, flagellin-based influenza vaccines have been shown to induce noticeable and protracted adverse effects in immunized patients, such as pain at injection site, fatigue and muscle aches, that may impair its usage (Turley et

*al.*, 2011). Sustained activation of TLR5 has been linked to systemic production of proinflammatory cytokines interleurkin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), which are associated with neuropathic pain and hyperalgesia (Feuillet *et al.*, 2006; Hayashi *et al.*, 2001; Rolli *et al.*, 2010; Zhang et An, 2007).

Flagellins comprise two to four domains, of which D0 and D1 are involved in the interaction with TLR5 (Song et al., 2017; Zhang et al., 2015a). The D2 and D3 domains, absent amongst a subset of flagellins, show high sequence variations between species, accounting for immune evasion of flagellated pathogens (Ikeda et al., 2001). In addition, a recent study has shown that the D2 and D3 domains could be associated with the proinflammatory properties of flagellin (Biedma et al., 2019). Whereas the extensively studied flagellins FliC and FljB from Salmonella enterica Serovar Typhimurium (S. Typhimurium) include the four domains, the flagellin isolated from Bacillus subtilis (B. subtilis), Hag, contains only domains D0 and D1 (Song et al., 2017). Amino acid sequence comparison of Hag and FljB by local alignment revealed high sequence homology within the D0 and D1 domains, especially within the Nterminal D1 (ND1)  $\alpha$ -helix (69 % identity and conservative substitutions) and in the Cterminus (CD0) region of the protein (71 % identity and conservative substitutions), both containing important regions for interaction with TLR5, underlined in purple in Fig. 2.1A (Song et al., 2017; Zhang et al., 2015a). Nonetheless, the immunostimulatory properties of recombinant Hag as an immune adjuvant have not been evaluated so far. In this context, we compared the adjuvant and proinflammatory properties of Hag from B. subtilis, and FljB from S. Typhimurium. Recombinant Hag and FljB were conjugated at their C-terminus to three tandem repeats of the M2e epitope derived from the matrix protein 2 of the influenza A virus (3M2e) (Fig. 2.1B), as used in the influenza VAX102 vaccine previously evaluated in clinical trials (Huleatt et al., 2008; Turley et al., 2011). The M2e epitope constitutes a promising antigen candidate for a universal flu vaccine because its sequence is well conserved among influenza A virus

strains. It is however poorly immunogenic and requires co-administration with potent adjuvants and/or conjugation with immunogenic carriers (Mezhenskaya *et al.*, 2019). The present study revealed that Hag displays a 2.5-fold decrease in potency to activate TLR5 *in vitro* compared to FljB, while both flagellins induced a similar antibody response against the conjugated M2e epitope. Strikingly, mice immunization with Hag induced lower weight loss and a reduced proinflammatory response compared to the FljB-based vaccines.



Figure 2.1 Comparison of amino acid sequence and secondary structure of recombinant flagellins derived from *B. subtilis* (Hag) and *S.* Typhimurium (FljB). (A) Alignment of

Hag and FljB amino acid sequences using the Basic alignment search tool (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990). D0 and D1 domains are identified in red and blue respectively and TLR5 interaction regions are underlined in purple. (B) Structure prediction of Hag and FljB with the 3M2e epitope, in green, at their C-terminus generated by I-TASSER (Yang *et al.*, 2015). D0 and D1 domains are identified in red and blue, and D2 and D3 are identified in orange and yellow respectively. (C) SDS-PAGE and (D) anti-M2 western blot analysis of the purified proteins. (D) Arrows identify protein bands at the expected molecular weight for each protein. (E) Secondary structure analysis by far-UV circular dichroism and spectra deconvolution using K2D3 (Louis-Jeune *et al.*, 2012).

#### 2.4 Materials and methods

#### 2.4.1 Expression and purification of proteins

The pGEX-4 T-1 plasmids respectively containing FljB gene from S. Typhimurium, strain LT2 (PDB: 6RGV), Hag gene from B. subtilis, strain 168 (PDB: 5WJT), the 3M2e sequence, and FljB and Hag linked to 3M2e at their C-terminus with the GGGSGGGS linker, were generated through GenScript services. The M2e antigenic epitope is derived from the matrix protein 2 from the Influenza A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 virus strain, and the two cysteines were substituted to serine to prevent oxidation, without affecting antigenicity (SLLTEVETPIRNEWGSRSNGSSD) (Huleatt et al., 2008). Proteins were expressed in *Escherichia coli* Rosetta DE3 and purified using a GSTrap 4B column with an ÄKTA pure system in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, with 1 mM dithiothreitol (DTT). Proteins were eluted by thrombin cleavage for 16 h (h) at room temperature (RT). Endotoxins were removed using Pierce highcapacity endotoxin removal spin columns and confirmed to be lower than 0.25 EU/mL using the chromogenic limulus amebocyte lysate assay. Protein concentrations were determined using the Micro BCA assay. Proteins were analyzed by SDS-12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting. After protein electrotransfer onto nitrocellulose membranes, blocking of the membrane was achieved for 1 h at RT with 5% w/v non-fat dry milk in Tris-buffered saline (pH 7.4) + 0.05 % Tween 20 (TBST). Incubation overnight at 4 °C with anti-M2 mAb 14C2 (Santa Cruz) used at a 1:3,000 dilution in 1% milk in TBST was followed with incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (1:4,000 in 1% milk in TBST) (Santa Cruz) for 1 h at RT. Bands were detected by chemiluminescence. Purified proteins were flash frozen and stored at -80 °C until use.

## 2.4.2 Circular dichroism spectroscopy

Proteins in PBS pH 7.4 were diluted in ultrapure water to a final concentration of 4  $\mu$ M for 3M2e, 3  $\mu$ M for Hag and 2  $\mu$ M for other flagellins before being transferred into a 2 mm path length quartz cell. Far-ultraviolet (far-UV) circular dichroism (CD), spectra were recorded from 190 to 260 nm using a J-815 CD spectropolarimeter. Spectra were background subtracted with the buffer control and raw data were converted to mean residue ellipticity (MRE). Spectra deconvolution for secondary structure estimation was performed using K2D3 algorithm (Louis-Jeune *et al.*, 2012).

#### 2.4.3 TLR5 activation

HEK-blue mTLR5 cells (InvivoGen) expressing the secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene under the control of murine TLR5-inducible NF-κB were grown in DMEM containing 4.5 mg/ml glucose, 2 mM glutamine, 10% fetal bovine serum, 15 µg/ml blasticidin, and 100 µg/ml Zeocin at 37 °C under a 5% CO2 humidified atmosphere. Cells were seeded at 25,000 cells per well (100 µL/well; 96well plate) in HEK-Blue detection culture medium. Cells were exposed to recombinant flagellins at concentrations ranging from 10<sup>-15</sup> to 10<sup>-8</sup> M for 16 h. SEAP activity was measured by the absorbance at 630 nm. Results were expressed as fold induction relative to cells exposed to PBS. The half-maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>) of each independent experiment performed in triplicate was determined by nonlinear fitting of the TLR5 fold induction as a function of concentration. The EC<sub>50</sub> and P values using Student's t test were obtained using GraphPad Prism 7.0.

#### 2.4.4 Evaluation of proinflammatory responses in mice

The Université du Québec à Montréal animal protection committee approved animal experiments (reference number 0320-R3-924–0321). Six to eight weeks old female BALB/c mice were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 20 µg Hag-3M2e or equimolar doses of Hag (15.9 µg), FljB (25.7 µg), and FljB-3M2e (29.8 µg) in 50 µL sterile endotoxin-free PBS. Control mice were inoculated with the same volume of endotoxin-free PBS. After 2, 6 and 24 h, sera were collected by cardiac puncture, and mice were sacrificed by cervical dislocation. Mice were weighed before inoculation (0 h) and before cardiac puncture. Serum IL-6 and TNF- $\alpha$  levels were determined using IL-6 and TNF- $\alpha$  mouse ELISA detection kits (Invitrogen). Grubb's test was performed in each group to exclude any outliers. Significance between different groups was evaluated by one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*P < 0.0001; ns: not significant.

## 2.4.5 Intramuscular immunization

Six to eight weeks old female BALB/c mice were immunized by the intramuscular (i.m.) route with 50  $\mu$ L Hag-3M2e (20  $\mu$ g) or equimolar quantities of 3M2e (4  $\mu$ g) and FljB-3M2e (29.8  $\mu$ g). Control mice were immunized using the same volume of endotoxin-free PBS. Mice received a boost immunization at day 14 post primary immunization (ppi), and sera were collected from the saphenous vein before immunization and at day 13 ppi. At day 28 ppi, sera were collected by cardiac puncture and mice were sacrificed.

## 2.4.6 Indirect ELISA

Specific IgG responses were analyzed by indirect ELISA. 96-well ELISA plates were coated with 100  $\mu$ L of either the M2e peptide (2  $\mu$ g/mL), Hag (1  $\mu$ g/mL) or FljB (1.6  $\mu$ g/mL) in sodium carbonate buffer 0.05 M (pH 9.6) overnight at 4 °C. Plates were washed with PBS + 0.05% Tween 20 (PBST) and blocked with 1% w/v bovine serum albumin (BSA) in PBST for 1 h. After an additional wash, plates were incubated for 3 h at RT with serial dilutions of mouse sera. Plates were washed and incubated for 1 h at RT with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:20,000), IgG1 (1:10,000), IgG2a (1:5,000), IgG2b (1:5,000) or IgG3 (1:5,000). After washes, 3,3' -5,5' -tetramethyl benzidine (TMB) substrate was added. After 15 min incubation at RT, 1 N sulfuric acid (H2SO4) was added, and absorbance was measured at 450 nm. Absorbance was plotted dilution using the following regression curve equation: against serum y = (b + cx)/(1 + ax). Antibody titers were determined as the highest dilution resulting in an absorbance value four times that of the blank (without serum). Significance between groups was evaluated by one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.0001; ns: not significant.

#### 2.5 Results and discussion

#### 2.5.1 Hag shows reduced potency to activate TLR5 compared to FljB

Whereas numerous studies have highlighted the potential as adjuvant of the *Salmonella* flagellin FljB, no study has investigated the immunoadjuvant properties of the flagellin Hag from *B. subtilis*. Both flagellins, with or without the 3M2e peptide, were expressed in *E. coli* using a GST-fusion strategy and eluted from the affinity chromatography column by thrombin cleavage. As shown by Coomassie Blue staining, Hag (32.6 kDa), FljB (52.5 kDa) and their epitope-conjugated forms Hag-3M2e (40.9 kDa) and FljB-

3M2e (60.9 kDa) were obtained at the expected molecular weight with minimal presence of C-terminal cleavage (Fig. 2.1C), which is common for recombinant flagellins (Lu et Swartz, 2016). Anti-M2e western blot analysis confirmed the nature of the 3M2e-conjugated chimeric proteins, but also revealed some incomplete expression and/or presence of M2e-conjugated flagellin cleavage fragments (Fig. 2.1D). Moreover, the specificity of the anti-M2e was also confirmed, as Hag and FljB were not detected by the anti-M2e antibody (Fig. 2.S1). CD spectroscopy revealed that all flagellins present an  $\alpha$ -helix-rich secondary structure (Fig. 2.1E) in accordance to what has been reported for the conserved D0 and D1 domains (Song et al., 2017). FljB showed a higher  $\beta$ -sheet content associated with the D2 and D3 domains (Maki-Yonekura et al., 2010). The isolated 3M2e epitope was mainly disordered in solution, as previously reported for the M2e peptide (Cho et al., 2015). C-terminal conjugation of 3M2e on Hag and FljB did not disturb the  $\alpha$ -helical secondary structure. Conservation of this helical conformation seems important for TLR5 stimulation by agonists, including FljB and the C-terminal domain of the protein P97 (P97c) of Mycoplasma hyopneumoniae (Gauthier et al., 2020; Song et al., 2017).

The immunostimulatory properties of flagellin are closely associated with its capacity to engage TLR5 (Hayashi *et al.*, 2001). Hence, TLR5 signaling activity of recombinant Hag was compared with that of FljB using the HEK-Blue mTLR5 reporter assay. As expected from the high sequence homology and secondary structure conservation in the TLR5-interacting domains, both flagellins readily activated TLR5 with EC<sub>50</sub> in the picomolar (pM) range (Fig. 2.2). However, Hag signaling activity was significantly lower than that of FljB, with a 2.5-fold higher EC<sub>50</sub>, in agreement with the 2.1-fold higher EC<sub>50</sub> previously reported for flagellin isolated from *B. subtilis* in comparison to flagellins purified from *Salmonella enterica* serovar Dublin (Song *et al.*, 2017). Reduction of TLR5 activation by Hag could be attributed to the lack of D2 and D3 domains, whose deletion in FliC has been shown to reduce its potency (Biedma *et al.*, 2017).

2019). It is suggested that removal of residues within D2 domain can contribute to the conformational destabilisation of the adjacent ND1 region that contains critical residues for TLR5 interaction, including R90 and D114 (Biedma *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2017). A similar trend is observed for the 3M2e-conjugated flagellins, hinting that Hag-based vaccines could show reduced proinflammatory and/or immunogenic properties compared to FljB-based formulations. The presence of the epitope did not significantly affect the TLR5 activity of Hag, indicating for the first time that antigens can be conjugated at the C-terminus of this flagellin without altering its binding to this innate immune receptor.



Figure 2.2 TLR5 signaling activities of Hag and FljB. TLR5 activation was determined using HEK-Blue mTLR5 cells expressing the SEAP reporter and is expressed as fold induction relative to PBS-exposed cells. The data shown are representative of at least three independent experiments performed in triplicate.

#### 2.5.2 Hag shows reduced proinflammatory properties in comparison to FljB

While FljB has shown potential as an immunostimulant, safety concerns associated with elevated inflammation markers and adverse effects in immunized patients have precluded its usage as a vaccine adjuvant (Turley et al., 2011). Immunization with FljBbased vaccines has been reported to cause sustained systemic production of proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- $\alpha$ , which correlates with protracted pain (Rolli et al., 2010; Zhang et An, 2007). Therefore, we investigated the proinflammatory properties of Hag, FljB and their 3M2e-conjugated counterparts by measuring IL-6 and TNF- $\alpha$  levels 2, 6 and 24 h after i.p. inoculation. Two hours after injection, mice inoculated with flagellins and chimeric proteins showed elevated serum levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  compared to PBS-inoculated mice (Fig. 2.3A and B). Importantly, Hag and Hag-3M2e induced significantly lower levels of IL-6 2 h after inoculation (Fig. 2.3A), with 984.5 and 586.5 pg/mL respectively, compared to their FljB counterparts at 1160 and 1003 pg/mL. Such levels of IL-6 in the sera two hours after i.p. injection is in the range of what has been previously reported for S. Typhimurium flagellins (Feuillet et al., 2006; Hayashi et al., 2001; Rolli et al., 2010). The equivalent trend was observed 6 h after injection (Fig. 2.3A), as mice inoculated with Hag were the only ones showing basal IL-6 levels, in contrast to mice inoculated with FljB and FljB-3M2e that had IL-6 levels significantly higher than the PBSinoculated control mice. Similarly, Hag and Hag-3M2e induced lower secretion of TNF- $\alpha$  2 h after inoculation compared to their FljB counterparts (Fig. 2.3B). Fusion of M2e tandem repeats to flagellins also slightly enhanced their innate immunostimulatory capacity as the 3M2e-conjugated flagellins induced significantly higher TNF- $\alpha$  secretion than their unmodified counterparts (Fig. 2.3B). Similar enhancement of the secretion of proinflammatory cytokines has been observed for the conjugation of 3M2e on Hepatitis B core antigen virus-like particles (VLP) (Ibañez et al., 2013). In fact, M2e tandem repeats have demonstrated some intrinsic

proinflammatory properties, as the 5xM2e protein has been shown to induce secretion of cytokines and chemokines 2 h after i.p. inoculation in mice (Kim *et al.*, 2018). TNF- $\alpha$  and IL-6 levels returned to baseline 6 and 24 h after i.p. injection, respectively. As shown in Fig. 2.3C, the reduced proinflammatory response induced by Hag-3M2e compared to FljB-3M2e correlated with a significantly lower weight loss 24 h after i.p. injection (3.1% versus 7.5% respectively). The higher proinflammatory properties of FljB-3M2e compared to FljB without the epitope also translated into a significantly higher weight loss 24 h after inoculation (Fig. 2.3C). It has been proposed that production of IL-6 and other proinflammatory cytokines in response to flagellin is dependent on TLR5 signaling (Hayashi *et al.*, 2001; Rolli *et al.*, 2010), suggesting that the lower serum levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  and reduced weight loss in mice inoculated with Hag compared to FljB could be associated with reduced TLR5 signaling activity (Fig. 2.2). Overall, these observations suggest that Hag could ultimately address certain safety concerns associated with *Salmonella* flagellins.



Figure 2.3 Flagellin Hag shows reduced proinflammatory properties in comparison to FljB. (A) Serum levels of IL-6 2 h (left panel) and 6 h (right panel) after injection. (B) Serum levels of TNF- $\alpha$  2 h after injection. (C) Weight loss 24 h after injection. (A-C) BALB/c mice were inoculated with 20 µg Hag-3M2e or equimolar dose of other flagellins by the i.p. route. Error bars represent mean ± standard error of the mean (SEM). Significance between the different groups was evaluated by one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.0001; ns: not significant.

#### 2.5.3 Recombinant Hag shows equivalent adjuvant effect to FljB

After observing that Hag showed reduced TLR5 activity and proinflammatory properties compared to FljB, we evaluated whether the Hag-associated adjuvanticity could be consequently affected. BALB/c mice were i.m. immunized with 20  $\mu$ g Hag-3M2e and an equimolar dose of 3M2e and FljB-3M2e. Mice received a second dose at day 14 ppi (Fig. 2.4A). As observed for the i.p. inoculation (Fig. 2.3C), mice immunized with Hag-3M2e showed a lower weight loss following prime and boost i.m.

injections compared to FljB-3M2e immunized mice (Fig. 2.4B), further exposing the reduced adverse effects of Hag. M2e-specific total IgG levels in sera were analysed at days 13 and 28 ppi, while M2e-specific IgG subclasses and flagellin-specific total IgG levels were analyzed at day 28 ppi. Total IgG titers obtained at 13 and 28 days ppi showed that, compared to soluble 3M2e, immunization with Hag and FljB formulations significantly potentiated the antibody response against the M2e epitope (Fig. 2.4C). Interestingly, the IgG titers were similar for both flagellin-based vaccines, although Hag showed reduced TLR5 stimulation and secretion of inflammatory markers. This observation indicates that the induction of an antigen-specific antibody response associated with the usage of flagellin does not necessarily correlate with the intensity of the innate immune response. It has been previously shown that the dose of Salmonella enterica serovar Enteritidis flagellin needed for maximal specific antibody production is lower than the dose inducing maximal TNF- $\alpha$  production (Honko et Mizel, 2004; Honko et al., 2006). This could be attributed to the fact that flagellin can stimulate TLR5 at the surface of a variety of innate immune cells, including DCs, that play a crucial role in the induction of antigen-specific immune responses in the lymph nodes (Mizel et Bates, 2010; Tsujimoto et al., 2005). As flagellin is efficiently drained to the lymph nodes, preferential stimulation of these cells relative to other immune and epithelial cells by flagellin concentrations slightly lower than those inducing maximal proinflammatory response could induce a maximal specific immune response (Hajam et al., 2017). IgG subclass profiles induced by both flagellins against the M2e epitope were identical, with IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 titers significantly higher than those of mice immunized with soluble 3M2e (Fig. 2.4D). Since production of IgG1 is commonly associated with a Th2 response while IgG2a/b generally refers to a Th1 response, this IgG profile indicates a mixed Th1/Th2 immune response, as previously reported for FljB (Girard et al., 2011). Hag and FljB-based formulations also induced high specific IgG responses against Hag and FljB, respectively (Fig. 2.4E), as reported for FljB-based vaccines (Huleatt et al., 2007b). It has been demonstrated that previous

immunity against FljB does not impair its immunostimulatory properties for further use (Huleatt *et al.*, 2007b). Interestingly, while immunization with Hag yielded no antibodies recognizing FljB, mice vaccinated with FljB elicited a significant Hag-specific IgG response. According to prediction of discontinuous epitopes with ElliPro (Ponomarenko *et al.*, 2008), this could be associated with the generation of antibodies recognizing epitopes encompassing regions of ND1, D2 and CD1 domains in FljB, that potentially interact with ND1 and CD1 domains in Hag. In contrast, antibodies produced against constrained epitopes in Hag could see their interaction with FljB hindered by the presence of D2 domain in the vicinity of the binding sites.



Figure 2.4 Hag-3M2e induces reduced weight loss and equivalent potentiation of the M2e-specific immune response compared to FljB-3M2e (A) Immunization timeline. (B) Weight loss over 5 days following prime immunization (top) and boost (middle), and 24 h after each immunization (bottom). (C) M2e-specific total IgG levels 13 (left) and 28 days ppi (right). (D) M2e-specific IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 response and (E)

Hag- and FljB-specific total IgG response 28 days ppi. (A-E) BALB/c mice were immunized with 20  $\mu$ g Hag-3M2e or equimolar dose of other proteins by the i.m. route. Control mice were inoculated with PBS. Error bars represent mean  $\pm$  SEM. Significance between the different groups was evaluated by one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.0001; ns: not significant.

#### 2.6 Conclusion

In this study, the immunostimulatory and inflammatory properties of a recombinant flagellin derived from B. subtilis, Hag, were evaluated for the first time and its adjuvanticity was compared to that of FljB, which has been extensively investigated. Inoculation with Hag-based formulations showed reduced secretion of proinflammatory cytokines and decreased weight loss compared to FliB, which could be associated with the lower TLR5 activity observed for Hag. Interestingly, immunization revealed that both flagellin-based vaccine formulations induced a robust M2e-specific antibody response and a similar IgG subclass profile characteristic of a mixed Th1/Th2 immune response. However, the characterization of the T cell response would be required to get a complete overview of the M2e-specific immune response induced by both flagellin-based vaccines. Overall, these observations expose that recombinant flagellin derived from *Bacillus* constitutes a promising alternative to its Salmonella counterparts as vaccine adjuvant with reduced proinflammatory and adverse effects, while conserving potent immunostimulatory properties. Additional studies will be needed to evaluate whether the M2e-specific response induced by Hagbased vaccine also translates into protective immunity against an influenza virus infection. Moreover, the underlying mechanisms associated with variation in the inflammatory response induced by different flagellins and the relationships between inflammation and the induction of a specific immune response still need to be further investigated.

2.7 Supporting information



Figure 2.S1 Anti-M2e western blot analysis of Hag and FljB flagellins and 3xM2e protein. Std: Molecular weight standard.

## CHAPITRE III

## ARTICLE II

# SELF-ASSEMBLY OF FLAGELLIN INTO IMMUNOSTIMULATORY RING-LIKE STRUCTURES AS AN ANTIGEN DELIVERY SYSTEM

Mélanie Côté-Cyr<sup>a, b, c, d</sup>, Ximena Zottig<sup>a, b, c, d</sup>, Laurie Gauthier<sup>b, c, d</sup>, Denis Archambault<sup>c, d</sup>, Steve Bourgault<sup>a, b, d</sup>

<sup>a</sup> Chemistry Department, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada
<sup>b</sup> Quebec Network for Research on Protein Function, Engineering and Applications (PROTEO), Québec, Canada
<sup>c</sup> Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada
<sup>d</sup> The Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre (CRIPA), Saint-Hyacinthe, Canada

Manuscrit publié dans la revue ACS Biomaterials Science & Engineering, doi: 10.1021/acsbiomaterials.1c01332

Contribution des auteurs:

Mélanie Côté-Cyr: Conceptualisation, recherche bibliographique, optimisation de l'expression et la purification des protéines, optimisation de l'assemblage et microscopie électronique, production et analyse de dichroïsme circulaire, DLS, tests cellulaires, manipulation des souris, ELISA pour mesure des cytokines et anticorps, analyse des données, création des figures, écriture du manuscrit.

Ximena Zottig : Design des constructions protéiques, optimisation de l'expression des protéines, essais préliminaires d'assemblage, ELISA pour mesure des cytokines et anticorps.

Laurie Gauthier : Support pour l'expression des protéines, manipulation des souris, ELISA pour mesure des anticorps.

Denis Archambault : Conceptualisation, révision du manuscrit et supervision des travaux.

Steve Bourgault : Conceptualisation, révision du manuscrit et supervision des travaux.


Figure 3.1 Résumé graphique de l'article II.

# 3.1 Résumé

Les nanoparticules protéiques représentent des porteurs d'antigènes prometteurs pour la vaccination, car leur taille et l'affichage répétitif d'antigènes à leur surface, imitant la plupart des particules virales, permettent un traitement efficace par le système immunitaire. Cependant, ces nanostructures sont souvent incapables de stimuler efficacement le système immunitaire inné, nécessitant leur co-administration avec des adjuvants pour favoriser une immunité protectrice de longue durée. La protéine flagelline, qui est le composant principal du flagelle bactérien, a été abondamment évaluée comme molécule porteuse d'épitope en raison de ses propriétés adjuvantes intrinsèques impliquant l'activation du récepteur immunitaire inné Toll-like receptor 5 (TLR5). Alors que la flagelline est reconnue pour sa capacité à s'autoassembler en nanotubes de longueur de l'ordre du micron, un nombre limité d'études ont évalué de nanostructures à base de flagelline l'utilisation comme particules immunostimulantes porteuses d'antigènes. Dans cette étude, nous avons montré une stratégie permettant de guider l'autoassemblage d'une protéine flagelline de Bacillus subtilis, Hag, en nanoparticules ayant un faible rapport de forme en empêchant les interactions non covalentes responsables de son élongation en nanotubes. Nous avons observé que l'ajout d'une séquence antigénique dérivée du virus influenza A (3M2e) à l'extrémité C-terminale de cette flagelline, par opposition au positionnement de l'épitope en milieu de séquence, inhibait l'élongation en filament et permettait d'obtenir des structures de type anneau à faible rapport de forme lors de l'autoassemblage induit par la précipitation aux sels. Ces nanostructures présentaient l'antigène à leur surface et montraient des similitudes morphologiques et structurales avec les nanotubes de flagelline, avec un diamètre d'environ 12 nm, et une structure secondaire riche en hélices α. Les structures de flagelline de type anneau étaient efficacement internalisées par les cellules présentatrices d'antigènes, ont avidement activé le TLR5 in vitro et ont induit des réponses immunitaires innées et adaptatives robustes. L'immunisation de

souris par voie intranasale avec ces nanostructures a entraîné une potentialisation de la réponse en anticorps spécifiques dirigés contre l'antigène M2e ainsi qu'une protection contre une infection léthale par le virus influenza A. Cette étude illustre le grand potentiel de ces structures en anneaux intrinsèquement immunostimulantes en tant que porteurs d'antigènes pour le développement de stratégies vaccinales versatiles.

### 3.2 Abstract

Proteinaceous nanoparticles represent attractive antigen carriers for vaccination as their size and repetitive antigen displays that mimic most viral particles enable efficient immune processing. However, these nanocarriers are often unable to stimulate efficiently the innate immune system, requiring coadministration with adjuvants to promote long-lasting protective immunity. The protein flagellin, which constitutes the primary constituent of the bacterial flagellum, has been widely evaluated as an antigen carrier due to its intrinsic adjuvant properties involving activation of the innate immune receptor Toll-like receptor 5 (TLR5). Although flagellin is known for its ability to selfassemble into micron-scale length nanotubes, few studies have evaluated the potential usage of flagellin-based nanostructures as immunostimulatory antigen carriers. In this study, we reported for the first time a strategy to guide the self-assembly of a flagellin protein from Bacillus subtilis, Hag, into lower aspect ratio nanoparticles by hindering non-covalent interactions responsible for its elongation into nanotubes. We observed that addition of an antigenic sequence derived from the influenza A virus (3M2e) at the C-terminus of this flagellin, as opposed to positioning the epitope into mid-sequence, precluded filament elongation and resulted in low aspect ratio ring-like nanostructures upon salting-out-induced self-assembly. These nanostructures displayed the antigen at their surface and shared morphological and structural characteristics with flagellin nanotubes, with a diameter of approximately 12 nm, and an  $\alpha$ -helix-rich secondary structure. Flagellin ring-like nanostructures were efficiently internalized by antigenpresenting cells, and avidly activated the TLR5 *in vitro* as well as the innate and adaptive immune responses. Intranasal immunization of mice with these nanostructures resulted in the potentiation of the antigen-specific antibody response and protection against a lethal infection with the influenza A virus, illustrating the potential of these intrinsically immunostimulatory nanostructures as antigen carriers.

# 3.3 Introduction

As exemplified by the COVID-19 pandemic, vaccination constitutes the most costeffective public health measure and has saved countless human lives over the last two centuries (Orenstein et Ahmed, 2017; van Panhuis et al., 2013). Vaccines have historically been composed of live-attenuated pathogens, which have proven to be efficient in inducing long-lasting immunity. However, safety concerns associated with incomplete inactivation of viruses, or reversion to virulence, remain (Kenney et al., 2011; Zhang et al., 2014). Hence, new vaccine technologies have been developed, such as DNA- and RNA-based vaccines, and subunit vaccines (Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2015b). Subunit vaccines are composed of defined amino acid sequences of pathogen antigens, allowing the targeting of specific epitopes by the host immune system. Nonetheless, purified antigens are usually poorly immunogenic, requiring the coadministration with an immunopotentiator, or adjuvant, and/or their conjugation with an epitope carrier (Finco et Rappuoli, 2014; Zhang et al., 2015b). Over the last two decades, nanoparticles, which are synthetic or biological nanosized materials, have emerged as promising delivery platforms for subunit vaccines (Al-Halifa et al., 2019). Numerous types of nanoparticles have been considered as carriers of antigenic determinants, which comprise polymers, inorganic particles, polysaccharides, and liposomes (Boraschi et Italiani, 2015; Luo et al., 2017; Yang et al., 2016; Zaman et al., 2013). The nanoscale size of these materials, which closely resembles many invading

pathogens, is ideal for the induction of various immune processes (Bachmann et Jennings, 2010; Luo et al., 2017). Conjugation of the antigen to a nanoparticle leads to its physical stabilization (Pachioni-Vasconcelos Jde et al., 2016), enhanced internalization by antigen-presenting cells (APCs) (Luo et al., 2017), and/or local depot effect, ensuring prolonged antigen presentation to immune cells that have migrated to the injection site (Fredriksen et Grip, 2012). Nevertheless, usage of inorganic and polymeric nanoparticles is limited by issues related to potential toxicity, biological stability, low solubility, and/or non-biodegradability. In comparison, proteins that selfassemble into nanosized organized repetitive antigen displays have gained interests for their multivalency, non-toxicity, and biodegradability (Babych et al., 2018; Karch et Burkhard, 2016; Lebel et al., 2015; O'Neill et al., 2021; Yang et al., 2016; Zottig et al., 2021; Zottig et al., 2020). Examples of antigen carriers based on protein assemblies include virus-like particles, which are viral structural proteins without nucleic acids (Grgacic et Anderson, 2006; Noad et Roy, 2003), and protein nanocages, such as ferritin cages (Han et al., 2014; Molino et al., 2013). The organized and repetitive epitope display allows clustering of cell-surface receptors and enhanced immune cell stimulation (Zottig et al., 2020). However, these proteinaceous nanoparticles usually present poor intrinsic immunostimulatory properties, requiring the addition of adjuvants in the vaccine formulations (Awate et al., 2013). Thus, there is still an important need to identify adjuvant technologies to increase the immunogenicity of subunit vaccines, and protein-based nanoassemblies with intrinsic ability to activate the immune system constitute a promising alternative to conventional epitope nanocarriers.

The protein flagellin, which is the primary component of bacterial flagella, constitutes an important pathogen-associated molecular pattern that has shown great potential as a vaccine adjuvant due to its ability to stimulate components of the innate immune system (Hayashi *et al.*, 2001; Huleatt *et al.*, 2008; Lockner *et al.*, 2015; Stepanova *et*  al., 2018). Flagellin is a potent agonist of the toll-like receptor 5 (TLR5), whose activation stimulates IL-6 production via the MyD88-dependent pathway (Hayashi et al., 2001). The presence of flagellin in the intracellular space can also activate the NOD-like receptors (NLRs) NAIP5 and NLRC4, which in turn triggers NLRC4 inflammasome assembly and leads to proinflammatory signals through capsase-1 activation (Lightfield et al., 2008; Matusiak et al., 2015; Zhao et al., 2011b). While this protein is proficient to self-assemble into linear filaments, most studies have so far exclusively focused on the monomeric form of the protein as an adjuvant. In fact, only one study has reported the usage of flagellin-based nanotubes as antigen carriers, showing their potential in inducing robust epitope-specific responses (Bennett et al., 2015). Nonetheless, flagellin nanotubes are usually µm-long with a diameter of 12 to 23 nm depending on the bacterial species (Maki-Yonekura et al., 2010; Wang et al., 2017), which precludes efficient internalization by APCs as well as passive draining to the lymph nodes (Bachmann et Jennings, 2010). Moreover, flagellin nanotubes have been shown to elicit a much lower activation of TLR5 and a reduced stimulation of innate immunity compared to their monomeric counterpart (Skountzou et al., 2010; Smith et al., 2003). Thus, modulating the self-assembly of the protein flagellin into lower aspect ratio supramolecular nanostructures could be a promising alternative to the usage of µm-long nanotubes as intrinsically immunostimulatory antigen delivery platforms.

The assembly of flagellin into nanotubes involves the formation of intermolecular coiled-coil motifs that are governed by extensive hydrophobic interactions and hydrogen bonds. Interactions between the D1 domain of adjacent monomers are important for protein self-recognition, while interactions between the D1 domain of a flagellin subunit and the D0 domain of the next subunit allow elongation into nanotubes (Wang *et al.*, 2017; Yonekura *et al.*, 2003). It has been shown that removal of domains D2 and D3, or their replacement by an antigen, does not preclude flagellin elongation

into filaments (Bennett et al., 2015; Klein et al., 2018). In this study, we proposed to hinder the intermolecular interactions participating in flagellin elongation into nanotubes by causing steric hindrance in the vicinity of the D0 domain through the incorporation of the antigenic determinant. The flagellin Hag from Bacillus subtilis was fused to three tandem repeats of the epitope M2e of the influenza A virus (3M2e) either in the mid-D1 domain, that is, in lieu of the D2 and D3 domains usually present in flagellins, or at its C-terminal extremity. As hypothesized, insertion of 3M2e in the mid-D1 allowed the elongation of Hag into nanotubes displaying the epitope at their surface (nTubes-3M2e) (Bennett et al., 2015; Il Kim et al., 2018; Klein et al., 2018). Conversely, the addition of the 3M2e sequence at the C-terminus of the protein resulted in the formation of lower aspect ratio nanoparticles with a ring-like morphology (nRings-3M2e). We observed that these flagellin-based ring-like formulations were efficiently internalized by APCs and displayed potent immunostimulatory properties. Furthermore, these proteinaceous assemblies generated a robust anti-M2e immune response and protected immunized mice from a lethal experimental challenge with the influenza A virus, highlighting their potential as immunostimulatory epitope nanocarriers.

# 3.4 Materials and Methods

# 3.4.1 Protein Expression and Purification

The pGEX-4T-1 plasmids, respectively, comprising Hag sequence from *B. subtilis* strain 168 (Gene ID: 936742), 3M2e, and 3M2e linked to Hag between residues 184 and 185, or at its C-terminus, with a GGGSGGGS linker, were purchased from GenScript. The M2e sequence derives from the ectodomain of the matrix protein 2 from the influenza A virus (strain A/Puerto Rico/8/1934 H1N1) and, as previously reported (Huleatt *et al.*, 2008), the two cysteines were mutated to serine to avoid

spontaneous disulfide bond formation (SLLTEVETPIRNEWG<u>S</u>R<u>S</u>NGSSD). As recently described (Côté-Cyr *et al.*, 2021), upon expression in *Escherichia coli* Rosetta DE3 competent cells, proteins were purified using a GSTrap column in phosphatebuffered saline (PBS) pH 7.4 supplemented with 1 mM dithiothreitol (DTT). Elution was performed by a 16 h (h) thrombin cleavage at room temperature (RT). Pierce highcapacity endotoxin removal spin columns were used to remove endotoxins. Chromogenic limulus amebocyte lysate (LAL) assay revealed that all protein solutions contain less than 0.25 EU/mL of endotoxins. Concentrations were determined by the Micro BCA assay (Thermo Fisher), and purity and identity of proteins were verified by sodium SDS-PAGE and immunoblotting.

#### 3.4.2 Self-Assembly of Flagellin into Nanostructures

Flagellin proteins were assembled in PBS pH 7.4 by salting out induced with 400 mM ammonium sulfate ([NH4]2SO4), unless otherwise stated, at final protein concentrations ranging between 1 and 1.5 mg/mL for 72 h at RT under quiescent conditions (Wakabayashi *et al.*, 1969). Ammonium sulfate was then removed by extensive dialysis in PBS (pH 7.4) using Slide-A-Lyzer MINI dialysis devices with a molecular weight cutoff (MWCO) of 3.5 kDa at 4 °C. Protein concentrations obtained after dialysis were determined using the Micro BCA assay.

# 3.4.3 Transmission Electron Microscopy (TEM)

After dilution in ultrapure water, proteins were applied to a 300 mesh copper carboncoated grid and negatively stained for 45 s with 1.5% (w/v) uranyl formate. Image acquisition was performed on a FEI Tecnai G2 Spirit Twin microscope running at 120 kV and furnished with a Gatan Ultrascan 4000 4k × 4k CCD camera. Image acquisition of assembled Hag-3M2e<sub>Ct</sub> was also performed on a FEI Tecnai G2 F20 200 kV TEM equipped with a TVIPS TemCam XF416(ES) 16MP CMOS camera system.

3.4.4 Dynamic Light Scattering (DLS)

The hydrodynamic radius of the assemblies was evaluated using a Malvern ZetaPlus instrument and 1 cm length acrylic cells at RT. A refractive index (RI) value of 1.34 was applied for the solvent, whereas the viscosity of the sample was set at 4.0 cp. Three measurements of 10 runs of 10 s were recorded for each sample.

3.4.5 Epitope Accessibility by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

High-binging 96-well ELISA plates (Thermo Fisher) were coated with 2 μg/mL of M2e peptide, Hag, Hag-3M2e, or nRings-3M2e in sodium carbonate buffer 0.05 M pH 9.6 overnight at 4 °C. After washing with PBS + 0.05% Tween 20 (PBST), plates were blocked with 1% w/v bovine serum albumin (BSA) in PBST for 1 h at RT. Plates were washed with PBST and incubated for 3 h at RT with 1/2 serial dilutions in 1% BSA of the anti-influenza A M2 14C2 monoclonal antibody at a starting dilution of 1:500. After washes with PBST, plates were incubated for 1 h at RT with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG diluted 1:10,000. After wash, the 3,3'-5,5'-tetramethyl benzidine (TMB) substrate was added for a 15 min (min) incubation at RT and the reaction was stopped with 1 N sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) before measuring the optical density (O.D.) at 450 nm. Data are represented as O.D.<sub>450nm</sub> as a function of anti-influenza A M2 14C2 antibody dilution.

# 3.4.6 UV-visible and Circular Dichroism (CD) Spectroscopy

Turbidity of assembled and monomeric protein solutions was measured in a 10 mm path length quartz cell at 350 nm with a UV-1280 Shimadzu UV–visible spectrophotometer. Statistical significance was evaluated by a one-tailed *t*-test and established at \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; and \*\*\*\*P < 0.0001. For far-UV CD spectroscopy, protein solutions were diluted in water to reach a concentration of 3  $\mu$ M. Spectra were recorded from 190 to 260 nm using a Jasco J-815 CD spectropolarimeter and a 2 mm path length quartz cell. For near-UV CD, the spectra of non-diluted protein solutions in PBS were recorded from 260 to 350 nm in a 10 mm quartz cuvette. For both measurements, the wavelength step was set at 0.5 nm with an average time of 10 s/scan at each wavelength step. The spectra were background subtracted with the buffer control and smoothed using the Savitzky–Golay algorithm with a smoothing moving window of nine points. Raw data were converted to mean residue ellipticity (MRE) using the following formula

MRE (deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>) = 
$$\frac{CD \ signal \ (mdeg) \ x \ 10^5}{pathlenght \ (cm)x \ C_{protein} \ (\mu M) \ x \ N_{residues}}$$
(1)

where  $C_{\text{protein}}$  is the concentration of the protein and  $N_{\text{residues}}$  is the number of residues.

# 3.4.7 Fluorescence Labeling of Proteins

Assembled and monomeric Hag-3M2e<sub>Ct</sub> were fluorescently labeled by incubating the protein with 20 M molar equivalent of Alexa Fluor 488 N-succinimidyl ester (NHS) in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) for 3 h at RT under constant agitation. The unconjugated dye was removed during extensive dialysis using a MWCO of 3.5 kDa in PBS pH 7.4. The degree of labeling (DOL) was determined using the following equation

$$DOL = \frac{A_{495} x \varepsilon_{Hag-3M2e}}{A_{280} x \varepsilon_{Alexa488}}$$
(2)

3.4.8 Cellular Uptake by APCs

DC2.4 murine dendritic-like cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 10 mM HEPES buffer and 0.000054% 2-mercaptoethanol. J774.A1 murine macrophages were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) (FBS), 50 U/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin. Both cell lines were grown at 37 °C under a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. For confocal microscopy analysis, DC2.4 and J774.A1 cells were seeded on 8-well coverslips for 24 h at a density of 55,000 and 75,000 cells/well, respectively, and incubated with 10 µg/mL of fluorescently labeled assembled, or monomeric, flagellin for 4 h. After washes with PBS, cells were fixed with 4% formaldehyde and stained with 1 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) and 5 units/mL (0.165 µM) Texas Red-X phalloidin. Images were acquired on an inverted Nikon A1R confocal microscope using a 60× oil immersion lens and are presented as Z-stack projections. Images were examined using the software ImageJ. For the evaluation of cell uptake by flow cytometry, DC2.4 and J774A.1 cells were seeded in 12-well plates at a density of 180,000 and 250,000 cells/well, respectively. Cells were incubated with 1 and 10 µg/mL of fluorescently labeled assembled, or monomeric, flagellin for 4 h at 37 °C. Cells were then harvested and washed three times with ice-cold PBS, resuspended in PBS, and kept at 4 °C before analysis. Flow cytometry was achieved using 10,000 gated cells/sample using a BD FACSCalibur flow cytometer (excitation: 488 nm, emission: 530 nm). The software FlowJo was used for the data analyses, and mean fluorescence intensities (MFI) relative to buffer-treated cells were corrected to

account for the DOL. MFI of at least three experiments were averaged and expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical significance was evaluated by the multiple *t*-test and established at \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001; \*\*\*\**P* < 0.0001; ns: not significant.

# 3.4.9 TLR5 Stimulation

As previously described (Côté-Cyr *et al.*, 2021), HEK-Blue mTLR5 cells (InvivoGen) expressing the secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene under the control of murine TLR5-inducible NF- $\kappa$ B were cultured in DMEM supplemented with 4.5 mg/mL glucose, 2 mM glutamine, 10% FBS, 15 µg/mL blasticidin, and 100 µg/mL zeocin at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>. Cells were seeded at 25,000 cells per well in a 96-well plate using the HEK-Blue detection medium, a complete cell culture medium containing a SEAP color substrate. The cells were then exposed to assembled or monomeric proteins (0.01 to 10,000 pg/mL). After incubation for 16 h at 37 °C, the absorbance at 630 nm was measured as an indicator of SEAP activity. The results were expressed as fold SEAP activation relative to the vehicle control (PBS)-treated cells. The EC<sub>50</sub> (half maximal effective concentration) was obtained using a non-linear fitting of the TLR5 fold induction as a function of protein concentration, on a logarithm scale, by means of the GraphPad Prism 7.0 software.

### 3.4.10 Innate Immune Response in Mice

The animal protection committee of the Université du Québec à Montréal authorized all experiments with animals (0320-R3-924-0321) in agreement with the Canadian guidelines and regulations. Female BALB/c mice (Charles River), six to eight weeks old, were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 50  $\mu$ L sterile endotoxin-free PBS containing 20  $\mu$ g filtered-sterilized monomeric Hag-3M2e<sub>Ct</sub> and nRings-3M2e or

equimolar amounts of Hag (15.9 µg), and 3M2e (4.0 µg). Mice of the control group were inoculated with 50 µL of sterile endotoxin-free PBS. Eighteen mice were immunized with each protein or the buffer vehicle. After 2, 6, and 24 h, mice were put under isoflurane anesthesia (six mice per group per time point) and sera were taken by means of cardiac puncture. Mice were terminally sacrificed using cervical dislocation. Rectal temperature was measured, and mice were weighed at time 0 h and before each blood collection (2, 6, or 24 h). The concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the sera were evaluated using appropriate ELISA kits (Invitrogen). When applicable, outliers in each group were excluded using the Grubb's test. Statistical significance between groups (n = 6 per group, unless specified otherwise) was assessed by one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*

### 3.4.11 Immunization of Mice

Six to eight weeks old female BALB/c mice were immunized by the intramuscular (i.m.) or intranasal (i.n.) route with 20 µg assembled or monomeric Hag-3M2e<sub>Ct</sub>, in 50 µL, or 4.0 µg 3M2e (equimolar to Hag-3M2e<sub>ct</sub>). The same volume of endotoxin-free sterile PBS was injected to control mice. Twelve mice were immunized with each protein or the buffer vehicle by each route. For i.m. immunization, alum-adjuvanted formulations were prepared by diluting the protein solutions at a 1:1 volume ratio. For i.n. immunization, mice were first placed under isoflurane anesthesia before inoculation by i.n. instillation. Mice were immunized with a booster dose 14 days after the primary immunization, and sera were collected from the saphenous vein before the first immunization and at day 13 post-primary immunization (ppi). For four immunized mice per group, sera were collected at day 28 ppi by cardiac puncture. Bronchoalveolar lavage (BAL) were performed by rinsing the lungs with 1 mL of PBS by means of

tracheal puncture. For the other 8 i.n. immunized mice per group that were kept for the experimental challenge, sera were taken from the saphenous vein.

#### 3.4.12 Experimental Challenge

At day 29 ppi, the 8 remaining i.n. immunized mice were placed into the biosafety level 2 and anesthetized by isoflurane inhalation. Mice were infected by i.n. instillation of  $5\times$  the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of influenza virus A/PuertoRico/8/1934 H1N1 (GenBank). Body weight and clinical symptoms were checked every day. For evaluation of the intensity of clinical symptoms, a scale from 0 to 3 was used (0, normal state, absence of symptom; 1, light; 2, moderate; and 3, severe) (Table 3.S1). A global average clinical score was calculated for each mouse. Data are presented as mean of weight loss and global clinical score  $\pm$  standard error of mean (SEM). Mice that lost 20% or more of their weight and/or showing a score of 3 for any clinical symptom were euthanized. Survival curves were compared using the log-rank Mantel–Cox test in GraphPad Prism 7.0 software.

# 3.4.13 Indirect ELISA for Titer Determination

The specific IgG response was evaluated by indirect ELISA. Briefly, 96-well ELISA plates were coated at 4 °C for 16 h with either the M2e peptide at 2  $\mu$ g/mL (Al-Halifa *et al.*, 2020), or Hag protein at 1  $\mu$ g/mL, in sodium carbonate buffer 0.05 M (pH 9.6). Wells were then blocked with 1% w/v BSA in PBST, washed three times with PBST, and incubated for 3 h at RT with mouse sera: 1/2 serial dilutions. After washes, plates were incubated with HRP-conjugated goat antimouse IgG (1:10,000), IgG1 (1:10,000), IgG2a (1:5,000), IgG2b (1:5,000), or IgG3 (1:5,000) for 1 h at RT (Côté-Cyr *et al.*, 2021). Plates were washed with PBST and TMB substrate was added and after 15 min at RT, the reaction was stopped with 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the optical density was measured.

Absorbance at 450 nm was plotted against dilution of the mice sera by means of this regression curve equation: y = (b + cx)/(1 + ax). The antibody titer was established as the highest sera dilution associated with an absorbance value twice that of the blank control, that is, without serum. Antibody titers were presented as mean ± SEM, and statistical significance between groups was assessed using a one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.0001; ns: not significant.

### 3.5 Results and Discussion

3.5.1 Altering the Elongation of Flagellin Filaments into Low Aspect Ratio Nanoparticles by Antigen Positioning

Owing to their nanoscale size, ordered organization and biocompatibility, proteinaceous nanoparticles constitute promising antigen delivery systems (Bachmann et Jennings, 2010). However, these nanoparticles rarely show intrinsic capacity to stimulate the innate immune system and most often require co-administration with an adjuvant to induce a protective immune response (Hervé *et al.*, 2014). In this context, we harnessed the self-assembly of the protein flagellin, which has immunomodulatory properties (Hayashi *et al.*, 2001; Huleatt *et al.*, 2007b), to design self-adjuvanted proteinaceous nanomaterials. The bacterial flagellum is a supercoiled assembly typically composed of 11 stacked protofilaments. On the one hand, flagellin monomers from adjacent protofilaments of the flagellum form hydrophobic interactions and hydrogen bonds between their N-terminal D1 (ND1)  $\alpha$ -helices. On the other hand, the interactions between a subunit (s<sub>0</sub>) and the next monomeric building block in the same protofilament (s<sub>+11</sub>), which allow the helical elongation of the flagellum, take place between the ND1 domain of the s<sub>0</sub> lower subunit, and the ND0 and portion of the ND1 domain of the s<sub>+11</sub> subunit (Wang *et al.*, 2017). In this study, the flagellin Hag from *B*.

subtilis, which comprises only the minimal domains for TLR5 stimulation and polymerization, that is, D0 and D1, was used. Chimeric Hag proteins were expressed as recombinant proteins with three tandem repeats of the well-conserved M2e epitope from the influenza A virus (3M2e) (Huleatt et al., 2007b). The M2e sequence is highly conserved among influenza A virus strains despite the frequent antigenic drift and shift altering other surface proteins of the virus and represents an attractive antigen candidate for universal influenza vaccines (Mezhenskaya et al., 2019). The M2e epitope was expressed in tandem repeats to increase the antibody-specific immune response (Huleatt et al., 2008) and linked to Hag by a GGGSGGGS flexible linker to allow independent folding of the two moieties. In a first chimeric protein, Hag-3M2e184, the 3M2e motif was inserted between the β-hairpin of the hinge domain and the C-terminal α-helix of the D1 domain (CD1), that is, between positions 184 and 185 (Figure 3.2A). Such a strategy, which essentially consists of replacing the domains D2 and D3 typically present in most flagellins, was previously used to design flagellin-based vaccines and has been shown to permit elongation into nanotubes (Bennett et al., 2015; Klein et al., 2018; Liu et al., 2011; Stepanova et al., 2018). In a second chimeric flagellin, Hag-3M2ect, the 3M2e motif was conjugated to the C-terminus to induce steric hindrance around domain D0 and to prevent flagellin elongation by hindering the interactions of D0 domain with the D1 domain of neighboring proteins (Figure 3.2A). Hag and 3M2e-chimeric proteins were recombinantly expressed in fusion with a glutathione S-transferase (GST) tag in E. coli and purified by glutathione affinity chromatography and on-column cleavage of the GST tag. SDS-PAGE and western blot analyses showed good purity of 3M2e (8 kDa), Hag (32.6 kDa), Hag-3M2e<sub>184</sub> (41.5 kDa), and Hag-3M2e<sub>Ct</sub> (40.9 kDa), albeit some cleavage could be observed, which is typical for flagellin produced recombinantly (Figure 3.S1) (Huleatt et al., 2007b).



Figure 3.2 Design of chimeric flagellins and their assembly into nanostructures. (a) Structural models of Hag flagellin monomers derived from *B. subtilis* generated by I-TASSER (Yang *et al.*, 2015) and schematic primary structure representation. The domains D0 and D1 are, respectively, colored in red and blue. The hinge domain is presented in gray and the 3M2e motif, in green. (b–d) Negative stain transmission electron micrographs and tridimensional structure representation by structural alignment with Hag filaments (PDB: 5WJT) showing (b) Hag and (c) Hag-3M2e<sub>184</sub> nanotubes, and (d) Hag-3M2e<sub>Ct</sub> ring-like nanostructures. Proteins were assembled in PBS pH 7.4 at 1 to 1.5 mg/mL for 72 h at RT by the addition of 400 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and salts were removed by extensive dialysis before TEM imaging.

Purified flagellins were assembled into supramolecular structures by salting out with 400 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 72 h, a method previously used for the *in vitro* polymerization of *Salmonella* flagella (Bennett *et al.*, 2015; Ikeda *et al.*, 1984). Under these conditions, unmodified Hag assembled into nanotubes exhibiting a high degree of contrast in negative stain TEM with a micron-scale length and a uniform diameter along the nanotubes of  $13.06 \pm 1.21$  nm (Figure 3.2B and 3.S2). These nanotubes resembled

native B. subtilis flagella, which have a diameter of approximately 12.5 nm (Wang et al., 2017). Salting-out-induced polymerization of Hag-3M2e<sub>184</sub> also led to the formation of nanotubes (nTubes-3M2e), indicating that the addition of an antigen between the  $\beta$ -hairpin domain and the CD1  $\alpha$ -helix of the D1 domain of Hag does not preclude its elongation into nanotubes (Figure 3.2C). These micron-scale length nanotubes showed a diameter of  $13.73 \pm 2.49$  nm, which was slightly higher and less uniform along the filaments compared to Hag (Figure 3.2B and 3.S2). Moreover, the outer regions of Hag-3M2e184 nanotubes showed a lower degree of contrast in the TEM micrographs than Hag nanotubes. This observed higher heterogeneity in diameter and lower contrast displayed by 3M2e-decorated nanotubes can be explained by the presence of the epitope at the surface of the assemblies, as expected from molecular modeling (Figure 3.2A). Similar effects have been previously reported for nanotubes obtained from the assembly of a recombinant FliC flagellin conjugated with an epitope from the Dengue 2 virus and were attributed to the flexibility of the epitope at the surface of the filaments (Bennett et al., 2015). According to our hypothesis, Hag-3M2ect assembled into low aspect ratio nanoparticles with diameters between 10 and 15 nm, with many of them showing a ring-like morphology (nRings-3M2e) characterized by a small hollow cavity in their center, similar to the 2.5 nm diameter cavity found in the center of the flagellum (Wang et al., 2017), and some short nanotubes could also be observed (Figures 3.2D and 3.S3). The predicted tridimensional structure of Hag-3M2ect, indicated that the C-terminal conjugation of the antigen causes steric hindrance around the D0 domain, which inhibits its interactions with the D1 domain of neighboring Hag, while interactions between D1 domains of adjacent proteins are not disturbed (Figure 3.2A). This observation and the fact that the (NH4)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration used for assembly is at the bottom of the range of concentrations usually used for assembling flagellins (Ikeda et al., 1984) would explain the formation of kinetically trapped nRings-3M2e nanostructures. This kinetic trapping of the self-assembly process was overcome by doubling the

(NH4)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration to 800 mM, which further prompts hydrophobic interactions and, ultimately, elongation of Hag-3M2e<sub>Ct</sub> into nanotubes (Figure 3.S4). Considering that each monomer in the flagellum shows a rotation and an upwards translation in the three-dimensional space compared to the adjacent monomer (Maki-Yonekura *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017), the structures showing a ring-like morphology in the nRings-3M2e formulations are likely not perfectly closed rings, but rather a mixture of rings, disks, and/or short multilayered nanotubes of variable lengths and number of subunits (Figure 3.S3), with each monomer showing a degree of translation compared to the adjacent building block. To the best of our knowledge, this is the first time engineered flagellin-based low aspect ratio nanostructures are reported. These proteinaceous particles could represent a promising immunostimulant nanomaterial for the delivery of antigenic determinants, a hypothesis that we investigated in the present study.

3.5.2 Flagellin-based Nanostructures are  $\alpha$ -Helix-Rich Structures Exposing the Antigens at their Surface

Flagellin monomeric proteins are known to self-assemble into flagella *in vivo* as well as into micrometer-long filaments in vitro upon salting out (Ikeda *et al.*, 1984; Wakabayashi *et al.*, 1969). However, trapping of flagellin assemblies into lower aspect ratio ring-like nanoparticles and usage of such nanomaterials for vaccine applications have never been reported. First, we analyzed these flagellin-based assemblies using a combination of biophysical and biochemical methods. Self-assembly of Hag- $3M2e_{Ct}$  into nRings-3M2e was achieved by salting out of 1.3 mg/mL protein with 400 mM (NH4)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in PBS pH 7.4 for 72 h at RT. TEM analysis of over 400 particles revealed a diameter of 11.80 ± 1.22 nm (Figure 3.3A), which is in the range of the 12.5 nm diameter reported for *Bacillus* flagella (Wang *et al.*, 2017). DLS analysis indicated

a hydrodynamic diameter of  $17.3 \pm 4.3$  nm for nRings-3M2e with a polydispersity index of 0.4 compared to  $7.2 \pm 2.0$  nm for monomeric Hag-3M2ect, indicative of the self-assembly process (Figure 3.3B). Such polydispersity also indicates the presence of diverse nanoparticle morphologies and lengths. Anti-M2e ELISA analysis confirmed that the M2e epitopes maintain their antigenicity and are exposed at the surface of the nRings-3M2e assemblies (Figure 3.3C). The self-assembly of Hag-3M2ect into nRings-3M2e was further evaluated by UV and CD spectroscopy. A significant increase in the turbidity of the solution, measured by the O.D. at 350 nm, was observed upon assembly (Figure 3.3D, as previously reported for flagellin polymerization into filaments (Ikeda et al., 1984). It is known that an increase in the particle size is associated with an increased turbidity of the solution (Bourgault et al., 2011; Elsayed et Cevc, 2011). As expected from the known structure of flagellin proteins, both Hag-3M2ect and nRings-3M2e showed far-UV CD spectra characterized by two minima at 222 and 208 nm, and a maximum at 192 nm, which is typical for a secondary structure rich in a-helices (Wakabayashi et al., 1969). The nRings-3M2e showed a higher MRE222nm/MRE208nm ratio compared to monomeric Hag-3M2ect, which could be associated with the stabilization of the  $\alpha$ -helical secondary structure by the formation of coiled-coil quaternary assembly motifs (Figure 3.3E) (Sala et al., 2016). A similar trend, with a higher variation in the ratio MRE<sub>222nm</sub>/MRE<sub>208nm</sub> upon assembly, was also observed for Hag-3M2e184 and its assembled nanotube counterpart (Figure 3.S5), for which coiled-coil motifs are known to drive self-assembly (Hyman et Trachtenberg, 1991; Wang et al., 2017). The near UV CD spectra of Hag-3M2ect and nRings-3M2e showed noticeable differences in the CD signal between 260 and 300 nm, which accounts for the environments of aromatic residue side chains (Figure 3.3F). Hag primary sequence contains five phenylalanine and one tyrosine, whereas each M2e epitope contains one tryptophan residue. These amino acids usually show CD signals around 225–270, 275–282, and 290–305 nm, respectively (Kelly et al., 2005). The tyrosine and four of the phenylalanine residues are located within the hinge coil and

the  $\beta$ -strand region between the ND1 and the CD1  $\alpha$ -helices. Because these helices are involved in the interactions between adjacent monomers, assembly of Hag-3M2e<sub>Ct</sub> likely induces a change in the microenvironment of these side chains, explaining the difference in the CD signal between 260 and 290 nm (Wang *et al.*, 2017). Variation in the near UV CD signal was more pronounced for the assembly of Hag and Hag-3M2e<sub>184</sub> into nanotubes (Figure 3.S5). These results highlight that the MRE<sub>222nm</sub>/MRE<sub>208nm</sub> ratio in far-UV CD and the variation of near-UV CD signal constitute efficient methods to assess the assembly of flagellins into coiled-coil nanostructures and indicate structural similarities between nRings-3M2e and Hag nanotubes.



Figure 3.3 Characterization of Hag-3M2e<sub>Ct</sub> self-assembly into nRings-3M2e. (a,b) Size distribution of nRings-3M2e obtained by (a) TEM analysis and (b) DLS. (c) Accessibility of the M2e epitope at the surface of the monomeric and assembled proteins evaluated by ELISA. (d) Turbidity of the solution at 350 nm. Data represent the mean  $\pm$  SD of four independent experiments. Statistical significance was determined by one-tailed *t*-test (\*\**P* < 0.01). (e) Far-UV and (f) near-UV CD spectra of Hag-3M2e<sub>Ct</sub> and

nRings-3M2e. (a–f) Hag-3M2e<sub>Ct</sub> was assembled into nRings-3M2e at a concentration of 1.3 mg/mL in PBS (pH 7.4) supplemented with 400 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 72 h at RT.

#### 3.5.3 Flagellin Ring-Like Nanoparticles are Efficiently Internalized by APCs

With a diameter between 10 to 20 nm and an organized repetitive display at their surface (Figure 3.3A,B), flagellin-based ring-like particles show key characteristics for efficient internalization by APCs (Al-Halifa et al., 2019; Bachmann et Jennings, 2010). Internalization by APCs, such as DCs, macrophages and B cells, is a prerequisite for the loading of antigens onto major histocompatibility complex (MHC) class I and/or II molecules for presentation to T cells. This process is critical for the establishment of a specific immune response and long-lasting immunological memory (Trombetta et Mellman, 2004). Thus, we investigated the internalization of fluorescently labeled monomeric Hag-3M2e<sub>Ct</sub> and nRings-3M2e by murine DCs (DC2.4) and macrophages (J774.A1) by confocal microscopy and flow cytometry. The nanostructures were fluorescently labeled post-assembly on their primary amine groups with NHS-Alexa 488. TEM imaging confirmed that the nanoring morphology was conserved upon labeling (Figure 3.S6) and the DOL was determined after extensive dialysis. As observed by confocal microscopy, both monomeric Hag-3M2e<sub>ct</sub> and nRings-3M2e were efficiently internalized by DCs and macrophages (Figure 3.4). A notable change in the morphology of both cell types was also observed upon treatment with Hag-3M2e<sub>Ct</sub> and nRings-3M2e, indicative of their capacity to stimulate APC maturation (Kim et Kim, 2019; Lee et al., 2013a). Quantification by flow cytometry revealed that the two formulations were uptaken by APCs in a concentration-dependent manner and that the ring-like assemblies were significantly more internalized by DCs than their monomeric counterparts (Figure 3.4A,B). The preferential cellular uptake of nRings-3M2e by DCs is an interesting feature for the establishment of a specific immune

response, as DCs are known as the most efficient APCs for stimulating T cells (Liu et Roche, 2015; Trombetta et Mellman, 2004). In contrast, macrophages did not show any significant differences in the internalization levels between Hag-3M2ect and nRings-3M2e, albeit a certain trend toward the assemblies could be observed. (Figure 3.4C,D) Macrophages have a notable ability to internalize soluble components of the external media, as they can uptake the equivalent of twice their surface area of liquid per hour via pinocytosis and recycling (Trombetta et Mellman, 2004). This remarkable ability to non-specifically endocytose surrounding soluble antigens likely explains why both formulations are similarly internalized by macrophages. Moreover, macrophages can also uptake soluble components in a specific manner by receptor-mediated phagocytosis following binding and activation of cell surface pattern recognition receptors (PRRs), such as TLRs (Liu et Roche, 2015; Trombetta et Mellman, 2004). Considering that flagellin is the main TLR5 agonist and that J774.A1 cells endogenously express the TLR5 (Andreu et al., 2017; Müller et al., 2017), the internalization of Hag-3M2ect and nRings-3M2e by macrophages could also implicate receptor-mediated phagocytosis. Overall, preferential internalization of the assemblies could lead to a better bridging of the innate and adaptive immune systems, enhancing the amplitude and duration of the adaptive immune response as well as the immunological memory.



Figure 3.4 Cellular uptake of Hag-3M2e<sub>Ct</sub> and nRings-3M2e by APCs. Internalization by (a,b) dendritic cells (DC2.4) and (c,d) macrophages (J774.A1) evaluated by (a,c) confocal microscopy and (b,d) flow cytometry. Cells were incubated for 4 h in the presence of (a,c) 10 µg/mL or (b,d) 1 and 10 µg/mL of Alexa 488-labeled Hag-3M2e<sub>Ct</sub> or nRings-3M2e. (b,d) Flow cytometry histograms represent four independent experiments, and MFI data represent the mean  $\pm$  SD of these four independent experiments. Statistical significance was determined by multiple *t*-test (\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; ns: not significant).

#### 3.5.4 Flagellin-Based Assemblies Stimulate the Immune Receptor TLR5 in Vitro

Apart from participating in receptor-mediated phagocytosis, the TLR5 plays an important role in the immunomodulatory properties of flagellin by inducing the secretion of cytokines responsible for T cell stimulation and differentiation, and chemokines, which lead to immune cell recruitment (Hajam et al., 2017; Mizel et Bates, 2010). Therefore, we evaluated the capacity of Hag-based assemblies to stimulate TLR5 signaling using the HEK-Blue mTLR5 reporter cell line. We observed that both the monomeric Hag-3M2ect and the nRings-3M2e efficiently activated this immune receptor (Figure 3.5). With an EC<sub>50</sub> of 369.8 pg/mL, nRings-3M2e showed a 2.5-fold decreased potency to stimulate the TLR5 in comparison to Hag-3M2ect, showing an EC50 of 148.4 pg/mL. In comparison, a 25-fold decrease of TLR5 activation was previously reported for polymerized Salmonella flagellin filaments compared to their monomeric counterpart (Simon et al., 2011; Smith et al., 2003). It has been shown that the binding of flagellin to TLR5 involves two interfaces encompassing residues in the ND1 domain and in the CD1 domain (Song *et al.*, 2017; Zhang et al., 2015a). Considering that regions of the D1 domain are involved in monomer self-recognition, this decrease of TLR5 activation by the ring-like nanoassemblies can be explained by the partial burying of the TLR5-binding interfaces inside the nanostructures (Yonekura *et al.*, 2003). The lower  $\alpha$ -helical stabilization (Figure 3.3E and 3.S5) in the ensemble of nanoparticles in comparison with nanotubes could contribute to conformational flexibility, which facilitate TLR5 binding (Smith et al., 2003). Overall, Hag-based ring-like nanoparticles elicit potent TLR5 stimulation abilities, similar to their monomeric counterpart, in contrast to flagellin-based filaments.



Figure 3.5 TLR5 stimulation by Hag-3M2e<sub>Ct</sub> and nRings-3M2e. HEK-Blue mTLR5 cells were used to evaluate the stimulation of TLR5. Data are expressed as fold induction relative to cells treated with the PBS vehicle control and represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments, each of them performed in triplicate. Statistical significance was evaluated using multiple *t*-test (\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; and \*\*\**P* < 0.001).

#### 3.5.5 Flagellin-based Nanoparticles Activate the Innate Immune System

Stimulation of TLR5 by flagellin has been associated with the secretion of proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- $\alpha$  (Eaves-Pyles *et al.*, 2001; Feuillet *et al.*, 2006; Hayashi *et al.*, 2001; Rolli *et al.*, 2010), which are key indicators of the activation of the innate immune response (Hayashi *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2014). Nonetheless, sustained secretion of these cytokines can lead to protracted pain and other adverse side effects (Zhang et An, 2007). Hence, it is important to maintain a controlled level of these proinflammatory cytokines to induce an efficient immune response without promoting hyperalgesia (Tanaka *et al.*, 2014; Zhang et An, 2007). Accordingly, we measured IL-6 and TNF- $\alpha$  serum levels in mice 2, 6 and 24 h after i.p. inoculation (Leenaars et Hendriksen, 1998). Two hours after inoculation, time at which maximum proinflammatory cytokine secretion has been reported for the inoculation with *Salmonella* flagellins (Eaves-Pyles *et al.*, 2001; Feuillet *et al.*, 2006), mice

inoculated with Hag, Hag-3M2ect and nRings-3M2e showed IL-6 levels of 1262.6, 990.0 and 1349.6 pg/mL respectively, while mice inoculated with the buffer vehicle control and the 3M2e epitope showed comparably low IL-6 levels (Figure 3.6A). The serum levels of IL-6 for mice inoculated with Hag-based formulations are in agreement with previous studies performed with Salmonella flagellins (Hayashi et al., 2001; Rolli et al., 2010). A similar trend was observed for TNF-a levels after 2 h, with Hag-, Hag- $3M2e_{Ct}$ - and nRings-3M2e-inoculated mice showing significant TNF- $\alpha$  levels of 40.81, 35.59 and 38.82 pg/mL, while TNF- $\alpha$  was practically not detectable in serum of mice inoculated with the buffer vehicle control and the 3M2e formulation (Figure 3.6B). Thus, mice inoculated with monomeric Hag-3M2ect and their assembled counterpart showed comparable secretion of TNF- $\alpha$  and IL-6 2 h after inoculation, suggesting similar capacity to stimulate the innate immune system. Interestingly, although the ring-like particles showed a slight decrease in TLR5 activation in vivo compared to monomeric flagellin no significant differences in serum cytokine levels were observed after 2 h. In fact, other molecular mechanisms, such as NLRC4 inflammasome signaling, are known to contribute to flagellin-induced IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion, which could compensate for the decrease in TLR5 activation (Matusiak et al., 2015; Tenthorey et al., 2017). Because nRings-3M2e are more internalized by DCs than Hag-3M2ect, it is possible that they would interact with intracellular NLRs to a higher extent than the monomers. The inflammasome signaling pathway would then lead to secretion of IL-1 $\beta$ , which can act as a paracrine factor to induce IL-6 secretion (Cahill et Rogers, 2008; Duncan et Canna, 2018). After 6 h, serum IL-6 returned to a basal level for all groups, except for mice immunized with the nRings-3M2e assemblies (Figure 3.6A), for which IL-6 levels returned to baseline after 24 h, as they were undetectable by ELISA (data not shown). This prolonged effect by nRings-3M2e could be indicative of an IL-1 $\beta$ -induced IL-6 secretion, where IL-6 expression would be delayed compared to TLR5-induced IL-6 secretion (Cahill et Rogers, 2008). Serum TNF- $\alpha$  for all groups were back to basal levels 6 h after i.p. inoculation, as they were undetectable by ELISA

(data not shown). The induction of proinflammatory cytokine secretion at 2 h postinoculation also correlated with a weight loss of 4 to 5% 24 h after i.p. inoculation with all flagellins, while mice inoculated with the buffer vehicle control and the epitope showed no weight loss (Figure 3.6C). Overall, assembling Hag into low aspect ratio nanoparticles did not significantly impact its ability to stimulate the inflammatory and innate immune responses *in vivo*, highlighting the potential of these nanostructures as an immunostimulatory antigen delivery system.



Figure 3.6 Evaluation of the innate immune response induced by monomeric and assembled Hag flagellin. (a) Serum IL-6 levels 2 and 6 h after inoculation, left and right panels, respectively. (b) Serum TNF- $\alpha$  levels 2 h after inoculation. (c) Percentage of initial weight measured 24 h after inoculation. (a–c) Data represent the mean  $\pm$  SEM and statistical significance between groups (n = 6 per group, n = 5 for Hag WT and Hag-3M2e<sub>Ct</sub> in a and b) was assessed by means of one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.0001; ns: not significant).

# 3.5.6 Immunogenicity of nRings-3M2e upon Intramuscular Immunization

It has been previously reported that nanostructures with a diameter of approximately 15 nm composed of the nucleoprotein (N) of the human respiratory syncytial virus (RSV) and functionalized with viral antigens are efficient in enhancing the antibody response against poorly immunogenic epitopes from respiratory viruses such as RSV

and influenza A virus (Hervé et al., 2017; Hervé et al., 2014). Similarly, flagellin-based ring-like structures, which were more internalized by DCs than their monomeric counterpart, while being able to potently activate the innate immunity, likely induce a robust antigen-specific immune response. Therefore, we evaluated the capacity of nRings-3M2e to induce an antibody response against the M2e epitope. Mice were immunized intramuscularly following the timeline presented in Figure 3.7A with equimolar doses of 3M2e, Hag-3M2ect, or nRings-3M2e, with or without aluminum salts (alum). Immunization with Hag-3M2ect and nRings-3M2e potentiated the M2especific antibody response, as observed by the IgG titers at days 13 and 28 ppi that were significantly higher than for mice immunized with 3M2e alone (Figure 3.7B). At day 13 ppi, monomeric and assembled flagellin showed similar anti-M2e antibody responses while, at day 28 ppi, Hag-3M2ect induced a significantly higher response than nRings-3M2e. The same trends were observed for alum-adjuvanted formulations at days 13 and 28 ppi. Previous studies have highlighted the crucial role of TLR5 signaling for the adjuvant effect of flagellins (Feuillet et al., 2006). The lower anti-M2e specific IgG response elicited by nRings-3M2e compared to their monomeric counterpart at 28 days ppi could be associated with their reduced TLR5 activity (Figure 3.5). However, antigen multivalency at the surface of the assemblies should have induced enhanced and/or prolonged B cell stimulation in the lymph nodes (López-Sagaseta et al., 2016). Although the response at day 28 ppi was slightly lower for nRings-3M2e, it is possible that this formulation would induce a better long-lasting antibody response, a hypothesis that will need to be further evaluated. Immunization with Hag-3M2e and nRings-3M2e with or without alum showed identical IgG subclass profiles at day 28 ppi with IgG1 being predominant for both, which is indicative of a Th2 humoral response. Both formulations also induced high M2e-specific IgG2a and IgG2b secretion, which are indicative of a Th1 cellular response (Figure 3.6D). This is in accordance with the mixed Th1/Th2 immune response previously observed for Salmonella flagellins (Gauthier et al., 2020; Girard et al., 2011; Stepanova et al., 2018).

Hence, assembling Hag into low aspect ratio nanostructures did not significantly alter the polarization nor the amplitude of the flagellin-induced immune response directed against the grafted antigen. Nonetheless, additional studies would be needed to evaluate the impact of the assembly on B cell stimulation in the lymph nodes and on the duration of the antibody response.



Figure 3.7 Immunogenicity of monomeric and assembled Hag-3M2e<sub>Ct</sub>. (a) Immunization timeline. (b) Anti-M2e total IgG titers 13 and 28 days ppi, left and right, respectively (n = 12 per group). (c) Anti-M2e IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 titers 28 days after primary immunization (n = 4 per group). (a–c) Mice were immunized intramuscularly and alum-adjuvanted formulations were prepared with a 1:1 (alum/protein) volume ratio. Data represent that the mean ± SEM and statistical significance between groups was assessed using one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*P < 0.0001; ns: not significant).

Flagellin-based vaccines are also known to induce high flagellin-specific antibody titers (Huleatt et al., 2007b). While some studies have suggested that this response should not affect further use of this protein in vaccination (Ben-Yedidia et Arnon, 1998; Huleatt et al., 2007b), others studies have stressed some concerns regarding the reduction of TLR5 activation by pre-existing flagellin-specific antibodies (Biedma et al., 2019; Nempont et al., 2008). Interestingly, nRings-3M2e, with and without alum, induced significantly lower Hag-specific IgG titers than Hag-3M2ect (Figure 3.8). This could be due to an overall reduced immune response in vivo and/or to a more targeted immune response against the antigen for the ring-based assemblies. These nanostructures expose a high density of the M2e at their surface, while most of the Hag antigenic regions are mainly buried within the core of the assembly (Ponomarenko et al., 2008). Antigen multivalency at the surface of the particles could have modulated the B-cell response toward the M2e (Abbott et Crotty, 2020). Indeed, lower exposition of Hag antigenic regions compared to the exposition of the M2e at the surface of the assemblies could ultimately contribute to a proportionally lower activation of flagellinspecific B cells compared to that of M2e-specific B-cells upon booster immunization. Proportionally lower activation of Hag-specific B cells would then lead to a lower ratio of anti-flagellin to anti-M2e IgG. However, other factors, such as affinity of BCRs with the antigen and number of specific precursor B cells contribute to the targeting of the antibody response (Abbott et Crotty, 2020). Hence, the exact contribution of epitope multivalency at the surface of nRings-3M2e on the modulation of the M2e-specific to flagellin-specific antibody response remains to be evaluated.



Figure 3.8 Specific antibody response directed against Hag. Mice were intramuscularly immunized with 20 µg Hag-3M2e and nRings-3M2e, or equimolar dose of 3M2e and antibody titers were evaluated at day 28 ppi. Adjuvanted formulations are prepared with a 1:1 (alum/protein) volume ratio. Data represent the mean  $\pm$  SEM, and statistical significance between groups (n = 4 per group) was evaluated by one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test (\*\*\*\*P < 0.0001; ns: not significant).

3.5.7 Immunogenicity and Protection Conferred by the Flagellin-Based Nanoassemblies

The primary site of infection of respiratory viruses such as influenza viruses is the upper and lower respiratory tracts (Zeng *et al.*, 2013). The nasal and bronchusassociated lymphoid tissues (NALT and BALT) present in the respiratory tract are rich in specialized immune cells and constitute a promising target for the induction of a protective immunity against such respiratory viruses (Holmgren et Czerkinsky, 2005). Moreover, the TLR5 is highly expressed in the airway epithelium, and *Salmonella* flagellins have been shown to potentiate the mucosal immune response in the lungs (Pino *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012). Accordingly, we investigated the potential of flagellin-based ring-like nanoparticles to confer protection against the influenza virus in mice immunized by the i.n. route. Mice received two doses of 3M2e, Hag-3M2ect or nRings-3M2e at 2 week interval, followed by an experimental challenge 2 weeks after the booster dose (Figure 3.9A). As observed for the i.m. immunization (Figure 3.7B), mice immunized with Hag-3M2ect and nRings-3M2e induced higher M2especific IgG in the sera at days 13 and 28 ppi than mice vaccinated with 3M2e (Figure 3.9B). In contrast to the i.m. immunization, where Hag-3M2ect induced slightly higher anti-M2e IgG titers, both monomeric and ring-like nanostructures formulations equally potentiated the M2e-specific response following i.n. immunization. As TLR5 expression is particularly high in the respiratory tract as opposed to muscular tissues, it is possible that both assembled and monomeric Hag-3M2e<sub>Ct</sub> exerted a maximal adjuvant effect at the administered dose, hence showing an equivalent antibody response (Hajam et al., 2017). As observed by the elevated anti-M2e IgG1 and IgG2a/b titers, IgG subclasses profiling suggests a mixed Th1/Th2 immune response (Figure 3.9C). Total IgG and IgA titers in BAL fluids were measured at 28 days ppi to evaluate the mucosal immune response induced by the flagellin-based vaccines. Although Hag-3M2ect and nRings-3M2e induced similarly high IgG responses in the lungs as opposed to 3M2e, the ring-like assemblies were the only formulation to induce significant IgA secretion (Figure 3.9D). While IgG can diffuse from the plasma to the respiratory tract, IgA are the principal immunoglobulin produced at the respiratory mucosal surfaces upon i.n. immunization (Corthesy, 2013) and constitute an important first line of defense against respiratory viruses in the upper respiratory tract (Abreu et al., 2020; Holmgren et Czerkinsky, 2005; Renegar et al., 2004). The enhanced IgA secretion upon i.n. immunization with nRings-3M2e could be attributed to sustained stimulation of NALT and BALT resident cells due to a lower lung clearance rate of the nanostructures that have a higher molecular weight (Kim et Malik, 2003). Protein nanorings with a diameter of 15 nm have been previously shown to induce IgA secretion, which was associated with protection against an influenza A virus infection (Hervé et al., 2014). At day 28 ppi, mice were infected with 5 × LD<sub>50</sub> of H1N1(PR8), and weight loss and clinical signs were evaluated on a daily basis. Mice that showed a weight loss of over 20% of their weight or intensity of clinical symptoms of three were euthanized. Although immunization with the 3M2e-based vaccine did not induce any protective immunity, Hag-3M2e<sub>Ct</sub> and nRings-3M2e offered partial protection against influenza A lethal infection, with 88 and 50% survival, respectively (Figure 3.9E). The difference in survival rates induced by monomeric and assembled Hag was not statistically significant. The two flagellin-based vaccines delayed the weight loss and the appearance of the clinical signs induced by the virus, as well as reduced their intensity (Figure 3.9F,G). Not only these observations highlight the potential of flagellin-based nanostructures as an antigen delivery system but they also expose for the first time the effectiveness of *B. subtilis* Hag flagellin to induce a protective immune response.



Figure 3.9. Specific anti-M2e immune response and experimental challenge against the influenza A virus. Mice were intranasally immunized with 20  $\mu$ g Hag-3M2e<sub>Ct</sub> and nRings-3M2e or an equimolar dose of 3M2e. (a) Immunization timeline. (b) Total anti-M2e IgG titers at 13 days ppi (left) and 28 days ppi (middle), and kinetics of IgG titers
(right) (n = 12 per group). (c) Anti-M2e IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 titers at 28 days ppi (n = 4 per group). (d) M2e-specific total IgG (left) and IgA (right) titers in BAL fluids 28 days ppi (n = 4 per group). (e) Percent survival, (f) weight loss, and (g) clinical scores following i.n. inoculation with 5 × LD<sub>50</sub> of H1N1 (PR8) (n = 8 per group). Data represent the mean ± SEM, and statistical significance between groups was assessed with a one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*\*P < 0.001; ns: not significant).

### 3.6 Conclusion

Owing to their biocompatibility, nanoscale size, and ordered organization, protein nanoparticles represent promising antigen delivery systems to enhance the specific immune response against the grafted antigen(s). Nonetheless, such proteinaceous nanomaterials often require the coadministration, or conjugation, with an additional adjuvant to induce a robust and long-lasting protective immune response (Bachmann et Jennings, 2010). Although the protein flagellin is well known for its immunomodulatory properties and for its capacity to assemble into ordered nanotubes, the manipulation of the self-recognition process to design tailored lower aspect ratio nanoparticles with intrinsic immunostimulant capacity has never been investigated so far. In this study, we showed that by antigen positioning, the self-assembly and final morphology of flagellin-based supramolecular structures could be modulated. While addition of three tandem repeats of the M2e epitope derived from the influenza A virus in the mid-sequence of Hag flagellin allowed its elongation into nanotubes, addition of the same antigen at Hag's C-terminus hindered interactions responsible for nanotube elongation and kinetically trapped the assembly into nanoring-like structures. These nanostructures showed structural and morphological similarities with Hag-based nanotubes; a diameter of approximately 12 nm, a small hollow cavity, and a secondary structure rich in  $\alpha$ -helices. Flagellin ring-like structures were more readily internalized by DCs than their monomeric counterpart and showed a 2.5-fold reduced potency to

stimulate the TLR5. This reduction in TLR5 activation, however, did not correlate with reduction of the innate immune responses *in vivo*. Flagellin-based nanoring-like structures potentiated the M2e-specific immune response and induced a protective immune response against homologous challenge upon i.n. immunization. Further studies involving immune cell characterization will be required to fully appreciate the impact of assembling flagellin into low aspect ratio nanoparticles on the innate and adaptive immune responses, and the establishment of an immunological memory. Overall, the results of this study expand the collection of self-adjuvanted and versatile nanostructures, supporting the fast development of vaccines against emergent pathogens.

# 3.7 Supporting information

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

Table 3.S1 Scale for clinical symptoms of influenza infection



Figure 3.S1 Coomassie Blue stained SDS-PAGE (left) and anti-M2e western blot (right) analysis of the proteins. Arrows identify protein bands at the expected molecular weight for each protein.



Figure 3.S2 Diameter of the flagellin-based nanotubes determined by TEM imaging. (a) Size distribution for Hag-based nanotubes and (b) Hag- $3M2e_{184}$ -based nTubes-3M2e. Proteins were assembled in PBS pH 7.4 at 1 to 1.5 mg/mL for 72 h at RT by addition of 400 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



Figure 3.S3 Representative TEM negatively stained images of low aspect ratio nanostructures obtained from the assembly of Hag- $3M2e_{Ct}$  in presence of 400 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hag- $3M2e_{Ct}$  was assembled in PBS pH 7.4 at 1.2 mg/mL for 72 h at RT before extensive dialysis.



Figure 3.S4 Representative TEM negatively stained images of nanotubes formed by the assembly of Hag- $3M2e_{Ct}$  in presence of 800 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hag- $3M2e_{Ct}$  was assembled in PBS pH 7.4 at 1.5 mg/mL for 72 h at RT before extensive dialysis.



Figure 3.S5 Far-UV and near-UV CD spectra of monomeric flagellin and assembled nanotubes. (a) Far-UV and (b) Near-UV CD spectra of monomeric and assembled Hag (top) and Hag-3M2e<sub>184</sub> (bottom).



Figure 3.S6 Representative TEM negatively stained images of Alexa488-labeled nRings-3M2e. Hag-3M2e<sub>Ct</sub> was assembled in PBS pH 7.4 at 1 to 1.5 mg/mL for 72 h at RT by addition of 400 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Assembled nRings-3M2e were labeled by addition of 20 molar equivalents of Alexa Fluor 488 NHS Ester (Succinimidyl Ester) in phosphate buffer 50 mM pH 8.0 for 3 h at RT under rotary agitation. The dye was removed by extensive dialysis.

### CHAPITRE IV

#### DISCUSSION

La vaccination est une mesure excessivement efficace pour lutter contre la propagation de maladies infectieuses et permet chaque année de sauver des millions de vies humaines ainsi que de protéger les animaux domestiques et d'élevage. Les vaccins sous-unitaires ont récemment émergé comme une alternative prometteuse pour contourner les risques associés à l'inactivation incomplète et au retour à la virulence des vaccins à base de pathogènes inactivés et atténués, respectivement. Les vaccins sous-unitaires étant cependant peu immunogènes, leur utilisation est dépendante du développement et de la recherche sur les adjuvants, substances qui permettent d'augmenter la réponse immunitaire (Foged, 2011). Toutefois, encore aujourd'hui peu d'adjuvants sont approuvés pour l'utilisation chez l'humain et une très faible proportion d'entre eux conviennent pour l'administration par les muqueuses, une voie particulièrement efficace pour prévenir les infections respiratoires. Depuis près de vingt ans, les flagellines bactériennes, particulièrement celles provenant des bactéries du genre Salmonella, ont émergé en tant qu'adjuvant prometteur pour l'immunisation, non seulement par voie systémique mais aussi par voie mucosale (Hajam et al., 2017). Cependant, l'utilisation de cette flagelline en vaccination reste limitée entre autres par l'inflammation prolongée et hors-cible qu'elle provoque. Or, les propriétés inflammatoires et immunostimulantes des flagellines provenant d'autres genres bactériens et de nanostructures dérivées de leur assemblage demeurent peu explorées. Ce projet de maîtrise visait donc à évaluer l'utilisation d'une flagelline dite « minimale » provenant de la bactérie Bacillus subtilis et ne contenant que les domaines

protéiques D0 et D1 nécessaires à la stimulation du système immunitaire, ainsi que des nanostructures dérivées en tant qu'adjuvant et nanoparticule porteuse d'antigènes. Ces travaux ont d'abord montré le potentiel de la flagelline Hag de *Bacillus* en tant qu'adjuvant permettant d'augmenter la réponse immunitaire spécifique à un épitope, tout en présentant des propriétés inflammatoires diminuées par rapport à la flagelline de *Salmonella* FljB. En outre, nos résultats ont montré que le positionnement d'un épitope du virus influenza dans la séquence primaire de Hag permet de moduler le processus d'assemblage ainsi que la morphologie finale des nanostructures à base de cette protéine, permettant d'obtenir des structures du type anneau montrant un faible rapport de forme. Finalement, ces travaux ont permis de mettre en lumière le potentiel des structures en anneaux de flagelline en tant que nanoparticules auto-adjuvantes porteuses d'antigènes en vaccination.

# 4.1 La flagelline de *Bacillus subtilis* induit une réponse inflammatoire réduite par rapport à la flagelline de *Salmonella* FljB

De nombreuses études sur les flagellines FliC et FljB provenant des bactéries du genre *Salmonella* ont montré que leurs capacités adjuvante et d'activation du TLR5 étaient associées aux domaines D0 et D1. Ces domaines, qui sont aussi nécessaires et suffisants à l'assemblage de la flagelline, montrent une forte conservation de séquence et de structure entre les espèces bactériennes (Song *et al.*, 2017; Yonekura *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2012). Les domaines D2 et D3 sont quant à eux facultatifs à l'assemblage et à l'activation du TLR5, en plus d'être en partie responsables d'une réponse hors-cible en vaccination (Biedma *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2017). Par conséquent, nous avons évalué les propriétés immunostimulantes de la flagelline de *Bacillus subtilis*, Hag, ne contenant que les domaines D0 et D1, à induire une réponse spécifique dirigée contre un épitope greffé sur la protéine, tout en diminuant la réponse inflammatoire hors-cible

par rapport à une flagelline de *Salmonella*. Pour ce faire, trois copies de l'épitope conservé du virus influenza M2e ont été conjuguées en C-terminal de Hag ou de FljB.

Les flagellines Hag et FljB ainsi que leurs versions conjuguées au 3M2e présentaient une structure secondaire riche en hélices  $\alpha$  typique des flagellines, indiquant que l'ajout de l'épitope à leur extrémité C-terminale n'affectait pas leur repliement. Les flagellines Hag et Hag-3M2e ont cependant montré une activation du TLR5 murin (mTLR5) diminuée d'un facteur d'environ 2,5 par rapport à FljB et FljB-3M2e, ce qui fut en corrélation avec une réduction de la réponse inflammatoire 2 h après l'injection par voie i.p. chez la souris. Or, certaines études ont montré une moins grande sensibilité du mTLR5 aux variations de séquence comparé au TLR5 humain (hTLR5), qui montre une spécificité réduite aux flagellines contenant des modifications de séquences ou montrant des délétions de domaines (Biedma et al., 2019; Forstnerič et al., 2016; Smith et al., 2003). Il aurait donc été intéressant de reproduire les tests d'activation du TLR5 avec des cellules HEK-Blue hTLR5 en plus des cellules HEK-Blue mTLR5 utilisées dans cette étude afin d'évaluer dans quelle mesure ces résultats seraient transposables chez l'humain. De plus, tel que mentionné dans le chapitre II, la diminution d'activation du TLR5 a été attribuée à l'absence des domaines D2 et D3, qui déstabiliserait les hélices du domaine D1 contenant les régions reconnues par ce récepteur. En effet, il a été montré que la délétion des domaines D2 et D3 de FliC, dont les domaines D0 et D1 sont essentiellement identiques à ceux de FljB, diminuait son activité TLR5 (Biedma et al., 2019). Suivant cette hypothèse, il aurait été pertinent de comparer la résistance des flagellines Hag et FljB à la dénaturation thermique. De plus, malgré l'homologie de séquence élevée observée entre ces deux flagellines dans les régions reconnues par le TLR5, celles-ci présentent une certaine variation, notamment dans les régions comprenant les résidus 110 à 118 du domaine ND1 de Hag et la région de stimulation du TLR5 comprise dans le domaine CD1 (Song et al., 2017). Il se pourrait donc que la baisse d'activation du TLR5 soit aussi en partie associée à cette variation de séquence entre les deux flagellines. Il aurait donc été intéressant d'inclure une version de FljB présentant une délétion de ces domaines dans cette étude pour évaluer séparément l'impact de la variation entre les séquences primaires de Hag et FljB et de l'absence des domaines D2 et D3 sur la réponse inflammatoire et l'activation du TLR5. Alternativement, l'étude aurait pu comprendre une version de Hag comportant une insertion des domaines D2 et D3 de FljB afin d'évaluer si leur ajout augmente la réponse inflammatoire de Hag.

Dans cette étude, l'inflammation causée par la flagelline a été principalement associée à l'activation du TLR5, mais la flagelline est aussi reconnue pour activer l'inflammasome NLRC4 dans le cytoplasme des cellules (Tenthorey *et al.*, 2017). Nous aurions pu comparer les capacités de Hag et FljB à activer ce composant de l'immunité innée. Cependant, les mécanismes qui permettraient à la flagelline de s'échapper des endosomes pour se retrouver dans l'espace cytoplasmique demeurent inconnus et il est probable que l'activation de NLRC4 ne se produise que dans les cas d'infection par des pathogènes flagellés (Mizel et Bates, 2010). En effet, les études montrant l'activation de NLRC4 par les flagellines solubles nécessitent l'utilisation d'un agent de transfection pour livrer les flagellines dans le cytoplasme, ce qui semble peu représentatif des méthodes utilisées en vaccination (Franchi *et al.*, 2006; Matusiak *et al.*, 2015).

Pour ce qui est de la réponse inflammatoire chez les souris, il aurait été intéressant d'obtenir un profil plus complet de celle-ci en mesurant aussi les cytokines issues de la signalisation TLR5 IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , et les cytokines de la famille de l'IL-12 ainsi que les chimiokines MIP 1 $\alpha$  et 2, en plus de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$ . La quantité de sérum de souris obtenue dans nos essais d'inflammation limitait le nombre d'ELISA possibles pour mesurer les niveaux de diverses cytokines. Cependant, les essais multiplex, qui permettent la détection d'une variété de cytokines choisies avec une grande sensibilité et une faible quantité d'échantillon, auraient été particulièrement adaptés à ce type d'analyse (Vignali, 2000). De plus, l'étude de la réponse inflammatoire s'est faite suite à l'injection i.p. puisque cette voie est reconnue pour induire une réponse rapide et de forte intensité dû à la proximité avec la rate et les ganglions lymphatiques inguinaux (Leenaars et Hendriksen, 1998). Il aurait cependant été pertinent d'observer la réponse inflammatoire engendrée par l'inoculation intramusculaire (i.m.), voie utilisée dans cette étude pour l'analyse de la réponse spécifique, afin d'observer si les différences de réponse inflammatoire sont aussi marquées par cette voie d'inoculation. Sachant que le TLR5 est surexprimé chez les personnes et les souris plus âgées, causant une augmentation de l'inflammation en réponse à la flagelline (Qian et al., 2012), l'étude aurait pu comprendre une comparaison des réponses inflammatoire et spécifique à l'épitope induites par les deux flagellines étudiées chez des souris de 18 mois, considérées comme âgées, en plus des souris de 6-8 semaines utilisées (Bates et al., 2008). De plus, certaines études ont montré que l'expression du TLR5 est augmentée chez les souris femelles (Echem et Akamine, 2021). Puisque les essais in vivo ne comportaient que des souris femelles, il est difficile d'évaluer si les effets observés dans cette étude seraient aussi observables chez les souris mâles. En somme, bien que nos résultats exposant des effets pro-inflammatoires diminués pour Hag par rapport à FljB soient prometteurs, ils sont potentiellement peu représentatifs de la réponse inflammatoire engendrée par ces flagellines par différentes voies d'administration chez diverses espèces animales et aussi chez divers sexes et groupes d'âges.

4.2 Les flagellines de *Bacillus* et *Salmonella* induisent des réponses similaires en anticorps spécifiques dirigés contre le M2e

L'immunisation par voie i.m. est la plus couramment utilisée chez l'humain. L'administration par cette voie avec des doses équimolaires des deux flagellines chimériques, Hag-3M2e et FljB-3M2e, a induit une réponse spécifique comparable et permis d'augmenter drastiquement la réponse en anticorps anti-M2e en comparaison à l'administration de l'épitope soluble. Alors que les quantités d'anticorps sont sensiblement identiques pour les deux flagellines, il est toutefois difficile d'estimer si leurs fonctions sont équivalentes. En effet, les anticorps dirigés contre le M2e permettent habituellement de lutter contre l'infection au virus influenza par la reconnaissance de leur fragment Fc par les cellules immunitaires ou par le complément. Par conséquent, nous aurions dû tester l'activité ADCC et CDC des anticorps sur des cellules épithéliales rénales de chien MDCK pré-infectées avec le virus influenza H1N1 A/PuertoRico/8/1934 et présentant donc du M2e à leur surface. Pour tester l'activité ADCC, nous aurions pu ajouter du sérum de souris immunisées contenant des anticorps anti-M2e et utiliser des cellules Jurkat-NFAT transfectées dont l'activation du récepteur FcyRIV murin permet l'expression d'un gène rapporteur de la luciférase (Parekh et al., 2012). Pour la CDC, il suffirait de mesurer la viabilité cellulaire des MDCK suite à l'ajout du sérum contenant les anticorps et de sérum non immunisé, contenant du complément (Duensing et Watson, 2018). De plus, le profil en sousclasses d'IgG indique une polarisation de la réponse mixte Th1/Th2 similaire pour les deux flagellines. À cet effet, il aurait aussi été pertinent d'analyser la réponse cellulaire en plus de la réponse en anticorps. Pour ce faire, nous pourrions récolter les rates des souris immunisées au jour 28 ppi, puis isoler et mettre les splénocytes en culture. Les cellules seraient ensuite stimulées in vitro à l'aide du peptide M2e et les cellules T seraient marquées avec un anti-CD3 et analysées par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-CD8 et CD4, marquant les cellules Tc et Th respectivement. La proportion de cellules activées par la stimulation au M2e serait observée avec des anti-CD69 et CD25 et la réponse mémoire, particulièrement critique en vaccination, avec des anti-CD44 et CD62 (Chesson et al., 2014; Stepanova et al., 2018). La polarisation des Th serait déterminée par analyse ELISA des cytokines IFN-y et IL-4 sécrétées dans le milieu de culture des splénocytes et/ou par la technologie ELISpot (Calzas et al., 2021; Rudra et al., 2010). Faute d'avoir documenté la fonction effectrice des anticorps

et la réponse à médiation cellulaire, il aurait été pertinent d'évaluer la réponse immunitaire protectrice conférée par l'immunisation avec les deux flagellines. La capacité de FljB conjuguée à des répétitions de M2e à induire une réponse protectrice contre une infection au virus influenza A a été montrée dans des études précédentes (Huleatt *et al.*, 2008), alors que la capacité de Hag à faire de même a été montrée au chapitre III de ce mémoire. Cependant, aucune étude ne comprend de comparaison de la protection induite par ces deux flagellines à dose égale et par la même voie d'injection, comparaison qu'il aurait été pertinent d'inclure dans cette étude.

4.3. Le positionnement sélectif de l'antigène 3M2e dans la séquence de Hag permet le contrôle de son assemblage en différentes nanostructures

La flagelline de Bacillus subtilis, Hag, a montré une réponse inflammatoire diminuée pour une réponse en anticorps spécifiques équivalente par rapport à la flagelline couramment étudiée FljB. De plus, Hag comprend les deux domaines nécessaires à l'assemblage de la flagelline en nanostructures. Les nanostructures protéiques sont une avenue intéressante pour favoriser la réponse spécifique contre un épitope, mais elles requièrent habituellement la co-administration et/ou la conjugaison à des molécules adjuvantes pour induire une réponse protectrice robuste contre une infection. Dans ce contexte, nous avons utilisé les capacités d'assemblage de la flagelline de Bacillus subtilis, Hag, pour la conception de nanostructures porteuses d'antigènes du virus de la grippe ayant des propriétés adjuvantes intrinsèques. Sachant que les nanoparticules de tailles inférieures à 200 nm circulent plus facilement dans le système lymphatique et sont internalisées plus efficacement par les APC (Bachmann et Jennings, 2010), nous cherchions à développer des particules plus petites que les filaments de flagelline. Dans cette optique, nous avons ajouté la séquence antigénique 3M2e en C-terminal de Hag pour causer de l'encombrement stérique près du domaine D0 et ainsi bloquer les interactions non-covalentes responsables de l'élongation de la flagelline en nanotubes

(Wang et al., 2017; Yonekura et al., 2003). Nous avons observé que, contrairement à l'ajout de l'épitope en milieu de séquence qui permet l'élongation de Hag en filaments, la présence du 3M2e à son extrémité C-terminale résultait en structures de type anneau ayant un faible rapport de forme. Cependant, il se pourrait que ce phénomène soit M2edépendant et il aurait été pertinent de tester si l'ajout d'autres séquences antigéniques en C-terminal de Hag permettait aussi la formation de nanostructures de faible rapport de forme. En effet, M2e ayant une charge nette de -2 à pH physiologique, Hag-3M2ect présentait une charge de -6 près du domaine D0, ce qui aurait pu contribuer à inhiber la formation d'interactions hydrophobes entre ce domaine et le domaine D1 d'autres monomères de flagelline. De futures études avec des répétitions d'épitopes ayant une charge nette positive, comme l'épitope E2EP3 (STKDNFNVYKATRPYLAH) du virus Chikungunya ayant une charge de +2 (Kam *et al.*, 2012), ou une charge nette près de 0 comme l'épitope du parasite de la malaria GDRAAGQPAGDRAAGQPA (Vaughan et al., 2009), pourraient être effectuées pour observer la contribution de la charge de l'épitope à la modulation de l'autoassemblage de Hag. L'utilisation de nombres variables de répétitions en tandem de ces épitopes permettrait aussi de déterminer la longueur minimale de la séquence à ajouter pour inhiber les interactions responsables de l'élongation en nanotubes ainsi que la longueur maximale pour ne pas empêcher la formation nanostructures de type anneau.

Considérant que l'épitope en milieu de séquence ne semble pas affecter l'assemblage en filaments et que les flagellines présentant des épitopes différents en milieu et en fin de séquence permettent de générer une réponse plus efficace contre les virus influenza (Stepanova *et al.*, 2018), il aurait aussi été intéressant d'essayer de former des structures en anneaux présentant deux séries d'épitopes. Notre étude aurait donc pu comprendre une flagelline chimérique avec le 3M2e inséré à l'extrémité C-terminale et une séquence de la tige de HA (HA2) ou une autre séquence M2e consensus en position 184, dans le domaine charnière de Hag. Il est possible que l'assemblage d'une flagelline chimérique Hag-HA2<sub>184</sub>-3M2e<sub>Ct</sub> ou Hag-3M2e<sub>184</sub>-3M2e<sub>Ct</sub> permette aussi la formation de nanostructures de type anneau, présentant une plus grande densité ou variété d'épitopes et induisant une réponse immunitaire spécifique plus élevée.

Pour la conception de nanostructures à base de flagelline, il est aussi important de considérer que l'absence des domaines D2 et D3 chez Hag pourrait déstabiliser la conformation des hélices en D1 et D0 par rapport à celles de FljB. Cette déstabilisation pourrait être un facteur favorisant la formation de structures de faible rapport de forme au détriment des filaments. En effet, l'ajout de 400 mM de (NH4)2SO4 à des concentrations aussi faibles que 0,4 mg/mL de FljB avec la séquence 3M2e en Cterminal permettait tout de même la formation de nanofilaments, avec présence de nanostructures sphériques, alors que l'assemblage de Hag-3M2ect dans ces conditions ne permettait pas la formation de filaments (Figure 4.1). Il se pourrait en effet que la formation de structures ayant un faible rapport de forme soit spécifique aux flagellines minimales. Cependant, comme pour la différence d'activation du TLR5 entre Hag et FljB montrée au chapitre II, il est difficile d'évaluer si la propension de Hag à former de telles structures est due à l'absence des domaines D2 et D3 ou si elle est un effet de la séquence primaire de cette protéine. Des études plus approfondies seraient nécessaires pour documenter la capacité de flagellines ayant un nombre de domaines et une séquence primaire variables à former des filaments et autres nanostructures de faible rapport de forme.



Figure 4.1 Images des assemblages de flagellines avec la séquence 3M2e en C-terminal par microscopie électronique transmission. (a) FljB-3M2e. (b) Hag-3M2e. Les protéines sont assemblées à 0,4 mg/mL dans du PBS pH 7,4 à température pièce en présence de 400 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pendant 48 h. Échelle : 100 nm.

Pour ce qui est de la structure quaternaire des assemblages de type anneau de Hag-3M2e<sub>Ct</sub>, leurs similitudes avec les nanotubes de Hag par rapport au diamètre et à la structure secondaire en hélice  $\alpha$  nous amènent à l'hypothèse que ces deux structures présentent un arrangement de monomères et une structure tridimensionnelle similaires. Cependant, la faible résolution du microscope FEI Tecnai G2 Spirit Twin 120 kV couplé à la caméra Gatan Ultrascan 4000 4k x 4k CCD utilisée dans cette étude ne permettait pas d'obtenir une résolution assez élevée pour faire une reconstruction tridimensionnelle des structures de type anneau. De plus, le protocole de coloration négative à l'uranyl utilisé permet d'observer des échantillons séchés, alors que la vitrification de l'échantillon suivie de microscopie électronique en conditions cryogéniques (CryoEM) aurait permis d'observer la structure de l'échantillon en solution (Castón, 2013). Il aurait été intéressant de déterminer la structure des nanostructures de flagellines colorés négativement et observés avec un microscope couplé à une caméra permettant une meilleure résolution ou par CryoEM. La centrifugation différentielle analytique aurait aussi pu être utilisée pour déterminer le poids moléculaire et donc le nombre précis de monomères composant les nanoparticules de flagelline (Cole et al., 2008). En effet, peu de données

expérimentales supportent la structure tridimensionnelle des assemblages de Hag-3M2e<sub>Ct</sub> proposée dans le chapitre III, qui est plutôt basée sur les similitudes de ces nanostructures avec les nanotubes. De plus, les méthodes utilisées pour le suivi de l'assemblage de Hag-3M2e<sub>Ct</sub> en nanostructures, incluant le dichroïsme circulaire (CD – *circular dichroism*) en UV proche et lointain, demeuraient peu utilisées pour les flagellines et ont permis d'étendre la collection de méthodes pour le suivi de leur polymérisation. Cependant, l'utilisation de méthodes plus conventionnelles pour suivre l'assemblage des flagellines comme la mesure de la viscosité de la solution aurait pu amener une confiance supplémentaire face à ces nouvelles méthodes (Asakura *et al.*, 1964; Uratani, 1974).

4.4 Les nanoparticules de flagelline sont efficacement internalisées par les cellules présentatrices d'antigènes

Les nanovaccins protéiques ayant une taille entre 10 et 200 nm sont reconnus pour être efficacement internalisés par les CPA et pour présenter une diffusion passive améliorée dans le système lymphatique vers les ganglions (Bachmann et Jennings, 2010). Nos résultats ont montré une internalisation accrue des nanostructures de type anneau par rapport au monomère par les DC et une internalisation efficace par les macrophages. Nos résultats ont aussi montré un changement morphologique de ces cellules suivant la stimulation (Figure 3.4) qui a été associé à leur activation et la présentation subséquente de l'antigène. Pour confirmer cette activation, les niveaux de molécules de costimulation CD80 et 86 ainsi que de CMH I et II à la surface des cellules auraient pu être mesurés par cytométrie en flux avec des anticorps dirigés contre ces molécules et couplés à des fluorophores (Bakhru *et al.*, 2014; Zottig *et al.*, 2021). En lien avec l'affirmation que les nanovaccins présentent une diffusion passive dans le système lymphatique, la cinétique de localisation des nanostructures dans les ganglions lymphatiques aurait aussi pu être observée chez les souris. Pour ce faire, les souris

seraient inoculées avec des nanostructures de type anneau marquées à l'Alexa 488, puis les ganglions lymphatiques inguinaux seraient récoltés après 15 min, 2 h, 8 h et 24 h. Des coupes des ganglions seraient colorées avec des anti-CD169 reconnaissant les macrophages qui marquent le contour des ganglions lymphatiques et la présence des structures marquées serait quantifiée par fluorescence (Phan *et al.*, 2007).

### 4.5 Les nanoparticules de flagelline activent le système immunitaire inné

Le principal mécanisme responsable de l'activité adjuvante des flagellines est l'activation du récepteur TLR5, ce qui entraîne la génération subséquence d'une forte réponse immunitaire innée et, ultimement, adaptative. Cependant, une réponse immunitaire prolongée est aussi responsable d'effets secondaires indésirables (Rolli et al., 2010; Turley et al., 2011). Alors que les filaments sont connus pour présenter une activation du récepteur TLR5 fortement diminuée par rapport aux monomères de flagelline, les structures de type anneau ont présenté une réponse TLR5 in vitro que faiblement diminuée par rapport aux monomères, ce qui se traduit par une réponse immunitaire innée équivalente en termes de cytokines pro-inflammatoires 2 h après une injection i.p. chez les souris. Pourtant, une des hypothèses de départ était que l'assemblage de Hag pouvait permettre de réduire la réponse inflammatoire tout en promouvant des voies alternatives de génération d'une forte immunité spécifique, impliquant entre autres une plus forte internalisation par les CPA. Il a été suggéré que l'activation du TLR5 par les filaments est due à un équilibre entre l'association des monomères entre eux dans le filament et leur association sous forme monomérique avec le TLR5 (Smith et al., 2003). Il se peut que les nanoparticules de type anneau ne forment pas une structure assez stable pour déplacer l'équilibre suffisamment vers l'auto-association au détriment de l'activation du TLR5 et ainsi diminuer la réponse inflammatoire. Pour vérifier cette hypothèse, nous aurions pu stabiliser les nanoparticules de flagelline par réticulation des monomères avec des ponts disulfure

en introduisant une cystéine dans les domaines ND1 et CD1 selon une stratégie précédemment décrite avec des filaments de FliC (Gries *et al.*, 2019). De plus, l'inoculation a été faite par voie i.p., voie par laquelle une réponse inflammatoire maximale est généralement obtenue (Leenaars et Hendriksen, 1998). Considérant l'expression particulièrement élevée du TLR5 et le grand nombre de cellules immunitaires dans les tissus lymphoïdes nasaux (NALT – *nasal-associated lymphoid tissue*) et associés aux bronches (BALT – *bronchus-associated lymphoid tissue*), il aurait été pertinent d'analyser la réponse inflammatoire suivant une inoculation par voie i.n., voie d'ailleurs utilisée dans l'étude pour l'immunisation et l'analyse de la réponse spécifique en anticorps (Holmgren et Czerkinsky, 2005; Wang *et al.*, 2012). Nous aurions alors pu suivre les niveaux de cytokines dans le sérum et dans les poumons et obtenir un portrait plus représentatif de la réponse inflammatoire induite lors de l'immunisation par la voie désirée.

4.6 Les nanoparticules de flagelline augmentent la réponse immunitaire spécifique à l'anticorps greffé

La réponse en anticorps spécifiques au M2e induite par l'immunisation i.m. et i.n. avec les assemblages de Hag-3M2e<sub>Ct</sub> était plus élevée que la réponse induite par l'immunisation avec le 3M2e soluble. Cependant, l'immunisation i.m. a montré l'induction d'une réponse spécifique en IgG totaux légèrement plus élevée par les monomères de Hag-3M2e<sub>Ct</sub> que par les assemblages au jour 28 ppi, alors que l'immunisation i.n. a montré des titres en anticorps équivalents pour ces deux formulations. Il faut cependant garder en tête que la quantité d'anticorps spécifiques ne donne pas d'indice par rapport à leur fonction effectrice et qu'il aurait été pertinent de tester l'activité ADCC et CDC de ses anticorps selon la méthode décrite plus haut dans cette discussion. De plus, tel que mentionné dans le chapitre III, la différence en titres d'anticorps obtenus par ces deux voies peut être attribuée à l'expression différentielle

du TLR5 dans ces deux tissus, illustrant d'autant plus l'importance de tester la réponse inflammatoire à la suite d'une inoculation par la même voie que l'immunisation. En effet, alors que l'injection par voie i.m. avec des flagellines monomériques et assemblées n'a pas conféré de protection face à une infection expérimentale du virus H1N1 (Figure 4.2), l'immunisation par voie i.n. a induit une immunité protectrice (Figure 3.9). Plusieurs études ont rapporté une protection accrue suivant l'immunisation i.n. par rapport aux autres voies avec diverses plateformes vaccinales contre l'influenza. Dans ces études, la protection accrue par voie i.n. a été largement attribuée au fait qu'elle permet la production d'IgA qui constituent une première ligne de défense contre l'infection dans les muqueuses (Hervé et al., 2014; Neirynck et al., 1999). Nous avons d'ailleurs observé une production accrue de cette classe d'anticorps après l'immunisation i.n. seulement avec la forme assemblée en nanostructures de Hag-3M2ect. De plus les NALT et BALT dans les voies respiratoires sont riches en cellules immunitaires et peuvent abriter des cellules B et T résidentes mémoire, qui peuvent agir rapidement pour établir une réponse spécifique lors d'une infection subséquente des voies respiratoires (Allie et al., 2019; Lobaina Mato, 2019). Considérant que cette voie est optimale pour la lutte contre les virus respiratoires et que nous souhaitions développer de nouveaux adjuvants convenant à l'administration par voie mucosale, il aurait été important de comparer aussi la réponse induite par Hag et FljB lorsqu'administrées par voie i.n.



Figure 4.2 Pourcentage de survie des souris immunisées après infection expérimentale avec le virus influenza A H1N1. Les souris BALB/c ont été immunisées 2 fois à intervalle de 14 jours avec 20  $\mu$ g de Hag-3M2e<sub>Ct</sub> et nRings-3M2e ou une dose équimolaire de 3M2e par voie i.m., puis infectées par instillation i.n. avec 5 x LD<sub>50</sub> du virus influenza A H1N1 (PR8).

D'autre part, il importe de considérer que lors d'une infection au virus influenza, deux semaines sont suffisantes pour la résorption de la réponse innée, mais les cellules T et B effectrices peuvent rester dans les poumons jusqu'à plus de 2 et 8 semaines, respectivement (Pommerenke *et al.*, 2012). Il se peut donc que certaines cellules effectrices de la réponse primaire étaient encore présentes dans les poumons lors de l'infection expérimentale 2 semaines après la seconde immunisation, ce qui aurait favorisé une réponse immunitaire spécifique rapide. À cet effet, il aurait été pertinent d'effectuer une infection expérimentale 4 et 8 semaines après la seconde immunisation. La flagelline étant connue pour prolonger la réponse immunitaire spécifique (Hajam *et al.*, 2017), la mesure des titres en anticorps dans le sérum des souris à chaque semaine entre l'immunisation de rappel et cette infection aurait également permis de mesurer si cet effet dans le temps est aussi prononcé avec les nanostructures de flagelline.

Dans les études présentées aux chapitres II et III, les doses de Hag-3M2e utilisées chez les souris étaient de 20 µg, ce qui équivaut à près de 30 µg de FljB-3M2e en dose

équimolaire. Cette dose se trouve dans l'intervalle habituellement utilisé pour documenter la réponse inflammatoire causée par les flagellines chez les souris (Hayashi *et al.*, 2001; Liaudet *et al.*, 2002). Cependant, en vaccination, les flagellines de *Salmonella* ont été évaluées à une dose maximale de 10  $\mu$ g chez les humains et peuvent exercer un effet adjuvant à des doses aussi faibles que 0,3  $\mu$ g (Turley *et al.*, 2011). Il aurait été pertinent de tester une série de doses de moins de 10  $\mu$ g avec les plateformes à base de Hag développées dans ces deux chapitres afin d'être plus représentatif de la réalité en clinique et de fournir une meilleure comparaison de l'efficacité de ces formulations vaccinales avec les formulations à base de FljB.

Les études présentées aux chapitres II et III ont montré l'efficacité de plusieurs plateformes vaccinales à induire une réponse en anticorps contre la séquence de l'épitope M2e dérivé du virus influenza H1N1 A/PuertoRico/8/1934. L'épitope M2e est cependant reconnu comme un candidat pour la conception de vaccins universels permettant d'induire une réponse spécifique contre plusieurs souches du virus influenza A (Mezhenskaya *et al.*, 2019). À cet effet, il aurait été intéressant de tester la capacité des anticorps produits à reconnaitre des séquences M2e provenant de différentes souches de virus influenza par ELISA, ainsi que la protection contre une infection expérimentale avec un autre souche d'influenza adaptée aux souris comme la souche d'influenza A/X-31(H3N2) (Bouvier et Lowen, 2010).

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ces travaux de maîtrise visant à explorer de nouvelles avenues pour l'utilisation efficace et sécuritaire des flagellines en vaccination, la flagelline de *Bacillus subtilis*, Hag, a été conjuguée à 3 répétitions de l'épitope M2e du virus influenza A. Ses propriétés immunostimulantes ainsi que celles de nanostructures provenant de son autoassemblage ont été évaluées. Nos résultats ont permis d'identifier Hag comme alternative aux flagellines de Salmonella enterica, FliC et FljB, en tant que molécule adjuvante présentant des propriétés inflammatoires réduites et une réponse en anticorps spécifiques équivalente à celles induite par FljB. Ces travaux ont aussi démontré la modulation de l'assemblage de Hag en structures de faible rapport de forme avec une morphologie de type anneau par un positionnement spécifique de l'épitope dans la séquence primaire de la protéine. Ces nanoparticules porteuses d'antigènes présentent une capacité adjuvante intrinsèque, éliminant ainsi le besoin de supplémenter la préparation nanovaccinale avec des adjuvants. Les nanostructures de faible rapport de forme à base de Hag ont favorisé l'internalisation de l'antigène par les CPA. Lorsqu'administrées par voie i.n. chez les souris, elles ont aussi augmenté la réponse en anticorps contre M2e en plus d'induire une immunité protectrice contre le virus influenza A. Nonobstant leur nature préliminaire, ces travaux représentent une avancée significative quant à l'étude des propriétés immunostimulantes des flagellines à deux domaines et des nanostructures dérivées de leur assemblage. Les études sur d'autres flagellines seront cependant nécessaires afin de vérifier si la diminution de la réponse inflammatoire et l'assemblage en nanostructures de type anneau sont des effets spécifiques à la flagelline de Bacillus subtilis et aux flagellines minimales. Des analyses in vivo plus approfondies permettront également d'évaluer si les résultats obtenus dans ces études sont transposables chez les humains et les animaux d'élevage.

Cette étude permet d'étendre la diversité de molécules adjuvantes et nanoparticules porteuses d'antigènes pour l'immunisation par voie mucosale. Nos résultats ouvrent également la porte vers l'exploration des capacités immunostimulantes de la panoplie de flagellines existantes et encouragent l'étude approfondie des propriétés des flagellines minimales en tant qu'adjuvants en vaccination.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abbott RK et Crotty S (2020) Factors in B cell competition and immunodominance. *Immunological Reviews 296*: 120-131.
- Abram D et Koffler H (1964) In vitro formation of flagella-like filaments and other structures from flagellin. *Journal of Molecular Biology* 9: 168-IN126.
- Abreu RB, Clutter EF, Attari S, Sautto GA et Ross TM (2020) IgA Responses Following Recurrent Influenza Virus Vaccination. *Frontiers in Immunology 11*:
- Aguzzi A, Kranich J et Krautler NJ (2014) Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. *Trends in Immunology* 35: 105-113.
- Akira S, Uematsu S et Takeuchi O (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell 124*: 783-801.
- Al-Halifa S, Gauthier L, Arpin D, Bourgault S et Archambault D (2019) Nanoparticle-Based Vaccines Against Respiratory Viruses. *Frontiers in Immunology 10*:
- 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 Crossβ Fibrils to Design Adjuvanted Nanovaccines. *Nanomaterials 10*: 1981.
- Allen CDC, Okada T et Cyster JG (2007) Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity* 27: 190-202.
- Allie SR, Bradley JE, Mudunuru U, Schultz MD, Graf BA, Lund FE et Randall TD (2019) The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter. *Nature Immunology 20*: 97-108.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW et Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Andreu N, Phelan J, de Sessions PF, Cliff JM, Clark TG et Hibberd ML (2017) Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with Mycobacterium tuberculosis. *Scientific Reports* 7: 42225.

- Arbeitskreis Blut UBBK (2009) Influenza Virus. Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie 36: 32-39.
- Asakura S, Eguchi G et Iino T (1964) Reconstitution of bacterial flagella in vitro. Journal of Molecular Biology 10: 42-IN49.
- Awate S, Babiuk LA et Mutwiri G (2013) Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in immunology 4*: 114-114.
- Azmi F, Ahmad Fuaad AAH, Giddam AK, Batzloff MR, Good MF, Skwarczynski M et Toth I (2014) Self-adjuvanting vaccine against group A streptococcus: Application of fibrillized peptide and immunostimulatory lipid as adjuvant. *Bioorganic & Medicinal Chemistry 22*: 6401-6408.
- 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*: 19547-19556.
- Bachmann Martin F, Rohrer Urs H, Kündig Thomas M, Bürki K, Hengartner H et Zinkernagel Rolf M (1993) The Influence of Antigen Organization on B Cell Responsiveness. *Science 262*: 1448-1451.
- Bachmann MF et Jennings GT (2010) Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology 10*: 787-796.
- Bakhru P, Sirisaengtaksin N, Soudani E, Mukherjee S, Khan A et Jagannath C (2014) BCG vaccine mediated reduction in the MHC-II expression of macrophages and dendritic cells is reversed by activation of Toll-like receptors 7 and 9. *Cellular immunology 287*: 53-61.
- Bates JT, Honko AN, Graff AH, Kock ND et Mizel SB (2008) Mucosal adjuvant activity of flagellin in aged mice. *Mechanisms of ageing and development 129*: 271-281.
- Ben-Yedidia T et Arnon R (1998) Effect of pre-existing carrier immunity on the efficacy of synthetic influenza vaccine. *Immunology Letters* 64: 9-15.
- Bennett KM, Gorham RD, Jr., Gusti V, Trinh L, Morikis D et Lo DD (2015) Hybrid flagellin as a T cell independent vaccine scaffold. *BMC biotechnology* 15: 71-71.

- Biedma ME, Cayet D, Tabareau J, Rossi AH, Ivičak-Kocjan K, Moreno G, Errea A, Soulard D, Parisi G, Jerala R, et al. (2019) Recombinant flagellins with deletions in domains D1, D2, and D3: Characterization as novel immunoadjuvants. *Vaccine* 37: 652-663.
- Blokhina EA, Kuprianov VV, Stepanova LA, Tsybalova LM, Kiselev OI, Ravin NV et Skryabin KG (2013) A molecular assembly system for presentation of antigens on the surface of HBc virus-like particles. *Virology* 435: 293-300.
- Boraschi D et Italiani P (2015) From Antigen Delivery System to Adjuvanticy: The Board Application of Nanoparticles in Vaccinology. *Vaccines (Basel)* 3: 930-939.
- Bourgault S, Solomon JP, Reixach N et Kelly JW (2011) Sulfated glycosaminoglycans accelerate transthyretin amyloidogenesis by quaternary structural conversion. *Biochemistry 50*: 1001-1015.
- Bouvier NM et Lowen AC (2010) Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses 2*: 1530-1563.
- Bouvier NM et Palese P (2008) The biology of influenza viruses. *Vaccine 26 Suppl 4*: D49-D53.
- Boyoglu-Barnum S, Hutchinson GB, Boyington JC, Moin SM, Gillespie RA, Tsybovsky Y, Stephens T, Vaile JR, Lederhofer J, Corbett KS, et al. (2020) Glycan repositioning of influenza hemagglutinin stem facilitates the elicitation of protective cross-group antibody responses. *Nature Communications 11*: 791.
- Brennan FR, Gilleland LB, Staczek J, Bendig MM, Hamilton WDO et Gilleland HE (1999) A chimaeric plant virus vaccine protects mice against a bacterial infection. *Microbiology (Reading)* 145 (*Pt 8*): 2061-2067.
- Brisse M, Vrba SM, Kirk N, Liang Y et Ly H (2020) Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development. *Frontiers in Immunology 11*:
- Bruxelle J-F, Mizrahi A, Hoÿs S, Collignon A, Janoir C et Péchiné S (2017) Clostridium difficile flagellin FliC: Evaluation as adjuvant and use in a mucosal vaccine against Clostridium difficile. *PloS one 12*: e0187212-e0187212.
- Cahill CM et Rogers JT (2008) Interleukin (IL) 1beta induction of IL-6 is mediated by a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT/IkappaB kinase alpha

pathway targeting activator protein-1. *The Journal of biological chemistry 283*: 25900-25912.

- Calzas C, Mao M, Turpaud M, Viboud Q, Mettier J, Figueroa T, Bessière P, Mangin A, Sedano L, Hervé P-L, et al. (2021) Immunogenicity and Protective Potential of Mucosal Vaccine Formulations Based on Conserved Epitopes of Influenza A Viruses Fused to an Innovative Ring Nanoplatform in Mice and Chickens. *Frontiers in immunology 12*: 772550-772550.
- Camacho AG, Teixeira LH, Bargieri DY, Boscardin SB, Soares IS, Nussenzweig RS, Nussenzweig V et Rodrigues MM (2011) TLR5-dependent immunogenicity of a recombinant fusion protein containing an immunodominant epitope of malarial circumsporozoite protein and the FliC flagellin of Salmonella Typhimurium. Mem Inst Oswaldo Cruz 106 Suppl 1: 167-171.
- Campodónico VL, Llosa NJ, Grout M, Döring G, Maira-Litrán T et Pier GB (2010) Evaluation of flagella and flagellin of Pseudomonas aeruginosa as vaccines. *Infection and immunity* 78: 746-755.
- Canouï E et Launay O (2019) [History and principles of vaccination]. *Rev Mal Respir* 36: 74-81.
- Castón JR (2013) Conventional electron microscopy, cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography of viruses. *Subcell Biochem* 68: 79-115.
- Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. J Allergy Clin Immunol 125: S3-23.
- Chen Q et Lai H (2013) Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Human vaccines* & *immunotherapeutics 9*: 26-49.
- Chesson CB, Huelsmann EJ, Lacek AT, Kohlhapp FJ, Webb MF, Nabatiyan A, Zloza A et Rudra JS (2014) Antigenic peptide nanofibers elicit adjuvant-free CD8+ T cell responses. *Vaccine 32*: 1174-1180.
- Cho KJ, Schepens B, Seok JH, Kim S, Roose K, Lee J-H, Gallardo R, Hamme EV, Schymkowitz J, Rousseau F, et al. (2015) Structure of the Extracellular Domain of Matrix Protein 2 of Influenza A Virus in Complex with a Protective Monoclonal Antibody. *Journal of Virology* 89: 3700-3711.
- Cimica V et Galarza JM (2017) Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines. *Clinical immunology (Orlando, Fla) 183*: 99-108.

- Cohen V, Jellinek SP, Teperikidis L, Berkovits E et Goldman WM (2007) Roomtemperature storage of medications labeled for refrigeration. *American Journal* of *Health-System Pharmacy* 64: 1711-1715.
- Cohet C, van der Most R, Bauchau V, Bekkat-Berkani R, Doherty TM, Schuind A, Tavares Da Silva F, Rappuoli R, Garçon N et Innis BL (2019) Safety of AS03adjuvanted influenza vaccines: A review of the evidence. *Vaccine 37*: 3006-3021.
- Cole JL, Lary JW, P Moody T et Laue TM (2008) Analytical ultracentrifugation: sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. *Methods in cell biology* 84: 143-179.
- Collins A (2016) IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunology and Cell Biology 94*:
- Cooper AM et Khader SA (2007) IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends in Immunology 28*: 33-38.
- Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA, Himansu S, Schäfer A, Ziwawo CT, DiPiazza AT, et al. (2020) SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature* 586: 567-571.
- Corthesy B (2013) Multi-Faceted Functions of Secretory IgA at Mucosal Surfaces. Frontiers in Immunology 4:
- Côté-Cyr M, Gauthier L, Zottig X, Bourgault S et Archambault D (2021) Recombinant Bacillus subtilis flagellin Hag is a potent immunostimulant with reduced proinflammatory properties compared to Salmonella enterica serovar Typhimurium FljB. Vaccine
- Crommelin DJA, Anchordoquy TJ, Volkin DB, Jiskoot W et Mastrobattista E (2021) Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability. *Journal of pharmaceutical sciences 110*: 997-1001.
- Crotty S (2015) A brief history of T cell help to B cells. *Nature Reviews Immunology* 15: 185-189.
- Cui B, Liu X, Fang Y, Zhou P, Zhang Y et Wang Y (2018) Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines 17*: 335-349.

- de Taeye SW, Bentlage AEH, Mebius MM, Meesters JI, Lissenberg-Thunnissen S, Falck D, Sénard T, Salehi N, Wuhrer M, Schuurman J, et al. (2020) FcγR Binding and ADCC Activity of Human IgG Allotypes. *Frontiers in Immunology 11*:
- de Taeye SW, Rispens T et Vidarsson G (2019) The Ligands for Human IgG and Their Effector Functions. *Antibodies (Basel, Switzerland)* 8: 30.
- Didierlaurent A, Ferrero I, Otten LA, Dubois B, Reinhardt M, Carlsen H, Blomhoff R, Akira S, Kraehenbuhl J-P et Sirard J-C (2004) Flagellin Promotes Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Development of Th2-Type Response. *The Journal of Immunology 172*: 6922.
- Duensing T et Watson S (2018) Complement-Dependent Cytotoxicity Assay. *Cold Spring Harbor Protocols 2018*: pdb.prot093799.
- Duncan JA et Canna SW (2018) The NLRC4 Inflammasome. *Immunological Reviews* 281: 115-123.
- Dykman LA (2020) Gold nanoparticles for preparation of antibodies and vaccines against infectious diseases. *Expert review of vaccines 19*: 465-477.
- Eaves-Pyles T, Murthy K, Liaudet L, Virág L, Ross G, Soriano FG, Szabó C et Salzman AL (2001) Flagellin, a Novel Mediator of *Salmonella*-Induced Epithelial Activation and Systemic Inflammation: IκBα Degradation, Induction of Nitric Oxide Synthase, Induction of Proinflammatory Mediators, and Cardiovascular Dysfunction. *The Journal of Immunology 166*: 1248.
- Echem C et Akamine EH (2021) Toll-Like Receptors Represent an Important Link for Sex Differences in Cardiovascular Aging and Diseases. *Frontiers in Aging 2*:
- Ehreth J (2003) The global value of vaccination. *Vaccine 21*: 596-600.
- Elsayed MMA et Cevc G (2011) Turbidity Spectroscopy for Characterization of Submicroscopic Drug Carriers, Such as Nanoparticles and Lipid Vesicles: Size Determination. *Pharmaceutical Research 28*: 2204-2222.
- Fan X, Hashem AM, Chen Z, Li C, Doyle T, Zhang Y, Yi Y, Farnsworth A, Xu K, Li Z, et al. (2015) Targeting the HA2 subunit of influenza A virus hemagglutinin via CD40L provides universal protection against diverse subtypes. *Mucosal Immunology 8*: 211-220.

- Fehr T, Bachmann MF, Bucher E, Kalinke U, Di Padova FE, Lang AB, Hengartner H et Zinkernagel RM (1997) Role of repetitive antigen patterns for induction of antibodies against antibodies. *The Journal of experimental medicine 185*: 1785-1792.
- Feuillet V, Medjane S, Mondor I, Demaria O, Pagni PP, Galán JE, Flavell RA et Alexopoulou L (2006) Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the* United States of America 103: 12487-12492.
- Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IF et Plebanski M (2004) Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol 173*: 3148-3154.
- Finco O et Rappuoli R (2014) Designing Vaccines for the Twenty-First Century Society. *Frontiers in Immunology 5*:
- Foged C (2011) Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems. *Therapeutic Delivery 2*: 1057-1077.
- Forstnerič V, Ivičak-Kocjan K, Ljubetič A, Jerala R et Benčina M (2016) Distinctive Recognition of Flagellin by Human and Mouse Toll-Like Receptor 5. *PLOS ONE 11*: e0158894.
- Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti T-D, Özören N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, et al. (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1β in *salmonella*-infected macrophages. *Nature Immunology* 7: 576-582.
- Fredriksen BN et Grip J (2012) PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Vaccine 30*: 656-667.
- Fries CN, Chen J-L, Dennis ML, Votaw NL, Eudailey J, Watts BE, Hainline KM, Cain DW, Barfield R, Chan C, et al. (2021) HIV envelope antigen valency on peptide nanofibers modulates antibody magnitude and binding breadth. *Scientific Reports 11*: 14494.
- Frietze KM, Peabody DS et Chackerian B (2016) Engineering virus-like particles as vaccine platforms. *Current Opinion in Virology 18*: 44-49.

- Gauthier L, Babych M, Segura M, Bourgault S et Archambault D (2020) Identification of a novel TLR5 agonist derived from the P97 protein of Mycoplasma hyopneumoniae. *Immunobiology 225*: 151962.
- Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ et Madara JL (2001) Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *The Journal of Immunology 167*: 1882.
- Giraldo DM, Hernandez JC et Urcuqui Inchima S (2015) Impact of in vitro Costimulation with TLR2, TLR4 and TLR9 Agonists and HIV-1 on Antigen-Presenting Cell Activation. *Intervirology* 58: 122-129.
- Girard A, Saron W, Bergeron-Sandoval L-P, Sarhan F et Archambault D (2011) Flagellin produced in plants is a potent adjuvant for oral immunization. *Vaccine* 29: 6695-6703.
- Gorry PR, McPhee DA, Verity E, Dyer WB, Wesselingh SL, Learmont J, Sullivan JS, Roche M, Zaunders JJ, Gabuzda D, et al. (2007) Pathogenicity and immunogenicity of attenuated, nef-deleted HIV-1 strains in vivo. *Retrovirology* 4: 66.
- Grgacic EV et Anderson DA (2006) Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* 40: 60-65.
- Gries CM, Mohan RR, Morikis D et Lo DD (2019) Crosslinked flagella as a stabilized vaccine adjuvant scaffold. *BMC Biotechnology 19*: 48.
- 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*: 621-667.
- Hajam IA, Dar PA, Shahnawaz I, Jaume JC et Lee JH (2017) Bacterial flagellin—a potent immunomodulatory agent. *Experimental & Molecular Medicine 49*: e373-e373.
- Hampton HR et Chtanova T (2019) Lymphatic Migration of Immune Cells. *Frontiers in Immunology 10*:
- Han J-A, Kang YJ, Shin C, Ra J-S, Shin H-H, Hong SY, Do Y et Kang S (2014) Ferritin protein cage nanoparticles as versatile antigen delivery nanoplatforms for

dendritic cell (DC)-based vaccine development. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 10*: 561-569.

- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM et Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature 410*: 1099-1103.
- Heesters BA, Chatterjee P, Kim Y-A, Gonzalez SF, Kuligowski MP, Kirchhausen T et Carroll MC (2013) Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. *Immunity* 38: 1164-1175.
- Heesters BA, van der Poel CE, Das A et Carroll MC (2016) Antigen Presentation to B Cells. *Trends in Immunology* 37: 844-854.
- Hervé P-L, Deloizy C, Descamps D, Rameix-Welti M-A, Fix J, McLellan JS, Eléouët J-F et Riffault S (2017) RSV N-nanorings fused to palivizumab-targeted neutralizing epitope as a nanoparticle RSV vaccine. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine 13*: 411-420.
- Hervé P-L, Raliou M, Bourdieu C, Dubuquoy C, Petit-Camurdan A, Bertho N, Eléouët J-F, Chevalier C et Riffault S (2014) A novel subnucleocapsid nanoplatform for mucosal vaccination against influenza virus that targets the ectodomain of matrix protein 2. *Journal of virology 88*: 325-338.
- Hicks DJ, Fooks AR et Johnson N (2012) Developments in rabies vaccines. *Clinical and experimental immunology 169*: 199-204.
- Holmgren J et Czerkinsky C (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine* 11: S45-S53.
- Honko AN et Mizel SB (2004) Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infection and immunity* 72: 6676-6679.
- Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ et Mizel SB (2006) Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with Yersinia pestis. *Infection and immunity* 74: 1113-1120.
- Huleatt JW, Foellmer HG, Hewitt D, Tang J, Desai P, Price A, Jacobs A, Takahashi VN, Huang Y, Nakaar V, et al. (2007a) A West Nile Virus Recombinant Protein Vaccine That Coactivates Innate and Adaptive Immunity. *The Journal of Infectious Diseases 195*: 1607-1617.
- Huleatt JW, Jacobs AR, Tang J, Desai P, Kopp EB, Huang Y, Song L, Nakaar V et Powell TJ (2007b) Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine 25*: 763-775.
- Huleatt JW, Nakaar V, Desai P, Huang Y, Hewitt D, Jacobs A, Tang J, McDonald W, Song L, Evans RK, et al. (2008) Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine 26*: 201-214.
- Hyman HC et Trachtenberg S (1991) Point mutations that lock *Salmonella* typhimurium flagellar filaments in the straight right-handed and left-handed forms and their relation to filament superhelicity. *Journal of Molecular Biology* 220: 79-88.
- Ibañez LI, Roose K, De Filette M, Schotsaert M, De Sloovere J, Roels S, Pollard C, Schepens B, Grooten J, Fiers W, et al. (2013) M2e-Displaying Virus-Like Particles with Associated RNA Promote T Helper 1 Type Adaptive Immunity against Influenza A. *PLOS ONE 8*: e59081.
- Ikeda JS, Schmitt CK, Darnell SC, Watson PR, Bispham J, Wallis TS, Weinstein DL, Metcalf ES, Adams P, O'Connor CD, et al. (2001) Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis. *Infection and immunity 69*: 3021-3030.
- Ikeda T, Kamiya R et Yamaguchi S (1984) In vitro polymerization of flagellin excreted by a short-flagellum *Salmonella* typhimurium mutant. *Journal of bacteriology* 159: 787-789.
- Il Kim M, Lee C, Park J, Jeon B-Y et Hong M (2018) Crystal structure of Bacillus cereus flagellin and structure-guided fusion-protein designs. *Scientific Reports* 8: 5814.
- Ito T, Gorman OT, Kawaoka Y, Bean WJ et Webster RG (1991) Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *Journal of virology 65*: 5491-5498.
- Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, Cohen C, Gran JM, Schanzer D, Cowling BJ, et al. (2018) Estimates of global seasonal

influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet 391*: 1285-1300.

- Iwasaki A et Medzhitov R (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science (New York, NY) 327*: 291-295.
- Janeway CA et Medzhitov R (2002) Innate Immune Recognition. Annual Review of Immunology 20: 197-216.
- Kaba SA, Brando C, Guo Q, Mittelholzer C, Raman S, Tropel D, Aebi U, Burkhard P et Lanar DE (2009) A nonadjuvanted polypeptide nanoparticle vaccine confers long-lasting protection against rodent malaria. *Journal of immunology* (*Baltimore, Md : 1950) 183*: 7268-7277.
- Kaba SA, McCoy ME, Doll TAPF, Brando C, Guo Q, Dasgupta D, Yang Y, Mittelholzer C, Spaccapelo R, Crisanti A, et al. (2012) Protective Antibody and CD8+ T-Cell Responses to the Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein Induced by a Nanoparticle Vaccine. *PLOS ONE* 7: e48304.
- Kaisho T et Akira S (2001) Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88knockout mice. *Trends in Immunology 22*: 78-83.
- Kalil AC et Thomas PG (2019) Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. *Critical care (London, England) 23*: 258-258.
- Kam Y-W, Lum F-M, Teo T-H, Lee WWL, Simarmata D, Harjanto S, Chua C-L, Chan Y-F, Wee J-K, Chow A, et al. (2012) Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO molecular medicine 4*: 330-343.
- Kanekiyo M, Bu W, Joyce MG, Meng G, Whittle James RR, Baxa U, Yamamoto T, Narpala S, Todd J-P, Rao Srinivas S, et al. (2015) Rational Design of an Epstein-Barr Virus Vaccine Targeting the Receptor-Binding Site. *Cell 162*: 1090-1100.
- Kanekiyo M, Wei C-J, Yassine HM, McTamney PM, Boyington JC, Whittle JRR, Rao SS, Kong W-P, Wang L et Nabel GJ (2013) Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature 499*: 102-106.
- Karch CP et Burkhard P (2016) Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochem Pharmacol 120*: 1-14.

- Keating GM et Noble S (2003) Recombinant Hepatitis B Vaccine (Engerix-B®). Drugs 63: 1021-1051.
- Kelly SM, Jess TJ et Price NC (2005) How to study proteins by circular dichroism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1751: 119-139.
- Kenney JL, Volk SM, Pandya J, Wang E, Liang X et Weaver SC (2011) Stability of RNA virus attenuation approaches. *Vaccine 29*: 2230-2234.
- Kim K-H, Kwon Y-M, Lee Y-T, Kim M-C, Hwang HS, Ko E-J, Lee Y, Choi H-J et Kang S-M (2018) Virus-Like Particles Are a Superior Platform for Presenting M2e Epitopes to Prime Humoral and Cellular Immunity against Influenza Virus. *Vaccines 6*: 66.
- Kim K-J et Malik AB (2003) Protein transport across the lung epithelial barrier. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 284*: L247-L259.
- Kim M-C, Lee Y-N, Ko E-J, Lee JS, Kwon Y-M, Hwang HS, Song J-M, Song B-M, Lee Y-J, Choi J-G, et al. (2014) Supplementation of influenza split vaccines with conserved M2 ectodomains overcomes strain specificity and provides long-term cross protection. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 22*: 1364-1374.
- Kim MK et Kim J (2019) Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Advances 9*: 11230-11238.
- Klein Á, Kovács M, Muskotál A, Jankovics H, Tóth B, Pósfai M et Vonderviszt F (2018) Nanobody-Displaying Flagellar Nanotubes. *Scientific Reports* 8: 3584.
- Kochs G, García-Sastre A et Martínez-Sobrido L (2007) Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *Journal of virology* 81: 7011-7021.
- Kool M, Fierens K et Lambrecht BN (2012) Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *Journal of Medical Microbiology* 61: 927-934.
- Kool M, Pétrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, Bergen IM, Castillo R, Lambrecht BN et Tschopp J (2008) Cutting Edge: Alum Adjuvant Stimulates Inflammatory Dendritic Cells through Activation of the NALP3 Inflammasome. *The Journal of Immunology 181*: 3755.

- Krammer F (2019) The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nature Reviews Immunology 19*: 383-397.
- Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, Palese P, Shaw ML, Treanor J, Webster RG, et al. (2018) Influenza. *Nature Reviews Disease Primers 4*: 3.
- Kumar S, Sunagar R et Gosselin E (2019) Bacterial Protein Toll-Like-Receptor Agonists: A Novel Perspective on Vaccine Adjuvants. *Front Immunol 10*: 1144.
- Kumara MT, Srividya N, Muralidharan S et Tripp BC (2006) Bioengineered Flagella Protein Nanotubes with Cysteine Loops: Self-Assembly and Manipulation in an Optical Trap. *Nano Letters* 6: 2121-2129.
- Lai AY et Kondo M (2008) T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Seminars in immunology 20*: 207-212.
- Lamb RA, Zebedee SL et Richardson CD (1985) Influenza virus M<sub>2</sub> protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell* 40: 627-633.
- Lebel M-E, Chartrand K, Leclerc D et Lamarre A (2015) Plant viruses as nanoparticlebased vaccines and adjuvants. *Vaccines 3*:
- Lee EB, Jeon HM, Kim CU, Park SM, Cho G, Kim HJ, Kim Y, Kim DJ, Kim YS, Lee H, et al. (2019) Attachment of flagellin enhances the immunostimulatory activity of a hemagglutinin-ferritin nano-cage. *Nanomedicine* 17: 223-235.
- Lee H-S, Stachelek SJ, Tomczyk N, Finley MJ, Composto RJ et Eckmann DM (2013a) Correlating macrophage morphology and cytokine production resulting from biomaterial contact. *Journal of biomedical materials research Part A 101*: 203-212.
- Lee J-S, Chowdhury MYE, Moon H-J, Choi Y-K, Talactac MR, Kim J-H, Park M-E, Son H-Y, Shin K-S et Kim C-J (2013b) The highly conserved HA2 protein of the influenza a virus induces a cross protective immune response. *Journal of Virological Methods 194*: 280-288.
- Lee LA et Wang Q (2006) Adaptations of nanoscale viruses and other protein cages for medical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 2*: 137-149.

- Lee Y-N, Lee Y-T, Kim M-C, Hwang HS, Lee JS, Kim K-H et Kang S-M (2014) Fc receptor is not required for inducing antibodies but plays a critical role in conferring protection after influenza M2 vaccination. *Immunology 143*: 300-309.
- Leenaars M et Hendriksen CF (1998) Influence of Route of Injection on Efficacy and Side Effects of Immunisation. *ALTEX* 15: 87.
- Li S, Zhang Q, Bai H, Huang W, Shu C, Ye C, Sun W et Ma Y (2019) Self-Assembled Nanofibers Elicit Potent HPV16 E7-Specific Cellular Immunity And Abolish Established TC-1 Graft Tumor. *International journal of nanomedicine 14*: 8209-8219.
- Liaudet L, Murthy KGK, Mabley JG, Pacher P, Soriano FG, Salzman AL et Szabó C (2002) Comparison of Inflammation, Organ Damage, and Oxidant Stress Induced by *Salmonella enterica* Serovar Muenchen Flagellin and Serovar Enteritidis Lipopolysaccharide. *Infection and Immunity* 70: 192-198.
- Lightfield KL, Persson J, Brubaker SW, Witte CE, von Moltke J, Dunipace EA, Henry T, Sun YH, Cado D, Dietrich WF, et al. (2008) Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol 9*: 1171-1178.
- Lino T (1974) Assembly of *salmonella* flagellin in vitro and in vivo. *Journal of Supramolecular Structure 2*: 372-384.
- Liu G, Song L, Reiserova L, Trivedi U, Li H, Liu X, Noah D, Hou F, Weaver B et Tussey L (2012) Flagellin-HA vaccines protect ferrets and mice against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) infections. *Vaccine 30*: 6833-6838.
- Liu G, Tarbet B, Song L, Reiserova L, Weaver B, Chen Y, Li H, Hou F, Liu X, Parent J, et al. (2011) Immunogenicity and Efficacy of Flagellin-Fused Vaccine Candidates Targeting 2009 Pandemic H1N1 Influenza in Mice. *PLOS ONE 6*: e20928.
- Liu Z et Roche PA (2015) Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Frontiers in Physiology 6*:
- Lobaina Mato Y (2019) Nasal route for vaccine and drug delivery: Features and current opportunities. *International Journal of Pharmaceutics* 572: 118813.

- Lockner JW, Eubanks LM, Choi JL, Lively JM, Schlosburg JE, Collins KC, Globisch D, Rosenfeld-Gunn RJ, Wilson IA et Janda KD (2015) Flagellin as carrier and adjuvant in cocaine vaccine development. *Molecular pharmaceutics 12*: 653-662.
- López-Sagaseta J, Malito E, Rappuoli R et Bottomley MJ (2016) Self-assembling protein nanoparticles in the design of vaccines. *Computational and Structural Biotechnology Journal 14*: 58-68.
- Louis-Jeune C, Andrade-Navarro MA et Perez-Iratxeta C (2012) Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 80: 374-381.
- Lu Y et Swartz JR (2016) Functional properties of flagellin as a stimulator of innate immunity. *Scientific Reports* 6: 18379.
- Luo M, Samandi LZ, Wang Z, Chen ZJ et Gao J (2017) Synthetic nanovaccines for immunotherapy. *J Control Release 263*: 200-210.
- Maki-Yonekura S, Yonekura K et Namba K (2010) Conformational change of flagellin for polymorphic supercoiling of the flagellar filament. *Nature Structural & Molecular Biology 17*: 417-422.
- Mallajosyula JK, Hiatt E, Hume S, Johnson A, Jeevan T, Chikwamba R, Pogue GP, Bratcher B, Haydon H, Webby RJ, et al. (2014) Single-dose monomeric HA subunit vaccine generates full protection from influenza challenge. *Human* vaccines & immunotherapeutics 10: 586-595.
- Mancera Gracia JC, Pearce DS, Masic A et Balasch M (2020) Influenza A Virus in Swine: Epidemiology, Challenges and Vaccination Strategies. *Frontiers in Veterinary Science 7*:
- Margine I, Krammer F, Hai R, Heaton NS, Tan GS, Andrews SA, Runstadler JA, Wilson PC, Albrecht RA, García-Sastre A, et al. (2013) Hemagglutinin stalkbased universal vaccine constructs protect against group 2 influenza A viruses. *Journal of virology* 87: 10435-10446.
- Matusiak M, Van Opdenbosch N, Vande Walle L, Sirard J-C, Kanneganti T-D et Lamkanfi M (2015) Flagellin-induced NLRC4 phosphorylation primes the inflammasome for activation by NAIP5. *Proceedings of the National Academy* of Sciences 112: 1541.

- McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE et McKimm-Breschkin JL (2019) Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Frontiers in microbiology* 10: 39-39.
- Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A et Luster AD (2003) The Toll-Like Receptor 5 Stimulus Bacterial Flagellin Induces Maturation and Chemokine Production in Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology 170*: 5165.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P et Janeway CA (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature 388*: 394-397.
- 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*: 76.
- Minamino T, Morimoto YV, Kinoshita M et Namba K (2021) Multiple Roles of Flagellar Export Chaperones for Efficient and Robust Flagellar Filament Formation in *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology 12*:
- Mizel SB et Bates JT (2010) Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 185*: 5677-5682.
- Molino NM, Anderson AKL, Nelson EL et Wang S-W (2013) Biomimetic protein nanoparticles facilitate enhanced dendritic cell activation and cross-presentation. *ACS nano* 7: 9743-9752.
- Moon JJ, Suh H, Bershteyn A, Stephan MT, Liu H, Huang B, Sohail M, Luo S, Ho Um S, Khant H, et al. (2011) Interbilayer-crosslinked multilamellar vesicles as synthetic vaccines for potent humoral and cellular immune responses. *Nature Materials 10*: 243-251.
- Mozdzanowska K, Feng J, Eid M, Kragol G, Cudic M, Otvos L et Gerhard W (2003) Induction of influenza type A virus-specific resistance by immunization of mice with a synthetic multiple antigenic peptide vaccine that contains ectodomains of matrix protein 2. *Vaccine 21*: 2616-2626.
- Müller E, Christopoulos PF, Halder S, Lunde A, Beraki K, Speth M, Øynebråten I et Corthay A (2017) Toll-Like Receptor Ligands and Interferon-γ Synergize for Induction of Antitumor M1 Macrophages. *Frontiers in Immunology 8*:

- Neirynck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM et Fiers W (1999) A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nature Medicine 5*: 1157-1163.
- Nempont C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V et Sirard J-C (2008) Deletion of Flagellin's Hypervariable Region Abrogates Antibody-Mediated Neutralization and Systemic Activation of TLR5-Dependent Immunity. *The Journal of Immunology 181*: 2036.
- Noad R et Roy P (2003) Virus-like particles as immunogens. Trends Microbiol 11:
- Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM et Corcoran LM (2015) The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology* 15: 160-171.
- O'Neill CL, Shrimali PC, Clapacs ZP, Files MA et Rudra JS (2021) Peptide-based supramolecular vaccine systems(). *Acta Biomater*
- Okamura M, Matsumoto W, Seike F, Tanaka Y, Teratani C, Tozuka M, Kashimoto T, Takehara K, Nakamura M et Yoshikawa Y (2012) Efficacy of Soluble Recombinant FliC Protein from *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis as a Potential Vaccine Candidate Against Homologous Challenge in Chickens. *Avian Diseases 56*: 354-358.
- Olive C (2012) Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. *Expert Review of Vaccines 11*: 237-256.
- Orenstein WA et Ahmed R (2017) Simply put: Vaccination saves lives. *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America 114: 4031-4033.
- Ozawa M et Kawaoka Y (2013) Cross talk between animal and human influenza viruses. *Annual review of animal biosciences 1*: 21-42.
- Pachioni-Vasconcelos Jde A, Lopes AM, Apolinario AC, Valenzuela-Oses JK, Costa JS, Nascimento Lde O, Pessoa A, Barbosa LR et Rangel-Yagui Cde O (2016) Nanostructures for protein drug delivery. *Biomater Sci 4*: 205-218.
- Parekh BS, Berger E, Sibley S, Cahya S, Xiao L, LaCerte MA, Vaillancourt P, Wooden S et Gately D (2012) Development and validation of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-reporter gene assay. *mAbs 4*: 310-318.

- Pasquale AD, Preiss S, Silva FT et Garçon N (2015) Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines 3*:
- Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA et Kedl RM (2013) T cell responses: naive to memory and everything in between. *Advances in physiology education* 37: 273-283.
- Petukhova VN, Gasanova VT, Stepanova AL, Rusova AO, Potapchuk VM, Korotkov VA, Skurat VE, Tsybalova ML, Kiselev IO, Ivanov AP, et al. (2013) Immunogenicity and Protective Efficacy of Candidate Universal Influenza A Nanovaccines Produced in Plants by Tobacco Mosaic Virus-based Vectors. *Current Pharmaceutical Design 19*: 5587-5600.
- Phan TG, Grigorova I, Okada T et Cyster JG (2007) Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nature Immunology 8*: 992-1000.
- Pielak RM et Chou JJ (2011) Influenza M2 proton channels. *Biochimica et biophysica acta 1808*: 522-529.
- Pimentel TAPF, Yan Z, Jeffers SA, Holmes KV, Hodges RS et Burkhard P (2009) Peptide nanoparticles as novel immunogens: design and analysis of a prototypic severe acute respiratory syndrome vaccine. *Chemical biology & drug design 73*: 53-61.
- Pino O, Martin M et Michalek SM (2005) Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. *Infection and immunity* 73: 6763-6770.
- Plummer EM et Manchester M (2011) Viral nanoparticles and virus like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology* 3: 174 - 196.
- Pollard AJ et Bijker EM (2021) A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology 21*: 83-100.
- Pommerenke C, Wilk E, Srivastava B, Schulze A, Novoselova N, Geffers R et Schughart K (2012) Global Transcriptome Analysis in Influenza-Infected Mouse Lungs Reveals the Kinetics of Innate and Adaptive Host Immune Responses. *PLOS ONE* 7: e41169.

- Ponomarenko J, Bui H-H, Li W, Fusseder N, Bourne PE, Sette A et Peters B (2008) ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics 9*: 514.
- Pulendran B, S. Arunachalam P et O'Hagan DT (2021) Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery 20*: 454-475.
- Qian F, Wang X, Zhang L, Chen S, Piecychna M, Allore H, Bockenstedt L, Malawista S, Bucala R, Shaw AC, et al. (2012) Age-associated elevation in TLR5 leads to increased inflammatory responses in the elderly. *Aging Cell 11*: 104-110.
- Reed SG, Orr MT et Fox CB (2013) Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine 19*: 1597-1608.
- Renegar KB, Small PA, Boykins LG et Wright PF (2004) Role of IgA versus IgG in the Control of Influenza Viral Infection in the Murine Respiratory Tract. *The Journal of Immunology 173*: 1978.
- Rodrigues CMC et Plotkin SA (2020) Impact of Vaccines; Health, Economic and Social Perspectives. *Frontiers in Microbiology 11*:
- Rolli J, Loukili N, Levrand S, Rosenblatt-Velin N, Rignault-Clerc S, Waeber B, Feihl F, Pacher P et Liaudet L (2010) Bacterial flagellin elicits widespread innate immune defense mechanisms, apoptotic signaling, and a sepsis-like systemic inflammatory response in mice. *Critical care (London, England)* 14: R160-R160.
- Rudra JS, Mishra S, Chong AS, Mitchell RA, Nardin EH, Nussenzweig V et Collier JH (2012) Self-assembled peptide nanofibers raising durable antibody responses against a malaria epitope. *Biomaterials* 33: 6476-6484.
- Rudra JS, Tian YF, Jung JP et Collier JH (2010) A self-assembling peptide acting as an immune adjuvant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107*: 622-627.
- Saelens X (2019) The Role of Matrix Protein 2 Ectodomain in the Development of Universal Influenza Vaccines. *The Journal of infectious diseases 219*: S68-S74.
- Sala FA, Valadares N, Macêdo JN, Borges JC et Garratt R (2016) Heterotypic Coiled-Coil Formation is Essential for the Correct Assembly of the Septin Heterofilament. *Biophysical journal 111 12*: 2608-2619.

- Santarlasci V, Cosmi L, Maggi L, Liotta F et Annunziato F (2013) IL-1 and T Helper Immune Responses. *Frontiers in Immunology 4*:
- Schnell JR et Chou JJ (2008) Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature 451*: 591-595.
- Schroeder HW, Jr. et Cavacini L (2010) Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology 125*: S41-S52.
- Shao W, Li X, Goraya MU, Wang S et Chen J-L (2017) Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *International journal of molecular sciences* 18: 1650.
- Sheffery M et Newton A (1977) Reconstitution and purification of flagellar filaments from Caulobacter crescentus. *Journal of bacteriology 132*: 1027-1030.
- Simon R, Tennant S, Wang J, Schmidlein P, Lees A, Ernst R, Pasetti M, Galen J et Levine M (2011) Salmonella enterica Serovar Enteritidis Core O Polysaccharide Conjugated to H:g,m Flagellin as a Candidate Vaccine for Protection against Invasive Infection with S. Enteritidis. Infection and immunity 79: 4240-4249.
- Skountzou I, Martin MdP, Wang B, Ye L, Koutsonanos D, Weldon W, Jacob J et Compans RW (2010) *Salmonella* flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. *Vaccine* 28: 4103-4112.
- Sliepen K, Han BW, Bontjer I, Mooij P, Garces F, Behrens A-J, Rantalainen K, Kumar S, Sarkar A, Brouwer PJM, et al. (2019) Structure and immunogenicity of a stabilized HIV-1 envelope trimer based on a group-M consensus sequence. *Nature Communications 10*: 2355.
- Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SLR, Cookson BT et Aderem A (2003) Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature Immunology 4*: 1247-1253.
- Song WS, Jeon YJ, Namgung B, Hong M et Yoon S-I (2017) A conserved TLR5 binding and activation hot spot on flagellin. *Scientific reports* 7: 40878-40878.
- Spellberg B et Edwards JE, Jr. (2001) Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases 32*: 76-102.

- Sriwilaijaroen N et Suzuki Y (2012) Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences* 88: 226-249.
- Staczek J, Bendahmane M, Gilleland LB, Beachy RN et Gilleland HE, Jr. (2000) Immunization with a chimeric tobacco mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of Pseudomonas aeruginosa provides protection against challenge with P. aeruginosa. *Vaccine 18*: 2266-2274.
- Stepanova LA, Mardanova ES, Shuklina MA, Blokhina EA, Kotlyarov RY, Potapchuk MV, Kovaleva AA, Vidyaeva IG, Korotkov AV, Eletskaya EI, et al. (2018) Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and Tcell responses and protects mice against various influenza viruses a subtypes. *Journal of biomedical science 25*: 33-33.
- Stoll S, Delon J, Brotz TM et Germain RN (2002) Dynamic Imaging of T Cell-Dendritic Cell Interactions in Lymph Nodes. *Science 296*: 1873-1876.
- Swain SL (1995) T-Cell Subsets: Who does the polarizing? Current Biology 5: 849-851.
- Swain SL, McKinstry KK et Strutt TM (2012) Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. *Nature Reviews Immunology 12*: 136-148.
- Tanaka T, Narazaki M et Kishimoto T (2014) IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology 6*: a016295-a016295.
- Tay MZ, Wiehe K et Pollara J (2019) Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis in Antiviral Immune Responses. *Frontiers in Immunology 10*:
- te Velthuis AJW et Fodor E (2016) Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature Reviews Microbiology 14*: 479-493.
- Tenthorey JL, Haloupek N, López-Blanco JR, Grob P, Adamson E, Hartenian E, Lind NA, Bourgeois NM, Chacón P, Nogales E, et al. (2017) The structural basis of flagellin detection by NAIP5: A strategy to limit pathogen immune evasion. *Science (New York, NY) 358*: 888-893.
- Tompkins SM, Zhao Z-S, Lo C-Y, Misplon JA, Liu T, Ye Z, Hogan RJ, Wu Z, Benton KA, Tumpey TM, et al. (2007) Matrix protein 2 vaccination and protection

against influenza viruses, including subtype H5N1. Emerging infectious diseases 13: 426-435.

- Treanor JJ, Taylor DN, Tussey L, Hay C, Nolan C, Fitzgerald T, Liu G, Kavita U, Song L, Dark I, et al. (2010) Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin influenza–flagellin fusion vaccine (VAX125) in healthy young adults. *Vaccine 28*: 8268-8274.
- Trombetta ES et Mellman I (2004) CELL BIOLOGY OF ANTIGEN PROCESSING IN VITRO AND IN VIVO. *Annual Review of Immunology 23*: 975-1028.
- Tsujimoto H, Uchida T, Efron PA, Scumpia PO, Verma A, Matsumoto T, Tschoeke SK, Ungaro RF, Ono S, Seki S, et al. (2005) Flagellin enhances NK cell proliferation and activation directly and through dendritic cell-NK cell interactions. *Journal of Leukocyte Biology* 78: 888-897.
- Turley CB, Rupp RE, Johnson C, Taylor DN, 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*: 5145-5152.
- Uratani Y (1974) Polymerization of *Salmonella* Flagellin in Water and Deuterium Oxide Media. *The Journal of Biochemistry* 75: 1143-1151.
- van Panhuis WG, Grefenstette J, Jung SY, Chok NS, Cross A, Eng H, Lee BY, Zadorozhny V, Brown S, Cummings D, et al. (2013) Contagious diseases in the United States from 1888 to the present. *The New England journal of medicine 369*: 2152-2158.
- Vaughan K, Blythe M, Greenbaum J, Zhang Q, Peters B, Doolan DL et Sette A (2009) Meta-analysis of immune epitope data for all Plasmodia: overview and applications for malarial immunobiology and vaccine-related issues. *Parasite immunology 31*: 78-97.
- Vidarsson G, Dekkers G et Rispens T (2014) IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology 5*:
- Vignali DAA (2000) Multiplexed particle-based flow cytometric assays. Journal of Immunological Methods 243: 243-255.
- Vignali DAA et Kuchroo VK (2012) IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology 13*: 722-728.

- Vivier E et Malissen B (2005) Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature Immunology* 6: 17-21.
- Wahome N, Pfeiffer T, Ambiel I, Yang Y, Keppler O, Bosch V et Burkhard P (2012) Conformation-specific Display of 4E10 and 2F5 Epitopes on Self-assembling Protein Nanoparticles as a Potential HIV Vaccine. *Chemical biology & drug design 80*: 349-357.
- Wakabayashi K, Hotani H et Asakura S (1969) Polymerization of salmonella flagellin in the presence of high concentrations of salts. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure 175: 195-203.
- Wang F, Burrage AM, Postel S, Clark RE, Orlova A, Sundberg EJ, Kearns DB et Egelman EH (2017) A structural model of flagellar filament switching across multiple bacterial species. *Nature Communications* 8: 960.
- 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:
- Wang R, Ahmed J, Wang G, Hassan I, Strulovici-Barel Y, Salit J, Mezey JG et Crystal RG (2012) Airway Epithelial Expression of TLR5 Is Downregulated in Healthy Smokers and Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The Journal of Immunology 189*: 2217.
- Wu NC et Wilson IA (2020) Structural Biology of Influenza Hemagglutinin: An Amaranthine Adventure. *Viruses 12*: 1053.
- Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J et Zhang Y (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods* 12: 7-8.
- Yang L, Li W, Kirberger M, Liao W et Ren J (2016) Design of nanomaterial based systems for novel vaccine development. *Biomater Sci* 4: 785-802.
- Yasuhara A, Yamayoshi S, Soni P, Takenaga T, Kawakami C, Takashita E, Sakai-Tagawa Y, Uraki R, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, et al. (2017) Diversity of antigenic mutants of influenza A(H1N1)pdm09 virus escaped from human monoclonal antibodies. *Scientific Reports* 7: 17735.
- Yewdell JW, Norbury CC et Bennink JR (1999) Mechanisms of Exogenous Antigen Presentation by MHC Class I Molecules in Vitro and in Vivo: Implications for

Generating CD8+ T Cell Responses to Infectious Agents, Tumors, Transplants, and Vaccines. Dans *Advances in Immunology*. Dixon FJ, ed, Vol 73. Academic Press.

- Yonekura K, Maki-Yonekura S et Namba K (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 424: 643-650.
- Yoon S-i, Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL et Wilson IA (2012) Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science (New York, NY) 335*: 859-864.
- Zaman M, Good MF et Toth I (2013) Nanovaccines and their mode of action. *Methods* 60: 226-231.
- Zeng H, Goldsmith Cynthia S, Maines Taronna R, Belser Jessica A, Gustin Kortney M, Pekosz A, Zaki Sherif R, Katz Jacqueline M et Tumpey Terrence M (2013) Tropism and Infectivity of Influenza Virus, Including Highly Pathogenic Avian H5N1 Virus, in Ferret Tracheal Differentiated Primary Epithelial Cell Cultures. Journal of Virology 87: 2597-2607.
- Zepeda-Cervantes J, Ramírez-Jarquín JO et Vaca L (2020) Interaction Between Virus-Like Particles (VLPs) and Pattern Recognition Receptors (PRRs) From Dendritic Cells (DCs): Toward Better Engineering of VLPs. *Frontiers in Immunology 11*:
- Zhang J-M et An J (2007) Cytokines, inflammation, and pain. International anesthesiology clinics 45: 27-37.
- Zhang L, Pan Z, Kang X, Yang Y, Kang H, Zhang N, Rosati JM et Jiao X (2015a) Amino acids 89–96 of Salmonella typhimurium flagellin represent the major domain responsible for TLR5-independent adjuvanticity in the humoral immune response. Cellular & Molecular Immunology 12: 625-632.
- Zhang N, Jiang S et Du L (2014) Current advancements and potential strategies in the development of MERS-CoV vaccines. *Expert Review of Vaccines 13*: 761-774.
- Zhang N, Zheng B-J, Lu L, Zhou Y, Jiang S et Du L (2015b) Advancements in the development of subunit influenza vaccines. *Microbes and infection 17*: 123-134.
- Zhang Y et Orner BP (2011) Self-assembly in the ferritin nano-cage protein superfamily. *International journal of molecular sciences 12*: 5406-5421.

- Zhao Q, Potter CS, Carragher B, Lander G, Sworen J, Towne V, Abraham D, Duncan P, Washabaugh MW et Sitrin RD (2014) Characterization of virus-like particles in GARDASIL® by cryo transmission electron microscopy. *Human vaccines & immunotherapeutics 10*: 734-739.
- Zhao Q, Towne V, Brown M, Wang Y, Abraham D, Oswald CB, Gimenez JA, Washabaugh MW, Kennedy R et Sitrin RD (2011a) In-depth process understanding of RECOMBIVAX HB® maturation and potential epitope improvements with redox treatment: multifaceted biochemical and immunochemical characterization. *Vaccine 29*: 7936-7941.
- Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, Liu L et Shao F (2011b) The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477: 596-600.
- 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*: