



HAL
open science

Vaccination à ADN intranasale sur un modèle porcin.

Laurent Souci

► **To cite this version:**

Laurent Souci. Vaccination à ADN intranasale sur un modèle porcin.. Sciences du Vivant [q-bio].
Université Rennes 1, 2020. Français. NNT: . tel-03313764

HAL Id: tel-03313764

<https://hal.inrae.fr/tel-03313764v1>

Submitted on 22 Dec 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL
open science

Vaccination à ADN intranasale sur un modèle porcin

Laurent Souci

► **To cite this version:**

Laurent Souci. Vaccination à ADN intranasale sur un modèle porcin. Microbiologie et Parasitologie. Université Rennes 1, 2020. Français. NNT : 2020REN1B039 . tel-03396219

HAL Id: tel-03396219

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03396219>

Submitted on 22 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : Microbiologie, virologie, parasitologie

Par :

Laurent SOUCI

Vaccination à ADN par intranasale sur un modèle porcin

Thèse présentée et soutenue à PLOUFRAGAN, le 9 décembre 2020 ;

Unité de recherche : Unité Génétique Virale & Biosécurité (UGVB), Anses.

Rapporteurs avant soutenance :

Mme Sabine RIFFAULT

Directrice de Recherche, INRAE Centre Ile-de-France-Jouy-en-Josas-Anthony

Mme Jennifer RICHARDSON

Directrice de Recherche, INRAE Centre Ile-de-France-Jouy-en-Josas-Anthony

Composition du Jury :

Président :

M. Roger LE GRAND

Directeur de Recherche, CEA Fontenay-Aux-Rose

Examineurs :

Mme Sabine RIFFAULT

Directrice de Recherche, INRAE Centre Ile-de-France-Jouy-en-Josas-Anthony

Mme Jennifer RICHARDSON

Directrice de Recherche, INRAE Centre Ile-de-France-Jouy-en-Josas-Anthony

Mme Claire PIQUET-PELLORCE

Maître de Conférences, Université de Rennes 1

M. Tristan MONTIER

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier , Université UBO Brest

Directeur de thèse :

M. Daniel DORY

Chef de Projet, Anses Ploufragan

Remerciements

Je souhaite remercier très sincèrement **Mme Sabine Riffault** et **Mme Jennifer Richardson** d'avoir accepté le rôle de rapporteur de ma thèse. Ainsi que **Mme Claire Piquet-Pellorce**, **M. Roger Le Grand** et **M. Tristan Montier** d'avoir de leur côté accepté d'examiner celle-ci.

Je remercie, l'Anses de Ploufragan de m'avoir accueilli pour pouvoir réaliser cette thèse. Ainsi que l'unité Génétique Virale et Biosécurité de l'Anses dirigée par **Yannick Blanchard** d'avoir permis la réalisation de ces travaux de thèse au sein de sa structure durant ces trois années.

Une thèse, c'est aussi une rencontre avec un directeur de thèse. **Daniel**, j'ai eu la chance de faire cette thèse sous ton encadrement durant ces trois années de thèse. Je souhaite te remercier chaleureusement de m'avoir aidé au mieux à travers ce long chemin sinueux qu'est la thèse. J'ai fortement apprécié la relation de confiance qu'il y a pu y avoir. Un grand merci d'avoir été un soutien sans failles. J'ai également apprécié ton calme et ta générosité et le fait que tu as toujours orienté les travaux de recherches avec tact et diplomatie. J'ai beaucoup appris à tes côtés.

Mes remerciements vont aussi aux personnes de l'unité que j'ai pu côtoyer tout au long de ces trois années de thèse : **Cécilia, Claire, Françoise, Renée, Fabrice, Lionnel, Edouard, Pierrick, Aurélie, Véronique...** Et ceux qui n'ont été que de passage : **Alexandra, Jonathan, Aurélie** etc...

En particulier, merci à **Maud** avec qui je partageais mon bureau pour son optimisme permanent au quotidien. Je souhaite remercier également **Nolwenn** pour ses conseils pour la relecture de l'article de thèse.

Un grand merci aussi à **Virginie** pour les impressions des manuscrits.

Je souhaite remercier tout particulièrement le personnel du service animalier **Frédéric, Gérald, Jean-Marie, Angélique** qui ont tout fait pour les essais *in vivo* se déroulent le mieux possible.

Un grand merci également à l'équipe du Pr **Tristan Montier** de m'avoir accueilli une semaine à Brest dans le cadre de notre collaboration, en particulier **Angélique**. Merci à nos collègues du Zoopôle développement (**Hervé, Assimiou, Eric**) qui nous ont aidés pour la réalisation de certains essais *in vivo*.

Je remercie également l'ensemble des autres doctorants avec qui ont pu partager cette aventure qu'est la thèse : **Julie H, Julie E, Clément, Rémi, Sarah, Alexandre...** Ainsi que tous les jeunes de l'Anses avec qui on s'est vus régulièrement le mercredi midi.

Je souhaite aussi remercier les personnes de l'amicale Anses de Ploufragan pour toute les animations très sympas qui apportent une certaine convivialité à la bretonne (surtout la soirée crêpes !).

Je souhaite remercier tout particulièrement Saint Briec Armor Agglomération, Le Conseil Départemental des Côtes d'Armor, l'Anses et le tremplin Carnot pour le financement de ces travaux de thèse.

Un grand merci bien sûr à ma famille de m'avoir soutenu et supporté dans la thèse.

Par ailleurs venir s'installer à Ploufragan a permis de découvrir autrement cette très belle région qu'est la Bretagne.

Pour finir, 2020 a aussi été une année atypique signifiant mon retour sur Tours. Je souhaite aussi remercier mon équipe BIOVA de INRAE Centre Val-de-Loire.

Résumé de thèse

La vaccination nous permet de lutter contre de nombreuses infections causées par des agents pathogènes. C'est l'une des stratégies préventives les plus puissantes pour contrôler ces infections. La principale voie d'entrée des pathogènes sont les muqueuses or la plupart des vaccins sont pourtant majoritairement inoculés par la voie parentérale et sont en général capables d'induire des réponses immunitaires protectrices. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Par ailleurs, l'émergence de nouveaux agents pathogènes pénétrant par la voie mucosale est observée de temps en temps. Pour toutes ces raisons, il est important d'être en mesure de développer de nouvelles stratégies comme par exemple l'utilisation de vaccins mucosaux. Entre autres, le développement de vaccins sous-unitaires mucosaux suscite de plus en plus d'intérêt. L'immunogénicité des vaccins mucosaux sous-unitaires (protéique ou ADN plasmidique) reste bien souvent insuffisante et des améliorations sont nécessaires. Cela pourrait par exemple se faire avec l'utilisation de nanovecteurs. Cela est également vrai pour les pathogènes porcins. Afin d'évaluer la faisabilité d'une telle stratégie chez les porcs, nous avons tiré profit du modèle de vaccin à ADN contre le virus de la pseudorabie porcine (PrV), et plus particulièrement la capacité de la glycoprotéine B (gB), une composante de ce vaccin, à induire de fortes réponses immunitaires. Dans la première partie de la thèse, nous avons sélectionné quatre nanovecteurs (chitosan, chitosan mannosylé, KLN47 et PLGA-PEI) qui pourraient favoriser la délivrance d'ADN en intranasal chez le porc. Nous avons confirmé que ces nanovecteurs étaient efficaces pour transfecter *in vitro* 2 lignées cellulaires, sans être toxiques pour celles-ci. Dans la deuxième partie, l'inoculation intranasale d'un ADN plasmidique codant pour la glycoprotéine B a été évaluée chez les porcs. Les réponses immunitaires systémiques et mucosales ont été évaluées et comparées aux résultats obtenus par la voie intramusculaire avec le même ADN plasmidique nu (employé comme référence de régime de vaccin). Les réponses immunitaires les plus fortes ont été générées dans les groupes de porcs injectés intramusculairement avec le plasmide nu. Étonnamment, pour les inoculations intranasales, le vaccin à ADN nu a été montré comme induisant les réponses immunitaires les plus fortes comparées aux quatre vaccins formulés. Cependant, quelques réponses immunitaires ont été améliorées avec l'inoculation de vaccins à ADN formulés avec le PLGA-PEI ou le KLN47, ce qui suggère que ces deux formulations sont potentiellement capables d'induire des réponses plus fortes. Cela pourrait se faire en optimisant la composition du vaccin et le protocole d'inoculation du vaccin. Plusieurs pistes d'amélioration sont discutées à la fin du manuscrit.

Résumé de thèse (anglais)

Vaccination is performed to teach the body to fight infections from pathogens. It is one of the most powerful strategies to control these infections. On one hand, most of the pathogens enter the body through mucosa; on the other one, most of the vaccines are inoculated through parenteral routes, and are able to generate protective immune responses. However, this is not always the case. There are also emergences of new pathogens that enter the body through mucosal route and for which it is important to be able to quickly develop protection strategies. This can be done by mucosal vaccines. Among other, there is a growing interest in the development of mucosal sub-unit vaccines. Immunogenicity of subunit mucosal vaccines (proteins or DNA encoding antigens) often remains insufficient and strategies are needed to enhance it. This can be done for example with the use of nanovectors/formulations. This is also true for porcine pathogens. In order to evaluate the feasibility of such strategy in pigs, we took advantage of the pseudorabies virus (PrV) DNA vaccine model, and more particularly to the ability of glycoprotein B (gB), one of the components of this vaccine, to induce strong immune responses. In the first part of the thesis, we selected four nanovectors (chitosan, mannosylated chitosan, KLN47 and PLGA-PEI) that may favor the intranasal delivery of our DNA in pigs. We confirmed that these nanovectors were powerful to transfect *in vitro* 2 cell lines, without being toxic for them. In the second part, the intranasal inoculation of plasmid DNA encoding PrV-gB was evaluated in pigs. The systemic and mucosal immune responses were evaluated and compared to those obtained through the intramuscular route with the naked DNA plasmid (used as vaccine regimen reference). The strongest immune responses were generated in the groups of pigs injected intramuscularly with naked plasmid. Surprisingly, for the intranasal inoculations, naked DNA vaccine was shown to induce strongest immune responses than for the four formulated DNA vaccines. However, some immune responses were enhanced in individual PLGA-PEI or KLN47 formulated DNA vaccines inoculated pigs, suggesting that these 2 formulations are potentially able to induce stronger responses. Improvement of intranasal DNA vaccination in pigs may be done by optimizing the vaccine composition and/or the vaccine inoculation protocol. Several areas for improvement are presented at the end of the manuscript.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé de thèse	5
Résumé de thèse (anglais)	6
Introduction	13
A. Introduction – Fonctionnement du système immunitaire : un mode de protection contre les pathogènes	17
1. Organes Lymphoïdes chez l’Homme et le Porc	17
2. La réponse immunitaire innée : une réponse rapide mettant en jeu les muqueuses.....	21
3. Réponse immunitaire adaptative mucoale : une réponse spécifique sur des sites effecteurs distants	27
B. Introduction - La vaccination : une mise à profit du système immunitaire	35
1. Succès passés, enjeux présents et défis futurs	35
2. Types de vaccins	39
C. Introduction - Voie mucoale et vaccins mucoaux	54
1. La voie mucoale.....	54
2. Vaccins mucoaux commercialisés en 2019	60
3. Systèmes nanoparticulaires utilisés pour la voie intranasale.....	62
D. Introduction Partie D - Vaccination à ADN par voie intranasale chez le porc	77
1. Modèle de vaccination à ADN plasmidique contre l’Herpèsvirus de la Pseudorange porcine	77
Objectifs de ces travaux de thèse	85
Méthodologies et Résultats	87

A. Résultats - Sélection de vecteurs d'intérêt adaptés pour la vaccination à ADN intranasal.....	89
B. Résultats - Détermination des protocoles de fabrication des 4 systèmes nanoparticulaires puis évaluation <i>in vitro</i> de leur efficacité.....	93
1. Contexte - Fabrication/production de systèmes nanoparticulaires.....	93
2. Méthodologie - Fabrication/production de systèmes nanoparticulaires.....	94
3. Méthodologie - Détermination du potentiel transfectionnel de nos quatre nanovecteurs.....	104
4. Résultats - Evaluation <i>in vitro</i> du potentiel transfectionnel de nos quatre formulations par mesure de la bioluminescence.....	105
5. Bilan général de la partie étude <i>in vitro</i>	115
C. Poursuite du projet de thèse : étude <i>in vivo</i> d'inoculation par la voie intranasale d'ADN plasmidique nanovectorisé chez le porc	117
D. Résultats : Caractérisation du ciblage <i>in vivo</i> des muqueuses nasales chez le porc avec un plasmide marqueur nanovectorisé avec le chitosan ou le chitosan mannosylé (essai #1)	118
E. Résultats de thèse : Evaluation de la réponse immunitaire induite par un plasmide codant pour la glycoprotéine B du virus de la pseudorage porcine adjuvanté avec un plasmide codant le GM-CSF (essais #2, #3 et #4).....	122
1. Méthodologie - Essai #2 (n= 16 porcs) : Réponses immunitaires induites par un plasmide codant la glycoprotéine B du virus de la pseudorage porcine nanovectorisé avec du chitosan ou du chitosan mannosylé et inoculé par la voie intranasale.....	123
2. Méthodologie - Essai #3 (n=7 porcs) : Etude de l'impact de la variation de certains paramètres de l'inoculation de l'ADN plasmidique nanovectorisé avec le chitosan sur la génération de réponses immunitaires anti-PrV	128

3. Méthologie - Essai #4 (n=20 porcs) : Réponses immunitaires induites par un plasmide codant la glycoprotéine B du virus de la pseudorage porcine combiné avec chacun des quatre nanovecteurs et inoculé par la voie IN.	130
4. Introduction et objectifs de l'article de thèse	132
5. Résultats présentés dans l'article de thèse	133
6. Essai#2 – Résultats complémentaires	145
7. Essai #3 – Variation de certains paramètres : résultats.....	150
8. Essai #4 – Comparaison des 4 formulations : résultats pour le chitosan, le chitosan mannosylé, le PLGA-PEI et le KLN47	152
9. Bilan général de l'essai #4	161
Discussion.....	163
Bibliographie.....	181
Table des figures	205
Liste des tableaux	209
Annexes	211
Annexe #1 : Saisine #1 pour le comité d'éthique	213
Annexe #2 : Saisine #2 pour le comité d'éthique	223
Annexe #3 : Plan de management qualité de la thèse.....	228
Annexe #4 : Rapport audit de management de la thèse	248

Introduction

L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (Anses) contribue principalement à **assurer la sécurité sanitaire humaine dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation**. Elle contribue également à assurer, entre autres, la protection de la santé et du bien-être des animaux. La vaccination représente une des stratégies de défense contre des pathogènes. Avec l'apogée de la vaccination à ADN, de nouvelles plateformes de développement de vaccin sont possibles, et ceci tout particulièrement en cas d'émergence d'un pathogène. En effet, la vaccination à ADN présente l'avantage d'être extrêmement facile et rapide à mettre en œuvre. Malheureusement, les niveaux de protection sont souvent relativement faibles chez les animaux de rente (Redding and Weiner 2009). Dans ce contexte, et pour se donner les plus grandes chances de pouvoir développer un vaccin en cas d'émergence ou de pouvoir expertiser un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché, l'Anses a, en se basant sur le modèle de vaccination à ADN contre le virus de la pseudoragie porcine, étudié différentes voies d'amélioration de ce type de vaccination chez le porc, ainsi que certains éléments de biosécurité. Tout cela a été possible car ce vaccin à ADN induit une immunité protectrice chez le porc lorsqu'il est administré par la voie parentérale (par ex (Dory, Torché, et al. 2005)). Actuellement, malgré de nombreuses recherches entreprises, certains vaccins comme celui contre le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (Rowland and Lunney 2017) ou le virus respiratoire syncytial (Anderson et al. 2013) ne sont pas suffisamment efficaces. Dans d'autres cas, comme pour la peste porcine africaine, aucun vaccin n'est disponible (Sanchez-Cordon et al. 2017). Et ce ne sont que quelques exemples. Une des pistes à explorer pour l'amélioration ou le développement de ces vaccins est la voie mucoale. Ici, et toujours dans l'optique d'étudier la faisabilité du système, nous avons choisi de développer et d'étudier la vaccination à ADN par la voie intranasale en utilisant notre modèle de vaccin (Dory, Torché, et al. 2005; Dory et al. 2007) contre le virus de la pseudoragie porcine. Les différentes parties de l'introduction vont nous permettre de comprendre pourquoi et comment nous envisageons de réaliser la vaccination à ADN par voie intranasale chez le porc.

A. Introduction – Fonctionnement du système immunitaire : un mode de protection contre les pathogènes

1. Organes Lymphoïdes chez l'Homme et le Porc

a) Organes Lymphoïdes Primaires

Le système immunitaire est organisé de façon à donner une réponse la plus large possible afin de protéger l'organisme contre un pathogène. Cette réponse complète est possible grâce à une anatomie très structurée qui est disséminée dans tout l'organisme (Male 2014). Les cellules impliquées dans la réponse immunitaire dérivent toutes d'un type cellulaire commun : les Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) (Wei and Frenette 2018). Celles-ci se différencient dans la moelle osseuse dans un processus appelé hématopoïèse dont la finalité est l'obtention de cellules sanguines matures (Doulatov et al. 2012). Le développement et la maturation des cellules immunitaires se passent au niveau des organes lymphoïdes primaires: la moelle osseuse et/ou le thymus (**Figure 1**) (Pabst 2007; Male 2014; Burrell et al. 2011).

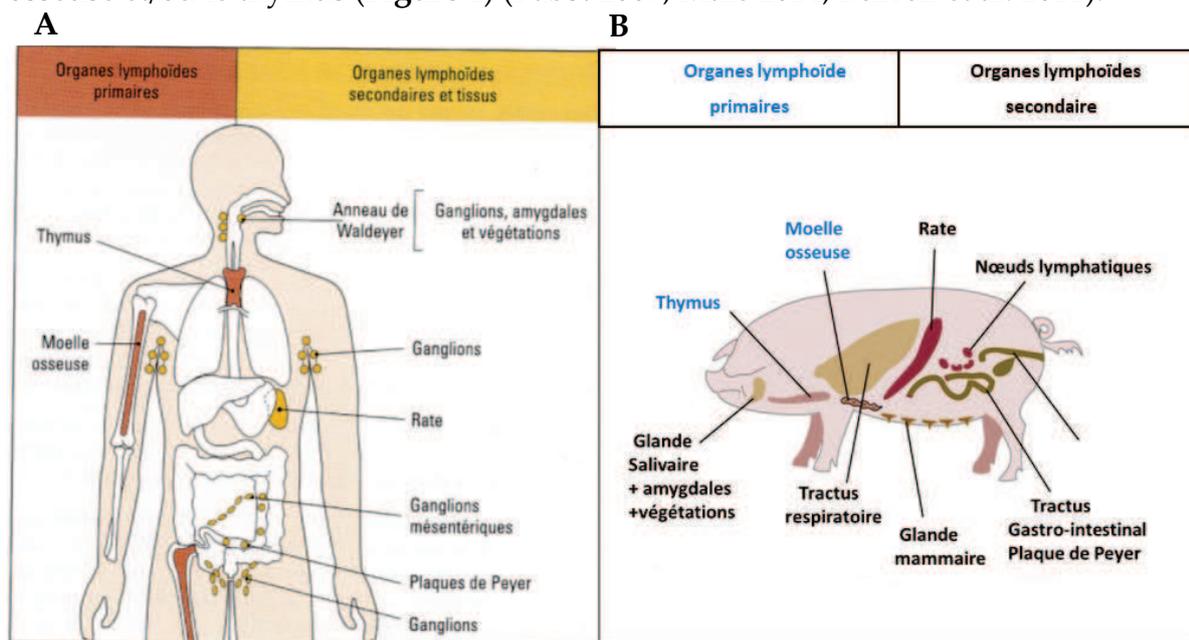


Figure 1. (A) Principaux organes et tissus lymphoïdes chez l'homme. D'après Immunology – An Illustrated Outline de David Male, traduit de l'anglais (Male 2014). (B) Principaux organes et tissus lymphoïdes chez le porc.

La moelle osseuse, présente dans le squelette axial et les os longs, est le lieu de résidence des CSH. C'est un tissu hématopoïétique. Un réseau de sinus veineux, associés avec les artères et les veines (Ramasamy et al. 2016), filtre chacune des cellules en développement.

Les CSH se différencient dans la moelle osseuse en deux grande lignées et peuvent devenir soit:

- 1. Un progéniteur myéloïde-érythroïde commun (PMC)** qui va être à l'origine des lignées érythroïdes (globules rouges), myéloïdes (granulocytes, macrophages, monocytes) ainsi que de cellules dendritiques (Weiskopf et al. 2016; Doulatov et al. 2012).
- 2. Un progéniteur lymphoïde commun (PLC)** qui va donner les lymphocytes B (LB), les lymphocytes T (LT), les cellules tueuses naturelles (NK cells) et les cellules dendritiques (Kondo, Weissman, and Akashi 1997; Doulatov et al. 2012).

La moelle osseuse est le lieu où les LB vont être développées et éduquées de façon à passer du stade cellule pré-pro B au stade cellule B immature (Pieper, Grimbacher, and Eibel 2013). Ces dernières possèdent des BCR matures (récepteurs des LB) et des immunoglobulines membranaires IgMm (Osmond and Batten 1984). Les cellules B immatures migrent alors dans la rate pour compléter leur programme de développement (Pillai and Cariappa 2009; Cariappa et al. 2007; Pieper, Grimbacher, and Eibel 2013).

Le thymus quant à lui est un organe lymphoïde primaire dans lequel il y a éducation des lymphocytes T (T pour thymo-dépendant) (Gordon and Manley 2011). La fonction de cet organe est longtemps demeurée inconnue et n'a été identifiée qu'au début des années 60 par Miller *et al.* suite à des travaux réalisés sur des souris thymectomisées (Miller 1961b, 1961a). Les cellules progénitrices pro-T dérivants du PLC migrent de la moelle osseuse vers le thymus afin de coloniser celui-ci (Rothenberg

et al. 2016; Love and Bhandoola 2011; Bhandoola et al. 2007). Un programme de différenciation des thymocytes y est mis en place : génération du TCR (récepteur des cellules T), sélection positive (capacité à interagir avec un antigène) et négative (en cas de reconnaissance des antigènes du soi (Gordon and Manley 2011; Yui and Rothenberg 2014). Au cours du développement dans le thymus, les cellules pro-T (CD4-/CD8-) vont donner naissance à une population possédant les deux marqueurs (CD4+/CD8+). Celles-ci vont ensuite perdre durant la différenciation un de ces deux marqueurs et devenir des lymphocytes T matures (CD4+ ou CD8+) que l'on va retrouver dans la zone médullaire du thymus (Rothenberg et al. 2016; Love and Bhandoola 2011; Yui and Rothenberg 2014).

b) Organes Lymphoïdes Secondaires

Les organes lymphoïdes secondaires (OLS) correspondent au lieu où les cellules immunitaires mûres, suite à leur développement, vont rencontrer l'antigène et initier une réponse immunitaire. Ces organes sont répartis de façon structurée dans l'ensemble de l'organisme et comprennent : la rate, les ganglions lymphatiques, les amygdales, les végétations ainsi que l'ensemble des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) (Brandtzaeg et al. 2008; Randall, Carragher, and Rangel-Moreno 2008). Malgré leur grande diversité, les organes lymphoïdes secondaires ont des caractéristiques anatomiques communes. Ainsi, ils possèdent tous des zones de cellules T et de cellules B. Par ailleurs, chacun de ces organes possède un microenvironnement spécialisé dans le développement des lymphocytes B : les follicules lymphoïdes. Ceux-ci jouent un rôle dans l'obtention d'une production d'anticorps spécifiques de l'antigène rencontré (Pabst 2007).

Le système immunitaire implique deux systèmes circulatoires: celui **lymphatique** et/ou **sanguin**. Suite à leur développement, les cellules immunitaires (dont les lymphocytes T et B vierges de toute rencontre avec l'antigène) vont quitter les organes lymphoïdes primaires pour aller dans le sang. Elles vont alors accéder par

la circulation sanguine aux ganglions et aux MALT grâce à un réseau de veinules spécialisées (Ager and May 2015) (les veinules post-capillaires à endothélium épais (HEV)). Une fois présentes dans ceux-ci, il y a recirculation des cellules immunitaires à travers tout un système de vaisseaux lymphatiques répartis dans l'organisme (notamment par les chaînes de ganglions) (Randolph et al. 2017), avant de revenir dans la circulation sanguine en cas de non rencontre avec l'antigène (**Figure 2**). Les ganglions sont spécialisés dans la rencontre antigène-lymphocyte dans les tissus dit « périphériques » (Gasteiger, Ataide, and Kastenmuller 2016). Les MALT (dont la plaque de Peyer), qui feront l'objet d'une partie entière dans cette introduction, jouent un rôle dans l'organisation de la réponse immunitaire contre les antigènes pénétrant dans les tissus muqueux (Brandtzaeg et al. 2008). Enfin, la rate (non alimentée par le réseau lymphatique) permet quant à elle de filtrer et capturer les antigènes présents dans le sang afin de pouvoir lutter contre les pathogènes véhiculés par la circulation sanguine (Mebius and Kraal 2005).

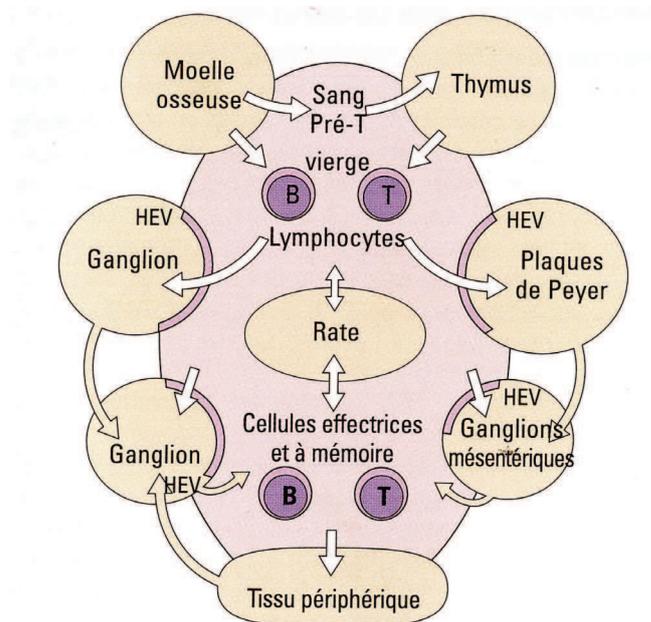


Figure 2. Mode de circulation des lymphocytes dans le système immunitaire. D'après Immunology – An Illustrated Outline de David Male, traduit de l'anglais (Male 2014).

2. La réponse immunitaire innée : une réponse rapide mettant en jeu les muqueuses

L'immunité innée permet à l'organisme de se défendre contre divers types de micro-organismes grâce à une reconnaissance générique de motifs associés aux pathogènes. Comme nous le verrons dans la suite de cette partie, l'immunité innée implique particulièrement **les muqueuses**, qui nous intéressent dans le cadre de cette thèse, puisqu'elles sont fortement en contact avec l'environnement extérieur et donc requièrent des premières lignes de défenses qui sont quasi-immédiatement activées. Dans le chapitre ci-présent nous allons décrire les bases fondamentales qui régissent ce type d'immunité.

a) Qu'est-ce que la réponse immunitaire innée ?

La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense de l'organisme contre toute agression pathogénique. Elle a pour la première fois été décrite par Metchnikov (1884), considéré comme le père de l'immunologie innée (McGonagle and Georgouli 2008; O'Neill 2004), puisqu'il avait découvert les mécanismes de la phagocytose (Miyazaki 2018), à la fin du XIX^{ème} siècle. Son élève Julien Bordet découvrit plus tard le système du complément (Cavaillon, Sansonetti, and Goldman 2019). En dépit de ces avancées, considérées comme majeures dans la mise en place des bases fondamentales de l'immunologie, les découvertes sur l'immunité innée ont pendant longtemps été éclipsées par celles concernant l'immunité adaptative. Cette dernière étant considérée comme spécifique des antigènes avait en effet focalisé toute l'attention des chercheurs (Medzhitov 2001). La recherche sur l'immunité innée a repris son envol de façon relativement récente, avec la découverte et la description en 1996 par une équipe strasbourgeoise (Jules Hoffmann récompensé par le Nobel de médecine 2011) de la famille des Toll-like receptor (TLR) impliquée dans la reconnaissance de micro-organismes et dans l'induction de gènes

anti-microbiens (Lemaitre et al. 1996). Les travaux de Jannaway et Medzhitov à la même période ont également permis une meilleure compréhension des mécanismes médiés par ces mêmes TLR (*e.g.* (Medzhitov, Preston-Hurlburt, and Janeway 1997; Medzhitov 2001)). La réponse immunitaire innée (ou naturelle) se caractérise par une réponse rapide (délai en minute/heure) qui peut s'établir grâce à des systèmes de reconnaissance permettant la détection d'une palette assez large de « signaux dangers » qui correspondent à des structures moléculaires propres aux micro-organismes (Owen et al. 2013).

b) Les muqueuses et la peau constituent les premières barrières de l'immunité innée

Au niveau de son organisation, le système immunitaire inné est constitué par trois barrières importantes (**Figure 3**), communes à tous les individus : la barrière physique, chimique et biologique.

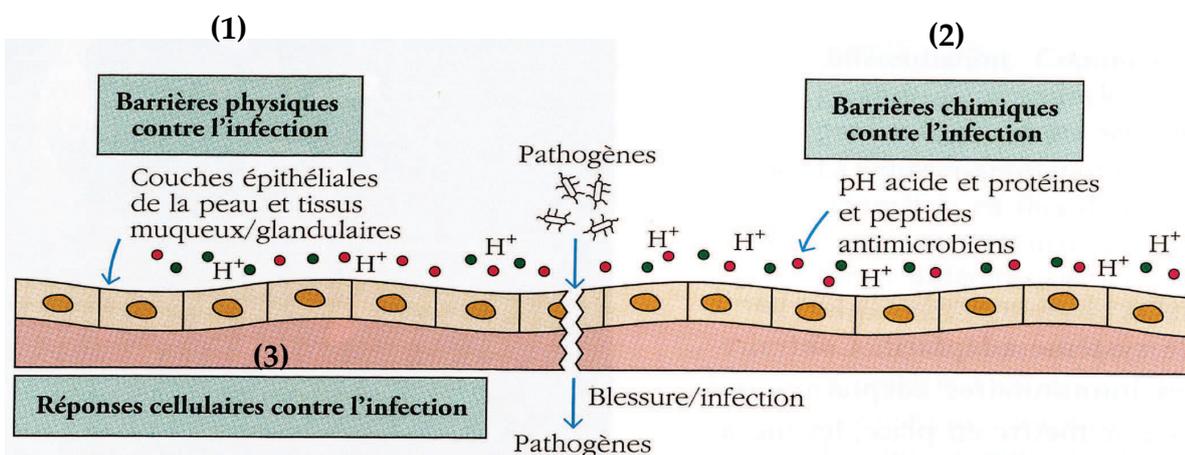


Figure 3. Schéma sur les principales barrières de l'immunité innée. (1) Barrière physique, (2) Barrière chimique, (3) Barrière biologique = réponses cellulaires contre l'infection. Schéma adapté (tronqué) de Immunology, 7th edition, traduit de l'anglais (Owen et al. 2013).

La barrière physique (**Figure 3 (1)**) permet d'isoler le milieu intérieur de l'organisme de l'environnement extérieur, afin de protéger celui-ci contre tout facteur

externe (substances ou micro-organismes) pouvant représenter un danger (Riera Romo, Perez-Martinez, and Castillo Ferrer 2016). Les tissus anatomiques ayant cette fonction sont la peau (imperméable grâce à la kératine) (Elias 2007), les muqueuses (Nochi and Kiyono 2006) ainsi que les surfaces glandulaires.

Il y a présence de mécanismes visant à expulser **mécaniquement** tout pathogène : flux liquidiens (mucus, urine, salive, larmes), cils vibratiles et contraction des muscles lisses (toux, diarrhée). Cette barrière fonctionne en association avec la **barrière chimique (Figure 3 (2))** qui a pour fonction la mise en place d'un environnement qui soit à la fois **antimicrobien** (action microbiostatique et/ou microbicide) mais aussi **immunomodulateur** (Koenderman, Buurman, and Daha 2014). A cet effet, des mécanismes variés sont impliqués : faible pH, présence d'enzymes hydrolytiques (lysozyme), présence de protéines ou peptides antimicrobiens (PAM) avec par exemple les défensines α et β , les cathélicidines (*e.g.* LL37) (Patel and Akhtar 2017; Zhang and Gallo 2016), de protéases, de protéines S 100 (Xia et al. 2018) et de protéines du surfactant comme SP-A ou SP-D (Kishore et al. 2006). Parfois, les pathogènes réussissent à passer outre ces deux barrières (*e.g.* en cas de blessures). Le traitement de l'infection est alors du ressort du système immunitaire avec en premier lieu l'intervention des acteurs de la réponse innée cellulaire (§ 1.2.3); on parle dans ce cas de barrière « **biologique** » (Figure 3 (3)).

c) Cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée

Les cellules immunitaires issues du progéniteur myéloïde commun sont celles qui vont être en première ligne suite à l'invasion d'un pathogène. Leur rôle va être de répondre à celle-ci tout en alertant la lignée lymphoïde de la présente agression. La lignée myéloïde comprend d'un côté les **phagocytes mononucléaires** dotés d'un noyau massif et agranulaire (sans granules); de l'autre côté nous retrouvons les **polynucléaires** qui sont granulaires (capables de libérer des granules spécifique) et ont un noyau lobé (Yutin et al. 2009).

Les **phagocytes** (du grec *φάγος*¹ « glouton »), mentionnés ci-dessus, sont par définition des cellules capables d'internaliser des antigènes ou pathogènes de façon à pouvoir les éliminer en les dégradant. Ce processus est appelé **phagocytose**.

d) Récepteurs et système de reconnaissance dans l'immunité Innée

La reconnaissance des pathogènes, dans le cadre de la réponse immune innée, s'effectue grâce des familles de récepteurs appelés **PRR** (« *pattern-recognition receptors* » signifiant « motifs moléculaires associés aux pathogènes »). Ceux-ci sont capables de reconnaître un panel de motifs moléculaires microbiens qui ont bien été conservés au cours de l'évolution dans certains groupes de pathogènes (par exemple les lipopolysaccharides (LPS), les ARN ou ADN viraux ou bactériens ...). Ces motifs sont désignés comme étant des **PAMP** (« *pathogen-associated molecular pattern* », « motif moléculaires associés aux pathogènes ») (Kawai and Akira 2010; Janeway and Medzhitov 2002). Les PAMPs bactériens sont principalement des constituants de la paroi avec par exemple le LPS, le peptidoglycane (PGN), les acides lipotéichoïques (LTA) et les lipoprotéines ; les PAMPs viraux comprennent généralement quant à eux l'ARN/ADN viral et les protéines d'enveloppe (Cavaillon 2010). Les PRR peuvent aussi reconnaître certains motifs moléculaires du « soi », c'est-à-dire endogènes, qui peuvent être associés à un potentiel danger pour l'organismes (*e.g.* molécules libérées lors de dommages tissulaires ou cellulaires) ; on parle de **DAMP** (« *damage associated molecular pattern* » pour « motifs moléculaires associés aux signaux de danger »). Il existe en tout quatre grandes familles de PRR : les TLR (Toll-like receptor ; **Figure 4**), les CLR (récepteurs de lectines de type C, les RLR (récepteurs induits par l'acide rétinoïque) et les NLR (Nod-like receptor) (Takeuchi and Akira 2010). La liaison des PAMP ou DAMP aux PRR permet l'initiation d'une cascade de signalisation impliquée dans l'expression de gènes impliqués dans la réponse innée. Il y activation des gènes

¹ phagos

codants pour diverses protéines : molécules antimicrobiennes, interférons, chimiokines, cytokines (pour activer ou recruter cellules), les médiateurs pro-inflammatoires et des enzymes (Owen et al. 2013).

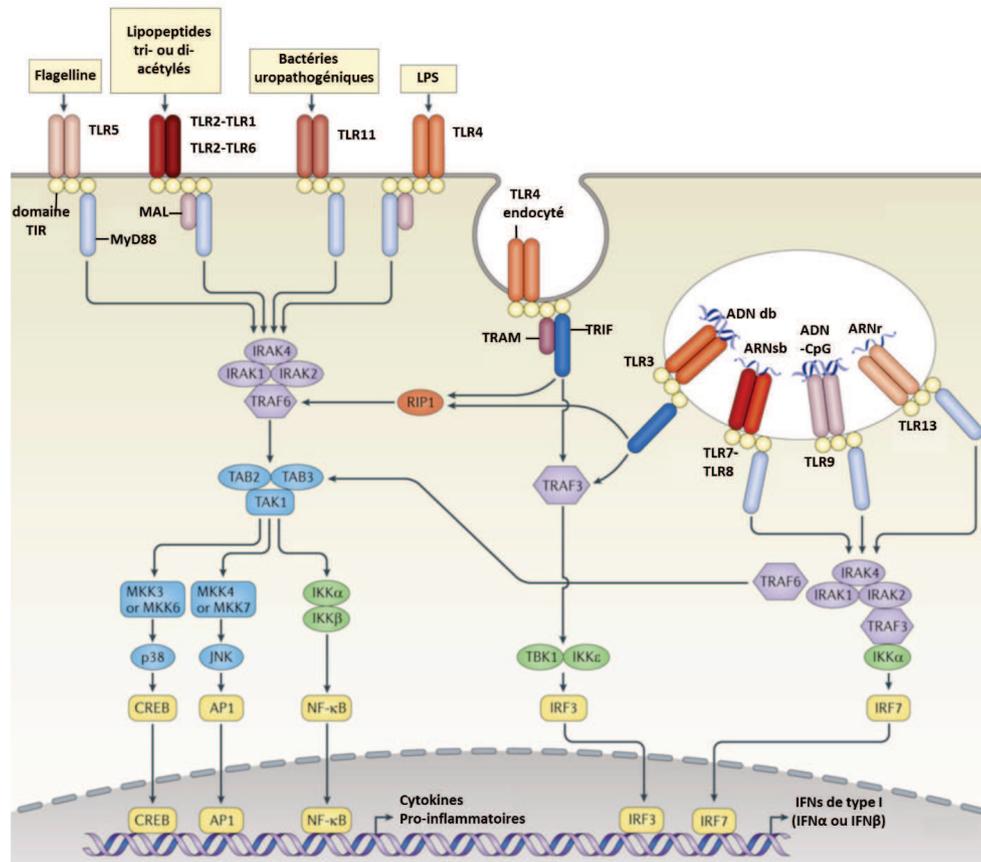


Figure 4. Famille des TLR et leur ligands spécifiques. Schéma traduit de (O'Neill, Golenbock, and Bowie 2013)

e) Le complément

Le système du complément est une famille d'une vingtaine de glycoprotéines sériques pouvant être synthétisées par le foie, les fibroblastes ou bien les macrophages (Abbas, 2000). Celui agit en coopération avec les systèmes immunitaires inné et adaptatif avec pour objectif l'élimination des pathogènes tissulaires ou sanguins (Walport 2001a, 2001b). Lorsqu'un élément/composant du complément est activé, celui-ci acquiert à son tour une activité protéolytique lui permettant d'activer la suite de la cascade enzymatique. L'initiation de la voie du complément peut se déclencher

selon trois voies différentes qui relèvent de mécanismes bien distincts (**Figure 5**). Il existe 3 voies du complément : la voie classique (activation par liaison de complexes immuns/anticorps), la voie alterne (par hydrolyse spontanée ou par des surfaces pathogènes) et la voie des lectines (récepteur MBL «lectines liant le mannose» pouvant se lier à des PAMPS microbiens comme les résidus mannoses ou des motifs N-acétylglucosamine (GlcNac)) (Hajishengallis et al. 2017). Bien qu'indépendantes, ces voies convergent toutes vers l'obtention d'une C3 convertase (Duncan, Wijeyewickrema, and Pike 2008). Elle clive la C3 pour donner C3a ou C3b qui agissent respectivement dans l'inflammation ou l'opsonisation de pathogènes (Ricklin et al. 2016). La C5 convertase clive le C5 en C5a ou C5b qui sont impliqués dans des processus de lyse ou d'inflammation, respectivement (Laursen et al. 2012). Le C5b intervient notamment en initiant la formation d'un complexe d'attaque membranaire (CAM), un complexe dont le rôle est clé dans le système du complément (Serna et al. 2016). Le C5b se lie au C6, C7 puis C8 formant le C5b678 qui est capable de s'insérer à l'intérieur de la membrane phospholipidique des pathogènes ciblés (Serna et al. 2016). Pour finir, il y a liaison du C9 qui va former un pore (Serna et al. 2016). Celui-ci cause une perte de l'intégrité membranaire et donc une mort cellulaire (Dudkina et al. 2016).

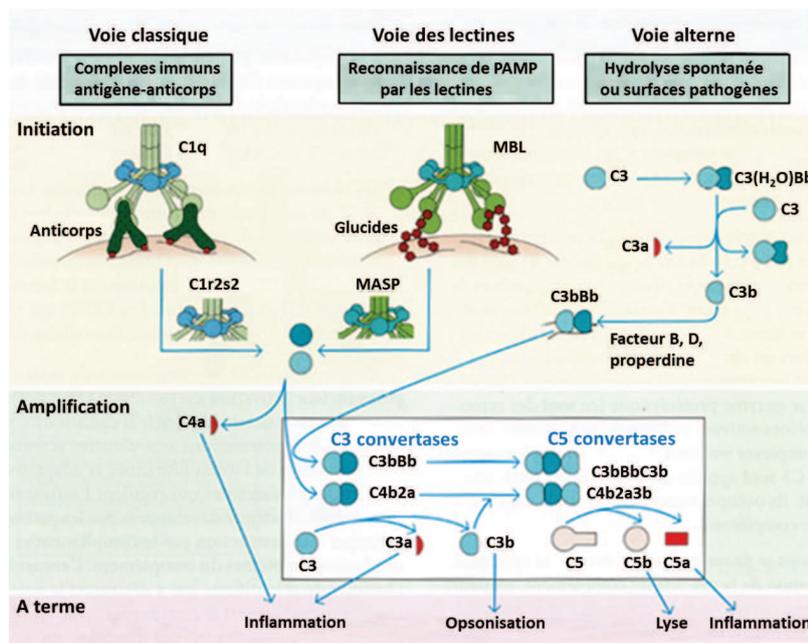


Figure 5. Le système du complément (d'après (Owen et al., 2013)). Les 3 voies du complément sont décrites : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne.

3. Réponse immunitaire adaptative mucosale : une réponse spécifique sur des sites effecteurs distants

a) La reconnaissance antigénique

On parle d'antigènes pour décrire toute molécule pouvant être reconnue par le système immunitaire. Ces antigènes possèdent des épitopes (ou déterminants antigéniques). Ceux-ci peuvent être reconnus et fixés par des anticorps qui leur sont spécifiques ou bien par les récepteurs d'antigènes des lymphocytes B ou T. Ces récepteurs sont décrits dans la partie ci-dessous.

(1) Le BCR : Récepteur Antigénique des Lymphocytes B

Le BCR est constitué de deux structures fonctionnelles principales (**Figure 6**).

L'une est impliquée dans la reconnaissance en elle-même de l'antigène grâce à un récepteur immunoglobuline membranaire (IgMm et IgDm) (Friess, Pluhackova, and Bockmann 2018; Geisberger, Lamers, and Achatz 2006). Les lymphocytes B matures ont pour fonction de capturer et d'internaliser les antigènes reconnus par le BCR afin de pouvoir présenter ceux-ci aux lymphocytes T, dans le cadre de la coopération immunitaire (Lanzavecchia 1985).

L'autre structure fonctionnelle du BCR, quant à elle, joue un rôle dans la transduction du signal lorsqu'il y a liaison d'un ligand antigénique qui est spécifique au récepteur BCR (Yam-Puc et al. 2018). On parle de signalisation lymphocytaire. La transmission de ce signal s'effectue grâce à l'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ ($CD79\alpha,\beta$) qui contient des motifs répétés appelés motifs d'activation à tyrosine des récepteurs immuns (ITAM) (Yam-Puc et al. 2018; Gauld, Dal Porto, and Cambier 2002; Flaswinkel and Reth 1994). La transduction du signal s'initie grâce à la phosphorylation des résidus tyrosines des ITAM du $CD79\alpha,\beta$, ce qui va permettre le recrutement de diverses molécules adaptatrices impliquées dans des cascades de signalisation

diverses (voies NF- κ B, NFAT, RAS...) (Dal Porto et al. 2004; Gauld, Dal Porto, and Cambier 2002; Hobeika, Nielsen, and Medgyesi 2015). Ainsi, il y a activation de gènes impliqués dans l'activation des LB. Il y a également initiation du développement de centres germinatifs (CG) (Vascotto et al. 2007), où les LB vont se différencier en plasmocytes capables de produire des anticorps ayant une forte affinité pour l'antigène.

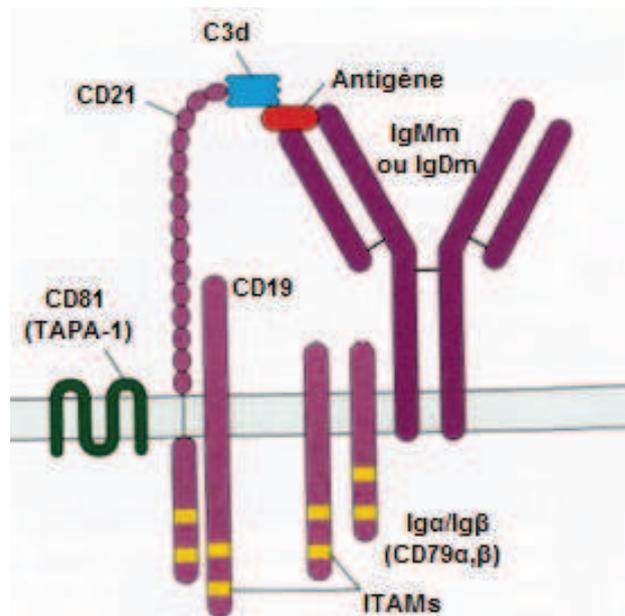


Figure 6. Structure du récepteur des lymphocytes B (BCR). D'après Immunology, 7th edition, traduit de l'anglais (Owen et al. 2013).

Afin d'assurer la cascade de signalisation du BCR, il y a présence de co-récepteurs permettant d'assister et de compléter l'action du CD79 α,β . Parmi ceux-ci, nous pouvons retrouver le CD21 qui est un récepteur du C3d, une molécule du complément qui a pour fonction de se lier aux antigènes (Fearon and Carroll 2000). Le CD21 peut agir de concert avec le CD19 (possède des motifs ITAMs) (Depoil et al. 2008; Gauld, Dal Porto, and Cambier 2002) et/ou le CD81 (TAPA-1) (Levy 2014; Cherukuri et al. 2004) afin de favoriser non seulement la liaison à l'antigène mais aussi de faciliter la transduction du signal.

(2) Le TCR : récepteur antigénique des lymphocytes T

Le récepteur antigénique des LT est le TCR (**Figure 7**). Comme pour les LB, le TCR permet suite à la liaison d'un antigène spécifique la transduction d'un signal qui va être nécessaire à l'activation des LT naïfs (Parkin and Cohen 2001). Ces LT, alors devenus effecteurs, vont pouvoir assumer les fonctions immunitaires pour lesquelles ils ont été prédestinées durant leur éducation dans le thymus.

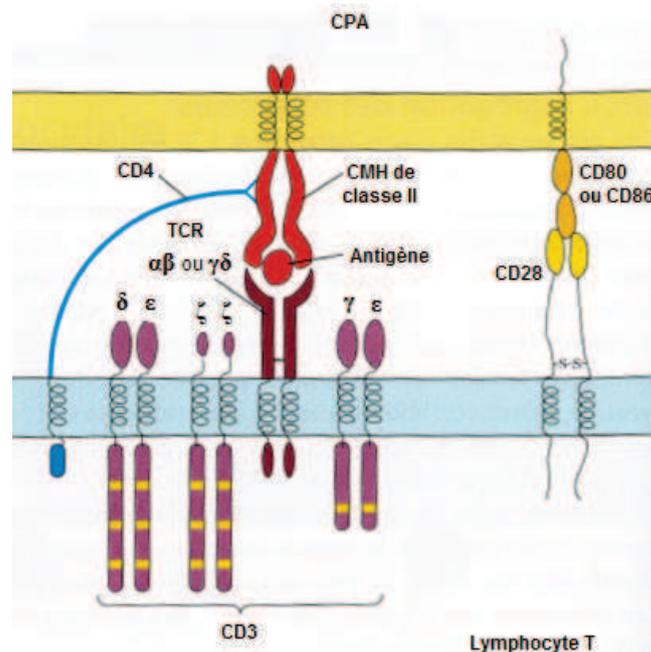


Figure 7. Structure du récepteur des lymphocytes T (TCR). D'après Immunology, 7th edition, traduit de l'anglais (Owen et al. 2013).

Le récepteur antigénique du TCR est constitué par un hétérodimère $\alpha\beta$ (Bhati et al. 2014) ou $\gamma\delta$ (Willcox and Willcox 2019). Ce récepteur permet la reconnaissance et la fixation d'antigènes préalablement apprêtés sur le CMH qu'il soit de type I ou II (Attaf et al. 2015). La grande majorité des lymphocytes possède un TCR $\alpha\beta$ qui reconnaît principalement des peptides antigéniques (Bhati et al. 2014). Les LT $\gamma\delta$, moins nombreux, ont une localisation plus spécifique (notamment dans les muqueuses) et sont capables de reconnaître des antigènes de natures différentes de celles reconnues par les LT $\alpha\beta$ (Attaf et al. 2015). Ainsi, les LT $\gamma\delta$ reconnaissent les peptides conventionnels mais aussi des molécules lipidiques ou glycolipidiques

présentés sur un CMH non conventionnel, des protéines de choc thermique et des phosphoprotéines microbiennes. Ce récepteur est accompagné d'un complexe CD3 qui est composé de chaînes polypeptidique $\delta\epsilon$, $\gamma\epsilon$ ainsi que d'un dimère $\zeta\zeta$ ou $\zeta\nu$. Le CD3 est doté de motifs ITAM qui permettent la transduction du signal TCR nécessaire à l'activation des LT naïf.

Le TCR est également associé à des co-récepteurs qui vont en partie déterminer la fonction jouée par les LT matures : le CD4 ou le CD8. Chaque lymphocyte T ne possède qu'un seul de ces deux co-récepteurs. Ainsi les LT possèdent soit le CD4 (LT CD4+) qui va être restreint aux molécules du CMH de classe II, soit le CD8 (LT CD8+) qui va être restreint aux molécules du CMH de classe I.

Pour finir, la présence du récepteur CD28 au niveau du TCR est nécessaire. Le CD28 se fixe au CD80 (présent à la surface de LB, de LT activés, de macrophages...) ou au CD86 (présent à la surface de cellules dendritiques, LB mémoires, monocytes, LT activés ...). Les CD80 et CD86 sont des glycoprotéines de co-stimulation de l'activation des LT qui, suite à leur interaction avec le CD28, vont valider l'activation des LT naïfs.

b) La présentation antigénique

Les antigènes, afin de pouvoir être présentés de façon effective aux lymphocytes T, doivent être préalablement apprêtés. Les peptides antigéniques sont préparés selon des voies endocytaires qui impliquent un complexe : le complexe majeur d'histocompatibilité. Il existe en tout deux voie différentes d'apprêtement qui peuvent être soit « interne » soit « externe » en fonction de la classe de CMH impliquée. De façon générale, les antigènes provenant de la cellule en elle-même (antigènes du soi) sont présentés sur le CMH de classe I tandis que ceux provenant de l'extérieur (antigènes du non soi) sont endocytés par des cellules professionnelles et présentés sur leur CMH de classe II.

(3) Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I (CMH-I)

Les antigènes endogènes, correspondant aux antigènes dit « du soi », sont pris en charge par la voie du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (**Figure 8**). Le CMH-I est constitué d'un polypeptide à trois domaines (α 1- α 2- α 3) codé par les gènes du CMH. Le domaine α 3 est associé avec la microglobuline β 2 qui est un polypeptide de type Ig codé par des gènes autres que ceux du CMH. La β 2 permet le chargement et transport des molécules de classe I. Enfin, le domaine α 3 possède également un site de fixation pour le récepteur CD8 des lymphocytes T. Le CMH-I est exprimé par toutes les cellules nucléées à l'exception des globules rouges.

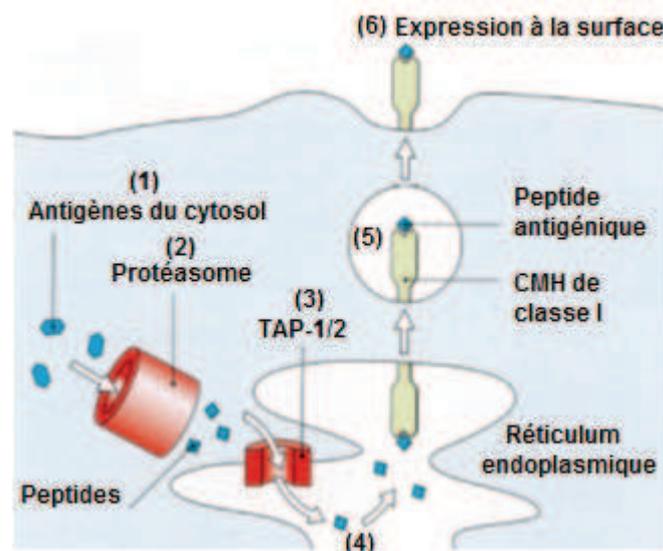


Figure 8. Présentation antigénique : la voie du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I). D'après *Immunology – An Illustrated Outline* de David Male, traduit de l'anglais (Male 2014). Les antigènes endogènes (1) sont dégradés par le protéasome de façon à obtenir des peptides de petite taille (2). Ceux-ci sont ensuite conduits au réticulum endoplasmique rugueux (RER) par des transporteurs de protéines TAP-1/2 (3). Une fois dans le RER les peptides subissent de nouvelles dégradations qui sont le fait d'exopeptidases et vont donner de petits fragments peptidiques capables de bien se lier aux molécules du CMH de classe I (4). Cette association va stabiliser le complexe peptide/CMH-I (5) qui va alors être transporté en dehors du RER en direction de la membrane plasmique (6) où l'antigène va pouvoir être présenté aux LT CD8⁺ qui agissent comme cellules lymphocytaires cytotoxiques (Male 2014).

(4) Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH-II)

Le CMH-II permet la présentation des antigènes exogènes, c'est dire considérés comme « du non soi » (Figure 9).

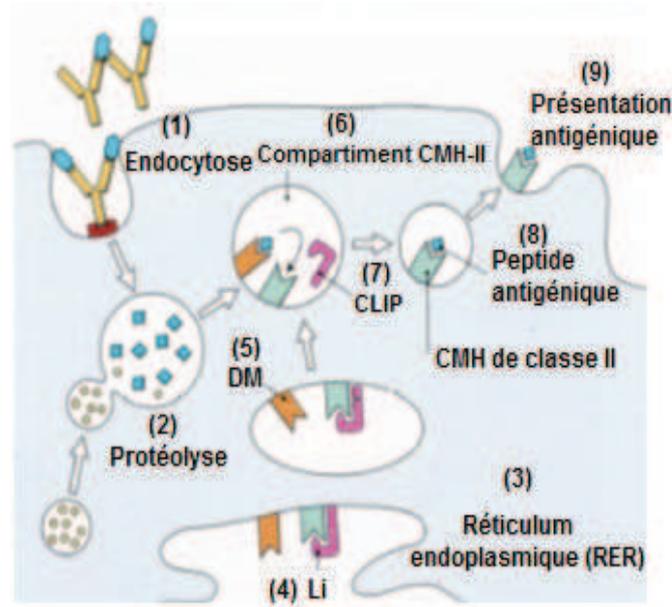


Figure 9. Présentation antigénique : la voie du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II). D'après Immunology – An Illustrated Outline de David Male, traduit de l'anglais (Male 2014). (1) Endocytose de l'antigène exogène par des CPA. (2) Dégradation en fragments peptidiques (protéolyse). (3) Formation d'une vésicule contenant les molécules du CMH-II depuis le RER. (4) Association du CMH-II à une chaîne invariante Li qui assure le bon repliement des molécules du CMH et surtout empêche la liaison des peptides du RER au CMH. (5) Intervention d'une molécule DM qui va veiller au bon chargement des peptides antigéniques sur le CMH-II. (6) La fusion de la vésicule contenant les fragments peptidiques avec celle contenant le CMH-II-Li forme le compartiment du CMH de classe II (MIIC). (7) Dégradation de la chaîne invariante Li pour donner un peptide CLIP (class II-associated invariant-chain peptide). (8) Le CLIP sera à son tour remplacé par l'antigène peptidique d'intérêt. (9) Pour finir, le complexe CMH-II-antigène est conduit à la surface cellulaire où l'antigène sera présenté aux lymphocytes T CD4⁺ (Male 2014).

Le CMH-II est exprimé sur les cellules présentatrices d'antigènes CPA (cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes B...) (Roche and Furuta 2015). Les CPA sont des cellules dont le rôle est de prendre en charge les antigènes exogènes afin de pouvoir les rendre présentables aux lymphocytes (Owen et al. 2013). Certaines CPA captent les antigènes en périphérie (*e.g.* au niveau de la peau) puis se déplacent dans des organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques drainants afin de pouvoir y présenter l'antigène aux lymphocytes T

auxiliaires CD4⁺ (Kashem, Haniffa, and Kaplan 2017). D'autres CPA au contraire résident sur place dans les organes lymphoïdes secondaires pour intercepter directement l'antigène (Turley, Fletcher, and Elpek 2010). Le CMH de classe II est constitué par deux chaînes polypeptidiques α et β ayant des domaines extracellulaires et traversant la membrane plasmique. Le site de liaison à l'antigène est formé par le site $\alpha 1$ et $\beta 1$. Enfin le domaine β possède un site de liaison pour le récepteur CD4 des LT.

c) La réponse de type humorale systémique et mucoale

Dans la réponse humorale, les LT CD4⁺ sont activés par l'intermédiaire de leur TCR qui interagit avec l'antigène d'intérêt présenté sur le CMH-II. Une **expansion clonale** des LT est déclenchée après des interactions spécifiques avec les lymphocytes B (LB) des centres germinatifs (Sharma et al. 2015). Les LB matures peuvent élargir leur répertoire en immunoglobulines par le biais de mécanismes tels que l'**hypermutation somatique** (HMS) ou la **commutation de classe** (à partir d'IgM ou IgD pour donner des IgG, IgA ou IgE) (Cerutti 2008). La réponse adaptative mucoale de type humorale se caractérise par la mise en place de multiples stratégies immunitaires qui vont permettre de protéger simultanément les deux côtés des barrières épithéliales mucoales. La production et la sécrétion d'immunoglobulines A sécrétoires (sIgAs) locales représente la réponse prédominante dans ce type d'immunité. Les sIgAs possèdent des propriétés et fonctions particulièrement adaptées à un environnement mucoal.

Les sIgAs dimériques jouent de nombreux rôles : **i) Résistance aux dégradations** protéasiques (résulte de la dimérisation et de la glycosylation élevée des IgA produites par le plasmocytes mucoaux). **ii) Exclusion immunitaire** avec limitation du contact et de la fixation cellulaire entre agents pathogènes et surfaces muqueuses (Neutra and Kozlowski 2006). **iii) Promotion de la capture d'antigènes** ou de microorganismes (Torrieri-Dramard et al. 2011). **iv) Obstruction de certaines**

molécules de surfaces comme par exemple les toxines bactériennes grâce à un système de liaison de forte affinité (Cerutti 2008). **v) Interception d'agents pathogènes présents dans le compartiment intracellulaire** épithélial lors de la transcytose de sIgAs (via un transport par médiation pIgR) afin de ramener ces même pathogènes dans la lumière de la muqueuse. **vi) Intervention dans la cytotoxicité** à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). **vii) Ancrage de bactéries commensales au mucus** pour empêcher leur accès aux tissus muqueux sous-jacents (voir revue de (Cerutti 2008)).

Les plasmocytes mucosaux permettent également la production d'IgG locales au niveau des sites effecteurs. Néanmoins les quantités d'IgG mucosales produites restent bien en deçà de celles obtenues pour les sIgA. Ces concentrations sont par exemple trente à cent fois inférieures à celles de sIgA au niveau de la muqueuse intestinale en raison de leur grande sensibilité aux dégradations protéasiques. Les IgG qui parviennent à rester intactes jouent cependant un rôle non négligeable dans la neutralisation des agents pathogènes et dans la maîtrise des infections.

Suite à une immunisation par la voie muqueuse, la réponse locale s'accompagne généralement de l'obtention d'IgG mais aussi d'IgA sériques afin de prévenir toute propagation systémique du pathogène ciblé (Xu, Yuen, and Lam 2014). Cette caractéristique met en avant un des avantages majeurs de la voie d'immunisation muqueuse : le fait de pouvoir induire une réponse qui puisse à la fois être locale sur les sites muqueux mais aussi systémique. Ces propriétés soulignent donc l'intérêt du développement de nouvelles stratégies vaccinales ou les vaccins induisent une réponse directement au niveau du site d'infection (au niveau de la muqueuse).

B. Introduction - La vaccination : une mise à profit du système immunitaire

1. Succès passés, enjeux présents et défis futurs

L'histoire de la vaccination en Europe prend ses origines, de façon assez étonnante, au début du XVIIIème siècle. Une femme dénommée Lady Montagu, épistolière et épouse de l'ambassadeur d'Angleterre de l'empire Ottoman, vit à Constantinople et y tisse des liens amicaux. Elle découvre, au fil de discussions que les femmes turques protègent leurs enfants de la variole en les inoculant avec des croûtes de pustules de variole (pratique empirique qui serait héritée de la société chinoise du XVème siècle). Impressionnée, elle fait varioliser ses propres enfants et promeut intensément sa découverte, une fois de retour à Londres en 1721, allant jusqu'à affirmer dans ses *Turkish Letters*² qu'à Constantinople « *The small-pox, so fatal, and so general amongst us, is here entirely harmless* »³ (Montagu, Hale, and Oliver Wendell Holmes Collection (Library of Congress) 1869). Bien qu'ayant fait face à une communauté médicale divisée, mais lui étant plutôt hostile, elle réussit malgré tout à convaincre le roi d'Angleterre Georges 1^{er} qui fera, suite à des essais concluants, varioliser ses deux petites filles : la technique de variolisation se répand alors dans toute l'Europe (Figure 10). Pionnière, Lady Montagu avait découvert de façon empirique ce qui plus tard sera considéré comme le principe de vaccination (Stone and Stone 2002; Roberts 1996).

Plus tard, la théorisation par Jenner en 1798 d'un moyen de prévention contre la variole, par inoculation du virus de la vaccine, est considéré comme l'une des plus importantes innovations de l'époque moderne en infectiologie. Louis Pasteur, reconnu comme étant le père de « l'immunologie moderne », a introduit au XIXème siècle la « théorie des germes » et conceptualisé que la vaccination pourrait être appliquée à

² Lettres Turques

³ La variole, si fatale et commune chez nous, n'est rien à Constantinople.

n'importe quelle maladie de type microbienne. Il a par ailleurs démontré que la virulence directe des pathogènes pouvait être atténuée pour une utilisation comme vaccin prophylactique afin de prévenir les maladies infectieuses. Ainsi, lors de son discours d'énonciation du principe de vaccination en 1880, Pasteur invente le terme « vaccin » et le définit de la façon suivante : « *les vaccins correspondent à des pathogènes affaiblis ayant le caractère de ne jamais tuer, de donner une maladie bénigne qui préserve des maladies mortelles* ».

La vaccination a connu des succès majeurs avec notamment l'éradication totale dans le monde de la variole chez l'homme (en 1980) (WHO 1979) ainsi que de la peste bovine de type I (rinderpest virus) (OIE 2011; Moutou 2014). Par ailleurs, les cas de poliomyélites ont pu être réduits de plus de 99% depuis 1988, date de lancement par l'OMS de « l'Initiative mondiale pour l'éradication de la poliomyélite (IMEP) » (Ward et al. 1993) avec la mise en place d'intensives campagnes de vaccination accompagnées d'une surveillance très étroite. A ce propos, l'OMS vient de déclarer en octobre 2019 l'éradication mondiale du *poliovirus* sauvage de type 3 (Dyer 2019) en plus de celui de type 2.

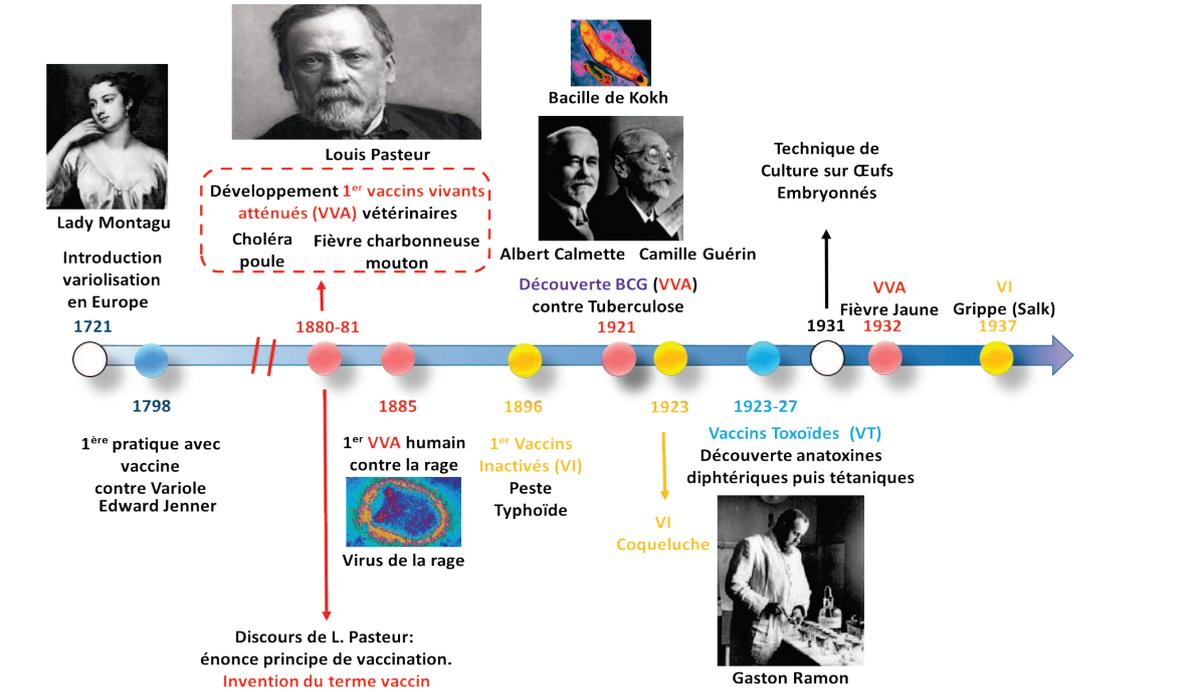
A divers niveaux, les vaccins ont permis le recul important d'une dizaine de maladies : la diphtérie, le tétanos, la fièvre jaune, la coqueluche, l'*haemophilus influenza* de type b, la rougeole, les oreillons, la rubéole, la fièvre typhoïde et la rage. En revanche, ces maladies à prévention vaccinale sont parfois considérées comme relevant du « passé », souvent à tort, par la population des pays industrialisés ; celle qui a le plus bénéficié des programmes de vaccination efficaces. Il en résulte que certaines maladies qui n'étaient plus perçues comme « une menace » ont été en quelque sorte ignorées et sous-estimées par la population, entraînant une baisse dramatique de la couverture vaccinale. Cette « amnésie collective » a conduit ces dernières années à la résurgence de maladies « presque disparues » sous forme d'épidémies contagieuses sporadiques et étendues. Ainsi, les mots du philosophe George Santayana « *Ceux qui ne se souviennent pas du passé sont condamnés à le répéter* »

illustrent bien cette problématique. Un exemple récent marquant est probablement le retour de la rougeole en 2019, dans un certain nombre de pays développés (en Europe dont la France et aux Etats-Unis), où pourtant l'accès à un vaccin très efficace et peu coûteux est aisé (McLaren, Stein, and Minkoff 2019). La coqueluche (Chiappini et al. 2013), les oreillons (Lewnard and Grad 2018) et la rubéole sont également concernés. Ainsi, pour maintenir éloignées ces maladies, le maintien d'une surveillance étroite et d'une couverture vaccinale très élevée avec les vaccins déjà existant au sein de la population est vital.

Après deux siècles, au fil des innovations et progrès techniques scientifiques (**Figure 10**), une trentaine de maladie infectieuses humaines possède à ce jour un vaccin qui lui est propre. Malheureusement, la vaccination reste encore et toujours un défi pour sauvegarder la santé des populations. Ainsi, en 2016, selon l'OMS 1,7 millions de personnes sont décédées de la tuberculose, 1 million de personnes du VIH et 445 000 du paludisme. D'autres types d'infections bien que non fatales, causent une morbidité importante qui demeure problématique, en particulier dans les pays en voie de développement.

A Aux commencements de la vaccination: Découverte : XVIIIème siècle

Premier âge d'or de la vaccination: de l'ère pasteurienne à 1940



B Deuxième âge d'or de la vaccination (1940-1970) puis ère technologies recombinantes (actuelle)

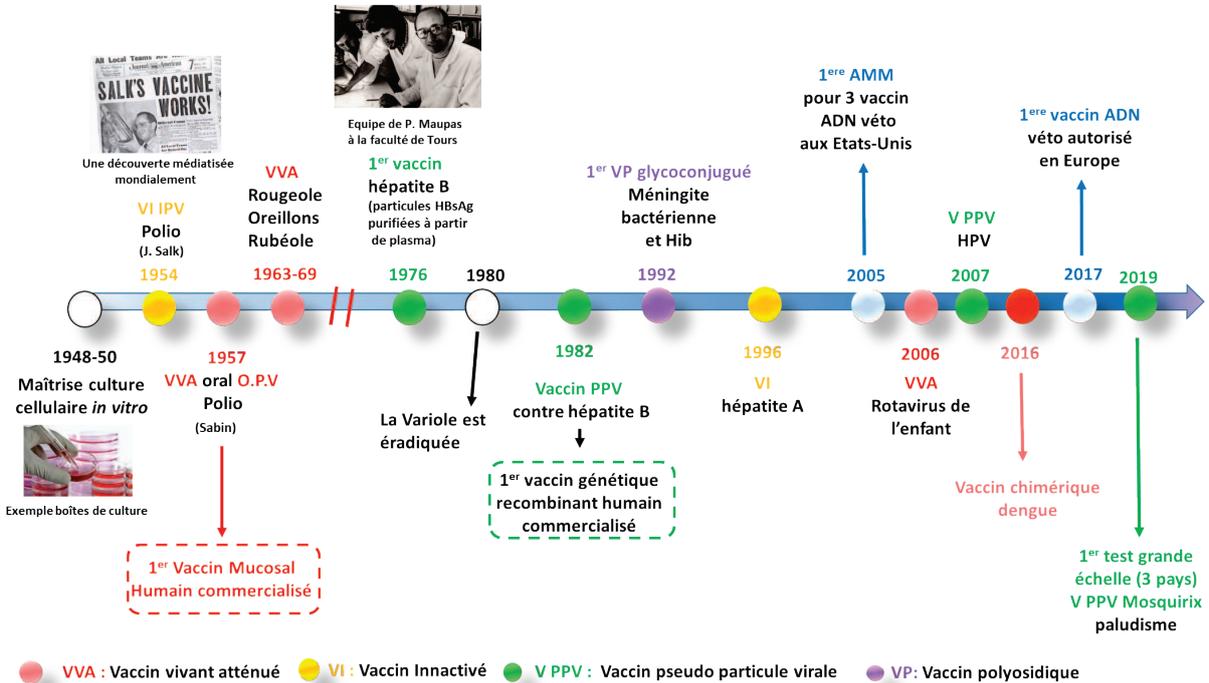


Figure 10. Chronologie de l'histoire de la vaccination en Europe. La frise (A) comprend deux périodes. La première, très brève, recouvre les toutes premières découvertes (XVIII^{ème} siècle). La seconde correspond au premier âge d'or de la vaccination qui s'étend de l'ère pasteurienne où le terme vaccination a été conceptualisé jusqu'aux années 1940. La frise (B) évoque le deuxième âge d'or où suite à une meilleure maîtrise des techniques de culture cellulaire, de nombreux vaccins atténués ou inactivés ont pu être découverts. Enfin cette frise se termine par l'ère actuelle, dite « des technologies recombinantes » en cours depuis les années 1980.

2. Types de vaccins

a) Vaccins vivants atténués

Un vaccin vivant atténué est défini comme étant un organisme vivant (viral ou bactérien) dont la virulence et la capacité à induire une maladie (pathogénèse) a été atténuée, affaiblie ou altérée. Il peut également s'agir d'une souche ayant été sélectionnée comme étant moins virulente que la souche sauvage « wild-type ». Le but de ce type de vaccination est de mimer de façon très légère l'infection à partir de ces organismes dérivés afin d'induire une réponse immunitaire protectrice durable (Vetter et al. 2018).

Les processus d'atténuation du pathogène sont variés. Ils peuvent se faire par multiplication des passages sur différentes lignées cellulaires. Selon ce principe, la réplication et l'infection du virus sélectionné sont de plus en plus efficaces dans les cellules des lignées cellulaires, au fil des passages cellulaires, tout en perdant ces mêmes capacités chez leur hôte naturel. Cette méthode *in vitro* a par exemple permis l'obtention des vaccins contre : la poliomyélite avec l'OPV (Sabin, Hennessen, and Winsser 1954), la rougeole (Katz et al. 1960), les oreillons (Hilleman et al. 1968)... L'atténuation peut également se faire pour certains virus par de nombreux passages sur des œufs de poule embryonnés (Hajj Hussein et al. 2015). Les virus peuvent aussi être affaiblis de façon thermosensible par passages du virus à une température inférieure à 25 °C afin de pouvoir sélectionner ceux qui se répliquent le mieux à 25 °C plutôt qu'à 37 °C (température du corps humain) et donc diminuer leur pathogénicité (Hajj Hussein et al. 2015; Plotkin et al. 1969). L'induction de mutations aléatoires et la sélection de souches avec une virulence réduite sont également des procédés utilisés. En revanche, la production de ce type de vaccins n'est pas possible pour tous les micro-organismes : ceux qui changent de forme durant les différents stades de leur vie (parasites), ceux qui ne peuvent pas être cultivés, ceux qui peuvent présenter des

phases de latences et enfin ceux qui agissent et mettent en place des mécanismes d'échappement du système immunitaire (évasion-immune)(Cunningham et al. 2016).

Les avantages des vaccins vivants atténués sont nombreux. L'excellente immunogénicité de ceux-ci permet l'induction d'une réponse immune robuste à la fois humorale et cellulaire. Les antigènes étant généralement les mêmes que pour le pathogène original, la réponse obtenue est comparable à celle obtenue suite à une infection naturelle. De ce fait une immunité à long terme est aisément obtenue suite à l'administration d'une seule dose vaccinale (Plotkin, Orenstein, and Offit 2018; Pulendran and Ahmed 2011). Cela est un atout majeur dans les pays en voie de développement où il est souvent difficile de faire revenir ultérieurement les personnes pour réaliser les rappels de vaccination. L'usage d'adjuvants n'est pas nécessairement indispensable. Par ailleurs, le vaccin étant une unité « vivante », celui-ci peut infecter et se répliquer dans les cellules. Enfin, une immunité dite « de troupeau » peut être induite par l'excrétion des particules virales vaccinales et donc vacciner les individus dans l'environnement. Selon le contexte vaccinal, cette immunité de troupeau peut être aussi bien un avantage qu'un risque.

Les vaccins vivants atténués présentent d'importants inconvénients comme le risque de virulence résiduelle ou la réversion vers la souche sauvage pathogénique. Des cas de réversion ayant conduit à une pathogénicité ont par exemple été rencontrés avec le vaccin Oral Polio Vaccine (OPV) (Pliaka, Kyriakopoulou, and Markoulatos 2012). Autre exemple, en vaccination vétérinaire, des cas de reversions ont été rencontrés en 1996 au Danemark suite à la vaccination de troupeaux avec une souche Nord-Américaine du virus responsable du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) comme vaccin vivant atténué pour combattre la souche SDRP de type Européenne (Mortensen et al. 2002; Murtaugh, Elam, and Kakach 1995). Le vaccin s'est reversé puis s'est répandu dans les troupeaux. De ce fait, les deux types de virus SDRP sont restés dans la population porcine, il s'agit là d'un exemple de contamination environnementale (Meeusen et al. 2007).

Le risque d'une maladie clinique résultant de ce type de vaccination reste toutefois rare mais peut représenter un problème pour certaines populations à risque (immunodéprimés, en période de gestation...) (Vetter et al. 2018). Dans les cas ci-présents, il y a contre-indication afin d'éviter tout risque de réversion non contrôlée. Enfin, le dernier inconvénient est la difficulté à obtenir une production constante du vaccin. Parmi les vaccins humains commercialisés nous pouvons retrouver ceux contre: la rage, la tuberculose (BCG), la fièvre jaune, le trio rougeole-oreillons-rubéole (vaccin ROR), la typhoïde, le cytomégalovirus, le rotavirus, le virus de la grippe, la varicelle (Delany, Rappuoli, and De Gregorio 2014)... Il est intéressant de noter que pour les bactéries, un seul vaccin humain vivant atténué est commercialisé : le BCG, mis au point par Albert Calmette et Camille Guérin il y a un siècle (1921). Celui-ci, reste à ce jour le vaccin de référence contre la tuberculose (principale maladie infectieuse humaine à ce jour en terme de mortalité) et a été obtenu par atténuation, par passage sur plusieurs années de la souche bovine *Mycobacterium bovis* (Tanner et al. 2019). En vaccination vétérinaire, l'une des réussites majeures a été l'éradication dans le monde du virus de la peste bovine. Cela a été possible grâce au vaccin atténué «Plowright» qui avait été obtenu suite à 90 passages de la souche « Kabete O » (Roeder, Mariner, and Kock 2013; Plowright and Taylor 1967). Chez le porc, nous pouvons citer l'exemple vaccin vivant atténué PRRSV-MLV contre le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (Renukaradhya et al. 2015).

b) Vaccins inactivés

Les vaccins dit « inactivés » se définissent de la façon suivante : organisme pathogène infectieux entier qui a été inactivé/tué dans son intégralité suite à un traitement particulier (chimiquement (formaline, formaldéhyde...), par radiation ou par chaleur) (Vetter et al. 2018). La capacité du pathogène à se répliquer et à induire une pathogénicité a été détruite. Les antigènes clés doivent néanmoins rester intacts pour être reconnus par le système immunitaire et donc garder leur immunogénicité.

Ce type de vaccination présente l'avantage d'induire une large réponse immunitaire à de multiples antigènes (Cunningham et al. 2016). Par ailleurs, ils sont plus sûrs et stables que les vaccins vivants atténués puisque tout risque de réversion vers la virulence est écarté. En général les vaccins inactivés permettent de traiter les signes cliniques plutôt que l'infection par le pathogène en elle-même. En revanche ceux-ci sont moins efficaces car ils ne peuvent plus infecter les cellules et requièrent donc dans la plupart des cas l'utilisation d'adjuvants et le recours à plusieurs injections (Meeusen et al. 2007). Dû au besoin d'adjuvant, le coût de production est plus élevé que pour les vaccins atténués.

Parmi les inconvénients nous pouvons citer la forte réactogénicité de ces vaccins (rougeur douleur, gonflement au point d'injection, fièvre, douleur musculaires et articulaires...) et le fait que certains antigènes peuvent être détruits lors des processus d'inactivation (Cunningham et al. 2016). En dépit de la sécurité conférée par l'inactivation des pathogènes, ceux-ci peuvent tout de même présenter certains risques. Le premier concerne la production du vaccin en elle-même puisqu'elle nécessite la manipulation de quantités très importantes d'agents infectieux par le personnel. Celui-ci est considéré comme à risque d'infection malgré la très haute biosécurité imposée lors du processus industriel. Un incident de ce type a été à l'origine en Angleterre d'un foyer de fièvre aphteuse en 2007. La souche virale O1 BFS 1860 (isolé au Royaume-Uni durant l'épidémie de 1967/68) s'était accidentellement échappée d'un laboratoire P4 de l'institut de Pirbright (Ryan et al. 2008). Ceci avait été la conséquence d'un défaut dans le système de ventilation (absence de dépression) alors que la production d'un vaccin inactivé utilisant cette souche était en cours (Record 2007; Record 2014). Le deuxième risque encouru est l'inactivation défailante potentielle des pathogènes pendant de la production. Ainsi par exemple, le vaccin antipoliomyélitique de Jonas Salk obtenu par inactivation du virus sauvage avec du formaldéhyde a été à l'origine en 1955 de ce qui est encore aujourd'hui considéré comme l'un des plus graves accidents post-vaccinal (incident Cutter) (Pliaka,

Kyriakopoulou, and Markoulatos 2012). Deux lots vaccinaux contenaient du virus qui n'avait pas été tué efficacement tué par le formaldéhyde provoquant ainsi accidentellement de nombreux cas de poliomyélite (200) chez les patients vaccinés ainsi qu'une dizaine de décès (Offit 2005). Suite à cela, les protocoles et techniques de fabrication ont été hautement renforcées afin de garantir l'inactivation totale du virus et donc d'assurer une très haute biosécurité. Les normes encadrant tout cela sont très strictes. Les exemples de risques présentés ci-dessus ont concerné des cas très particuliers qui restent exceptionnels. Par ailleurs, il peut être mis en avant l'impact majeur et décisif des campagnes de vaccination réalisées avec des vaccins inactivés dans le recul important de nombreuses maladies infectieuses.

Parmi les vaccins humains inactivés commercialisés nous pouvons retrouver ceux contre la typhoïde, le choléra, la peste, la coqueluche, la grippe, la poliomyélite (IPV), la rage, l'encéphalite japonaise, l'encéphalite liée au tiques et l'hépatite A (Delany, Rappuoli, and De Gregorio 2014).

c) Vaccins sous-unitaires

Par définition, un vaccin sous-unitaire repose sur l'utilisation d'un ou de plusieurs antigènes du pathogène afin d'induire une réponse immunitaire spécifique uniquement à ce(s) même(s) antigène(s) (Jorge and Dellagostin 2017). Cet antigène peut être de nature variée. Les vaccins sous-unitaires, que nous allons décrire exhaustivement dans cette partie comprennent : les vaccins Virus-Like Particles (VLP), les vaccins recombinants, les vaccins à ADN et les vaccins polysaccharidiques. Les vaccins sous-unitaire ne sont pas infectieux et sont souvent mieux tolérés que les vaccins inactivés (Vetter et al. 2018). Par contre, ces vaccins sont parfois peu immunogènes et induisent une réponse immunitaire relativement faible, impliquant le recours à des rappels afin d'obtenir une protection sur le long terme.

(1) Vaccins toxoïdes

Aux origines des vaccins toxoïdes, la découverte capitale en 1888 par les pasteuriens Alexandre Yersin et Emile Roux de la toute première toxine bactérienne décrite : la toxine diphtérique (TD) ; celle qui est responsable de la diphtérie causée par *Corynebacterium diptheriae* (Ramon 1953b; Cavaillon and Legout 2019). Par ailleurs, Von Behring et Kitasato constatent en 1890 que l'inoculation d'animaux (souris ou cochons d'Inde) avec des sous-doses létales de toxine purifiée (à partir de sera de lapin infectés) pouvait permettre la production dans leur sérum d'un antidote efficace. Cette découverte value à Behring le tout premier Prix Nobel de physiologie et/ou de médecine en 1901 (Raju 1998). Ce principe de sérothérapie a été repris à partir de 1894 par Roux et Martin, et développé chez les grands animaux (obtention d'antisera chez le cheval) afin pouvoir produire ce remède, au sein de l'institut Pasteur, à une grande échelle (industrielle). Cela a permis de répondre à la forte demande de remèdes dans un contexte où le tétanos s'est révélé particulièrement problématique ; c'était en effet la période de la Grande Guerre (Gachelin 2007; Opinel 2007). Il est estimé qu'environ 6 millions de soldats français auraient été soignés par sérothérapie antitétanique et que cela aurait permis de sauver un nombre important de soldats blessés, dans un environnement propice aux infections par le tétanos (Bazin 2008). Plus tardivement, ces capacités d'antidote dans le sérum ont été attribuées aux anticorps spécifiques neutralisants (Karch and Burkhard 2016). Par la suite, Ramon découvre, en 1923 et 1927 respectivement (**Figure 10**), que les toxines diphtériques (Ramon 1953a, 1953b) et tétaniques (Ramon 1956) peuvent être inactivées, par traitement chimique (formaldéhyde) et thermique (chaleur). Ces anatoxines ont alors été largement utilisées en vaccination (vaccins toxoïdes) et restent encore aujourd'hui la meilleure mesure préventive contre les toxémies par clostridies à la fois chez l'homme et les animaux (Hunter, Uilenberg, and Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation (Ede Netherlands) 1994). Certaines de ces toxines peuvent être utilisées en tant qu'adjuvants. Parmi les exemples, on retrouve la toxine cholérique B recombinante

(rCTB), qui est le seul adjuvant autorisé pour être inclus avec des vaccins mucosaux commerciaux (Miquel-Clopes et al. 2019). Pour le porc, nous avons par exemple les vaccins toxoïdes COGLAPIX® ou Porcilis APP® contre la pleuropneumonie porcine. Ceux-ci sont composés de toxoïdes bactériens (Apx I, II et III) et permettent une protection contre l'ensemble des sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Frey 2019).

(2) Vaccins polyosidiques

Un vaccin polyosidique ou polysaccharidique est un vaccin qui est obtenu à partir de dérivés des sucres polysaccharidiques complexes qui composent la capsule de surface de certaines bactéries. Les vaccins de première génération comprennent uniquement des polysaccharides purifiés à partir de bactéries encapsulées (Delany, Rappuoli, and De Gregorio 2014). Plusieurs bactéries ayant une capsule de surface sont impliquées dans des maladies majeures comme *Nisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* de type B ou *Streptococcus*. En revanche, cette première génération de vaccins s'est heurtées au fait qu'ils sont peu immunogènes et qu'ils n'induisent qu'une réponse humorale transitoire.

Afin de rendre ce type de vaccin plus efficaces, ceux-ci peuvent être conjugués avec des protéines porteuses (Delany, Rappuoli, and De Gregorio 2014). La notion de conjugaison « protéine porteuse » trouve son origine au début du XXème siècle avec la découverte d'antigènes appelés « haptènes » par Karl Landsteiner. Un haptène est un antigène de petite taille dit « incomplet » puisqu'il est non immunogène par lui-même mais qu'il le devient lorsque celui-ci est combiné avec une protéine de grande taille dite « porteuse ». Les anticorps spécifiques du complexe haptène-porteur sont en revanche capables de reconnaître isolément ce même haptène (Male 2014). En 1929, Goebel et Avery ont montré que le fait de coupler des polysaccharides avec des protéines porteuses pouvait favoriser leur immunogénicité (Avery and Goebel 1929). Plus tard, il est montré que le fait d'administrer des polysaccharides d'*Haemophilus*

influenzae type b (Hib) couplés à des anatoxines diphtériques ou tétaniques induisait une réponse humorale anti-Hib (Schneerson et al. 1980). Cette découverte a servi de base au développement par Mériex et Connaught des vaccins PRP-D (avec anatoxine diphtérique) et PRP-T (avec anatoxine tétanique) (Pichichero 2013). Il a par ailleurs été reporté que l'induction d'une réponse mémoire était possible chez les enfants avec ce type de glycoconjugués (Anderson, Fisher, and Breeding 1986). Parmi les inconvénients, il a été constaté que le recours à des doses « booster » est parfois requis pour atteindre et maintenir une réponse immunitaire sur une longue durée (Vetter et al. 2018).

(3) Vaccins Virus-Like-Particles (VLPs)

Un vaccin VLP est un vaccin composé par une ou plusieurs protéines virales (antigène vaccinal) qui sont exprimées de façon recombinante et s'auto-assemblent en structures supramoléculaires. Les VLP imitent généralement la structure symétrique de la capsid virale du virus parental d'origine (Bachmann et al. 1997). Cette forte analogie avec les virus « naturels » permet, entre autres, l'utilisation de doses vaccinales plus faibles que celles généralement requises en vaccination sous-unitaire. Il est considéré que les VLP combinent à la fois des avantages semblables à ceux des vaccins viraux entiers (structure virale, antigène conservé...) tout en ayant ceux des vaccins sous-unitaires (absence de génome viral infectieux, pas de réplication virale, bonne biosécurité ...) (Brun et al. 2011). Les VLP sont fabriqués grâce à différents systèmes d'expressions cellulaires : bactériens, levures ou insectes. Ceux-ci doivent prendre en compte les modifications post-traductionnelles qui sont parfois nécessaires pour certaines protéines afin d'optimiser au mieux la fabrication du vaccin VLP souhaité (Fuenmayor, Godia, and Cervera 2017). La structure antigénique répétitive des VLP explique en partie cette forte immunogénicité. Par ailleurs, il a été démontré en 1997 par Baschmann que ces antigènes répétés peuvent être lymphocyte-T indépendants et sont par conséquent capables d'induire directement des lymphocytes

B (LB) (Bachmann et al. 1997). Les VLP sont également aisément pris en charges par les cellules dendritiques.

A ce jour, quelques vaccins de ce type sont commercialisés comme par exemple les vaccins humains Gardasil (HPV) et le Sci-B-vac de troisième génération (HBV). En tout une trentaine de vaccin VLP vétérinaires ou humains ont été commercialisés et de nombreux autres sont actuellement en cours d'essais cliniques (Qian et al. 2020).

Parmi ceux-ci, l'un apparaît comme particulièrement important en santé publique : le vaccin Mosquirix destiné à la lutte contre le paludisme. Bien que quelques vaccins anti-parasitaires vétérinaires sont disponibles sur le marché (Bourdoiseau 2017), aucun vaccin anti-parasitaire humain n'est à ce jour commercialisé. Ce défi constant pourrait bien être relevé après trois décennies de recherche intensive avec le vaccin VLP Mosquirix qui reste le premier et unique vaccin à avoir permis une réduction significative du paludisme chez l'enfant (Chan et al. 2019; Wilby et al. 2012). Une phase pilote de grande ampleur est cours de lancement depuis avril 2019 dans trois pays africains chez les enfants de moins de deux ans. Chez le porc, le vaccin Porcilis PCV® commercialisé contre le circovirus porcin de type 2 est constitué de VLP obtenus à partir de la protéine de capsid du PCV2 (synthétisée dans un système hétérologue VP2) (Pan, He, and Huang 2008).

(4) Vaccins sous-unitaire protéique

Un vaccin sous-unitaire protéique est un vaccin pour lequel les protéines antigéniques ont été obtenues par purification de protéines à partir de pathogènes entiers ou bien par génie génétique recombinant.

1. Par exemple, le vaccin acellulaire contre la coqueluche est obtenu à partir de la purification d'une à cinq protéines du pathogène pertuisis bacillus (Ausiello et al. 2019).
2. Les vaccins protéiques nécessitent parfois des adaptations afin d'être plus immunogènes et efficaces : vectorisation avec protéines porteuses, lipidation, protocole vaccinal hétérogène de type prime/boost ...

Une protéine recombinante est une protéine exprimée *in vitro* par un système d'expression cellulaire (bactérie, levure, baculovirus, cellule eucaryotes...) suite à l'insertion dans celui-ci d'un plasmide contenant le gène qui code la protéine. Ces systèmes servent ensuite de base au vaccin protéique recombinant (Cox 2012). Comme exemple marquant de cette dernière décennie, l'équipe de Rino Rappuoli a développé un vaccin protéique contre le Ménégo-coque de sérogroupe B nommé 4CMenB (Serruto et al. 2012). Chez le poulet, un des autres exemples, est l'utilisation de protéines recombinantes de *Campylobacter* associées à un vaccin à ADN pour induire une protection partielle contre la colonisation de *Campylobacter* chez le poulet (Meunier et al. 2017). Chez le porc, nous pouvons retrouver comme exemple les vaccins commercialisés Porcilis Pesti® contre la peste porcine classique (glycoprotéine E2 recombinante du virus la peste porcine pour en faire un vaccin marqueur) (Ahrens et al. 2000) et Circoflex® contre le cicovirus porcin de type 2 (production de la protéine recombinante de capsid ORF2) (Fachinger et al. 2008).

(5) Vaccins vecteurs vivants recombinants

Un vaccin à base de vecteur vivant recombinant est un vaccin qui repose sur la cargaison d'une ou de plusieurs protéines antigéniques par un vecteur vivant (souvent viral) qui est à la fois non modifié et non lié à la maladie traitée (Rauch et al. 2018). Le (ou les) gène(s) codant la (ou les) protéine(s) vaccinale(s) a (ont) été inséré(s) dans le génome du vecteur pour que la ou les protéines vaccinales soit (soient)

produite(s) en même temps que la production du vecteur. Celui-ci peut être répliquatif ou bien avoir une réplication avortée directement après l'infection. La modularité possible avec ce type de vaccin offre de nombreux avantages. Par ailleurs, l'absence de la plus grande partie du génome viral permet d'éviter tout phénomène de réversion, ce qui en fait un vaccin sûr sur ce point. Pour les vecteurs viraux vivants on retrouve par exemple des dérivés de rétrovirus, des virus herpès simplex, des adenovirus, des poxvirus et pour les vecteurs bactériens on a par exemple *E. coli*, *Mycobacteria*, *Shigella* ou *V. cholerae*.

L'un des principaux intérêts de ce type de vaccination sous-unitaire est son efficacité pour générer une réponse lymphocyte-T cytotoxique. L'antigène peut être délivré à la voie de présentation antigénique de façon à ce qu'il soit apprêté au niveau du CMH-I (Liu 2010). Une réponse de type humorale est également induite.

Chez le porc, ce type de stratégie a par exemple été testée contre le circovirus porcin de type 2 avec par exemple un virus de pseudorage porcine (PRV) recombinant atténué (exprimant la protéine de fusion ORF1-ORF2 du virus) (Ju et al. 2005).

d) Vaccins à ADN

La découverte faite par Wolf et al., en 1990, a été les prémices de la vaccination à ADN. En effet, cette équipe avait démontré que le fait d'injecter un ADN plasmidique nu dans le muscle d'une souris, pouvait permettre chez celles-ci l'expression de la protéine encodée par ce même plasmide (Wolff et al. 1990; Wolff et al. 1992). Ce principe est repris peu après par Ulmer et al. qui démontre toujours sur un modèle murin en 1993 qu'il est possible d'induire une réponse immunitaire spécifique suite à l'injection d'un plasmide à ADN codant pour des protéines immunogéniques du virus influenza (Ulmer et al. 1993). Le concept de vaccination à ADN était alors né. De nombreuses études ont ensuite montré qu'il était possible d'induire une immunité protectrice contre divers micro-organismes (virus, bactéries ou parasites) (Ivory and Chadee 2004). Dès le début des années 2000, des essais cliniques ont été réalisés chez

l'homme de façon à pouvoir traiter différents types de maladies infectieuses (Shams 2005). Par ailleurs, à cette même période, des essais de vaccination ont également été réalisés sur des animaux de rente (Dhama et al. 2008; Dufour 2001; Shams 2005; van Drunen Littel-van den Hurk, Babiuk, and Babiuk 2004).

Les vaccins à ADN correspondent à des plasmides vecteurs ayant été développés pour être produits par répllication dans des cellules procaryotes (bactéries). Après la production bactérienne, les plasmides purifiés et exempts d'endotoxine peuvent se retrouver sous trois formes : super-enroulées, relâchées et linéaires. Les protéines vaccinales codées par les plasmides doivent pouvoir être exprimées de façon optimale dans des cellules eucaryotes (hôte recevant le vaccin) sans toutefois que les plasmides s'y répliquent (Williams 2013) Les vecteurs comprennent, à minima, les éléments suivants en plus du transgène codant la protéine vaccinale : une origine de répllication permettant de bons rendements de production des plasmides en production bactérienne, un gène de résistance à un antibiotique pour la sélection des clones bactériens transfectés, un promoteur fort pour l'expression du transgène dans les cellules mammaliennes hôte ainsi qu'un signal de terminaison/polyadénylation 3' du BGH (hormone de croissance bovine) pour assurer la stabilisation du transcrit ARNm (Gurunathan et al. 2000; Ismail, Allaudin, and Lila 2012; Feltquate 1998; Klinman, Ishii, and Verthelyi 2000).

Toute expression d'ADN plasmidique nécessite une entrée efficace dans les cellules eucaryotes. Il a été suggéré qu'elle pouvait se faire par l'intermédiaire de mécanismes actifs nécessitants un ou plusieurs récepteurs (Budker et al. 2000; Levy et al. 1996; Wheeler et al. 2006). Pour les kératinocytes, il est apparu que des mécanismes de macropinocytose pouvaient être impliqués dans l'internalisation de l'ADN (Basner-Tschakarjan et al. 2004). Par ailleurs, une étude suggère l'implication d'un mécanisme dépendant de certaines séquences qui seraient spécifiques du type cellulaire (Lehmann and Sczakiel 2005).

L'autre étape majeure reste le transport de l'ADN vaccinal vers le noyau afin que celui-ci y soit transcrit. Ceci suggère que l'ADN, une fois internalisé, doit pouvoir être capable de quitter la vésicule d'endocytose, de traverser le cytoplasme et de passer l'enveloppe nucléaire. Quelques minutes après son injection, l'ADN se retrouve dans le lysosome (Wattiaux et al. 2000); une toute petite partie de l'ADN est relarguée dans le cytoplasme, alors que la majorité est dégradée (Lechardeur, Verkman, and Lukacs 2005) par des enzymes DNAses libres (Lechardeur et al. 1999). L'obstacle majeur de l'entrée des plasmides dans le noyau est l'enveloppe nucléaire. Environ 1/1000-1500 des molécules de plasmides injectés directement dans le cytoplasme arrivent dans le noyau via les complexes du nucléopore (Dean, Strong, and Zimmer 2005; Dowty et al. 1995) et sont transcrites (Lechardeur and Lukacs 2006). La protéine codée par le plasmide est alors synthétisée et peut être présentée comme une protéine intracellulaire par le CMH de type 1. D'un autre côté, la protéine pourra être sécrétée par la cellule et prise en charge par une cellule présentatrice d'antigènes. Dans ce cas, cette protéine sera dégradée et présentée par le CMH-II impliqué dans la génération d'une réponse de type humorale (Corr et al. 1996; Corr et al. 1999).

Les vaccins ADN peuvent présenter de nombreux avantages comme présenté dans le **Tableau 1** ci-dessous.

Tableau 1 : Avantages de la vaccination ADN comparé aux vaccins conventionnels. Adapté et traduit de plusieurs publications (Xu, Yuen, and Lam 2014; Yang et al. 2014).

Catégorie	Caractéristiques
Design	Design rapide et flexible. Vaccin peut être développé pour de multiple agents infectieux avec un même vecteur plasmidique.
Production	Rapide et reproductible. Production à large échelle peu coûteuse. Les protéines vaccinales sont produites par l'hôte vacciné lui-même, ce qui permet leurs repliements comme lors de l'infection du virus ciblé.
Stabilité	Meilleure stabilité que pour les vaccins protéiques ou vivants atténués. Thermostable, ne requiert pas une chaîne stricte du froid. Facilité de transport et de stockage.
Sécurité	Ne requiert pas la culture d'agents infectieux dangereux. Aucun risque de réversion vers la forme virulente. Pas d'effet clinique adverse ni de toxicité. Pas d'anticorps anti-ADN, ce qui permet une administration répétée.
Réponse Immune	Induit une réponse à la fois cellulaire et humorale tout comme les vaccins vivants atténués.

D'un point de vue pratique, la construction d'un tel vaccin est relativement facile, rapide et peut être faite à moindre coût avec une stabilité assez forte sans maintien de la chaîne du froid. D'un point de vue immunologique, la vaccination ADN a la capacité de stimuler à la fois la réponse immunitaire humorale et cellulaire (Gurunathan, Klinman, and Seder 2000; Liu 2003; Oshop, Elankumaran, and Heckert 2002). De plus, la vaccination ADN est capable de stimuler la réponse immunitaire chez le nouveau-né en évitant la neutralisation par l'immunité passive d'origine maternelle (Fischer et al. 2003; van Rooij et al. 2006). Ce qui fonctionne pour les petits rongeurs ne fonctionne souvent pas aussi bien pour les mammifères de grande taille ; il faut donc élaborer des stratégies visant à améliorer la réponse immunitaire et la protection induites par le vaccin à ADN plasmidique chez les mammifères de grande taille.

La voie d'administration la plus commune est la voie parentérale qui consiste à injecter le vaccin ADN avec une aiguille par la voie intramusculaire (IM), intradermique (ID) ou sous-cutané (Suschak, Williams, and Schmaljohn 2017; Faurez et al. 2010). Dans ce cas, l'ADN vaccinal est pris en charge par les myocytes (Marino et al. 2011) et/ou les kératinocytes (Hengge et al. 1995) proches du site d'injection ou bien par des CPAs. Par ailleurs les vaccins ADN doivent échapper aux dégradations par l'endosome et le lysosome et survivre aux nucléases cytosoliques de façon à arriver sous forme intacte dans le noyau (Suschak, Williams, and Schmaljohn 2017).

Les progrès en vaccination à ADN ont permis depuis 2005 la mise sur le marché aux Etats-Unis ou au Canada de trois vaccins à ADN vétérinaires destinés aux mammifères ou aux poissons (West Nile Innovator, Canine Melanoma Vaccine, Apex-IHN) (Dalmo 2018). Par ailleurs, un vaccin à ADN a obtenu son autorisation d'utilisation en Europe depuis 2017, le vaccin contre la maladie pancréatique du saumon (Xu et al. 2017).

C. Introduction - Voie mucoale et vaccins mucoaux

1. La voie mucoale

La plupart des vaccins est administrée par la voie parentérale. Or la plupart des pathogènes entrent dans l'organisme par la voie mucoale. Une des pistes de développement de nouveaux vaccins ou d'amélioration des vaccinations déjà étudiées serait d'induire une réponse immunitaire localement au niveau des muqueuses, et cela à plus forte raison pour améliorer certains vaccins qui n'ont rien donné pour la voie systémique.

Les tissus muqueux sont compartimentés selon deux types de sites : les sites inducteurs et les sites effecteurs. On parle de système inducteur/effecteur. **Les sites inducteurs** correspondent aux sites muqueux où l'antigène est localement capturé et échantillonné par les cellules M (microfold) ou bien pris en charge par les cellules CPA. Les cellules M sont des cellules spécialisées qui permettent le passage d'antigènes à travers la barrière épithéliale où ils vont rencontrer les cellules dendritiques sous-épithéliales puis être présentés localement dans les zones de cellules T au sein des tissus lymphoïdes mucoaux organisés (Azizi et al. 2010; Neutra 1999; Alpan, Rudomen, and Matzinger 2001). Il existe plusieurs stratégies d'échantillonnage selon les barrières épithéliales mucoales rencontrées par l'antigène (cavité orale, nasale ou vaginale et surfaces respiratoires) (**Figure 11**). Elles impliquent toutes des cellules dendritiques (CD) qui peuvent soit : (1) résider sous les épithéliums, (2) migrer dans la sous-couche épithéliale ou alors (3) étendre leurs dendrites dans la lumière pour y capturer les antigènes (**Figure 11**) (Neutra and Kozlowski 2006).

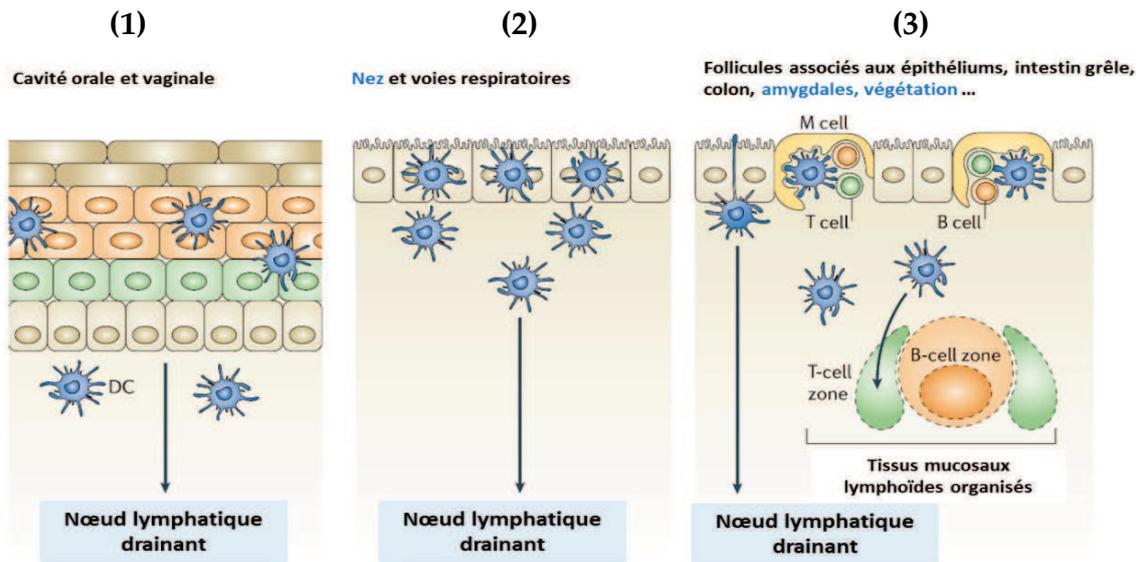


Figure 11. Echantillonnage des antigènes au niveau des sites inducteurs mucosaux (Neutra and Kozlowski 2006).

Ces mécanismes ont pour finalité la présentation de l'antigène sur un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de façon à activer les lymphocytes T-auxiliaires naïfs et à enclencher de ce fait l'induction d'une immunité mucosale sur des sites distants dit « **effecteurs** » (Brandtzaeg et al. 2008). L'immunité mucosale implique également de nombreux sites inducteurs lymphoïdes secondaires appelés **tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALTs)** qui jouent un rôle crucial dans ce type de réponse

La Société d'Immunologie Mucosale a approuvé et validé en 2007 l'adoption d'une nomenclature standardisée permettant de définir les différents compartiments mucosaux lymphoïdes secondaires (Brandtzaeg et al. 2008). Les tissus lymphoïdes associés sont les suivant (**Figure 12** pour le porc) :

- au Nasopharynx : le **NALT** qui comprend l'anneau de Waldeyer (chez l'homme), la cavité nasale, les amygdales et les végétations.
- au système Broncho-alvéolaires : le **BALT**
- au système Gastrointestinal : le **GALT** qui comprend la plaque de Peyer (**PP**), les ganglions mésentériques (**MLN**), les follicules lymphoïdes isolés (**ILFs**), la Lamina Propria (**LP**), l'appendice...
- à la conjonctive : le **CALT**
- au larynx : le **LALT**
- au conduit lacrymal : le **LDALT**
- à la Glande Salivaire : le **SGALT**

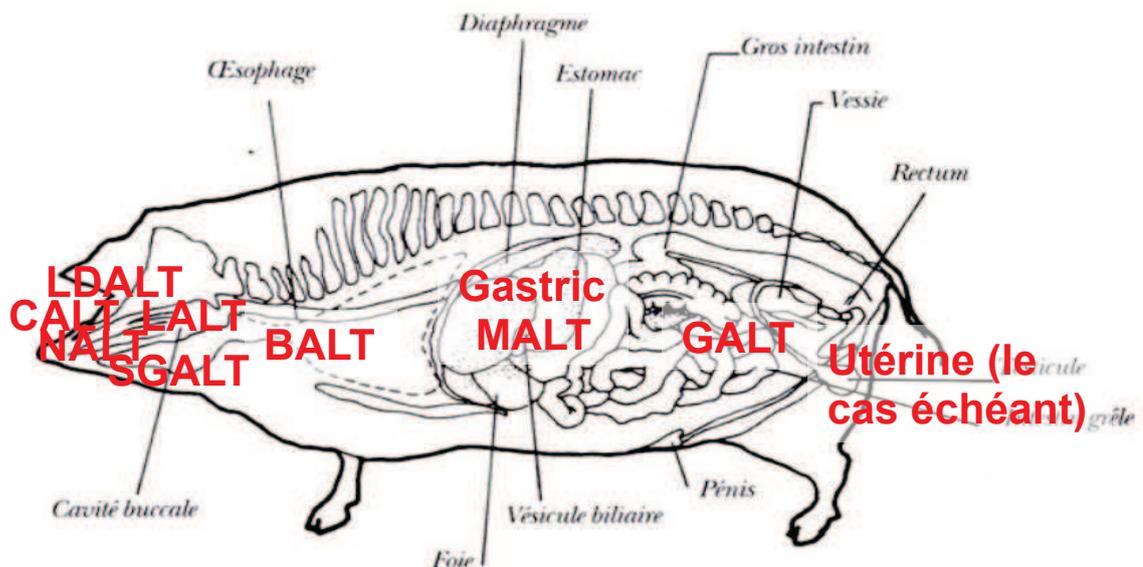


Figure 12. Les différents compartiments mucosaux lymphoïdes chez le porc.

Les **sites effecteurs** quant à eux, sont les sites muqueux distants où les cellules effectrices vont établir la réponse immunitaire adaptative, principalement de type humorale, et participer à des mécanismes tels que l'extravasation, la rétention et la différenciation cellulaire (Brandtzaeg et al. 2008). Le système inducteur/effecteur de la réponse immunitaire, a été mis à profit pour établir des stratégies de vaccination muqueuse. Ce système vous est présenté ci -dessous de façon schématique (**Figure 13**).

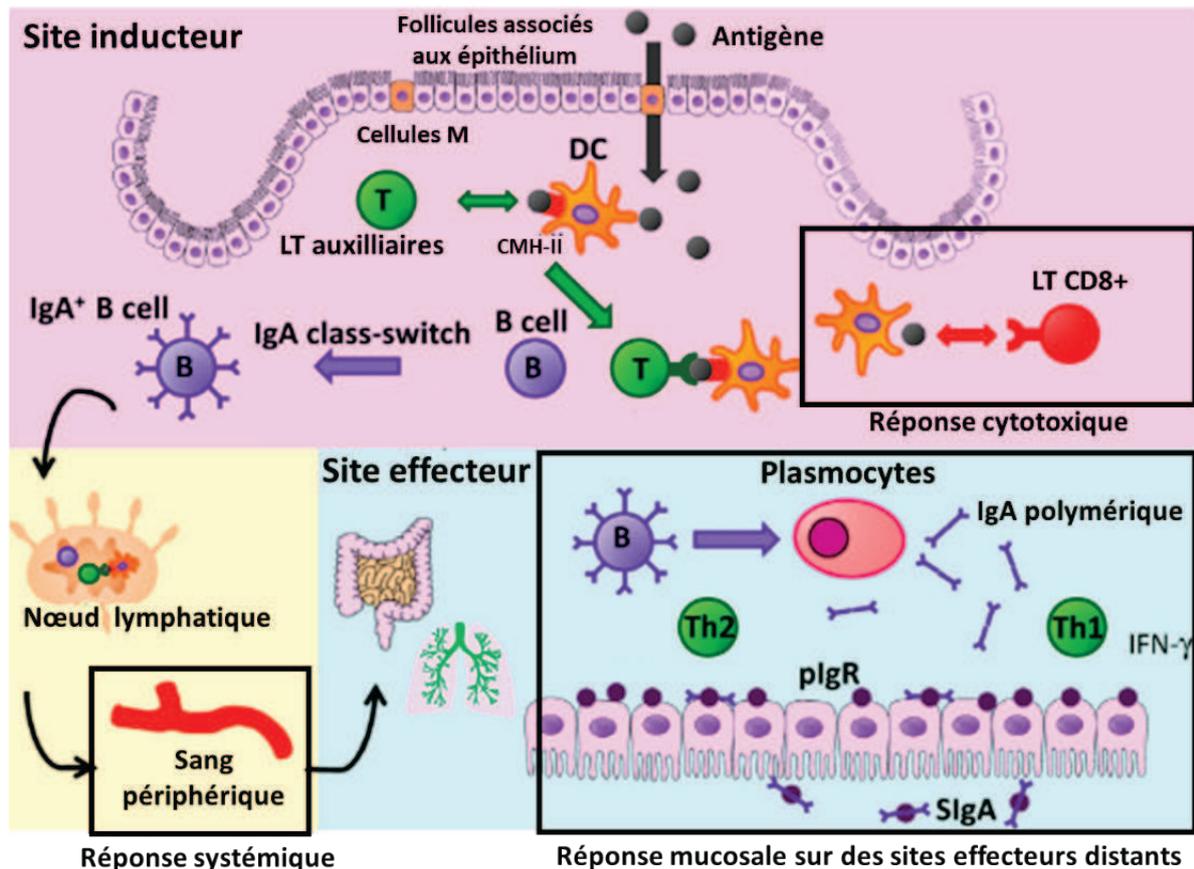


Figure 13. Représentation schématique du système inducteur/effecteur impliqué dans la réponse muqueuse immunitaire. Schéma modifié et adapté de (Lamichhane, Azegamia, and Kiyonoa 2014). Une fois administrés par voie muqueuse, les antigènes sont pris en charge par les muqueuses (lumière tube digestif, cavité nasale, conduit lacrymal etc..) pour être échantillonnés au niveau des sites inducteurs (par les cellules M et les follicules associés aux épithéliums (FAE)). La région du dôme subépithélial, qui se trouve sous le FAE, contient des cellules présentatrices d'antigènes. Elles peuvent capturer et présenter les antigènes aux lymphocytes T CD4+ ou CD8+ pour l'initiation de réponses immunitaires spécifiques à l'antigène. Des cellules B sont activées sur le site inducteur et deviennent des cellules productrices d'IgA suite à une commutation de classe, et vont rejoindre les ganglions lymphatiques par le sang périphérique puis aller vers les sites effecteurs pour s'y différencier en cellules plasmiques qui vont y sécréter des anticorps IgA. Ces anticorps sont ensuite endocytés grâce au récepteur pIgRs, pour être transportés vers les surfaces apicales avant d'être clivés en IgA sécrétoires (SIgA).

Les deux voies mucosales les plus prédominantes sont la voie orale et la voie intranasale. La voie orale permet, suite à l'induction des GALTs (*e.g.* Plaque de Peyer, follicules lymphoïdes isolés et nœuds lymphatiques mésentériques), l'obtention d'une réponse mucoale sur les sites distants du tractus gastro-intestinal et des glandes salivaires et mammaires (**Figure 14**) (Lycke 2012; Lamichhane, Azegamia, and Kiyonoa 2014). La voie intranasale, après induction des NALTs (au niveau de la cavité nasale, des amygdales ou des végétations), initie plutôt une réponse effectrice localisée au niveau des tractus respiratoire, gastrique et génital en plus de la cavité nasale en elle-même (**Figure 14**) (Lycke 2012).

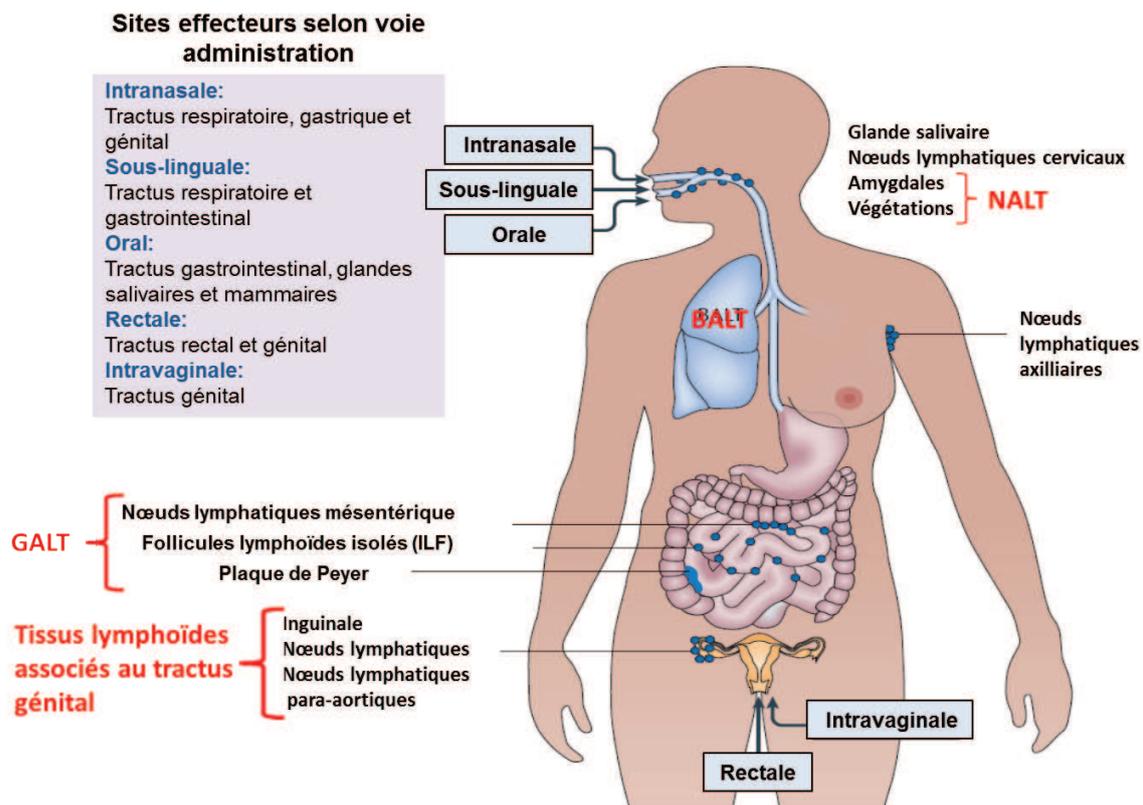


Figure 14. Les différents modes d'administration par la voie mucoale et leurs sites MALTs associés (Lycke 2012).

Le tableau ci-dessous vous présente les différents avantages mais aussi les inconvénients des différentes voies mucosales possible (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Récapitulatif sur les avantages et les inconvénients des différentes routes d'immunisation mucoale. Tableau extrait et traduit de l'article « Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells ». (Azizi et al, 2010)

	<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
<i>Voie intranasale</i>	Augmente la réponse cellulaire et humorale au niveau systémique et sur des sites muqueux locaux. Facile à administrer. Ne requiert pas d'aiguille ou seringues.	Manque d'adjuvants forts. Effet secondaire à mieux connaître : risques de passage de la barrière hémato-encéphalique.
<i>Voie orale</i>	Augmente la réponse systémique et mucoale. Sûr, facile à administrer, ne nécessite pas de professionnel de santé. Facilité de passer à une grande échelle (augmentation de la dose).	Parfois induction d'une tolérance à un antigène donné. Requiert une grande quantité d'antigène. Manque de stabilité des antigènes à cause des conditions extrêmes imposées par le tractus gastrointestinal.
<i>Voie par inhalation</i>	Augmente la réponse systémique et mucoale. Administration sous forme de poudre ou liquide.	Matériel spécifique nécessaire. Difficile à administrer.
<i>Voie sous-linguale</i>	Antigène absorbé rapidement. Induction de réponse immunitaire systémique. Pas de seringues ou aiguilles nécessaires.	Difficulté sur la formulation de l'antigène. Manque d'adjuvants forts.
<i>Voie génitale</i>	Induction de réponse humorale systémique. Induction de réponse mucoale dans les sécrétions génitales.	Administration peu pratique chez l'homme. Chez la femme variabilité en fonction du cycle menstruel.
<i>Voie rectale</i>	Induction d'anticorps spécifiques et de réponse cellulaire dans les sécrétions mucoales chez les petits animaux.	Niveaux IgG et IgA modestes chez les humains. Difficulté pour quantifier les cellules effectrices. Difficulté sur la route d'inoculation.

2. Vaccins mucosaux commercialisés en 2019

Il n'existe à ce jour qu'une poignée de vaccins mucosaux commercialisés comme indiqué dans le **Tableau 3**. Ce nombre limité peut s'expliquer par le manque de systèmes efficaces pour délivrer et protéger l'antigène vaccinal, pour assurer leur capacité adjuvante. Les vaccins mucosaux doivent aussi faire face au fait que les muqueuses permettent naturellement d'induire une certaine tolérance immune (Miquel-Clopes et al. 2019; Azizi et al. 2010). Les vaccins mucosaux humains actuellement commercialisés sont pour la plupart des vaccins vivants atténués ou inactivés administrables par la voie orale. Il n'existe qu'un seul vaccin humain inoculable par spray en intranasal : le FluMist contre l'*influenza* de type A ou B (**Tableau 3**). Chez les animaux, on dénombre quatre vaccins mucosaux. Le RABORAL-V-RG, un vecteur recombinant du virus de la vaccine protégeant contre le virus de la rage suite à une inoculation sous forme d'appât. Les trois autres vaccins sont de type vivant atténué et sont prévus pour être administrés par la voie nasale. Notons que la vaccination avec le vaccin Avinew Néo peut également se faire oralement ou par la voie oculaire (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Vaccin mucosaux commercialisés en usage clinique et vétérinaire en 2019. Tableau traduit de (Miquel-Clopes et al. 2019)

<i>Hôte vaccinal</i>	<i>Pathogène</i>	<i>Nom du vaccin</i>	<i>Voie d'administration</i>	<i>Type de vaccin</i>
<i>Humain</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	Dukoral	Orale (liquide)	Inactivé (sous unité B de la toxine cholérique)
		ShanChol, Euvtchol	Orale (liquide)	Inactivé
		Vaxchora	Orale (liquide)	Vivant atténué
	Influenza type A et B	FluMist	Intranasale (spray)	Vivant atténué
	Poliovirus	Biopolio B1/3, OPV...	Orale (liquide)	Vivant atténué
<i>Animaux</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Typhi Vivotif	Orale	Vivant atténué
	Adenovirus	Usage militaire	Orale (tablettes)	Vivant atténués
	Virus de la rage	RABORAL-V-RG	Orale (Appâts)	Recombinant (vecteur viral de la vaccine)
	Virus para-influenza bovin de type 3 et Virus respiratoire syncytial bovin	Rispoval	Intranasal (spray)	Vivant atténué
	<i>Bordetella bronchiseptica</i> et Virus parainfluenza canin	Novibac	Intranasal (gouttes)	Vivant atténué
	Virus de la maladie de Newcastle	Avinew NeO	Orale, oculaire ou nasale (spray, eau boisson ou gouttes)	Vivant atténué

3. Systèmes nanoparticulaires utilisés pour la voie intranasale

a) Pourquoi utiliser des systèmes nanoparticulaires ?

L'épithélium nasal est équipé d'un large répertoire de cellules immunitaires disponibles pour répondre à toute infection étant donné qu'il s'agit de la principale voie d'entrée des pathogènes. Vacciner par voie intranasale présente principalement un intérêt par le fait qu'il est possible d'induire une réponse qui soit à la fois systémique et mucoale (sécrétion d'IgA locales sur les sites effecteurs distants associés aux NALTs) (Slutter et al. 2010). Les vaccins sous-unitaires intranasaux sont confrontés aux nombreuses limites inhérentes aux muqueuses nasales étant donné qu'elles servent en premier lieu de barrière de l'immunité innée. Celles-ci présentent bien souvent l'inconvénient de causer la dégradation des préparations vaccinales (protéique, ADN plasmidique...) en raison des conditions acides (pH faible) de la muqueuse nasale, de la présence de peptidases, de protéases ou bien d'enzymes (cytochrome P450 dépendant de la monooxygénase, aldéhyde déhydrogénase) (Casettari and Illum 2014). Par ailleurs, les défenses mécaniques (mucocils, mucus, barrière épithéliale...) causent une clairance rapide des antigènes vaccinaux et donc une faible absorption de ces antigènes au niveau des épithéliums nasaux (Sharma et al. 2015). Ainsi, les vaccins sous-unitaires peinent à accéder de façon efficace et intacte aux sites lymphoïdes inducteurs (NALTs). Il en résulte une immunogénicité insuffisante (Hobson 2003) et il est de ce fait nécessaire de contourner ces obstacles et de s'adapter à ces voies de protection naturelles pour envisager ce type de vaccination. De par leurs propriétés immuno-adjuvantes et leurs capacités à permettre une délivrance de l'antigène vaccinal prolongé, les systèmes nano- ou micro-particulaires ont rapidement émergés pour solutionner ce problème (Slutter et al. 2010). La **figure 15** ci-dessous résume les principales utilisations possibles de ces systèmes nanoparticulaires en vaccination sous-unitaire.

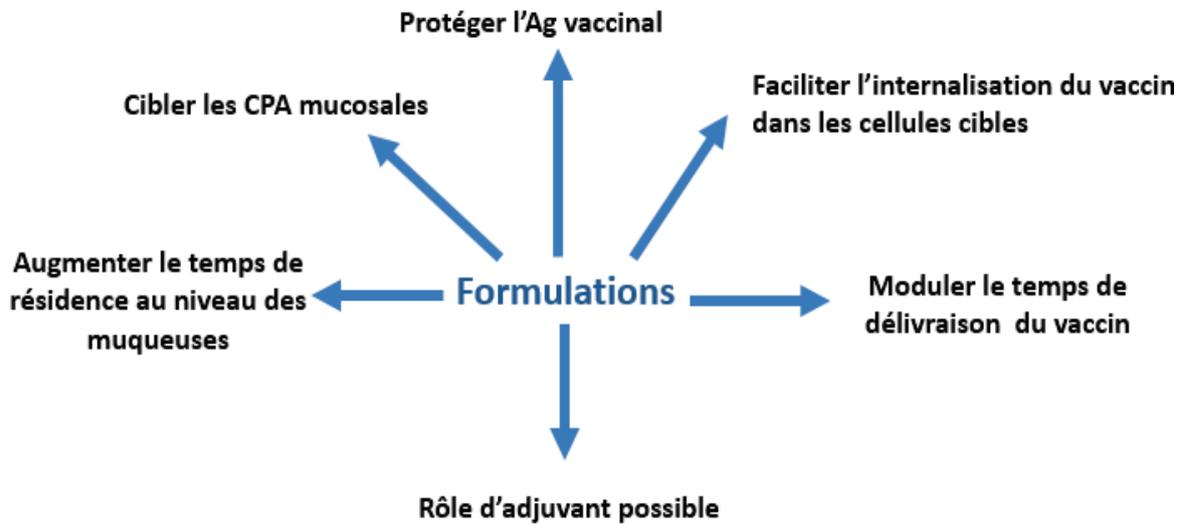


Figure 15. Les systèmes nanoparticulaires : différents rôles possibles en vaccination d'après (Xu, Yuen, and Lam 2014).

Par définition, les nanoparticules sont des structures solides ayant une taille comprise entre 10 et 1000 nm (Soppimath et al. 2001) et qui sont constituées d'un matériau qui peut être soit organique (polymères synthétiques ou naturels, micelles, liposomes, dendrimères) soit inorganique (core métallique, silice mésoporeuse) (Richards, Maruani, and Chudasama 2017). Dans ce chapitre nous décrirons uniquement celles qui sont les plus couramment utilisées en vaccination intranasale. (Richards, Maruani, and Chudasama 2017).

La grande modularité et diversité de ces nanomatériaux fait que ceux-ci sont développés et utilisés dans la plupart des domaines de la biomédecine (délivrance de médicaments, ingénierie tissulaire, délivrance de gènes, protéines ou vaccins, application en diagnostic par imagerie ...) et possèdent des applications dans la plupart des domaines industriels (agro-alimentaire, chimique, textile, cosmétique...).

Il existe différents types de nanoparticules (Soppimath et al. 2001; Vasir and Labhasetwar 2007) :

- **Les nanocapsules** : un système vésiculaire dans lequel l'antigène vaccinal est confiné et encapsulé dans une cavité recouverte par une unique membrane polymérique ;
- **Les nanosphères** : un système de matrice dans lequel l'antigène est dispersé physiquement de façon uniforme ;
- **Les polyplexes** : obtenus par condensation et complexation de l'antigène avec des polymères ;
- **Les nanoparticules adsorbées** : pour lesquelles l'antigène vaccinal est adsorbé à la surface de nanoparticules préformées.

En vaccinologie, les nanovecteurs doivent pouvoir répondre au dilemme suivant : présenter une immunogénicité maximale tout en étant sûrs et bien tolérés. De façon générale, le design d'un vaccin intranasal avec des nanoparticules vise à obtenir un vaccin se rapprochant le plus possible de **la taille, de la géométrie, de la cinétique et des motifs moléculaires des pathogènes** (Bachmann and Jennings 2010). La taille des nanoparticules joue un rôle clé dans la biodistribution de vaccins formulés (Acharya and Sahoo 2011) et reste un facteur important pour l'internalisation de l'antigène vaccinal par les CPA et les cellules endothéliales mais aussi pour assurer un adressage correct au niveau intracellulaire (Danhier et al. 2012). De plus, la taille impacte la charge de celles-ci et donc leurs propriétés physicochimiques ou interactions avec les mécanismes biologiques. La notion de taille optimale de nanoparticules fait l'objet de débats puisqu'il est considéré que les CPA sont adaptées pour interagir avec des pathogènes de tailles très variées allant des virus (20-100nm) aux bactéries et cellules (de l'ordre du μm) (Danhier et al. 2012). La taille optimale d'une nanoparticule serait en fait une histoire de compromis puisque celles de **petites tailles sont mieux internalisées** tandis que celles **plus grandes** disposent d'une **charge**

de surface (conséquences physicochimiques et biochimiques) et d'une **hydrophilie plus favorables** à la bonne libération de l'antigène vaccinal dans les cellules (Acharya and Sahoo 2011)). Globalement celle-ci se situerait aux alentours de 100-200 nm. Pour assurer une bonne prise en charge par les cellules microfold (M) et les CPA au niveau des surfaces mucoales, l'utilisation de nanoparticules d'une taille inférieure à 500 nm est recommandée (Bachmann and Jennings 2010).

Les possibilités d'adaptations structurelles de nanoparticules sont multiples comme indiqué dans la **Figure 16** (Sharma et al. 2015).

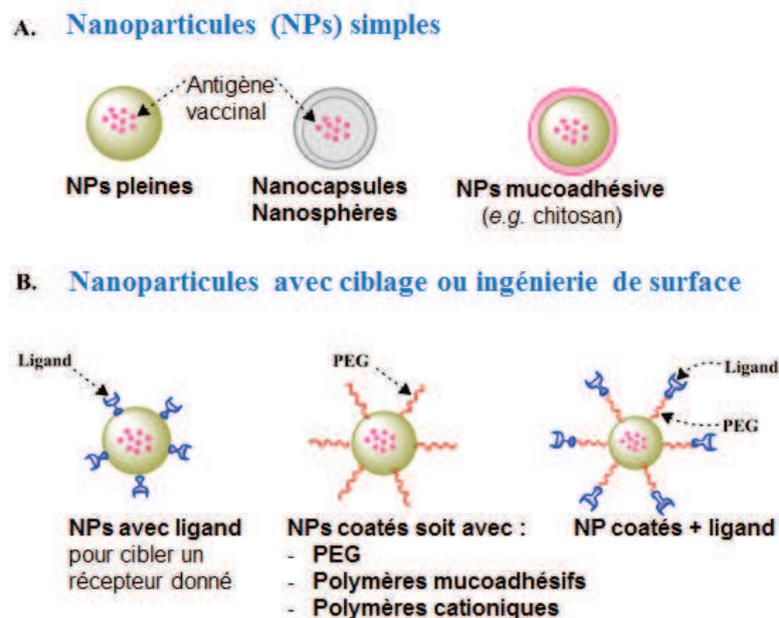


Figure 16. Différents types de nanoparticules comme vecteurs vaccinaux mucoaux. Adapté et traduit de (Sharma et al. 2015).

Les nanovecteurs ont pour fonction d'assurer une bonne délivrance des antigènes vaccinaux de différentes natures dans le cytosol. Une fois internalisés, les nanovecteurs assurent de nombreuses fonctionnalités dans le cytosol de la cellule (Vasir and Labhasetwar 2007; Jeong, Kim, and Park 2007) : i) Echappement du compartiment endosomal ; ii) Délivrance de l'antigène vaccinal à côté du site ciblé (souvent cytoplasme ou noyau) ; iii) Transport au niveau cytosolique ; iv) Capacité à

se décomplexer et de se désassembler sur le site cible en fonction de certains changements intracellulaires (pH, potentiel redox ...) de façon à y délivrer l'antigène vaccinal de façon contrôlée ; v) Transport actif vers le noyau (*e.g.* pour les vaccins ADN).

b) Nanoparticules polymériques les plus couramment utilisées en vaccination IN

(1) Polymères polysaccharidiques

(a) Le chitosan

Le chitosan est un biopolymère cationique naturel obtenu par la N-désacétylation partielle de la chitine, un composant majeur de l'exosquelette d'insectes, de crustacés ou de champignons (Illum et al. 2001). Comme nous pouvons le voir dans le **Tableau 4**, de nombreuses études se sont intéressées aux nanoparticules de chitosan en tant que candidat potentiel pour la délivrance de vaccins intranasaux. Cet intérêt se justifie par les propriétés avantageuses de celles-ci pour la voie mucale comme montré dans la **Figure 17**.

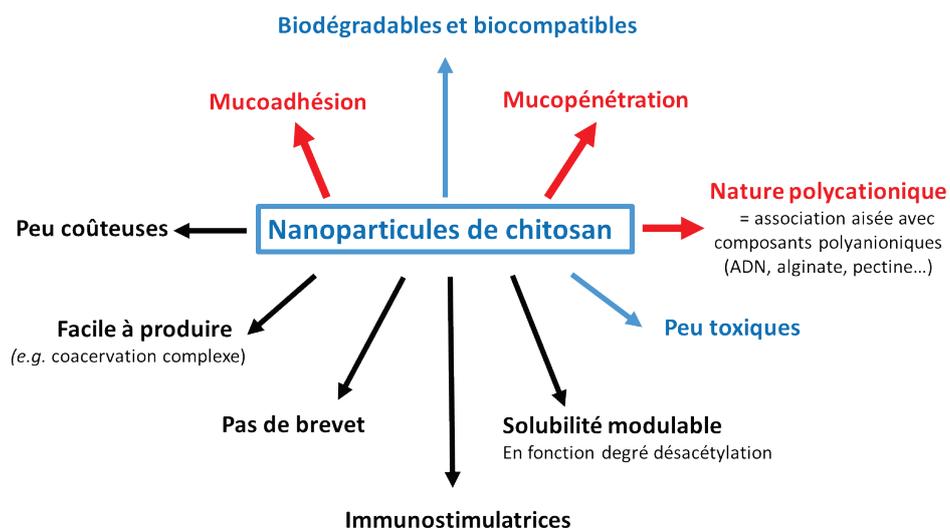


Figure 17 : Propriétés importantes des nanoparticules de chitosan pour une utilisation en intranasal.

Le chitosan et ses dérivés ont été majoritairement étudiés sur modèle murin pour les études concernant la voie intranasale. Au début des années 2000, Illum *et al* rapportent que plusieurs études menées dans leur équipe (Cahill et al. 1993; Illum et al. 2001; Bacon et al. 2000) ont mis en évidence le fait que l'administration d'antigènes vaccinaux (*e.g. pertussis* ou *influenza I*) associés au chitosan pouvait permettre l'induction d'une meilleure réponse en IgG sériques et IgA locales comparé aux souris inoculées avec l'antigène seul. Ces mêmes souris vaccinées en IN ont été protégées suite aux épreuves virales (Illum 2002; Garg et al. 2010; Alpar et al. 2005). En parallèle, il a été montré que le chitosan peut permettre le ralentissement de la clairance mucociliaire nasale tout en étant associé à un temps de contact prolongé avec les NALTs (Aspden et al. 1997; Soane et al. 2001), ce qui favoriserait l'absorption du vaccin au niveau de la muqueuse nasale. L'efficacité et les propriétés des nanoparticules de chitosan dépendent de paramètres très divers comme le poids moléculaire, le degré de désacétylation, le ratio polymère/antigène, le type de chitosan utilisé, le pH, la présence d'additifs, leur consistance, la nature de l'antigène vaccinal, l'utilisation de formes dérivées du chitosan et leurs techniques de fabrication (voir la revue détaillée de (Mao, Sun, and Kissel 2010)). En conséquence, il y a une grande hétérogénéité au niveau des nanoparticules de chitosan décrites pour la vaccination IN dans la littérature, ce qui peut parfois compliquer leurs comparaisons. Ceci s'illustre par exemple dans le **Tableau 4** qui rassemble les études *in vivo* pour la voie intranasale menées récemment avec le chitosan. Nous pouvons y constater une grande diversité dans la taille des nanoparticules (de 80 nm jusqu'à 680 nm – 2 µm) utilisées, ce qui implique des modes différents d'endocytoses et de prises en charge par les cellules M ou CPA. On y constate également une grande variation au niveau des potentiels *zeta* (tous cationiques mais allant de + 1,69 mV à + 45 mV), du type de vaccin étudié mais aussi et surtout de leur mode d'administration (quantité en microgramme inoculée pour un animal donné, nombre d'inoculations, présence/absence d'anesthésie, méthode d'inoculation en IN (pipette, goutte à goutte, aérosols)).

Les études *in vivo* rapportées dans le **Tableau 4** ont mis en évidence que les nanoparticules de chitosan peuvent être de bons adjuvants immunitaires pour la voie intranasale (Bernocchi, Carpentier, and Betbeder 2017). Il a été observé et confirmé que la nanovectorisation d'antigènes vaccinaux avec le chitosan permet globalement l'obtention d'une meilleure réponse systémique humorale (IgG sériques) et mucoale (IgA locales des sites effecteurs) et ce aussi bien en vaccination sous-unitaire protéique qu'en vaccination à ADN. Ceci étaye et rejoint les conclusions d'Illum *et al* mentionnées dans le paragraphe précédent (Cahill et al. 1993; Illum et al. 2001; Bacon et al. 2000).

Le **Tableau 4** mentionne aussi un certain nombre d'études dans lesquelles l'efficacité du chitosan en intranasal est comparée à celle d'un de ses dérivés (TMC, glycol-chitosan, chitosan thiolaté...). Chaque dérivé possède des caractéristiques physicochimiques qui leurs sont propres. Les possibilités d'utilisation du chitosan sont ainsi démultipliées, d'autant plus qu'il existe également des formes dérivées des formes dérivées du chitosan (*e.g.* TMC thiolaté, TMC galactosylé...) (Kulkarni et al. 2017) et que le mode de fabrication des nanoparticules peut se faire selon des protocoles très différents (nanoprécipitation, émulsions, réticulation, gélification ionotropique, coacervation complexe...) (Islam et al. 2012). Parmi ces exemples, Pawar *et al.* ont inoculé des souris avec un vaccin sous-unitaire contre l'hépatite B (HBV) constitué par l'antigène HBsAg associé au chitosan (Cs) ou à l'un de ses dérivés, le **glycol chitosan** (GCs). Le GCs a présenté la meilleure clairance nasale et internalisation de l'antigène par les CPA. Le fait de vacciner avec le GCs en IN a permis une nette amélioration dans l'induction d'une immunité mucoale comparée au vaccin classique HBsAg adjuvanté avec de l'alum (en sous-cutané). Ce dernier, bien que robuste au niveau de la réponse humorale systémique, élicite en effet une réponse mucoale négligeable (Pawar and Jaganathan 2016). La **forme triméthylée du chitosan (TMC)** a également été évaluée en IN pour ce même antigène (Tafaghodi et al. 2012). Le TMC a, contrairement au Cs seul, montré une certaine propension à induire

positivement la maturation de cellules dendritiques. Par ailleurs, les souris immunisées intranasalement avec le TMC ou le Cs ont montré une réponse en anticorps sériques et nasaux comparable et bien plus élevée que celle obtenue avec le vaccin conventionnel HBsAg-alum (Tafaghodi et al. 2012). Le TMC, obtenu par méthylation réductrice du Cs, présente quelques avantages par rapport au Cs puisqu'il est hydrosoluble et favorise la mucopénétration, l'ouverture des jonctions serrées ainsi que le transport paracellulaire des nanoparticules (Kumar, Vimal, and Kumar 2016). Le TMC a été évalué chez la souris pour de nombreux antigènes (**Tableau 4**), y compris en vaccination à ADN (Xu et al. 2004).

Tableau 4. Etudes sur le chitosan et ses dérivés en vaccination intranasale.

	Modèle	Taille nanoparticule(nm)	Charge de surface (Potentiel zeta en mV)	Type de vaccin	Dose (µg)	Nombre d'inoculation	Volume administré	Anesthésie	Référence
Chitosan	lapin	580	?	virus inactivé	45	3	3 * 200 µL	oui	Dehghan et al 2014
Chitosan	volaille	200	12	ADN	200	2			Zhao et al (2014)
Chitosan	porc	571,7	1,69 à 1,88	sous-unitaire	?	2	2 * 2 ml par aeros	non	Dhakal et al 2018
Chitosan	souris	210	10	ADN	5	2	2 * 20 µl	non	Raghuwanishi 2012
Chitosan	souris	300 à 400	4,2 à 13,8	ADN	50	2	2 * 10 µl	non	Kahtri 2008
Chitosan	souris	143							Subbiah et al. (2012)
Chitosan	souris	80 à 100	?	ADN	50	4			Xu et al 2004
Chitosan (TMC)	souris	170 à 2000		Protéique	10	3		oui	Scherliess et al (2015)
Chitosan ou agarose nanoparticules	souris	80	14	sous-unitaire	100	2	2 * 10 µl	oui	Tafaghodi et al (2012)
Chitosan ou TMC	souris	140	9,8	sous-unitaire	?	3	3 * 20 µL	?	Liu et al 2015
Chitosan ou TMC	souris	365 à 424	30 à 45	S U protein recombinant chimérique	20	3	?	?	Doavi et al 2016
Chitosan ou TMC	souris	247	40	ADN	20	3	3 * 20 µl	oui	Iqbal 2003
Chitosan substitué avec A-A-M	souris	208	7 à 26	S U VLP	1,5; 5; 10	3	3 * 15 µL	oui	Jesus et al 2016
Chitosan/Poly-(ε-caprolactone)	souris	125,6	23	ADN	15	3	3 * 10 µL	non	Gupta 2011
Chitosan/Poly-(ε-caprolactone)	souris	300 à 350	22	S U split	1	2	2 * 20 µl	non	Sawaengsak et al. (2014)
CS (CS/TPP)	lapin	220 à 250	18-21	ADN	200	6	6 * 100 µL		Yang et al 2009
CS (CS/TPP)	souris	210 à 310	23	ADN	1	5	5 * 20 µL	oui	Yao et al (2013)
MCA	Cochon d'Indes	60 à 300	14 à 38	ADN	20	1	200	?	Nanda et al (2014)
MCA vs Cs	souris	200 à 250	30-32	Sous-unitaire protéine recombinante		2	2 * 5 µL	oui	Dabaghian et al 2018
TMC	souris	250 à 400	7 à 21	sous-unitaire protéique	10	2	2 * 10 µl	?	Bal 2012
TMC	souris	207 à 603	17 à 26	toxioïde	2,5	3	3 * 25 µL	?	Cevher et al 2015
TMC vs TMC/pullulan	souris	250 à 400	7 à 21	Protéique	10	2	2 * 10 µl	?	Verheul 2011

(b) L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (HYAFF) est un autre mucopolysaccharide ayant été testé en IN. Selon le brevet déposé par l'équipe de O'Hagan *et al*, il a été montré sur plusieurs modèles animaux que le fait de combiner l'HYAFF avec un antigène donné peut favoriser l'absorption de ce même antigène aux muqueuses tout en améliorant son immunogénicité (Garg et al. 2010; O'Hagan, Singh, and Ulmer 2004). Parmi ces études, nous pouvons mentionner celle de Singh *et al* publiée en 2001. Celle-ci montre sur trois modèles animaux (souris, lapin, mini-porc) que la vaccination en IN avec des microsphères d'HYAFF associées à un antigène protéique d'hémagglutinine du virus *influenza* H1N1 peut permettre l'induction d'IgG sériques et d'IgA dans les sécrétions nasales chez les trois espèces évaluées. De plus, la réponse humorale sérique induite chez les mini-porcs vaccinés en IN était supérieure à celle observée chez ceux vaccinés en IM (Singh, Briones, and O'Hagan 2001).

(c) Le pullulane

Le pullulane est un polysaccharide hydrosoluble pouvant encapsuler aisément des molécules de nature hydrophobe. Celui-ci a par exemple été décrit par Kong *et al* comme système de délivrance intranasal sous forme de nanogel (Kong et al. 2013). Ce dernier a été constitué par du pullulane associé à un groupe cholestéryle (un lipide) cationique (nanogel cCHP) formulé avec la protéine PsA comme antigène (protéine A de surface de la bactérie *Streptococcus pneumoniae*). Les souris inoculées en IN avec ce nanogel ont présenté une réponse protectrice contre la bactérie *Streptococcus pneumoniae* tout en limitant la colonisation et l'invasion des voies respiratoires par celle-ci. Une réponse en IgG sérique et en anticorps IgA nasaux et bronchiaux a été constatée, le tout accompagné d'une réponse Th17 mucoale (Kong et al. 2013). Ce résultat souligne l'utilisation potentiel de ce type de nanogel comme système de vaccination IN contre les infections respiratoires à pneumocoques. Des résultats encourageants avaient également été observés chez des souris vaccinées en intranasal

avec un nanogel cCHP associé avec des fragments sous-unitaires de neurotoxines de *Clostridium Botulinum*. Une bonne adhésion aux épithéliums nasaux et une prise en charge efficiente par les cellules dendritiques avaient été observées, ainsi qu'une production d'IgG anti-botuliques neutralisants et d'IgA sécrétoires (Nochi et al. 2010; Nakahashi-Ouchida, Yuki, and Kiyono 2018).

(d) L'alginate

L'alginate est un polysaccharide issu naturellement d'algues brunes possédant des caractéristiques hydrophiles, biodégradables et biocompatibles (Lee et al. 2018; Smidsrod 1990). L'alginate est employé pour divers usages pharmaceutiques ou agroalimentaires, principalement en tant qu'épaississant ou stabilisateur d'émulsions, et permet en outre de former un gel d'alginate en présence de cations divalents (Garg et al. 2010; Tafaghodi, Sajadi Tabassi, and Jaafari 2006). Au début des années 2000, Rebelatto *et al* avait évalué chez le veau l'efficacité en IN de microparticules (tailles entre 1 µm et 50 µm) d'alginate encapsulant un antigène d'albumine de sérum porcin (PSA). De bons niveaux en anticorps IgG1 anti-PSA avaient été mesurés dans le sérum et les sécrétions nasales des veaux inoculés et dans une moindre mesure dans la salive (Rebelatto 2001). Les niveaux d'IgA en revanche n'avaient pas été augmentés et seulement une faible réponse lymphoproliférative et cytotoxique (CTL) avait pu être détectée (Rebelatto 2001). Plus tard, il a été montré que l'immunisation en IN de lapins avec un antigène toxoïde tétanique (TT) encapsulé sous forme de microsphère avec de l'alginate pouvait permettre l'induction d'une réponse IgG systémique robuste accompagnée cette fois-ci d'une réponse mucoale IgA dans les lavages nasaux (Tafaghodi, Sajadi Tabassi, and Jaafari 2006). L'alginate est aussi couramment associé avec le chitosan pour former des micro/nanoparticules co-polymériques afin de combiner leurs avantages et surtout outrepasser leurs limites intrinsèques. L'alginate, en dépit de ses propriétés d'intérêt pour la voie intranasale, présente l'inconvénient d'avoir une charge de surface globalement négative, ce qui peut limiter les interactions

avec les membranes cellulaires ou les mucines qui sont-elles-mêmes chargées négativement. Ceci peut limiter le temps de résidence et l'absorption de nanoparticules d'alginate au niveau des muqueuses (Lee et al. 2018; Cui, Qian, and Yin 2006). Les nanoparticules de chitosan, quant-à-elles, sont de nature cationique mais peuvent parfois être confrontées à des problèmes de stabilisation ou d'agrégation (Islam et al. 2012). En ce sens, Borges *et al* ont développé en 2008 des nanoparticules de chitosan adsorbées avec antigène vaccinal HsBAg puis recouvertes d'alginate, de façon à pouvoir protéger l'antigène des dégradations enzymatiques et à optimiser l'interaction avec les muqueuses. Une augmentation de la réponse humorale mucoale avait pu être montrée comparé à la condition où l'antigène n'était pas formulé (Borges et al. 2008).

(e) Le PLGA

L'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) est un ester aliphatique formé par un copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique. Il est biodégradable, a une bonne biocompatibilité, s'administre aisément et est peu toxique, ce qui rend son utilisation relativement sûre (biomatériel approuvé par l'US FDA (Food Drug Administration⁴) et l'AEM (Agence européenne du médicament) comme système de délivrance de médicaments). Les produits de sa dégradation (**Figure 18**) (clivage par hydrolyse d'un lien ester) sont sûrs et peuvent soit être excrétés par les reins, soit entrer dans le cycle de Krebs afin d'être éliminés sous forme de dioxyde de carbone ou d'eau (Sahana et al. 2008; Dinarvand et al. 2011). Le PLGA est commercialisé sous plusieurs poids moléculaires et à différentes compositions co-polymériques. En général, celui-ci est identifié par son ratio en monomères. Par exemple, l'indication PLGA 50 : 50 correspond à du PLGA contenant 50 % d'acide lactique et 50 % d'acide glycolique. Le choix de ce ratio se fait en fonction des propriétés et caractéristiques souhaitées.

⁴ Agence Américaine de la Sureté Agroalimentaire

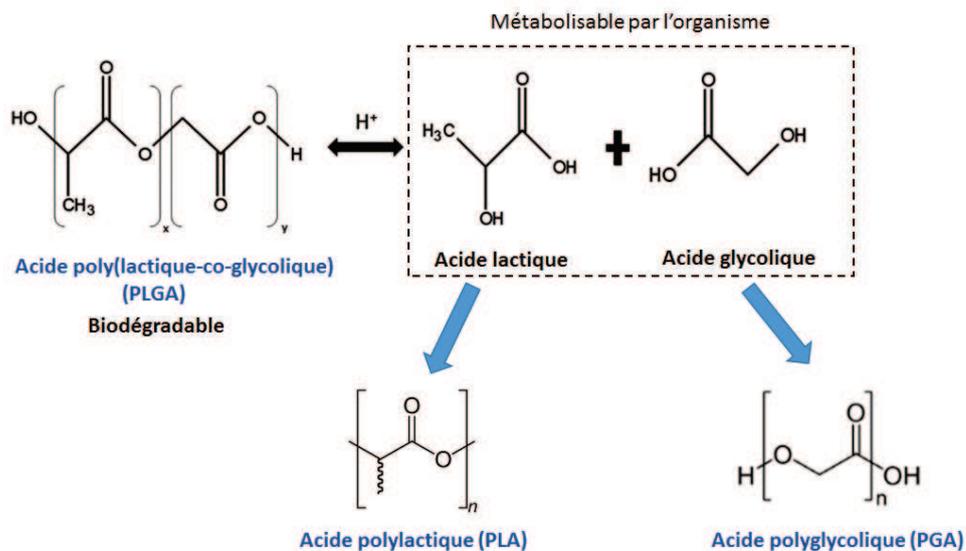


Figure 18 : L'hydrolyse du PLGA et ses produits de dégradation. Le PLGA, PLA et PGA présentés ci-dessus sont trois types de polyesters aliphatiques qui peuvent servir de polymères pour la fabrication de nanoparticules polymériques. Schéma adapté et modifié de (Danhier et al. 2012).

En vaccination à ADN, il a été montré que le PLGA utilisé comme nanoparticule pouvait permettre une augmentation de la charge délivrée d'ADN, de limiter la dégradation de l'ADN (longue conservation du vaccin dans la nanoparticule comprise entre 4 et 8 semaines sous des conditions physiologiques) et d'amplifier la délivrance du vaccin à ADN à des CPAs (Dhakal et al. 2017)

(f) Le poly- ϵ -caprolactone (PCL)

Le PCL est comme le PLGA un polyester aliphatique biodégradable (son hydrolyse donne de l'acide 6-hydroxycaproïque pouvant être métabolisé au sein du cycle de l'acide citrique) qui possède une faible température de fusion (60°C). Cette dégradabilité du PCL se fait sur un temps long (Garg et al. 2010). Ainsi le PCL est couramment associé en tant que co-polymère avec d'autres polymères biodégradables puisque celui-ci favorise une délivrance lente et contrôlée de l'antigène vaccinal (Garg et al. 2010). Florindo *et al* ont étudié en 2009 l'efficacité du PCL en vaccination IN contre la bactérie *Streptococcus equi* responsable de la maladie de la gourme chez le cheval

(Florindo *et al* 2009). Des nanosphères de PCL ont été fabriquées selon deux processus différents : par encapsulation ou par adsorption à leur surface d'antigènes protéiques de *S. equi*. Par ailleurs, ces nanoparticules ont pour certaines été co-associées avec des polymères mucoadhésifs (alginate, chitosan) et/ou avec des facilitateurs d'absorption (spermine, acide oléique). Les résultats de Florindo *et al* ont montré sur un modèle murin que l'administration en IN de ces nanosphères permet une meilleure immunogénicité, l'élévation des niveaux cytochiques mais aussi l'induction d'IgA sécrétoires mucosales, et ce aussi bien pour les antigènes encapsulés que pour ceux adsorbés à la surface des nanosphères de PCL. Enfin, les nanosphères de PCL modifiées et co-associées avec des polymères mucoadhésifs ont montré les meilleurs résultats. Cette notion de co-association de biopolymères pour optimiser des nanoparticules est décrite plus précisément dans la partie (2) qui suit.

(2) Contourner les limites et optimiser les nanoparticules polymériques

Les nanoparticules polymériques peuvent, dans certains cas, présenter des limites en vaccination intranasale. Pour le chitosan, il peut s'agir de problème de stockage, d'agrégation ou d'instabilité dans un milieu acide (cela peut conduire à la neutralisation des groupes amines du chitosan) (Islam et al. 2012) ou à des pH physiologiques qui peuvent impacter la perméabilité des nanoparticules, leur solubilité et leur potentiel de charge de surface (Pawar et al. 2010). Les nanoparticules de PLGA quant-à-elles présentent l'inconvénient d'avoir des capacités mucoadhésives limitées sachant qu'en moyenne une formulation peu adhésive reste au maximum 15 à 20 minute dans les cavités nasales (Pawar et al. 2010). Ceci peut être un frein à l'immunogénicité des NPs de PLGA d'être prises en charge par les cellules M, les CPAs ou bien de transfecter les cellules endothéliales (Pawar et al. 2010). A cela, s'ajoute le fait que le potentiel *zeta* de nanoparticules de PLGA non modifiées est négatif (Tahara et al. 2011) ce qui va limiter leur complexation avec des acides nucléiques et surtout leur interaction avec des membranes cellulaires (Zhao, Zhang, Zhang, Shi, et al. 2014).

Plusieurs options sont possibles pour solutionner ces inconvénients : **i)** l'utilisation de stabilisants comme le polyéthylène glycol (PEG) (Suk et al. 2016), le CTAB ou DMAB (Basarkar et al. 2007; Fay et al. 2010), le poloxamère ou la poloxamine (Csaba, Sanchez, and Alonso 2006) **ii)** l'ajout d'un ligand spécifique **iii)** la co-association avec d'autre polymères tels que les polymères cationiques avec par exemple la PEI (Shau et al. 2012; Bivas-Benita et al. 2004), la polylysine (Capan et al. 1999), le chitosan **iv)** la préparation de nanoparticules de PLGA en utilisant un surfactant cationique (Basarkar et al. 2007).

D. Introduction - Vaccination à ADN par voie intranasale chez le porc

1. Modèle de vaccination à ADN plasmidique contre l'Herpèsvirus de la Pseudorage porcine

Le modèle d'étude de la vaccination à ADN plasmidique utilisé dans le laboratoire est celui contre l'Herpèsvirus de la Pseudorage porcine (que nous appellerons PrV dans la suite de cette thèse). Ce virus est responsable de la maladie d'Aujeszky. Cette maladie était déjà décrite au XIX^{ème} siècle, mais ce n'est qu'au début du XX^{ème} siècle que le vétérinaire hongrois Aládar Aujeszky en identifia l'agent causal et le différençia de celui de la rage. Cette maladie virale est mortelle pour une grande partie des vertébrés ; cependant les grands singes et l'homme ne sont pas infectés par le virus. De plus, le porc et son cousin sauvage le sanglier sont capables de guérir de la maladie ; ils restent néanmoins porteurs et excréteurs du virus à vie, ce qui en font les réservoirs naturels du virus. Le PrV est un virus neurotrope létal pour les porcelets et induit l'avortement des truies pleines. Chez les porcs plus âgés, il provoque des désordres nerveux, une détresse respiratoire, une hyperthermie, ainsi qu'une perte de poids importante avec des conséquences économiques désastreuses.

Le PrV appartient à la famille des *Herpesviridae*, de la sous famille des *alphaherpesvirinae*, du genre *varicellovirus*. Les alphaherpesvirus se répliquent rapidement, entraînant un effet cytopathique qui permet de produire des particules virales en quelques heures, et peuvent établir une latence dans les ganglions nerveux. Le noyau central contient le génome viral supporté par une molécule d'ADN double brin linéaire de 143 kb. L'ADN est empaqueté dans une capsidie icosaédrique pour former la nucléocapsidie. La protéine majeure de la capsidie VP5 est codée par *UL19* et s'assemble en 162 capsomères. La capsidie est encadrée dans une matrice protéique

appelée tégument. Il existe au moins quatorze protéines du tégument codées par le génome viral et l'actine provient des cellules infectées. Enfin, le tégument est entouré par une enveloppe, qui est une membrane lipidique contenant plusieurs glycoprotéines virales. Le génome du PrV code pour seize protéines membranaires. Onze d'entre elles (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM et gN) sont modifiées par l'ajout de sucres par N- et O- glycosylation, quatre autres protéines (UL20, UL43, US9 et UL24) se retrouvent aussi au niveau de la membrane mais ne sont pas glycosylées.

Les glycoprotéines jouent un rôle important dans l'attachement du virus à la cellule hôte, ainsi que dans la fusion des membranes. En tant que constituants de surface, ce sont aussi des cibles majeures de la réponse immunitaire de l'hôte (Klupp et al. 2004; Mettenleiter 2000; Pomeranz, Reynolds, and Hengartner 2005).

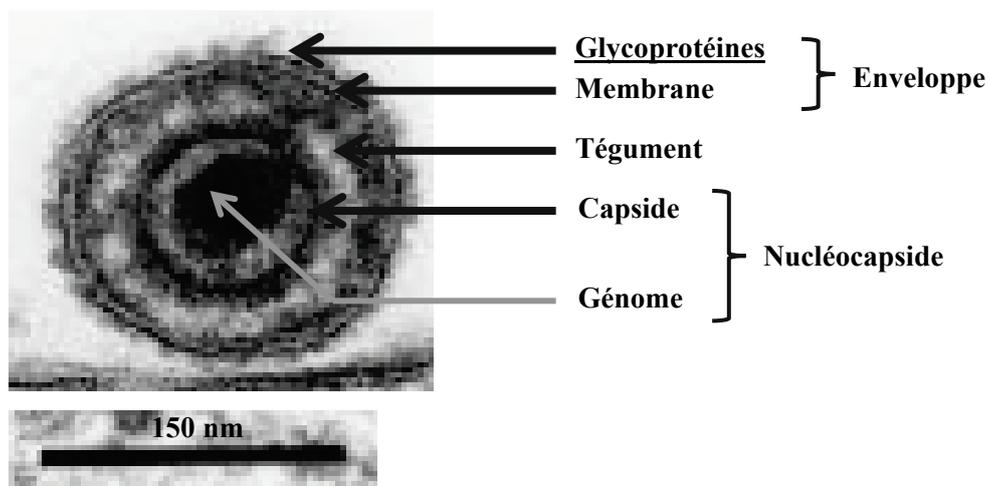


Figure 19. Le virus de la Pseudorange Porcine. Image de microscopie électronique tirée de la revue de Mettenleiter (2000) (Mettenleiter 2000).

La maladie d'Aujeszky est une maladie à déclaration obligatoire et classée par l'OIE (Office International des Epizooties - Organisation Mondiale de la Santé Animale) parmi les maladies ayant un impact socio-économique et/ou de santé publique et ayant une incidence sur le commerce international et la production animale. Les mesures de prophylaxie préconisées par l'OIE contre la maladie d'Aujeszky sont décrites en détail dans le chapitre 2.2.2 du Code sanitaire pour les animaux terrestres – 2006).

Néanmoins, Vannier *et al.* ont décrit l'historique des plans de prophylaxie dans l'Ouest de la France et comment la Bretagne et la Mayenne, après avoir opté pour une prophylaxie uniquement médicale (vaccination), ont pu y associer une prophylaxie sanitaire peu de temps après (Vannier, Vedeau, and Allemeersch 1997). Les vaccins utilisés dans la prophylaxie médicale sont des vaccins défectifs en glycoprotéine E permettant ainsi de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés (c'est donc un vaccin DIVA).

Le modèle du laboratoire de vaccination à ADN contre le PrV est un modèle puissant car une injection unique de vaccin à ADN plasmidique en intramusculaire profonde au niveau de l'encolure du porc permet de générer une protection relativement efficace contre une infection expérimentale létale. Les porcs utilisés pour ces études sont exempts de certains organismes pathogènes spécifiques (EOPS).

Trois plasmides codent individuellement les glycoprotéines B, C et D du PrV. Ces trois glycoprotéines ont été choisies car elles sont présentes à la surface du virus et interviennent dans des étapes clés de l'infection (**Figure 20**). La glycoprotéine B du PrV, d'une taille de 913 acides aminés, est impliquée dans la fusion des membranes du virus et de la cellule pendant la pénétration du virus. Elle est importante dans l'induction de la réponse immunitaire cellulaire, et notamment la réponse par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (van Rooij et al. 2000). Par ailleurs, plusieurs épitopes B ont été détectés sur cette protéine (Zaripov et al. 1999; Zaripov et al. 1998). De plus cette glycoprotéine possède à son extrémité Carboxy-terminale des sites d'endocytose et de passage de cellule en cellule (Nixdorf et al. 2000) qui lui confèrent une biologie particulière (entrée dans la cellule et sortie de la cellule). La glycoprotéine C, d'une taille de 479 acides aminés, est principalement impliquée dans l'attachement initial du virus à la cellule hôte. La glycoprotéine C est la cible majeure de l'immunité cellulaire et humorale résultant d'une infection ou d'une vaccination (Zuckermann 2000; Zuckermann et al. 1990). La glycoprotéine D a une taille de 403 acides aminés. La gD du Human Simplex Virus 1 (HSV-1), qui est homologue à la gD du PrV,

intervient dans la pénétration du virus dans la cellule ainsi que dans le passage de cellule à cellule (Rauh and Mettenleiter 1991). L'immunité induite par la glycoprotéine D neutralise l'infection de façon indépendante du complément (Zuckermann 2000)

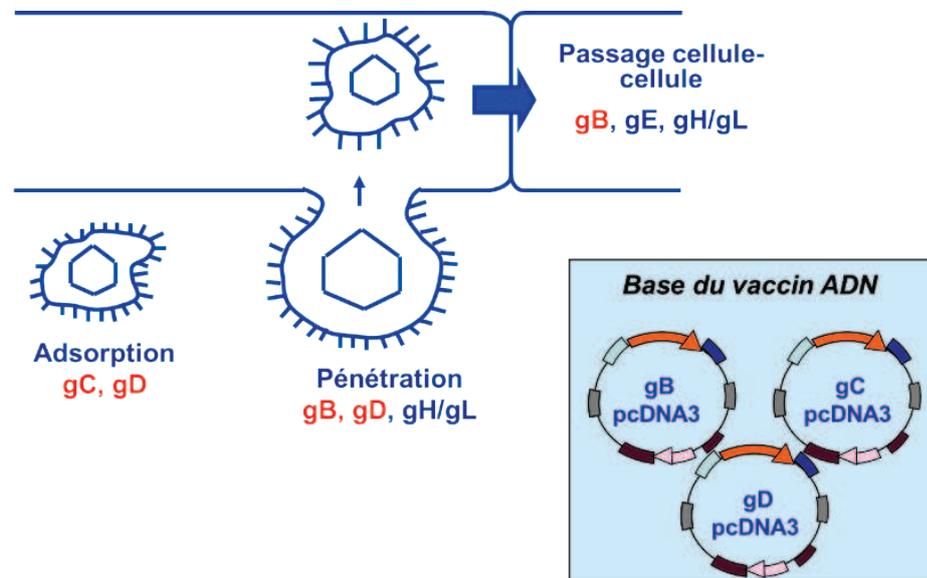


Figure 20. Glycoprotéines majeures d'enveloppe du virus de la Pseudoragie porcine et base du vaccin ADN. Schéma de Daniel Dory.

Dans ce modèle, 21 jours après l'injection du vaccin à ADN plasmidique anti-PrV, les porcs sont soumis à une épreuve virale par une souche hautement virulente de PrV, la souche NiA3. La réponse immunitaire et la protection clinique engendrées par le vaccin sont suivies. Les paramètres cliniques observés sont : l'atténuation de la perte de poids par rapport aux porcs non vaccinés caractérisée par l'indice pondéral $\Delta G7$, le nombre de jours d'hyperthermie ainsi que les signes nerveux et respiratoires. Les paramètres immunologiques mesurés sont : les anticorps spécifiques et neutralisant et l'ARN messager d'IFN- γ et d'IL-4 produits par les PBMC isolés du sang et restimulés *in vitro* par du PrV. L'excrétion nasale de virus est également suivie.

La protection clinique contre une infection du PrV bien que relativement efficace n'est pas optimale avec le vaccin ADN de base composé par l'association de 3 plasmides codant les glycoprotéines B, C et D du PrV. Le principal point faible est que

l'excrétion virale nasale reste élevée. C'est pourquoi certaines stratégies d'amélioration décrites dans la littérature ont été évaluées sur notre modèle de vaccination à ADN plasmidique contre le PrV.

a) Amélioration de la technologie de vaccination à ADN : modèle de l'Herpesvirus de la Pseudoragie porcine

A partir des voies d'amélioration de l'efficacité de la vaccination ADN décrites pour d'autres modèles, une stratégie d'étude a été retenue afin de pouvoir explorer plusieurs pistes d'amélioration de la vaccination ADN anti-PrV chez le porc. En effet, toutes les voies d'amélioration référencées dans la littérature ne pouvaient pas être testées faute de temps et de budget. La stratégie retenue a permis d'investiguer plusieurs directions :

- (1) **La voie de la réplication / transcription** en utilisant des plasmides dérivés du virus Sindbis ou contenant des éléments réplicatifs du virus PCV2 (Faurez et al. 2012; Dory, Torché, et al. 2005). Seule l'utilisation du vecteur plasmidique dérivé du Sindbis s'est révélée bénéfique.
- (2) **La voie de la dégradation / présentation des antigènes** en fusionnant les antigènes à l'ubiquitine qui s'est révélée sans effet (Gravier et al. 2007).
- (3) **L'ajout d'éléments immunostimulateurs** CpG ou GM-CSF qui se sont révélés tous les 2 bénéfiques (Dory, Béven, et al. 2005; Dufour et al. 2000).
- (4) **Le renforcement de la réponse vaccinale** en appliquant un protocole de vaccination de type ADN prime / recombinant viral boost (Dory et al. 2006) qui s'est révélé être particulièrement efficace.

La glycoprotéine B

L'efficacité forte de la vaccination à ADN contre le PrV pourrait être expliquée par les propriétés immunisantes des glycoprotéines du PrV utilisées dans le vaccin. Parmi ces 3 glycoprotéines, la glycoprotéine B est d'un intérêt tout particulier. C'est une protéine de 913 acides aminés (aa) qui possède un domaine transmembranaire et un site de clivage par la protéase furine (figure 19). La gB est fortement immunogénique car 2 sites B ont été identifiés dans la sous-unité N-terminale (aa 59-126 et 214-279) et 1 site B a été identifié dans la sous-unité C-terminale (aa 540-734) (Zaripov et al. 1998; Zaripov et al. 1999) (**Figure 21**).

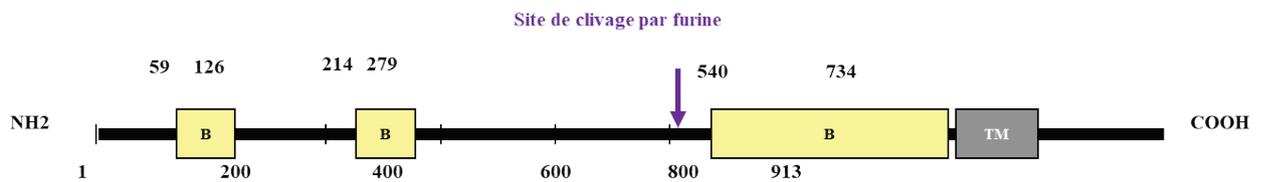


Figure 21. Représentation schématique de la glycoprotéine B du virus de la Pseudoragie porcine. B: Site antigénique B ; TM : domaine transmembranaire.

De plus des séquences permettant l'endocytose (aa 884-913), le passage de cellule en cellule (aa 824-854) et l'incorporation dans le virion (aa 854-913) ont été décrites (Nixdorf et al. 2000). Ainsi la gB est capable de rentrer dans les cellules et d'en sortir, ce qui pourrait augmenter la possibilité à cette glycoprotéine de rencontrer des cellules du système immunitaire. Pour ces raisons, la glycoprotéine B du PrV a été sélectionnée dans notre laboratoire pour démontrer l'efficacité de l'électroporation (Le Moigne et al. 2012) ou comme transporteur d'antigènes du virus de la fièvre aphteuse (Dory et al. 2009).

Objectifs

du projet de thèse

Objectifs de ces travaux de thèse

La réalisation de ces travaux de thèse a consisté à développer et évaluer la faisabilité d'une nouvelle stratégie vaccinale visant à allier vaccination à ADN et vaccination mucosale. Pour ce faire, nous avons utilisé notre vaccin à ADN contre le virus de la pseudorabe porcine, développé précédemment par notre équipe. Notre choix s'est porté sur celui-ci car fortement immunogène en intramusculaire chez le porc, le tout accompagné d'une réponse immune protectrice. Celui ayant aussi fait l'objet de nombreuses optimisations au sein de notre équipe « vaccination à ADN nu » (cf partie 4.2), ce vaccin nous a semblé pouvoir constituer un modèle d'étude légitime pour étudier la vaccination à ADN par une voie autre que celle parentérale, celle la plus communément décrite pour ce type de stratégie vaccinale. Le principal objectif de ce projet était de pouvoir déterminer si ce vaccin à ADN connu pour être efficace parentéralement (administration en IM) pouvait également l'être lorsque administré par une voie mucosale donnée. Par contre, ce passage d'une voie d'administration à l'autre impliquait un certain nombre de contraintes supplémentaires du fait que les muqueuses constituent généralement la première barrière de l'organisme avec l'extérieur et donc sont donc dotées de mécanismes naturels protecteurs (immunité innée) qu'il convient de contourner efficacement pour obtenir une stratégie vaccinale efficace en mucosale. Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier en parcourant la littérature scientifique, les outils biologiques pouvant potentiellement permettre la délivrance de notre vaccin ADN au niveau de la cavité nasale et respiratoire. Le système recherché devait être sous-unitaire car ce type de vaccination est considéré comme étant « plus sûr » ; et donc plus acceptable, ce qui a exclu d'office les systèmes viraux vivants d'ADN (e. g. adénovirus, lentivirus...).

Méthodologies et Résultats

A. Résultats - Sélection de vecteurs d'intérêt adaptés pour la vaccination à ADN intranasal

Cette étape de bibliographie, explicitée dans le chapitre 1 introduction de cette thèse, a mis en avant le fait que de nombreuses études ont eu recours à des systèmes nanoparticulaires, principalement biopolymériques pour vacciner intranasalement différents types de modèles animaux. Ces études ont été menées avec des vaccins de nature protéique ou nucléique et ont été très majoritairement réalisées chez des animaux de petite taille tels que la souris ou le cochon d'Inde. Il est apparu dans cette étude que les données en vaccination sous-unitaire intranasale chez les animaux de rente comme le porc sont fortement limitées, *a fortiori* en vaccination à ADN où les données sont quasiment inexistantes.

Ainsi, dans un premier temps, nous avons sélectionné trois vecteurs ayant déjà été utilisés dans le cadre de la vaccination à ADN par voie intranasale mais pour d'autres espèces animales que le porc ou alors en vaccination sous-unitaire protéique chez le porc. Dans cette sélection de vecteurs, l'accessibilité au niveau technique des moyens de production des nanoparticules a également été prise en compte de façon à pouvoir fabriquer nos propres nanoparticules vaccinales avec le matériel dont nous disposons au sein de notre laboratoire. Face à la grande diversité des protocoles, un choix a dû être fait suite à l'analyse bibliographique des matériels et méthodes décrits dans les publications relatives aux vecteurs nanoparticulaires d'intérêt pour la voie intranasale. Au final, trois systèmes nanoparticulaires bio-polymériques ont été retenus (**Figure 22**).

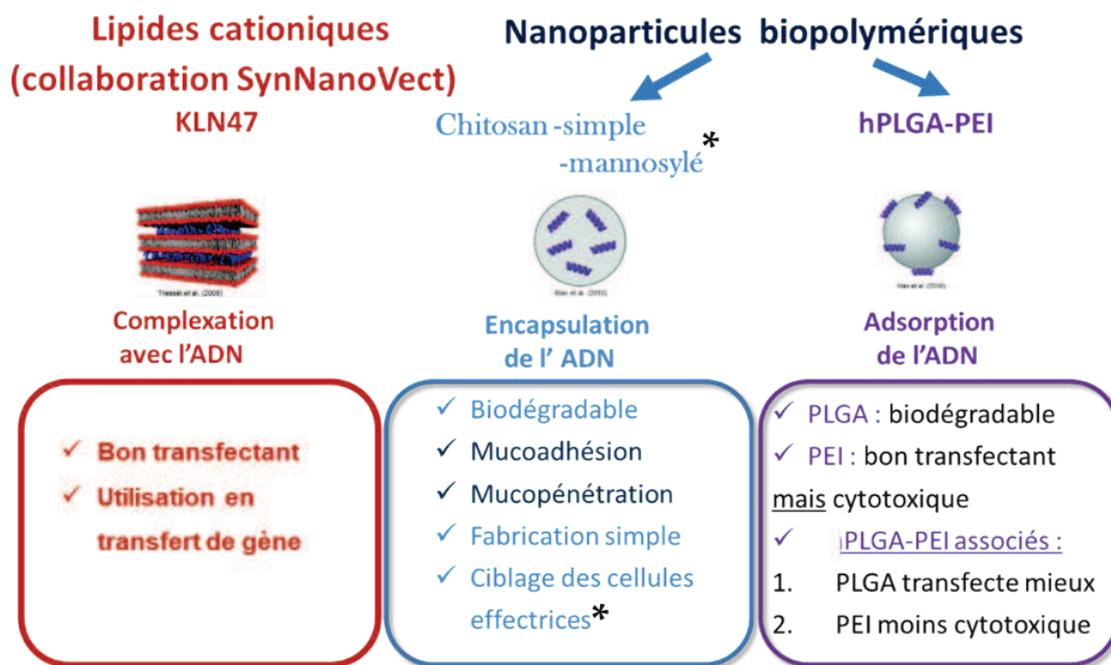


Figure 22 : Représentation schématique des nanovecteurs retenus pour la thèse : le KLN47 associé par complexation avec l'ADN vaccinal, le chitosan ou le chitosan mannosylé avec lesquels l'ADN est encapsulé et pour finir les nanoparticules de PLGA-PEI sur lesquels l'ADN est adsorbé.

1. **Le chitosan** est mucoadhésif et mucopénétrant, a charge de surface de nature cationique, est biodégradable, permet à lui-seul de complexer l'ADN vaccinal et a été communément décrit en vaccination intranasale (Islam et al. 2012; Khatri, Goyal, Gupta, Mishra, and Vyas 2008). Il est en outre très facile de produire les particules vaccinales, et cela en utilisant des techniques de laboratoires relativement basiques.
2. **Le chitosan mannosylé** qui a globalement les mêmes propriétés que le chitosan mais qui possède en plus un ligand mannose. Celui-ci permet le ciblage de certaines cellules CPAs effectrices des muqueuses par liaison au récepteur mannose (MR) (Nanda et al. 2014). Il est à noter que pour ce système nous avons tiré profit d'une opportunité suite à la rencontre d'une responsable de la recherche de la société Pacific GeneTech Limited (Hong Kong) qui justement produit ce genre de particules. Il ne nous restait plus qu'à associer l'ADN aux particules au laboratoire.

3. L'acide poly lactique-co-glycolique (PLGA) associé à la polyéthylénimine (PEI)

qui combine les avantages du PLGA (biodégradable, non toxique) avec ceux de la PEI (bon transfectant, polycationique) tout en limitant leurs inconvénients (*e.g.* charge négative (PLGA), cytotoxicité (PEI)) (Du et al. 2015). Là aussi le protocole de fabrication des particules en laboratoire est relativement facile et ne nécessite pas de matériel particulier. Mais nous avons eu la chance que ces particules soient commercialisées par une société Espagnole, Nanovex biotechnologies. Là aussi, il ne nous restait plus qu'à associer l'ADN aux particules au laboratoire.

4. Par ailleurs, ce projet de thèse s'est déroulé en collaboration avec la plateforme SynNanoVect de l'UMR-INSERM 1078 de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) de Brest. Celle-ci a développé des systèmes vectorisés sous forme de lipides cationiques (**Figure 23**) visant à favoriser le transfert de gène.

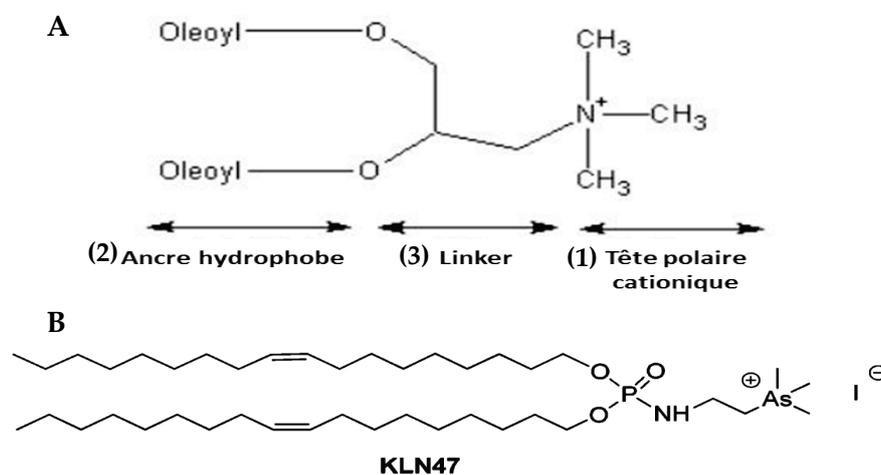


Figure 23. (A) Caractéristiques importantes des lipides cationiques. Les lipides cationiques sont des molécules amphiphiles constitués de trois domaines : (1) une tête polaire cationique pouvant se lier aux acides nucléiques, (2) un motif hydrophobe et (3) un linker permettant de relier ces deux éléments. Extrait de (Chesnoy and Huang 2000). (B) Structure moléculaire du KLN47, un arsénolipophosphoramide. Extrait de (Berchel et al. 2015).

Parmi ces lipides cationiques, l'un d'entre eux, le **KLN47** a montré des résultats prometteurs dans le cadre de transfert de gène sur un modèle murin (Le Gall et al. 2013) et surtout s'est révélé peu toxique comparé à une grande majorité des lipides cationiques. Ainsi, il avait pu être montré que la délivrance en intranasal de lipoplexes obtenus par complexation d'un plasmide marqueur codant la luciférase associé avec du KLN47 pouvait permettre un ciblage efficace des muqueuses nasales chez la souris (**Figure 24**).

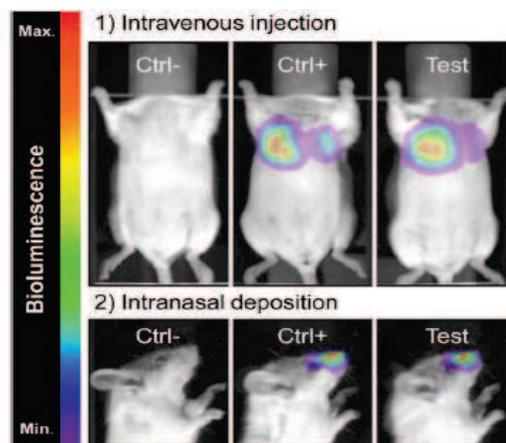


Figure 24 : Efficacité de transfection chez la souris déterminée par bioluminescence en imagerie *in vivo* suite à une inoculation par la voie intraveineuse (1) ou intranasale (2) (Le Gall et al. 2013). Dans le cas du test, une augmentation de la bioluminescence est observée, traduisant un ciblage efficace des muqueuses respiratoires et nasales, selon la voie d'inoculation. Ctrl-, contrôle négatif (souris inoculées avec de l'ADN nu); Ctrl+, contrôle positif (souris inoculées IN avec des lipoplexes non incubés avec des bactéries); Test (souris inoculées IN avec des lipoplexes pré-incubés avec des bactéries)

Nous avons retenu le KLN47 comme quatrième formulation afin d'évaluer le potentiel cationique en vaccination ADN intranasale chez le porc. En effet, que ce soit pour le transfert de gènes ou la vaccination à ADN, le principe actif à véhiculer est le même, à savoir la molécule d'ADN plasmidique.

B. Résultats - Détermination des protocoles de fabrication des 4 systèmes nanoparticulaires puis évaluation *in vitro* de leur efficacité

1. Contexte - Fabrication/production de systèmes nanoparticulaires

La première grande partie expérimentale de ces travaux de thèse a consisté à mettre en place des protocoles afin de produire et/ou formuler par nos propres moyens quatre systèmes nanoparticulaires différents avec des ADN plasmidiques d'intérêt. Des protocoles nouveaux étaient à mettre en place dans notre laboratoire vu que nous étions néophytes en la matière pour ce qui concerne la fabrication de nanoparticules. Ainsi sur cette partie, nous partions de zéro pour initier ce projet sur la vaccination intranasale. Néanmoins nous savions que nous pouvions compter sur l'expertise de la plateforme SynNanoVec pour nous aider. En revanche, notre équipe disposait de l'expertise nécessaire pour le volet concernant la vaccination à ADN vu que le vaccin ADN contre le PrV développé dans notre laboratoire a longuement été étudié, caractérisé et optimisé pour être le plus efficace possible lorsque administré intramusculairement à des porcs. Ainsi, nous nous sommes servis comme point de départ des connaissances théoriques acquises suite à l'analyse bibliographique sur la vaccination à ADN par voie mucosale pour sélectionner les systèmes nanoparticulaires mais aussi les protocoles permettant de les produire et de les complexer avec nos ADN plasmidiques. Ceci a surtout concerné les trois formulations de nature biopolymérique (à savoir le chitosan, le chitosan mannosylé et le PLGA). Pour la dernière formulation, le KLN 47, nous nous sommes complètement appuyés sur l'expertise de nos collaborateurs de la plateforme SynNanoVect qui ont inventés et produits ces lipides cationiques. Il est important de noter que le lipide cationique KLN47 avait surtout été

évalué en intranasal sur modèle murin et que l'efficacité de ce type de formulation/système restait à définir sur de plus grands animaux tels que le porc.

2. Méthodologie - Fabrication/production de systèmes nanoparticulaires.

a) Fourniture des nanovecteurs

Nous nous sommes procuré nos quatre nanovecteurs d'intérêt auprès des fournisseurs suivants :

- (1) **Le chitosan** a été acheté à un poids moléculaire de 143 kDa, sous forme de poudre auprès de la société Sigma. Notons que le chitosan est disponible à l'achat sous des formes et poids moléculaires très différents. De ce fait, il y a dans la littérature scientifique une grande hétérogénéité quant au type de chitosan utilisé pour la voie mucosale, ce qui peut compliquer toute normalisation entre les différentes études disponibles pour le chitosan.
- (2) **Le PLGA-PEI** a été acheté sous forme de nanoparticules lyophilisées auprès de la société NanoVex biotechnologies (basée en Espagne).
- (3) **Le chitosan mannosylé** nous a été gracieusement fourni, sous forme de préparation liquide, par la société PacificGeneTech (basée à Hong Kong).
- (4) **Le lipide cationique KLN47** nous a été fourni par la plateforme SynNanoVect avec laquelle nous avons collaboré (Brest, France).

b) ADN plasmidique utilisé

Le plasmide marqueur que nous avons utilisé pour réaliser l'étude *in vitro* préalable porte le gène qui code la luciférase de luciole (plasmide pTG11033 de 9,6 kb, sous contrôle du promoteur IE fort du cytomégalovirus, IE-CMV).

Pour être produits, les plasmides ont été amplifiés à partir d'une culture de bactérie *E. coli* transfectées avec ce plasmide puis extraits à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN Maxiprep-plus sans endotoxine (Macherey-Nagel, Allemagne). La concentration et la pureté des plasmides produits ont été évaluées par spectrophotométrie UV par mesure des absorbances et calcul des ratios OD260/OD280 nm et OD260/OD230 nm (Lecteur de plaque infinie 200 Pro, TECAN SA, Suisse).

c) Mise au point de la fabrication de nanoparticules de chitosan

La première nanoparticule à laquelle nous nous sommes intéressés a été le chitosan. Plusieurs raisons nous ont fait penser que le chitosan présentait un fort intérêt pour ce que l'on souhaitait faire, à savoir produire un système efficace pour cibler les muqueuses porcines nasales. Premièrement, pour une première approche le chitosan présentait l'avantage d'être un biopolymère naturel très peu coûteux comparé aux autres systèmes retenus. Deuxièmement, le chitosan a la particularité de s'auto-assembler très aisément pour former des nanoparticules encapsulant les ADN ou protéines d'intérêt. Enfin, le chitosan a été utilisé aussi bien en vaccination protéique intranasale chez le porc (voir les études de (Dhakal et al. 2017) (Dhakal et al. 2018)) qu'en vaccination à ADN par voie intranasale chez la souris ou le cochon d'Indes. Pour l'ensemble de ces raisons, cette formulation nanoparticulaire était l'une des plus prometteuses pour réaliser de la vaccination à ADN intranasale chez le porc. De nombreuses techniques et méthodes permettant de produire des nanoparticules de chitosan ont été décrites. Celles-ci peuvent se baser sur des méthodes qui peuvent être

aussi bien chimiques que physiques (voir la revue suivante (Islam et al. 2012; Agnihotri, Nadagouda, and Aminabhavi 2004)).

Le protocole choisi doit généralement prendre en compte de nombreux paramètres qui peuvent être très variables selon l'application souhaitée : la taille de nanoparticule souhaitée, la stabilité chimique et thermique de l'antigène mais aussi la stabilité, toxicité résiduelle et capacité à relarguer à bon port l'antigène véhiculé par les nanoparticules utilisées. D'autres facteurs comme le type de matériel utilisé pour l'inoculation et le mode d'administration envisagé interviennent également (Dash 2011).

Pour produire des **nanoparticules de chitosan**, les techniques possibles que nous avons répertoriées étaient les suivantes :

- Coalescence par gouttelettes d'émulsion ;
- Gélation ionique ;
- Solubilisation dans des micelles inverses ;
- Coacervation complexe/précipitation.

Afin de choisir le protocole à utiliser parmi la multitude des protocoles présentés ci-dessus, nous avons convenu que celui-ci devait répondre aux critères suivants :

- (1) Être accessible à notre niveau (matériel, technique) pour pouvoir le produire nous-même.
- (2) Avoir été utilisé pour formuler et vectoriser des acides nucléiques sous forme de nanoparticules de chitosan pour de la délivrance de gènes *in vivo* (à minima sur un modèle rongeur).
- (3) Que les nanoparticules produites de cette façon aient déjà été décrites pour vacciner en intranasal.

- (4) Que les nanoparticules ainsi produites aient déjà été utilisées sur un modèle porcin pour délivrer efficacement un antigène vaccinal (qu'il soit de nature protéique ou nucléique (dans l'idéal)) au niveau de leur cavité nasale.

La **méthode de coacervation complexe** se base sur les propriétés physicochimiques propres au chitosan. Le principe de cette technique est relativement simple et est particulièrement rapide vu que peu d'étapes sont nécessaires dans ce protocole pour obtenir des nanoparticules de petites tailles encapsulant l'antigène efficacement. Elle repose sur le fait que le chitosan est naturellement insoluble en milieu alcalin (à un pH supérieur à 7). Ainsi, le chitosan rendu soluble en solution acide se précipite sous forme de coacervat au contact d'une solution alcaline. Un coacervat, terme issu du latin *coacervare* « rassembler, mettre en groupe » se définit comme étant une petite gouttelette de forme sphérique, en suspension formée grâce aux forces hydrophobes exercées par rapport au liquide extérieur (dans le cas ci-présent, une solution alcaline).

Deux méthodes principales sont communément décrites pour réaliser de la coacervation complexe avec le chitosan :

- **La première technique, dite de coacervation complexe par liaison croisée d'émulsion**, consiste à souffler le chitosan avec de l'air dans des solutions alcalines telles que le sodium hydroxyde, le méthanol-NaOH ou l'éthanediamine.
- **La seconde technique** consiste à diluer l'antigène d'intérêt (protéine, acide nucléique) dans une solution de pH neutre, le sulfate de sodium. Ensuite cette solution est ajoutée très lentement à une solution d'acétate de sodium à pH acide contenant du chitosan. Le tout est suivi d'une agitation ou bien d'une courte ultrasonication.

Les nanoparticules produites selon la méthode (2) ont montré une meilleure stabilité. Par ailleurs, ce protocole a l'avantage d'être très simple sur le principe, est rapide, demande du matériel commun de laboratoire et ne requiert pas l'utilisation d'agents de réticulation : celui-ci a donc retenu notre attention.

d) Protocoles de coacervation complexe utilisés pour délivrer de l'ADN : paramètres mis en jeu.

Pour établir notre protocole nous nous sommes basés sur deux études de référence décrivant l'impact de divers paramètres sur la production par coacervation complexe de nanoparticules de chitosan-ADN (Mao et al. 2001; Boyoglu et al. 2009). Les principaux paramètres à prendre en compte selon ces deux publications sont les suivants : concentrations d'ADN, de chitosan et de sulfate de sodium, le pH des solutions, le poids moléculaire et le degré de déacétylation du chitosan utilisé mais aussi la température au moment de la coacervation.

Par rapport aux thématiques qui nous intéressent, Nanda *et al.* ont vaccinés intranasalement des cochons d'Inde avec un acide nucléique (ADN) formulé par coacervation complexe avec des nanoparticules chitosan tel que décrit par Boyoglu et/ou Mao (Nanda et al. 2014). C'est ce protocole décrit dans l'étude de Nanda *et al.* que nous avons utilisé vu qu'une certaine efficacité avait pu être montrée avec la voie IN.

e) Protocole de fabrication des nanoparticules chitosan-ADN.

Le chitosan a été dissous dans de l'acide acétique à 1 %, chauffé 10 minutes à 55 °C puis mis à agiter 1 heure de façon à obtenir une solution mère homogène de chitosan à 0,5 % (masse chitosan / volume total). Deux solutions ont alors été préparées selon les quantités d'ADN, les volumes et surtout les ratios chitosan/ADN souhaités. La première (solution de chitosan) a été obtenue par dilution de la solution mère de chitosan dans du tampon acétate de sodium à 5 mM (pH 5,5). La seconde (solution d'ADN) contient l'ADN plasmidique que l'on souhaite encapsuler dilué dans un tampon sulfate de sodium à 25 mM. Ces deux solutions ont été chauffées séparément dans un bain-marie pendant 30 minutes à 55°C. Elles ont ensuite été mélangées entre-elles volume à volume, en ajoutant délicatement la solution d'ADN sur la solution chitosan goutte par goutte. Enfin, les préparations ont été vortexées pendant 30 secondes puis incubées pendant 1 heure à température ambiante avant d'être conservées à + 4°C jusqu'à utilisation (stockage d'un mois possible). Ce protocole est expliqué schématiquement dans la figure qui suit (**Figure 25**).

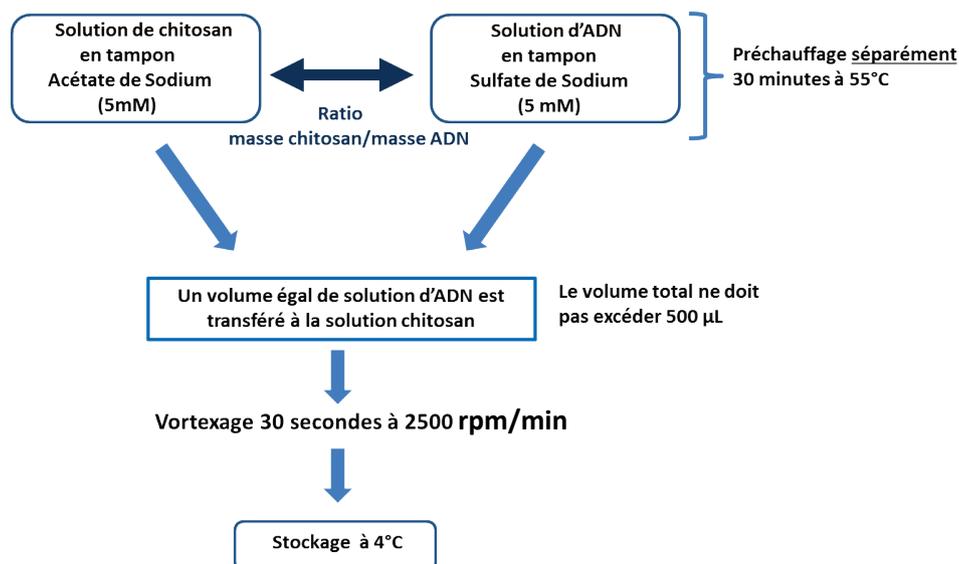


Figure 25 : représentation schématique du protocole de coacervation complexe (Nanda et al. 2014) pour fabriquer des nanoparticules de chitosan encapsulant l'ADN plasmidique d'intérêt.

f) Protocole de fabrication de nanoparticules de chitosan mannosylé (MCA)-ADN.

La deuxième nanoparticule à laquelle nous nous sommes intéressés, est celle du chitosan mannosylé du fait que le processus de nanoencapsulation d'ADN requiert lui aussi un protocole coacervation complexe (Nanda et al. 2014). Toutefois, il y a quelques différences au niveau des solutions tampons utilisées comparé au chitosan non mannosylé. Cette fois-ci l'ADN plasmidique d'intérêt et le chitosan mannosylé (MCA) ont tous deux été dilués dans du tampon phosphate de sodium (10 mM, pH 7,4) en fonction des ratios (masse de MCA / masse d'ADN) souhaités. Ces solutions ont ensuite été chauffées séparément pendant 30 minutes à 55 ° C, mélangées volume à volume, vortexées 30 secondes et enfin incubées pendant 1 heure à température ambiante avant d'être stockées + 4 °C (stockage possible pendant 1 mois environ).

g) Préparation de nanoparticules de PLGA-PEI adsorbées avec de l'ADN.

Dans un troisième temps, nous nous sommes penchés sur les nanoparticules de PLGA-PEI. Rappelons que celles-ci ont été achetées sous forme de nanoparticules lyophilisées déjà formées et caractérisées. Selon les indications du fournisseur NanoVex Biotechnologies la taille de ces nanoparticules de PLGA-PEI était d'une taille de 200 ± 12 nm et d'un potentiel *zeta* de 38.9 ± 0.4 mV.

Les nanoparticules de PLGA-PEI-ADN ont été obtenues par adsorption de l'ADN plasmidique à la surface de nanoparticules de PLGA-PEI. Nous avons utilisé et adapté un protocole précédemment décrit (Shau et al. 2012). L'ADN plasmidique et le PLGA-PEI ont été dilués dans de l'eau ultrapure, en fonction des ratios (masse de PLGA-PEI / masse d'ADN) souhaités, puis mélangés volume à volume, vortexés 30 secondes et enfin mis à incubés 1 heure à température ambiante. Il est conseillé

d'utiliser ces NPs extemporanément à leur préparation ou au maximum dans la semaine qui suit. Le protocole est schématisé dans la figure qui suit (Figure 26).

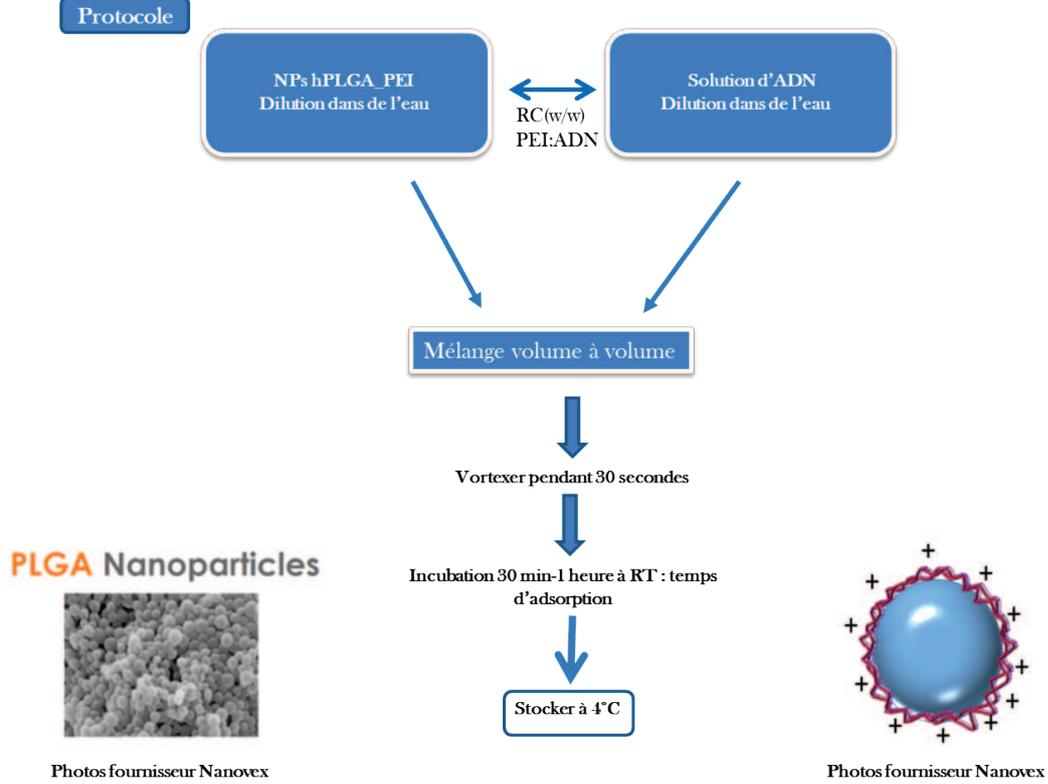


Figure 26. Représentation schématique du protocole d'adsorption de nos ADN d'intérêt sur des nanoparticules de PLGA-PEI achetées sous forme lyophilisée (Shau et al. 2012).

h) Préparation de lipoplexes KLN47-ADN.

Les lipoplexes KLN47-ADN ont été obtenus comme précédemment décrit (Le Gall et al. 2013). Les lipides cationiques KLN47 et l'ADN plasmidique ont été dilués séparément dans de l'eau ultrapure en fonction du ratio charge choisi (**Tableau 5**). La solution d'ADN diluée a été ajoutée volume par volume et goutte à goutte sur la solution cationique. Le mélange a été incubé 30 min à température ambiante (temps de complexation) et les lipoplexes obtenus ont été conservés à 4 ° C avant utilisation (à utiliser extemporanément à leur préparation).

Tableau 5 : protocole de fabrication des lipoplexes KLN47-ADN en fonction des différents ratios charges souhaités.

Calcul des ratios charges (nombre charges positives/nombre de charges négatives):					
	➤ Solution mère de vecteurs lipidiques KLN47: 1,5 mM charges positives				
	➤ Solution d'ADN : 1 µg d'ADN équivaut à 3 nmoles de charges négatives				
Ratio charge	0,5	1	2	4	6
Quantité d'ADN choisie (ng)	250	250	250	250	250
Correspond à x nmoles charges négatives	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Nombre de nmoles de charges positives nécessaires	0,375	0,75	1,5	3	4,5
Quantité de vecteur KLN47 à ajouter (µL)	0,25	0,5	1	2	3

i) Evaluation de la complexation des ADN d'intérêt avec nos formulations

Après la nanovectorisation des ADN plasmidiques d'intérêt, la complexation de l'ADN a été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) associé avec l'agent intercalant SYBR[™] Safe DNA (ThermoFisher, USA). Les bandes d'ADN ont été visualisées sous UV. Dans un premier temps, un ADN contrôle a été mélangé aux formulations préparées ci-dessus pour observer si l'ADN plasmidique s'associe ou ne s'associe pas à chacune de ces formulations. Puis, au bout d'un temps défini pour chaque mélange indiqué plus haut, les mélanges ont été déposés sur un gel d'agarose et séparés par électrophorèse en présence de Sybr-Safe (qui permet de visualiser l'ADN libre ou complexé). Comme indiqué ci-dessous (**Figure 27**), les quatre formulations ont plus ou moins bien complexé l'ADN plasmidique. Quelques traces d'ADN libre restent visibles pour le KLN47 alors qu'aucune trace n'est visible pour les trois autres formulations.

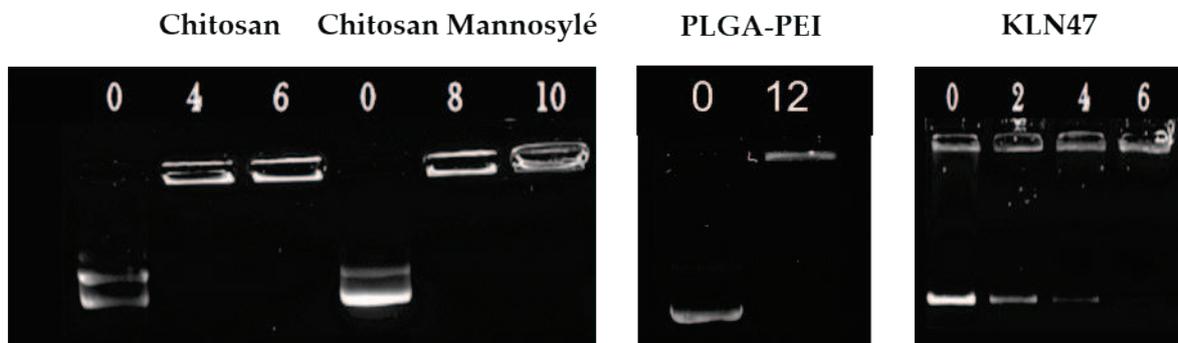


Figure 27. Complexation de l'ADN formulé. Vérification de la complexation de l'ADN (pTG11033) formulé à des ratio masse Formulation/masse ADN différents (chitosan (2 μ g ADN), chitosan mannosylé (2 μ g ADN) et PLGA-PEI (1 μ g ADN)) ou à des ratios charges différents (KLN47 avec 250 ng d'ADN). Le chiffre 0 correspond à de l'ADN nu seul.

3. Méthodologie - Détermination du potentiel transfectionnel de nos quatre nanovecteurs.

Un bon système nanoparticulaire vaccinal est un système capable de favoriser au maximum la transfection de l'ADN plasmidique (c'est-à-dire notre vaccin) dans des cellules cibles (à savoir celles tapissant la cavité nasale et éventuellement celle respiratoire) sans toutefois être cytotoxique pour ces dernières. Afin de déterminer le potentiel transfectionnel de nos quatre nanovecteurs nous avons dans un premier temps fabriqué et/ou formulé un plasmide (pTG11033) codant une enzyme mono-oxygénase ATP-dépendante ayant un rôle clé dans les processus de bioluminescence, la luciférase de *Photinus pyralis* (plus communément désignée sous le nom de luciférase de luciole), avec chacune des formulations nanoparticulaires que nous avons retenues. La luciférase sert en tant qu'enzyme de catalyseur dans la réaction de bioluminescence par oxydation de la luciférine en oxyluciférine, le tout en présence d'oxygène, de Mg^{2+} et d'ATP. Le photon émis permet l'obtention d'une lumière de type jaune-vert. C'est cette dernière que l'on détecte lorsque l'on mesure la bioluminescence émise (**Figure 28**).

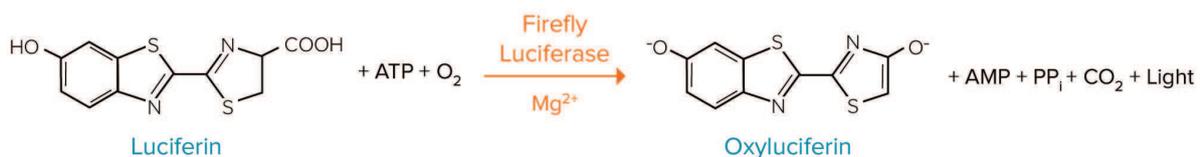


Figure 28 : Schéma représentant la réaction de bioluminescence avec la Luciférase de luciole.

Pour se faire, nous avons utilisé le kit Luciferase Assay System de Promega. Brièvement, le principe de ce kit consiste en l'ajout d'un réactif très sensible permettant la quantification rapide de la luciférase. L'ajout du substrat de la luciférase aux lysats cellulaires permet d'obtenir une lumière détectable au moins 1 minute par un luminomètre. Par ailleurs, la luciférase est un rapporteur idéal car elle **i)** a une bonne sensibilité de détection **ii)** n'a pas d'activité endogène dans les cellules de mammifères.

a) Méthodologie – Mesure de l’efficacité de transfection par bioluminescence

L’efficacité de transfection avec des plasmides pTG11033 nanovectorisés a été caractérisée *in vitro* comme précédemment publié (Berchel et al., 2015; Le Gall et al., 2013). Vingt mille cellules par puits de cellules épithéliales bronchiques humaines (HBE-16) ou de cellules embryonnaires humaines fœtales de rein (HEK 293), cultivées dans du milieu EMEM (supplémenté avec de la Pénicilline/Streptomycine à 1 %, de la glucosamine à 1% (Gibco, ThermoFisher, USA) et du sérum de veau fœtal à 10%) ont été platées dans une plaque P96 puis mises à incuber pendant toute la nuit (37 ° C, 5% de CO₂). Le lendemain, les cellules ont été transfectées en triplicat à raison de 40 µL / puits soit avec le plasmide pTG11033 non vectorisé (condition ADN nu) soit avec le plasmide pTG11033 nanovectorisé et/ou complexé avec le chitosan, le chitosan mannosylé, le PLGA-PEI ou le KLN47. Le temps de transfection total a été fixé à 72 heures. Les témoins contrôles ont été effectués avec du milieu EMEM seul (témoin non transfecté NT) ou du vecteur seul sans ADN. Ensuite, les cultures ont été évaluées pour déterminer le potentiel de transfection et l’effet cytotoxique de chaque préparation.

4. Résultats - Evaluation *in vitro* du potentiel transfectionnel de nos quatre formulations par mesure de la bioluminescence.

Les nanovecteurs/formulations que nous avons produits (nanoparticules ADN-chitosan ou ADN-MCA) ou du moins complexées avec nos ADN d’intérêts (ADN-PLGA-PEI ou ADN-KLN 47) ont été évalués *in vitro* sur des lignées cellulaires. En raison de l’absence de lignées cellulaires porcines nasales durables et fiables, nous avons mené notre étude *in vitro* sur deux lignées cellulaires ; celles HEK-293 (une lignée de cellules épithéliales de rein humaines) ou HBE-16 (une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines). Nous avons utilisé celles-ci car elles ont été

communément utilisées dans la littérature à des fins de transfection mucoale avec ces mêmes vecteurs

Toutes ces conditions ont été comparées avec une condition ADN nu (non formulé) ainsi qu'une condition témoin négatif non transfecté (NT). De cette façon, nous avons déterminé l'efficacité transfection de nos nanovecteurs/formulations par bioluminescence pour voir si ceux-ci pouvaient favoriser la transfection de notre plasmide marqueur pTG11033 codant la luciférase de luciole dans les 2 lignées de cellules.

Tout d'abord, des résultats assez similaires ont été obtenus pour les conditions contrôles (cellules non transfectées (NT)) sur les deux lignées cellulaires évaluées avec des valeurs comprises entre 1.00 E+03 et 1.00 E+04 Unités Relatives de Lumière (RLU) par mg de protéines. Cette valeur correspond au bruit de fond (autoluminescence). Par ailleurs, comme vous le verrez tout au long de cette partie consacrée aux résultats *in vitro*, l'ensemble des valeurs déterminées pour la condition ADN nu (plasmide pTG11033 seul) s'est systématiquement avéré être compris entre 4.00 E+03 et 6.00 E+03 RLU par mg de protéines. Ainsi, comparé au contrôle négatif NT, aucune amélioration de l'efficacité de transfection *in vitro* n'a pu être définie avec de l'ADN nu que ce soit avec les HEK-293 ou bien les HBE-16.

(a) **Choix du ratio masse/masse chitosan/ADN plasmidique (pTG11033) optimal.**

Le potentiel transfectionnel de nos nanoparticules de chitosan-ADN a été évalué *in vitro* par mesure de la bioluminescence émise par des cellules de la lignée cellulaire HEK293. En principe, plus les cellules ont été transfectées de façon efficiente, plus elles contiennent de plasmide marqueur pTG11033 et donc plus il y a d'expression de luciférase dans ces mêmes cellules. Nous avons utilisé des HEK 293 parce que cette lignée a été utilisée dans les études références portant sur l'optimisation du protocole de coacervation complexe pour former des nanoparticules de chitosan (Mao, Sun, and Kissel 2010; Boyoglu et al. 2009). Dans un premier temps nous avons voulu fabriquer

des nanoparticules de chitosan-ADN (pTG11033) avec une faible quantité d'ADN (250 ng/puits transfecté dans les premiers tests de fabrication). Nous nous étions alors rendus compte qu'en dépit du fait que l'ADN plasmidique pTG11033 était bien complexé (absence de bande résiduelle d'ADN sur les gels d'électrophorèse réalisés), l'efficacité de transfection du plasmide pTG11033 mesurée par bioluminescence était très faible voire nulle (résultats non montrés).

Par la suite, nous avons fabriqué nos nanoparticules de chitosan de façon à ce que le mélange transfectionnel contienne 2 μg d'ADN à différents ratio masse chitosan/masseADN (**Figure 29**). La condition lipofectamine sert de contrôle positif (5,1 RLU/mg de protéines). Notons que la lipofectamine est un lipide cationique communément commercialisé en tant qu'agent transfectant connu pour très bien transférer de nombreux types cellulaires. En revanche, dans un contexte de vaccination son utilisation est exclue à cause de sa toxicité notoire (d'où le fait que l'on retire bien souvent la Lipofectamine 4 h à 6 h post-transfection). Ici nous avons retiré la solution de lipofectamine après 4 h (pour avoir le témoin positif) mais par contre les solutions contenant le chitosan ont été laissées sur les cellules HEK-293 pendant l'intégralité des 72h de transfection. Nous avons alors constaté qu'en utilisant une quantité de 2 μg d'ADN, une efficacité de transfection était observée en présence de chitosan alors qu'aucune transfection n'était observée avec la condition ADN nu (plasmide pTG11033 seul). La condition ADN-Cs ratio 2 a donné une bioluminescence de 6,29 E+4 RLU par mg de protéines. Les conditions ayant des ratio masse chitosan/masse ADN supérieurs montrent encore de meilleures efficacités de transfection comparé à l'ADN nu et au témoin NT (9,7 E+5 RLU/mg pour le ratio 4 ; 1,27 E+6 RLU/mg pour le ratio 6 et 1,06 E+6 RLU/mg pour le ratio 8). L'efficacité de transfection est légèrement en deçà pour le ratio 10 (4,92 E+5 RLU/mg).

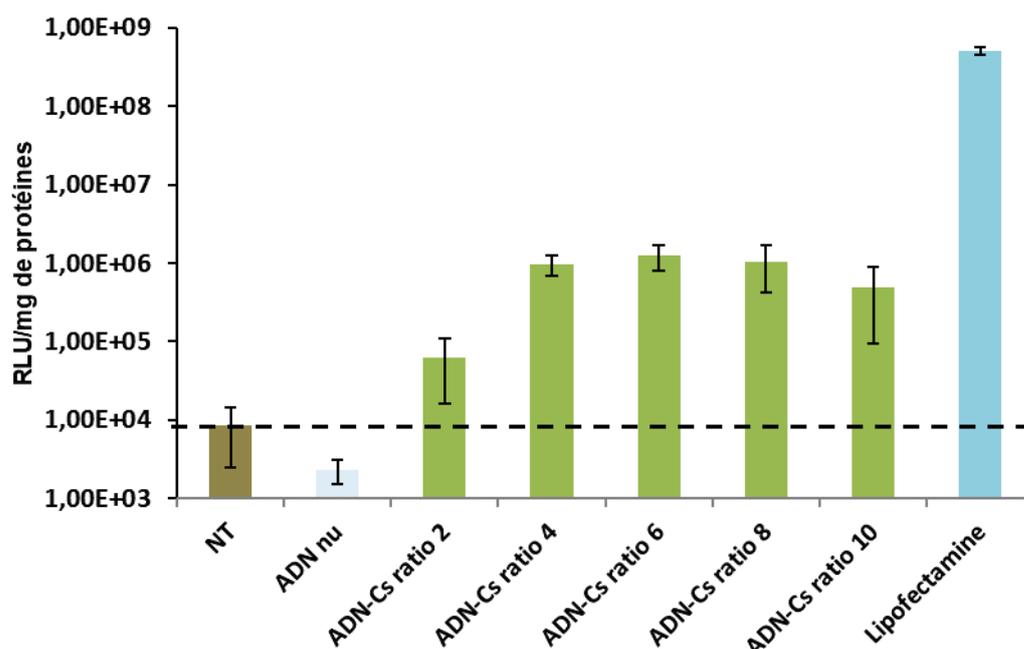


Figure 29. Efficacité de transfection *in vitro* sur des cellules HEK293 du chitosan formulé avec un ADN plasmidique marqueur codant la luciférase. 2 µg d'ADN plasmidique (pTG11033) ont été formulés avec le chitosan par coacervation complexe à différents ratios masse chitosan/masse ADN. La transfection a été faite sur une lignée HEK-293 pour un temps de 72h. Une condition cellules HEK-293 non transfectées a servi de contrôle négatif (NT). La ligne crénelée indique la valeur limite d'autoluminescence. La condition lipofectamine sert de témoin positif. La condition ADN nu correspond au plasmide pTG11033 seul préparé dans la même solution tampon que celle utilisée pour formuler l'ADN avec du chitosan. Les valeurs sont exprimées en unités de lumière relative (RLU) par mg de protéines et ont été mesurées à partir des lysats cellulaires à un temps de 72 heures post-transfection. Le résultat affiché est le résultat d'une seule expérience réalisée en triplicate ± ET.

Pour poursuivre avec le chitosan, nous avons considéré le ratio masse chitosan/masse ADN de 4 comme étant pertinent car il permet d'obtenir la valeur de bioluminescence la plus forte avec le ratio masse chitosan/masse d'ADN le plus faible. Nous avons donc étudié l'efficacité de transfection des nanoparticules d'ADN-Cs sur deux lignées cellulaires (les HEK-293 et les HBE-16) mais cette fois-ci sur 3 expériences indépendantes (**Figure 30**). Les résultats ont été confirmés pour les cellules HEK-293. Par contre aucune efficacité de transfection n'a pu être relevée sur les cellules HBE-16.

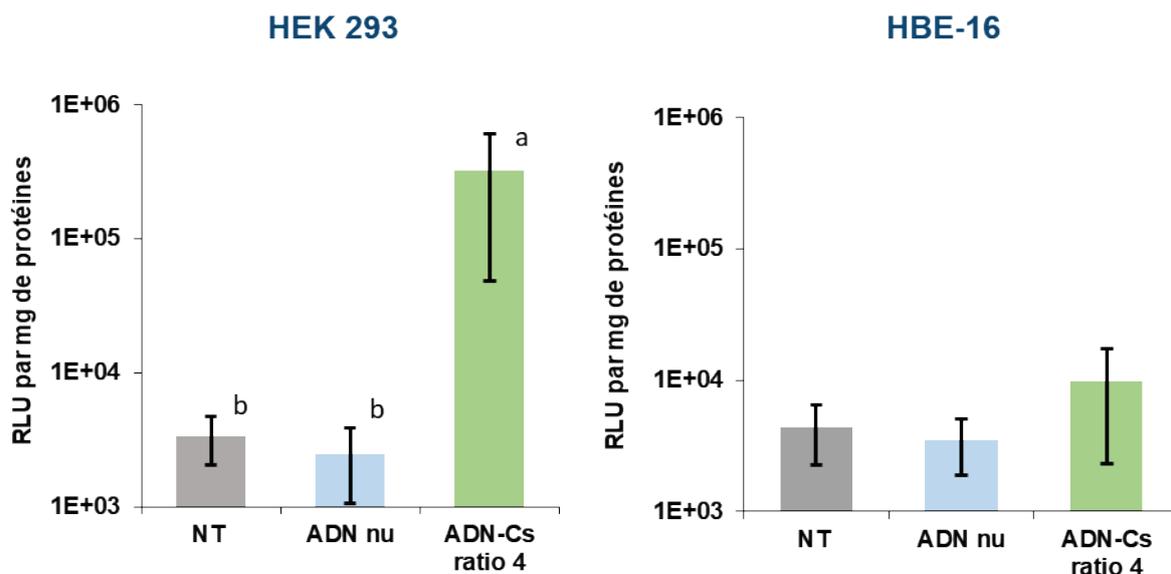


Figure 30. Efficacité de transfection *in vitro* sur des cellules HEK-293 et HBE-16 du chitosan formulé avec un ADN plasmidique marqueur codant la luciférase. 2 µg d'ADN plasmidique (pTG11033) ont été formulés avec le chitosan par coacervation complexe à un ratio masse chitosan/masse ADN de 4. La transfection a été faite sur une lignée HEK-293 ou HBE-16 pour un temps de 72h. Une condition cellules (HEK-293 ou HBE-16) non transfectées a servi de contrôle négatif (NT). La condition ADN nu correspond au plasmide pTG11033 seul. Les valeurs sont exprimées en unités de lumière relative (RLU) par mg de protéines et ont été mesurées à partir des lysats cellulaires à un temps de 72 heures post-transfection. Le résultat affiché représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. Chaque expérience a été réalisée en triplicate ± ET. Test non-paramétrique Mann-Whitney (ab, p < 0.05).

(b) Caractérisation *in vitro* du chitosan mannosylé (MCA) nanovectorisé avec un ADN plasmidique (pTg11033) codant la luciférase.

Des analyses *in vitro* préliminaires ont été faites avec le chitosan mannosylé (MCA) comme cela a été fait pour le chitosan. Nous avons pu déterminer par mesure de la luciférase sur des cellules HEK-293 que le ratio masse MCA/masse ADN de 8 était intéressant (la quantité d'ADN utilisée étant fixée à 2 µg). En deçà du ratio de 8 l'efficacité de transfection s'est avérée être inférieure et au-delà de 8, les valeurs étaient similaires voire diminuaient à partir du ratio de 12 (données non montrées). Nous avons donc étudié, de façon plus détaillée l'efficacité de transfection des nanoparticules d'ADN-MCA fabriquées à un ratio masse MCA/masse ADN de 8 sur

les deux lignées cellulaires (les HEK-293 et les HBE-16) au cours de 3 expériences indépendantes (**Figure 31**). Nous avons trouvé que le l'ADN complexé avec le MCA transfectait efficacement les cellules HEK-293 ($1,63 \times 10^5$ RLU/mg de protéines) de façon significative statistiquement comparé à l'ADN nu. Par contre, comme pour le chitosan, aucune efficacité de transfection n'a pu être relevée sur les cellules HBE-16.

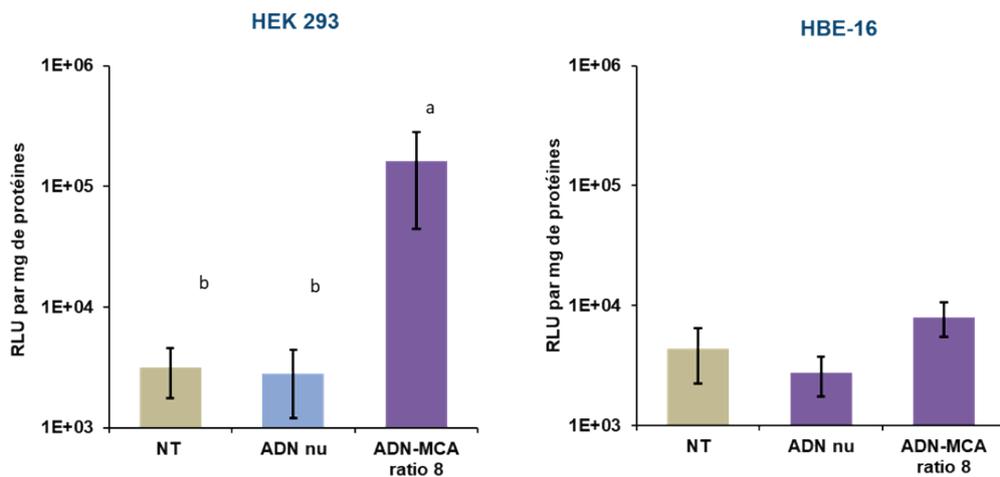


Figure 31. Efficacité de transfection *in vitro* sur des cellules HEK-293 et HBE-16 du chitosan mannosylé (MCA) formulé avec un ADN plasmidique marqueur codant la luciférase. 2 µg d'ADN plasmidique (pTG11033) ont été formulés avec le chitosan mannosylé par coacervation complexe à un ratio masse MCA/masse ADN de 8. La transfection a été faite sur une lignée HEK-293 ou une lignée HBE-16 pour un temps de 72h. Une condition cellules (HEK-293 ou HBE-16) non transfectées a servi de contrôle négatif (NT). La condition ADN nu correspond au plasmide pTG11033 seul. Les valeurs sont exprimées en unités de lumière relative (RLU) par mg de protéines et ont été mesurées à partir des lysats cellulaires à un temps de 72 heures post-transfection. Le résultat affiché représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. Chaque expérience a été réalisée en triplicate \pm ET. Test non-paramétrique Mann-Whitney (ab, $p < 0.05$).

(c) Choix du ratio charge (RC) lipide cationique KLN47/ADN plasmidique (pTg11033) optimal.

Pour le lipide cationique KLN47, du fait que cette formulation nous avait été fournie par la plateforme SynNanoVect et que le protocole de mesure de bioluminescence pour évaluer l'efficacité de transfection nous a été fourni par cette même plateforme, nous avons dès le départ des indications sur les conditions optimales (meilleur compromis entre efficacité transfection et toxicité cellulaire) à

évaluer. Nous avons gardé les conditions qu'ils nous avaient recommandées, à savoir 250 ng d'ADN formulé à des ratios charges (RC) de 1 et/ou 2. Une efficacité de transfection positive a pu être déterminée sur les deux types cellulaires testés : $1,68 \text{ E}+6$ (RC 1) et $9,93 \text{ E}+5$ (RC 2) RLU/mg de protéines pour les HEK-293 et $2,16 \text{ E}+6$ (RC 1) et $5,93 \text{ E}+5$ (RC 2) RLU/mg de protéines pour les HBE-16. Le KLN47 a donc une efficacité de transfection positive par rapport à la condition ADN nu (plasmide pTG11033 seul) pour les 2 lignées cellulaires, et ce de façon significative sur 3 expériences indépendantes (**Figure 32**).

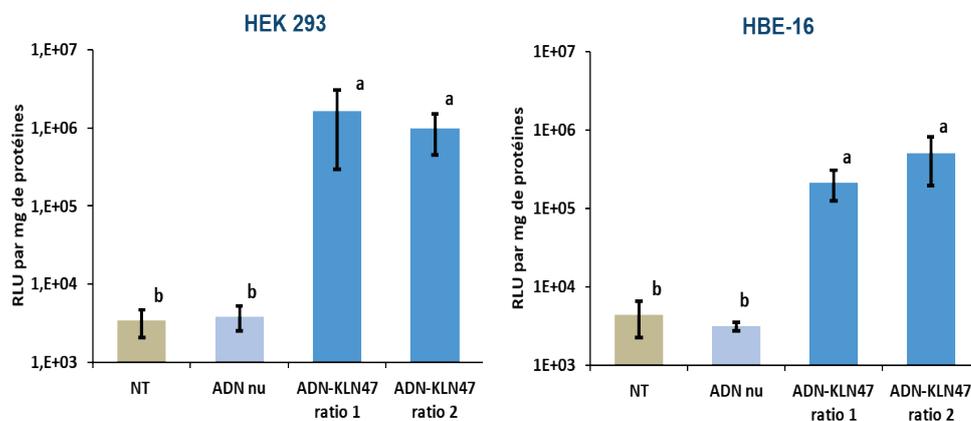


Figure 32 : Efficacité de transfection *in vitro* sur des cellules HEK-293 et HBE-16 du KLN47 formulé avec un ADN plasmidique marqueur codant la luciférase. 250 ng d'ADN plasmidique (pTG11033) ont été formulés avec le KLN47 à différents ratios charges. La transfection a été faite sur une lignée HEK-293 ou HBE-16 pour un temps de 72h. Une condition cellules (HEK-293 ou HBE-16) non transfectées a servi de contrôle négatif (NT). La condition ADN nu correspond au plasmide pTG11033 seul. Les valeurs sont exprimées en unités de lumière relative (RLU) par mg de protéines et ont été mesurées à partir des lysats cellulaires à un temps de 72 heures post-transfection. Le résultat affiché représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. Chaque expérience a été réalisée en triplicate \pm ET. Test non-paramétrique Mann-Whitney (ab, $p < 0.05$).

(d) **Caractérisation *in vitro* du PLGA-PEI nanovectorisé avec un ADN plasmidique (pTg11033) codant la luciférase.**

Des analyses *in vitro* préliminaires ont été également faites avec la formulation PLGA-PEI. Nous avons pu déterminer par mesure de la luciférase sur des cellules HEK-293 que le ratio masse MCA/masse ADN de 12 était intéressant (la quantité d'ADN utilisée étant fixée à 1 μg). En deçà du ratio de 12 (masse nanoparticules PLGA-

PEI/masse d'ADN), l'efficacité de transfection s'est avérée être nulle (avec une adsorption assez aléatoire de l'ADN sur les nanoparticules de PLGA-PEI). Au-delà de 12, les niveaux de luciférase détectés étaient similaires à ceux mesurés au ratio de 12 (données non montrées). On peut noter qu'avec ce ratio de 12 une quantité très élevée de nanoparticules était nécessaire pour formuler notre ADN. Comme pour les autres formulations, nous avons donc étudié sur 3 expériences indépendantes l'efficacité de transfection des nanoparticules PLGA-PEI (ratio de 12) sur les deux lignées cellulaires (les HEK-293 et les HBE-16). Les résultats obtenus pour les HEK-293 ont été publiés dans notre article de thèse qui vous sera présenté dans la suite de ce manuscrit. Nous avons trouvé que les nanoparticules d'ADN-PLGA-PEI transfectait également efficacement les cellules HBE-16 (1,22 E+6 RLU/mg de protéines), et ce de façon significative comparé à l'ADN nu (**Figure 33**).

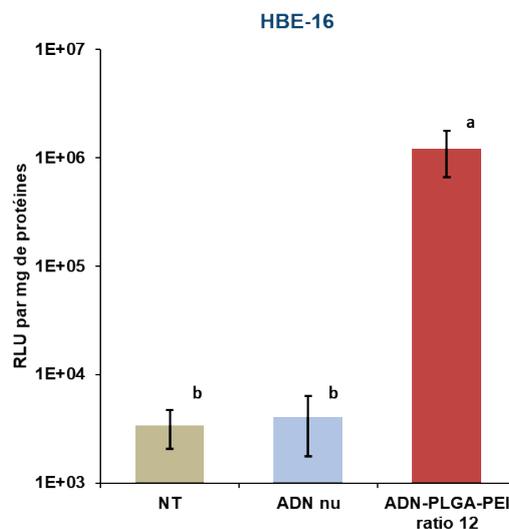


Figure 33 : Efficacité de transfection *in vitro* sur des cellules HBE-16 des nanoparticules de PLGA-PEI adsorbées avec un ADN plasmidique marqueur codant la luciférase. 1 µg d'ADN plasmidique (pTG11033) ont été adsorbées sur des nanoparticules de PLGA-PEI à un ratio masse nanoparticule PLGA-PEI/masse d'ADN de 12. La transfection a été faite sur une lignée HBE-16 pour un temps de 72h. Une condition cellules (HBE-16) non transfectées a servi de contrôle négatif (NT). La condition ADN nu correspond au plasmide pTG11033 seul. Les valeurs sont exprimées en unités de lumière relative (RLU) par mg de protéines et ont été mesurées à partir des lysats cellulaires à un temps de 72 heures post-transfection. Le résultat affiché représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. Chaque expérience a été réalisée en triplicate ± ET. Test non-paramétrique Mann-Whitney (ab, $p < 0.05$).

(e) Evaluation de la cytotoxicité des formulations

La sureté des formulations a été évaluée *in vitro* avec un test de cytotoxicité basé sur la détection quantitative de la lactate déshydrogénase (LDH) (**Figure 34**). Cette enzyme est libérée dans le surnageant de culture cellulaire lorsque les cellules sont lysées suite à un effet cytotoxique de constituants mis en contact des cellules. La LDH est donc un bon indicateur d'effet cytotoxique, ou si on l'analyse sous l'angle opposé, permet *a contrario* d'évaluer la viabilité cellulaire. Pour chaque condition/formulation, un témoin négatif a été réalisé en utilisant des cellules non traitées exposées au tampon solvant seul utilisé pour chacune des formulations (dans un mélange de tampon acétate de sodium 5 mM / solution de sulfate de sodium 25 mM mélangés volume à volume au 1/2 pour le chitosan, dans du tampon phosphate sodium 10 mM pour le MCA et dans de l'eau ultrapure pour le KLN47 ou PLGA-PEI). A soixante-douze heures post-transfection la viabilité cellulaire des cellules de la lignée HEK-93 ou HBE-16 (**Figure 34**) a été évaluée. Il en a résulté qu'aucune formulation, parmi les quatre évaluées et dans les conditions évaluées, ne s'est avérée être cytotoxique sur les deux lignées cellulaires testées. De cette façon, elles peuvent être considérés comme sûres pour les rapports masse/masse testés ou les rapports de charge qui avaient été retenus suite aux tests d'efficacité de transfection. On peut souligner que par rapport à de nombreux autres lipides cationiques, le lipoplexe KLN47 est considéré comme étant un des lipides cationiques les moins cytotoxiques (Berchel et al. 2015). Cela dépend principalement du ratio charge (RC) utilisé. Ici, vous pouvez constater qu'à un RC de 1 le KLN47 n'est cytotoxique ni pour les HEK-293 ni pour les HBE-16. Par contre à partir du RC 2 la viabilité cellulaire commence à diminuer (72 % et 76 % pour les lignées HEK293 et HBE-16, respectivement).

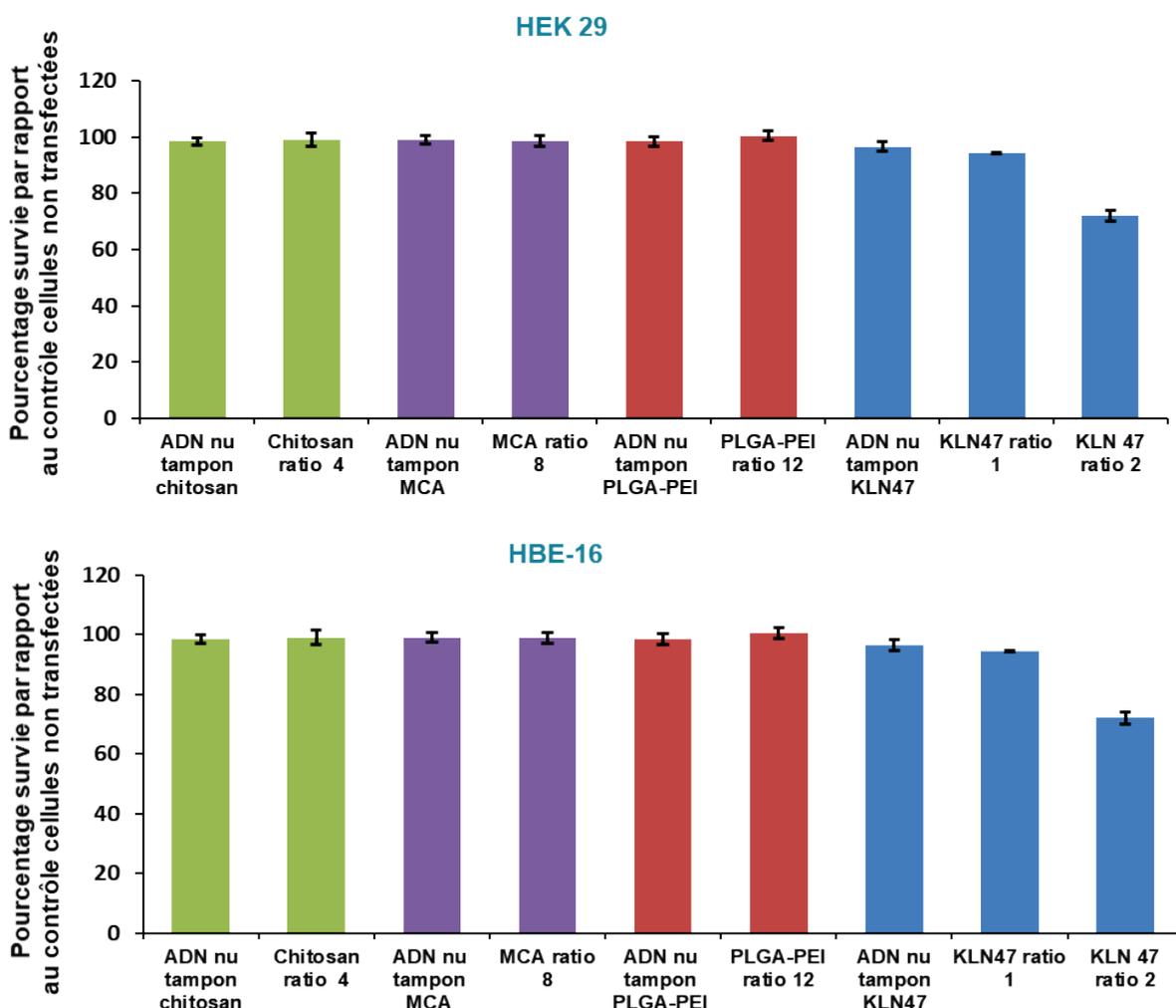


Figure 34. Viabilité cellulaire mesurée à 72 heures post-transfection. La condition contrôle cellules non transfectées pour les 2 lignées cellulaires HEK-293 et HBE-16 a servi de niveau de référence (NT) et correspond à 100 % de viabilité cellulaire. La cytotoxicité a été mesurée sur des cellules HEK293 ou HBE-16 transfectée tel que décrit précédemment. Pour le chitosan ou chitosan mannosylé, 2 µg d'ADN plasmidique (pTG11033) ont été formulés par coacervation complexe à des ratios masse chitosan ou MCA/masse d'ADN de 4 et de 8, respectivement. Pour la condition PLGA-PEI, 1 µg d'ADN plasmidique (pTG11033) ont été adsorbées sur des nanoparticules de PLGA-PEI à un ratio masse nanoparticule PLGA-PEI/masse d'ADN de 12. Pour le KLN47 250 ng d'ADN plasmidique (pTG11033) ont été formulés avec le KLN47 à un ratio charge de 1 ou 2. Pour chaque nanovecteur, la viabilité a été comparée à celle obtenue avec le tampon utilisé pour conserver ce nanovecteur.

5. Bilan général de la partie étude *in vitro*

L'ensemble de ces résultats montre que la nanovectorisation de l'ADN est nécessaire pour transférer les cellules *in vitro* d'une manière plus efficace qu'avec de l'ADN plasmidique nu (non vectorisé). Pour ainsi dire, sur la base de ces résultats *in vitro*, l'utilisation de nanoparticules polymérique ou de lipides cationiques apparaît comme étant prometteuse pour l'administration nasale d'ADN plasmidiques d'intérêt en raison de leurs capacités à mieux transférer les cellules que sans ceux-ci. Pour le chitosan et le chitosan mannosylé, l'efficacité de transfection était dépendante de la lignée cellulaire utilisée. Les cellules HEK-293 étaient facilement transfectables alors que les cellules HBE-16 ne l'étaient pas (dans les conditions étudiées ici). En ce qui concerne le PLGA-PEI et le KLN47, ces différences d'efficacité de transfection n'avaient pas été observées. Cependant, nous pouvons souligner que ces observations sont uniquement basées sur l'utilisation d'un plasmide marqueur. Ainsi, nous pouvons nous interroger si les formulations sont aussi efficaces avec d'autres types de plasmides, y compris notre plasmide vaccinal pcDNA3-gB qui code pour la glycoprotéine B du virus PrV. Par ailleurs, aucune des nanovectorisations de l'ADN ne s'est révélée toxique pour les 2 lignées de cellules testées.

De plus, ces données préalables nécessaires obtenues *in vitro* devaient bien sûr être approfondies *in vivo* chez le porc étant donné qu'il existe un écart énorme entre les modèles *in vitro* dérivés de cellules humaines et l'environnement muqueux porcin en conditions réelles (*in vivo*).

De façon générale, il a souvent été constaté dans la littérature avec ce type de nanovecteurs qu'une bonne bioactivité *in vitro* ne présageait pas automatiquement d'une bonne performance biologique *in vivo* (Ragelle et al. 2014). Ces modèles *in vitro* sont en fait assez peu prédictibles même si bien entendu, ils nous donnent des indications sur les nanovecteurs qui pourraient être potentiellement les plus efficaces. Cette différence est principalement due l'environnement chimique difficile des muqueuses (mucus, protéases etc...), à la présence du système immunitaire

(implication notamment des CPAs et cellules M pouvant être impliquées dans la prise en charge d'antigènes), aux interactions tri-dimensionnelles entre plusieurs types de cellules dans les tissus (comparé à une lignée cellulaire *in vitro* juste cultivée en deux dimensions) ainsi qu'aux nombreuses barrières extracellulaires rencontrées dans l'environnement muqueux (Mastorakos et al. 2015). Toutes ces contraintes sont à prendre en compte en plus et sont autant de facteurs supplémentaires à maîtriser lors de la réalisation d'essais d'inoculation *in vivo* par la voie intranasale d'ADN nanovectorisé.

C. Poursuite du projet de thèse - Etude *in vivo* d'inoculation par la voie intranasale d'ADN plasmidique nanovectorisé chez le porc

Au cours de cette thèse, quatre essais au total ont par la suite été réalisés en animalerie porcine. Ceux-ci se sont effectués conformément aux bonnes pratiques en expérimentation animale et ont été autorisés suite au dépôt d'une saisine auprès d'un comité d'éthique (Annexe #1 : Saisine #1 pour le comité d'éthique ; Annexe #2 : Saisine #2 pour le comité d'éthique).

L'immense majorité des essais de vaccination à ADN par voie intranasale a été réalisée sur des modèles murins. Dans ce cas, le volume de vaccin occupe tout au moins une grande partie de la cavité nasale. Du fait de la grande différence de taille entre la cavité nasale murine et porcine, il est évident que la technique d'inoculation par voie intranasale doit être adaptée à la taille et à la morphologie des muqueuses nasales et plus largement respiratoires du porc. Dans la littérature, des auteurs ont utilisé un système artisanal composé d'une seringue prolongée d'un tuyau pour atteindre le fond de la cavité nasale chez le mouton (Vujanic et al. 2012). Nous avons donc choisi, avec l'aide de Zoopôle Développement et de nos collègues de la plateforme SynNanoVect, d'évaluer une stratégie similaire dans un premier temps. Dans ce cas, nous avons utilisé comme plasmide à inoculer un plasmide codant la luciférase, de manière similaire avec ce qui a été réalisé pour les évaluation *in vitro*. Puis, comme nous le verrons ci-dessous, cette stratégie n'ayant rien donné, nous avons choisi de modifier à la fois la stratégie d'inoculation en utilisant une seringue équipée d'un atomiseur et en analysant l'induction de réponses immunitaires générées suite à l'inoculation de plasmides codant une protéine vaccinale (la glycoprotéine B (gB) du PrV). Nous verrons que cette dernière stratégie a été plus fructueuse et a permis de réaliser 3 essais porcins consécutifs.

D. Résultats - Caractérisation du ciblage *in vivo* des muqueuses nasales chez le porc avec un plasmide marqueur nanovectorisé avec le chitosan ou le chitosan mannosylé (essai #1)

Dans un premier temps, nous avons réalisé dans cet **essai #1** une étude de faisabilité afin de pouvoir évaluer le ciblage des muqueuses nasales. Cet essai #1 a été réalisé avec un groupe de dix porcs au total. Ceux-ci ont été inoculés avec un plasmide ADN marqueur pTG11033 codant le gène de la luciférase de luciole. Au niveau des conditions, cet ADN a été formulé/nanovectorisé sous forme de nanoparticules de chitosan ou bien de chitosan mannosylé. Sur ce tout premier essai, nous nous sommes focalisés sur ces deux vecteurs, en particulier, pour des raisons pratiques et financières. Il se trouve que ce type de formulation est productible aisément par nos propres moyens au sein de notre laboratoire en grande quantité et que celles-ci ont un coût très limité comparé aux deux autres formulations (PLGA-PEI et à plus forte mesure le lipide cationique KLN47).

Cet essai comportait deux objectifs principaux :

- Prendre en main et se familiariser de façon pratique en animalerie à de l'inoculation des porcs par la voie intranasale.
- Déterminer si la nanovectorisation avec le chitosan ou le chitosan mannosylé peut permettre de favoriser le transfert de gène au niveau des épithéliums de la cavité nasale du porc.

a) Méthodologie essai #1 : conditions expérimentales d'inoculation

Les porcs ont été répartis en trois groupes pour cet **essai #1**. Quatre porcs ont été inoculés par voie intranasale avec le plasmide codant la luciférase (pTG11033) que nous avons encapsulé avec du **chitosan (groupe #1)**, quatre porcs ont été inoculés avec ce même plasmide encapsulé avec du **chitosan mannosylé (groupe #2)** et enfin deux porcs non inoculés ont servi de **témoins négatifs (groupe #3)**.

Les porcs des **groupes #1 et #2** ont pour chacun reçu un total de 400 µg d'ADN plasmidique inoculé intranasalement (à raison de 200 µg par narine). L'administration a été effectuée avec l'aide d'une seringue munie d'un prolongateur de façon à atteindre le septum nasal (muqueuse située le long de la cloison nasale médiane) que l'on souhaitait cibler/transfecter avec nos préparations vaccinales. Trois jours après la réalisation des inoculations, les animaux ont été sacrifiés ; le septum nasal a été prélevé lors des autopsies et l'expression de la luciférase y a été recherchée par bioluminescence.

b) Prélèvements de septums de la muqueuse nasale porcine

Au niveau méthodologique, les prélèvements de septums nasaux ont été effectués en salle d'autopsie en collaboration avec des personnes de la structure Zoopôle Développement (Ploufragan) qui ont l'habitude de travailler sur le terrain sur des élevages. Ce type de prélèvement nous a été appris par une collègue revenant tout juste d'une formation dans une équipe belge spécialisée sur les explants de muqueuse (Frydas and Nauwynck 2016). Celle-ci nous a retransmis de façon pratique en salle d'autopsie les connaissances acquises.

Au moment de l'autopsie, nous avons découpé puis lavé la tête du porc avec du savon en faisant attention à ne pas faire rentrer d'eau dans le groin, avant de désinfecter la tête avec de l'éthanol. Nous avons alors tracé au scalpel une ligne

légèrement en biais puis découpé la tête de porc en deux à l'aide d'une scie en faisant bien attention à ne pas abîmer le septum nasal. Afin d'éviter tout risque de contamination du tissu prélevé, il a été nécessaire de toucher la muqueuse nasale le moins possible avec la pince. A cette étape, nous avons extrait le septum en entier à l'aide d'un couteau puis plongé celui-ci dans une bouteille contenant du milieu de culture dit « milieu de transport » (PBS supplémenté en antibiotiques avec 1 % de Gentamycine, 1 % de Pénicilline/Streptomycine, 1 % de Kanamycine et 0,1 % de Fungizone). Le tout a alors été immédiatement placé dans de la glace.

Cette deuxième partie du traitement du septum nasal devait se faire impérativement dans les cinq heures qui suivaient le prélèvement et devait être intégralement réalisée sous un PSM avec du matériel ayant été préalablement autoclavé. Pour cela, nous avons sorti le septum du pot avec une pince et placé celui-ci dans un bac métallique. A ce stade, la muqueuse ne devait absolument pas s'assécher et celle-ci a donc été régulièrement recouverte de milieu sans sérum (milieu 50 % RPMI, 50 % DMEM, 1 % Gentamycine et 1 % Pénicilline/Streptomycine). Nous avons alors extrait la muqueuse en calant le septum au niveau du bord du bac de façon à ce qu'il ne bouge pas pendant la découpe. Un scalpel et une pince à bout plat ont alors été utilisés pour prélever le tissu. Nous avons tenu le tissu au coin avec la pince et utilisé notre scalpel comme si on tenait un stylo et manié celui-ci de façon à être positionné au maximum à l'horizontale pour ne pas déchirer le tissu (de façon pratique, il est recommandé que cette étape soit effectuée avec l'aide d'une tierce personne). Une fois la muqueuse nasale extraite, celle-ci a été immédiatement placée dans 500 µl de tampon de lyse PLB 1X (Promega) puis congelée et stockée à - 80 °C. Avant analyse, les échantillons de muqueuses endothéliales nasales ont été découpés puis broyés 15 min avec un broyeur à billes. Ensuite, l'activité luciférase du plasmide marqueur pTG11033 associé au chitosan ou au chitosan mannosylé inoculé *in vivo* trois jours plus tôt a été déterminée.

Il s'est avéré, malheureusement, qu'aucune expression de la luciférase n'a pu être décelée par bioluminescence. Au vu des résultats décevants obtenus dans cette étude de faisabilité (**essai #1**), nous avons décidé de changer de stratégie de recherche pour évaluer l'efficacité de l'inoculation en recherchant plutôt indirectement la transfection de cellules au niveau des muqueuses par l'induction des réponses immunitaires systémiques et mucosales.

Ainsi, pour les essais *in vivo* suivants (**essais #2, #3 et #4**), nous avons utilisé comme ADN plasmidique un plasmide codant la glycoprotéine B du virus de la pseudorage porcine ; cette protéine est connue comme étant fortement immunogène (Le Moigne et al. 2012; Dory et al. 2009). Par ailleurs, l'immunogénicité de cette protéine a été augmentée en lui associant un plasmide codant le GM-CSF. Cet effet adjuvant s'était révélé comme étant efficace lors d'essais d'amélioration de réponses immunitaires protectrices suite à l'inoculation d'un vaccin à ADN nu contre ce virus inoculé par la voie intramusculaire (Dufour et al. 2000). En procédant de cette façon, il était ainsi possible d'évaluer le ciblage des cellules d'intérêt indirectement en mesurant l'induction des réponses immunitaires contre cette glycoprotéine B.

E. Résultats de thèse : Evaluation de la réponse immunitaire induite par un plasmide codant pour la glycoprotéine B du virus de la pseudorage porcine adjuvanté avec un plasmide codant le GM-CSF (essais #2, #3 et #4)

a) Méthodologie

Pour cette grande partie expérimentale dédiée à « l'évaluation de la réponse immunitaire induite contre la glycoprotéine B du PrV », trois essais avec des effectifs porcins plus ou moins variables ont pu être conduits sur la dernière partie de la thèse.

- **Essai #2 (n= 16 porcs) dont certains résultats sont présentés dans l'article de thèse.**

Cet essai visait à rechercher les réponses immunitaires induites par un plasmide codant la glycoprotéine B du virus de la pseudorage porcine nanovectorisé avec du chitosan ou du chitosan mannosylé et inoculé par la voie intranasale.

- **Essai #3 (n=7 porcs) présenté en tant que résultats indépendants dans le manuscrit.**

Cet essai avait pour but d'étudier l'impact de la variation de certains paramètres de l'inoculation de l'ADN plasmidique codant des glycoprotéines du PrV nanovectorisé avec le chitosan sur les réponses immunitaires induites.

- **Essai #4 (n= 20 porcs) dont certains résultats sont présentés dans l'article de thèse.**

Cet essai avait pour but de comparer les réponses immunitaires induites par un plasmide codant la glycoprotéine B du PrV combiné avec chacun des quatre nanovecteurs et inoculé par la voie intranasale.

1. Méthodologie - Essai #2 (n= 16 porcs) : Réponses immunitaires induites par un plasmide codant la glycoprotéine B du virus de la pseudorange porcine nanovectorisé avec du chitosan ou du chitosan mannosylé et inoculé par la voie intranasale

Cinq groupes de 3 porcelets ont été utilisés ici : ADN nu en intranasal (IN), ADN-chitosan en IN, ADN-MCA en IN, ADN nu inoculé par la voie intramusculaire (IM = voie de référence par rapport aux expériences antérieures de l'équipe) et enfin un groupe de porcs non-inoculés (NI). Les animaux ont été inoculés à 3 reprises avec un écart de 10 jours entre chaque inoculation pour laisser du temps au système immunitaire de répondre à chaque inoculation. Puis les animaux ont été suivis jusqu'à 18 jours après la dernière inoculation. Des prélèvements sanguins ont été réalisés tous les 8-10 jours pour rechercher les anticorps de type IgG et IgA anti-PrV sériques, ainsi que des cellules productrices d'interféron-gamma (marqueur de la réponse cellulaire). La salive et le mucus nasal ont été prélevés après la 3^{ème} inoculation. Enfin, un prélèvement des amygdales et un écouvillonnage nasal ont été réalisés au moment de l'autopsie des animaux après leur sacrifice. Le déroulé de l'essai est schématisé dans la figure qui suit (Figure 35).

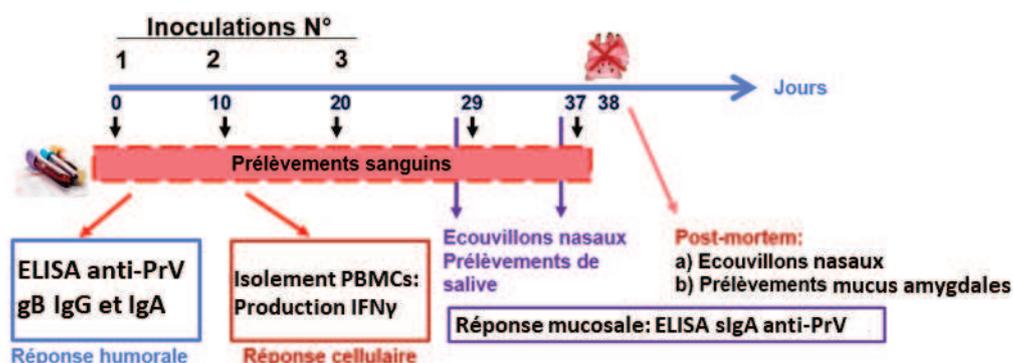


Figure 35. Représentation schématique du déroulé de l'essai #2.

La distribution des mâles et femelles s'est faite de façon randomisée. La répartition des groupes d'animaux est la suivante :

- **Groupe #1 (n=2 porcelets) : témoin négatif non inoculé (NI)**
- **Groupe #2 (n=3 porcelets) : ADN non formulé inoculé en intramusculaire (ADN nu IM)**
- **Groupe #3 (n=3 porcelets) inoculé en IN avec de l'ADN (ADN nu IN)**
- **Groupe #4 (n=3 porcelets) : inoculé avec le chitosan en IN (ADN-CS IN)**
- **Groupe #5 (n=3 porcelets) : inoculé avec le MCA en IN (ADN-MCA IN)**

a) Conditions générales de logement et répartition des animaux pour conduire l'essai

Les animaux ont été élevés au sein de l'unité expérimentale du SPPAE (Service de Production Porcine Assainie et Expérimentale) de l'Anses dans des parcs indépendants entre eux. L'accès à ces animaleries est strict, protégé et formalisé selon des procédures spécifiques : passage de SAS avec douche obligatoire et vigilance sur le port des EPI (équipements de protection individuelle). Les conditions d'hébergement s'effectuent conformément aux normes réglementaires nationales. Chaque bloc de la structure contient 2 parcs. Dans cet essai, chaque parc contenait au maximum 3 porcs. Les porcs témoins négatifs non inoculés (condition NI) ont été hébergés dans un ensemble de blocs différent (couloir général d'accès séparé) des autres blocs (bloc D4). Les porcs inoculés avec nos formulations d'intérêt (chitosan et chitosan mannosylé) étaient hébergés dans un deuxième bloc (bloc B2). Enfin, les porcs inoculés par les voies IN ou IM avec des préparations d'ADN nu étaient hébergés dans un troisième bloc (bloc B3). Par ailleurs, les parcs du bloc B2 contenant les porcs inoculés avec le chitosan et le chitosan mannosylé étaient séparés avec l'aide d'une bâche. Un lavage des bottes est effectué lors du passage d'un parc à l'autre dans un même bloc. Les mêmes précautions étaient prises pour les deux parcs du bloc B3.

b) Essai #2 : Préparation des inoculums

Pour cet essai #2, les inoculums ont été préparés pendant la semaine précédant la date d'inoculation. A cet effet, les protocoles de fabrication/production des inoculums ont été identiques à ceux utilisés précédemment pour l'étude *in vitro* sur des lignées cellulaires.

c) Essai #2 : Méthode d'administration en IN

Au départ de cette grande partie expérimentale, initiée avec cet essai #2, une question s'est vite imposée : comment faire pour administrer intranasalement un porc avec un vaccin donné ? Nous avons considéré que la méthode d'administration retenue devait permettre de couvrir l'ensemble de la cavité nasale porcine au moment de l'inoculation pour plus particulièrement cibler les NALTs se situant dans la zone nasopharyngée (**Figure 36**). Il peut être noté que de nombreuses publications mentionnent juste « administration en IN » sans forcément détailler la façon de procéder.

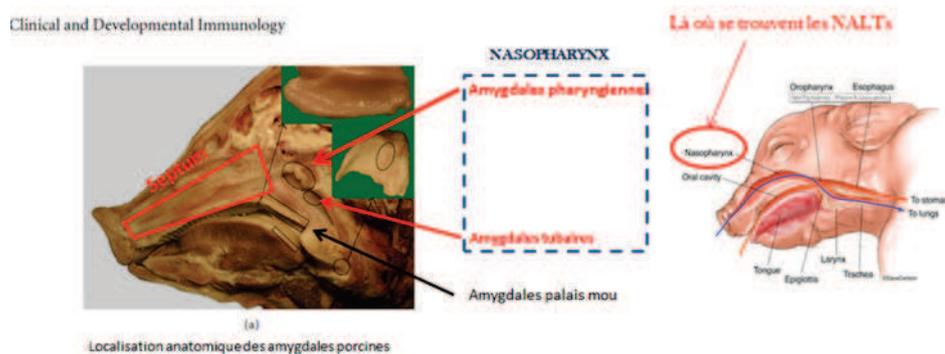


Figure 36. Localisation anatomique du septum, du nasopharynx et des NALTs chez le porc. Le nasopharynx porcine comprend les amygdales pharyngiennes et tubaires du porc. Les principaux sites inducteurs NALTs (Nasopharynx-associated lymphoid tissues) présents dans la cavité nasale du porc sont majoritairement situés au niveau du nasopharynx porcine. Cette zone est donc à cibler prioritairement au moment de l'inoculation par voie IN dans le but d'induire une réponse immunitaire suite à ce type d'inoculation.

L'inoculation a été faite à trois dates différentes (voir schéma de la **Fig. 1** de l'article). Pour se faire nous avons eu recours à un système de pulvérisation spécialement adapté pour une administration sur la muqueuse nasale : le dispositif atomiseur **LMA MAD Nasal MAD100** (Teleflex) associé à une seringue. Il est important de préciser que ce type de dispositif est plutôt vendu en tant que matériel médical pour permettre l'administration de médicaments chez l'humain par voie intranasale (**Figure 37**).

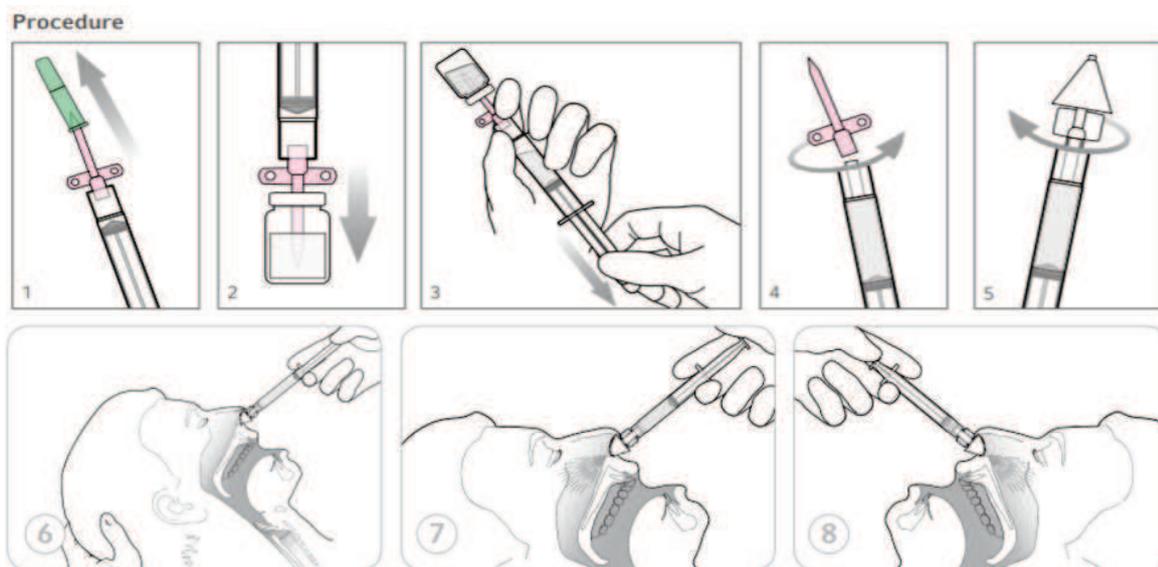


Figure 37. Schéma explicatif du fournisseur montrant la façon de pulvériser à un patient humain un médicament par la voie nasale à l'aide du dispositif MAD100. L'inoculum est prélevé dans la seringue avec une aiguille (1-3). Celle-ci est enlevée et remplacée par la tête amovible MAD nasal qui permettra de pulvériser la préparation (4-5). Pour l'inoculation par la voie IN, le patient doit avoir la tête penchée en arrière, la seringue doit être placée parallèlement à l'axe de la cavité nasale au niveau du nez et le patient doit inspirer en même temps que le médicament est pulvérisé en IN (6-7). Le médicament est inoculé ensuite dans la seconde narine de la même façon (8).

Nous souhaitons voir si ce type de matériel pouvait être efficace chez le porc. Il semble évident que le groin chez le porc est d'une taille bien plus importante que celle du nez chez l'espèce humaine. Cela pourrait suggérer que l'efficacité et la praticité de ce genre de seringues prévues pour l'IN n'était pas certaine pour le modèle porcin. L'autre différence majeure est l'acceptabilité du mode d'administration : un patient humain peut suivre les instructions médicales lorsqu'un médicament lui est

administré en IN avec ce type de seringue (moment opportun pour respirer, manière de pencher la tête en moment de l'administration...). Il en est tout autre chez le porc, pour qui le manipulateur doit adapter l'inoculation à la position de la tête du porc et à la respiration de celui-ci.

Notre vaccin ADN a, pour les conditions IN (soit les **groupes #3, #4 et #5**), été administré avec la seringue MAD100 aux porcs à raison de 2 ml (soit 200 µg d'ADN) dans chaque narine. Les inoculums ont été bien mélangés par inversement extemporanément à l'inoculation (pour homogénéiser la solution). Au niveau de la quantité administrée, nous avons essayé de prendre en compte, le mieux possible, l'espace mort dû aux propriétés intrinsèques de la seringue MAD100 de façon à pouvoir délivrer une dose exacte correspondant à 200 µg de plasmide (150 µg plasmide codant la gB et 50 µg de plasmide codant le GM-CSF utilisé comme adjuvant) dans chacune des narines du porc. De façon pratique, au moment de l'injection, les porcs ont été maintenus par contention physique au lasso. De ce fait, la tête du porc était bien positionnée vers le haut. Pour la pulvérisation, l'embout de la seringue a été disposé dans la narine à l'extrémité du groin de façon à ce que l'axe de la seringue soit parallèle à l'axe du groin (voir schéma de la **Figure 38**). L'inoculation a été réalisée quand le porc inspirait.

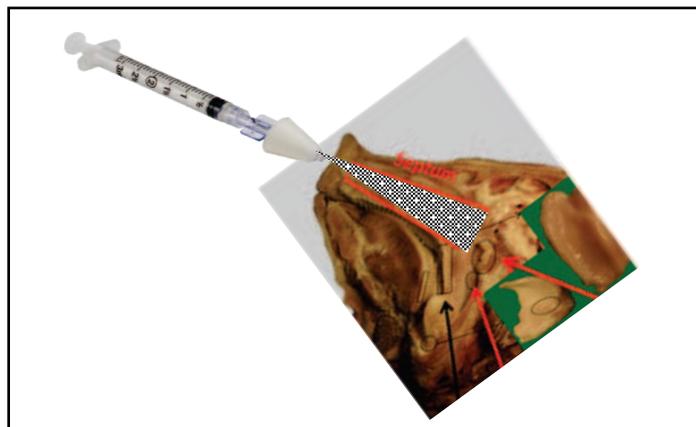


Figure 38. Schéma montrant la façon d'inoculer le porc par la voie intranasale avec la seringue MAD100 qui sert à pulvériser la dose vaccinale.

2. Méthodologie - Essai #3 (n=7 porcs) : Etude de l'impact de la variation de certains paramètres de l'inoculation de l'ADN plasmidique nanovectorisé avec le chitosan sur la génération de réponses immunitaires anti-PrV

Afin de rechercher des stratégies permettant d'améliorer l'efficacité vaccinale, un troisième essai de mise au point a été réalisé afin d'évaluer, sur un nombre très restreint de porcs, l'impact de différentes conditions expérimentales (association de la gC et de la gD du PrV à la gB pour inoculer un vaccin avec 3 immunogènes connus pour induire des réponses immunitaires protectrices lorsqu'ils sont inoculés ensemble ; triplement de la quantité de vaccin inoculé ; utilisation d'un dispositif MAD d'inoculation plus profond dans les narines). Pour cela sept porcelets âgés de 8 semaines environs ont été inoculés comme il suit :

- **Porcelet #1** non inoculé (NI) ;
- **Porcelet #2** inoculé 3 fois en IN avec une dose contenant 200 µg de pcDNA3-gB, 200 µg pcDNA3-gC, 200 µg pcDNA3-gD et 50 µg pcDNA3-GM-CSF formulé avec du chitosan par narine (**MixADN-Cs IN**);
- **Porcelet #3** inoculé 3 fois en IM avec une dose contenant 400 µg pcDNA3-gB, 400 µg pcDNA3-gC, 400 µg pcDNA3-gD et 100 µg pcDNA3-GM-CSF (**MixADN nu IM**) ;
- **Porcelet #4** inoculé 3 fois en IN avec une dose contenant 200 µg de pcDNA3-gB et 50 µg de pcDNA3-GM-CSF formulé avec du chitosan par narine (**ADN-Cs 1X IN**) ;
- **Porcelet #5** inoculé 3 fois en IN avec une dose contenant 200 µg de pcDNA3-gB et 50 µg de pcDNA3-GM-CSF formulé avec le chitosan par narine. Administration avec l'atomiseur long (**ADN-Cs IN long**) ;
- **Porcelet #6** inoculé 3 fois en IN avec une dose contenant 600 µg de pcDNA3-gB et 50 µg de pcDNA3-GM-CSF formulé avec le chitosan par narine (**ADN-Cs 3X**) ;
- **Porcelet #7** inoculé 3 fois en IN avec une dose contenant 600 µg de pcDNA3-gB et 50 µg de pcDNA3-GM-CSF par narine (**ADN nu 3X IN**)

Le tableau 6 récapitule les conditions effectuées.

Tableau 6 : récapitulatif des conditions testées durant l'essai #3

	Chitosan	pcDNA3-GM-CSF	pcDNA3-gB	pcDNA3-gC	pcDNA3-gD	Volume administré
ADN-Cs 1X IN	Oui	50 µg/narines	200 µg/narines			2 mL/narines
ADN-Cs 3X			600 µg/narines			
ADN nu 3X IN			600 µg/narines			
ADN-Cs IN long	Oui		200 µg/narines			
MixADN-Cs IN			200 µg/narines			
MixADN nu IM		100 µg	400 µg	400 µg	400 µg	2 mL injecté à l'encolure gauche
NI						

L'inoculation a été faite à trois reprises à 10 jours d'intervalle (J0, J10 et J20) grâce à un système de pulvérisation spécialement adapté pour une administration en IN : le dispositif LMA MAD Nasal associé à une seringue MAD100 (Teleflex) (sauf pour le porc inoculé plus profondément). Les inoculations IN ont été faite avec 2 ml d'inoculum pulvérisé dans chaque narine. Différentes compositions du vaccin (gB seul ou gB+gC+gD) ou différentes doses (x1 ou x3) ont été comparées. Pour la condition ADN-Cs long, nous avons utilisé un atomiseur dit « MADgic » dont le principe est semblable à celui de l'atomiseur MAD100 (décrit précédemment) mais celui-ci dispose en plus d'un prolongateur afin d'inoculer le vaccin plus profondément dans les narines et de faciliter ainsi l'accès aux NALTs situés aux environs du Nasopharynx. Un porc inoculé par la voie intramusculaire avec de l'ADN plasmidique nu a servi de témoin positif et un porc non inoculé a servi de témoin négatif. Des prélèvements sanguins ainsi que des prélèvements de salives ont été réalisés tout au long de l'essai.

3. Méthodologie - Essai #4 (n=20 porcs) : Réponses immunitaires induites par un plasmide codant la glycoprotéine B du virus de la pseudorange porcine combiné avec chacun des quatre nanovecteurs et inoculé par la voie IN.

Pour cet essai #4, nous disposions en tout de 20 porcelets âgés de 8 semaines (dont 4 porcelets non inoculés utilisés conjointement avec une autre équipe comme porcs témoins négatifs). La méthodologie effectuée pour réaliser l'essai #4 est décrite dans la partie 2.3. de l'article publié, à l'exception près qu'il y a des groupes en plus (les groupes chitosan, chitosan mannosylé et KLN47 qui seront présentés en tant que résultats complémentaires dans ce manuscrit de thèse). En effet, dans l'article publié nous nous sommes focalisés uniquement sur le PLGA-PEI, vu qu'aucune des formulations étudiées n'était sortie du lot parmi nos conditions expérimentales.

Les 4 formulations suivantes ont donc été évaluées au cours d'un même essai : le chitosan, le chitosan mannosylé, le PLGA-PEI et le KLN47 (3 porcs par formulation). L'ADN plasmidique codant la gB du PrV a été complexé avec chacune des formulations et inoculé par la voie IN. L'atomiseur MAD®100 a de nouveau été utilisé. En contrôle, il y a eu 3 porcs inoculés avec l'ADN plasmidique nu par voie IN, un porc inoculé avec l'ADN nu par la voie IM (à nouveau en tant que témoin positif) et quatre porcs non inoculés. Les porcs ont été inoculés à 3 reprises à environ 10 jours d'intervalle et ils ont été suivis jusqu'à J49 (suivi plus long que lors des essais précédents). Nous avons également décidé de pratiquer des prélèvements de salive plus réguliers et ce à partir du début de l'essai de manière à avoir un suivi de la réponse mucosale locale tout au long de l'essai. Malheureusement, un porc du groupe chitosan a dû être abattu de manière compassionnelle car il s'était blessé à la patte arrière gauche.

Les groupes ont été divisés en six conditions de la façon suivante :

- **Groupe #1** (n= 3 porcelets) inoculé IN dans chaque narine avec une dose contenant 150 µg pcDNA3-gB et 50 µg pcDNA3-GM-CSF non formulés (**ADN nu IN**) ;
- **Groupe #2** (n= 3 porcelets) inoculé IM dans l'encolure gauche du cou avec une dose contenant 300 µg pcDNA3-gB et 100 µg pcDNA3-GM-CSF non formulés (**ADN nu IM**) ;
- **Groupe #3** (n= 3 porcelets) inoculé IN dans chaque narine avec une dose contenant 150 µg de pcDNA3-gB et 50 µg de pcDNA3-GM-CSF formulés avec le KLN47 (**ADN-KLN47 IN**) ;
- **Groupe #4** (n= 3 porcelets) inoculé IN dans chaque narine avec une dose contenant 150 µg de pcDNA3-gB et 50 µg de pcDNA3-GM-CSF formulés avec le PLGA-PEI (**ADN-PLGA-PEI IN**) ;
- **Groupe #5** (n= 3 porcelets) inoculé IN dans chaque narine avec une dose contenant 150 µg de pcDNA3-gB et 50 µg de pcDNA3-GM-CSF formulés avec le chitosan (**ADN-Cs IN**) ;
- **Groupe #6** (n= 3 porcelets) inoculé IN dans chaque narine avec une dose contenant 150 µg de pcDNA3-gB et 50 µg de pcDNA3-GM-CSF formulé avec le chitosan mannosylé (**ADN-MCA IN**)

Comme expliqué plus haut, seule une partie des résultats de l'essai #4 a été publiée dans l'article, en combinaison avec certains résultats de l'article #2.

4. Introduction et objectifs de l'article de thèse

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction de cette thèse, il y a un besoin de développer de nouvelles stratégies vaccinales chez les animaux de rentes, tels que le porc. En particulier, il serait important de disposer de stratégies qui neutralisent le pathogène ciblé dès son entrée dans l'organisme, au niveau des muqueuses. Par ailleurs, des vaccins sous-unitaires seraient souhaitables. La vaccination à ADN représente une voie de recherche pertinente. Néanmoins, et cela malgré des progrès considérables ont été obtenus dans le domaine, il n'existe à ce jour que très peu de vaccins à ADN vétérinaires disponibles et autorisés commercialement (quatre vaccins en tout dont un seul uniquement est autorisé en Europe, celui contre la pancréatite du saumon) (Dalmo 2018). Dans ces quatre exemples, la voie d'administration est celle parentérale (intramusculaire). Là aussi, la voie intranasale représente une voie intéressante pour le développement de nouveaux vaccins à ADN chez le porc. Pour étudier cette voie, nous allons mettre à profit notre modèle de vaccin à ADN contre le virus de la pseudoréponse porcine qui permet d'induire une réponse immunitaire protectrice lorsque ce vaccin est inoculé par la voie intramusculaire.

L'article de thèse, publié en 2020 dans le journal « Research in Veterinary Science » présente les résultats combinés des essais #2 et #4 conduits durant cette thèse. Au vu des résultats qui avaient été obtenus, nous avons décidé de présenter, dans cet article, uniquement les conditions ADN nu et PLGA-PEI-ADN administrées en intranasal ainsi que les conditions contrôles qui avaient été faites (porcs non inoculés (témoin négatif) et ADN nu administré en intramusculaire (témoin positif)). Ce choix a été fait par souci de clarté par rapport au message que nous souhaitions transmettre avec cet article. Nous souhaitons en effet mettre en avant les résultats originaux et prometteurs obtenus avec la condition ADN nu IN pour lesquels nous avons montré

dans chacun des 3 essais réalisés la mise en place d'une réponse immunitaire à la fois locale et systémique. Les résultats avec les 4 formulations ont été mitigés en IN comparé à la condition ADN nu. Ceux obtenus avec le PLGA-PEI ont au moins permis d'avoir une réponse mucoale détectable encore à J42 chez 2 des 3 porcs inoculés, contrairement à ce que nous avons obtenu avec l'ADN nu ou l'ADN associé avec les trois autres formulations. Les résultats obtenus avec trois autres nanovecteurs/formulations administrés en intranasal vous seront présentés après l'article, dans la partie résultats complémentaires du manuscrit de thèse ci-présent.

5. Résultats présentés dans l'article de thèse

a) Première partie de l'article (contexte et résultats) :

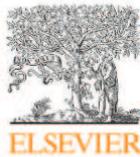
Dans l'article, la première partie résultats (3.1. *PrV-specific systemic and mucosal humoral responses induced after IN inoculation of the naked PrV-gB based DNA vaccine (pig experiment #1)*) s'intéresse aux réponses mucoales et systémiques anti-PrV induites suite à l'administration de notre ADN vaccinal PrV-gB, sous sa forme nue, en IN. Comme contrôle positif, nous avons administré le même ADN plasmidique nu par la voie IM. L'essai nommé « **pig experiment #1** » qui y est mentionné correspond à l'**essai #2** réalisé dans le cadre de la thèse. Les titres en IgG sérique et IgA salivaires induits après 3 inoculations IN ou IM d'ADN vaccinal nu sont présentés dans cette partie 3.1. Tout au long de l'essai#2, des prélèvements sériques ont été réalisés les jours où les porcs ont été inoculés (3 fois à J+1, J+10 et J+20) puis toutes les semaines jusqu'à J+37 (voir la figure 1 présentée dans l'article). Par ailleurs, des échantillons salivaires avaient aussi été collectés à J29 et à J37. Nous montrons dans cette étude de faisabilité, qu'une réponse en IgG sériques et en IgA salivaires est induite en administrant notre ADN nu (pcDNA3-gB) en IN (3 inoculations). Toutefois, cette réponse est légère et présente une très forte variabilité inter-individus. D'autres résultats avaient été obtenus durant l'**essai #2**. Ils concernent les titres en IgA sériques mentionnés mais non montrés dans l'article (sous-partie 3.1.1. de l'article) mais aussi la réponse

immunitaire induite suite à l'inoculation IN de notre ADN vaccinal formulé avec du chitosan ou du MCA. L'utilisation de ces formulations dans ces conditions expérimentales n'a pas du tout été concluante dans le cadre de cet essai. L'ensemble des résultats non présentés dans l'article le sont dans ce manuscrit après l'article en tant que résultats complémentaires de l'essai #2 (Partie Essai #2 : résultats complémentaires).

b) Deuxième partie de l'article (contexte et résultats) :

Lors du dernier essai réalisé, l'essai #4, nous avons à nouveau mis en évidence l'induction de réponse immunitaire suite à l'inoculation en IN de l'ADN nu codant la gB du PrV. Nous avons voulu voir si le fait de formuler notre ADN vaccinal avec chacune des quatre formulations qui avaient été mises au point durant la première partie de la thèse pouvait permettre ou non d'améliorer l'efficacité vaccinale et comparer les résultats entre eux. L'idée étant de protéger l'ADN vaccinal tout en favorisant son accès aux sites inducteurs NALTs porcins afin d'initier une réponse de type mucoale. Aucune des 4 formulations n'a permis d'améliorer de manière forte les réponses immunitaires. Le PLGA-PEI a néanmoins permis de détecter plus longtemps les IgA anti-PrV dans la salive chez 2 porcs sur 3 comparé aux porcs ayant été inoculés avec de l'ADN nu. Nous nous sommes donc basés sur ce résultat pour bâtir la seconde partie de l'article, en ne présentant que les résultats du PLGA-PEI. De cette façon, la seconde grande partie de résultats présentée dans l'article (3.2. *PrV-specific systemic and mucosal humoral responses induced after IN inoculation of the PLGA-PEI nanovectored DNA vaccine encoding PrV-gB (pig experiment #2)*) comprend des résultats obtenus durant l'étude *in vitro* (ceux des conditions ADN-PLGA-PEI et ADN nu (**Fig. 4** article)) ainsi que ceux de l'étude *in vivo* de l'essai #4 (conditions ADN-PLGA-PEI en IN et ADN nu en IN (**Fig. 5** et **6** article)). Les autres résultats de l'essai #4 (ceux pour les trois autres formulations, à savoir le chitosan, le MCA et le KLN 47) sont présentés dans ce manuscrit en tant que résultats complémentaires (Résultats de thèse **Essai #4 : résultats**

complémentaires). Il est montré dans l'article que les porcs inoculés IN avec de l'ADN nu présentaient une réponse spécifique du virus de la pseudoréponse porcine qui était à la fois systémique avec des IgG anti-PrV (**Fig. 5** article) mais aussi mucoale avec des IgA salivaires anti-PrV (**Fig. 6** article). L'association de l'ADN au PLGA-PEI a eu un effet délétère sur la réponse systémique, mais a permis de prolonger la détection des anticorps spécifiques dans la salive.



Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

Intranasal inoculations of naked or PLGA-PEI nanovectored DNA vaccine induce systemic and mucosal antibodies in pigs: A feasibility study

Laurent Souci^{a,1}, Hervé Jaunet^b, Gérald Le Diguerher^c, Jean-Marie Guionnet^c, Véronique Béven^a, Frédéric Paboeuf^c, Tristan Montier^d, Daniel Dory^{a,*}

^a French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Viral Genetics and Biosafety Unit, Ploufragan, France

^b ZOOPOLE Development, Ploufragan, France

^c French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Pig Production and Experimental Unit, Ploufragan, France

^d SynNanoVect platform - UMR INSERM 1078, University of Brest, Brest, France

ARTICLE INFO

Keywords:

DNA vaccination
Swine
Intranasal
Antibodies
Salivary IgA

ABSTRACT

Mucosa are the routes of entry of most pathogens into animals' organisms. Reducing the important global burden of mucosal infectious diseases in livestock animals is required in the field of veterinary public health. For veterinary respiratory pathogens, one possible strategy is the development of intranasal (IN) DNA vaccination. The aim of this study was to assess the feasibility of IN DNA vaccination in pigs, an important species in livestock production industry, and a source of zoonotic diseases. To achieve this goal, we used a DNA vaccine against pseudorabies virus (PrV) encoding the immunogenic glycoprotein B (pcDNA3-gB plasmid). When pigs were inoculated with the naked DNA vaccine through the IN route, PrV-specific IgG and IgA type antibodies were detected in porcine sera. Interestingly, mucosal salivary IgA antibodies against PrV were also detected, at similar levels to those measured following intramuscular injection (positive controls). Furthermore, the IN delivery of pcDNA3-gB combined with PLGA-PEI nanoparticles resulted in similar levels of antibodies but was associated with an increase in the duration of detection of mucosal IgA for 2 out of 3 pigs. Our results suggest that there is room to improve the efficacy of IN DNA vaccination in pigs through optimization of IN inoculations, for example by using nanoparticles such as PLGA-PEI. Further studies will be dedicated to optimizing and testing the protective potential of IN DNA vaccination procedures against PrV.

1. Introduction

Respiratory pathogens of livestock animals are responsible for high economic losses for farms due to high morbidity and sometimes lethal respiratory diseases. In some rare cases, animal pathogens can be transmitted and emerge in humans, as exemplified with the 2009 H1N1 influenza pandemic of swine origin (Hass et al., 2011). It is therefore necessary to develop strategies to control animal infections, and vaccination represents one of the most powerful tools available. Vaccines administered *via* the systemic route are often effective in inducing broad and heterologous protective immunity, but there are exceptions. In these cases, like for vaccination against swine influenza or porcine reproductive and respiratory syndrome (Dhakal and Renukaradhya, 2019), mucosal vaccination may be beneficial. Because respiratory pathogens enter the body through the respiratory mucosa, induction of mucosal protective immune responses may limit entry of the pathogens

and associated infection (Kraehenbuhl and Neutra, 2013). Mucosae are located in various cavities of the body, at the interface between the external and internal environments (e.g respiratory or gastrointestinal tracts). They contribute to essential functions such as respiration, nutrition, and reproduction, while playing a protective role by preventing the physical entry of pathogens (Liebler-Tenorio and Pabst, 2006), and by mobilizing the innate and specific local immune systems (Lawson et al., 2011; Liebler-Tenorio and Pabst, 2006; Lycke, 2012; Pabst, 2012). Moreover, a key part of mucosal immunity is mucosa-associated lymphoid tissues (MALTs), that are functionally interconnected despite being anatomically separated, thus allowing protection through IgA secretion can reach a broad range of distant mucosal surfaces (McGhee and Fujihashi, 2012).

Most mucosal vaccination strategies involve the oral or nasal routes. Most mucosal vaccines consist of attenuated pathogens, with no or very low virulence (Lycke, 2012; Pavot et al., 2012) that mimic as much as

* Corresponding author at: ANSES, Ploufragan/Plouzané Laboratory, Viral Genetics and Biosafety Unit, BP 53, 22440 Ploufragan, France.

E-mail address: daniel.dory@anses.fr (D. Dory).

¹ Present address: INRAE, Biology of Avian Viruses team, Nouzilly, France.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.06.018>

Received 1 March 2020; Received in revised form 20 May 2020; Accepted 17 June 2020
0034-5288/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

possible the wild-type pathogens they are derived from and can therefore enter the organism through the mucosa. Because these viruses remain alive, reversion to virulence or interactions with other pathogens present at the time of inoculation have been reported (Eclercy et al., 2019; Liu et al., 2018). Therefore, as a safety measure, it is recommended to develop subunit vaccines. For example, vaccine antigens can be inserted into viral or bacterial vectors, be administered as recombinant proteins (Wang et al., 2015) or as DNA vaccines (Farris et al., 2016; Oh et al., 2001). Among those, the DNA vaccine strategy presents many advantages, the main one being its simplicity. DNA vaccination consists in inoculating plasmid DNA encoding the vaccine antigen. These antigens are then produced in the vaccinated animals, inducing humoral and cellular immune responses (Dufour, 2001). In addition, DNA vaccines are non-infectious, easy to develop and to produce in high quantities, and they induce an immune response different from that of natural infection allowing differentiation of infected and vaccinated animals (DIVA). DNA vaccination has successfully been achieved in the veterinary field and several vaccines are available on the market (Clynav®, West Nile Innovator®, Apex-IHN® and Oncept® vaccines) (Dalmo, 2018). For intranasal (IN) DNA vaccination, the vaccine is either be inoculated in its naked form (Gomes et al., 2007) or combined with vectors (liposomal or nano/microparticulate structures) that serve as mucosal delivery systems (Csaba et al., 2009). It was previously shown in rodents that such nanovectors can protect the vaccine DNA from mucosal degradation and favor interaction with mucosal cells, antigen-presenting cells (APCs) or inductive sites of MALTs (Kraehenbuhl and Neutra, 2013). The two most common biopolymers, described for IN DNA vaccination purposes, are chitosan (Khatri et al., 2008) and poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) (Du et al., 2015). In particular, PLGA has been optimized for a more efficient delivery and internalization of the DNA vaccine by mucosal surfaces (e.g. nasal cavity). For example, the combination of polyethylenimine (PEI) with PLGA enhances electrostatic interactions of PLGA with DNA plasmids (thanks to cationic nature of the PEI) and promotes its interaction with mucosal cells, and no cell cytotoxicity was reported (Shau et al., 2012). However, it is important to point out that the vast majority of IN DNA vaccine studies were performed using mice or guinea pigs (Ai et al., 2013; Du et al., 2015; Iqbal et al., 2003; Khatri et al., 2008; Nanda et al., 2014). Given the importance of respiratory pathogens in the veterinary field, and associated risks for zoonotic diseases, there is a strong need to conduct new studies to determine the efficacy of IN DNA vaccination for livestock animals such as pigs.

Given that the respiratory tract is the most common route of viral entry, IN DNA vaccination strategies represent a novel and promising vaccination strategy. The pseudorabies virus (PrV) that uses nasal cells as a route of entry into the pig body (Babic et al., 1994) is an ideal viral model to test IN DNA vaccination in pigs. Also, intramuscular DNA vaccination is effective and can be used as positive control (Dory et al., 2005; Gerdts et al., 1997). Among the glycoproteins encoded by the PrV DNA vaccine, the glycoprotein B (gB) is of particular interest because it is highly immunogenic (Dory et al., 2009) and could be used to validate new DNA vaccine strategies. This protein has previously been used in our laboratory to evaluate the potential of electroporation for porcine DNA vaccination (Le Moigne et al., 2012).

In the present study, the plasmid encoding PrV-gB (pcDNA3-gB) associated with a plasmid pcDNA3-GM-CSF encoding granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF used as an adjuvant (Somasundaram et al., 1999)) was administered intranasally in its naked form or associated with the nanovector PLGA-PEI. Naked DNA IN inoculation resulted in mucosal salivary IgA antibodies production. Furthermore, the vectored DNA vaccine appeared to extend the duration of IgA production compared to naked DNA alone. These promising results justify further studies to optimize IN DNA vaccination in pigs to prevent infectious respiratory diseases.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids

Plasmids pcDNA3-gB (encoding PrV-gB) (Dory et al., 2009), pcDNA3-GM-CSF (encoding granulocyte macrophage colony stimulating factor) (Somasundaram et al., 1999), and pTG11033 (encoding luciferase) (Lindberg et al., 2015) were produced in *E. coli* and purified using a Maxiprep plus endotoxin-free DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Germany), according to the manufacturer's instructions. The plasmids were resuspended in endotoxin-free tris-EDTA buffer. Plasmid concentrations and purities were assessed spectrophotometrically by measuring OD ratios at 260 nm/280 nm, and 260 nm/230 nm, respectively (Plate reader infinite 200 Pro, TECAN Ltd., Switzerland).

2.2. Preparation of plasmid-PLGA-PEI nanoparticles

PLGA-PEI nanoparticles were purchased from NanoVex Biotechnologies (Spain). The sizes of the particles were 200 ± 12 nm and the zeta potentials were 38.9 ± 0.4 mV. plasmid-PLGA-PEI nanoparticles were obtained by the adsorption of plasmid DNA onto PLGA-PEI surfaces, as previously described (Shau et al., 2012). Briefly, plasmid DNA and PLGA-PEI were diluted into ultrapure water and mixed at a weight DNA/weight PEI ratio of 12, vortexed for 30 s and incubated for one hour at room temperature (RT). Freshly prepared nanoparticles were inoculated or studied *in vitro* within hours.

2.3. Assessment of humoral immune responses after IM injection or IN inoculation of a naked PrV-gB-based DNA vaccine

All the experimental protocols described in this paper were approved by the ethics committee for animal experimentation of ANSES/National Veterinary School of Alfort/University of Paris-Est Créteil (France) (Notice number 10/07/18-3), and by the French Ministry of Research under reference 15,614-201806210855647_v2.

Two groups of 8–9-week-old specific pathogen-free (SPF) pigs were inoculated three times at 10-day intervals (Fig. 1A). They weighed 24.5 ± 2.9 kg at the time of the first inoculation. Pigs in group #1 ($n = 3$ pigs) were injected with 4 mL of the DNA vaccine composed of 400 µg of pcDNA3-gB and 100 µg of pcDNA3-GM-CSF by the IM route in the neck muscle. pcDNA3-GM-CSF was used as an adjuvant, as previously described (Somasundaram et al., 1999). Pigs in group #2 ($n = 3$ pigs) were inoculated with the same DNA vaccine by the IN route (2 mL in each nostril) using an MAD100 Nasal™ Intranasal Mucosal Atomization Device (Teleflex Medical, Wayne, USA). Non-inoculated control pigs made up an additional group, group #3 ($n = 2$ pigs). All pigs were observed daily to detect any adverse reactions. Body temperatures were measured daily and pigs were weighed weekly. Blood sera were collected on days 0, 10, 20, 29 and 37 post-inoculation (pi). Salivary samples were collected on days 29 and 37 pi. On day 38 pi, pigs were anesthetized with an auricular intravenous injection of thiopental (1 g/50 kg body weight) and euthanized. All the organs and the snout of each pig were observed during the autopsies to detect any problem linked to inoculations.

2.4. Assessment of humoral immune responses after IN inoculation of naked or nanovectored PrV-gB-based DNA vaccines

Four groups of 7–8-week-old SPF pigs were inoculated three times at 10-day intervals (Fig. 1B). They weighed 25.9 ± 5.7 kg at the time of the first inoculation. Three groups of three pigs were inoculated by the IN route using an MAD100 Nasal™ Intranasal Mucosal Atomization Device (Teleflex Medical, Wayne, USA) with 300 µg of pcDNA3-gB + 100 µg of pcDNA3-GM-CSF (2 mL corresponding to half of the DNA vaccine in each nostril). Pigs in groups #1 and #2 were inoculated with naked pcDNA3-gB and PLGA-PEI-pcDNA3-gB, respectively. One

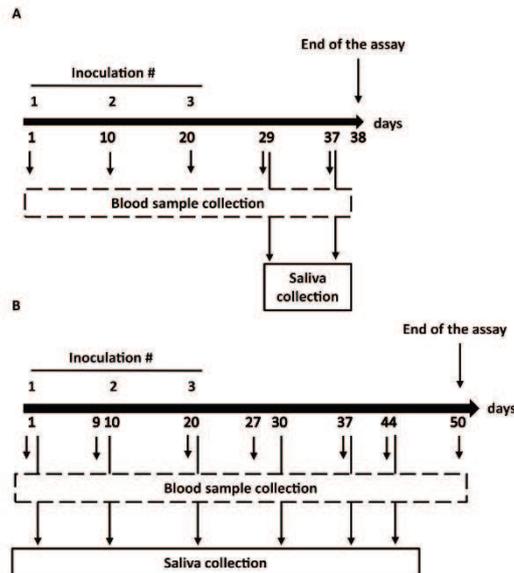


Fig. 1. Schematic representation of the animal immunization experiments.

(A) Assessment of immune potentials in pigs inoculated intranasally with a naked PrV-gB DNA vaccine. (B) Assessment of immune potentials in pigs inoculated intranasally with a formulated PrV-gB DNA vaccine.

control pig (group #3) was injected three times at the same time points with the same naked DNA vaccine (4 mL in total) by the IM route. Finally, an additional group of four non-inoculated pigs served as negative controls (group #4). Clinical observations and euthanasia were performed as described above, except that euthanasia was performed on day 50 pi. Blood sera were collected the day before the first inoculation and on days 9, 20, 27, 37, 44 and 50 pi. Salivary samples were collected the day before the first inoculation and on days 10, 20, 30, 37 and 44 pi.

2.5. Determination of serum anti-PrV IgG and IgA antibody titers

An indirect ELISA for the determination of serum anti-PrV-specific IgG and IgA antibody titers was adapted from the protocol previously described (Le Moigne et al., 2012). Briefly, maxiSorp 96-well plates (Nunc, ThermoFisher, USA) were coated overnight with 1.5 µg/well of PrV glycoproteins diluted in 100 µL of 0.05 M carbonate buffer (Sigma-Aldrich, USA) at 4 °C. The plates were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) buffer pH 7.4 containing 0.05% tween 20 (PBS-T, Sigma-Aldrich, USA) prior to being blocked with 300 µL/well of blocking buffer [1% BSA (Eurobio, France) in PBS-T] for two hours at 37 °C. After two washes with PBS-T, the plates were incubated for 1 h at 37 °C with 100 µL/well of two-fold serial diluted serum samples in PBS-T. Each serum sample was analyzed in triplicate. After three washes, the plates were incubated for 1 h at 37 °C with 100 µL/well of 1:20,000 diluted horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-pig IgG (H/L) (Bio-Rad, USA) or 1:100,000 diluted HRP-conjugated goat anti-pig IgA AAI40P antibody (Bio-Rad, USA) for IgG or IgA determinations, respectively. These antibodies were diluted in 1% BSA/PBS-T. Finally, after three washes, 100 µL/well of tetramethylene benzidine (TMB) substrate (Pierce TMB substrate kit, ThermoFischer Scientific, USA) was added to the plates for 5 or 10 min for IgG or IgA determinations,

respectively. The reactions were stopped by adding 100 µL/well of 2 M sulphuric acid (H₂SO₄, Sigma-Aldrich, USA). The plates were shaken for 1 min and the absorbance at 450 nm of each well was read on an Infinite 200 Pro plate reader (TECAN Ltd., Switzerland). Antibody titers were expressed as the highest dilution giving an OD value higher than the threefold OD of the control sera from the non-vaccinated and non-infected pigs.

2.6. Determination of salivary anti-PrV IgA antibody titers

An indirect ELISA was performed on salivary samples in triplicate as described above for the serum samples, with minor modifications. 1:150,000 diluted AAI40P HRP-conjugated goat anti-pig IgA antibody and 15 min of incubation with the TMB-substrate were used.

2.7. In vitro characterization of the nanovectored plasmids

The plasmids were characterized as previously described, with some modifications (Berchel et al., 2015; Le Gall et al., 2013). Twenty thousand cells/well of human bronchial epithelial cells (HBE-16) were incubated in 96-well plates overnight (37 °C, 5% CO₂) with Eagle's minimal essential medium (EMEM) supplemented with 1% penicillin/streptomycin antibiotics, 1% glucosamine (Gibco, ThermoFisher, USA) and 10% fetal bovine serum. Then, the cells were incubated in triplicate for 72 h with 40 µL/well of either naked pTG11033 plasmid or PLGA-PEI-pTG11033. Controls consisted of EMEM or PLGA-PEI without DNA. Thereafter, the cultures were assessed for cytotoxic effects and the transfection potential of each DNA or nanovector preparation.

2.7.1. Cytotoxic effect evaluation

Each preparation described above was evaluated for cytotoxic effects on cell supernatants using a CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit, according to the manufacturer's instructions (Promega, USA).

2.7.2. Transfection potential evaluation

After removing the remaining culture medium, 75 µL/well of passive lysis buffer (PLB buffer, Promega, USA) were added. Then, 25 µL of each cell lysate were transferred to two separate plates. The first plate (a transparent MaxiSorp 96-well plate, Nunc, Naperville, USA) was used to determine total protein content using a BC Assay kit, according to the manufacturer's instructions (Pierce, ThermoFisher, USA). The other plate (a white MaxiSorpLumiNunc 96-well plate, Nunc, USA) was used to measure luciferase activities using the Promega Firefly Luciferase Assay System (Promega, USA), according to the manufacturer's instructions. An amount of 65 µL per well of Promega Luciferase Assay Reagent was added. After 2 min incubation at RT in the dark, the luminescence was measured with a luminescence Infinite 200 Pro plate reader (TECAN Ltd., Switzerland), with reading and delay times of one second each. The results were expressed as relative light units (RLUs) per milligram of total proteins.

2.8. Statistical analyses

For the *in vitro* experiments, a Mann–Whitney–Wilcoxon (U) test (non-directional test) was used. Comparisons were performed at a limit of significance of 0.05.

3. Results

3.1. PrV-specific systemic and mucosal humoral responses induced after IN inoculation of the naked PrV-gB-based DNA vaccine (pig experiment #1)

Two groups of three pigs were inoculated three times at ten-day intervals with a naked pcDNA3-gB-based DNA vaccine either through the IM or IN route, respectively (Fig. 1A). A third group of two pigs was

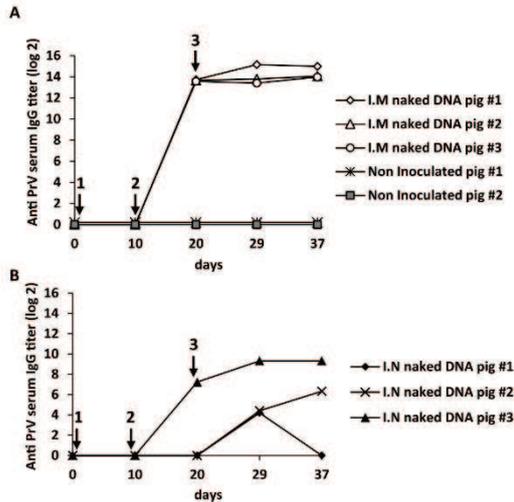


Fig. 2. ELISA determination of systemic IgG antibody levels against PrV after inoculation with a naked PrV-gB-based DNA vaccine.

(B) Pigs were inoculated three times with a naked pcDNA3-gB DNA vaccine, as indicated by the arrows. Pig sera were collected every 8–10 days throughout the pig experiment. IgG titers of the two non-inoculated pigs and the three pigs inoculated by the IM route are indicated in (A). IgG titers of the three pigs inoculated by the IN route are indicated in (B). Dilutions were performed in triplicate and the threshold of positivity was established as the OD mean of the negative controls ± 3 SD. Antibody titers are presented in log₂ scales. Arrows topped with a number indicate the inoculations with DNA vaccine.

not inoculated and served as a control group. None of the DNA inoculated pigs had fever, showed side effects, and they all grew similarly to the non-inoculated animals for the duration of the experiment. At necropsy, no lesions related to the inoculation or injection procedures were observed.

3.1.1. Determination of serum anti-PrV IgG and IgA following IM or IN inoculation of the naked PrV-gB-based DNA vaccine

In previous studies, we showed that pcDNA3-gB when inoculated intramuscularly induced strong production of systemic anti-PrV IgG antibodies (Dory et al., 2009; Le Moigne et al., 2012). Here, as

expected, the three pigs injected with the PrV-gB-based DNA vaccine by the IM route exhibited an elevated serum anti-PrV IgG response that started to be detected on day 20 pi (10 days after the second injection), and the response remained high or increased after the third injection until the end of the pig experiment (Fig. 2A). Maximum titers expressed in log₂ base were between 13.5 (pigs #2 and #3) and 15.2 (pig #1). Serum anti-PrV IgA antibodies started to be detected on day 10 pi for pig #1, and on day 20 pi for the other two pigs (data not shown). The highest titers were observed on day 29 pi (between 6.3 and 7.3 log₂). The two non-inoculated pigs produced no anti-PrV IgG and IgA (Fig. 2A and data not shown).

For the group inoculated by the IN route with the naked PrV-gB-based DNA vaccine, pig #3 produced IgG antibodies against PrV from 20 days pi to the end of the pig experiment (Fig. 2B). On day 37 pi, the titer was 9.3 log₂ for this pig. Pig #2 in this group also exhibited an increasing level of PrV-specific serum IgG response, but it started only after the third inoculation (day 29 pi). It reached a titer of 6.3 log₂ at the end of the pig experiment (37 dpi). For the third pig (pig #1), a transient and very low response was observed only on day 29 pi (4.4 log₂). Concerning the induction of systemic anti-PrV IgA, pig #1 elicited such a response from 20 dpi (highest titer of 6.3 log₂ on day 20 pi) (data not shown). The other two pigs showed only a slight increase of the titer on day 37 pi (3.1 log₂) (data not shown).

3.1.2. Determination of anti-PrV sIgA in the saliva of pigs following IM or IN inoculation of the naked PrV-gB-based DNA vaccine

Thereafter, the presence of anti-PrV sIgA was determined in pig saliva collected on days 29 and 37 pi (Fig. 3). No antibodies were detected in the samples from the two non-inoculated pigs. Antibodies were detected in two out of three pigs injected by the IM route with the naked DNA vaccine. The titers of antibodies were 3.4 and 4.3 log₂, respectively. More interestingly, all the pigs inoculated through the IN route with the naked PrV-gB-based DNA vaccine had sIgA titers against PrV at least at the same order of magnitude as those of the pigs injected through the IM route with the same vaccine. Furthermore, pig #2 presented higher titers than those detected in the IM group (titers of 7.3 and 6.3 log₂ on days 29 and 37 pi, respectively).

3.2. PrV-specific systemic and mucosal humoral responses induced after IN inoculation of the PLGA-PEI-nanovectored DNA vaccine encoding PrV-gB (pig experiment #2)

In previous studies, researchers have used nanovectors to protect DNA vaccines from mucosal degradation. In the second part of this study, the PrV-gB-based DNA vaccine was associated with PLGA-PEI already known to enhance DNA vaccine efficacy, mainly in mice experiments.

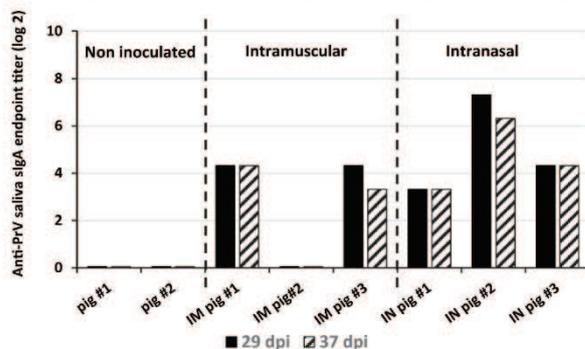


Fig. 3. ELISA determination of salivary sIgA antibody levels against PrV after inoculation with a naked PrV-gB-based DNA vaccine.

(C) Pigs were inoculated three times with the DNA vaccine at ten-day intervals. Pig saliva samples were collected at days 29 and 37 after the first inoculation (dpi). Black bars correspond to 29 dpi and dashed bars to 37 dpi. Saliva dilutions were performed in triplicate and the threshold of positivity was established as the OD mean of the negative controls ± 3 SD. Antibody titers are presented in log₂ scales.

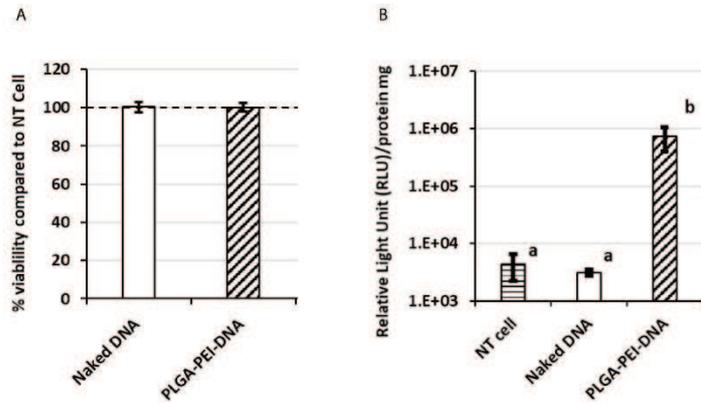


Fig. 4. *In vitro* toxicity and cell transfection potentials of naked and PLGA-PEI associated plasmids.

(D) HBE-16 cells were incubated with 1 μ g of naked plasmid pTG11033 (Naked DNA), 1 μ g of plasmid DNA pTG11033 adsorbed onto pre-made PLGA-PEI nanoparticles at a weight to weight ratio of 12 (PLGA-PEI-DNA). Cell viabilities (A) and luciferase expressions (B) were measured at 72 h post-transfection. The untransfected cell condition served as a reference level (NT cells) corresponding to 100% viability (dashed line) (A) or to luciferase base level (B). In the latter case, the values expressed in relative light units (RLUs) per protein mg measured in the cell lysates are indicated. Mean results of three independent experiments are presented \pm SD. Significant differences between each condition and their respective controls were determined with the non-parametric Mann-Whitney test (ab, $p < .05$).

3.2.1. *In vitro* characterization of the nanovectored DNA plasmids

The PLGA-PEI nanovectored DNA plasmids encoding luciferase were prepared as described above and incubated for 72 h with the bronchial epithelial cell line HBE-16. Cytotoxic analyses performed on the supernatants of these cell cultures revealed that the preparation with PLGA-PEI had no toxicity for the cells (Fig. 4A). Furthermore, only the association of PLGA-PEI with the plasmid DNA encoding luciferase enabled the expression of luciferase within the cells (Fig. 4B). These results indicate that the nanovectors composed of PLGA-PEI are functional and can be safely administered to pigs.

3.2.2. Determination of serum anti-PrV IgG and IgA following IN inoculation of the PLGA-PEI-nanovectored PrV-gB-based DNA vaccine

Two groups of three pigs were intranasally inoculated three times at ten-day intervals with the naked PrV-gB-based DNA vaccine or PLGA-PEI PrV-gB-based DNA vaccine, respectively. As a control, an additional pig was intramuscularly injected at the same time points with the naked DNA vaccine. Finally, a fourth group of four non-inoculated pigs was added. No adverse reactions following any of the inoculations were observed throughout the pig experiment. Humoral immune responses against PrV were measured until day 50 (Fig. 1B).

Specific IgG and IgA titers against PrV were measured in the sera of all the pigs every 7–10 days throughout the pig experiment. Confirming results from experiment #1 described above, anti-PrV IgG and IgA were detected in the sera of the pigs inoculated with the naked DNA vaccine through the IM (data not shown) and IN routes (Fig. 5A for IgG and data not shown for IgA). For the pigs inoculated with the PLGA-PEI-DNA vaccine, the systemic anti-PrV IgG and IgA immune responses was low for all three pigs (Fig. 5B and data not shown, respectively).

3.2.3. Determination of anti-PrV sIgA in the saliva of pigs inoculated with nanovectored pcDNA3-gB through the IN route

Compared to experiment #1, saliva was collected for a longer period from day 0 until day 44 pi (instead of only days 29 and 37 pi as in the first pig experiment). sIgA against PrV was detected in most of the pigs inoculated with the DNA vaccine after the second or third inoculation (naked DNA vaccine injected through the IM route (Fig. 6A) or inoculated through the IN route (Fig. 6B) and nanovectored PLGA-PEI-DNA vaccine (Fig. 6C)). However, for the majority of the pigs, the detection of these antibodies was transient since on day 44 pi, these antibodies were no longer detected (Fig. 6A, B and pig #2 of Fig. 6C). There was two notable exceptions: sIgA against PrV was still detected in saliva in pigs #1 and #3 in the PLGA-PEI DNA vaccine group on day 44 pi (titers of 3.3) (Fig. 6C).

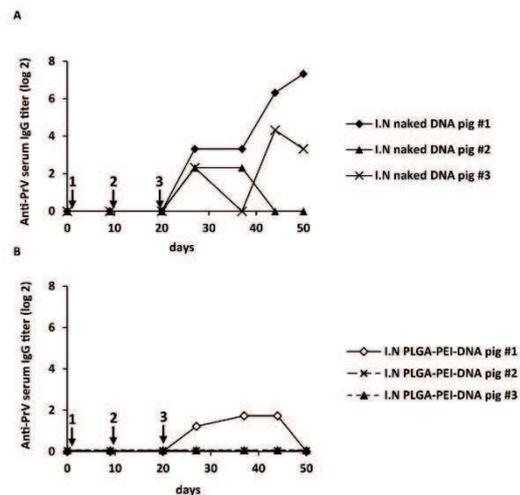


Fig. 5. ELISA determination of systemic IgG antibody levels against PrV after intranasal inoculation with a naked or PLGA-PEI associated PrV-gB-based DNA vaccine.

(E) Pigs were inoculated three times with the DNA vaccine as indicated by the arrows. Pig sera were collected every 8–10 days throughout the pig experiment. Results for the three pigs inoculated with naked pcDNA3-gB are indicated in (A). Results for the three pigs inoculated with PLGA-PEI-pcDNA3-gB are indicated in (B). Dilutions were performed in triplicate and the threshold of positivity was established as the OD mean of the negative controls \pm 3 SD. Antibody titers are presented in log₂ scales. Arrows topped with a number indicate the inoculations with DNA vaccine.

4. Discussion

There is a need to develop new vaccine strategies against respiratory pathogens in pigs. Very promising results for IN DNA vaccination have been obtained using mice or guinea pigs (Ai et al., 2013; Du et al., 2015; Iqbal et al., 2003; Khatri et al., 2008; Nanda et al., 2014). Of specific interest, IN inoculation to mice of a naked plasmid encoding the same PrV-gB as the one used in the present study resulted in the induction of vaginal PrV-specific sIgA, but not in protection (Yoon et al., 2008).

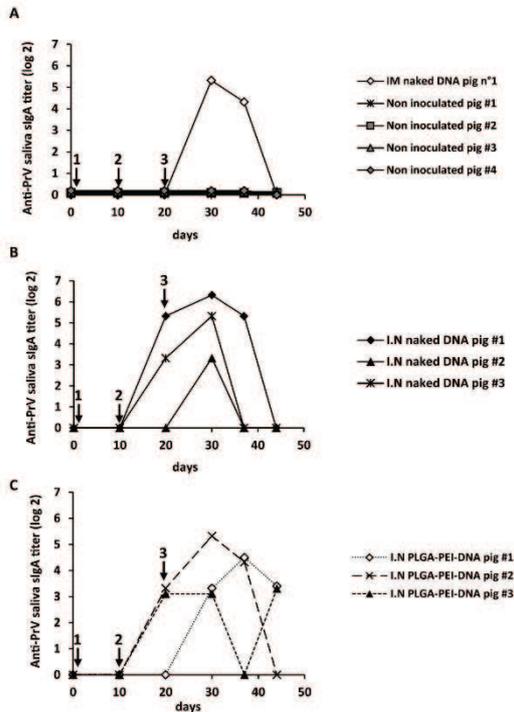


Fig. 6. ELISA determination of salivary sIgA antibody levels against PrV after inoculation with a naked or PLGA-PEI associated PrV-gB based DNA vaccine.

(F) Pigs were inoculated three times with the DNA vaccine as indicated by the arrows. Pig saliva samples were collected every 8–10 days throughout the pig experiment. Results for the four non-inoculated pigs and the single animal inoculated through the IM route are indicated in (A). Results for the three pigs inoculated by the IN route with naked pcDNA3-gB are indicated in (B). Results for the three pigs inoculated by the IN route with PLGA-PEI-pcDNA3-gB are indicated in (C). Dilutions were performed in triplicate and the threshold of positivity was established as the OD mean of the negative controls ± 3 SD. Antibody titers are presented in log₂ scales. Arrows topped with a number indicate the inoculations with DNA vaccine.

Unfortunately, there are very few data on mucosal DNA vaccination in large animals, and none on IN DNA vaccination in pigs. Furthermore negative results are common. For example, a DNA vaccine against the foot-and-mouth disease virus (FMDV) was not efficient in sheep when administered through the IN route, regardless of whether the vaccine was naked or not (Niborski et al., 2006).

The present study aims at generating preliminary results on the development of IN DNA vaccination in pigs. To do this, we used a DNA vaccine against PrV that induces immune responses after IM injection: a DNA vaccine encoding PrV gB (Dory et al., 2009; Le Moigne et al., 2012). This model is especially valuable for such study because (1) the virus enters the body through the nasal route (and therefore it is beneficial to generate protective immunity at this entry site), and (2) it has been shown that a plasmid encoding PrV-gB induced the production of mucosal sIgA against PrV in the vagina after IN inoculation of mice (Yoon et al., 2008). It can thus serve as a marker of induction of systemic and mucosal humoral immune responses to study new strategies to inoculate DNA vaccines in pigs. At this stage, it has to be pointed out

that PrV-gB alone is not able to induce strong protective immunity against PrV-infection in pigs (van Rooij et al., 2000), and this was also the case after IN inoculation in mice (Yoon et al., 2008). Therefore, PrV-gB is fully adapted to the study we wanted to perform here since the main aim of the present study was first to evaluate if IN inoculation of a DNA vaccine can induce the production of immune responses, and more particularly mucosal immune responses. For this reason, and because they are beyond our objective, protective studies were not conducted. Before a PrV-challenge with a protective DNA vaccine encoding PrV-gB, -gC and -gD (Dory et al., 2005; Gerdtts et al., 1997; van Rooij et al., 2002) could be designed in pigs, IN administration of DNA vaccine must first be optimized.

In the present study, the IM route of immunization served (1) to show that the PrV-gB DNA vaccine is functional and induces the production of systemic humoral immune response, and (2) to study whether sIgA against PrV are detected in the saliva of intramuscularly injected pigs. In all cases, anti-PrV IgG and IgA were found in the sera of these pigs; anti-PrV sIgA antibodies were detected in the saliva of 3 out of 4 pigs. To our knowledge, this is the first time that such sIgA antibodies have been detected in the saliva of pigs intramuscularly vaccinated with a DNA vaccine against PrV. Previously, such antibodies were also detected in nasal secretions of pigs intramuscularly injected with a commercial inactivated PrV vaccine (Geskytur®) (Le Luduec et al., 2016). Unfortunately, the comparisons of the levels of antibodies obtained after the IM injection of our DNA vaccine and Geskytur® are not possible since the sIgA levels were measured in two different fluids.

IN inoculation of naked DNA vaccine has mainly been described as ineffective in inducing immune responses or protection, with some notable exceptions. For example, Svanholm et al reported that significant clinical protection against *Chlamydomphila pneumoniae* was obtained after IN immunization of mice with a naked plasmid encoding HSP-60 (Svanholm et al., 2000). Several other studies have reported induction of specific systemic (serum IgG or IgA) or mucosal (sIgA) immune responses against β -galactosidase (Csaba et al., 2006; Cui and Mumper, 2002), hepatitis B virus (Khatiri et al., 2008) or *Streptococcus pneumoniae* (Xu et al., 2011) following IN naked DNA immunizations in mice. Herein, we observed the induction of immune responses after IN inoculation of the naked form of the PrV-gB DNA vaccine in pigs. This inoculation induced both systemic and mucosal humoral immune responses in all the vaccinated pigs (six pigs if we take into account both pig experiments). Even though the number of individuals used was too low to allow significance testing, it seems that systemic anti-PrV IgG and IgA levels is lower following IN inoculation than those measured in the IM group. In contrast, levels of sIgA in the saliva were around the same order of magnitude in the IM and IN groups. In fact, the highest levels of sIgA in the saliva were found for individuals of the IN groups in both pig experiments. But we observed a high inter-individual variations, especially in the IN groups that further limits our ability to interpret the data. That being said, it is noteworthy that all the 6 pigs inoculated with the naked DNA vaccine induced the production of sIgA against PrV in the salivary (instead of 3 out of 4 for the IM group), providing a strong evidence that IN DNA vaccination induces the production of respiratory mucosal immune responses against the targeted pathogen. Cao et al that inoculated pigs intranasally with an attenuated PrV vaccine PrV K61 measured the sIgA titers in saliva around 8 log₂ (Cao et al., 2011), i.e. slightly above the results we obtained here with the naked PrV-gB-based DNA vaccine, which shows that the titers that we obtained are common for the species. Further studies with a higher number of individuals are now necessary to determine if the IN route has a higher potency at inducing sIgA production. In addition, follow-up studies will need to include a thorough optimization procedure to reduce inter-individual variations and enhance the efficacy of this intranasally inoculated DNA vaccine by testing other adjuvants or modifying several other parameters (use of nanovectors, ways to inoculate, etc.).

Most researchers studying IN DNA vaccination combine their DNA

vaccines with nanovectors to protect the DNA molecule from mucosal environment degradation until it reaches the cells involved in the development of immune responses. There are many types of nanovectors (for reviews see (Bernocchi et al., 2017; Xu et al., 2014)). For our study, we selected PLGA-PEI nanoparticles. Indeed, PLGA and/or PEI were previously successfully used in IN DNA vaccination in mice (Du et al., 2015; Torrieri-Dramard et al., 2011).

In the present proof of concept study, we selected a DNA/nanovector ratio previously found to be effective to transfect the bronchial lineage HBE-16 cell line *in vitro*. It did not ensure success of *in vivo* IN inoculation but we assumed it would increase chances of success (Ragelle et al., 2014). In association with PLGA-PEI, the duration of mucosal immune response in the saliva induced by the DNA vaccine was longer for two out of three pigs, compared to the three pigs inoculated intranasally with the naked DNA vaccine. This result may be anecdotal, but it reveals that mucosal humoral immune responses might be improved. Clearly, further studies are necessary to optimize the IN DNA vaccine to induce a high and sustained mucosal immune responses. We suggest that such studies should compare the efficiency of PLGA-PEI with other nanovectors, and optimize the other parameters such as the DNA/nanovector ratios, total quantity of DNA, adjuvants and inoculation conditions; inoculation conditions include anesthetized pigs (Janakova et al., 2002) or non-anesthetized pigs (Khatri et al., 2008), the volume of vaccine, number of doses, intervals between the doses, speed of inoculation, and specific devices for inoculation). Only such a thorough and comprehensive approach will allow us to reliably assess the protective immunity induced by IN DNA vaccine strategies.

5. Conclusion

The current study clearly showed that IN inoculation of a naked DNA vaccine encoding PrV-gB induces both a systemic and a mucosal humoral immune response against PrV in pigs. To the best of our knowledge, this is the first report showing the induction of immune responses following IN inoculation of a naked DNA vaccine in pigs. Some immune response parameters appeared enhanced when the DNA vaccine was combined to PLGA-PEI nanovectors. Even though the inter-individual variability observed indicate that the optimized conditions were not reached in the present study, these results suggest that it is possible to improve DNA vaccine efficacy by varying its composition and inoculation conditions. Based on the promising results presented herein, we encourage future studies to build upon the present results and improve IN DNA vaccination in pigs.

Funding

This research was funded by the AgriFoodTransition Carnot Institute (Ploufragan, France) under the grant number 10_2017_00868. L.S. was the recipient of a thesis grant from ANSES (Maisons-Alfort, France), Saint-Brieuc Armor Agglomération (Saint-Brieuc, France) and Conseil Départemental des Côtes d'Armor (Saint-Brieuc, France).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Mohamed Dia and Dr. Eric Pagot of ZOOPOLE Development (Ploufragan, France), and to the other members of the Pig Production and Experimental Unit (SPPAE) of ANSES (Ploufragan, France) for their technical help during the animal experiments. They also thank Dr. Nolwenn Dheilley (Viral Genetics and

Biosafety Unit, ANSES, Ploufragan, France) for the review of the English of the final version of the manuscript.

References

- Ai, W., Yue, Y., Xiong, S., Xu, W., 2013. Enhanced protection against pulmonary mycobacterial challenge by chitosan-formulated polypeptide gene vaccine is associated with increased pulmonary secretory IgA and gamma-interferon(+) T cell responses. *Microbiol. Immunol.* 57, 224–235.
- Babic, N., Mettenleiter, T.C., Ugolini, G., Flamand, A., Coulon, P., 1994. Propagation of pseudorabies virus in the nervous system of the mouse after intranasal inoculation. *Virology* 204, 616–625.
- Berchel, M., Le Gall, T., Haelters, J.P., Lehn, P., Montier, T., Jaffres, P.A., 2015. Cationic lipophosphoramidates containing a hydroxylated polar headgroup for improving gene delivery. *Mol. Pharm.* 12, 1902–1910.
- Bernocchi, B., Carpentier, R., Betbeder, D., 2017. Nasal nanovaccines. *Int. J. Pharm.* 530, 128–138.
- Cao, D., Li, H., Jiang, Z., Cheng, Q., Yang, Z., Xu, C., Cao, G., Zhang, L., 2011. CpG oligodeoxynucleotide synergizes innate defense regulator peptide for enhancing the systemic and mucosal immune responses to pseudorabies attenuated virus vaccine in piglets *in vivo*. *Int. Immunopharmacol.* 11, 748–754.
- Csaba, N., Sanchez, A., Alonso, M.J., 2006. PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamer blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery. *J. Control. Release* 113, 164–172.
- Csaba, N., Garcia-Fuentes, M., Alonso, M.J., 2009. Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 140–157.
- Cui, Z., Mumper, R.J., 2002. Intranasal administration of plasmid DNA-coated nanoparticles results in enhanced immune responses. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 1195–1203.
- Dalmo, R.A., 2018. DNA vaccines for fish: review and perspectives on correlates of protection. *J. Fish Dis.* 41, 1–9.
- Dhakal, S., Renukaradhya, G.J., 2019. Nanoparticle-based vaccine development and evaluation against viral infections in pigs. *Vet. Res.* 50, 90.
- Dory, D., Torché, A.M., Béven, V., Blanchard, P., Loizel, C., Cariolet, R., Jestin, A., 2005. Effective protection of pigs against lethal pseudorabies virus infection after a single injection of low-dose Sindbis-derived plasmids encoding PrV gB, gC and gD glycoproteins. *Vaccine* 23, 3483–3491.
- Dory, D., Remond, M., Beven, V., Cariolet, R., Backovic, M., Zientara, S., Jestin, A., 2009. Pseudorabies virus glycoprotein B can be used to carry foot and mouth disease antigens in DNA vaccination of pigs. *Antivir. Res.* 81, 217–225.
- Du, L., Li, B., Xu, X., Sun, B., Pang, F., Wen, L., Huang, K., He, K., 2015. Adsorption of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus DNA vaccine candidate onto biodegradable nanoparticles improves immunogenicity in mice. *Arch. Virol.* 160, 1543–1547.
- Dufour, V., 2001. DNA vaccines: new applications for veterinary medicine. *Vet. Sci. Tomorrow* 1–20.
- Eclercy, J., Renson, P., Lebret, A., Hirschaud, E., Normand, V., Andraud, M., Paboouf, F., Blanchard, Y., Rose, N., Bourry, O., 2019. A field recombinant strain derived from two type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) modified live vaccines shows increased viremia and transmission in SPF pigs. *Viruses* 11.
- Farris, E., Brown, D.M., Ramer-Tait, A.E., Pannier, A.K., 2016. Micro- and nanoparticulates for DNA vaccine delivery. *Exp. Biol. Med.* 241, 919–929.
- Gerdt, V., Jöns, A., Makoschey, B., Visser, N., Mettenleiter, C., 1997. Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J. Gen. Virol.* 78, 2139–2146.
- Gomes, D.C., Pinto, E.F., de Melo, L.D., Lima, W.P., Larraga, V., Lopes, U.G., Rossi-Bergmann, B., 2007. Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. *Vaccine* 25, 2168–2172.
- Hass, J., Matuszewski, S., Cieslik, D., Haase, M., 2011. The role of swine as "mixing vessel" for interspecies transmission of the influenza A subtype H1N1: a simultaneous Bayesian inference of phylogeny and ancestral hosts. *Infect. Genet. Evol.* 11, 437–441.
- Iqbal, M., Lin, W., Jabbal-Gill, L., Davis, S.S., Steward, M.W., Illum, L., 2003. Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice. *Vaccine* 21, 1478–1485.
- Janakova, L., Bakke, H., Haugen, I.L., Berstad, A.K., Holby, E.A., Aaberge, I.S., Haneberg, B., 2002. Influence of intravenous anesthesia on mucosal and systemic antibody responses to nasal vaccines. *Infect. Immun.* 70, 5479–5484.
- Khatri, K., Goyal, A.K., Gupta, P.N., Mishra, N., Vyas, S.P., 2008. Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B. *Int. J. Pharm.* 354, 235–241.
- Kraehenbuhl, J.P., Neutra, M.R., 2013. Mucosal vaccines: where do we stand? *Curr. Top. Med. Chem.* 13, 2609–2628.
- Lawson, L.B., Norton, E.B., Clements, J.D., 2011. Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 414–420.
- Le Gall, T., Berchel, M., Le Hir, S., Fraix, A., Salaun, J.Y., Ferec, C., Lehn, P., Jaffres, P.A., Montier, T., 2013. Arsonium-containing lipophosphoramidates, poly-functional nano-carriers for simultaneous antibacterial action and eukaryotic cell transfection. *Adv. Healthcare Mater.* 2, 1513–1524.
- Le Luduec, J.B., Debeer, S., Piras, F., Andreoni, C., Boudet, F., Laurent, P., Kaiserlian, D., Dubois, B., 2016. Intradermal vaccination with un-adjuvanted sub-unit vaccines triggers skin innate immunity and confers protective respiratory immunity in domestic swine. *Vaccine* 34, 914–922.
- Le Moigne, V., Cariolet, R., Beven, V., Keranflech, A., Jestin, A., Dory, D., 2012. Electroporation improves the immune response induced by a DNA vaccine against

- pseudorabies virus glycoprotein B in pigs. *Res. Vet. Sci.* 93, 1032–1035.
- Liebler-Tenorio, E.M., Pabst, R., 2006. MALT structure and function in farm animals. *Vet. Res.* 37, 257–280.
- Lindberg, M.F., Le Gall, T., Carmoy, N., Berchel, M., Hyde, S.C., Gill, D.R., Jaffres, P.A., Lehn, P., Montier, T., 2015. Efficient *in vivo* transfection and safety profile of a CpG-free and codon optimized luciferase plasmid using a cationic lipophosphoramidate in a multiple intravenous administration procedure. *Biomaterials* 59, 1–11.
- Liu, P., Bai, Y., Jiang, X., Zhou, L., Yuan, S., Yao, H., Yang, H., Sun, Z., 2018. High reversion potential of a cell-adapted vaccine candidate against highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Microbiol.* 227, 133–142.
- Lycke, N., 2012. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 592–605.
- McGhee, J.R., Fujihashi, K., 2012. Inside the mucosal immune system. *PLoS Biol.* 10, e1001397.
- Nanda, R.K., Hajam, I.A., Edao, B.M., Ramya, K., Rajangam, M., Chandra Sekar, S., Ganesh, K., Bhanuprakash, V., Kishore, S., 2014. Immunological evaluation of mannosylated chitosan nanoparticles based foot and mouth disease virus DNA vaccine, pVAC FMDV VP1-OmpA in Guinea pigs. *Biologicals* 42, 153–159.
- Niborski, V., Li, Y., Brennan, F., Lane, M., Torche, A.M., Remond, M., Bonneau, M., Riffault, S., Stirling, C., Hutchings, G., Takamatsu, H., Barnett, P., Charley, B., Schwartz-Cornil, I., 2006. Efficacy of particle-based DNA delivery for vaccination of sheep against FMDV. *Vaccine* 24, 7204–7213.
- Oh, Y.K., Kim, J.P., Hwang, T.S., Ko, J.J., Kim, J.M., Yang, J.S., Kim, C.K., 2001. Nasal absorption and biodistribution of plasmid DNA: an alternative route of DNA vaccine delivery. *Vaccine* 19, 4519–4525.
- Pabst, O., 2012. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 821–832.
- Pavot, V., Rochereau, N., Genin, C., Verrier, B., Paul, S., 2012. New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* 30, 142–154.
- Ragelle, H., Riva, R., Vandermeulen, G., Naeye, B., Pourcelle, V., Le Duff, C.S., D'Haese, C., Nysten, B., Braeckmans, K., De Smedt, S.C., Jerome, C., Preat, V., 2014. Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency. *J. Control. Release* 176, 54–63.
- Shau, M.D., Shih, M.F., Lin, C.C., Chuang, I.C., Hung, W.C., Hennink, W.E., Cherng, J.Y., 2012. A one-step process in preparation of cationic nanoparticles with poly(lactide-co-glycolide)-containing polyethylenimine gives efficient gene delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 46, 522–529.
- Somasundaram, C., Takamatsu, H., Andréoni, C., Audonnet, J.-C., Fisher, L., Lefèvre, F., Charley, B., 1999. Enhanced protective response and immuno-adjuvant effects of porcine GM-CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70, 277–287.
- Svanholm, C., Bandholtz, L., Castanos-Velez, E., Wigzell, H., Rottenberg, M.E., 2000. Protective DNA immunization against chlamydia pneumoniae. *Scand. J. Immunol.* 51, 345–353.
- Torrieri-Dramard, L., Lambrecht, B., Ferreira, H.L., Van den Berg, T., Klatzmann, D., Bellier, B., 2011. Intranasal DNA vaccination induces potent mucosal and systemic immune responses and cross-protective immunity against influenza viruses. *Mol. Ther.* 19, 602–611.
- van Rooij, E.M., Haagmans, B.L., Glansbeek, H.L., de Visser, Y.E., de Bruin, M.G., Boersma, W., Bianchi, A.T., 2000. A DNA vaccine coding for glycoprotein B of pseudorabies virus induces cell-mediated immunity in pigs and reduces virus excretion early after infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 74, 121–136.
- van Rooij, E.M., Glansbeek, H.L., Hilgers, L.A., te Lintelo, E.G., de Visser, Y.E., Boersma, W.J., Haagmans, B.L., Bianchi, A.T., 2002. Protective antiviral immune responses to pseudorabies virus induced by DNA vaccination using dimethyldioctadecylammonium bromide as an adjuvant. *J. Virol.* 76, 10540–10545.
- Wang, S., Liu, H., Zhang, X., Qian, F., 2015. Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens: advantages, challenges and formulation strategies. *Protein Cell* 6, 480–503.
- Xu, J., Dai, W., Wang, Z., Chen, B., Li, Z., Fan, X., 2011. Intranasal vaccination with chitosan-DNA nanoparticles expressing pneumococcal surface antigen a protects mice against nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 75–81.
- Xu, Y., Yuen, P.W., Lam, J.K., 2014. Intranasal DNA vaccine for protection against respiratory infectious diseases: the delivery perspectives. *Pharmaceutics* 6, 378–415.
- Yoon, H.A., Han, Y.W., Aleyas, A.G., George, J.A., Kim, S.J., Kim, H.K., Song, H.J., Cho, J.G., Eo, S.K., 2008. Protective immunity induced by systemic and mucosal delivery of DNA vaccine expressing glycoprotein B of pseudorabies virus. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 591–599.

L'article n'a repris qu'une partie des résultats obtenus durant la thèse. Les autres résultats qui sont complémentaires à ceux présentés dans l'article sont présentés ci-dessous.

6. Essai#2 – Résultats complémentaires

Pour rappel, dans cet essai nous avons évalué la faisabilité d'inoculer à des porcs le plasmide codant la gB du PrV formulé avec du chitosan ou du chitosan mannosylé par la voie intranasale. En contrôle il y avait des porcs inoculés par le même plasmide non formulé par la voie intranasale ou la voie intramusculaire et des porcs non inoculés.

a) Condition ADN nu codant PrV-gB inoculé en IM et témoin négatif

Dans l'article, nous avons montré que ces porcs inoculés en IM produisaient des IgG sériques et des IgA salivaires anti-PrV. Les porcs de la condition ADN nu IM ont tous les trois présentés également une réponse IgA sérique anti-PrV (**Figure 39**). Le porc #1 ADN nu I.M s'est avéré être rapidement producteur d'IgA sériques après une seule inoculation (titre de 3,3 log₂ détecté à J+10 post-inoculation). Pour ce porc, le pic en IgA sérique a été atteint à J+29 (titre de 6,32 log₂) soit après avoir reçu les deux autres injections I.M de plasmide pcDNA3-gB (à J+10 et J+20 en plus de celle faite à J+0). Les deux autres porcs ont présenté des IgA sériques à partir de J+20 avec une réponse maximale à J+29 (titres de 6,32 log₂ et 7,32 log₂ pour les porcs #2 et #3, respectivement). Ainsi, l'administration IM du vaccin à ADN nu a pu permettre l'induction d'une réponse en IgA sérique anti-PrV relativement précoce, et ce en amont de la réponse en IgG sériques (**Fig. 2 A** article) qui avait commencé à augmenter constamment dix jours plus tard que celle des IgA. Notons qu'au dernier jour de l'**essai #2**, c'est-à-dire à J+37, les IgA sériques anti-PrV étaient encore détectées (titres de 5,32 log₂ ou 4,32 log₂), bien qu'ayant légèrement diminués par rapport au jour J+29. Les porcs non inoculés n'ont quant-à-eux présentés aucuns anticorps sériques de type IgA anti-PrV.

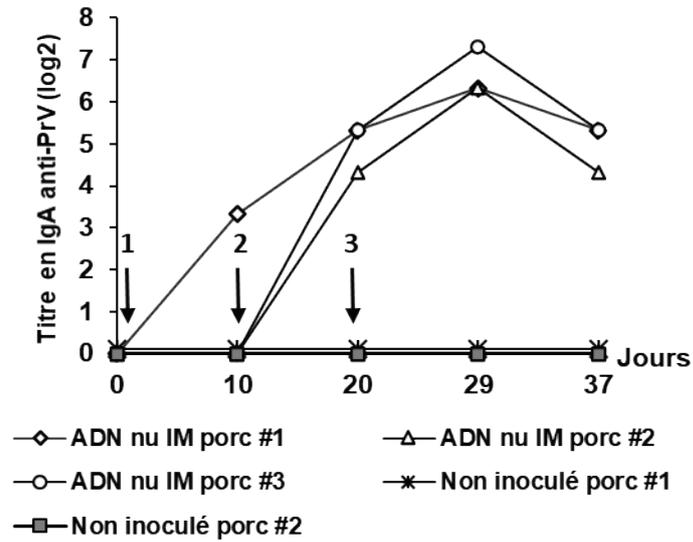


Figure 39. Détermination par ELISA des titres en IgA sériques contre le PrV chez les porcs inoculés en IM avec de l'ADN nu PrV-gB ou les porcs non inoculés. Les porcs de la condition ADN nu IM ont été inoculés à 3 reprises en IM (indiqué par les flèches) avec le plasmide codant PrV-gB nu. Les dilutions des sérums ont été réalisées en triplicats et le seuil de positivité a été établi comme étant la densité optique moyenne des contrôles négatifs + 3 ET. Deux autres porcs témoins n'ont pas été inoculés par les plasmides.

b) Condition ADN nu IN

Rappelons que nous avons montré la production d'IgG sériques et d'IgA salivaires anti-PrV par des porcs inoculés par la voie intranasale avec le plasmide codant la gB du PrV. La réponse en IgA systémiques induite contre le PrV a également été mesurée pour ces porcs (**Figure 40**). Nous avons pu observer pour le porc#1, que ce genre de réponse a été élicitée à partir de J+20 post-inoculation (pic à J+20 avec une valeur de 6,3 log₂ à J2). Les porcs#2 et #3 n'ont quant à eux montré une positivité en IgA sériques qu'à partir du jour J+37, soit à la dernière date de prélèvement (titre de 3,1 log₂ pour les 2 porcs). Ces résultats sont décrits dans l'article mais les figures n'y sont pas montrées.

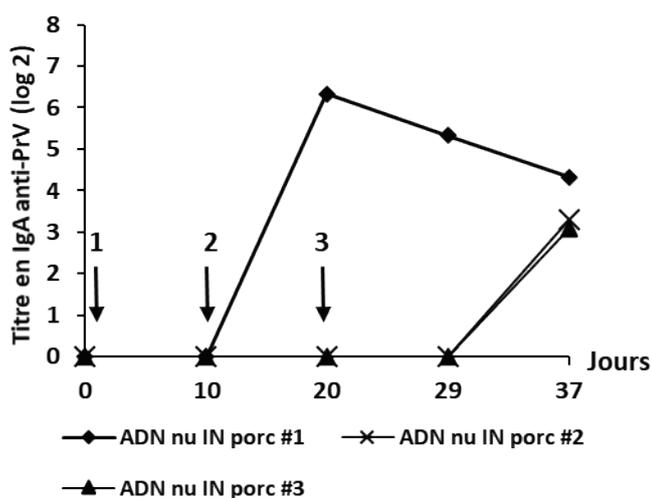


Figure 40. Détermination par ELISA des titres IgA sériques contre le PrV chez des porcs inoculés en IN avec de l'ADN nu codant PrV-gB. Les porcs de la condition ADN nu IN ont été inoculés à 3 reprises en IN (indiqué par les flèches) avec le plasmide nu codant PrV-gB. Les dilutions des sérums ont été réalisées en triplicats et le seuil de positivité a été établi comme étant la densité optique moyenne des contrôles négatifs + 3 ET.

c) Conditions ADN-Cs IN et ADN-MCA IN

Aucun résultat n'était présenté dans l'article pour ces 2 groupes. Très peu d'anticorps anti-PrV ont en fait été détectés dans le sérum, comme le montre la **Figure 41** où seuls 1 porc sur 3 et 2 porcs sur 3 ont produits de manière très faible et très ponctuelle des IgG anti-PrV dans le sérum lorsqu'ils ont été inoculés avec l'ADN associé au chitosan ou au chitosan mannosylé, respectivement. Il n'y avait pas d'anticorps de type IgA anti-PrV dans le sérum. Enfin dans la salive, 1 porc sur 3 et 2 porcs sur 3 ont présenté de très faibles titres en IgA anti-PrV lorsqu'ils ont été inoculés avec l'ADN associé au chitosan ou au chitosan mannosylé, respectivement (résultats non montrés).

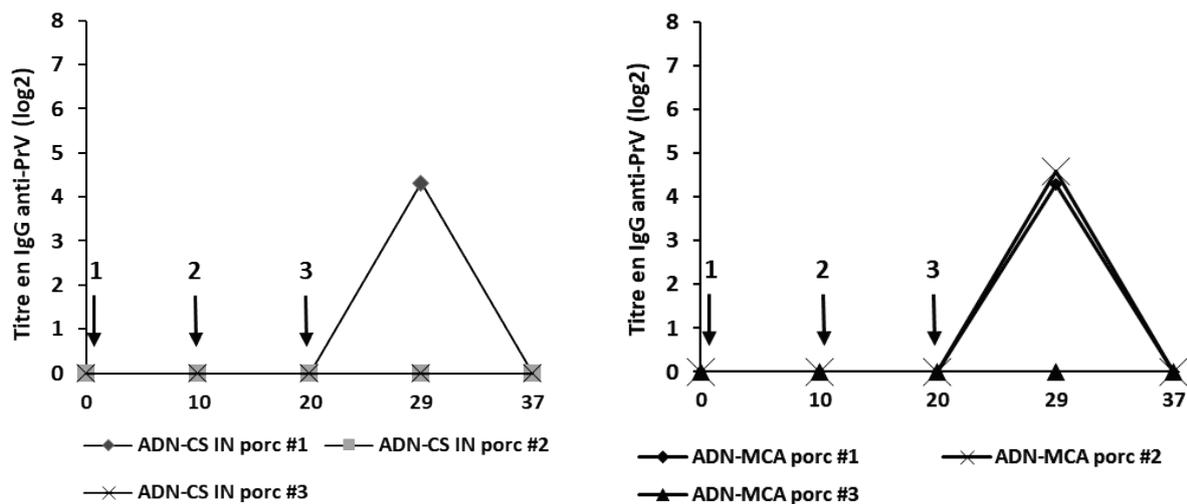


Figure 41. Détermination par ELISA des titres IgG sériques contre le PrV chez des porcs inoculé IN avec de l'ADN codant la gB du PrV associé avec le chisoan ou le chitosan mannosylé. Les porcs ont été inoculés à 3 reprises en IN (indiqué par les flèches) avec notre vaccin à ADN associé avec le chitosan (figure de gauche) ou le chitosan mannosylé (figure de droite). Les dilutions des sérums ont été réalisées en triplicats et le seuil de positivité a été établi comme étant la densité optique moyenne des contrôles négatifs + 3 ET.

d) Réponse cellulaire

L'induction de la réponse cellulaire systémique a également été évaluée durant l'essai #2. Pour cela des PBMCs ont été isolés du sang total par la méthode du Ficoll, incubés avec du virus PrV et l'ARN messager de l'IFN-gamma a été recherché au bout de 16 heures, comme cela s'est fait dans d'autres études de vaccination contre le PrV au laboratoire (Dory et al. 2009). Il s'est avéré ici qu'aucune des conditions expérimentales n'avait permis d'induire ce type de réponse (résultats non montrés).

e) Conclusions de l'essai #2

En conclusion de cet essai #2 (résultats article et résultats complémentaires de l'essai #2), nous avons pu voir que l'inoculation en IM pouvait permettre d'induire une réponse immunitaire systémique forte (IgG) qui peut s'accompagner d'une réponse qui soit à la fois systémique (IgA sériques) et mucoale (sIgA salivaires). Compte-tenu de notre expérience, ce type d'inoculation permet d'induire une protection contre le virus de la pseudorabe porcine en utilisant un mélange de 3 plasmides codant la gB, la gC et la gD du virus.

En revanche, l'injection en IN a donné des résultats plus mitigés avec une très faible réponse systémique et une réponse mucoale mesurée dans la salive proche de celle induite par l'IM, voire légèrement supérieure, lorsque l'ADN est nu et libre. Lorsqu'il est complexé au chitosan ou au chitosan mannosylé (MCA), les réponses immunitaires sont nettement plus faibles, voire nulles dans certains cas. Il y a peut-être des conditions d'inoculation de l'ADN complexé avec le chitosan qui pourraient être améliorées, et c'est l'objet de l'essai suivant de cette thèse (**essai #3**).

7. Essai #3 – Variation de certains paramètres : résultats

L'essai précédent avait montré que l'ADN nu inoculé en IN permettait de générer des réponses immunitaires contre le PrV et que l'ADN vaccinal complexé avec le chitosan en particuliers voyait son immunogénicité considérablement réduite. Il y a peut-être des paramètres du complexe ADN-chitosan ou de la technique d'inoculation qui peuvent être améliorés. Nous avons alors réalisé un essai sur quelques animaux en modifiant certains paramètres de l'inoculation par voie IN de l'ADN formulé avec le chitosan. Rappelons que le chitosan a été maintenu ici pour son coût et la simplicité de production des nanoparticules en laboratoire.

Pour chaque paramètre, un seul animal a été utilisé. Les paramètres évalués ont été :

- La quantité d'ADN à inoculer : 1 animal a été inoculé avec une quantité d'ADN trois fois plus importante que précédemment, à savoir 600 µg par inoculation et par narine ;
- La nature des immunogènes : 1 animal a été inoculé avec un mélange gB+gC+gD du PrV qui sont toutes les 3 des glycoprotéines du PrV fortement immunogènes et qui permettent d'induire des réponses protectrices (Dory, Béven, et al. 2005) ;
- La profondeur de l'inoculation en IN : un atomiseur plus long a été utilisé de manière à pulvériser l'ADN vaccinal complexé au chitosan plus profondément dans les narines au niveau du septum nasal.
- Les contrôles étant les suivants : ADN codant la gB-chitosan inoculé en IN à la quantité 1X (c'est-à-dire la condition de l'essai précédent), ADN nu codant la gB inoculé en IN à la quantité 1X, ADN gB + gC + gD-chitosan inoculé par la voie IM et 1 porc non inoculé.

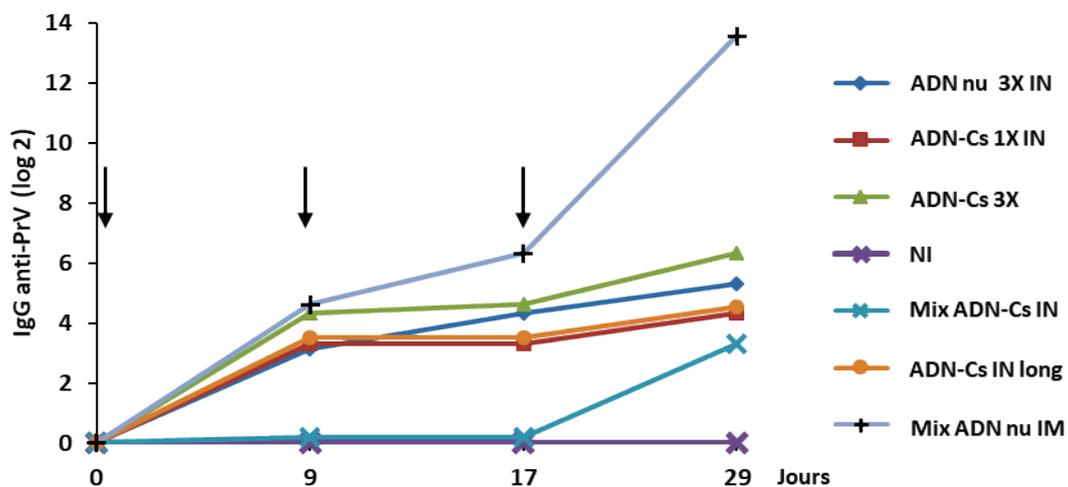


Figure 42. Détermination par ELISA des titres IgG sériques contre le PrV chez des porcs inoculés avec différentes préparations vaccinales. Les porcs des conditions IN ou IM ont été inoculés à 3 reprises (indiqué par les flèches) avec notre vaccin à ADN nu (plasmide pcDNA3-gB seul ou mix de plasmides pcDNA3-(gB + gC + gD) ou bien formulé avec différentes conditions de chitosan (concentration d'ADN 1X ou 3X). Les dilutions des sérums ont été réalisées en triplicats et le seuil de positivité a été établi comme étant la densité optique moyenne des contrôles négatifs + 3 ET.

Les porcs ont été inoculés à 3 reprises, comme décrit précédemment. Les paramètres mesurés ont de nouveau été la recherche d'anticorps sériques. Ainsi, les résultats obtenus ont confirmé que l'ADN nu inoculé en IN permettait bien d'induire des réponses immunitaires systémiques, mais aucune des autres conditions avec le chitosan n'avait permis d'augmenter sensiblement les réponses immunitaires obtenues précédemment, y compris lorsque la quantité d'ADN a été triplée ou si le mix d'ADN a été utilisé (**Figure 42**). Par conséquent, et compte-tenu des contraintes liées à la disponibilité et au coût du KLN47 et du PLGA-PEI, nous avons décidé de maintenir la quantité d'ADN 1x pour l'essai suivant (sinon il aurait fallu tripler également la quantité de KLN47, ce qui était impossible). Dans cet essai, les 4 formulations sélectionnées ont été incluses afin de pouvoir objectivement comparer les formulations entre elles avec la même quantité d'ADN à la concentration 1X (200 µg par narine et par inoculation). Enfin l'inoculateur MAD100 normal sera maintenu (et non l'inoculateur plus profond).

8. Essai #4 – Comparaison des 4 formulations : résultats pour le chitosan, le chitosan mannosylé, le PLGA-PEI et le KLN47

a) Condition ADN nu IN

Dans l'article publié, n'était présenté que la production des IgG sériques anti-PrV pour ce qui concerne la réponse humorale systémique suite à l'inoculation IN d'ADN nu (codant la gB). Pour les IgA systémiques anti-PrV, nous avons à nouveau constaté que les 3 porcs inoculés produisent ce type d'anticorps suite à l'inoculation de l'ADN nu codant la gB du PrV par la voie IN (**Figure 43**).

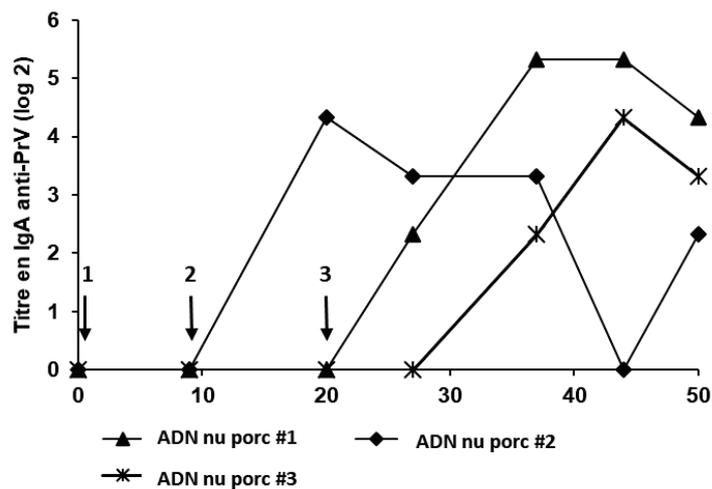


Figure 43. Détermination par ELISA des titres en IgA systémiques contre le PrV inoculé avec notre vaccin à ADN (pcDNA3-gB). Les porcs ont été inoculés à 3 reprises (indiqué par les flèches) avec un vaccin à ADN pcDNA3-gB sous sa forme nue. Les dilutions des sérums ont été réalisées en triplicate et le seuil de positivité a été établi comme étant l'O.D. moyenne des contrôles négatifs + 3 ET.

b) Condition ADN-Cs IN (réponse systémique)

La réponse immunitaire systémique obtenue pour ce groupe (ADN-Cs) est la suivante : titre bref et maximal d'IgA sériques obtenu pour un seul des 2 porcs (titre faible de 2,32 log₂) (**Figure 44 B**). Ce même animal a présenté une réponse en IgG sérique très faible elle-aussi (titre de 3,32 log₂ à J44 et J50 sur la fin de l'essai) (**Figure 44 A**). Enfin, au niveau de la réponse mucoale, mesurée à partir des échantillons de salives prélevés tout au long de l'essai #4, nous avons trouvé que les deux porcs n'induisaient des sIgA salivaires qu'à J20 uniquement (titre de 3,32 log₂ pour les porcs #1 et #2) (**Figure 44 C**). Cette réponse mucoale a donc été très brève et limitée.

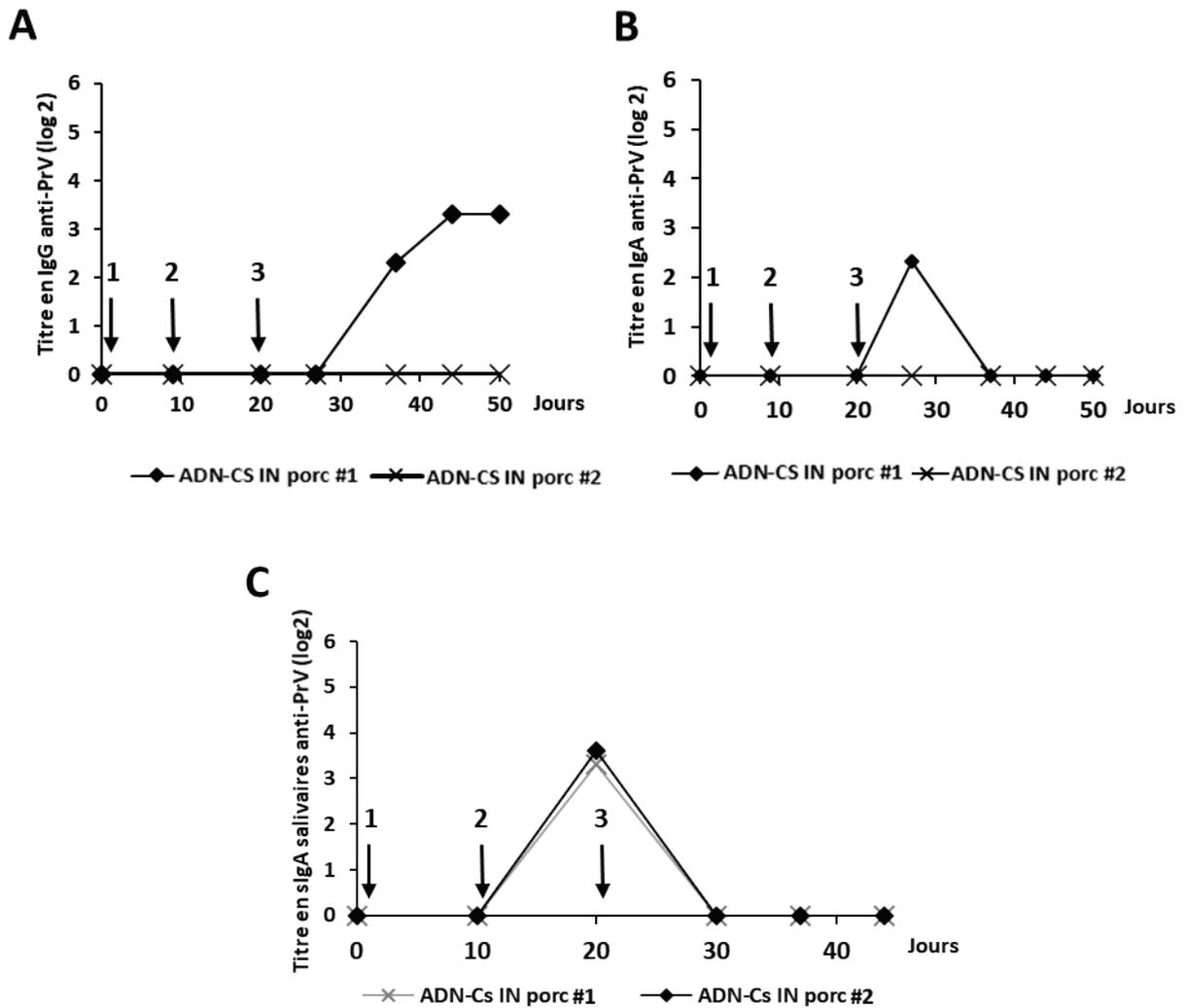


Figure 44. Détermination par ELISA des titres en IgG and IgA systémiques et sIgA salivaires obtenus durant l'essai #4 contre le PrV chez des porcs inoculés avec le plasmide codant la gB du PrV formulé avec du chitosan. Les porcs ont été inoculés à 3 reprises (indiqué par les flèches) avec un vaccin à ADN-Cs formulé avec le chitosan Les titres en IgG et IgA sériques sont indiqués en (A) et (B) respectivement. Ceux en sIgA salivaires sont indiqués en (C). Les dilutions des sérums et échantillons salivaires ont été réalisées en triplicats et le seuil de positivité a été établi comme étant la densité optique moyenne des contrôles négatifs + 3 ET.

c) Condition ADN-MCA IN

Pour la condition MCA-ADN inoculé IN, une forte variabilité interindividuelle a de nouveau été constatée dans le groupe ADN-MCA constitué de trois porcs différents (**Figure 45**). Le porc#1 de ce groupe a présenté une réponse IgG sérique anti-PrV commençant dès J+10 (titre de 4,3 log₂), atteignant son titre maximal à J+20 (titre de 6,3 log₂) avant de redescendre à des valeurs plateaux (titres compris entre 3,3 log₂ et 4,3 log₂) (**Figure 45A**). De façon surprenantes, les porcs #2 et #3 n'ont pas produit ce type d'anticorps tout au long de l'essai, ce qui contraste fortement avec les résultats obtenus pour le porc #1. Pour les IgA sériques anti-PrV, seul le porc#3 présente une très brève réponse (titre de 4,32 à J+20 uniquement) (**Figure 45B**). En ce qui concerne les anticorps sIgA mesurés dans la salive, les 3 porcs induisent la production de ce type d'anticorps de façon plus ou moins transitoire (**Figure 45C**). Aucune amélioration par rapport à l'ADN nu inoculé par la voie IN n'est observée.

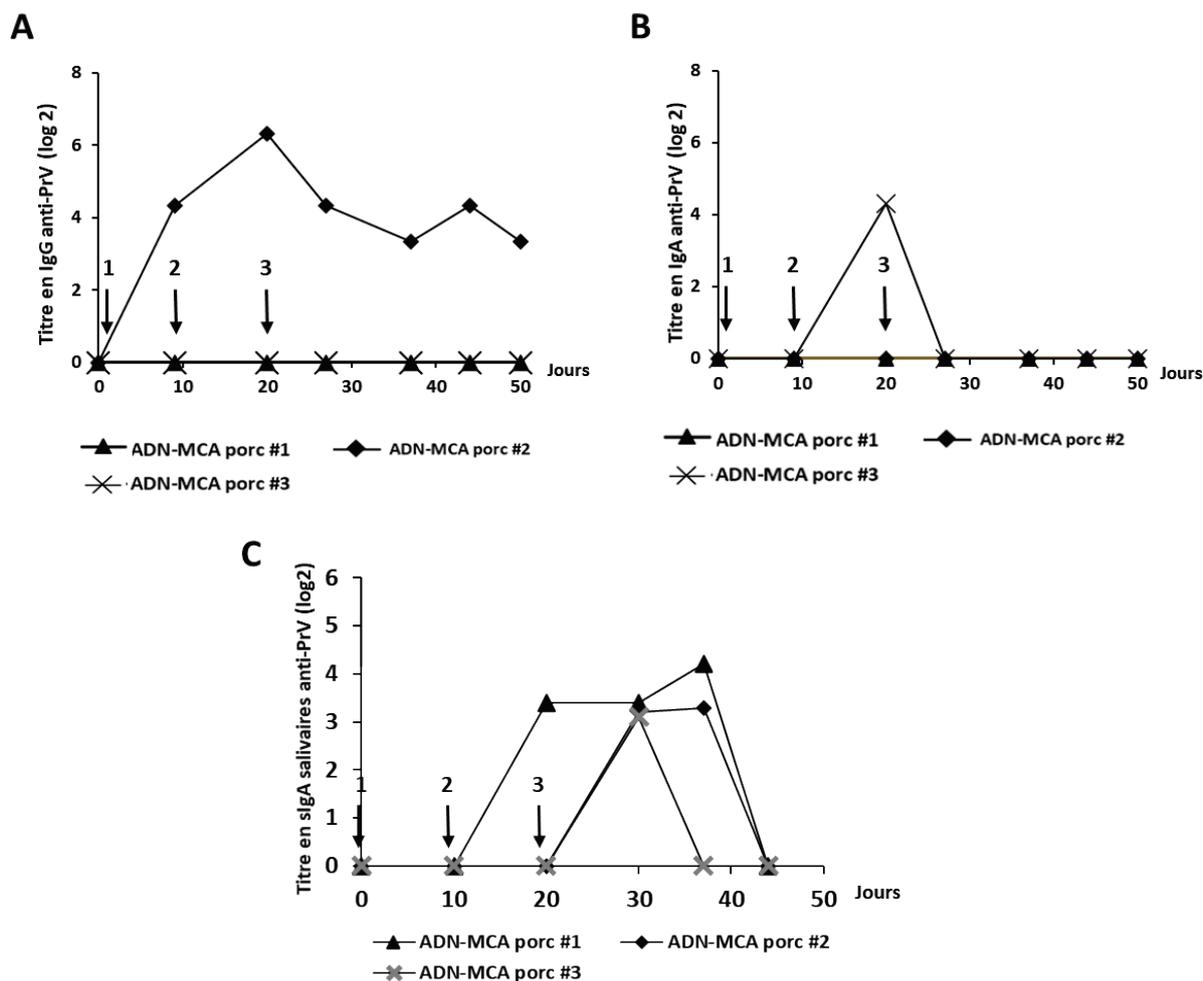


Figure 45. Détermination par ELISA des titres en IgG and IgA systémiques et sIgA salivaires contre le PrV inoculé avec notre vaccin à ADN (pcDNA3-gB) formulé avec le MCA. Les porcs ont été inoculés à 3 reprises (indiqué par les flèches) avec un vaccin à ADN pcDNA3-gB formulé avec le chitosan. Les titres en IgG et IgA sont indiqués en (A) et (B) respectivement, ainsi que ceux en sIgA salivaires (C). Les dilutions des sérums et échantillons salivaires ont été réalisées en triplicats et le seuil de positivité a été établi comme étant la densité optique moyenne des contrôles négatifs + 3 ET.

d) Condition ADN-KLN47

Dans le groupe inoculé avec de l'ADN-KLN47, un des porcs a présenté le niveau le plus élevé d'IgG anti-PrV sériques qui a pu être mesuré sur l'ensemble des conditions avec des porcs inoculés IN (porc#1, titre de 8,32 log₂ à J+44 et J+50) (**Figure 46A**). Les deux autres porcs de ce groupe se sont toutefois avérés être négatifs en IgG sériques anti-PrV tout au long de l'essai. Encore une fois, nous retrouvons une très forte variabilité inter-individuelle, celle-ci étant renforcée par les faibles effectifs en porc par conditions.

Par ailleurs, pour la réponse induite en IgA sériques, le porc #1 montre aussi une légère réponse à compter de J+37 (titre de 2,32 log₂) qui est encore positive à la fin de l'essai #4 (titre de 2,32 log₂), le pic ayant par contre été atteint à J+44 (titre de 3,32 log₂) (**Figure 46B**). Le porc #2 a présenté des IgA sériques de façon plus que brève (titre de 2,32 à J+37 uniquement). Ces anticorps n'ont pas été détectés chez le porc #3 de ce groupe.

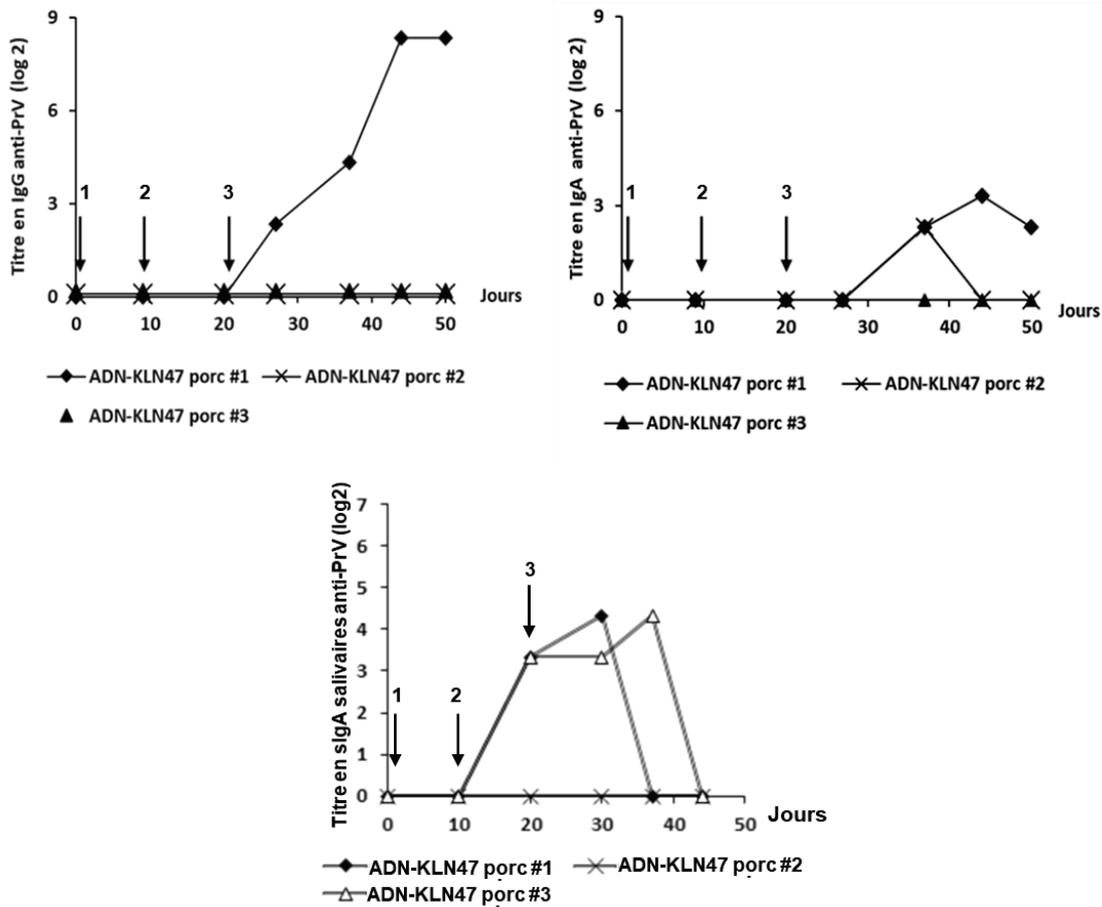


Figure 46. Détermination par ELISA des titres en IgG and IgA systémiques ou mucosaux obtenus durant l'essai #4 contre le PrV inoculé avec notre vaccin à ADN (pcDNA3-gB) formulé avec le lipide cationique KLN47. Les porcs ont été inoculés à 3 reprises (indiqué par les flèches) avec un vaccin à ADN pcDNA3-gB formulé avec le KLN 47. Les titres en IgG et IgA sont indiqués en (A) et (B), respectivement ainsi que ceux en sIgA salivaires (C). Les dilutions des sérums et échantillons salivaires ont été réalisées en triplicats et le seuil de positivité a été établi comme étant la densité optique moyenne des contrôles négatifs + 3 ET.

e) Réponse en sIgA dans le mucus des amygdales (essai #4).

A la fin de l'essai #4, nous avons également prélevé du mucus au niveau des amygdales au moment de l'autopsie des porcs à J+49 (**Tableau 7**). Ces anticorps ont été détectés dans le mucus du porc inoculé par la voie IM avec l'ADN nu à condition de déposer 13 mg de mucus. Par ailleurs, ces anticorps ont été détectés dans les mucus de tous les animaux inoculés avec l'ADN par voie IN, que l'ADN soit nu ou formulé, sauf chez 2 porcs sur 3 du groupe KLN47 (porcs #2 et #3) et 1 porc du groupe ADN nu (porc #2) où aucun anticorps de ce type n'a été détecté dans le mucus prélevé au niveau des amygdales. Il faut dans tous les cas positifs entre 0,8 (porc #1 ADN nu IN) et 13 mg (porcs #3 ADN nu, #2 ADN-MCA, #3 ADN-Cs, #1 ADN-PLGA-PEI et #1 ADN-KLN47) de mucus pour détecter ces anticorps (plus la quantité à déposer est faible, plus il y a des anticorps dans le mucus). Les résultats sont variables à l'intérieur d'un même groupe et il n'y a pas vraiment de groupe qui se détache clairement des autres.

Tableau 7 : Détermination par ELISA des sIgA présentes dans le mucus d'amygdales porcines (post-mortem à J50 de l'essai #4)

Condition inoculation	IM	IN													
	ADN nu	ADN nu			ADN-Cs		ADN-MCA			ADN-PLGA-PEI			ADN-KLN47		
Porc n°	#1	#1	#2	#3	#1	#2	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3
sIgA au niveau des amygdales à J50 (quantité minimale de mucus en mg pour détection des sIgA)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	13	0,8	-	13	6,6	6,6	1,7	13	13	13	1,6	3,3	13	-	-

f) Réponse pour les sIgA nasales (essai#4)

Nous avons également déterminé durant l'essai #4 la présence ou non de sIgA dans les fosses nasales. Au final, elles n'ont été détectées qu'à J+27 et/ou à J+34 mais pas dans tous les cas (**Tableau 8**). Elles sont détectées chez le porc inoculé en IM avec l'ADN nu, chez 2 porcs / 3 inoculés en IN avec l'ADN nu (porcs #1 et #2 ADN nu), chez les 2 porcs (#1 et #2) inoculés en IN avec de l'ADN-chitosan et un porc (#2) du groupe ADN-PLGA-PEI. Tous les autres porcs sont négatifs.

Tableau 8 : Détermination par ELISA des sIgA présentes dans les lavages nasaux (NAL) (prélèvements réalisés à J27 et J34 durant l'essai#4).

Condition d'inoculation		IM ADN nu	IN													
			ADN nu			ADN-Cs		ADN-MCA			ADN-PLGA-PEI			ADN-KLN47		
Porc n°		#1	#1	#2	#3	#1	#2	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3
sIgA nasales	DO > seuil	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	Période	J27	J27 et 34	J27	-	J27 et 34	J34	-	-	-	-	J27	-	-	-	-

9. Bilan général de l'essai #4

Nous avons pu voir au cours de ce dernier essai *in vivo* que le titre le plus fort en IgG sériques anti-PrV parmi toutes les conditions a été obtenu chez le porc inoculé par la voie IM. En revanche, le constat est plus contrasté à propos de la réponse en IgG sériques anti-PrV induite chez les porcs inoculés par la voie IN : ces anticorps n'ont pas été détectés chez neuf porcs sur les 14 inoculés IN. Ces résultats montrent que pour obtenir une réponse systémique forte, l'immunisation par la voie intramusculaire est la plus efficace, et que le recours à des formulations/nanovecteurs par la voie intranasale n'avait pas permis d'induire ce type de réponse aussi fortement. La grande surprise a été la condition ADN nu IN qui a en quelque sorte déjoué nos suppositions. Au début de la thèse, nous pensions que cette condition serait inefficace car l'ADN nu sans formulation n'est pas protégé pour faire face aux défenses naturelles des muqueuses nasales et/ou respiratoires. Par ailleurs, nos résultats *in vitro* montraient une transfection nulle dans les lignées cellulaires testées en l'absence de nanovecteurs. Il s'est avéré en fait que les 3 porcs du groupe ADN nu IN et qu'en moyenne 1 porc sur 3 de chaque groupe ayant reçu de l'ADN formulé ont produit des IgG sériques anti-PrV. Le titre le plus fort a été obtenu pour 1 porc du groupe KLN47, ce qui souligne le potentiel du KLN47 comme nanovecteur vaccinal chez le porc, mais ce porc a été le seul à répondre pour ce critère parmi les 3 porcs du groupe. La variabilité inter-individuelle apparaît comme donc étant particulièrement critique dans les groupes inoculés IN, ce qui suggère que ce mode d'inoculation, tel que l'avons effectué à des fins d'immunisation, doit être amélioré pour limiter le manque de régularité entre chaque animal vacciné.

Les titres en IgA sériques anti-PrV ont également été dosés. Là aussi, les titres en IgA sériques sont plus faibles chez les porcs inoculés par la voie IN avec l'ADN nu que chez le porc inoculé par la voie IM. La cinétique de production de ces IgA est porc-dépendante. Par ailleurs, les pics de ces titres sont beaucoup plus faibles dans les groupes ayant été inoculés par voie IN avec l'ADN formulé, quelle que soit la

formulation (6 porcs négatifs, 2 porcs à un titre de 2,32 log₂ (ADN-PLGA-PEI porc#1 et ADN-KLN47 porc #2), 2 porcs à un titre de 3,32 log₂ (ADN-Cs porc#1 et ADN-KLN47 porc #1 et enfin 1 porc à 4,32 log₂ (ADN-MCA porc#1)) si l'on compare aux titres obtenus pour les porcs inoculés avec l'ADN nu par voie IN.

En ce qui concerne les résultats des sIgA salivaires, les résultats entre l'inoculation en IN et en IM de l'ADN nu se sont avérés être beaucoup plus proches, avec une production d'IgA salivaires décelée dès la 2^{ème} inoculation pour 2 porcs sur 3 du groupe IN. La production de sIgA salivaire est décelée chez la plupart des porcs ayant été inoculés avec l'ADN formulé (titres de 3,32 log₂ à 5,32 log₂), sauf pour un porc du groupe chitosan (ADN-Cs porc #2) et un du groupe KLN47 (ADN-KLN porc #2). Le groupe chitosan est celui qui donne les résultats les plus faibles (0 pour le porc #1 et 3,32 log₂ pour le porc#2).

Discussion

La vaccination est une stratégie qui permet à un homme ou un animal de se défendre spécifiquement contre un pathogène donné. En effet, cet organisme va apprendre à reconnaître spécifiquement un ou plusieurs immunogènes issus du pathogène et à développer une réponse immunitaire protectrice contre ce(s) immunogène(s). De manière classique, les vaccins sont inoculés par voie parentérale. Cependant, les voies d'entrée des pathogènes sont généralement des voies mucoales. Dans de nombreux cas, la vaccination par voie parentérale permet de se protéger contre un pathogène entrant via les muqueuses, mais ce n'est pas toujours le cas. Par ailleurs, et c'est le cas avec la pandémie liée au SARS-Cov2, des virus entrant par la voie oronasale émergent de temps en temps. C'est dans tous ces cas que la vaccination effectuée par la même voie que la voie d'entrée du pathogène représente une piste de recherche intéressante pour développer de nouvelles stratégies vaccinales, et c'est l'objet de ces travaux de thèses. Ces recherches conduites au sein de l'Unité Génétique Virale & Biosécurité (UGVB) du laboratoire Anses de Ploufragan, visaient à étudier la faisabilité d'une stratégie vaccinale originale, à savoir la vaccination à ADN intranasal. Vu que les thématiques de recherche menées au sein de l'agence concernent principalement l'étude de pathogènes ayant un fort impact chez les animaux de rentes et que nous disposions d'un vaccin à ADN modèle développé contre le virus de la pseudorag porcine, il en a résulté que ce modèle est un modèle *in vivo* porcin de choix pour étudier une nouvelle stratégie de vaccination des porcs : la vaccination à ADN par voie intranasale. Au-delà de l'aspect « vaccination vétérinaire » pour des animaux de rentes, le modèle porcin est généralement considéré comme étant physiologiquement proche de l'homme. Cela pouvait donc aussi en faire un modèle de choix pour une première approche *in vivo* expérimentale avant de passer à des essais cliniques plus poussés à visée humaine (chez le singe ou l'humain par exemple). En ce qui nous concerne, c'est-à-dire la vaccination à ADN intranasale des animaux de rente, très peu de données ont été rapportées dans la littérature scientifique. Ceci est principalement dû au fait que notre vaccin était de nature nucléique et qu'*a fortiori*, la voie

d'administration choisies, celle intranasale, est peu couramment employée chez des animaux de rente pour ce type de vaccin.

Au cours de ces dernières années, des stratégies d'amélioration de la vaccination à ADN plasmidique contre le virus de la pseudorage porcine (PrV) ont été étudiées par notre équipe. Ces études s'étaient principalement focalisées sur l'optimisation et le devenir de notre vaccin expérimental lorsque celui-ci est utilisé par voie parentérale (Injection IM, intradermique (ID) ou par électroporation). En bref, une seule injection du vaccin à ADN contenant entre autres le plasmide pcDNA3-gB nu avait été démontré comme étant capable d'induire une forte réponse immunitaire protectrice contre le PrV. Ce modèle de vaccination à ADN est donc intéressant à double titre ici. Premièrement, c'est un modèle de vaccination qui fonctionne bien. Il reste donc un modèle idéal pour poursuivre les études de nouvelles voies d'amélioration de la vaccination à ADN chez le porc. Par ailleurs, la voie d'entrée du virus de la pseudorage porcine dans l'organisme est la sphère oro-nasale. C'est donc un modèle intéressant pour développer la vaccination à ADN par voie intranasale.

Il y a très peu de données dans la littérature sur la vaccination à ADN par voie intranasale chez le porc. Des données existent chez la souris ou d'autres rongeurs de laboratoire pour ce type de vaccination. En revanche pour le porc, la voie intranasale a surtout été décrite pour l'inoculation de protéines recombinantes. L'ensemble de ces données nous ont permis de sélectionner 3 nanovecteurs prometteurs pour notre étude : le chitosan, le chitosan mannosylé et le PLGA-PEI. Par ailleurs, nous avons des contacts avec la plateforme SynNanoVect de Brest qui a développé un vecteur lipidique pour le transfert de gènes inoculé aux bronches par la voie respiratoire en utilisant un modèle murin : le KLN47. Si ce vecteur fonctionne pour le transfert de gènes, il est capable en théorie de transférer également l'ADN vaccinal puisque dans les 2 cas c'est de l'ADN qui doit être véhiculé. Ces 4 nanovecteurs ont donc été inclus dans l'étude chez le porc.

Des études *in vitro* tout à fait classiques sur des lignées de cellules HEK293 et HBE-16 ont permis de montrer que l'ADN formulé avec chacun de ces vecteurs transfectait au moins l'une de ces lignées cellulaires (la lignée HEK293), et que l'association ADN-nanovecteur n'était pas toxique pour les cellules, tout du moins dans les conditions testées. Ceci était un préalable nécessaire pour effectuer les études *in vivo* chez le porc car ainsi nous savons que nos associations vecteurs/ADN sont fonctionnelles pour permettre la transfection de cellules et qu'elles sont non toxiques avec les ratios ADN/vecteurs utilisés. Il est néanmoins important de signaler ici que la lignée de cellules bronchiques humaines HBE-16 n'était pas transfectée par l'ADN plasmidique lorsque celui-ci était associé avec le chitosan ou le chitosan mannosylé, alors que les 2 autres formulations (le PLGA-PEI et le KLN47) permettaient la transfection de l'ADN plasmidique dans ces cellules. Ensuite nous avons entamé les premières études *in vivo* chez le porc. Pour cette première étape, il a fallu adapter les protocoles décrits dans la littérature pour la vaccination à ADN chez les rongeurs de laboratoire aux porcs. Avec l'aide de vétérinaires de la structure Zoopôle Développement (Ploufragan), nous avons placé au bout d'une seringue un prolongateur sous la forme d'un petit tuyau flexible en plastique de manière à placer le jet d'ADN plasmidique au niveau du septum nasal. L'inoculation de l'ADN vaccinal a été réalisée sur porcs éveillés, au moment de l'inspiration. Pour des raisons de coûts de fabrication de l'ADN formulé, nous avons débuté avec le chitosan et le chitosan mannosylé. Un ADN codant la luciférase a été utilisé. Au bout de 72 heures, nous avons sacrifiés les porcs et isolé le septum nasal pour y rechercher l'expression de la luciférase. Aucune expression de la luciférase n'a pu être détectée. Cette absence de détection pourrait être expliquée par plusieurs phénomènes. Tout d'abord ça peut être lié au fait que les transfusions des cellules de ces muqueuses ne se font pas ou se font très mal lorsque l'ADN est associé au chitosan. Une autre explication serait liée au fait que le tissu sélectionné, la muqueuse du septum nasale, ne soit pas la muqueuse principalement ciblée ou encore que la technique d'inoculation avec un flux de liquide issu d'une seringue prolongée d'un tuyau ne permette pas aux nanoparticules de

rentrer en contact avec les cellules des muqueuses. Enfin, la technique de recherche de la bioluminescence utilisée n'était peut-être pas assez sensible.

Toutefois, il peut être noté que d'autres techniques biologiques auraient pu permettre d'étudier plus efficacement et ce de façon plus pratique le devenir des nanovecteurs d'intérêt formulés avec le plasmide codant la luciférase au niveau des muqueuses nasales porcines, si elles avaient pu être accessibles au sein de notre structure. Une première piste aurait pu être l'utilisation d'un scanner IVIS, un système d'imagerie *in vivo* sur animaux vivant de petite taille (souris, lapin, cochon d'indes). Ce type de scanner IVIS permet la quantification de la profondeur, de la géométrie et surtout de l'intensité de sources aussi bien bioluminescentes que fluorescentes et ce, dans des résolutions spatiales tridimensionnelles. Le porc étant un animal de taille importante, faire l'imagerie *in vivo* en tant que tel aurait bien sûr été exclu mais ce type d'imagerie aurait pu se faire directement sur : **a)** sur tête de porc entière (post-autopsie), **b)** sur le groin (après l'avoir découpé) et/ou **c)** directement sur les septums nasaux qui aurait été prélevés comme nous l'avons fait dans cet essai n°1. Ce résultat aurait été plus visuel sur les zones où le plasmide aurait pu se trouver et permis de détecter des quantités bien plus infimes de luciférase. Une seconde option aurait pu être l'utilisation d'un stéréomicroscope à fluorescence. Dans ce cas de figure, nous aurions pu par exemple préparer/formuler un plasmide pGFP codant pour la protéine fluorescente GFP avec nos nanovecteurs chitosan ou MCA et détecter la fluorescence sur des tissus prélevés dans la cavité nasale de porcs ayant été inoculés avec nos nanovecteurs combiné à de la GFP. Cela aurait été faisable sur les septums prélevés de la même manière que nous l'avons fait.

Dans un second temps, nous avons abandonné cette stratégie de recherche d'expression de luciférase *in vivo*, en nous basant cette fois sur l'induction de réponses immunitaires systémiques et mucosales. Dans ce cas nous avons utilisé un plasmide codant la glycoprotéine B (gB) du virus de la pseudorange porcine (PrV) associé ou non avec chacun des 4 nanovecteurs sélectionnés et un atomiseur permettant l'inoculation

d'ADN vaccinal formulé ou non sous la forme d'un brouillard de particules de 30 à 100 microns de diamètre. Ce brouillard peut être projeté jusqu'à 1 mètre (à l'extérieur) et peut donc atteindre aussi bien les points proches de l'extrémité de la seringue que les points plus distants de la muqueuse nasale et respiratoire. Cette fois, même si les résultats semblent un peu décevants à bien des égards, des résultats prometteurs ont été générés et ceux-ci ont pu faire l'objet d'une publication. En effet, avec cette stratégie, nous avons pu montrer que des anticorps anti-PrV sériques de type IgG et mucosaux de type sIgA étaient générés, notamment lorsque les plasmides codant la gB du PrV étaient inoculés sous la forme nue (c'est-à-dire sans nanovecteur). Les formes nanovectorisées du plasmide étaient généralement moins performantes pour l'induction de ces réponses immunitaires, mis-à-part quelques résultats individuels plus prometteurs suggérant le potentiel de ces vecteurs s'ils sont utilisés dans des conditions plus optimisées. Les productions d'anticorps étaient comparées à celles induites par l'injection de l'ADN vaccinal par la voie de référence, la voie intramusculaire. Cette voie permettait d'induire les réponses humorales systémiques de type IgG les plus fortes et conformes à celles obtenues précédemment dans l'équipe et permettaient également d'induire des réponses mucosales de type sIgA relativement fortes, comparées à celles obtenues avec l'ADN nu inoculé par la voie intranasale.

Par ailleurs, l'induction d'IgA sériques anti-PrV a également été évaluée dans ces essais (essais *in vivo* #2 et #4) afin de déterminer le potentiel de notre vaccin à ADN à induire une réponse d'un autre type que celle en IgG sériques, même si le rôle de ces IgA sériques n'est pas clairement défini. Ainsi nous avons montré que tous les porcs inoculés IM produisaient également des IgA sériques. Par rapport aux IgA sécrétoires (IgA avec une structure dimérique que l'on appelle sIgA) particulièrement impliquées dans les mécanismes d'immunité mucoale, comme cela vous a été présenté dans le chapitre d'introduction de cette thèse, le rôle réel des IgA sériques (structure monomérique IgA1) est longtemps resté flou (Trochimiak and Hubner-Wozniak 2012).

Les IgA sériques pourraient jouer un rôle dans la régulation de la formation de complexe immunitaire en limitant la suractivation de ce dernier (Pabst 2012). Ils régulent également l'activation des leucocytes et peuvent interagir avec les récepteurs du complément sérique ou des cellules de surface (Leong and Ding 2014). Ainsi leur rôle dans le système systémique pourrait être complémentaire à celui des IgG sériques. L'intérêt de tels anticorps par rapport à notre thématique serait à mieux définir ultérieurement.

Le potentiel de la voie IM pour induire une réponse locale mucoale a été également déterminé. De façon générale, les vaccins parentéraux présentent une faible immunogénicité mucoale et ne produisent pas systématiquement des anticorps sécrétoires locaux. Toutefois, l'induction d'une immunité mucoale par voie systémique est un concept qui reste controversé (Su et al. 2016). Nous avons pu déterminer, sur deux essais indépendants (essai *in vivo* #2 et #4), que c'est possible étant donné que quatre porcs sur cinq, vaccinés IM, avaient produit des anticorps sIgA anti-PrV dans leur salive. Ainsi, même si notre vaccin à ADN plasmidique n'est pas administré par la voie mucoale (la voie IN par exemple), notre vaccin permet l'induction d'une réponse immunitaire mucoale détectée dans la salive chez des porcs vaccinés en IM. Néanmoins, cette réponse s'est avérée être du même ordre d'intensité que pour les inoculations en IN et n'a été que transitoire. Dans la littérature, certaines études avaient auparavant montré que des vaccins à ADN IM peuvent en effet induire une réponse qui se relève à la fois d'une immunité mucoale et systémique. Par exemple, l'équipe de Taylor (Taylor et al. 2005) a vacciné des veaux de deux semaines avec un vaccin à ADN du virus respiratoire bovin (BRV) par la voie IM et a ensuite observé l'induction de sIgA dans des lavages broncho-alvéolaires ainsi qu'une protection efficace lors des épreuves d'infection IN avec le virus BRV.

Dans cette thèse, nous avons aussi voulu mettre à profit notre vaccin à ADN expérimental développé contre le virus de la pseudoréose porcine (PrV) pour évaluer le potentiel d'une voie d'administration mucoale et donc de directement induire une

réponse immunitaire efficace sur les sites même (donc locale) des muqueuses ciblées. Ceci a constitué l'objectif principal de cette thèse : à savoir définir si la voie IN peut être efficace en vaccination à ADN sur un modèle porcin.

Parmi les voies d'administration mucoales qu'il nous était possible de choisir à étudier durant la thèse, nous avons fait le choix de la voie intranasale à plusieurs titres. En effet, la voie respiratoire est l'une des voies principales d'entrée de pathogènes dans l'organisme. Ensuite, il est supposé que la cavité nasale présente une bonne bio-disponibilité de ses sites inducteurs immunitaires (à savoir les NALTs), les épithéliums nasaux sont relativement perméables et l'activité enzymatique est réduite à plus forte raison comparé à d'autres voies mucoales (notamment la voie orale) (Csaba, Garcia-Fuentes, and Alonso 2009; Khatri, Goyal, Gupta, Mishra, Mehta, et al. 2008). Nous avons utilisé un dispositif de seringue avec un embout spécial servant d'atomiseur de manière à pouvoir mieux cibler les sites inducteurs NALTs des porcs (ceux-ci comprennent les amygdales, les végétations, les follicules lymphoïdes subépithéliaux isolés...). Avec ce type de stratégie, il est théoriquement possible d'obtenir une réponse adaptative locale associée aux sites inducteurs NALTs grâce à l'activation du centre germinatif associé à des lymphocytes B. Selon la littérature, ce type d'IgA locales peuvent être produites, dans divers sites distants de l'organisme que l'on appelle « sites effecteurs » avant d'être sécrétées (sIgA). On parle pour le système d'immunité mucoale de système « sites inducteur/effecteur » (Bernocchi, Carpentier, and Betbeder 2017). Dans le cas ci-présent, à savoir la voie IN, les sites effecteurs associés aux NALTs sont les suivants : tractus gastro-intestinaux, respiratoires et génitales ainsi que les glandes salivaires (Lycke 2012).

Nous avons déterminé durant les essais *in vivo* #2 et #4 de la thèse, que les porcs vaccinés IN avec de l'ADN nu présentaient une réponse systémique de type IgG et IgA de plus faible intensité que celle obtenue avec l'immunisation par la voie IM. De plus, il y a eu une forte variabilité inter-individuelle entre les réponses observées pour chacun des porcs. De façon inattendue, nous avons constaté, que tous les porcs

vaccinés IN avec de l'ADN nu avaient élicité une réponse mucoale, avec l'obtention de titres relativement élevés en sIgA salivaires (si on compare aux titres obtenus avec la vaccination par voie IM). Trois porcs sur six (en comptant les 3 porcs de l'essai #2 et les 3 autres de l'essai #4) de la condition ADN nu IN ont présenté une réponse mucoale similaire voire même meilleure que celle obtenue avec les porcs de la condition ADN nu IM. Pris ensemble, ces résultats de thèse nous montrent que l'induction d'une légère réponse humorale et mucoale est faisable en inoculant uniquement de l'ADN nu en IN. En se référant à de nombreuses publications, la vaccination IN à ADN nu est généralement considérée comme étant inefficace ; d'où le postulat que nous avons fait au début de la thèse comme quoi il était nécessaire de formuler l'ADN avec des nanovecteurs pour avoir, ne serait-ce qu'une chance de succès en vaccination à ADN par la voie IN pour induire une réponse mucoale locale.

Se différenciant de ce paradigme, certaines études certes peu nombreuses, ont toutefois montré que suite à une vaccination à ADN nu administrée en IN, les plasmides peuvent être pris en charge par des lymphocytes et qu'une légère réponse systémique et/ou mucoale peut être induite efficacement. De cette façon, Oh avait démontré que suite à l'inoculation IN de souris (anesthésiées) avec l'ADN nu, que cet ADN plasmidique en question pouvait être distribué sous sa forme intacte dans les divers ganglions lymphatiques (Oh et al. 2001). Cela suggère que lorsque de l'ADN nu est administré IN, il se pourrait que celui-ci soit présenté intactement aux lymphocytes B et aux macrophages. Il est supposé que l'ADN nu pourrait de ce fait induire une réponse systémique bien que l'ADN ne soit pas formulé ni protégé avec des nanovecteurs (Oh et al. 2001). Toujours au début des années 2000, Svanholm avait quant-à-lui démontré que des réponses cellulaires et humorales pouvaient être obtenues en vaccinant des souris (anesthésiées) avec de l'ADN nu (gène HSP-60 de *C. pneumoniae*). Après le challenge avec *C. pneumoniae*, des lésions pathologiques moins graves, une charge bactérienne plus faible et une protection significative ont pu être

observées ; tout ceci démontrant que la réalisation d'une vaccination IN peut être protectrice en inoculant seulement de l'ADN nu (Svanholm et al. 2000). Par la suite, quelques études ont à leur tour montré que des réponses humorales minimales pouvaient être induites avec de l'ADN nu IN (au niveau systémique (IgG ou IgA sériques) et/ou mucosal (sIgA)) que ce soit sur des souris anesthésiés (Csaba, Sanchez, and Alonso 2006; Cui and Mumper 2002) ou bien sur des souris vigiles non anesthésiées (Xu et al. 2011; Khatri, Goyal, Gupta, Mishra, and Vyas 2008). Quoiqu'il en soit, toutes ces données sur l'inoculation d'ADN nu en IN n'ont été décrites que pour les rongeurs. Ce type de modèles *in vivo* étant bien différent physiologiquement du nôtre qui était le modèle porcin.

Nous pouvons ajouter que les vaccins à ADN mucosaux ont souvent été décrits comme ayant une immunogénicité particulièrement faible lorsqu'ils sont transposés sur des animaux de grande taille ou bien chez l'humain et les quelques données disponibles ne sont pas toujours encourageantes (Schautteet et al. 2012). Les grands animaux (porcs, bovins, moutons) ou les humains vaccinés par voie mucosale avec de multiples doses d'ADN présentent bien souvent une réponse très faible et de courte durée (Niborski et al. 2006). Cela pourrait principalement s'expliquer par une efficacité de transfection plus faible de l'ADN sur les grands animaux par rapport aux souris (Babiuk et al. 2003). La prédominance du modèle murin a en quelques sortes entraîné une sous-estimation des différentes surfaces mucosales des grands animaux pour la vaccination ADN. Par conséquent, le ciblage vaccinal n'est souvent pas fiable en raison du manque de connaissance de ces modèles.

Entre les souris et les grands animaux ou les humains, les différences de paramètres sont énormes (anatomie, immunité, physiologie), ce qui rend très difficile la transposition des données expérimentales obtenues chez la souris chez les grands animaux ou l'homme. Saade avait considéré en 2012 que la vaccination mucosale à ADN était encore une technologie relativement immature qui mériterait d'être développée et testée pour pouvoir être plus sérieusement prise en compte en clinique

(Saade and Petrovsky 2012). Disposer de données expérimentales chez les grands animaux, tel que le modèle que nous avons utilisé, pourrait permettre soit de développer des connaissances sur l'immunité mucoale afin de fournir de nouvelles stratégies de vaccination dans le domaine de la santé animale (Meeusen 2011) soit de mieux transposer les recherches sur l'administration d'ADN en mucoale chez l'homme. Dans ce dernier cas, nous pourrions ainsi tirer profit de la relative proximité anatomique au niveau du système respiratoire entre le porc et l'homme.

L'une des premières études qui avait démontré que l'induction d'une réponse immunitaire humorale et mucoale était possible chez les grands animaux après l'inoculation d'un ADN vaccinal au niveau mucoale est une publication de Loehr. Il y est montré que la vaccination intravaginale des bovins avec un vaccin à ADN nu contre l'herpèsvirus bovin de type 1 administré comme suppositoire pouvait permettre l'obtention d'IgG et d'IgA sériques contre ce virus ainsi que des anticorps mucoaux sur différents sites mucoaux distants (lavages nasaux (NAL), lavages broncho-alvéolaires (BAL)). Plus important encore, des scores cliniques diminués ainsi qu'une amélioration des titres en anticorps neutralisants au niveau des surfaces mucoales locales après le challenge infectieux avec l'herpèsvirus bovin de type 1 ont pu être constatés (Loehr et al. 2001). Après cela, étonnamment peu ou très peu de données en vaccination à ADN par voie mucoale ont été rapportées sur ce type de modèles *in vivo* chez les grands animaux. Ainsi, les expérimentations en vaccination IN à ADN nu sont restées très marginales chez les grands animaux.

Chez le mouton, il avait été montré que la vaccination à ADN plasmidique contre le virus de la fièvre aphteuse avec un ADN nu ou formulé (ADN/PLG) n'était pas efficace quand celui-ci était inoculé IN même après un boost avec la toxine labile d'E. coli (Niborski et al. 2006). Ceci contraste avec les données précédentes obtenues chez la souris où il avait été montré que la formulation PLG pouvait favoriser l'immunogénicité lorsque la voie d'administration est celle intranasale. En revanche, ce même vaccin ADN/PLG était efficace lorsque celui-ci était injecté par voie IM. Les

auteurs en avaient conclu que les sites inducteurs présents dans la cavité nasale du mouton n'étaient peut-être pas si aisément accessibles et qu'en plus de ça le vaccin devait se confronter à d'important mécanismes mucociliaires. Ces mécanismes impacteraient moins la souris, ce qui pourrait expliquer les différences d'efficacité entre le modèle murin et le modèle sur grands animaux (Niborski et al. 2006).

Chez le porc, la voie IN a principalement été testée avec des vaccins antigéniques (protéiques) sous-unitaires. En revanche, les données se restreignant uniquement à la vaccination ADN administrée en IN semblent être clairement inexistantes pour le modèle porcin. Ainsi, il y aurait donc sous-utilisation du modèle porcin pour ce type de stratégie vaccinale (vaccination à ADN IN).

Dans un contexte un peu différent de celui de la vaccination ADN, une équipe de notre unité avait démontré en 2012 que l'ADN nu du circovirus porcin de type 2 (PCV-2) seul est infectieux chez le porc lorsque celui-ci est administré par voie oronasale ou intratrachéale ; ceci conduisant à une production de particules infectieuses dans un grand nombre d'organes porcins. Ceci met en avant le fait que l'ADN nu administré par une voie mucosale peut être pris en charge aux niveaux surfaces mucosales du porc en utilisant ni agent transfectant ni formulation de type nanoparticulaires (Grasland et al. 2012).

Parmi les résultats de thèse, les réponses immunitaires systémiques (IgG et IgA sériques) induites chez le porc avec de l'ADN adsorbé sur des nanoparticules de PLGA-PEI étaient décevantes. Une légère réponse en sIgA salivaires a par contre été observée. Ces niveaux étaient par contre, à notre grand étonnement, à des niveaux moindres qu'avec la condition ADN nu IN. Ainsi, la formulation de notre ADN aurait potentiellement eu un impact négatif sur l'immunogénicité *in vivo*. Durant l'essai *in vivo* #4 de la thèse, les porcs qui ont été inoculés avec de l'ADN-KLN47 ont présentés des réponses systémiques et mucosales très faibles à une exception près. Un effet positif a été observé pour un des porcs parmi les trois testés. Nous avons vu que ce porc-là avait induit des niveaux en IgG sériques qui se sont avérés être, à deux reprises,

à des niveaux plus élevés que les titres maximaux qui avaient été obtenus chez les porcs vaccinés avec de l'ADN nu. Ce résultat, bien que rapporté à un seul porc, a suggéré que l'inoculation IN de l'ADN formulé avec le KLN47 pourrait avoir un fort potentiel immunisant. Bien entendu, ce résultat pourrait aussi être lié aux variations interindividuelles fortes. Néanmoins, ce type de résultats mériterait d'être approfondi sur des effectifs porcins d'une taille plus importante dans la cadre d'essais futurs (beaucoup plus de porcs pour une condition donnée pour faire face à la très forte variabilité inter-individuelle). Différents paramètres devront aussi être optimisées dans le cadre de ces essais (ratio-charge, quantité d'ADN, protocole d'inoculation – animaux vigiles ou pas, aérosols, ...). Dans nos études, les résultats les plus décevants ont été obtenus avec le chitosan, qu'il soit mannosylé ou non. Rappelons que nous sommes partis dans un premier temps sur ces nanoparticules pour étudier la faisabilité de la vaccination à ADN par voie IN chez le porc car ce sont des particules qui ont fait leurs preuves dans d'autres études utilisant des modèles murins et qui sont relativement faciles à produire et sont bon marché. Dans l'essai #2, des niveaux très faibles d'anticorps sériques et mucosaux ont été obtenus, si l'on compare par rapport aux porcs inoculés en IM. Nous avons essayé de modifier certains paramètres au cours de l'essai #3 en utilisant uniquement le chitosan : dose d'ADN triplée, associée la gB à la gC et la gD (de manière à diversifier les réponses en anticorps) et d'utiliser un atomiseur plus profond (de manière à inoculer également l'ADN vers des muqueuses respiratoires plus profondes). Malheureusement, aucune de ces stratégies ne s'est révélée plus efficace à augmenter le niveau des anticorps. Rappelons qu'au cours des essais in vitro, nous avons observé que les cellules HBE-16 n'étaient pas ou n'étaient que très peu transfecté par de l'ADN associé au chitosan et au chitosan mannosylé, alors que la transfection de ces cellules se passait bien pour l'ADN formulé avec le KLN47 et le PLGA-PEI. Par ailleurs, le chitosan et le chitosan mannosylé ont permis de transfecter les cellules HEK293 sans aucun problème. Ces résultats prouveraient que l'efficacité de transfection avec le chitosan et son dérivé serait potentiellement cellules dépendant, et ceci laisserait supposer que les cellules visées par notre

inoculation en intranasale n'étaient peut-être pas celles qui se transfectent le plus facilement tout au moins avec l'ADN associé au chitosan. A la fin de l'essai #3, il nous semblait opportun de tester également les 2 autres formulations initialement retenues, le KLN47 et le PLGA-PEI, car ces formulations avaient permis la transfection *in vitro* des cellules HBE-16 par le plasmide marqueur. Au cours de l'essai #4 nous avons donc choisi (1) de maintenir le chitosan et le chitosan mannosylé de manière à avoir un point de comparaison pour les 2 autres formulations et (2) de maintenir la condition plasmide codant la gB du PrV à la concentration 1X car la condition 3X n'a pas permis d'améliorer l'efficacité vaccinale avec le chitosan et cela aurait de surcroît entraîné un surcoût énorme pour le KLN47.

Il en va de soi, au vu de l'ensemble de nos résultats que les moyens/méthodes d'inoculation en IN sur des porcs mériteraient d'être mieux contrôlées dans les essais futurs potentiellement réalisés pour limiter les grandes variabilités entre les porcs.

De très fortes variabilités inter-individuelles ont en effet été observées dans l'ensemble des essais *in vivo* conduits ici. Cette variabilité a majoritairement été constatée chez les porcs qui avaient été vaccinés en IN. Ce n'était par contre pas le cas pour les porcs ayant reçu le vaccin ADN en injection IM.

Nous supposons que lorsque nous avons eu recours à la voie IM, le site d'injection intramusculaire était très facilement identifiable. Au contraire, les inoculations IN sur les porcs ont été bien plus délicates à réaliser en raison des contraintes suivantes: la tête du porc devait être maintenue vers le haut, l'injection avec le dispositif d'atomiseur sur une narine devait être faite en même temps que l'inspiration porcine (qui peut avoir un impact sur le temps total de l'inoculation en fonction du rythme de respiration du porc) et enfin, des précautions devaient être prises afin de limiter l'exflux hors de la narine. Comme nous l'avons observé dans notre étude, Kraehenbuhl *et al* avait indiqué dans une publication que la délivrance clinique des vaccins muqueux était souvent limitée par des défis techniques et réglementaires, ce qui implique que l'amélioration des méthodes d'inoculation est

nécessaire. Cet auteur considère que, contrairement à ce qui se passe pour un vaccin injecté, la dose efficace d'un vaccin administré qui pénètre dans l'organisme par voie mucosale ne peut être estimée (dose vraiment « vue » par le système immunitaire) (Kraehenbuhl and Neutra 2013). Dans notre expérimentation, les inoculations d'ADN ont été faites avec un dispositif de pulvérisation à des porcs conscients et pendant le temps d'inspiration. Nous l'avons fait ici car de nombreux chercheurs avaient inoculé de l'ADN vaccinal par voie IN chez des souris vigiles (Xu et al. 2011; Khatri, Goyal, Gupta, Mishra, and Vyas 2008). Néanmoins, l'administration intranasale à des animaux vigiles n'est pas si facile à réaliser à cause de réflexes qui peuvent limiter l'inhalation de la dose du vaccin. Beaucoup d'études avaient également signalé l'utilisation de l'anesthésie pour l'administration par voie IN de l'ADN (Csaba, Sanchez, and Alonso 2006; Cui and Mumper 2002). C'est une stratégie qui permet d'administrer l'ADN vaccinal d'une façon plus contrôlée où les expérimentateurs s'affranchissent de certains réflexes des animaux. Il est à noter ici que nous avons envisagé d'anesthésier les porcs. Mais nous ne l'avons pas fait car ce n'est pas très facile à faire et qu'il y avait des risques vitaux pour les porcs. Par ailleurs, nous n'avons aucune indication que l'inoculation d'ADN par voie IN fonctionne ou pas chez le porc. Dans ce cas, des données préliminaires obtenues sur des porcs vigiles se sont donc révélées indispensables pour évaluer la faisabilité ou pas de ce genre d'inoculation. Janakova *et al*, a rapporté que l'utilisation de l'anesthésie par voie intraveineuse peut avoir un impact sur les réponses des anticorps aux vaccins nasaux. Avec l'anesthésie les taux en IgG et IgA sériques étaient environ quatre à neuf fois plus élevés que chez les souris inoculées alors qu'elles étaient conscientes (non anesthésiées), mais les réponses mucosales détectées dans la salive et les selles n'étaient quant-à-elle pas modifiées (Janakova et al. 2002). Dans notre cas, une partie de l'ADN peut avoir été expulsée des narines des porcs ou avalée après le dépôt du vaccin et de ce fait peut n'avoir pas été correctement inoculée. Les anesthésies nous permettent d'améliorer le temps de contact de l'ADN avec les muqueuses nasales favorisant la prise en charge par les sites inducteurs et l'induction de réponse

immunitaires. Une autre alternative souvent mentionnée dans la littérature est l'administration de la dose vaccinale à plusieurs reprises sur des souris conscientes. Le concept est d'administrer plusieurs petites doses pendant 15 minutes de telle sorte que l'ADN plasmidique reste localisé le plus longtemps possible au niveau des sites inducteurs des NALTs. Un autre point qui complique la transposition de la voie IN d'un modèle souris animal à un modèle grand animal, est le volume total de la dose du vaccin. La majorité des études menées sur un modèle murin présentent bien souvent des volumes d'inoculations qui sont loin d'être représentatifs. Ainsi, de nombreuses études ont par exemple utilisé IN des volumes allant de 20 à 100 μ L sur des souris alors qu'il est considéré qu'un volume de 3 μ L seulement est nécessaire pour se restreindre uniquement à la cavité nasale murine (Yen et al. 2006). Ainsi, ces volumes excessifs peuvent biaiser les sites qui sont vraiment induits (muqueuse nasale, poumon ...). Ils ne sont pas réalistes chez les porcs ou les humains si nous comparons le volume de la cavité nasale.

En résumé, dans la présente étude nous avons montré sur un modèle porc que l'inoculation par voie IN de l'ADN nu induisait des réponses humorales systémiques et mucosales. Les réponses obtenues avec l'ADN nu étaient plus fortes que pour le groupe inoculé avec le ADN formulé avec du PLGA-PEI (3 porcs sur 3) ou du KLN47 (2 porcs sur 3). Néanmoins, des résultats prometteurs observés avec un porc du groupe KLN47 peuvent nous indiquer que cette formulation de l'ADN possède un grand potentiel pour la vaccination à ADN. De même, les résultats avec le PLGA-PEI indiquent que la durée de la réponse mucoale semble être plus longue. Toutefois, les variétés inter-individuelles très élevées qui suivent l'inoculation par voie IN avaient suggéré que les conditions d'administration ne sont pas entièrement contrôlées et des optimisations sont nécessaires dans les essais qui suivront la thèse. Des pistes d'amélioration du protocole vaccinal sont proposées. Étant donné la proximité anatomique entre le porc et l'homme, les progrès qui seront obtenus pour le porc pourront être appliqués ultérieurement pour l'homme.

Bibliographie

- Acharya, S., and S. K. Sahoo. 2011. 'PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect', *Adv Drug Deliv Rev*, 63: 170-83.
- Ager, A., and M. J. May. 2015. 'Understanding high endothelial venules: Lessons for cancer immunology', *Oncoimmunology*, 4: e1008791.
- Agnihotri, Sunil, Mallikarjuna Nadagouda, and Tejraj Aminabhavi. 2004. 'Recent Advances on Chitosan-Based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 100: 5-28.
- Ahrens, U., V. Kaden, C. Drexler, and N. Visser. 2000. 'Efficacy of the classical swine fever (CSF) marker vaccine Porcilis Pesti in pregnant sows', *Vet Microbiol*, 77: 83-97.
- Alpan, O., G. Rudomen, and P. Matzinger. 2001. 'The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses', *J Immunol*, 166: 4843-52.
- Alpar, H. O., S. Somavarapu, K. N. Atuah, and V. W. Bramwell. 2005. 'Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery', *Adv Drug Deliv Rev*, 57: 411-30.
- Anderson, D. H., S. K. Fisher, and D. J. Breeding. 1986. 'A concentration of fucosylated glycoconjugates at the base of cone outer segments: quantitative electron microscope autoradiography', *Exp Eye Res*, 42: 267-83.
- Anderson, L. J., P. R. Dormitzer, D. J. Nokes, R. Rappuoli, A. Roca, and B. S. Graham. 2013. 'Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development', *Vaccine*, 31 Suppl 2: B209-15.
- Aspden, Trudi J., Julian D. T. Mason, Nicholas S. Jones, James Lowe, Øyvind Skaugrud, and Lisbeth Illum. 1997. 'Chitosan as a Nasal Delivery System: The Effect of Chitosan Solutions on in Vitro and in Vivo Mucociliary Transport Rates in Human Turbinates and Volunteers', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86: 509-13.
- Attaf, M., M. Legut, D. K. Cole, and A. K. Sewell. 2015. 'The T cell antigen receptor: the Swiss army knife of the immune system', *Clin Exp Immunol*, 181: 1-18.
- Ausiello, C. M., F. Mascart, V. Corbiere, and G. Fedele. 2019. 'Human Immune Responses to Pertussis Vaccines', *Adv Exp Med Biol*, 1183: 99-113.
- Avery, O. T., and W. F. Goebel. 1929. 'Chemo-Immunological Studies on Conjugated Carbohydrate-Proteins : Ii. Immunological Specificity of Synthetic Sugar-Protein Antigens', *J Exp Med*, 50: 533-50.
- Azizi, A., A. Kumar, F. Diaz-Mitoma, and J. Mestecky. 2010. 'Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells', *PLoS Pathog*, 6: e1001147.
- Babiuk, L. A., R. Pontarollo, S. Babiuk, B. Loehr, and S. van Drunen Littel-van den Hurk. 2003. 'Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals', *Vaccine*, 21: 649-58.
- Bachmann, M. F., and G. T. Jennings. 2010. 'Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns', *Nat Rev Immunol*, 10: 787-96.

- Bachmann, Martin F., Thomas M. Kündig, Daniel E. Speiser, Kim McKall-Faienza, Kenji Kishara, Tak W. Mak, and Pamela S. Ohashi. 1997. 'T-Cell-Independent Antiviral B Cell Responses in CD45-Deficient Mice', *Cellular Immunology*, 175: 12-15.
- Bacon, A., J. Makin, P. J. Sizer, I. Jabbal-Gill, M. Hinchcliffe, L. Illum, S. Chatfield, and M. Roberts. 2000. 'Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens', *Infection and immunity*, 68: 5764-70.
- Bal, S. M., B. Slutter, R. Verheul, J. A. Bouwstra, and W. Jiskoot. 2012. 'Adjuvanted, antigen loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles for nasal and intradermal vaccination: adjuvant- and site-dependent immunogenicity in mice', *Eur J Pharm Sci*, 45: 475-81.
- Basarkar, A., D. Devineni, R. Palaniappan, and J. Singh. 2007. 'Preparation, characterization, cytotoxicity and transfection efficiency of poly(DL-lactide-co-glycolide) and poly(DL-lactic acid) cationic nanoparticles for controlled delivery of plasmid DNA', *Int J Pharm*, 343: 247-54.
- Basner-Tschakarjan, E., A. Mirmohammadsadegh, A. Baer, and U. R. Hengge. 2004. 'Uptake and trafficking of DNA in keratinocytes: evidence for DNA-binding proteins', *Gene Ther*, 11: 765-74.
- Bazin, Hervé. 2008. *L'histoire des vaccinations* (J. Libbey Eurotext: Montrouge).
- Bento, D., H. F. Staats, and O. Borges. 2015. 'Effect of particulate adjuvant on the anthrax protective antigen dose required for effective nasal vaccination', *Vaccine*, 33: 3609-13.
- Bento, D., H. F. Staats, T. Goncalves, and O. Borges. 2015. 'Development of a novel adjuvanted nasal vaccine: C48/80 associated with chitosan nanoparticles as a path to enhance mucosal immunity', *Eur J Pharm Biopharm*, 93: 149-64.
- Berchel, M., T. Le Gall, J. P. Haelters, P. Lehn, T. Montier, and P. A. Jaffres. 2015. 'Cationic lipophosphoramidates containing a hydroxylated polar headgroup for improving gene delivery', *Mol Pharm*, 12: 1902-10.
- Bernocchi, B., R. Carpentier, and D. Betbeder. 2017. 'Nasal nanovaccines', *Int J Pharm*, 530: 128-38.
- Bhandoola, A., H. von Boehmer, H. T. Petrie, and J. C. Zuniga-Pflucker. 2007. 'Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from', *Immunity*, 26: 678-89.
- Bhati, M., D. K. Cole, J. McCluskey, A. K. Sewell, and J. Rossjohn. 2014. 'The versatility of the alphabeta T-cell antigen receptor', *Protein Sci*, 23: 260-72.
- Bivas-Benita, M., S. Romeijn, H. E. Junginger, and G. Borchard. 2004. 'PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium', *Eur J Pharm Biopharm*, 58: 1-6.
- Borges, O., A. Cordeiro-da-Silva, J. Tavares, N. Santarem, A. de Sousa, G. Borchard, and H. E. Junginger. 2008. 'Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles', *Eur J Pharm Biopharm*, 69: 405-16.

- Bourdoiseau, Gilles. 2017. 'Particularités et limites des vaccins en parasitologie vétérinaire', *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*.
- Boyoglu, S., K. Vig, S. Pillai, V. Rangari, V. A. Dennis, F. Khazi, and S. R. Singh. 2009. 'Enhanced delivery and expression of a nanoencapsulated DNA vaccine vector for respiratory syncytial virus', *Nanomedicine*, 5: 463-72.
- Brandhonneur, N., C. Loizel, F. Chevanne, P. Wakeley, A. Jestin, M. F. Le Potier, and P. Le Corre. 2009. 'Mucosal or systemic administration of rE2 glycoprotein antigen loaded PLGA microspheres', *Int J Pharm*, 373: 16-23.
- Brandtzaeg, P., H. Kiyono, R. Pabst, and M. W. Russell. 2008. 'Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue', *Mucosal Immunol*, 1: 31-7.
- Brun, A., J. Barcena, E. Blanco, B. Borrego, D. Dory, J. M. Escribano, G. Le Gall-Recule, J. Ortego, and L. K. Dixon. 2011. 'Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development', *Virus Res*, 157: 1-12.
- Budker, V., T. Budker, G. Zhang, V. Subbotin, A. Loomis, and J. A. Wolff. 2000. 'Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process', *J Gene Med*, 2: 76-88.
- Burrell, B. E., Y. Ding, Y. Nakayama, K. S. Park, J. Xu, N. Yin, and J. S. Bromberg. 2011. 'Tolerance and lymphoid organ structure and function', *Front Immunol*, 2: 64.
- Cahill, Edward S., Derek T. O'Hagan, Lisbeth Illum, and Keith Redhead. 1993. 'Mice are protected against Bordetella pertussis infection by intra-nasal immunization with filamentous haemagglutinin', *FEMS Microbiology Letters*, 107: 211-16.
- Capan, Yilmaz, Byung Woo, Sisay Gebrekidan, Shamim Ahmed, and Patrick Deluca. 1999. 'Preparation and Characterization of Poly (D,L-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres for Controlled Release of Poly(L-Lysine) Complexed Plasmid DNA', *Pharmaceutical research*, 16: 509-13.
- Cariappa, A., C. Chase, H. Liu, P. Russell, and S. Pillai. 2007. 'Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow', *Blood*, 109: 2339-45.
- Casettari, L., and L. Illum. 2014. 'Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs', *J Control Release*, 190: 189-200.
- Cavaillon, J. M. 2010. 'La réponse immunitaire à l'agression: le B.A.-BA — Système immunitaire inné', *Réanimation*, 20: 393-405.
- Cavaillon, J. M., and S. Legout. 2019. 'Duclaux, Chamberland, Roux, Grancher, and Metchnikoff: the five musketeers of Louis Pasteur', *Genes Immun*, 20: 344-56.
- Cavaillon, J. M., P. Sansonetti, and M. Goldman. 2019. '100th Anniversary of Jules Bordet's Nobel Prize: Tribute to a Founding Father of Immunology', *Front Immunol*, 10: 2114.
- Cerutti, A. 2008. 'The regulation of IgA class switching', *Nat Rev Immunol*, 8: 421-34.
- Cevher, E., S. K. Salomon, A. Makrakis, X. W. Li, S. Brocchini, and H. O. Alpar. 2015. 'Development of chitosan-pullulan composite nanoparticles for nasal delivery of vaccines: optimisation and cellular studies', *J Microencapsul*, 32: 755-68.
- Chan, J. A., D. Wetzel, L. Reiling, K. Miura, D. R. Drew, P. R. Gilson, D. A. Anderson, J. S. Richards, C. A. Long, M. Suckow, V. Jenzelewski, T. Tsuboi, M. J. Boyle, M.

- Piontek, and J. G. Beeson. 2019. 'Malaria vaccine candidates displayed on novel virus-like particles are immunogenic and induce transmission-blocking activity', *PLoS One*, 14: e0221733.
- Cherukuri, A., T. Shoham, H. W. Sohn, S. Levy, S. Brooks, R. Carter, and S. K. Pierce. 2004. 'The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts', *J Immunol*, 172: 370-80.
- Chesnoy, S., and L. Huang. 2000. 'Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery', *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29: 27-47.
- Chiappini, E., A. Stival, L. Galli, and M. de Martino. 2013. 'Pertussis re-emergence in the post-vaccination era', *BMC Infect Dis*, 13: 151.
- Corr, M., D. J. Lee, D. A. Carson, and H. Tighe. 1996. 'Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming', *J Exp Med*, 184: 1555-60.
- Corr, M., A. von Damm, D. J. Lee, and H. Tighe. 1999. 'In vivo priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer', *J Immunol*, 163: 4721-7.
- Cox, M. M. 2012. 'Recombinant protein vaccines produced in insect cells', *Vaccine*, 30: 1759-66.
- Csaba, N., M. Garcia-Fuentes, and M. J. Alonso. 2009. 'Nanoparticles for nasal vaccination', *Adv Drug Deliv Rev*, 61: 140-57.
- Csaba, N., A. Sanchez, and M. J. Alonso. 2006. 'PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery', *J Control Release*, 113: 164-72.
- Cui, F., F. Qian, and C. Yin. 2006. 'Preparation and characterization of mucoadhesive polymer-coated nanoparticles', *Int J Pharm*, 316: 154-61.
- Cui, Z., and R. J. Mumper. 2002. 'Intranasal administration of plasmid DNA-coated nanoparticles results in enhanced immune responses', *J Pharm Pharmacol*, 54: 1195-203.
- Cunningham, A. L., N. Garcon, O. Leo, L. R. Friedland, R. Strugnell, B. Laupeze, M. Doherty, and P. Stern. 2016. 'Vaccine development: From concept to early clinical testing', *Vaccine*, 34: 6655-64.
- Dabaghian, M., A. M. Latifi, M. Tebianian, H. NajmiNejad, and S. M. Ebrahimi. 2018. 'Nasal vaccination with r4M2e.HSP70c antigen encapsulated into N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticulate systems: Preparation and immunogenicity in a mouse model', *Vaccine*, 36: 2886-95.
- Dal Porto, J. M., S. B. Gauld, K. T. Merrell, D. Mills, A. E. Pugh-Bernard, and J. Cambier. 2004. 'B cell antigen receptor signaling 101', *Mol Immunol*, 41: 599-613.
- Dalmo, R. A. 2018. 'DNA vaccines for fish: Review and perspectives on correlates of protection', *J Fish Dis*, 41: 1-9.
- Danhier, F., E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, and V. Preat. 2012. 'PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications', *J Control Release*, 161: 505-22.
- Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R.M.; Chiellini, E. 2011. 'Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications', *Progress in Polymer Science*.

- Dean, D. A., D. D. Strong, and W. E. Zimmer. 2005. 'Nuclear entry of nonviral vectors', *Gene Ther*, 12: 881-90.
- Dehghan, S., M. Tafaghodi, T. Bolourieh, V. Mazaheri, A. Torabi, K. Abnous, and M. Tavassoti Kheiri. 2014. 'Rabbit nasal immunization against influenza by dry-powder form of chitosan nanospheres encapsulated with influenza whole virus and adjuvants', *Int J Pharm*, 475: 1-8.
- Delany, I., R. Rappuoli, and E. De Gregorio. 2014. 'Vaccines for the 21st century', *EMBO Mol Med*, 6: 708-20.
- Depoil, D., S. Fleire, B. L. Treanor, M. Weber, N. E. Harwood, K. L. Marchbank, V. L. Tybulewicz, and F. D. Batista. 2008. 'CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand', *Nat Immunol*, 9: 63-72.
- Dhakal, S., J. Hiremath, K. Bondra, Y. S. Lakshmanappa, D. L. Shyu, K. Ouyang, K. I. Kang, B. Binjawadagi, J. Goodman, K. Tabynov, S. Krakowka, B. Narasimhan, C. W. Lee, and G. J. Renukaradhya. 2017. 'Biodegradable nanoparticle delivery of inactivated swine influenza virus vaccine provides heterologous cell-mediated immune response in pigs', *J Control Release*, 247: 194-205.
- Dhakal, S., S. Renu, S. Ghimire, Y. Shaan Lakshmanappa, B. T. Hogshead, N. Feliciano-Ruiz, F. Lu, H. HogenEsch, S. Krakowka, C. W. Lee, and G. J. Renukaradhya. 2018. 'Mucosal Immunity and Protective Efficacy of Intranasal Inactivated Influenza Vaccine Is Improved by Chitosan Nanoparticle Delivery in Pigs', *Front Immunol*, 9: 934.
- Dhama, K., M. Mahendran, P. K. Gupta, and A. Rai. 2008. 'DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives', *Vet Res Commun*, 32: 341-56.
- Dinarvand, R., N. Sepehri, S. Manoochehri, H. Rouhani, and F. Atyabi. 2011. 'Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents', *Int J Nanomedicine*, 6: 877-95.
- Doavi, T., S. L. Mousavi, M. Kamali, J. Amani, and M. Fasihi Ramandi. 2016. 'Chitosan-Based Intranasal Vaccine against Escherichia coli O157:H7', *Iran Biomed J*, 20: 97-108.
- Dory, D., V. Béven, A.M. Torché, S. Bougeard, R. Cariolet, and A. Jestin. 2005. 'CpG motif in ATCGAT hexamer improves DNA-vaccine efficiency against lethal Pseudorabies virus infection in pigs', *Vaccine*, 23: 4532-40.
- Dory, D., T. Fischer, V. Beven, R. Cariolet, H. J. Rziha, and A. Jestin. 2006. 'Prime-boost immunization using DNA vaccine and recombinant Orf virus protects pigs against Pseudorabies virus (Herpes suid 1)', *Vaccine*, 24: 6256-63.
- Dory, D., M. Remond, V. Beven, R. Cariolet, M. Backovic, S. Zientara, and A. Jestin. 2009. 'Pseudorabies virus glycoprotein B can be used to carry foot and mouth disease antigens in DNA vaccination of pigs', *Antiviral Res*, 81: 217-25.
- Dory, D., A. M. Torche, V. Beven, R. Cariolet, and A. Jestin. 2007. 'Limited Protection Conferred by a DNA Vaccine against a Lethal Pseudorabies Virus Infection at Day 5 Postvaccination', *Clin Vaccine Immunol*, 14: 470-3.

- Dory, D., A.M. Torché, V. Béven, P. Blanchard, C. Loizel, R. Cariolet, and A. Jestin. 2005. 'Effective protection of pigs against lethal Pseudorabies virus infection after a single injection of low-dose Sindbis-derived plasmids encoding PrV gB, gC and gD glycoproteins', *Vaccine*, 23: 3483-91.
- Doulatov, S., F. Notta, E. Laurenti, and J. E. Dick. 2012. 'Hematopoiesis: a human perspective', *Cell Stem Cell*, 10: 120-36.
- Dowty, M. E., P. Williams, G. Zhang, J. E. Hagstrom, and J. A. Wolff. 1995. 'Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 4572-6.
- Du, L., B. Li, X. Xu, B. Sun, F. Pang, L. Wen, K. Huang, and K. He. 2015. 'Adsorption of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus DNA vaccine candidate onto biodegradable nanoparticles improves immunogenicity in mice', *Arch Virol*, 160: 1543-7.
- Dudkina, N. V., B. A. Spicer, C. F. Reboul, P. J. Conroy, N. Lukoyanova, H. Elmlund, R. H. Law, S. M. Ekkel, S. C. Kondos, R. J. Goode, G. Ramm, J. C. Whisstock, H. R. Saibil, and M. A. Dunstone. 2016. 'Structure of the poly-C9 component of the complement membrane attack complex', *Nat Commun*, 7: 10588.
- Dufour, V. 2001. 'DNA vaccines: new applications for veterinary medicine', *Veterinary Sciences Tomorrow*: 1-20.
- Dufour, V., S. Chevallier, R. Cariolet, S. Somasundaram, F. Lefèvre, A. Jestin, and E. Albina. 2000. 'Induction of porcine cytokine mRNA expression after DNA immunization and pseudorabies virus infection', *J Interferon Cytokine Res*, 20: 885-90.
- Duncan, R. C., L. C. Wijeyewickrema, and R. N. Pike. 2008. 'The initiating proteases of the complement system: controlling the cleavage', *Biochimie*, 90: 387-95.
- Dyer, O. 2019. 'Polio: WHO declares type 3 poliovirus eradicated after 31 year campaign', *BMJ*, 367: l6201.
- Elias, P. M. 2007. 'The skin barrier as an innate immune element', *Semin Immunopathol*, 29: 3-14.
- Fachinger, Vicky, Ralf Bischoff, Samir Ben Jedidia, Armin Saalmüller, and Knut Elbers. 2008. 'The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex', *Vaccine*, 26: 1488-99.
- Faurez, F., D. Dory, V. Le Moigne, R. Gravier, and A. Jestin. 2010. 'Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection', *Vaccine*, 28: 3888-95.
- Faurez, F., B. Grasland, V. Beven, R. Cariolet, A. Keranflec'h, A. Henry, A. Jestin, and D. Dory. 2012. 'The protective immune response against Pseudorabies virus induced by DNA vaccination is impaired if the plasmid harbors a functional Porcine circovirus type 2 rep and origin of replication', *Antiviral Res*, 96: 271-9.
- Fay, F., D. J. Quinn, B. F. Gilmore, P. A. McCarron, and C. J. Scott. 2010. 'Gene delivery using dimethyldidodecylammonium bromide-coated PLGA nanoparticles', *Biomaterials*, 31: 4214-22.

- Fearon, D. T., and M. C. Carroll. 2000. 'Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex', *Annu Rev Immunol*, 18: 393-422.
- Feltquate, D.M. 1998. 'DNA vaccines: Vector design, delivery, and antigen presentation', *J. Cell. Biochem.*, S30/31: 304-11.
- Fischer, L., S. Barzu, C. Andreoni, N. Buisson, A. Brun, and J. C. Audonnet. 2003. 'DNA vaccination of neonate piglets in the face of maternal immunity induces humoral memory and protection against a virulent pseudorabies virus challenge', *Vaccine*, 21: 1732-41.
- Flaswinkel, H., and M. Reth. 1994. 'Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor', *EMBO J*, 13: 83-9.
- Frey, J. 2019. 'RTX Toxins of Animal Pathogens and Their Role as Antigens in Vaccines and Diagnostics', *Toxins (Basel)*, 11.
- Friess, M. D., K. Pluhackova, and R. A. Bockmann. 2018. 'Structural Model of the mIgM B-Cell Receptor Transmembrane Domain From Self-Association Molecular Dynamics Simulations', *Front Immunol*, 9: 2947.
- Frydas, Ilias S., and Hans J. Nauwynck. 2016. 'Replication characteristics of eight virulent and two attenuated genotype 1 and 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in nasal mucosa explants', *Vet Microbiol*, 182: 156-62.
- Fuenmayor, J., F. Godia, and L. Cervera. 2017. 'Production of virus-like particles for vaccines', *N Biotechnol*, 39: 174-80.
- Gachelin, G. 2007. 'The designing of anti-diphtheria serotherapy at the Institut Pasteur (1888-1900): the role of a supranational network of microbiologists', *Dynamis*, 27: 45-62.
- Garg, N. K., S. Mangal, H. Khambete, and R. K. Tyagi. 2010. 'Mucosal delivery of vaccines: role of mucoadhesive/biodegradable polymers', *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 4: 114-28.
- Gasteiger, G., M. Ataide, and W. Kastenmuller. 2016. 'Lymph node - an organ for T-cell activation and pathogen defense', *Immunol Rev*, 271: 200-20.
- Gauld, S. B., J. M. Dal Porto, and J. C. Cambier. 2002. 'B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease', *Science*, 296: 1641-2.
- Geisberger, R., M. Lamers, and G. Achatz. 2006. 'The riddle of the dual expression of IgM and IgD', *Immunology*, 118: 429-37.
- Gordon, J., and N. R. Manley. 2011. 'Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis', *Development*, 138: 3865-78.
- Grasland, B., L. Bigault, M. Le Corvec, A. C. Hernandez-Nignol, A. Oger, D. Dory, N. Rose, R. Cariolet, and A. Jestin. 2012. 'Naked PCV-2 cloned genomic DNA is infectious by mucosal (intratracheal or oro-nasal) inoculation', *Virus Res*, 165: 90-4.
- Gravier, R., D. Dory, F. Rodriguez, S. Bougeard, V. Beven, R. Cariolet, and A. Jestin. 2007. 'Immune and protective abilities of ubiquitinated and non-ubiquitinated pseudorabies virus glycoproteins', *Acta Virol*, 51: 35-45.

- Gupta, N. K., P. Tomar, V. Sharma, and V. K. Dixit. 2011. 'Development and characterization of chitosan coated poly-(varepsilon-caprolactone) nanoparticulate system for effective immunization against influenza', *Vaccine*, 29: 9026-37.
- Gurunathan, S., D.M. Klinman, and R.A. Seder. 2000. 'DNA vaccines: Immunology, application, and optimization', *Annual Review of Immunology*, 18: 927-74.
- Gurunathan, S., C.Y. Wu, B.L. Freidag, and R.A. Seder. 2000. 'DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity', *Current Opinion in Immunology*, 12: 442-47.
- Hajishengallis, G., E. S. Reis, D. C. Mastellos, D. Ricklin, and J. D. Lambris. 2017. 'Novel mechanisms and functions of complement', *Nat Immunol*, 18: 1288-98.
- Hajj Hussein, I., N. Chams, S. Chams, S. El Sayegh, R. Badran, M. Raad, A. Gerges-Geagea, A. Leone, and A. Jurjus. 2015. 'Vaccines Through Centuries: Major Cornerstones of Global Health', *Front Public Health*, 3: 269.
- Hengge, U. R., E. F. Chan, R. A. Foster, P. S. Walker, and J. C. Vogel. 1995. 'Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA', *Nat Genet*, 10: 161-6.
- Hilleman, M. R., E. B. Buynak, R. E. Weibel, and J. Stokes, Jr. 1968. 'Live, attenuated mumps-virus vaccine', *N Engl J Med*, 278: 227-32.
- Hobeika, E., P. J. Nielsen, and D. Medgyesi. 2015. 'Signaling mechanisms regulating B-lymphocyte activation and tolerance', *J Mol Med (Berl)*, 93: 143-58.
- Hobson. 2003. 'Mucosal Immunization with DNA Vaccine'.
- Hunter, A. G., G. Uilenberg, and Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation (Ede Netherlands). 1994. *Animal health* (CTA ; Macmillan: Wageningen, the Netherlands London).
- Illum, L. 2002. Nasal drug delivery: new developments and strategies. *Drug discovery today*, 7(23), 1184–1189
- Illum, L., I. Jabbal-Gill, M. Hinchcliffe, A. N. Fisher, and S. S. Davis. 2001. 'Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines', *Adv Drug Deliv Rev*, 51: 81-96.
- Iqbal, M., W. Lin, I. Jabbal-Gill, S. S. Davis, M. W. Steward, and L. Illum. 2003. 'Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice', *Vaccine*, 21: 1478-85.
- Islam, M. A., J. Firdous, Y. J. Choi, C. H. Yun, and C. S. Cho. 2012. 'Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review', *Int J Nanomedicine*, 7: 6077-93.
- Ismail, R., Z. N. Allaudin, and M. A. Lila. 2012. 'Scaling-up recombinant plasmid DNA for clinical trial: current concern, solution and status', *Vaccine*, 30: 5914-20.
- Ivory, C., and K. Chadee. 2004. 'DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections', *Genet Vaccines Ther*, 2: 17.
- Jain, A. K., A. K. Goyal, P. N. Gupta, K. Khatri, N. Mishra, A. Mehta, S. Mangal, and S. P. Vyas. 2009. 'Synthesis, characterization and evaluation of novel triblock

- copolymer based nanoparticles for vaccine delivery against hepatitis B', *J Control Release*, 136: 161-9.
- Janakova, L., H. Bakke, I. L. Haugen, A. K. Berstad, E. A. Hoiby, I. S. Aaberge, and B. Haneberg. 2002. 'Influence of intravenous anesthesia on mucosal and systemic antibody responses to nasal vaccines', *Infection and immunity*, 70: 5479-84.
- Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. 'Innate immune recognition', *Annu Rev Immunol*, 20: 197-216.
- Jeong, Ji Hoon, Sung Wan Kim, and Tae Gwan Park. 2007. 'Molecular design of functional polymers for gene therapy', *Progress in Polymer Science*, 32: 1239-74.
- Jesus, S., E. Soares, J. Costa, G. Borchard, and O. Borges. 2016. 'Immune response elicited by an intranasally delivered HBsAg low-dose adsorbed to poly-epsilon-caprolactone based nanoparticles', *Int J Pharm*, 504: 59-69.
- Jorge, Sérgio, and Odir Antônio Dellagostin. 2017. 'The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches', *Biotechnology Research and Innovation*, 1: 6-13.
- Ju, C., H. Fan, Y. Tan, Z. Liu, X. Xi, S. Cao, B. Wu, and H. Chen. 2005. 'Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2', *Vet Microbiol*, 109: 179-90.
- Karch, C. P., and P. Burkhard. 2016. 'Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies', *Biochem Pharmacol*, 120: 1-14.
- Kashem, S. W., M. Haniffa, and D. H. Kaplan. 2017. 'Antigen-Presenting Cells in the Skin', *Annu Rev Immunol*, 35: 469-99.
- Katz, S. L., C. H. Kempe, F. L. Black, M. L. Lepow, S. Krugman, R. J. Haggerty, and J. F. Enders. 1960. 'Studies on an attenuated measles-virus vaccine. VIII. General summary and evaluation of the results of vaccine', *N Engl J Med*, 263: 180-4.
- Kavanagh, O. V., B. M. Adair, M. Welsh, and B. Earley. 2013. 'Immunogenetic responses in calves to intranasal delivery of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) epitopes encapsulated in poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles', *Res Vet Sci*, 95: 786-93.
- Kawai, T., and S. Akira. 2010. 'The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors', *Nat Immunol*, 11: 373-84.
- Khatri, K., A. K. Goyal, P. N. Gupta, N. Mishra, A. Mehta, and S. P. Vyas. 2008. 'Surface modified liposomes for nasal delivery of DNA vaccine', *Vaccine*, 26: 2225-33.
- Khatri, K., A. K. Goyal, P. N. Gupta, N. Mishra, and S. P. Vyas. 2008. 'Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B', *Int J Pharm*, 354: 235-41.
- Kishore, U., T. J. Greenhough, P. Waters, A. K. Shrive, R. Ghai, M. F. Kamran, A. L. Bernal, K. B. Reid, T. Madan, and T. Chakraborty. 2006. 'Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors', *Mol Immunol*, 43: 1293-315.
- Klinman, D.M., K.J. Ishii, and D. Verthelyi. 2000. 'CpG DNA augments the immunogenicity of plasmid DNA vaccines.' in H. Wagner (ed.), *Immunobiology of Bacterial CPG - DNA* (Springer-Verlag Berlin: Heidelberger Platz 3, D-14197 Berlin, Germany).

- Klupp, B. G., C. J. Hengartner, T. C. Mettenleiter, and L. W. Enquist. 2004. 'Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome', *Journal of virology*, 78: 424-40.
- Koenderman, L., W. Buurman, and M. R. Daha. 2014. 'The innate immune response', *Immunol Lett*, 162: 95-102.
- Kondo, M., I. L. Weissman, and K. Akashi. 1997. 'Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow', *Cell*, 91: 661-72.
- Kong, I. G., A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Okada, S. Sato, D. E. Briles, J. Kunisawa, Y. Inoue, M. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Kiyono. 2013. 'Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Streptococcus pneumoniae*', *Infection and immunity*, 81: 1625-34.
- Kraehenbuhl, J. P., and M. R. Neutra. 2013. 'Mucosal vaccines: where do we stand?', *Curr Top Med Chem*, 13: 2609-28.
- Kulkarni, A. D., H. M. Patel, S. J. Surana, Y. H. Vanjari, V. S. Belgamwar, and C. V. Pardeshi. 2017. 'N,N,N-Trimethyl chitosan: An advanced polymer with myriad of opportunities in nanomedicine', *Carbohydr Polym*, 157: 875-902.
- Kumar, A., A. Vimal, and A. Kumar. 2016. 'Why Chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery', *Int J Biol Macromol*, 91: 615-22.
- Lamichhane, A., T. Azegamia, and H. Kiyono. 2014. 'The mucosal immune system for vaccine development', *Vaccine*, 32: 6711-23.
- Lanzavecchia, A. 1985. 'Antigen-specific interaction between T and B cells', *Nature*, 314: 537-9.
- Laursen, N. S., F. Magnani, R. H. Gottfredsen, S. V. Petersen, and G. R. Andersen. 2012. 'Structure, function and control of complement C5 and its proteolytic fragments', *Curr Mol Med*, 12: 1083-97.
- Le Gall, T., M. Berchel, S. Le Hir, A. Fraix, J. Y. Salaun, C. Ferec, P. Lehn, P. A. Jaffres, and T. Montier. 2013. 'Arsonium-containing lipophosphoramides, poly-functional nano-carriers for simultaneous antibacterial action and eukaryotic cell transfection', *Adv Healthc Mater*, 2: 1513-24.
- Le Moigne, V., R. Cariolet, V. Beven, A. Keranflec'h, A. Jestin, and D. Dory. 2012. 'Electroporation improves the immune response induced by a DNA vaccine against pseudorabies virus glycoprotein B in pigs', *Res Vet Sci*, 93: 1032-5.
- Lebre, F., G. Borchard, H. Faneca, M. C. Pedroso de Lima, and O. Borges. 2016. 'Intranasal Administration of Novel Chitosan Nanoparticle/DNA Complexes Induces Antibody Response to Hepatitis B Surface Antigen in Mice', *Mol Pharm*, 13: 472-82.
- Lechardeur, D., and G. L. Lukacs. 2006. 'Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus', *Hum Gene Ther*, 17: 882-9.
- Lechardeur, D., K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodvich, and G. L. Lukacs. 1999. 'Metabolic instability of

- plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer', *Gene Ther*, 6: 482-97.
- Lechardeur, D., A. S. Verkman, and G. L. Lukacs. 2005. 'Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer', *Adv Drug Deliv Rev*, 57: 755-67.
- Lee, J., Y. M. Kim, J. H. Kim, C. W. Cho, J. W. Jeon, J. K. Park, S. H. Lee, B. G. Jung, and B. J. Lee. 2018. 'Nasal delivery of chitosan/alginate nanoparticle encapsulated bee (*Apis mellifera*) venom promotes antibody production and viral clearance during porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection by modulating T cell related responses', *Vet Immunol Immunopathol*, 200: 40-51.
- Lehmann, M. J., and G. Sczakiel. 2005. 'Spontaneous uptake of biologically active recombinant DNA by mammalian cells via a selected DNA segment', *Gene Ther*, 12: 446-51.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. 'The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults', *Cell*, 86: 973-83.
- Leong, K. W., and J. L. Ding. 2014. 'The unexplored roles of human serum IgA', *DNA Cell Biol*, 33: 823-9.
- Levy, E. I., J. E. Paino, P. S. Sarin, A. L. Goldstein, A. J. Caputy, D. C. Wright, and L. N. Sekhar. 1996. 'Enzyme-linked immunosorbent assay quantification of cytokine concentrations in human meningiomas', *Neurosurgery*, 39: 823-8; discussion 28-9.
- Levy, S. 2014. 'Function of the tetraspanin molecule CD81 in B and T cells', *Immunol Res*, 58: 179-85.
- Lewnard, J. A., and Y. H. Grad. 2018. 'Vaccine waning and mumps re-emergence in the United States', *Sci Transl Med*, 10.
- Li, B., L. Du, Z. Yu, B. Sun, X. Xu, B. Fan, R. Guo, W. Yuan, and K. He. 2017. 'Poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticle-entrapped vaccine induces a protective immune response against porcine epidemic diarrhea virus infection in piglets', *Vaccine*, 35: 7010-17.
- Liu, M. A. 2003. 'DNA vaccines: a review', *J Intern Med*, 253: 402-10.
- — —. 2010. 'Immunologic basis of vaccine vectors', *Immunity*, 33: 504-15.
- Liu, Q., X. Zheng, C. Zhang, X. Shao, X. Zhang, Q. Zhang, and X. Jiang. 2015. 'Conjugating influenza A (H1N1) antigen to n-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles improves the immunogenicity of the antigen after nasal administration', *J Med Virol*, 87: 1807-15.
- Loehr, B. I., R. Rankin, R. Pontarollo, T. King, P. Willson, L. A. Babiuk, and S. van Drunen Littel-van den Hurk. 2001. 'Suppository-mediated DNA immunization induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle', *Virology*, 289: 327-33.
- Love, P. E., and A. Bhandoola. 2011. 'Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration', *Nat Rev Immunol*, 11: 469-77.

- Lycke, N. 2012. 'Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations', *Nat Rev Immunol*, 12: 592-605.
- Male, David K. 2014. *Immunology : an illustrated outline* (Garland Science, Taylor and Francis Group: New York).
- Mansoor, F., B. Earley, J. P. Cassidy, B. Markey, S. Doherty, and M. D. Welsh. 2015. 'Comparing the immune response to a novel intranasal nanoparticle PLGA vaccine and a commercial BPI3V vaccine in dairy calves', *BMC Vet Res*, 11: 220.
- Mao, H. Q., K. Roy, V. L. Troung-Le, K. A. Janes, K. Y. Lin, Y. Wang, J. T. August, and K. W. Leong. 2001. 'Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency', *J Control Release*, 70: 399-421.
- Mao, S., W. Sun, and T. Kissel. 2010. 'Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA', *Adv Drug Deliv Rev*, 62: 12-27.
- Marino, M., F. Scuderi, C. Provenzano, and E. Bartoccioni. 2011. 'Skeletal muscle cells: from local inflammatory response to active immunity', *Gene Ther*, 18: 109-16.
- Mastorakos, P., A. L. da Silva, J. Chisholm, E. Song, W. K. Choi, M. P. Boyle, M. M. Morales, J. Hanes, and J. S. Suk. 2015. 'Highly compacted biodegradable DNA nanoparticles capable of overcoming the mucus barrier for inhaled lung gene therapy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 8720-5.
- McGonagle, D., and T. Georgouli. 2008. 'The importance of 'Mechnikov's thorn' for an improved understanding of 21st century medicine and immunology: a view from the eye', *Scand J Immunol*, 68: 129-39.
- McLaren, R. A., Jr., J. L. Stein, and H. Minkoff. 2019. 'Measles: There is No Vaccine against Vaccine Phobia', *Am J Perinatol*.
- Mebius, R. E., and G. Kraal. 2005. 'Structure and function of the spleen', *Nat Rev Immunol*, 5: 606-16.
- Medzhitov, R. 2001. 'Toll-like receptors and innate immunity', *Nat Rev Immunol*, 1: 135-45.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. 'A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity', *Nature*, 388: 394-7.
- Meeusen, E. N. 2011. 'Exploiting mucosal surfaces for the development of mucosal vaccines', *Vaccine*, 29: 8506-11.
- Meeusen, E. N., J. Walker, A. Peters, P. P. Pastoret, and G. Jungersen. 2007. 'Current status of veterinary vaccines', *Clin Microbiol Rev*, 20: 489-510, table of contents.
- Mettenleiter, T. C. 2000. 'Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis--state of the art, June 1999', *Vet Res*, 31: 99-115.
- Meunier, M., M. Guyard-Nicodeme, E. Vigouroux, T. Poezevara, V. Beven, S. Quesne, L. Bigault, M. Amelot, D. Dory, and M. Chemaly. 2017. 'Promising new vaccine candidates against *Campylobacter* in broilers', *PLoS One*, 12: e0188472.
- Miller, J. F. 1961a. 'Analysis of the thymus influence in leukaemogenesis', *Nature*, 191: 248-9.
- — —. 1961b. 'Immunological function of the thymus', *Lancet*, 2: 748-9.

- Miquel-Clopes, A., E. G. Bentley, J. P. Stewart, and S. R. Carding. 2019. 'Mucosal vaccines and technology', *Clin Exp Immunol*, 196: 205-14.
- Miyazaki, T. 2018. 'Homage to Mechnikov - the phagocytic system: past and present', *Semin Immunopathol*, 40: 519-21.
- Montagu, Mary Wortley, Sarah Josepha Buell Hale, and Oliver Wendell Holmes Collection (Library of Congress). 1869. *Letters of Lady Mary Wortley Montagu* (Roberts Bros.: Boston).
- Mortensen, S., H. Stryhn, R. Sogaard, A. Boklund, K. D. Stark, J. Christensen, and P. Willeberg. 2002. 'Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus', *Prev Vet Med*, 53: 83-101.
- Moutou, F. 2014. 'The second eradication: rinderpest', *Bull Soc Pathol Exot*, 107: 137-8, 35-6.
- Murtaugh, M. P., M. R. Elam, and L. T. Kakach. 1995. 'Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus', *Arch Virol*, 140: 1451-60.
- Nakahashi-Ouchida, Rika, Yoshikazu Yuki, and Hiroshi Kiyono. 2018. 'Cationic pullulan nanogel as a safe and effective nasal vaccine delivery system for respiratory infectious diseases', *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 14: 2189-93.
- Nanda, R. K., I. A. Hajam, B. M. Edao, K. Ramya, M. Rajangam, S. Chandra Sekar, K. Ganesh, V. Bhanuprakash, and S. Kishore. 2014. 'Immunological evaluation of mannosylated chitosan nanoparticles based foot and mouth disease virus DNA vaccine, pVAC FMDV VP1-OmpA in guinea pigs', *Biologicals*, 42: 153-9.
- Neutra, M. R., and P. A. Kozlowski. 2006. 'Mucosal vaccines: the promise and the challenge', *Nat Rev Immunol*, 6: 148-58.
- Neutra, M.R. 1999. 'M cells in antigen sampling in mucosal tissues.' in J.P. Kraehenbuhl and M.R. Neutra (eds.), *Defense of Mucosal Surfaces: Pathogenesis, Immunity and Vaccines* (Springer-Verlag Berlin: Heidelberger Platz 3, W-1000 Berlin 33, Germany).
- Niborski, V., Y. Li, F. Brennan, M. Lane, A. M. Torche, M. Remond, M. Bonneau, S. Riffault, C. Stirling, G. Hutchings, H. Takamatsu, P. Barnett, B. Charley, and I. Schwartz-Cornil. 2006. 'Efficacy of particle-based DNA delivery for vaccination of sheep against FMDV', *Vaccine*, 24: 7204-13.
- Nixdorf, R., B. G. Klupp, A. Karger, and T. C. Mettenleiter. 2000. 'Effects of truncation of the carboxy terminus of pseudorabies virus glycoprotein B on infectivity', *Journal of virology*, 74: 7137-45.
- Nochi, T., and H. Kiyono. 2006. 'Innate immunity in the mucosal immune system', *Curr Pharm Des*, 12: 4203-13.
- Nochi, T., Y. Yuki, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, T. Kohda, N. Harada, I. G. Kong, A. Sato, N. Kataoka, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Tsukada, S. Kozaki, K. Akiyoshi, and H. Kiyono. 2010. 'Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines', *Nat Mater*, 9: 572-8.

- O'Hagan, D. T., M. Singh, and J. B. Ulmer. 2004. 'Microparticles for the delivery of DNA vaccines', *Immunol Rev*, 199: 191-200.
- O'Neill, L. A. 2004. 'TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat', *Trends Immunol*, 25: 687-93.
- O'Neill, L. A., D. Golenbock, and A. G. Bowie. 2013. 'The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity', *Nat Rev Immunol*, 13: 453-60.
- Offit, Paul A. 2005. *The Cutter incident : how America's first polio vaccine led to the growing vaccine crisis* (Yale University Press: New Haven).
- Oh, Y.K., J.P. Kim, T.S. Hwang, J.J. Ko, J.M. Kim, J.S. Yang, and C.K. Kim. 2001. 'Nasal absorption and biodistribution of plasmid DNA: an alternative route of DNA vaccine delivery', *Vaccine*, 19: 4519-25.
- OIE. 2011. 'OIE declares rinderpest eradicated', *Vet Rec*, 168: 573.
- Okamoto, S., M. Matsuura, T. Akagi, M. Akashi, T. Tanimoto, T. Ishikawa, M. Takahashi, K. Yamanishi, and Y. Mori. 2009. 'Poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles combined with mucosal influenza virus hemagglutinin vaccine protects against influenza virus infection in mice', *Vaccine*, 27: 5896-905.
- Opinel, A. 2007. 'The Pasteur Hospital as an element of Emile Roux's anti-diphtheria apparatus (1890-1914)', *Dynamis*, 27: 83-106.
- Oshop, G. L., S. Elankumaran, and R. A. Heckert. 2002. 'DNA vaccination in the avian', *Vet Immunol Immunopathol*, 89: 1-12.
- Osmond, D. G., and S. J. Batten. 1984. 'Genesis of B lymphocytes in the bone marrow: extravascular and intravascular localization of surface IgM-bearing cells in mouse bone marrow detected by electron-microscope radioautography after in vivo perfusion of 125I anti-IgM antibody', *Am J Anat*, 170: 349-65.
- Owen, Judith A., Jenni Punt, Sharon A. Stranford, Patricia P. Jones, and Janis Kuby. 2013. *Kuby immunology* (W.H. Freeman: New York).
- Pabst, O. 2012. 'New concepts in the generation and functions of IgA', *Nat Rev Immunol*, 12: 821-32.
- Pabst, R. 2007. 'Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs. What are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary?', *Immunol Lett*, 112: 1-8.
- Pan, Li, Zhongwang Zhang, Jianliang Lv, Peng Zhou, Wenfa Hu, Yuzhen Fang, Haotai Chen, Xincheng Liu, Junjun Shao, Yaozhong Ding, Furong Zhao, Tong Lin, Huiyun Chang, Jie Zhang, Yongguang Zhang, and Yonglu Wang. 2014. 'Induction of mucosal immune responses and protection of cattle against direct-contact challenge by intranasal delivery with foot-and-mouth disease virus antigen mediated by nanoparticles', *International Journal of Nanomedicine*.
- Pan, Q., K. He, and K. Huang. 2008. 'Development of recombinant porcine parvovirus-like particles as an antigen carrier formed by the hybrid VP2 protein carrying immunoreactive epitope of porcine circovirus type 2', *Vaccine*, 26: 2119-26.
- Parkin, J., and B. Cohen. 2001. 'An overview of the immune system', *Lancet*, 357: 1777-89.

- Patel, S., and N. Akhtar. 2017. 'Antimicrobial peptides (AMPs): The quintessential 'offense and defense' molecules are more than antimicrobials', *Biomed Pharmacother*, 95: 1276-83.
- Pawar, D., A. K. Goyal, S. Mangal, N. Mishra, B. Vaidya, S. Tiwari, A. K. Jain, and S. P. Vyas. 2010. 'Evaluation of mucoadhesive PLGA microparticles for nasal immunization', *AAPS J*, 12: 130-7.
- Pawar, D., and K. S. Jaganathan. 2016. 'Mucoadhesive glycol chitosan nanoparticles for intranasal delivery of hepatitis B vaccine: enhancement of mucosal and systemic immune response', *Drug Deliv*, 23: 185-94.
- Pawar, D., S. Mangal, R. Goswami, and K. S. Jaganathan. 2013. 'Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity', *Eur J Pharm Biopharm*, 85: 550-9.
- Pichichero, M. E. 2013. 'Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials', *Hum Vaccin Immunother*, 9: 2505-23.
- Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel. 2013. 'B-cell biology and development', *J Allergy Clin Immunol*, 131: 959-71.
- Pillai, S., and A. Cariappa. 2009. 'The bone marrow perisinusoidal niche for recirculating B cells and the positive selection of bone marrow-derived B lymphocytes', *Immunol Cell Biol*, 87: 16-9.
- Pliaka, V., Z. Kyriakopoulou, and P. Markoulatos. 2012. 'Risks associated with the use of live-attenuated vaccine poliovirus strains and the strategies for control and eradication of paralytic poliomyelitis', *Expert Rev Vaccines*, 11: 609-28.
- Plotkin, S. A., J. D. Farquhar, M. Katz, and F. Buser. 1969. 'Attenuation of RA 27-3 rubella virus in WI-38 human diploid cells', *Am J Dis Child*, 118: 178-85.
- Plotkin, Stanley A., Walter A. Orenstein, and Paul A. Offit. 2018. *Plotkin's vaccines* (Elsevier: Philadelphia, PA).
- Plowright, W., and W. P. Taylor. 1967. 'Long-term studies of the immunity in East African Cattle following inoculation with rinderpest culture vaccine', *Res Vet Sci*, 8: 118-28.
- Pomeranz, L. E., A. E. Reynolds, and C. J. Hengartner. 2005. 'Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine', *Microbiol Mol Biol Rev*, 69: 462-500, table of contents.
- Pulendran, B., and R. Ahmed. 2011. 'Immunological mechanisms of vaccination', *Nat Immunol*, 12: 509-17.
- Qian, C., X. Liu, Q. Xu, Z. Wang, J. Chen, T. Li, Q. Zheng, H. Yu, Y. Gu, S. Li, and N. Xia. 2020. 'Recent Progress on the Versatility of Virus-Like Particles', *Vaccines (Basel)*, 8.
- Ragelle, H., R. Riva, G. Vandermeulen, B. Naeye, V. Pourcelle, C. S. Le Duff, C. D'Haese, B. Nysten, K. Braeckmans, S. C. De Smedt, C. Jerome, and V. Preat. 2014. 'Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency', *J Control Release*, 176: 54-63.

- Raghuwanshi, D., V. Mishra, D. Das, K. Kaur, and M. R. Suresh. 2012. 'Dendritic cell targeted chitosan nanoparticles for nasal DNA immunization against SARS CoV nucleocapsid protein', *Mol Pharm*, 9: 946-56.
- Rajapaksa, T. E., M. Stover-Hamer, X. Fernandez, H. A. Eckelhoefer, and D. D. Lo. 2010. 'Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery', *J Control Release*, 142: 196-205.
- Raju, T. N. 1998. 'The Nobel chronicles. 1901: Emil Adolf von Behring (1854-1917)', *Lancet*, 352: 75.
- Ramasamy, S. K., A. P. Kusumbe, T. Itkin, S. Gur-Cohen, T. Lapidot, and R. H. Adams. 2016. 'Regulation of Hematopoiesis and Osteogenesis by Blood Vessel-Derived Signals', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 32: 649-75.
- Ramon, G. 1953a. '[Diphtheria anatoxin and the principle of anatoxic vaccinations were revealed thirty years ago; comments on their discovery]', *Bull Acad Natl Med*, 137: 571-3.
- — —. 1953b. '[The discovery of diphtheria toxin and its consequences; homage to Emile Roux]', *C R Hebd Seances Acad Sci*, 237: 1129-32.
- — —. 1956. '[Tetanus and vaccination with tetanus anatoxin]', *Rev Pathol Gen Physiol Clin*, 56: 263-93.
- Randall, T. D., D. M. Carragher, and J. Rangel-Moreno. 2008. 'Development of secondary lymphoid organs', *Annu Rev Immunol*, 26: 627-50.
- Randolph, G. J., S. Ivanov, B. H. Zinselmeyer, and J. P. Scallan. 2017. 'The Lymphatic System: Integral Roles in Immunity', *Annu Rev Immunol*, 35: 31-52.
- Rauch, S., E. Jasny, K. E. Schmidt, and B. Petsch. 2018. 'New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations', *Front Immunol*, 9: 1963.
- Rauh, I., and T. C. Mettenleiter. 1991. 'Pseudorabies virus glycoproteins gII and gp50 are essential for virus penetration', *Journal of virology*, 65: 5348-56.
- Rebelatto. 2001. '<Rebelatto2001.pdf>'.
<Rebelatto2001.pdf>
- Record, The Veterinary. 2007. 'FMD outbreak linked to defective drain', *Vet Rec.*, 161: 362-63.
- Record, Veterinary. 2014. 'Pirbright Institute fined for safety shortcomings during FMD experiments', *Vet Rec*, 174: 467.
- Redding, L., and D. B. Weiner. 2009. 'DNA vaccines in veterinary use', *Expert Rev Vaccines*, 8: 1251-76.
- Renukaradhya, G. J., X. J. Meng, J. G. Calvert, M. Roof, and K. M. Lager. 2015. 'Live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Current status and future direction', *Vaccine*, 33: 4069-80.
- Richards, D. A., A. Maruani, and V. Chudasama. 2017. 'Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction', *Chem Sci*, 8: 63-77.
- Ricklin, D., E. S. Reis, D. C. Mastellos, P. Gros, and J. D. Lambris. 2016. 'Complement component C3 - The "Swiss Army Knife" of innate immunity and host defense', *Immunol Rev*, 274: 33-58.
- Riera Romo, M., D. Perez-Martinez, and C. Castillo Ferrer. 2016. 'Innate immunity in vertebrates: an overview', *Immunology*, 148: 125-39.

- Roberts, S. 1996. 'Lady Mary Wortley Montagu and the Reverend Cotton Mather: their campaigns for smallpox inoculation', *J Med Biogr*, 4: 129-36.
- Roche, P. A., and K. Furuta. 2015. 'The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation', *Nat Rev Immunol*, 15: 203-16.
- Roeder, P., J. Mariner, and R. Kock. 2013. 'Rinderpest: the veterinary perspective on eradication', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368: 20120139.
- Rothenberg, E. V., H. Y. Kueh, M. A. Yui, and J. A. Zhang. 2016. 'Hematopoiesis and T-cell specification as a model developmental system', *Immunol Rev*, 271: 72-97.
- Rowland, R. R. R., and J. K. Lunney. 2017. 'Alternative strategies for the control and elimination of PRRS', *Vet Microbiol*, 209: 1-4.
- Ryan, E., J. Gloster, S. M. Reid, Y. Li, N. P. Ferris, R. Waters, N. Juleff, B. Charleston, B. Bankowski, S. Gubbins, J. W. Wilesmith, D. P. King, and D. J. Paton. 2008. 'Clinical and laboratory investigations of the outbreaks of foot-and-mouth disease in southern England in 2007', *Vet Rec*, 163: 139-47.
- Saade, F., and N. Petrovsky. 2012. 'Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines', *Expert Rev Vaccines*, 11: 189-209.
- Sabin, A. B., W. A. Hennessen, and J. Winsser. 1954. 'Studies on variants of poliomyelitis virus. I. Experimental segregation and properties of avirulent variants of three immunologic types', *J Exp Med*, 99: 551-76.
- Sahana, D. K., G. Mittal, V. Bhardwaj, and M. N. Kumar. 2008. 'PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug', *J Pharm Sci*, 97: 1530-42.
- Sanchez-Cordon, P. J., D. Chapman, T. Jabbar, A. L. Reis, L. Goatley, C. L. Netherton, G. Taylor, M. Montoya, and L. Dixon. 2017. 'Different routes and doses influence protection in pigs immunised with the naturally attenuated African swine fever virus isolate OURT88/3', *Antiviral Res*, 138: 1-8.
- Sawaengsak, C., Y. Mori, K. Yamanishi, A. Mitrevej, and N. Sinchaipanid. 2014. 'Chitosan nanoparticle encapsulated hemagglutinin-split influenza virus mucosal vaccine', *AAPS PharmSciTech*, 15: 317-25.
- Schautteet, Katelijn, Evelien De Clercq, Yannick Jönsson, Stefanie Lagae, Koen Chiers, Eric Cox, and Daisy Vanrompay. 2012. 'Protection of pigs against genital *Chlamydia trachomatis* challenge by parenteral or mucosal DNA immunization', *Vaccine*, 30: 2869-81.
- Scherliess, R., M. Monckedieck, K. Young, S. Trows, S. Buske, and S. Hook. 2015. 'First in vivo evaluation of particulate nasal dry powder vaccine formulations containing ovalbumin in mice', *Int J Pharm*, 479: 408-15.
- Schneerson, R., J. B. Robbins, O. Barrera, A. Sutton, W. B. Habig, M. C. Hardegree, and J. Chaimovich. 1980. 'Haemophilus influenzae type B polysaccharide-protein conjugates: model for a new generation of capsular polysaccharide vaccines', *Prog Clin Biol Res*, 47: 77-94.
- Serna, M., J. L. Giles, B. P. Morgan, and D. Bubeck. 2016. 'Structural basis of complement membrane attack complex formation', *Nat Commun*, 7: 10587.

- Serruto, D., M. J. Bottomley, S. Ram, M. M. Giuliani, and R. Rappuoli. 2012. 'The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens', *Vaccine*, 30 Suppl 2: B87-97.
- Shams, H. 2005. 'Recent developments in veterinary vaccinology', *Vet J*, 170: 289-99.
- Sharma, R., U. Agrawal, N. Mody, and S. P. Vyas. 2015. 'Polymer nanotechnology based approaches in mucosal vaccine delivery: challenges and opportunities', *Biotechnol Adv*, 33: 64-79.
- Shau, M. D., M. F. Shih, C. C. Lin, I. C. Chuang, W. C. Hung, W. E. Hennink, and J. Y. Cherng. 2012. 'A one-step process in preparation of cationic nanoparticles with poly(lactide-co-glycolide)-containing polyethylenimine gives efficient gene delivery', *Eur J Pharm Sci*, 46: 522-9.
- Singh, M., M. Briones, and D. T. O'Hagan. 2001. 'A novel bioadhesive intranasal delivery system for inactivated influenza vaccines', *J Control Release*, 70: 267-76.
- Slutter, B., S. Bal, C. Keijzer, R. Mallants, N. Hagens, I. Que, E. Kaijzel, W. van Eden, P. Augustijns, C. Lowik, J. Bouwstra, F. Broere, and W. Jiskoot. 2010. 'Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen', *Vaccine*, 28: 6282-91.
- Smidsrod. 1990. '<Smidsrod1990.pdf>'.
<Smidsrod1990.pdf>
- Soane, R. J., M. Hinchcliffe, S. S. Davis, and L. Illum. 2001. 'Clearance characteristics of chitosan based formulations in the sheep nasal cavity', *Int J Pharm*, 217: 183-91.
- Soppimath, K. S., T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, and W. E. Rudzinski. 2001. 'Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices', *J Control Release*, 70: 1-20.
- Stone, A. F., and W. D. Stone. 2002. 'Lady Mary Wortley Montagu: medical and religious controversy following her introduction of smallpox inoculation', *J Med Biogr*, 10: 232-6.
- Su, F., G. B. Patel, S. Hu, and W. Chen. 2016. 'Induction of mucosal immunity through systemic immunization: Phantom or reality?', *Hum Vaccin Immunother*, 12: 1070-9.
- Suk, J. S., Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, and L. M. Ensign. 2016. 'PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery', *Adv Drug Deliv Rev*, 99: 28-51.
- Suschak, J. J., J. A. Williams, and C. S. Schmaljohn. 2017. 'Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity', *Hum Vaccin Immunother*, 13: 2837-48.
- Svanholm, C., L. Bandholtz, E. Castanos-Velez, H. Wigzell, and M. E. Rottenberg. 2000. 'Protective DNA immunization against Chlamydia pneumoniae', *Scand J Immunol*, 51: 345-53.
- Tafaghodi, M., S. A. Sajadi Tabassi, and M. R. Jaafari. 2006. 'Induction of systemic and mucosal immune responses by intranasal administration of alginate

- microspheres encapsulated with tetanus toxoid and CpG-ODN', *Int J Pharm*, 319: 37-43.
- Tafaghodi, M., V. Saluja, G. F. Kersten, H. Kraan, B. Slutter, J. P. Amorij, and W. Jiskoot. 2012. 'Hepatitis B surface antigen nanoparticles coated with chitosan and trimethyl chitosan: Impact of formulation on physicochemical and immunological characteristics', *Vaccine*, 30: 5341-8.
- Tahara, K., T. Sakai, H. Yamamoto, H. Takeuchi, N. Hirashima, and Y. Kawashima. 2011. 'Improvements in transfection efficiency with chitosan modified poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres prepared by the emulsion solvent diffusion method, for gene delivery', *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 59: 298-301.
- Takeuchi, Osamu, and Shizuo Akira. 2010. 'Pattern Recognition Receptors and Inflammation', *Cell*, 140: 805-20.
- Tanner, R., B. Villarreal-Ramos, H. M. Vordermeier, and H. McShane. 2019. 'The Humoral Immune Response to BCG Vaccination', *Front Immunol*, 10: 1317.
- Taylor, G., C. Bruce, A. F. Barbet, S. G. Wyld, and L. H. Thomas. 2005. 'DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves', *Vaccine*, 23: 1242-50.
- Torrieri-Dramard, L., B. Lambrecht, H. L. Ferreira, T. Van den Berg, D. Klatzmann, and B. Bellier. 2011. 'Intranasal DNA vaccination induces potent mucosal and systemic immune responses and cross-protective immunity against influenza viruses', *Mol Ther*, 19: 602-11.
- Trochimiak, T., and E. Hubner-Wozniak. 2012. 'Effect of exercise on the level of immunoglobulin a in saliva', *Biol Sport*, 29: 255-61.
- Turley, S. J., A. L. Fletcher, and K. G. Elpek. 2010. 'The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs', *Nat Rev Immunol*, 10: 813-25.
- Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. Randall Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman, L. A. Hawe, K. R. Leander, D. Martinez, H. C. Perry, J. W. Shiver, D. L. Montgomery, and M. A. Liu. 1993. 'Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein', *Science*, 259: 1745-9.
- van Drunen Littel-van den Hurk, S., S. L. Babiuk, and L. A. Babiuk. 2004. 'Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species', *Immunol Rev*, 199: 113-25.
- van Rooij, E. M., B. L. Haagmans, H. L. Glansbeek, Y. E. de Visser, M. G. de Bruin, W. Boersma, and A. T. Bianchi. 2000. 'A DNA vaccine coding for glycoprotein B of pseudorabies virus induces cell-mediated immunity in pigs and reduces virus excretion early after infection', *Vet Immunol Immunopathol*, 74: 121-36.
- van Rooij, E. M., H. W. Moonen-Leusen, Y. E. de Visser, W. G. Middel, W. J. Boersma, and A. T. Bianchi. 2006. 'A DNA vaccine coding for gB and gD of pseudorabies virus (suid herpes type 1) primes the immune system in the presence of maternal immunity more efficiently than conventional vaccines', *Vaccine*, 24: 1264-73.

- Vannier, P., F. Vedeau, and C. Allemeersch. 1997. 'Eradication and control programmes against Aujeszky's disease (pseudorabies) in France', *Vet Microbiol*, 55: 167-73.
- Vascotto, F., D. Le Roux, D. Lankar, G. Faure-Andre, P. Vargas, P. Guermonprez, and A. M. Lennon-Dumenil. 2007. 'Antigen presentation by B lymphocytes: how receptor signaling directs membrane trafficking', *Curr Opin Immunol*, 19: 93-8.
- Vasir, J. K., and V. Labhasetwar. 2007. 'Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics', *Adv Drug Deliv Rev*, 59: 718-28.
- Verheul, R. J., B. Slutter, S. M. Bal, J. A. Bouwstra, W. Jiskoot, and W. E. Hennink. 2011. 'Covalently stabilized trimethyl chitosan-hyaluronic acid nanoparticles for nasal and intradermal vaccination', *J Control Release*, 156: 46-52.
- Vetter, V., G. Denizer, L. R. Friedland, J. Krishnan, and M. Shapiro. 2018. 'Understanding modern-day vaccines: what you need to know', *Ann Med*, 50: 110-20.
- Vujanic, A., P. Sutton, K. J. Snibson, H. H. Yen, and J. P. Scheerlinck. 2012. 'Mucosal vaccination: lung versus nose', *Vet Immunol Immunopathol*, 148: 172-7.
- Walport, M. J. 2001a. 'Complement. First of two parts', *N Engl J Med*, 344: 1058-66.
- . 2001b. 'Complement. Second of two parts', *N Engl J Med*, 344: 1140-4.
- Ward, N. A., J. B. Milstien, H. F. Hull, B. P. Hull, and R. J. Kim-Farley. 1993. 'The WHO-EPI initiative for the global eradication of poliomyelitis', *Biologicals*, 21: 327-33.
- Wattiaux, R., N. Laurent, S. Wattiaux-De Coninck, and M. Jadot. 2000. 'Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer', *Adv Drug Deliv Rev*, 41: 201-8.
- Wei, Q., and P. S. Frenette. 2018. 'Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny', *Immunity*, 48: 632-48.
- Weiskopf, K., P. J. Schnorr, W. W. Pang, M. P. Chao, A. Chhabra, J. Seita, M. Feng, and I. L. Weissman. 2016. 'Myeloid Cell Origins, Differentiation, and Clinical Implications', *Microbiol Spectr*, 4.
- Wheeler, M., X. Cortez-Gonzalez, R. Frazzi, and M. Zanetti. 2006. 'Ex vivo programming of antigen-presenting B lymphocytes: considerations on DNA uptake and cell activation', *Int Rev Immunol*, 25: 83-97.
- WHO. 1979. 'Global eradication of smallpox: WHO Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication', *J Med Assoc Thai*, 62: 461.
- Wilby, K. J., T. T. Lau, S. E. Gilchrist, and M. H. Ensom. 2012. 'Mosquirix (RTS,S): a novel vaccine for the prevention of Plasmodium falciparum malaria', *Ann Pharmacother*, 46: 384-93.
- Willcox, B. E., and C. R. Willcox. 2019. 'gammadelta TCR ligands: the quest to solve a 500-million-year-old mystery', *Nat Immunol*, 20: 121-28.
- Williams, J. A. 2013. 'Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production', *Vaccines (Basel)*, 1: 225-49.
- Wolff, J. A., J. J. Ludtke, G. Acsadi, P. Williams, and A. Jani. 1992. 'Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle', *Hum. Mol. Genet.*, 1: 363-9.

- Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, and P.L. Felgner. 1990. 'Direct gene transfer into mouse muscle in vivo', *Science*, 247: 1465-8.
- Xia, Chang, Zachary Braunstein, Amelia C. Toomey, Jixin Zhong, and Xiaoquan Rao. 2018. 'S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation', *Frontiers in Immunology*, 8.
- Xu, J., W. Dai, Z. Wang, B. Chen, Z. Li, and X. Fan. 2011. 'Intranasal vaccination with chitosan-DNA nanoparticles expressing pneumococcal surface antigen a protects mice against nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*', *Clin Vaccine Immunol*, 18: 75-81.
- Xu, L., J. Zhao, M. Liu, G. Ren, F. Jian, J. Yin, J. Feng, H. Liu, and T. Lu. 2017. 'Bivalent DNA vaccine induces significant immune responses against infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout', *Sci Rep*, 7: 5700.
- Xu, W., Y. Shen, Z. Jiang, Y. Wang, Y. Chu, and S. Xiong. 2004. 'Intranasal delivery of chitosan-DNA vaccine generates mucosal SIgA and anti-CVB3 protection', *Vaccine*, 22: 3603-12.
- Xu, Y., P. W. Yuen, and J. K. Lam. 2014. 'Intranasal DNA Vaccine for Protection against Respiratory Infectious Diseases: The Delivery Perspectives', *Pharmaceutics*, 6: 378-415.
- Yam-Puc, J. C., L. Zhang, Y. Zhang, and K. M. Toellner. 2018. 'Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation', *F1000Res*, 7: 429.
- Yang, B., J. Jeang, A. Yang, T. C. Wu, and C. F. Hung. 2014. 'DNA vaccine for cancer immunotherapy', *Hum Vaccin Immunother*, 10: 3153-64.
- Yang, X., X. Yuan, D. Cai, S. Wang, and L. Zong. 2009. 'Low molecular weight chitosan in DNA vaccine delivery via mucosa', *Int J Pharm*, 375: 123-32.
- Yao, W., Y. Peng, M. Du, J. Luo, and L. Zong. 2013. 'Preventative vaccine-loaded mannosylated chitosan nanoparticles intended for nasal mucosal delivery enhance immune responses and potent tumor immunity', *Mol Pharm*, 10: 2904-14.
- Yen, H. H., J. P. Scheerlinck, S. Gekas, and P. Sutton. 2006. 'A sheep cannulation model for evaluation of nasal vaccine delivery', *Methods*, 38: 117-23.
- Yui, M. A., and E. V. Rothenberg. 2014. 'Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity', *Nat Rev Immunol*, 14: 529-45.
- Yutin, N., M. Y. Wolf, Y. I. Wolf, and E. V. Koonin. 2009. 'The origins of phagocytosis and eukaryogenesis', *Biol Direct*, 4: 9.
- Zaripov, M. M., O. S. Morenkov, B. Siklodi, I. Barna-Vetro, A. Gyongyosi-Horvath, and I. Fodor. 1998. 'Glycoprotein B of Aujeszky's disease virus: topographical epitope mapping and epitope-specific antibody response', *Res Virol*, 149: 29-41.
- Zaripov, M.M., O.S. Morenkov, N. Fodor, A. Brown, V.V. Schmatchenko, and I. Fodor. 1999. 'Distribution of B-cell epitopes on the pseudorabies virus glycoprotein B', *J. Gen. Virol.*, 80: 537-41.
- Zhang, L. J., and R. L. Gallo. 2016. 'Antimicrobial peptides', *Curr Biol*, 26: R14-9.

- Zhao, K., Y. Zhang, X. Zhang, C. Shi, X. Wang, X. Wang, Z. Jin, and S. Cui. 2014. 'Chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles as an efficient delivery system for Newcastle disease virus DNA vaccine', *Int J Nanomedicine*, 9: 4609-19.
- Zhao, K., Y. Zhang, X. Zhang, W. Li, C. Shi, C. Guo, C. Dai, Q. Chen, Z. Jin, Y. Zhao, H. Cui, and Y. Wang. 2014. 'Preparation and efficacy of Newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles', *Int J Nanomedicine*, 9: 389-402.
- Zuckermann, F. A. 2000. 'Aujeszky's disease virus: opportunities and challenge', *Vet. Res.*, 31: 121-31.
- Zuckermann, F. A., L. Zsak, T. C. Mettenleiter, and T. Ben-Porat. 1990. 'Pseudorabies virus glycoprotein gIII is a major target antigen for murine and swine virus-specific cytotoxic T lymphocytes', *Journal of virology*, 64: 802-12.

Table des figures

Figure 1. (A) Principaux organes et tissus lymphoïdes chez l'homme. (B) Principaux organes et tissus lymphoïdes chez le porc.	17
Figure 2. Mode de circulation des lymphocytes dans le système immunitaire.	20
Figure 3. Schéma sur les principales barrières de l'immunité innée.	22
Figure 4. Famille des TLR et leur ligands spécifiques.	25
Figure 5. Le système du complément (d'après (Owen et al., 2013)).	26
Figure 6. Structure du récepteur des lymphocytes B (BCR).	28
Figure 7. Structure du récepteur des lymphocytes T (TCR).	29
Figure 8. Présentation antigénique : la voie du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I). D'après Immunology – An Illustrated Outline de David Male, traduit de l'anglais (Male 2014).	31
Figure 9. Présentation antigénique : la voie du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II).	32
Figure 10. Chronologie de l'histoire de la vaccination en Europe.	38
Figure 11. Echantillonnage des antigènes au niveau des sites inducteurs muqueux (Neutra and Kozlowski 2006).	55
Figure 12. Les différents compartiments muqueux lymphoïdes chez le porc.	56
Figure 13. Représentation schématique du système inducteur/effecteur impliqué dans la réponse muqueuse immunitaire.	57
Figure 14. Les différents modes d'administration par la voie muqueuse et leurs sites MALTs associés (Lycke 2012).	58
Figure 15. Les systèmes nanoparticulaires : différents rôles possibles en vaccination d'après (Xu, Yuen, and Lam 2014).	63
Figure 16. Différents types de nanoparticules comme vecteurs vaccinaux muqueux. Adapté et traduit de (Sharma et al. 2015).	65

Figure 17. Propriétés importantes des nanoparticules de chitosan pour une utilisation en intranasal.	66
Figure 18. L'hydrolyse du PLGA et ses produits de dégradation.	74
Figure 19. Le virus de la Pseudorange Porcine.....	78
Figure 20. Glycoprotéines majeures d'enveloppe du virus de la Pseudorange porcine et base du vaccin ADN.....	80
Figure 21. Représentation schématique de la glycoprotéine B du virus de la Pseudorange porcine.....	82
Figure 22. Représentation schématique des nanovecteurs retenus pour la thèse : le KLN47 associé par complexation avec l'ADN vaccinal, le chitosan ou le chitosan mannosylé avec lesquels l'ADN est encapsulé et pour finir les nanoparticules de PLGA-PEI sur lesquels l'ADN est adsorbé.....	90
Figure 23. (A) Caractéristiques importantes des lipides cationiques.....	91
Figure 24. Efficacité de transfection chez la souris déterminée par bioluminescence en imagerie <i>in vivo</i> suite à une inoculation par la voie intraveineuse (1) ou intranasale (2) (Le Gall et al. 2013).	92
Figure 25. Représentation schématique du protocole de coacervation complexe (Nanda et al. 2014) pour fabriquer des nanoparticules de chitosan encapsulant l'ADN plasmidique d'intérêt.....	99
Figure 26. Représentation schématique du protocole d'adsorption de nos ADN d'intérêt sur des nanoparticules de PLGA-PEI achetées sous forme lyophilisée.	101
Figure 27. Complexation de l'ADN formulé.....	103
Figure 28. Schéma représentant la réaction de bioluminescence avec la Luciférase de luciole.	104
Figure 29. Efficacité de transfection <i>in vitro</i> sur des cellules HEK293 du chitosan formulé avec un ADN plasmidique marqueur codant la luciférase.	108
Figure 30. Efficacité de transfection <i>in vitro</i> sur des cellules HEK-293 et HBE-16 du chitosan formulé avec un ADN plasmidique marqueur codant la luciférase.	109

Figure 31. Efficacité de transfection <i>in vitro</i> sur des cellules HEK-293 et HBE-16 du chitosan mannosylé (MCA) formulé avec un ADN plasmidique marqueur codant la luciférase.....	110
Figure 32. Efficacité de transfection <i>in vitro</i> sur des cellules HEK-293 et HBE-16 du KLN47 formulé avec un ADN plasmidique marqueur codant la luciférase. ..	111
Figure 33. Efficacité de transfection <i>in vitro</i> sur des cellules HBE-16 des nanoparticules de PLGA-PEI adsorbées avec un ADN plasmidique marqueur codant la luciférase.	112
Figure 34. Viabilité cellulaire mesurée à 72 heures post-transfection.	114
Figure 35. Représentation schématique du déroulé de l'essai #2.....	123
Figure 36. Localisation anatomique du septum, du nanopharynx et des NALTs chez le porc.	125
Figure 37. Schéma explicatif du fournisseur montrant la façon de pulvériser à un patient humain un médicament par la voie nasale à l'aide du dispositif MAD100.	126
Figure 38. Schéma montrant la façon d'inoculer le porc par la voie intranasale avec la seringue MAD100 qui sert à pulvériser la dose vaccinale.....	127
Figure 39. Détermination par ELISA des titres en IgA sériques contre le PrV chez les porcs inoculés en IM avec de l'ADN nu PrV-gB ou les porcs non inoculés....	146
Figure 40. Détermination par ELISA des titres IgA sériques contre le PrV chez des porcs inoculés en IN avec de l'ADN nu codant PrV-gB.	147
Figure 41. Détermination par ELISA des titres IgG sériques contre le PrV chez des porcs inoculé IN avec de l'ADN codant la gB du PrV associé avec le chitosan ou le chitosan mannosylé.	148
Figure 42. Détermination par ELISA des titres IgG sériques contre le PrV chez des porcs inoculés avec différentes préparations vaccinales.....	151
Figure 43. Détermination par ELISA des titres en IgA systémiques contre le PrV inoculé avec notre vaccin à ADN (pcDNA3-gB).....	152

Figure 44. Détermination par ELISA des titres en IgG and IgA systémiques et sIgA salivaires obtenus durant l'essai #4 contre le PrV chez des porcs inoculés avec le plasmide codant la gB du PrV formulé avec du chitosan.....	154
Figure 45. Détermination par ELISA des titres en IgG and IgA systémiques et sIgA salivaires contre le PrV inoculé avec notre vaccin à ADN (pcDNA3-gB) formulé avec le MCA.	156
Figure 46. Détermination par ELISA des titres en IgG and IgA systémiques ou mucosaux obtenus durant l'essai #4 contre le PrV inoculé avec notre vaccin à ADN (pcDNA3-gB) formulé avec le lipide cationique KLN47.....	158

Liste des tableaux

Tableau 1: Avantages de la vaccination ADN comparé aux vaccins conventionnels.....	52
Tableau 2 : Récapitulatif sur les avantages et les inconvénients des différentes routes d'immunisation mucoale.	59
Tableau 3 : Vaccin mucoaux commercialisés en usage clinique et vétérinaire en 2019.	61
Tableau 4. Etudes sur le chitosan et ses dérivés en vaccination intranasale...	70
Tableau 5 : protocole de fabrication des lipoplexes KLN47-ADN en fonction des différents ratios charges souhaités.	102
Tableau 6 : récapitulatif des conditions testées durant l'essai #3.....	129
Tableau 7 : Détermination par ELISA des sIgA présentes dans le mucus d'amygdales porcines (post-mortem à J50 de l'essai #4).....	159
Tableau 8 : Détermination par ELISA des sIgA présentes dans les lavages nasaux (NAL) (prélèvements réalisés à J27 et J34 durant l'essai#4).....	160

Annexes

Annexe #1 : Saisine #1 pour le comité d'éthique

1. Informations Générales

Numéro de version	1
1.1. Référence Dossier	201806210855647
1.2. Titre du projet	Induction de réponse immunitaire chez le porc après une inoculation d'un vaccin par voie intranasale

1.3. Durée du projet

Nombre d'années	1
Nombre de mois	0
Nombre de jours	0

1.4. Date prévue de début de projet

Date	16.08.2018
------	------------

2. Résumé non technique

Numéro d'agrément	C-22-745-1
Date de délivrance de l'agrément	25.01.2013
Civilité	Monsieur
NomResponsable	ETERRADOSSI
Prénom du responsable	Nicolas
Email du responsable	nicolas.terradossi@anses.fr
Civilité	Monsieur
Nom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU	ETERRADOSSI
Prénom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU	Nicolas
Email de ce délégataire	nicolas.terradossi@anses.fr

3.1.2. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet

Nombre de responsables	3
------------------------	---

Coordonnées du responsable

Civilité	Monsieur
Nom	DORY
Prénom	Daniel

Adresse Postale

Nom du laboratoire	Anses laboratoire de Ploufragan-Plouzané
Complément	Unité Génétique Virale et Biosécurité
Numéro	41

La vaccination par la voie intranasale vise à protéger les animaux contre un pathogène qui pénètre dans l'organisme par cette voie. Cette stratégie vaccinale présente en outre l'avantage d'être non invasive (pas d'aiguille) et peut être envisagée en cas de vaccination de masse d'un troupeau. La vaccination à ADN est une alternative vaccinale récemment découverte qui présente l'avantage de ne pas utiliser un agent infectieux, ce qui est bénéfique pour la biosécurité vaccinale. Dans ce cas, le vaccin est composé d'une molécule d'ADN codant la protéine vaccinale. Si on administre ce type de vaccin tel quel par voie intranasale, il sera rapidement détruit par certains composants de la muqueuse. C'est pourquoi il doit être transporté par un vecteur qui le protégera de la dégradation et lui permettra en sus d'atteindre son lieu d'action.

Notre objectif est de développer la vaccination à ADN par voie intranasale chez le porc induire une protection immunitaire vis-à-vis de pathogènes porcins contaminant le porc par la voie nasale. Dans un premier temps, nous avons sélectionné 4 vecteurs déjà utilisés dans le cadre de la vaccination à ADN par voie intranasale, mais pour d'autres espèces animales que le porc. Puis nous avons vérifié in vitro que ces vecteurs sont bien actifs pour véhiculer l'ADN dans des cellules en culture.

Ces 4 vecteurs doivent maintenant être évalués pour leurs capacités à permettre au vaccin ADN d'induire une réponse immunitaire chez le porc suite à une inoculation par voie intranasale. Pour cela, un ADN plasmidique vaccinal connu pour induire une forte réponse immunitaire chez le porc, le plasmide codant la glycoprotéine B du virus de la pseudoréponse porcine, sera associé à chacun de ces 4 vecteurs et sera ainsi administré à des porcs par voie intranasale à 3 reprises, à une semaine d'intervalle. Il est à noter que l'administration de ce plasmide n'entraîne aucune réaction adverse chez le porc. Les réponses immunitaires seront recherchées jusqu'à au moins 3 semaines après la dernière inoculation. A la suite de ces investigations, un essai de protection vaccinale proprement dit pourra être réalisé à l'aide du vecteur le plus efficace identifié ici.

Les vecteurs seront évalués au cours de deux procédures expérimentales qui seront menées dans le respect de la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique (au total N=27 animaux) ainsi que le raffinement des conditions d'hébergement. Ces mesures de raffinement viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant l'angoisse potentielle des animaux (eau et nourriture à volonté, lampes chauffantes, jouets, etc.). En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable, les animaux utilisés étant nécessaires pour évaluer l'immunogénicité d'un vaccin inoculé par la voie nasale chez le porc. Il n'existe pas en effet de lignée cellulaire pouvant imiter la complexité du système immunitaire porcine.

3. Informations Administratives et Réglementaires

3.1. L'Etablissement Utilisateur

3.1.1. Agrément de l'Etablissement Utilisateur (EU) où seront utilisés les animaux

Nom de l'Etablissement Utilisateur	Anses – Laboratoire de Ploufragan
------------------------------------	-----------------------------------

Voie	rue de Beaucemaine
Code Postal	22440
Ville	PLOUFRAGAN
Pays	FRANCE
Email	daniel.dory@anses.fr
Numéro de téléphone	0296016442

Coordonnées du responsable

Civilité	Monsieur
Nom	SOUCI
Prénom	Laurent

Adresse Postale

Nom du laboratoire	Anses laboratoire de Ploufragan Plouzané
Complément	Unité Génétique et Biosécurité
Numéro	41
Voie	rue de Beaucemaine
Code Postal	22440
Ville	PLOUFRAGAN
Email	laurent.souci@anses.fr
Numéro de téléphone	0296016274

Coordonnées du responsable

Civilité	Monsieur
Nom	

Page 4

Prénom	Frédéric
--------	----------

Adresse Postale

Nom du laboratoire	Anses laboratoire de Ploufragan-Plouzané
Complément	SPPAE
Numéro	41
Voie	rue de Beaucemaine
Code Postal	22440
Ville	PLOUFRAGAN
Email	frederic.paboeuf@anses.fr
Numéro de téléphone	02 96 01 62 50

3.1.3. Responsable(s) du bien être des animaux

Nombre de responsables	1
------------------------	---

Coordonnées du responsable

Civilité	Madame/Mademoiselle
Nom	POL
Prénom	Françoise

Adresse Postale

Nom du laboratoire	Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané
Complément	UEBEAC
Numéro	41

Page 5

Voie	rue de Beaucemaine
Code Postal	22440
Ville	PLOUFRAGAN
Email	francoise.pol@anses.fr
Numéro de téléphone	02 96 01 62 04

3.2. Le Personnel

Conception des procédures expérimentales et des projets	Oui
Application de procédures expérimentales aux animaux	Oui
Soins aux animaux	Oui
Mise à mort des animaux	Oui

3.3. Le Projet

3.3.1. Objectif du projet

Le projet est-il

Justifié d'un point de vue scientifique Oui

Informations concernant cette(ces) justification(s)

Tous les projets de l'Anses sont soumis à plusieurs niveaux d'évaluation : interne par la Direction Scientifique de l'Anses et externe par les instances de qui émanent les appels à projets (Ministères, ANR, UE,...)

3.3.2. Description du projet

Page 6

Les vaccins sous-unitaires sont principalement injectés par voie systémique. Notre équipe de l'Anses a longuement travaillé sur ce type de vaccination chez le porc et a ainsi développé un vaccin à ADN contre le virus de la pseudoragie porcine (PrV) injecté par voie intramusculaire [1]. Dans un très grand nombre de cas, la vaccination par voie systémique est efficace, mais pas toujours. En effet, l'induction de réponses immunitaires protectrices au niveau des muqueuses est efficace pour lutter contre les maladies infectieuses induites par les pathogènes pénétrant dans l'organisme par les muqueuses [2]. Les muqueuses sont présentes en effet dans différentes cavités du corps à l'interface entre le milieu extérieur et le milieu intérieur [3]. Elles sont donc retrouvées au niveau des voies respiratoires et gastro-intestinales, ainsi que dans les zones génitales, rectales, oculaires, Elles contribuent aux fonctions essentielles telles que la respiration, la nutrition et la reproduction en permettant les échanges entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme tout en assurant un rôle protecteur en empêchant l'entrée de microorganismes pathogènes. Pour cela l'entrée physique des pathogènes est tout d'abord empêchée par le mucus et par une couche de cellules épithéliales aux jonctions très serrées [4]. Par ailleurs, des cellules lymphoïdes, des macrophages et des cellules dendritiques dispersés parmi les cellules épithéliales représentent la seconde ligne de défense innée. Puis des réponses immunitaires spécifiques sont générées suite à la prise en charge des antigènes du pathogène par, entre autres, des cellules T, des cellules B et des cellules dendritiques plasmacytoïdes [4].

Classiquement, les vaccins mucosaux sont constitués de pathogènes atténués qui peuvent atteindre naturellement les muqueuses [5, 6]. Pour des raisons de sécurité vaccinale ou pour développer de nouveaux vaccins plus efficaces, des vaccinations sous-unitaires sont préférables. Les antigènes vaccinaux peuvent ainsi être insérés dans un vecteur viral ou bactérien qui cible les muqueuses ou être administrés sous forme d'ADN (d'où son appellation de vaccination à ADN, les protéines codées par l'ADN étant synthétisées suite à l'administration dans l'organisme) [7] ou de protéines recombinantes [8]. Dans ces deux derniers cas, l'ADN ou les protéines vaccinales doivent être véhiculés et protégés par des formulations (structures liposomales ou particulières par exemple) de tailles proches de celles des pathogènes et qui rentrent en contact avec l'épithélium [2, 9]. Ce sont des stratégies qui se développent actuellement principalement par voie orale ou nasale. Par ailleurs, ce genre de stratégie peut permettre la vaccination de masse de troupeaux en administrant les vaccins par aérosol ou via l'eau de boisson par exemple. Ce type d'administration est peu invasif et est par conséquent bien toléré par les animaux.

Il apparaît donc opportun de disposer de cette technologie de vaccination sous-unitaire par voie mucosale pour proposer de nouvelles stratégies vaccinales contre des pathogènes porcins à tropisme respiratoire. Notre modèle de vaccination à ADN contre le virus de la pseudoragie porcine (PrV) est un modèle adapté pour développer chez le porc ce type de vaccination par la voie intranasale (IN). En effet, la voie d'entrée du virus PrV dans l'organisme est la voie oronasale [10]. Ce modèle est composé de 3 ADN plasmidiques codant les glycoprotéines B, C et D du PrV [1]. Parmi les 3 glycoprotéines, la glycoprotéine B est particulièrement intéressante car elle permet à elle seule d'induire de fortes productions d'anticorps contre le PrV [15].

Une analyse bibliographique poussée sur la vaccination à ADN par voie intranasale a été menée au sein de notre

Page 7

laboratoire et a permis d'identifier 4 formulations qui permettent de véhiculer et de protéger l'ADN vaccinal ou thérapeutique jusqu'aux muqueuses nasales. Ces études ont été réalisées chez la souris, et aucun effet indésirable n'a été décelé. Les formulations sont :

- Le chitosan [11]
- Le chitosan manosylé [12]
- Le PLGA-PEI [13]
- Les lipides cationiques [14]

L'objectif du présent projet est d'évaluer le potentiel immunisant d'un plasmide codant la glycoprotéine B du virus de la pseudorabie porcine (la gB est connue comme étant fortement immunogène dans nos conditions expérimentales [15]) lorsqu'il est associé à chacune des 4 formulations identifiées précédemment et inoculé par la voie intranasale. Tous ces vecteurs ont été validés in vitro dans notre laboratoire pour leurs capacités à permettre la transfection des cellules par les plasmides. Le potentiel immunisant de ces formulations ADN plasmidique/vecteur inoculées par la voie intranasale sera comparé à celui du plasmide seul injecté par la voie intramusculaire.

Références :

- [1] Dory D, Béven V, Torché AM, Bougeard S, Cariolet R, Jestin A. CpG motif in ATCGAT hexamer improves DNA-vaccine efficiency against lethal Pseudorabies virus infection in pigs. *Vaccine*. 2005;23:4532-40.
- [2] Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Mucosal vaccines: where do we stand? *Current topics in medicinal chemistry*. 2013;13:2609-28.
- [3] Lawson LB, Norton EB, Clements JD. Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Curr Opin Immunol*. 2011;23:414-20.
- [4] Liebler-Tenorio EM, Pabst R. MALT structure and function in farm animals. *Vet Res*. 2006;37:257-80.
- [5] Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:592-605.
- [6] Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B, Paul S. New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine*. 2012;30:142-54.
- [7] Farris E, Brown DM, Ramer-Tait AE, Pannier AK. Micro- and nanoparticulates for DNA vaccine delivery. *Experimental biology and medicine*. 2016;241:919-29.
- [8] Wang S, Liu H, Zhang X, Qian F. Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens: advantages, challenges and formulation strategies. *Protein & cell*. 2015;6:480-503.
- [9] Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:6328-33.
- [10] Babic N, Mettenleiter TC, Ugolini G, Flamand A, Coulon P. Propagation of pseudorabies virus in the nervous system of the mouse after intranasal inoculation. *Virology*. 1994;204:616-25.
- [11] Sawaengsak C, Mori Y, Yamanishi K, Srimanote P, Chaicumpa W, Mitrevaj A, et al. Intranasal chitosan-DNA

Page 8

vaccines that protect across influenza virus subtypes. *Int J Pharm*. 2014;473:113-25.

- [12] Wu M, Zhao H, Li M, Yue Y, Xiong S, Xu W. Intranasal Vaccination with Mannosylated Chitosan Formulated DNA Vaccine Enables Robust IgA and Cellular Response Induction in the Lungs of Mice and Improves Protection against Pulmonary Mycobacterial Challenge. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:445.
- [13] Bivas-Benita M, Lin MY, Bal SM, van Meijgaarden KE, Franken KL, Friggen AH, et al. Pulmonary delivery of DNA encoding Mycobacterium tuberculosis latency antigen Rv1733c associated to PLGA-PEI nanoparticles enhances T cell responses in a DNA prime/protein boost vaccination regimen in mice. *Vaccine*. 2009;27:4010-7.
- [14] Le Gall T, Berchel M, Le Hir S, Fraix A, Salaun JY, Ferec C, et al. Arsonium-containing lipophosphoramides, poly-functional nano-carriers for simultaneous antibacterial action and eukaryotic cell transfection. *Advanced healthcare materials*. 2013;2:1513-24.
- [15] Dory D, Remond M, Beven V, Cariolet R, Backovic M, Zientara S, Jestin A. 2009. Pseudorabies virus glycoprotein B can be used to carry foot and mouth disease antigens in DNA vaccination of pigs. *Antiviral Res* 81:217-25.

3.3.3. Précisez, le cas échéant, la (ou les) méthode(s) de mise à mort prévue(s)

Les porcelets seront tout d'abord anesthésiés avec un agent pharmacologique (Zolétil 100, 1 ml/10 kg) puis l'euthanasie se fera par saignée.

3.3.4. Précisez, le cas échéant, les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation concernant la méthode de mise à mort envisagée :

Sans objet

3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées, et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez et justifiez les tests choisis :

Page 9

Le nombre d'essai est de 2 avec de 2 formulations testées par essai. Le nombre d'animaux par groupe inoculé est de 3. Puis il faudra ajouter 3 porcs (essai 1) et 2 porcs (essai 2) porcs injectés avec le plasmide par la voie intramusculaire comme contrôle positif, 3 porcs (essai 1) et 2 porcs (essai 2) inoculés par la voie intranasale avec de l'ADN sans vecteur pour prouver le rôle du vecteur dans l'immunisation et 3 porcs (essai 1) et 2 porcs (essai 2) non inoculés (témoin négatif). 27 animaux sont nécessaires pour pouvoir appliquer des tests statistiques (au minimum 3 animaux par groupe si on cumule les groupes témoins des 2 procédures). Ici les tests statistiques utilisés seront, pour une distribution normale : les tests ANOVA et de Student et pour une distribution ne suivant pas la loi normale : les tests de Kruskal-Wallis test et Kolmogorov-Smirnov. A priori, les formulations testées ici ne devraient pas entraîner d'effets indésirables sur les porcs, car rien n'a été décrit en ce sens dans les publications décrivant ce type d'essai sur d'autres espèces animales et nous n'avons pas mesuré d'effets cytotoxiques sur des cellules en culture dans les conditions expérimentales in vitro. Néanmoins les animaux seront observés quotidiennement. Si toutefois, l'infection conduisait à une altération de l'état de santé, les animaux concernés seront euthanasiés en cas d'atteinte des points limites suivants : non réponse à des stimuli tactiles et visuels, perte d'appétit et de poids (équivalent à 20% sur une période d'une semaine) ou température rectale supérieure à 41,8°C ou inférieure à 36,0°C.

3.4. Les Animaux

3.4.1. Justifiez d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet

Le but du projet est d'étudier si les 4 formulations retenues permettent au plasmide codant la glycoprotéine B du PrV d'induire une réponse immunitaire chez le porc (production d'anticorps, réponse cellulaire, réponse mucosale) contre le PrV lorsque ce plasmide est inoculé par la voie intranasale. Il n'y a pas de lignée cellulaire équivalente à la complexité de la muqueuse nasale porcine.

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés

Porcs (*Sus scrofa domesticus*) Oui

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) choisie(s)

Le but final est développer la vaccination à ADN par voie intranasale chez le porc.

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ? Non

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ? Non

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ? Non

Page 10

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ? Non

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques) Oui

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ?

Oui

Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet 1

Etablissement éleveur

Nom de l'établissement ANSES laboratoire de Ploufragan/Plouzané

Adresse postale

Nom du laboratoire Laboratoire de Ploufragan Plouzané

Numéro 41

Voie rue de Beaucemaine

Code Postal 22440

Ville PLOUFRAGAN

Animaux fournis Porcs EOPS

Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie Oui

Page 11

des animaux du projet ?

Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? Non

Etablissements éleveurs occasionnels non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements 0

Etablissements éleveurs ou fournisseurs localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements 0

Etablissements éleveurs ou fournisseurs localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements 0

Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent? Non

Animaux utilisés

3.4.10. Nombre d'animaux utilisés dans le projet 27

Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées

27 porcs au total (3 porcs inoculés avec de l'ADN associé avec chacun des 4 vecteurs par voie intranasale (soit au total 12 porcs), 5 porcs inoculés avec l'ADN sans vecteur par voie intranasale, 5 porcs inoculés par voie intramusculaire, 5 porcs témoins non inoculés).

Ce nombre permettra de tester les 4 vecteurs et d'avoir le nombre d'animaux contrôles nécessaire pour visualiser les effets des formulations (ADN sans vecteur, ADN par voie intramusculaire comme témoin positif, porcs non inoculés)

3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier

Juste après le sevrage et l'acclimatation dans la salle d'expérimentation

Page 12

3.4.12. Indiquer le sexe des animaux et le justifier

Mâles et femelles distribués de façon randomisée

3.4.13. Indiquer pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

Ces formulations étaient bien supportées lors des expérimentations sur souris d'après la littérature. Par ailleurs, aucun effet cytotoxique sur cellules n'a été observé dans nos conditions expérimentales. De plus la vaccination à ADN a toujours été bien tolérée dans nos animaleries. Il n'y a à priori pas de risque d'apporter un inconfort aux animaux avec cette méthode. Il n'est donc pas attendu de symptomatologie sévère lors de ces expérimentations. Néanmoins les animaux seront observés quotidiennement. Si toutefois, l'infection conduisait à une altération de l'état de santé, les animaux concernés seront euthanasiés en cas d'atteinte des points limites suivants : non réponse à des stimuli tactiles et visuels, perte d'appétit et de poids (équivalent à 20% sur une période d'une semaine) ou température rectale supérieure à 41,8°C ou inférieure à 36,0°C.

4. Procédures Expérimentales

4.1. Objet(s) visé(s) par les procédures expérimentales

A - La recherche fondamentale Oui

Description des procédures

Nombre de procédures 2

Procédure

Nom de la procédure

Inoculation de l'ADN codant la glycoprotéine B associé avec le chitosan et le PLGA-PEI par voie intranasale

Proposition de classification de la procédure selon le degré de sévérité Classe légère

Description détaillée de la procédure expérimentale

Pertinence et justification de la procédure expérimentale

Page 13

Le chitosan et le PLGA-PEI sont décrits comme permettant la vaccination à ADN par voie intranasale pour d'autres espèces animales (notamment la souris). Par ailleurs, nous avons également réalisé quelques tests in vitro sur des lignées cellulaires qui montrent également que l'ADN plasmidique peut entrer dans les cellules en culture grâce à ces vecteurs et être exprimé dans ces cellules en 72 heures. Mais ces cellules sont loin d'être aussi complexes que les muqueuses nasales porcines. Donc, il est nécessaire d'inoculer de l'ADN plasmidique codant un immunogène fort (la glycoprotéine B du PrV) associé individuellement à ces 2 vecteurs par voie intranasale pour évaluer le pouvoir vectorisant et protecteur de ces 2 vecteurs.

Les animaux seront inoculés à J1, J7 et J14 selon les modalités décrites ci-dessus. Ils seront sacrifiés à J35, soit 3 semaines après la dernière inoculation. Des prélèvements de sang auront lieu de manière hebdomadaire pour mesurer la réponse immunitaire. Un écouvillonnage nasal aura lieu à J28 et J35 pour rechercher des anticorps de type IgA. Des prélèvements de la muqueuse nasale auront lieu aussi après l'abattage des animaux à J35.

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

2 lots de 3 animaux inoculés par l'ADN plasmidique associé au vecteur (chitosan ou PLGA-PEI). Il y aura aussi 3 animaux témoins inoculés avec de l'ADN plasmidique sans vecteur pour mesurer le potentiel bénéfique des vecteurs, 3 animaux inoculés avec l'ADN plasmidique sans vecteur inoculés par une voie connue comme permettant d'induire une forte réponse immunitaire (la voie intramusculaire = contrôle positif d'inoculation) ainsi que 3 animaux non inoculés comme témoins négatifs. L'adjuvant utilisé sera un adjuvant génétique non huileux et non infectieux : un ADN contenant une séquence immunostimulatrice nommée CpG (CpG-ODN) qui a fait ses preuves dans nos essais de vaccination à ADN précédents.

Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés

Nous prélèverons du sang une fois par semaine (30 ml) de J1 à J35. Un écouvillonnage nasal sera réalisé à J28 et J35. Prélèvement de la muqueuse nasale après la mise à mort.

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires... en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Page 14

Aucun effet indésirable n'est attendu. Néanmoins les animaux seront observés après l'inoculation et chaque jour suivant celle-ci pour s'assurer qu'aucun effet indésirable ne survienne. Les conditions d'hébergement seront conformes aux normes réglementaires en vigueur à l'ANSES. A partir du jour du sevrage, les animaux seront élevés en groupe stable. Ils auront accès à de l'eau à discrétion et ils seront alimentés à volonté. Deux lampes chauffantes et une plaque de couchage leur apporteront un confort thermique. Enfin les animaux auront à leur disposition des jouets. Du premier jour au dernier jour de l'essai, les animaux seront examinés au cours d'une visite quotidienne (sauf le week-end). L'examen clinique individuel comprendra : une observation des signes cliniques d'origine respiratoire (toux, éternuements...) sera effectuée au cours de 15 minutes d'observation quotidienne dans chaque animalerie, un relevé de la température rectale de tous les porcs (dans la semaine précédant le début de l'essai (J0) puis toutes les 24 h (sauf week-end) jusqu'à l'autopsie), des observations "visuelles" de l'état de santé général des animaux via le couloir de visite des animaleries, au travers une fenêtre, une fois par jour jusqu'à l'autopsie, une pesée des porcelets (l'évolution pondérale sera obtenue par des pesées individuelles hebdomadaires, à partir de l'installation des animaux dans les animaleries jusqu'à l'autopsie) et la consommation alimentaire sera également évaluée chaque semaine. En cas de non réponse aux stimuli tactiles et visuels, perte d'appétit et perte de poids (20 %), hyperthermie (>41,8°C) ou hypothermie (<36°C), les porcs seront sacrifiés. Si l'état de santé de l'animal le nécessite une intervention médicale ou chirurgicale hors procédure est possible (soins aux animaux blessés accidentellement, mordus, malades,).

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Sans objet, voir ci-dessus

Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

Sans objet

Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

sans objet

Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

Mise à mort Oui

Précisez les animaux concernés

Tous les animaux impliqués seront euthanasiés et les carcasses seront incinérées

Précisez les animaux concernés

Aucun

Précisez les animaux concernés

Page 15

Aucun

Procédure

Nom de la procédure

Inoculation de l'ADN codant la glycoprotéine B associé avec le Chitosan mannosylé et le KLN47

Proposition de classification de la procédure selon le degré de sévérité Classe légère

Description détaillée de la procédure expérimentale

Pertinence et justification de la procédure expérimentale

-Le chitosan mannosylé et le KLN47 sont décrits comme permettant la l'inoculation d'ADN par voie intranasale pour d'autres espèces animales (notamment la souris). Par ailleurs, nous avons également réalisé quelques tests in vitro sur des lignées cellulaires qui montrent également que l'ADN plasmidique peut entrer dans les cellules en culture grâce à ces vecteurs et être exprimé dans ces cellules en 72 heures. Mais ces cellules sont loin d'être aussi complexes que les muqueuses nasales porcines. Donc, il est nécessaire d'inoculer de l'ADN plasmidique codant un immunogène fort (la glycoprotéine B du PrV) associé individuellement à ces 2 vecteurs par voie intranasale pour évaluer le pouvoir vectorisant et protecteur de ces 2 vecteurs.

-Les animaux seront inoculés à J1, J7 et J14 selon les modalités décrites ci-dessus. Ils seront sacrifiés à J35, soit 3 semaines après la dernière inoculation. Des prélèvements de sang auront lieu de manière hebdomadaire pour mesurer la réponse immunitaire. Un écouvillonnage nasal aura lieu à J28 et J35 pour rechercher des anticorps de type IgA. Des prélèvements de la muqueuse nasale auront lieu aussi après l'abattage des animaux à J35

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

2 lots de 3 animaux inoculés par l'ADN plasmidique associé au vecteur (chitosan mannosylé ou KLN47). Pour les témoins, nous pourrions profiter de l'expérience de l'essai 1 et réduire le nombre d'animaux nécessaires. Il y aura aussi 2 animaux témoins inoculés avec de l'ADN plasmidique sans vecteur pour mesurer le potentiel bénéfique des vecteurs, 2 animaux inoculé avec l'ADN plasmidique sans vecteur inoculés par une voie connue comme permettant d'induire une forte réponse immunitaire (la voie intramusculaire = contrôle positif d'inoculation) ainsi que 2 animaux non inoculés comme témoins négatifs. L'adjuvant utilisé sera un adjuvant génétique non huileux et non infectieux : un ADN contenant une séquence immunostimulatrice nommée CpG (CpG-ODN) qui a fait ses preuves dans nos essais de vaccination à ADN précédents.

Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés

Page 16

Nous prélèverons du sang une fois par semaine (30 ml) de J1 à J35. Un écouvillonnage nasal sera réalisé à J28 et J35. Prélèvement de la muqueuse nasale après la mise à mort.

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'anxiété (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Aucun effet indésirable n'est attendu. Néanmoins les animaux seront observés après l'inoculation et chaque jour suivant celle-ci pour s'assurer qu'aucun effet indésirable ne survienne. Les conditions d'hébergement seront conformes aux normes réglementaires en vigueur à l'ANSES. A partir du jour du sevrage, les animaux seront élevés en groupe stable. Ils auront accès à de l'eau à discrétion et ils seront alimentés à volonté. Deux lampes chauffantes et une plaque de couchage leur apporteront un confort thermique. Enfin les animaux auront à leur disposition des jouets. Du premier jour au dernier jour de l'essai, les animaux seront examinés au cours d'une visite quotidienne (sauf le week-end). L'examen clinique individuel comprendra : une observation des signes cliniques d'origine respiratoire (toux, éternuements...) sera effectuée au cours de 15 minutes d'observation quotidienne dans chaque animalerie, un relevé de la température rectale de tous les porcs (dans la semaine précédant le début de l'essai (J0) puis toutes les 24 h (sauf week-end) jusqu'à l'autopsie), des observations "visuelles" de l'état de santé général des animaux via le couloir de visite des animaleries, au travers une fenêtre, une fois par jour jusqu'à l'autopsie, une pesée des porcelets (l'évolution pondérale sera obtenue par des pesées individuelles hebdomadaires, à partir de l'installation des animaux dans les animaleries jusqu'à l'autopsie) et la consommation alimentaire sera également évaluée chaque semaine. En cas de non réponse aux stimuli tactiles et visuels, perte d'appétit et perte de poids (20 %), hyperthermie (>41,8°C) ou hypothermie (<36°C), les porcs seront sacrifiés. Si l'état de santé de l'animal le nécessite une intervention médicale ou chirurgicale hors procédure est possible (soins aux animaux blessés accidentellement, mordus, malades,).

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Sans objet, voir ci-dessus

Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

Sans objet

Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

sans objet

Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

Mise à mort

Oui

Précisez les animaux concernés

Page 17

Tous les animaux impliqués seront euthanasiés et les carcasses seront incinérées

Précisez les animaux concernés

Aucun

Précisez les animaux concernés

Aucun

Annexe #2 : Saisine #2 pour le comité d'éthique



Comité d'éthique Anses/ENVA/UPEC
Enregistré auprès du Comité National de Réflexion
Éthique sur l'Expérimentation Animale
Sous le numéro 16

Monsieur Daniel Dory
Anses laboratoire de Ploufragan-Plouzané
Unité Génétique Virale et Biosécurité
rue de Beaucemaine
22440 PLOUFRAGAN

N° du Dossier : 18-046
N° APAFIS : 201806210855647 (#15614)

N° de l'Avis : 10/07/18-3

Maisons-Alfort, le 10 juillet 2018

Objet : Avis du ComEth Anses/ENVA/UPEC

Monsieur,

Le ComEth Anses/ENVA/UPEC a procédé l'examen de votre projet intitulé « Induction de réponse immunitaire chez le porc après une inoculation d'un vaccin par voie intranasale ». A l'issue de sa réflexion, le ComEth vous informe **que votre projet a reçu un Avis favorable.**

Veillez noter que le présent avis du ComEth est informatif et ne vaut pas autorisation de projet, l'avis définitif sur votre projet vous sera rendu par le Ministère chargé de la recherche

Veillez croire, Monsieur, en l'expression de nos salutations distinguées.

Le secrétariat du ComEth Anses/ENVA/UPEC

Anses-Direction des Laboratoires
14 rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex
Président : François Lachapelle
Secrétaire : Florence Lavissière
Tel : 01 49 77 22 31
Courriel : cometh@anses.fr



ComEth Anses/ENVA/UPEC

Réunion du 10 juillet 2018

Saisine 18-046 : Induction de réponse immunitaire chez le porc après une inoculation d'un vaccin par voie intranasale

Rapporteur 1 :

La vaccination par voie intra-nasale est utilisée pour protéger les animaux contre les pathogènes qui pénètrent dans l'organisme par cette voie. Récemment, les vaccins à ADN ont été développés ; ils n'utilisent pas directement l'agent infectieux et sont donc plus sûrs. La problématique est que l'ADN est détruit rapidement au contact de la muqueuse nasale. Il faut donc l'associer à un vecteur qui le protège de la dégradation.

L'objectif du projet est d'évaluer le potentiel immunisant d'un plasmide codant la glycoprotéine B du virus de la pseudorage porcine (la gB est connue comme étant fortement immunogène dans nos conditions expérimentales) lorsqu'il est associé à chacune des 4 formulations identifiées précédemment et inoculé par la voie intranasale.

Les 4 vecteurs ont été validés *in vitro* avant l'essai.

Il n'y a pas de lignée cellulaire équivalente à la complexité de la muqueuse nasale porcine permettant le remplacement de cette étude.

Animaux : 27 porcs au total - 3 porcs inoculés avec de l'ADN associé avec chacun des 4 vecteurs par voie intranasale (soit au total 12 porcs), 5 porcs inoculés avec l'ADN sans vecteur par voie intranasale, 5 porcs inoculés par voie intramusculaire, 5 porcs témoins non inoculés.

Ce nombre permettra de tester les 4 vecteurs et d'avoir le nombre d'animaux contrôles nécessaire pour visualiser les effets des formulations (ADN sans vecteur, ADN par voie intramusculaire comme témoin positif, porcs non inoculés)

Age : juste après le sevrage et l'acclimatation dans la salle d'expérimentation,

Sexe : mâles et femelles distribués de façon randomisée

Deux procédures qui sont en fait les mêmes mais ne diffèrent que par la nature du vecteur testé et le nombre de témoins.

Groupe	Procédure 1	Procédure 2
Vecteur 1 - chitosan	3	
Vecteur 2 - PLGA-PEI	3	

Vecteur 3 - Chitosan mannosylé		3
Vecteur 4 - KLN47		3
Plasmide IM (+)	3	2
ADN sans vecteur	3	2
Témoin négatif	3	2
TOTAL	15	12

Procédure 1 : Inoculation de l'ADN codant la glycoprotéine B associé avec le chitosan et le PLGA-PEI par voie intranasale

Procédure 2 : Inoculation de l'ADN codant la glycoprotéine B associé avec le Chitosan mannosylé et le KLN47

Dans les deux cas, les animaux seront inoculés à J1, J7 et J14 par voie intra-nasale. Ils seront sacrifiés à J35.

Classe légère

Des prélèvements de sang (30 ml) auront lieu de manière hebdomadaire pour mesurer la réponse immunitaire.

Un écouvillonnage nasal aura lieu à J28 et J35 pour rechercher des anticorps de type IgA. Des prélèvements de la muqueuse nasale auront lieu aussi après l'abattage des animaux à J35.

A priori, les formulations testées ne devraient pas entraîner d'effets indésirables, car rien n'a été décrit en ce sens dans les publications sur d'autres espèces animales ; les demandeurs n'ont pas mesuré d'effets cytotoxiques sur des cellules en culture dans les conditions expérimentales in vitro. Les animaux seront observés quotidiennement.

Si l'infection conduisait à une altération de l'état de santé, les animaux concernés seront euthanasiés en cas d'atteinte des points limites suivants : non réponse à des stimuli tactiles et visuels, perte d'appétit et de poids (équivalent à 20% sur une période d'une semaine) ou température rectale supérieure à 41,8°C ou inférieure à 36,0°C.

Mise à mort par anesthésie au Zolétil 100 puis saignée.

Conclusion : en attente des réponses aux questions

Remarques et questions pour les demandeurs :

1/ RNT : Merci de corriger la phrase « Notre objectif est de développer la vaccination à ADN par voie intranasale chez le porc pour induire une protection immunitaire vis-à-vis de pathogènes porcins contaminant le porc par la voie nasale ».

Le RNT ci-joint a été modifié en conséquence. (Voir ci-dessous)

2/ Pourquoi avoir choisi un ADN connu pour induire une forte réponse immunitaire ?

Le but de l'essai est de pouvoir identifier les vecteurs qui permettront à l'ADN vaccinal d'être pris en charge par le système immunitaire au niveau des muqueuses. Comme on ne connaît pas pour l'instant l'efficacité de ces vecteurs chez le porc, il est important que l'ADN vaccinal induise une forte réponse immunitaire de manière à se donner le maximum de chance de mesurer un signal, même si le vecteur n'est pas très efficace.

3/ Pages 10 et 13, vous écrivez : « Néanmoins les animaux seront observés quotidiennement. Si toutefois, l'infection conduisait à une altération de l'état de santé, les animaux concernés seront euthanasiés en cas d'atteinte des points limites suivants : non réponse à des stimuli tactiles et visuels, perte d'appétit et de poids (équivalent à 20% sur une période d'une semaine) ou température rectale supérieure à 41,8°C ou inférieure à 36,0°C. »

Je suppose que cette remarque est en relation avec le point 4.

4/ Vous ne décrivez pas pesée ou de prise de température dans le suivi des animaux, seulement une observation. Si elles ont lieu, quand se feront-elles ? Si elles n'ont pas lieu, il faut revoir les critères du point limite.

Effectivement, la remarque 3 sur les critères du point limite n'a pas de sens si on n'indique pas que ces mesures sont réalisées. Les pesées auront lieu de manière hebdomadaire et les prises de température seront effectuées de manière quotidienne, sauf le week-end.

5/ Quelle sera la méthode de contention pour réaliser les prélèvements sanguins et écouvillons ? Contention chimique ? Physique ?

Ce sera avec une méthode de contention physique.

6/ Page 15 : « Les conditions d'hébergement seront conformes aux normes réglementaires en vigueur à l'ANSES. » Ceci ne dit pas si les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation française et européenne ... qu'en est-il ?

Les normes réglementaires en vigueur à l'ANSES sont conformes à la réglementation française et européenne.

7/ Page 17 : « Du premier jour au dernier jour de l'essai, les animaux seront examinés au cours d'une visite quotidienne (sauf le week-end). » Qu'entendez-vous par examen ? Sans subir un véritable examen clinique, les animaux feront ils néanmoins l'objet d'une observation le week-end ?

Par examen on entend une observation du comportement des animaux, l'apparition ou non de symptômes anormaux (toux, diarrhées, ...), la prise de température quotidienne et la pesée hebdomadaire. Le week-end, les animaux seront observés à travers la vitre de l'animalerie.

8/ pour les groupes d'animaux, vous indiquez qu'il faut 3 animaux par groupe. Or si j'ai bien compté, vous aurez en tout 5 animaux pour les groupes contrôles (injection IM, ADN sans vecteur et témoin négatif). Ai-je mal compris ? sinon, pouvez-vous justifier ?

Les formulations ADN vaccinal / vecteur sont complexes à produire, c'est pourquoi nous ne pouvons les étudier que 2 par 2. Lors de la première procédure où 2 vecteurs seront testés, nous allons avoir l'ensemble des contrôles avec le même nombre d'animaux dans chaque groupe, c'est-à-dire 3. Ainsi nous pourrons bien comparer les choses comparables. Lors de la seconde procédure où les 2 autres vecteurs seront évalués, nous avons besoin de contrôles également. Mais nous pouvons réduire légèrement le nombre d'animaux dans ces 3 groupes contrôles à 2 animaux par groupe car nous aurons en référence les résultats des contrôles de la procédure 1 et cumuler les résultats des contrôles des 2 procédures, ce qui fait au total 5 animaux par groupe contrôle sur l'ensemble des 2 procédures.

RNT revu :

Induction de réponse immunitaire chez le porc après une inoculation d'un vaccin à ADN par voie intranasale

La vaccination par la voie intranasale vise à protéger les animaux contre un pathogène qui pénètre dans l'organisme par cette voie. Cette stratégie vaccinale présente en outre l'avantage d'être non invasive (pas d'aiguille) et peut être envisagée en cas de vaccination de masse d'un troupeau. La vaccination à ADN est une alternative vaccinale récemment découverte qui présente l'avantage de ne pas utiliser un agent infectieux, ce qui est bénéfique pour la biosécurité vaccinale. Dans ce cas, le vaccin est composé d'une molécule d'ADN codant la protéine vaccinale. Si on administre ce type de vaccin tel quel par voie intranasale, il sera rapidement détruit par certains composants de la muqueuse. C'est pourquoi il doit être transporté par un vecteur qui le protégera de la dégradation et lui permettra en sus d'atteindre son lieu d'action.

Notre objectif est de développer la vaccination à ADN par voie intranasale chez le porc pour induire une protection immunitaire vis-à-vis de pathogènes porcins contaminant le porc par la voie nasale. Dans un premier temps, nous avons sélectionné 4 vecteurs déjà utilisés dans le cadre de la vaccination à ADN par voie intranasale, mais pour d'autres espèces animales que le porc. Puis nous

3

avons vérifié in vitro que ces vecteurs sont bien actifs pour véhiculer l'ADN dans des cellules en culture.

Ces 4 vecteurs doivent maintenant être évalués pour leurs capacités à permettre au vaccin ADN d'induire une réponse immunitaire chez le porc suite à une inoculation par voie intranasale. Pour cela, un ADN plasmidique vaccinal connu pour induire une forte réponse immunitaire chez le porc, le plasmide codant la glycoprotéine B du virus de la pseudoréprotection porcine, sera associé à chacun de ces 4 vecteurs et sera ainsi administré à des porcs par voie intranasale à 3 reprises, à une semaine d'intervalle. Il est à noter que l'administration de ce plasmide n'entraîne aucune réaction adverse chez le porc. Les réponses immunitaires seront recherchées jusqu'à au moins 3 semaines après la dernière inoculation. A la suite de ces investigations, un essai de protection vaccinale proprement dit pourra être réalisé à l'aide du vecteur le plus efficace identifié ici.

Les vecteurs seront évalués au cours de deux procédures expérimentales qui seront menées dans le respect de la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique (au total N=27 animaux) ainsi que le raffinement des conditions d'hébergement. Ces mesures de raffinement viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant l'angoisse potentielle des animaux (eau et nourriture à volonté, lampes chauffantes, jouets, etc.). En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable, les animaux utilisés étant nécessaires pour évaluer l'immunogénicité d'un vaccin inoculé par la voie nasale chez le porc. Il n'existe pas en effet de lignée cellulaire pouvant imiter la complexité du système immunitaire porcine.

Annexe #3 : Plan de management qualité de la thèse.



Plan de Management Qualité de la Thèse

Laurent Souci

« Vaccination à ADN mucosale chez le porc : efficacité et biosécurité »

ANSES – Laboratoire de Ploufragan-Plouzané

Unités « Génétique Virale et Biosécurité » (U GVB)

➤ Directeur de thèse : **D. Dory**

➤ Chef de Projet : **D. Dory**

Rédigé par : L. Souci Date :	Approuvé par : D. Dory Date :	Validé par : M. MORIN Date :
Visa :	Visa :	Visa :

Sommaire

I - Introduction

II – Le champ du plan de management qualité

III – La politique de management qualité du laboratoire et de l'unité

IV – Les acteurs du projet

V-A) Le directeur de thèse

V-B) Le chef de projet

V-C) Le comité de pilotage de la thèse

V-D) Le doctorant

V-E) Les ressources humaines du laboratoire de Ploufragan/Plouzané

V-F) Le responsable du service management qualité (SMQ)

V – La conduite du projet

V-A) Un projet formalisé

V-B) Des étapes de révision

V-C) La traçabilité assurée

V-D) Des revues du système de management de la qualité

V-E) Des contrôles pour la qualité du résultat final

V-F) Un processus de management de risques

V-G) Une revue complète des résultats lors de la clôture du projet

VI – Les équipements

VII – Les consommables

VIII – Les locaux

IX – Le coût

X – La gestion des écarts

X-A) Les non-conformités

X-B) Les non-confirmations

XI – La communication

I - Introduction

En se référant à la norme ISO 9000 (version 2005), l'assurance qualité est définie comme une partie du management visant à donner confiance en ce que les exigences pour la qualité seront satisfaites. L'assurance qualité permet suite à l'évaluation par un tiers d'avoir une reconnaissance et une garantie de l'intégrité et la fiabilité des résultats de recherche ainsi que de l'appui scientifique et technique du projet.

Une politique de management qualité définie par la Directrice Générale de l'ANSES le 5 janvier 2006 est conduite par l'ANSES. Celle-ci vise à développer la mise sous assurance qualité des travaux de recherche et plus particulièrement des thèses de doctorat. De ce fait, pour chaque projet de thèse réalisé à l'ANSES, un plan de management de la qualité doit être défini puis appliqué. Sa mise en application sera effective à partir du 3 juillet 2017.

Le document ci-présent est le plan de management qualité (PMQ) concernant le projet de thèse intitulé « Vaccination à ADN mucosale chez le porc : efficacité et biosécurité ». Ce projet a été défini par le directeur de thèse et sera réalisé et clôturé par le doctorant. Un management qualité au niveau de la gestion de ce projet permettra de vérifier le bon déroulement de celui-ci par la planification, l'organisation, le suivi, la maîtrise et les rapports des différents aspects relatifs au projet.

Le management qualité de ce projet de thèse s'appuiera sur les deux normes suivantes :

- ✓ **La norme ISO10006** : « Système de management de la qualité – Lignes directrices pour le management de la qualité dans les projets » pour l'établissement et la mise en œuvre du plan management qualité.
- ✓ **La norme ISO17025** : « Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essai » pour la gestion des ressources.

Les mots clés caractérisant ce projet sont: **traçabilité, planification, gestion des ressources, révision.**

II - Le champ du plan qualité

Le plan management qualité ci-présent s'applique pour la totalité du projet de thèse et se compose de trois parties :

- L'élaboration du projet scientifique,
- La conduite scientifique du projet,
- La valorisation des résultats obtenus et la clôture du projet.

Celui-ci concerne les travaux réalisés dans l'unité « Génétique Virale et Biosécurité » : laboratoire d'accueil pour la réalisation du projet ayant un système de management qualité ainsi que tous les autres collaborateurs du site même de l'ANSES ou extérieurs inscrits dans une démarche qualité.

III - La politique de management qualité du laboratoire et de l'unité

La politique de management qualité conduite à l'ANSES de Ploufragan/Plouzané vise à formaliser l'application au niveau local de la déclaration de politique qualité comme souhaité par la direction générale de l'ANSES.

A cet effet, un Service Management Qualité (SMQ) a été mis en place afin de contrôler et d'assurer la mise en œuvre d'une politique de management qualité pour l'ensemble des unités de recherche et des services du laboratoire.

Le SMQ est constitué par :

- Un responsable qualité
- Un responsable qualité adjoint
- Un responsable en métrologie
- Une secrétaire

A ce jour, cinq unités du site de Ploufragan/Plouzané sont accréditées par le COFRAC (comité français d'accréditation) au titre de la norme ISO 17025 :

- Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins (U HQPAP)
- Virologie, Immunologie, Parasitologie Aviaires et Cunicoles (U VIPAC)
- Virologie, Immunologie Porcine (U VIP)
- Mycoplasmologie, Bactériologie (U MB)
- Pathologie Virale des Poissons (U PVP, Plouzané)

Un management en qualité a été développé dès 2004 au sein l'Unité Génétique Virale et Biosécurité (U GVB) afin de pouvoir assurer la rigueur, la fiabilité et la reconnaissance des résultats de l'unité. Un correspondant qualité a été nommé par le chef d'unité et ce, afin d'élaborer et réviser les modes opératoires et les procédures spécifiques à l'unité mais aussi d'élaborer et réviser le Plan Qualité de l'unité.

La documentation qualité de l'ANSES de Ploufragan/Plouzané comprend le Manuel d'Assurance Qualité (MAQ), les plans qualité de chaque unité, les procédures, les modes opératoires et les supports d'enregistrement. La gestion d'un projet au sein de l'ANSES de Ploufragan/Plouzané est décrite par la procédure P.ESS.P1 et s'applique notamment au management des thèses avec pour référence la norme ISO10006.

Une gestion du système documentaire qualité est assurée dans l'unité et concerne les documents qualifiés de l'unité ainsi que ceux relatifs au projet de thèse. La rédaction du Plan Management Qualité s'inscrit dans la politique qualité menée par l'unité UGVB. Son rôle est de formaliser au mieux le processus liés à l'organisation de la thèse afin d'assurer la qualité finale des travaux de recherche effectués.

IV – Les acteurs du projet

Il convient d'énumérer les acteurs du projet et de définir leur rôle respectif dans ce plan de management de la qualité du projet de thèse.

Le projet de thèse qui va être réalisé au cours de ces trois prochaines années (2017-2019) est une thèse sans cotutelle. Le doctorant est encadré par un directeur de thèse et par un chef de projet. Les relations entre les différents acteurs du projet sont définies dans l'organigramme de thèse (Annexe 1).

✓ A. Le directeur de thèse

Le directeur de thèse est le docteur Daniel Dory, responsable de l'équipe « vaccination à ADN nu » au sein de l'unité UGVB. Le rôle attribué au responsable de thèse est d'encadrer le doctorant en assurant le bon déroulement de l'apprentissage du doctorant et d'apprécier régulièrement l'avancée et la qualité des travaux menés.

✓ B. Le chef de projet

Le docteur Daniel Dory tient également le rôle de chef de projet. Conformément à la norme ISO 10006, un chef de projet est une personne ayant des responsabilités ainsi que l'autorité nécessaire pour diriger le projet et assurer que le système de management de la qualité du projet est appliqué, respecté et maintenu par les acteurs du projet.

✓ C. Le comité de pilotage de la thèse

La fonction du comité de pilotage de thèse est d'assurer une analyse critique de l'avancée du projet de thèse et permet de conseiller le directeur de thèse ainsi que son doctorant sur la poursuite du projet.

Trois personnes constituent ce comité de pilotage :

- Le Pr Tristan Montier (Professeur des Universités, Praticien hospitalier au CHRU de Brest et Directeur de la plateforme SynNanoVect)
- Le Dr Guillaume Bastiat (Maître de conférences à l'université d'Angers et chercheur dans l'UMR Inserm 1066 - CNRS 6021)
- Le Dr Daniel Dory (Directeur de la thèse, Chargé de recherche responsable de l'équipe vaccination à ADN nu à l'ANSES de Ploufragan/Plouzané dans l'unité Génétique Virale et Biosécurité)

✓ **D. Le doctorant**

Le Doctorant est recruté pour effectuer les activités liées à ce projet de thèse. En début de thèse, le doctorant va suivre les orientations, conseils et consignes de son directeur de thèse puis devra adopter de lui-même une position critique (au sens du débat constructif) et ce, afin de prendre progressivement une position d'acteur dans la conduite de sa propre recherche. En fin de thèse, il doit être devenu un chercheur opérationnel et autonome. Le contrat de recrutement comporte un engagement de confidentialité.

Comme spécifié par l'école doctorale VAS, le doctorant s'engage dans la charte des thèses à suivre tout au long du projet des formations de l'école doctorale telles que des enseignements, des conférences et séminaires.

Dans la limite de ses moyens financiers et de ses propriétés, l'ANSES s'engage à permettre au doctorant de suivre des formations dans le cadre du projet. A ce but, le doctorant remplit une fiche de vœux qui permettra l'élaboration du programme de formation de l'année suivante.

✓ **E. Les ressources humaines du Laboratoire de Ploufragan/Plouzané**

En se référant à la norme ISO 9000 ainsi qu'au troisième principe du management qualité, le rôle du personnel est défini de la façon suivante :

« Le personnel à tous les niveaux constitue l'essence même d'une organisation et une totale implication de leur part permet d'utiliser leurs aptitudes au profit de l'organisme »

Le personnel du Laboratoire de Ploufragan/Plouzané est compétent et sensibilisé à l'assurance de la qualité. Pour chaque personnel, il est rempli une fiche personnelle qui permet définir les responsabilités et les compétences de chacun d'entre eux. Chaque année, le personnel remplit une fiche de vœux de formation.

✓ **F. Le responsable du service management qualité (SMQ)**

Monsieur Michel Morin assure le rôle de responsable du service management qualité (SMQ) et représente la direction pour le suivi du management qualité de la thèse (audit interne) afin d'encadrer la formulation du plan management qualité (PMQ) de thèse et de vérifier l'application de ses dispositions. Celui-ci est secondé par les correspondants qualité et métrologie de l'unité afin de vérifier la réalisation des mesures prises par le doctorant.

V - La conduite du projet

A. Un projet formalisé

Le projet scientifique est formalisé selon la fiche de définition de projet ayant pour intitulé « **Vaccination à ADN mucosale chez le porc : efficacité et biosécurité** ». L'objectif de cette thèse est de développer les outils nécessaires à la vaccination à ADN sous-unitaire par la voie mucosale chez le porc et d'évaluer le devenir du vaccin ainsi que les réponses immunitaires induites.

✓ Les cinq étapes établies et révisables si besoin au cours du projet sont les suivantes :

- Phase 1 : Analyse bibliographique, identification des formulations potentielles.
- Phase 2 : Production et évaluation *in vitro* des formulations retenues.
- Phase 3 : Caractérisation du ciblage *in vivo*.
- Phase 4 : Evaluation *in vivo* des réponses immunitaires contre le virus de la pseudorage porcine induites par un vaccin à ADN inoculé par la voie intranasale.
- Phase 5 : Rédaction du mémoire de thèse.

Le planning ci-dessous définit les différentes phases du projet de thèse et la durée estimée pour les différentes phases. La période de rédaction du mémoire de thèse y est prise en compte.

Tâches	Trimestre												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Phase 1 : Analyse bibliographique, identification des formulations potentielles.													
Phase 2 : Production et évaluation <i>in vitro</i> des formulations retenues.													
Phase 3 : Caractérisation du ciblage <i>in vivo</i> des différentes formulations.													
Phase 4 : Evaluation du potentiel vaccinal des formulations													
Phase 5 : Rédaction du mémoire de thèse													

La documentation scientifique et technique du projet est disponible au laboratoire de l'UGVB pour l'ensemble des acteurs du projet. Qu'elles soient standardisées ou non (nouvelles méthodes) au sein de l'unité UGVB, les différentes méthodes expérimentales utilisées au cours de ce projet sont consignées par le doctorant dans les cahiers de laboratoire spécifiques au projet (cf. V.C).

B. Des étapes de revue

Au cours de l'avancement de la thèse, le planning préétabli, le contenu et les objectifs scientifiques du projet ainsi que le Plan Management Qualité (PMQ) ci-présent peuvent être

révisables, si cela est nécessaire. Le doctorant est source de propositions d'évolution du projet et ce rôle doit s'affirmer par des étapes de révision au cours de l'avancement de la thèse.

✓ **Etapes de révision envisagées au début de projet :**

- Les **audits internes** de la thèse, à des intervalles de un et deux ans après le début de la thèse. Leur rôle est d'évaluer le respect des dispositions décrites dans ce PMQ. Si un écart existe ou est constaté, le projet pourra en conséquence être révisé.
- Les **réunions de travail** régulières avec le directeur de thèse et/ou l'équipe où les résultats sont présentés et discutés. Elles peuvent aboutir à une révision du projet le cas échéant.
- Les **réunions avec le comité de pilotage de thèse** où l'avancement du projet est discuté avec les membres du comité. Les axes de réflexions à prendre pour la suite sont évoqués au cours de la réunion. A l'issue de chaque comité, un compte-rendu est réalisé par le chef de projet ou bien par le doctorant. Il est ensuite diffusé à chacun des acteurs et archivés.

Toutes les propositions de modifications souhaitées par le doctorant seront discutées avec le chef de projet et vice-versa. En dernière instance, le chef de projet décide des modifications à apporter au projet. En cas de désaccord persistant avec le doctorant, le comité de pilotage arbitre la prise de décision.

C. La traçabilité assurée

Un cahier de laboratoire est tenu par le doctorant dans l'unité GVB afin d'assurer la traçabilité des différents travaux réalisés tout au long du projet. Celui-ci est propriété de l'unité.

Le contenu de ces cahiers comprend :

- La date et l'intitulé des travaux.
- La description des travaux réalisés, tout au long de leur avancement.
- Les numéros de lots des consommables critiques.
- Les hypothèses de travail développées.
- Les analyses, critiques et commentaires sur les manipulations expérimentales effectuées et sur les résultats de recherche obtenus.
- Les réflexions visant à modifier les manipulations et/ou à améliorer les résultats constatés.
- Le référencement des documents associés qui ne peuvent être intégrés au cahier (données informatiques...)
- Les comptes rendus concis des réunions avec le directeur. La prise de note pendant les réunions est réalisée sur un cahier spécialement dédié aux réunions.

- ✓ Les variables potentiellement imputables aux matériels, locaux et consommables utilisés sont maîtrisées grâce à des procédures prédéfinies (cf. parties VI, VII et VIII).

Au sein de l'unité GVB, afin d'assurer une bonne traçabilité, chaque équipement est attribué à une salle spécifique. Leur emplacement est spécifié dans le plan qualité de l'unité. De ce fait, il n'est pas nécessaire d'indiquer systématiquement le numéro d'inventaire de l'équipement utilisé à l'exception faite pour les changements non indiqués dans le plan qualité.

- ✓ **Micropipettes** : répartition par salle comme indiqué dans l'annexe 4. La réalisation d'une expérience dans une salle implique donc l'utilisation des micropipettes qui y sont associées.
- ✓ **Idem pour les autres matériels** : PSM, centrifugeuse, étuves, appareils de PCR, luminomètre, séquenceur

Dans le cadre de ce projet de thèse, les manipulations ne nécessitant pas de salle spécifique seront réalisées en salle F06204.

Par ailleurs, les données (résultats de Western Blot, d'électrophorèse ...) relatives aux résultats expérimentaux de la thèse sont enregistrées, dans la mesure du possible, sous forme informatique. Chaque personnel de l'ANSES de Ploufragan/Plouzané possède sa propre session informatique et dispose d'un serveur réseau privé (P:\). Les données informatiques du doctorant seront archivées sur celui-ci.

D- Des revues du système de management de la qualité

Elles peuvent être définies par les deux normes suivantes :

- **Norme ISO 10006 (partie 5.3)** : « il convient que la direction de l'organisme en charge du projet effectue des revues du système de management de la qualité à des intervalles planifiés pour assurer qu'il demeure pertinent, adéquat, efficace et efficient ».
- **Norme ISO/IEC 17000 de 2004** : « un audit interne est un processus systématique, indépendant et documenté, permettant d'obtenir des enregistrements, des énoncés de faits ou d'autres informations pertinentes, et de les évaluer de manière objective pour déterminer dans quelle mesure les exigences sont respectées ».

Dans le cadre de la thèse, un audit interne sur les engagements du présent plan de management qualité de la thèse est réalisé par le responsable qualité du Laboratoire de Ploufragan/Plouzané. Celui-ci a lieu à l'issue de la première et de la seconde année de thèse et est réalisé selon la procédure déterminée par l'ANSES de Ploufragan/Plouzané. Sa finalité est d'examiner les processus en lien avec les acteurs, de vérifier leur efficacité et de rechercher des améliorations potentielles. A la fin, un rapport de l'audit est rédigé puis communiqué aux membres du comité de thèse.

E - Des contrôles pour la qualité du résultat final

Le management de projet est destiné à assurer la fiabilité des résultats finaux. Le doctorant est soucieux de la qualité des résultats en indiquant tout au long des processus les témoins de contrôles utilisés. Ceux-ci peuvent être de nature positive ou négative.

F - Un processus de management de risques

D'après la norme ISO 10006, le terme risque considère, comme le terme incertitude, les aspects à la fois positifs et négatifs. Le management des risques du projet traite des incertitudes de nature scientifique ou technique qui peuvent intervenir tout au long du projet de thèse. Une fiche spécifique (Annexe 3) répertorie les points critiques du projet général. Celle-ci est rattachée au cahier de laboratoire et permet de suivre l'évolution du projet. Une étape de revue peut être nécessaire si de nouveaux points critiques sont rencontrés au cours de la thèse ou bien si certains points critiques restent non résolus.

G - Une revue complète des résultats lors de la clôture du projet

La clôture du projet de thèse s'effectue par la rédaction d'un mémoire de thèse et par une soutenance devant un jury. Lors de cette phase, il y a intervention des différents acteurs du projet pour d'un côté prendre en compte les résultats ayant une certaine pertinence et de l'autre côté retirer ceux qui sont non pertinents. Le jury sera amené à valider les résultats et le mémoire de thèse du doctorant. Il disposera d'un bilan du management qualité de la thèse rédigé par le responsable Qualité du Laboratoire Ploufragan/Plouzané. Les enregistrements issus de cette revue pourront permettre de faire ressortir les éléments susceptibles d'être utilisés dans d'autres projets.

VI - Les équipements

Les équipements de l'unité GVB sont gérés selon les plans qualité des unités en référence à la norme ISO 17025. L'inventaire et le suivi des équipements sont formalisés par une gestion planifiée et maîtrisée. Ainsi chaque matériel est identifié à l'aide d'une codification et dispose d'une fiche d'inventaire, de suivi du matériel, de mode opératoire et d'emploi du fabricant et d'un dossier de vie. Chaque appareil est sous la responsabilité d'une personne et d'un suppléant.

La fonction métrologie a pour but de maîtriser en permanence l'aptitude à l'emploi des moyens de mesure ou d'essai dans le laboratoire.

Il existe deux types de vérifications périodiques :

- **Vérifications de type interne** : en collaboration avec le correspondant métrologique de l'unité, les agents de l'unité effectuent les vérifications de matériels soumis à des contrôles métrologiques (micropipettes, balances et pHmètre). Par ailleurs, les variations des températures des enceintes thermostatées (étuves, réfrigérateurs,

congélateurs et surgélateurs) sont enregistrées par une centrale de mesure de température au sein de l'ANSES de Ploufragan-Plouzané.

- **Vérifications de type externe :** certains matériels nécessitent des opérations de maintenance et/ou des réparations qui sont assurées par des prestataires de services (cf. procédure P.MAT.G16). Celles-ci sont généralement réalisées dans le cadre d'un contrat d'entretien afin de prévenir tout dysfonctionnement ou anomalies.

VII - Les consommables

Les consommables sont gérés selon le plan qualité de chaque unité en référence à la norme ISO 17025.

Les produits consommables peuvent être de deux types :

- Les produits acquis à l'extérieur (antibiotiques, additifs, produits chimiques, colorants, matériel plastique à usage unique, produits spécifiques à la biologie moléculaire, produits radioactifs, produits biologiques, kits, produits d'entretien, de désinfection, fluides).
- Les produits fabriqués dans l'unité.

Dans chaque unité, des procédures décrivent les modalités de gestion des consommables. A cet effet, les procédures P.PQ9.CON.G2 et P.PQ9.CON.G1 sont mises en application au sein de l'unité GVB.

Les consommables fabriqués au sein des unités tels que les milieux de culture comportent les dates de fabrication, de péremption ainsi que le numéro de l'autoclave utilisé s'il y a lieu afin de s'assurer de leur bonne utilisation.

La qualité des consommables est évaluée à leur arrivée par le personnel présent à la réception.

Les consommables sont tracés par des numéros de lot. Afin d'en assurer leur traçabilité, à chaque réception, une référence interne leur est attribuée. Dans le cas du projet, les consommables critiques, en fonction de leur utilisation, sont tracés dans le cahier de laboratoire du doctorant. Les consommables critiques sont les consommables de nature chimique ou biologique qui peuvent influencer sur la qualité du résultat. En revanche, les contenants et les accessoires ne sont pas tracés.

Dans le cadre de la délégation de responsabilité de marché, des procédures indiquant les règles de mise en concurrence des fournisseurs ont été décidées :

- ✓ P.MAT.G1 pour le choix des fournisseurs de matériels.
- ✓ P.CON.G3 pour le choix des fournisseurs de consommables.

Les prestations des fournisseurs de matériels et de consommables doivent être évaluées pour valider l'aptitude de ces derniers à fournir un matériel et/ou un produit conforme aux exigences de l'ANSES. Deux autres procédures régissent l'organisation des évaluations :

- ✓ P.MAT.G5 pour l'évaluation des fournisseurs de matériels.
- ✓ P.CON.G5 pour l'évaluation des fournisseurs de consommables.

Le résultat de ces évaluations des fournisseurs de matériels et de consommables est utilisé comme critère pertinent pour la sélection de ces fournisseurs.

VIII - Les locaux

L'unité GVB est installée dans le bâtiment F06 sur le site des Croix. L'accès aux bâtiments est contrôlé au moyen d'un digicode sur les portes d'accès extérieures. Le personnel de l'ANSES possède un badge magnétique afin d'activer celui-ci. Pour le cas des visiteurs, un registre à l'accueil permet d'identifier les personnes autorisées à pénétrer dans les locaux. Les personnes accédant aux locaux de l'unité GVB doivent obligatoirement procéder à un changement complet de vêtements.

Les bâtiments présentent la particularité d'être en dépression par rapport à l'extérieur et possèdent une climatisation associée à un système de ventilation d'air filtré. L'aménagement des unités est organisé de façon à avoir des salles spécifiques à certaines activités expérimentales (par exemple salle PCR, salle ARN, salle culture cellulaire ...). Le plan des locaux de l'unité GVB est indiqué dans l'Annexe 4.

L'accès aux animaleries protégées et salles d'autopsie du SPPAE sont formalisées selon des procédures spécifiques.

IX - Le coût

Le projet a une durée de trois ans à compter du 1^{er} Janvier 2017. Il est financé par l'ANSES sur fonds propres. Le budget estimé est de 15000 euros par an pour les consommables et de 100 000 euro environs pour les trois essais prévus en animalerie. Il y aura dans la mesure du possible un suivi des coûts dans la cadre des revues du projet.

X - La gestion des écarts

A. Les non-conformités

Selon la norme ISO 9000, une non-conformité est une non-satisfaction d'une exigence du système qualité et/ou d'exigences convenues.

Le terme « non-satisfaction des exigences » peut concerner :

- Des non-conformités de produit qui conduisent à des produits ou services non conformes.
- Des non-conformités de système de management de la qualité qui ne permettent plus d'orienter et de contrôler l'organisme en matière de qualité.
- Des non-conformités qui entérinent le non-respect des exigences prédéfinies des parties intéressées.

Lorsque des non-conformités sont constatées, celles-ci sont consignées sur une fiche de non-conformité qui donne lieu à des actions curatives, correctives et/ou préventives et qui est gérée par la procédure générale P.ACT.A1. En ce qui nous concerne, les non-conformités concernent principalement la mauvaise qualité des produits utilisés ou bien tout simplement le fonctionnement de matériel.

Les non-confirmations

Le terme non-confirmations inclut les hypothèses invalidées, les résultats non confirmés par les expériences ultérieures ou bien les résultats non reproductibles. Le cas échéant, ces non-confirmations sont discutées avec le directeur de thèse puis consignées dans le cahier de suivi. Si cela est nécessaire, une revue de projet peut être réalisée suite à une non-confirmation.

La communication

Valorisation et diffusion des résultats :

Le projet de thèse sera valorisé en premier lieu par la rédaction d'un mémoire de thèse. Par ailleurs, le doctorant rédigera au cours de sa thèse des publications scientifiques à comité de lecture avec au moins un manuscrit de revue (synthèse bibliographique) et un manuscrit avec des résultats originaux. Les résultats pourront être présentés sous forme de posters ou bien de présentations orales lors de congrès nationaux ou internationaux.

Gestion de l'information entre les acteurs :

Des réunions sont organisées tout au long du projet afin de pouvoir discuter et surtout partager les différents acteurs du projet des résultats obtenus, de l'avancement du projet, des thèses avancées et des éventuels écarts.

Il existe différents types de réunions avec pour chacune un objectif prédéfini :

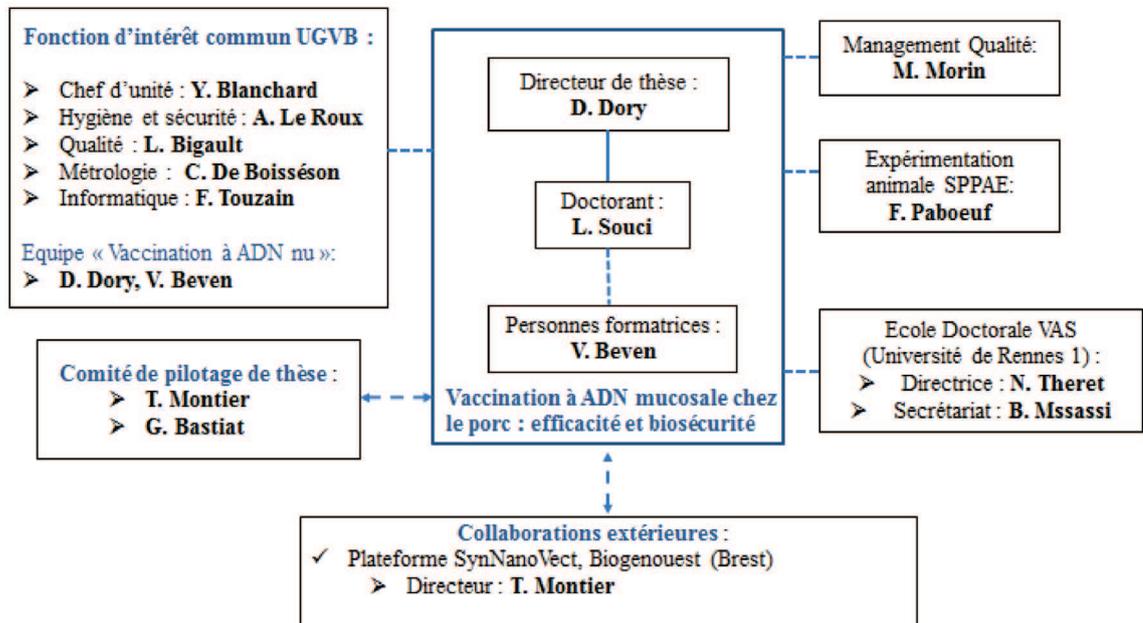
- **Réunions avec le directeur de thèse :** l'avancement du projet et les résultats des manipulations expérimentales ainsi que les conclusions qui s'y rapportent y sont discutés. Ces réunions auront lieu de façon régulière. Des comptes rendus concis

seront rédigés dans un cahier dédié aux réunions.

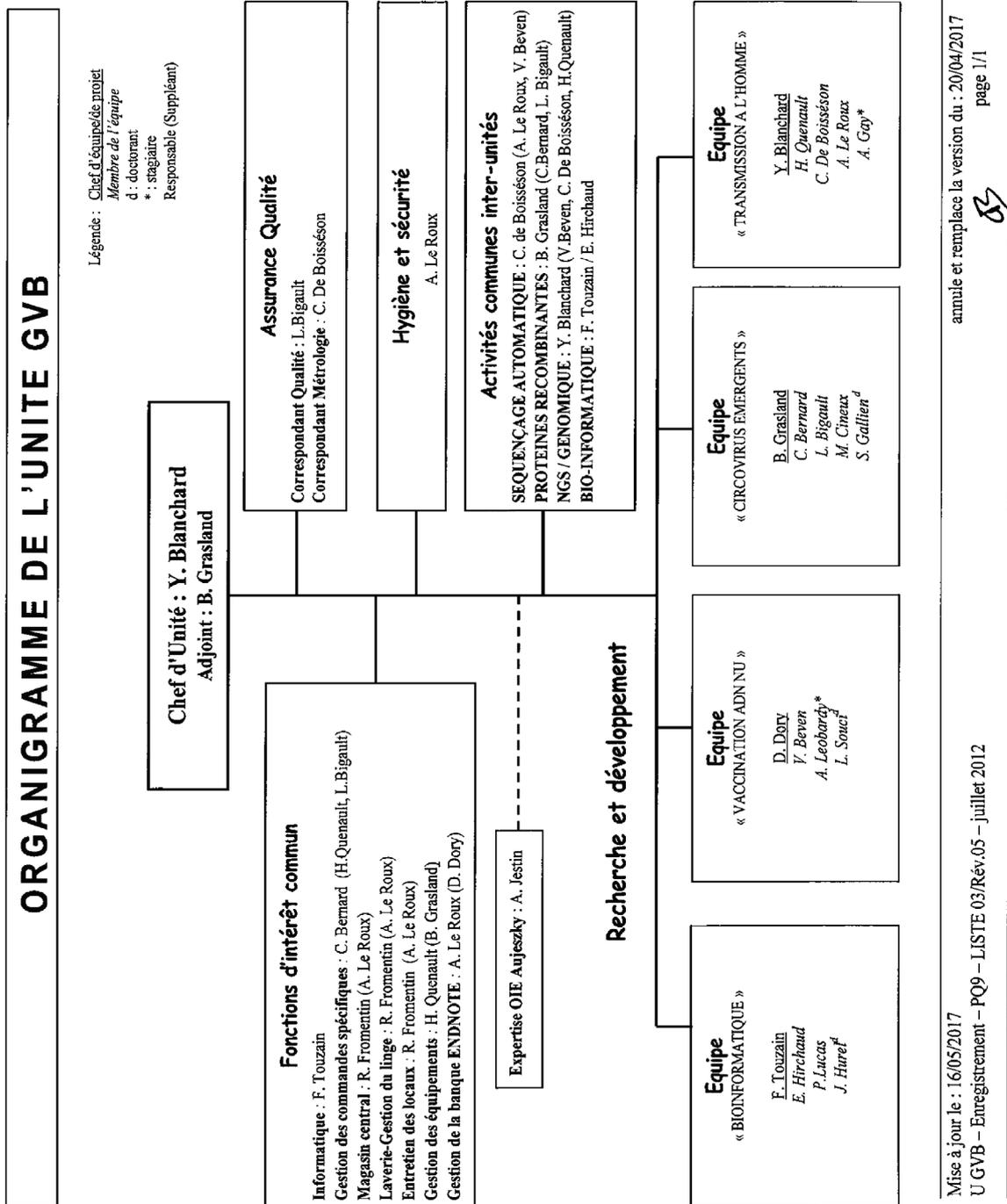
- **Réunions qualité de l'unité** : elles ont lieu de façon régulières en présence de toute l'unité GVB et vise à discuter du système qualité et de la bonne gestion du laboratoire.
- **Réunions d'équipe** : l'équipe y discute de l'avancement des travaux de chacun.
- **Réunions scientifiques de l'unité (RSU)** : les membres de l'unité y présentent sous forme de présentation orale leurs travaux et résultats. Elles permettent d'être informé des travaux concernant les autres équipes et d'avoir un avis extérieur sur la conduite des projets.
- **Réunions du comité de pilotage de thèse** : deux rencontres sont prévues au cours du projet. Il sera diffusé aux membres du comité de pilotage de thèse des rapports d'étape.

La communication entre les différents acteurs du projet se fait par réunion, messagerie électronique ou par téléphone.

Annexe 1 : Organigramme de thèse.



Annexe 2 : Organigramme de l'unité GVB



Annexe 3 : Liste des points critiques du projet de thèse

La liste des points critiques établie pour la thèse « Vaccination à ADN mucoale sur un modèle porcin : efficacité et biosécurité » est la suivante :

- ✓ Disponibilité des animaleries porcines du service SPPAE.
- ✓ Disponibilité des porcs pour les essais *in vivo*.
- ✓ Matériels nécessaires pour la fabrication et la caractérisation des formulations.
- ✓ Disponibilité d'une ou des formulations.

Annexe 4 : Plan des locaux de l'unité GVB – Répartition des micropipettes.

Salle Western Blot : F06110

P1000 n°22009/00/099
 P300 n°22009/00/090
 P50 n°22009/00/64
 P10 n°22009/00/090

Salle BET, post PCR : F06112

P1000 n°22009/00/216
 P20 n°22009/03/026
 Multicanales P50 n° 22009/00/067

Salle Bacterio : F06215

P1000 n°22009/00/088
 P200 n°22009/00/010
 P10 n°22009/00/021

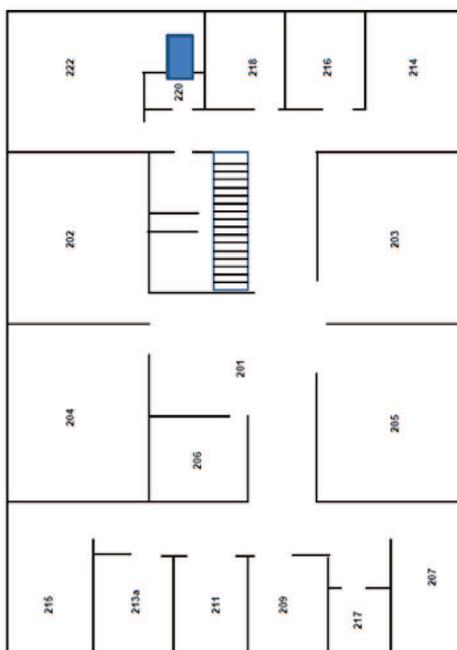


Annexe 4 : Plan des locaux de l'unité GVB – Répartition des micropipettes.

Laboratoire équipe ADN nu: F06204

Manipulations ne nécessitant pas de salle spécifique.

P1000 n°22009/00/008
 P1000 n°22009/00/025
 P200 n°22009/00/215
 P200 n°22009/00/055
 P100 n°22009/00/054
 P10 n°22009/00/056
 P10 n°22009/96/060
 P10 n°22009/00/105
 P3 n°22009/03/010
 Multicanale (30-300) n°22009/10/023
 Multicanale (50-300) n°22009/00/037



Couloir partie commune F15

Culture cellulaire saine : F06216

P1000 n°22009/00/032
 P200 n°22009/00/068
 P20 n°22009/00/069
 Multicanale (100-1000) n°22009/00/032

Salle pré-mix PCR

P1000 : 22009/10/024
 P200 : 22009/00/106
 P20 : 22009/15/001
 P10 : 22009/03/024

Salle PCR quantitative

P200 : 22009/00/007
 P10 : 22009/00/046
 P2 : 22009/10/026

Salle PCR1

P200 n°22009/00/039
 P20 n°22009/00/073
 P10 n°22009/03/023
 P2 n°22009/15/002

Annexe 5 : Déclaration de politique qualité de l'UGVB



Déclaration de politique qualité de l'unité Génétique Virale et Biosécurité

L'unité Génétique Virale et Biosécurité (UGVB) a été créée en 2000 par décision du Directeur de l'AFSSA sur proposition du Conseil Scientifique. Ses missions sont majoritairement une recherche en virologie moléculaire sur les virus émergents et les vecteurs viraux, et la description des relations avec l'hôte en faisant appel aux technologies « omiques », s'y ajoute, dans une moindre mesure, des activités d'expertise ainsi qu'un appui scientifique et technique aux autres unités de l'Anses. ». De plus, depuis 2014 l'unité héberge la plateforme de séquençage haut débit de l'Anses.

En 2004, l'UGVB s'est engagée dans la mise en œuvre d'une démarche qualité en recherche permettant d'assurer la fiabilité des résultats et la rigueur avec laquelle les projets de recherche sont conduits. Les normes NF EN ISO/CEI 17025 « prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais » et ISO 10006 « Lignes directrices pour le management de la qualité dans les projets » constituent le référentiel sur lequel s'appuie ce système de management.

L'application de la norme NF EN ISO/CEI 17025 est la base de l'organisation interne du laboratoire, notamment pour la gestion des ressources

La norme ISO 10006 est utilisée comme guide pour réaliser les thèses sous assurance de la qualité. Toutes les thèses entreprises dans l'unité sont désormais gérées en mode projet suivant les recommandations de cette norme. Les thèses réalisées en cotutelle, avec des équipes extérieures à l'Anses, pourront être dispensées de cette gestion en mode projet.

La mise en place du système de management de la qualité dans l'unité ayant été franchie, l'UGVB doit maintenant maintenir ses efforts sur l'amélioration continue de son système qualité.

Le développement important de la bioinformatique ces dernières années et la constitution d'une équipe bioinformatique au sein de GVB, en appui entre autre de la plateforme NGS nécessite, au même titre que pour les autres activités de l'unité, la mise en œuvre d'une politique de traçabilité et de sécurisation des données. Conscient de pratiques différentes dans ce champ d'activité, par rapport aux usages en vigueur pour les autres thématiques de GVB, il conviendra aux bioinformaticiens de définir, formaliser et appliquer les moyens nécessaires pour atteindre ces objectifs de traçabilité et de sécurité. Ceci se traduira par la mise en œuvre d'actions de progrès décidées en concertation dans l'unité.

Conformément à la déclaration de politique qualité du Directeur de l'Anses laboratoire de Ploufragan-Plouzané, j'invite tous les agents de l'Unité à s'investir dans la mise en place de ce programme d'action et ceci pour un maximum d'actions de recherche.

A Ploufragan, le 02/05/17
Le Chef de l'Unité
Yannick Blanchard

*

Annexe #4 : Rapport audit de management de la thèse



Laboratoire de Ploufragan-Plouzane

Audit interne N° AI/MQT LS/18/01

Rapport d'audit interne

Nature de l'audit : audit de management de thèse

Projet concerné : travaux de thèse conduits par Laurent SOUCI
« Vaccination à ADN mucosale chez le porc : efficacité et biosécurité »

Date de l'audit : 04 juin 2018

Référentiels applicables : Norme ISO 10006
Norme NF EN ISO/CEI 17025

Document de référence : Plan de Management Qualité (rév.00)

Auditeur :

Responsable d'audit : Eric CHORIN, Responsable Qualité, chef du SMQ

Personnes rencontrées au cours de l'audit :

Laurent SOUCI

Daniel DORY

N° des fiches de constat : néant

Date de rédaction du rapport : 05/06/2018

Plan de diffusion du rapport : N.Etterradosi, E.Chorin, Y. Blanchard, D. Dory, L. Souci.

Le Responsable d'audit

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'E' followed by 'CHORIN'. The signature is written over the printed name 'Eric CHORIN'.

Eric CHORIN

Cet audit de management de la thèse de Laurent Souci est le premier depuis le début de la mise en œuvre de son projet. Il est conduit conformément à la procédure P.ESS.P1 – PLOU/PG/0022.

Cet audit s'est déroulé dans un très bon climat avec une totale coopération et transparence de l'équipe rencontrée par l'auditeur.

Point sur le déroulement de la thèse

La thèse a débuté en Janvier 2017. Le planning prévisionnel du projet prévoit 5 phases sur 3 ans. Conformément à ce planning, les travaux qui sont actuellement réalisés concernent la phase 3 « Caractérisation du ciblage in vivo des différentes formulations ». Le projet est donc en phase avec les prévisions de déroulement.

La documentation

Le plan de management de qualité de la thèse, actuellement, en version 00, devra faire l'objet d'une révision afin de corriger certains éléments signalés lors de l'audit : structure du service de management de la qualité, changement du responsable qualité du laboratoire, ajout du CTPA qui n'est mentionné ni dans l'organigramme de thèse ni dans les acteurs du projet.

Les acteurs du projet

A l'exception du CTPA qui n'apparaît pas dans les acteurs du projet, ces derniers sont correctement identifiés et leurs rôles respectifs définis dans le plan de management de thèse.

Le projet formalisé

Le projet a été formalisé selon la fiche de définition de projet complétée par ce plan de management de la qualité. La présentation réalisée lors de la 1^{ère} réunion du comité de pilotage de la thèse permet une compréhension plus précise des travaux menés et des options de développement choisies.

La traçabilité

Le doctorant utilise les cahiers de laboratoire afin de consigner l'ensemble des éléments relatifs au projet. Le cahier examiné est renseigné de façon satisfaisante et signé régulièrement par le doctorant. La signature par le directeur de thèse est réalisée lors des différents points avec le doctorant.

Deux **axes d'amélioration** ont été identifiés lors de l'audit :

- L'examen des notes consignées lors de la 1^{ère} phase de l'expérimentation in vivo réalisée en Juin 2018 permet de montrer que les deux formulations testées n'ont pas été caractérisées avant l'inoculation. Une caractérisation devra être menée a posteriori sur les reliquats des deux formulations qui ont été conservés afin de vérifier que les formulations qui ont été utilisées étaient conformes aux critères attendus.
- L'archivage des données informatiques a été examiné. Les fichiers sont nommés selon le code des manipulations et sont stockés selon une architecture ordonnée qui permet aisément de retrouver les données. Attention néanmoins à ne pas stocker (même provisoirement) de fichiers sur le bureau de l'ordinateur, ces données n'étant pas sauvegardées lors des sauvegardes générales. Un stockage systématique sur le réseau est impératif.

La gestion des points critiques

L'équipe de thèse avait dès le début du projet, défini quatre points relatifs à la disponibilité :

- des animaleries,
- des porcs pour les essais in vivo,
- du matériel pour la fabrication et la caractérisation des formulations
- des formulations.

Ces points critiques sont à ce jour parfaitement gérés. Les contacts nécessaires ayant été pris très en amont avec le SPPAE. De même, le nécessaire a été fait auprès des participants au projet pour l'obtention des formulations souhaitées.

La gestion des ressources

La gestion des ressources affectées au projet n'appelle pas de commentaire particulier.

La gestion des écarts

Au jour de l'audit, aucun écart n'a été enregistré lors du déroulement du projet.

Les réunions de travail

Les diverses réunions de travail font l'objet d'une bonne traçabilité. Un comité de pilotage s'est tenu le 05/09/2017 au cours duquel une présentation réalisée par le doctorant a servi de support aux échanges entre les personnes présentes. Un compte-rendu de ce comité a été établi. Il reprend les principales discussions, les formations auxquelles le doctorant a participé ainsi qu'une appréciation sur la qualité des travaux menés. Ce compte-rendu, qui statue positivement quant à l'opportunité de poursuivre les travaux, a été transmis à l'école doctorale. Le suivi des travaux est très bien formalisé.

La revue du système de management qualité

Cet audit n'a pas mis en évidence un besoin de modification du système de management de la qualité.

Conclusion générale

Le projet audité est réalisé conformément aux dispositions décrites dans le plan de management de la qualité de la thèse. Les travaux avancent au rythme prévu. La traçabilité des données est parfaitement assurée par le biais des cahiers de laboratoire et de la gestion des données électroniques. Les axes d'amélioration mentionnés dans le paragraphe traitant de la traçabilité devront néanmoins être pris en compte.

Titre : Vaccination à ADN intranasale sur un modèle porcin

Mots clés : vaccin ADN ; voie intranasale ; modèle porcin

Résumé : La vaccination est l'une des stratégies préventives les plus puissantes pour contrôler de nombreuses infections causées par des agents pathogènes. La principale voie d'entrée des pathogènes sont les muqueuses or la plupart des vaccins sont pourtant majoritairement inoculés par la voie parentérale et sont en général capables d'induire des réponses immunitaires protectrices, mais pas toujours. Il est important de disposer de nouvelles stratégies alternatives comme par exemple l'utilisation de vaccins mucosaux. Cependant, l'immunogénicité des vaccins mucosaux sous-unitaires (protéique ou ADN plasmidique) reste bien souvent insuffisante chez des animaux de rente ou chez l'homme ; des améliorations sont nécessaires. Afin d'évaluer la faisabilité d'une telle stratégie chez les porcs, nous avons utilisé un vaccin à ADN plasmidique codant la glycoprotéine B (gB) du virus de la pseudorabie porcine (PrV) connu comme étant très fortement immunogénique.

Ce plasmide a été associé ou non à quatre nanovecteurs décrits pour le transport d'ADN plasmidique in vivo au niveau de sites mucosaux (chitosan, chitosan mannosylé, KLN47 et PLGA-PEI) et a été inoculé par la voie intranasale chez les porcs. De façon inattendue, le vaccin à ADN nu a induit des réponses immunitaires plus fortes que celles obtenues pour les quatre vaccins à ADN formulés. Cependant, quelques indices laissent suggérer que deux des formulations évaluées, le PLGA-PEI et le KLN47, semblent posséder un pouvoir immunisant plus fort. Plusieurs pistes d'amélioration de la composition vaccinale et du protocole d'inoculation sont discutées à la fin du manuscrit.

Title : DNA vaccination by the intranasal route on a swine model.....

Keywords : DNA vaccine ; intranasal route ; swine model

Abstract : Vaccination is one of the most powerful preventive strategy for controlling many infections caused by pathogens. The main route of entry for pathogens are mucosal surfaces. Most vaccines are predominantly inoculated parenterally and are generally capable of inducing protective immune responses, but not always. It is important to have new alternative strategies such as mucosal vaccines. However, the immunogenicity of such mucosal subunit vaccines (protein or plasmid DNA) is often insufficient in rents animals and in humans, so improvements are needed. In order to assess the feasibility of such a strategy in pigs, we used a plasmid DNA vaccine encoding the porcine pseudorabies virus (PrV) glycoprotein B (gB) known to be very highly immunogenic.

This plasmid was or was not associated with four nanovectors described for the transport of plasmid DNA in vivo at mucosal sites (chitosan, mannosylated chitosan, KLN47 and PLGA-PEI) and was inoculated intranasally in pigs. Unexpectedly, the naked DNA vaccine induced stronger immune responses than those obtained for the four formulated DNA vaccines. However, it appeared that two of the formulations evaluated, PLGA-PEI and KLN47, appear to have stronger immunizing power. Several strategies for improving the vaccine composition and the inoculation protocol are discussed at the end of the manuscript.