

# DES NANOSTRUCTURES PROTEIQUES EN VACCINOLOGIE VETERINAIRE

## PROTEIC NANOSTRUCTURES AND THEIR USE IN VETERINARY VACCINOLOGY

Par Sabine RIFFAULT<sup>(1)</sup>

(Communication présentée le 7 mars 2013)

### RÉSUMÉ

Les avancées dans le décryptage et la manipulation des génomes viraux ont permis de concevoir une nouvelle génération de vaccins sous-unitaires: les nanoparticules virales. Ces assemblages sont formés soit par les protéines de surface du virus (VLP pour « virus-like particles ») ou de protéines internes comme celles de la nucléocapside. Ces nanostructures possèdent des qualités utiles en vaccination : elles sont inertes et donc sans danger de dissémination ; elles sont fortement immunogènes de par leur structure répétée et de par leur taille nanométrique adaptée à une prise en charge par les cellules présentatrices d'antigène ; elles peuvent servir de plate-forme pour ancrer des antigènes hétérologues et être la base de vaccins multivalents. Au sein de notre unité, nous avons généré des nanoparticules avec la nucléoprotéine du virus respiratoire syncytial, agent majeur des broncho-pneumonies chez les veaux. Ces particules se présentent sous la forme d'anneaux d'une dizaine de nanomètres de diamètre. Nous avons mis en évidence leur capacité à interagir avec les cellules dendritiques et à les activer. Nous avons également démontré leur capacité à stimuler des défenses immunitaires protectrices, y compris après administration mucosale ce qui est un défi majeur pour les vaccins non réplicatifs.

**Mots clés:** nanoparticules, vaccin, virus respiratoire syncytial.

### SUMMARY

*Breakthroughs in the understanding and manipulation of viral genomes have allowed the emergence of a new generation of subunit vaccines: the viral nanoparticles. Such particles are formed with recombinant surface proteins that can self-assemble into virus-like particles or with internal proteins that mimic the viral nucleocapsid. These nanostructures display characteristics valuable for vaccination purposes: they are inert which exclude risk of dissemination; they are highly immunogenic due to their repeated organization and due to their nanometric size that facilitates uptake by antigen-presenting cells; they can be used as a platform to anchor heterologous antigens and make multivalent vaccine. Within our research department, we have created nanoparticles with the nucleoprotein (N) of the respiratory syncytial virus, one of the main agents causing calves pneumonia. These particles have a ring shape and have about ten nanometers diameters. N-rings have the ability to interact with dendritic cells and make them mature. We have also shown that N-rings can stimulate protective immunity against infection, especially following mucosal delivery, which is a major challenge for subunit vaccines.*

**Key words:** nanoparticles, vaccine, respiratory syncytial virus.

(1) Sabine Riffault, INRA, UR892, Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, 78350 Jouy-en-Josas, [sabine.riffault@jouy.inra.fr](mailto:sabine.riffault@jouy.inra.fr).

## INTRODUCTION

La vaccination reste le meilleur moyen de contrôle des infections virales tant chez l'homme que chez l'animal. Les vaccins vétérinaires classiques sont basés sur des virus inactivés ou vivants atténués. Les avancées majeures dans le décryptage et la manipulation des génomes viraux ont permis de concevoir une nouvelle génération de vaccins. Ainsi, les nanoparticules virales sont des assemblages structurés de protéines virales recombinantes. Lorsque ces assemblages sont formés par les protéines à la surface du virus, on parle de VLP pour « virus-like particles ». Des assemblages peuvent aussi être formés avec les protéines internes du virus comme celles de la nucléocapside. Ces objets moléculaires sont de taille nanométrique (10-100 nm) et présentent une géométrie spatiale, symétrie et répétition des motifs moléculaires, mimant tout ou partie de la particule virale (Crisci *et al.* 2012). Comme ces nanoparticules sont dépourvues de matériel génomique viral, ces objets sont incapables de se répliquer.

La taille et la géométrie sont deux facteurs clés pour l'efficacité d'un candidat vaccin de type sous-unitaire (Bachmann & Jennings, 2010). Les vaccins sont généralement administrés par voie cutanée, musculaire ou même mucosale. Au sein de ces tissus périphériques, le premier événement important pour l'efficacité de la vaccination est la prise en charge/détection des antigènes vaccinaux par des cellules immunitaires sentinelles telles que les cellules dendritiques. Ces cellules dendritiques vont assurer le transport lymphatique des antigènes vers les ganglions lymphatiques drainants, site d'induction des réponses immunitaires adaptatives. La taille et la géométrie des nanoparticules virales favorisent leur internalisation dans les cellules dendritiques par la voie endosomale. Les cellules dendritiques migrent vers les ganglions drainants en 24h et les antigènes vaccinaux sont dégradés dans les endosomes puis les peptides sont chargés sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II pour assurer leur présentation aux lymphocytes T naïfs. De par leur taille, les nanoparticules virales recombinantes sont également capables de diffuser librement du tissu dans les vaisseaux lymphatiques et ainsi arriver intactes dans le ganglion lymphatique au niveau du sinus sous-capsulaire puis diffuser vers les centres germinatifs pour interagir directement avec les récepteurs sur les lymphocytes B naïfs (Reddy *et al.*, 2007 ; Bachmann & Jennings, 2010).

Cette double capacité de transport et de présentation antigénique explique la grande immunogénicité des nanoparticules virales recombinantes. De plus, ces assemblages de protéines virales recombinantes adoptent une conformation antigénique native qui mime tout ou partie de la particule virale et qui peut contenir des motifs microbiens conservés (PAMP)<sup>2</sup> capables d'être reconnus par des récepteurs du système immunitaire inné (PRR)<sup>3</sup> et ainsi renforcer l'intensité de la réponse immunitaire.

(2) PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern.

(3) PRR : Pathogen Recognition Receptor

Les nanoparticules virales possèdent d'autres qualités pour une utilisation en vaccination (Crisci *et al.*, 2012):

- 1) Elles sont inertes donc sans danger de dissémination dans l'environnement,
- 2) Elles peuvent servir de plate-forme pour ancrer des antigènes hétérologues et être la base de vaccins multivalents ou de vaccins de type DIVA qui permettent de différencier animaux infectés et vaccinés.

Nous avons pu générer des nanoparticules avec la nucléoprotéine du virus respiratoire syncytial (VRS), agent majeur des broncho-pneumonies du veau. Nous avons mis en évidence leur capacité à interagir avec les cellules dendritiques et à les activer. Nous avons également démontré leur capacité à stimuler des défenses immunitaires contre le VRS chez la souris et le veau. Plus récemment, nous avons exploité leur capacité de plate-forme d'ancrage pour des antigènes de la grippe ou du VRS.

## UTILISATION DES NANOPARTICULES N<sup>SRS</sup> COMME VACCIN CONTRE LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL HUMAIN OU BOVIN

Les maladies respiratoires des bovins représentent une dominante pathologique dans tous les types d'élevage avec des conséquences économiques majeures, en particulier chez les jeunes bovins élevés en lots. Le VRS bovin (VRSB) est l'un des principaux agents pathogènes responsables des affections respiratoires sévères des jeunes bovins (Valarcher & Taylor 2007). La pathologie induite par le VRSB se traduit par différents syndromes allant d'une atteinte bénigne du tractus respiratoire supérieur à une atteinte grave du tractus respiratoire inférieur. Ces tableaux cliniques coexistent fréquemment dans un même troupeau et on les retrouve chez des animaux non vaccinés, mais aussi chez des bovins vaccinés et des bovins possédant une immunité d'origine maternelle contre le VRSB. En Europe et aux Etats-Unis, le VRSB induit des bronchiolites et des broncho-pneumonies dans plus de 70 % des exploitations, infectant environ 70% des veaux au cours de la première année de vie. Le taux de mortalité varie en moyenne entre 1 et 5% mais il peut atteindre 20% des animaux malades dans certains foyers épidémiques (Elvander, 1996).

Il existe un virus respiratoire syncytial humain (VRSH) qui est l'agent étiologique des bronchiolites du nourrisson (Ogra, 2004). Pendant leur première année de vie, une grande majorité des enfants sont infectés par le VRSH (plus de 70%) et l'infection entraîne une bronchiolite chez 20% des nourrissons atteints, avec un taux d'hospitalisation de 2 à 5% en France, pour une durée de 8 à 9 jours. La mortalité avoisine 0,1%. Le développement d'un vaccin contre le VRSH qui protège les

nourrissons de moins de 6 mois est donc un enjeu majeur en santé publique qui fait partie des priorités de l'OMS. Améliorer les vaccins contre le VRSB est également un enjeu majeur en santé vétérinaire (Meyer *et al.*, 2008), ne serait-ce que pour réduire les traitements antibiotiques pratiqués à cause des risques de surinfections bactériennes.

Nous avons choisi de développer une stratégie vaccinale originale basée sur la nucléoprotéine virale (N) dont le rôle est d'encapsider l'ARN génomique viral à l'intérieur de la particule virale. Cette nucléoprotéine est un candidat intéressant pour un vaccin car elle est la cible des réponses T mémoires de type cytotoxique qui sont essentielles pour éliminer le virus lors d'une primo-infection. De plus c'est la protéine virale la plus conservée y compris entre les VRS humain et bovin. Nous avons pu produire la nucléoprotéine sous forme recombinante en bactérie *E. coli* en la co-exprimant avec le fragment C-terminal de la phosphoprotéine du VRS et en utilisant les propriétés d'interaction entre ces protéines pour la purification de la N (Tran *et al.*, 2007). Ce procédé de production a permis de générer des assemblages nanométriques solubles et homogènes constitués d'anneaux de 15 nm de diamètre comprenant 10 ou 11 monomères de N disposés autour d'un fragment d'ARN bactérien dont la structure atomique a été résolue par cristallographie et diffraction aux rayons X (Tawar *et al.* ; 2009). Ces nanoparticules ont été appelées anneaux N<sup>SRS</sup> (Subnucleocapsid-Ring-Structure, **Figure 1**).

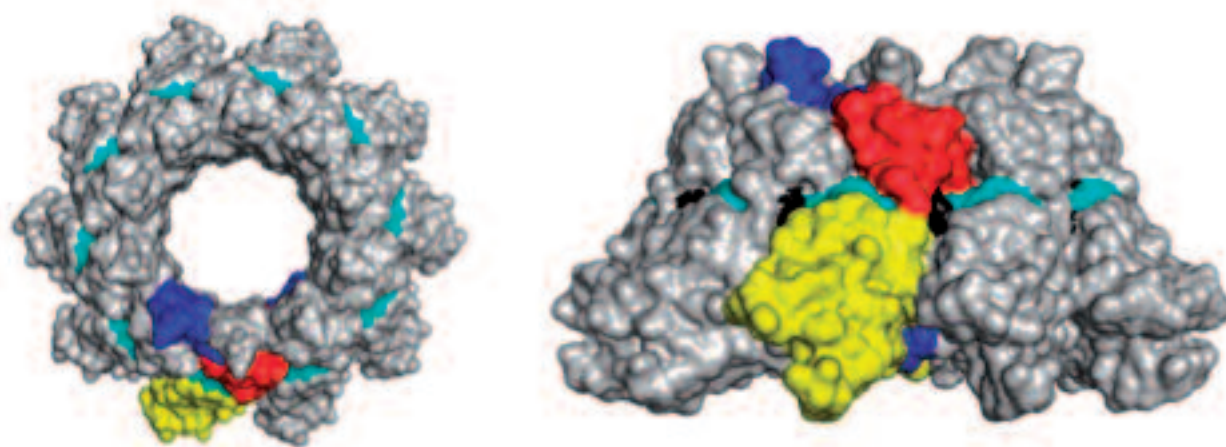
Le premier objectif a été d'utiliser les anneaux N<sup>SRS</sup> pour vacciner contre le virus respiratoire syncytial. Le modèle rongeur d'infection expérimentale par le VRSH a permis de montrer que la vaccination de souris adultes avec les anneaux N<sup>SRS</sup> par voie nasale induit une immunité Th1 et protège contre une épreuve virale (Roux *et al.*, 2008).

La limite de ce modèle expérimental est l'absence de signes cliniques liés à l'infection virale malgré une légère inflammation pulmonaire. Nous avons donc évalué notre nouveau candidat vaccin dans l'espèce cible de l'infection virale, le bovin. La vaccination parentérale de veaux de un mois avec les anneaux N<sup>SRS</sup> dans un adjuvant de type émulsion huile-eau les a partiellement protégés lors d'une infection expérimentale avec du VRSB : réduction significative des scores cliniques (**Figure 2a**), des lésions histologiques (**Figure 2b**) et de la charge virale (Riffault *et al.*, 2010).

À travers ces deux essais de vaccination réalisés dans une espèce modèle ou dans l'espèce cible, nous avons mis en évidence une très bonne immunogénicité des nanoparticules N<sup>SRS</sup> avec induction de réponse cellulaire de type CD4 et CD8 et une forte production d'anticorps sérique et mucosale. Nous nous sommes ensuite interrogés sur le rôle de la structure nanoparticulaire dans l'efficacité des anneaux N<sup>SRS</sup> à induire ces réponses immunitaires.

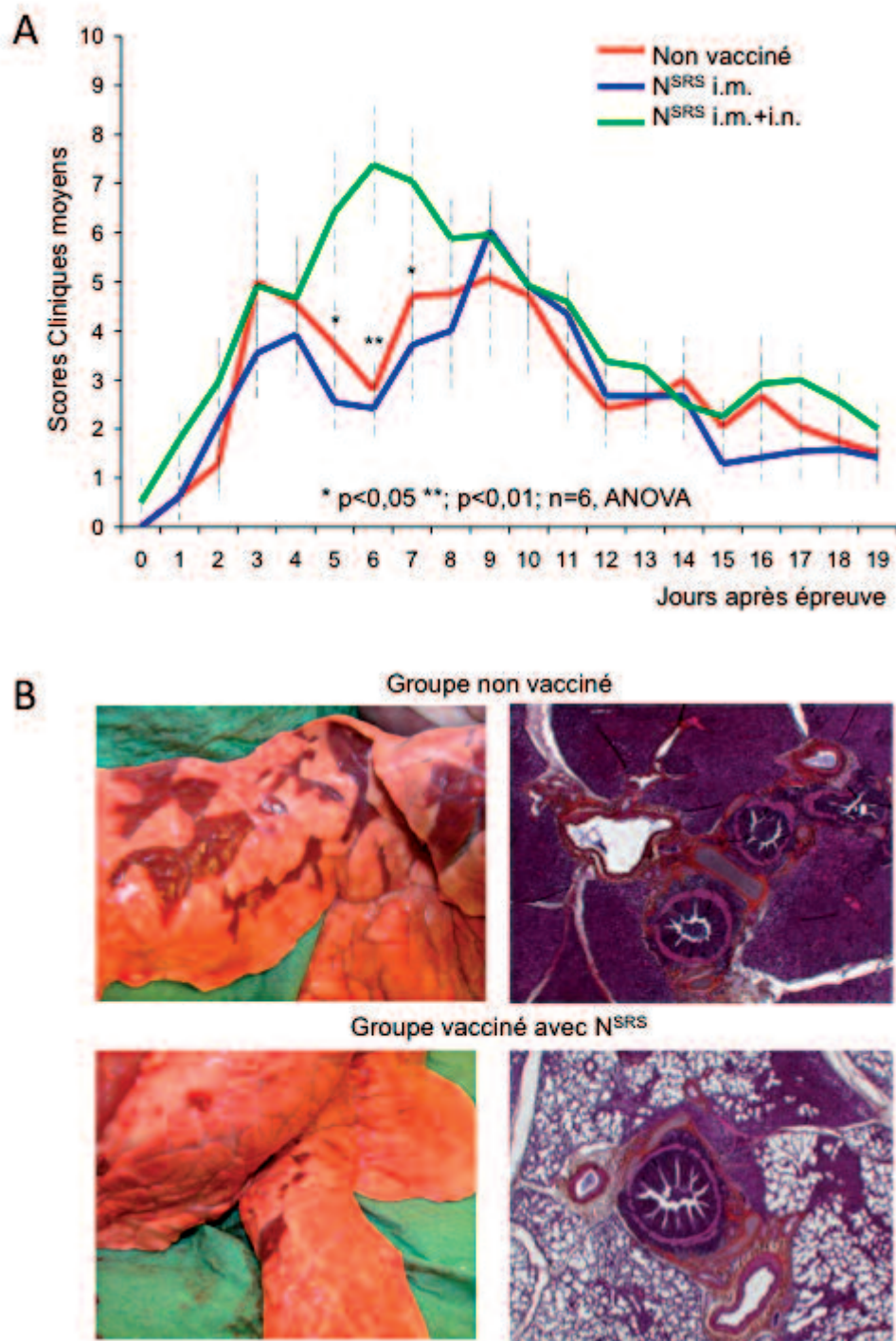
### PROPRIÉTÉS IMMUNOSTIMULATRICES DES NANOPARTICULES N<sup>SRS</sup>, INTÉRACTION AVEC LES CELLULES DENDRITIQUES

Pour étudier les propriétés immunostimulatrices des anneaux N<sup>SRS</sup>, nous avons généré des anneaux fluorescents par liaison génétique de la protéine fluorescente verte GFP (N-GFP<sup>SRS</sup>). Ceux-ci ont été mis en contact *in vitro* avec des cellules dendritiques isolées à partir de la rate de souris non immunes. Les anneaux N-GFP<sup>SRS</sup> ont pu être visualisés rapidement à l'intérieur des cellules dendritiques, démontrant une prise en charge efficace (Roux *et al.*, 2008). Dans un deuxième temps, nous avons démontré que les cellules dendritiques mises au contact des anneaux N<sup>SRS</sup> acquéraient des marqueurs d'activation et produisaient des cytokines immunostimulatrices. Une forme



**Figure 1** : Structures des nanoparticules NSRS

Résolution par diffraction aux rayons X de la structure tridimensionnelle d'une nanoparticule N<sup>SRS</sup> formée de 10 monomères de N (en gris ; un monomère est figuré avec ses trois domaines protéiques, en rouge pour le domaine C-terminal, jaune pour le domaine N-terminal et bleu pour les extrémités) et d'un ARN bactérien de 70 bases (figuré par un ruban bleu turquoise). Une vue supérieure (à gauche) et une vue latérale (à droite) sont montrées. D'après (Tawar *et al.*, 2009).



**Figure 2 :** Réduction de la pathologie pulmonaire grâce à la vaccination avec les nanoparticules N<sup>SRS</sup>

Des veaux âgés de un mois, sans immunité maternelle passive (pas d'absorption du colostrum) ont été immunisés à deux reprises à trois semaines d'intervalle avec les anneaux N<sup>SRS</sup> par voie intranasale (i.n.) et/ou intramusculaire (i.m.) en présence d'adjuvant SEPPIC, infectés expérimentalement avec du VRSB et suivis pendant 20 jours.

**(A)** Mesure des scores cliniques individuels chaque jour après épreuve virale des veaux non vaccinés ou vaccinés. Le score clinique prend en compte plusieurs paramètres : toux, jetage, appétit, fréquence respiratoire... (Riffault et al., 2010). Les étoiles indiquent les niveaux de différences significatives entre les groupes vaccinés et le groupe non vacciné.

**(B)** Deux veaux par groupe ont été autopsiés 6 jours après l'épreuve VRSB pour évaluer l'étendue et la sévérité des lésions macroscopiques (photos de gauche : zones d'hépatisation) et microscopiques (photos de droite : forte infiltration cellulaire dans le parenchyme et la lumière des bronches ; coloration hématoxyline/éosine/safran) dans les lobes pulmonaires (Riffault et al., 2010).



monomérique de la nucléoprotéine, dépourvue d'acides nucléiques a été obtenue par mutation ponctuelle. Cette nucléoprotéine non assemblée sous forme de SRS a totalement perdu ses propriétés d'interaction et d'activation des cellules dendritiques *in vitro* et sa capacité à induire une réponse anticorps *in vivo* (résultats non publiés).

Ces résultats suggèrent que la structure nanoparticulaire des anneaux N<sup>SRS</sup> (taille, géométrie et/ou la présence d'acides nucléiques type PAMP) est importante pour leurs propriétés vaccinales.

### UTILISATION DES NANOPARTICULES N<sup>SRS</sup> COMME PLATE-FORME POUR DES ANTIGÈNES HÉTÉROLOGUES

Les nanoparticules virales, de par leur très bonne capacité à stimuler les défenses immunitaires, peuvent être utilisées comme plate-forme pour d'autres motifs antigéniques. Les anneaux N<sup>SRS</sup> pouvant être administrés par voie mucosale, nous avons testé leur capacité à porter un déterminant du virus de la grippe et à conférer une protection contre une infection expérimentale dans un modèle rongeur.

Pour réaliser cette preuve de concept, nous avons choisi l'ectodomaine de la protéine de matrice M2e du virus grippal. Ce motif est faiblement immunogénique sur la particule virale mais lorsqu'il est porté par des structures de type nanoparticule, par exemple nanoparticules formées par la protéine core du virus de l'hépatite B, HBc), il est possible de générer des anticorps spécifiques de ce motif M2e qui sont protecteurs contre une épreuve virale (Schotsaert *et al.*, 2009). Nous avons donc

ajouté le motif M2e en simple ou triple copie à l'extrémité C-terminale de la nucléoprotéine. Nous avons vérifié que les nucléoprotéines chimériques N-M2e ou N-3M2e avaient gardé leurs capacités d'assemblage et démontré la meilleure immunogénicité de M2e ancré sur les nanoparticules N<sup>SRS</sup> par comparaison avec le peptide M2e seul. Les souris vaccinées par voie nasale avec les anneaux chimériques N-3M2e ont été complètement protégées contre une épreuve grippale (100% de survie et faible perte de poids) validant ainsi l'efficacité des nanoparticules N<sup>SRS</sup> comme plate-forme vaccinale (résultats non publiés).

### CONCLUSION

Grâce à ces différentes études, nous avons démontré l'efficacité des nanoparticules N<sup>SRS</sup> pour la vaccination contre le VRS, en particulier après une administration nasale. Nous avons également validé leur utilisation comme plate-forme vaccinale pour des antigènes hétérologues. Enfin nous avons des données permettant de relier leurs propriétés immunogéniques et immunostimulatrices à leur nature nanoparticulaire.

Même si les premiers articles décrivant l'utilisation de nanoparticules virales en vaccination datent des années 90, la compréhension des mécanismes reliant ces structures nanoparticulaires au système immunitaire est plus récente et en plein essor. La pleine compréhension des interactions entre des structures nanoparticulaires (vaccin protéique ou adjuvant) et les cellules immunitaires est un champ d'investigation majeur pour optimiser efficacité et sécurité de ces nano-objets.

### REMERCIEMENTS

*Je remercie toutes les personnes qui ont contribué aux travaux discutés dans cette communication et non encore publiés (Jean-François Eléouët, Christophe Chevalier, Pierre-Louis Hervé, Mariam Raliou, Bernard Charley, Agnès Petit-Camurdan, Nicolas Bertho, Marie Galloux, Catherine Dubuquoy Christiane Bourdieu et Jenna Fix ; UR892 INRA de Jouy-en-Josas).*

## BIBLIOGRAPHIE

- Bachmann, M.F. & Jennings, G.T. 2010. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol* 10(11): 787–796.
- Crisci, E., Barcena, J., Montoya, M. 2012. Virus-like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections. *Veterinary immunology and immunopathology* 148(3-4): 211–225.
- Elvander, M. 1996. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet Rec* 138(5): 101–105.
- Meyer, G., Deplanche, M., Schelcher, F. 2008. Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31(2-3): 191–225.
- Ogra, P.L. 2004. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev* 5 Suppl A: S119–126.
- Reddy, S.T., van der Vlies, A.J., Simeoni, E., Angeli, V., Randolph, G.J., O'Neil, C.P., Lee, L.K., Swartz, M.A., Hubbell, J.A. 2007. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat Biotechnol* 25(10): 1159–1164.
- Riffault, S., Meyer, G., Deplanche, M., Dubuquoy, C., Durand, G., Soulestin, M., Castagne, N., Bernard, J., Bernardet, P., Dubosclard, V., et al. 2010. A new subunit vaccine based on nucleoprotein nanoparticles confers partial clinical and virological protection in calves against bovine respiratory syncytial virus. *Vaccine* 28(21): 3722–3734.
- Roux, X., Dubuquoy, C., Durand, G., Tran-Tolla, T.L., Castagne, N., Bernard, J., Petit-Camurdan, A., Eleouet, J.F., Riffault, S. 2008. Sub-nucleocapsid nanoparticles: a nasal vaccine against respiratory syncytial virus. *PLoS One* 3(3): e1766.
- Schotsaert, M., De Filette, M., Fiers, W., Saelens, X. 2009. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert review of vaccines* 8(4): 499–508.
- Tawar, R.G., Duquerroy, S., Vornrhein, C., Varela, P.F., Damier-Piolle, L., Castagne, N., MacLellan, K., Bedouelle, H., Bricogne, G., Bhella, D., et al. 2009. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 326(5957): 1279–1283.
- Tran, T.L., Castagne, N., Bhella, D., Varela, P.F., Bernard, J., Chilmonczyk, S., Berkenkamp, S., Benhamo, V., Grznarova, K., Grosclaude, J., et al. 2007. The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein protomer. *J Gen Virol* 88(Pt 1): 196–206.
- Valarcher, J.F. & Taylor, G. 2007. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet Res* 38(2): 153–180.