



**Développement d'une plateforme vaccinale polyvalente
basée sur l'utilisation des nanoparticules du virus
mosaïque de la papaye (PapMV) et de la transpeptidase
Sortase A de *Staphylococcus aureus***

Mémoire

Ariane Thérien

Maîtrise en microbiologie-immunologie

Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Ariane Thérien, 2016

Résumé

La vaccination demeure à ce jour le moyen le plus efficace dans la prévention et le contrôle de maladies infectieuses. Les nanoparticules du PapMV ont été efficacement utilisées comme plateforme vaccinale permettant l'augmentation de l'immunogénicité d'antigènes. Bien que ces nanoparticules aient démontré un grand potentiel, la fusion d'antigène directement dans l'ORF de la protéine de capsid (CP) peut nuire à sa capacité d'autoassemblage en nanoparticules. Nous avons développé une nouvelle méthode de modification du PapMV basé sur l'utilisation de la transpeptidase bactérienne sortase A (SrtA) permettant la conjugaison d'antigènes directement sur les nanoparticules post-assemblage. La SrtA a permis la conjugaison de longs antigènes (M2e et T20) sans affecter l'intégrité structurale et immunologique des nanoparticules. Ces nanoparticules ont induit de fortes réponses humorales spécifiques aux antigènes et ont induit une protection complète contre une infection à l'influenza chez les souris vaccinées avec PapMV-SrtA-M2e. La plateforme PapMV-SrtA permet l'ingénierie facile et rapide de nouveaux vaccins.

Abstract

Vaccination remains to date the most effective intervention in the prevention and control of infectious diseases. PapMV nanoparticles have shown to be an efficient vaccine platform to increase antigens immunogenicity. While they have shown great potential, the insertion of antigens in the open reading frame (ORF) of the coat protein (CP) can affect its capacity to assemble into nanoparticles. We developed a new method to modify PapMV nanoparticles based on the use of bacterial transpeptidase sortase A (SrtA) to attach antigens directly onto assembled nanoparticles. SrtA attached long antigenic peptides (M2e and T20) onto PapMV nanoparticles without affecting their structural or immunological integrity. These nanoparticles induced strong antigen specific antibodies and fully protected PapMV-SrtA-M2e vaccinated mice against an influenza challenge. The use of the PapMV-SrtA platform will enable the faster and easier development of new vaccines

Tables des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT.....	V
TABLES DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES	XIII
REMERCIEMENTS.....	XIX
AVANT PROPOS	XXI
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1. LA VACCINATION	1
1.1. <i>Les vaccins sous-unitaires</i>	2
1.2. <i>Les nanoparticules virales</i>	3
2. LES PARTICULES VIRALES COMME PLATEFORME VACCINALE	5
2.1. <i>Plateformes vaccinales basées sur les virus animaux</i>	6
2.2. <i>Plateformes vaccinales basées sur les bactériophages</i>	7
2.3. <i>Plateformes vaccinales basées sur les virus de plantes</i>	10
2.3.1. <i>Le virus mosaïque de la papaye comme plateforme vaccinale</i>	16
3. MÉTHODES DE MODIFICATION TRADITIONNELLES DES PARTICULES VIRALES.....	18
3.1. <i>La transpeptidation catalysée par Sortase A</i>	20
3.1.1. <i>Les utilisations in vitro de la SrtA</i>	21
CHAPITRE 2 : PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	25
CHAPITRE 3 : DEVELOPMENT OF A VERSATILE VACCINE PLATFORM BASED ON PAPAYA MOSAIC VIRUS NANOPARTICLES.....	27
RÉSUMÉ.....	27
ABSTRACT	31
INTRODUCTION	32
MATERIALS AND METHODS.....	34
RESULTS.....	39
DISCUSSION	42
ACKNOWLEDGMENT.....	44
REFERENCES	45
FIGURE LEGENDS	48
SUPPLEMENTARY FIGURE LEGEND	50
FIGURES.....	51

SUPPLEMENTARY FIGURES	57
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	59
CHAPITRE 5 : CONCLUSION	65
BIBLIOGRAPHIE	67
ANNEXE I- PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DU PEPTIDE GGG-M2E	81
ANNEXE II- PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DU PEPTIDE GGG-T20.....	83
ANNEXE III- PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DU PEPTIDE GGG-AH1	85
ANNEXE IV- PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DU PEPTIDE GG-TRP2_178-203.....	87

Liste des tableaux

TABLEAU 1-1. EXEMPLES D'UTILISATION DES PSEUDOPARTICULES VIRALES (VLPS) DU VIRUS DE L'HÉPATITE B (HBV) COMME PLATEFORME VACCINALE	8
TABLEAU 1-2. EXEMPLES DE DIVERS VIRUS DE PLANTE UTILISÉS EN TANT QUE PLATEFORME VACCINALE.....	11

Liste des figures

FIGURE 1-1. EXEMPLES DE DIFFÉRENTES CAPSIDES VIRALES AYANT ÉTÉ DÉVELOPPÉES COMME VACCIN À BASE DE PARTICULES VIRAL OU COMME PLATEFORME VACCINALE HÉTÉROLOGUE.....	4
FIGURE 1-2. RÉSUMÉ DES DIFFÉRENTES PROPRIÉTÉS IMMUNOLOGIQUES DES PARTICULES VIRALES	5
FIGURE 1-3. IMAGE DE MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION DES VNPS DE PAPMV PRODUITES <i>IN VITRO</i>	16
FIGURE 1-4. SCHÉMATISATION DU MÉCANISME D'ACTIVATION DE CELLULES IMMUNITAIRES PAR LES VNPS DU PAPMV	17
FIGURE 1-5. ILLUSTRATION DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE CONJUGAISON CHIMIQUE	19
FIGURE 1-6. LES DIFFÉRENTES CLASSES DE SORTASE ET LEUR FONCTION RESPECTIVE	22
FIGURE 1-7. SCHÉMATISATION DE LA RÉACTION SRTA CHEZ <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	23
FIGURE 2-1. THE 3D STRUCTURE PREDICTION OF THE GGG-M2E AND GGG-T20 PEPTIDES	51
FIGURE 2-2. PAPMV-SRTA VLPS RESEMBLE NATIVE PAPMV VLPS	52
FIGURE 2-3. PEPTIDES ARE EFFICIENTLY CONJUGATED TO PAPMV-SRTA VLPS WITHOUT AFFECTING VLPS STRUCTURAL INTEGRITY	53
FIGURE 2-4. SRTA CONJUGATED PAPMV-SRTA-T20 INDUCES STRONG T20 SPECIFIC ANTIBODY RESPONSES	54
FIGURE 2-5. PAPMV-SRTA-M2E INDUCES SPECIFIC M2E IMMUNITY WITH PROTECTION AGAINST INFLUENZA INDUCED MORBIDITY AND MORTALITY	55
FIGURE S2-1. ANTI-M2E IMMUNITY INDUCED AFTER THE FIRST IMMUNIZATION OF PAPMV-SRTA-M2E.....	57

Liste des abréviations et des sigles

A β	Amyloïde bêta
AIMV	Alfalfa mosaic virus
ATL	Adult T-cell leukemia-lymphoma
AMCV	Artichoke mottled crinkle virus
APC	Antigen-presenting cell Cellules présentatrice d'antigène
BaMV	Bamboo mosaic virus
CCMV	Cowpea Chlorotic Mottle Virus
CdMV	Cardamom mosaic virus
CD4+	Lymphocyte CD4+
CD8+	Lymphocyte CD8+
CMV	Cucumber Mosaic Virus
COPV	Canine oral papillomavirus
CP	Coat protein Protéine de capsid
CPMV	Cowpea Mosaic Virus
CPV	Canine parvovirus
CRPV	Cottontail rabbit papillomavirus
CS	Circumsporozoite protein
CSFV	Classical swine fever virus
CTLs	Cytotoxic T Lymphocytes Lymphocytes T cytotoxiques
CymRSV	Cymbidium ringspot virus
DC	Dendritic cells Cellules dendritiques
Den2E	Dengue Type 2 envelope protein Protéine d'enveloppe du virus de Dengue de type-2
Der p 1	<i>Dermatophagoides pteronissinus</i> peptidase 1
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ENV	Protéine d'enveloppe du HIV
ESAT-6	Early secreted antigenic target-6
E1	Enveloppe glycoprotein 1
E2	Enveloppe glycoprotein 2

E7	Early protein 7
FMDV	Foot and mouth disease virus
FnBP	Fibronectin binding protein
HRV1	Hypervariable region 1
HA	Hémagglutinine
HAV	Hepatitis A virus Virus de l'hépatite A
HBV	Hepatitis B virus Virus de l'Hépatite B
HCC	Hématocellular carcinoma
HCMV	Human cytomegalo virus Cytomégalovirus humain
HCV	Hepatitis C virus Virus de l'Hépatite C
HEV	Hepatitis E virus Virus de l'Hépatite E
HIV	Human immunodeficiency virus Virus de l'immunodéficience humaine
HPV	Human papilloma virus Virus papillome humain
HRV	Human rhinovirus Rhinovirus humain
HTLV	Human T-cell leukemia virus-1
IFN	Interféron
IL	Interleukine
JEV	Japanese encephalitis virus
JGMV	Jackson grass mosaic virus
LAH	Long alpha helix of HA protein
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
M1	Matrix 1 protein
M2e	Matrix 2 extracellular domain
MOMP	Major outer membrane protein
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
NP	Nucléoprotéine
NS3	Non-structural protéin 3
ORF	Open reading frame Cadre de lecture ouvert

ROPV	Rabbit oral papillomavirus
PA	Anthrax protective antigen
PapMV	Papaya mosaic virus Virus mosaïque de la papaye
PapMV-sM2e	Virus mosaïque de la papaye portant l'épitope EVEPTIRNE de M2e au N-terminus
PapMVCP-M2e	Virus mosaïque de la papaye portant l'épitope M2e au C-terminus
PapMV-SrtA	Virus mosaïque de la papaye portant le motif de reconnaissance LPETGG de la Sortase A au C-terminus
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells Cellules mononucléaires du sang périphérique
PhMV	Physalis mottle tymovirus
PPV	Plum pox virus
Prt	Protéases
PVX	Potato virus X
PVY	Potato virus Y
RTA	Ricin toxin chain A
RSV	Respiratory syncytial virus Virus respiratoire syncytial
S.O	Sans objet
SrtA	Sortase A
SUV	Subunit vaccine Vaccin sous-unitaire
TACA	Tumor-associated carbohydrate antigen
TBSV	Tomato bushy stunt virus
TFF	Tangential Flow Filtration
TLRs	Toll like receptors
TMV	Tabacco mosaic virus
TuMV	Turnip mosaic virus
VEGFR-3	Vascular endothelial growth factor receptor 3
VLP	Virus-like particles Pseudoparticule virale
VNP	Virus-based nanoparticule
VP1	Viral protein 1
VP2	Viral protein 2
wIBDV	Very virulent Infectious Bursal disease virus
V3	Third variable loop of gp120 (HIV)

*À monsieur le docteur Jean-Louis Michaud,
Rabah Hammachin et Remy Aubin*

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur Denis Leclerc qui a cru en moi depuis le début lors de mon premier stage d'été en 2012, pour toutes les opportunités données (comme un congrès au Portugal!) et qui continue à me donner l'opportunité de m'épanouir dans son laboratoire pour mon doctorat.

Ces deux années ont été remplies d'échecs desquels on s'est relevés pour donner fruit à de grands accomplissements scientifiques, professionnels et personnels. Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné dans cette aventure : Annie Guérin pour sa sagesse avec les souris et sa continuelle bonne humeur, Caroline Garneau pour toutes les heures passées à regarder un TFF pour mes protéines et nombreux homogénéiser, Marilène Bolduc et Marie-Ève Laliberté-Gagné pour leurs conseils et leur soutien; Gervais Rioux et toute sa magnifique collection de t-shirt pour leur aide et support constant dans le laboratoire ainsi que dans la création de Medusaland, Damien Carignan, Ô maître des abstracts, notre Wikipédia ambulante, pour ses grandes connaissances et réponses à toutes mes questions aussi stupides qu'elles semblent, Alexis Russell pour les jeux de catch interrompu par les étudiants chercheurs d'un jour et pour ses blagues continues, Sabrina Bossé pour tous les muffins et la cuisine de procrastination, mais plus particulièrement pour sa bonne humeur et ses encouragements continus (we've got this), Denise St-Onge pour les sorties improvisées chez chocolat favoris pour se remonter le moral même quand il était haut et finalement, Vanessa Collin pour nos soirées d'études qui m'ont aidé à finir ce mémoire à temps.

J'aimerais remercier tout spécialement mes professeurs du baccalauréat en biotechnologie à La Cité qui nous ont toujours poussés à nous surpasser, à donner notre 200%, et sans qui je ne sais pas si je serais ici aujourd'hui à déposer mon mémoire.

Enfin, un gros merci à Louis Gauthier-Landry qui était toujours là pour me rassurer et me supporter dans mes crises de stress mal placées.

Avant propos

Le projet présenté sous forme d'article dans ce mémoire est le résultat de mes deux ans de maîtrise. Le projet a été entièrement dirigé par moi-même, avec la supervision de mon directeur de recherche Denis Leclerc, et j'en suis donc l'auteure principale.

J'ai effectué toutes les expériences nécessaires à la réalisation de ce projet seule ou avec assistance au besoin. Damien Carignan et Gervais Rioux m'ont entre autres aidé à réaliser les différents protocoles en souris. Marilène Bolduc et Marie-Ève Laliberté-Gagné ont contribué à la production et purification des mes protéines PapMV-SrtA et m'ont fourni les autres protéines de références (nanoparticules du PapMV natif et PapMV-sM2e) utilisées dans ce projet. Elles et Pierre Savard ont révisé mes protocoles de production et de purification de protéine afin qu'ils répondent aux critères demandés. Chacun a contribué à un moment ou un autre au processus de réflexion et de prise de décision par rapport à l'orientation et l'avancement de mon projet.

Le manuscrit de l'article présenté dans ce mémoire a été entièrement rédigé par moi-même. Denis Leclerc a supervisé et révisé le manuscrit. Gervais Rioux et Damien Carignan m'ont apporté des suggestions et commentaires pertinents pour améliorer mes propos tout au long de la rédaction. Ainsi le titre de coauteurs leur a été décerné. Le présent manuscrit n'a pas encore été soumis à un journal de révision par les pairs. Nous travaillons sur l'obtention d'une dernière figure à ajouter au manuscrit avant de pouvoir le soumettre. Nous espérons pouvoir soumettre le manuscrit complété d'ici la fin de l'été 2016.

Chapitre 1 : Introduction

1. La vaccination

La vaccination est encore à ce jour considérée comme l'un des plus grands avancements et succès de la médecine moderne (Zhao et al., 2014). Elle représente l'intervention en santé publique la plus efficace dans le contrôle et la prévention de maladies infectieuses (Kushnir, Streatfield, & Yusibov, 2012). Les programmes de vaccination ont permis l'éradication de la variole et ont considérablement réduit le taux de mortalité et morbidité associée à d'autres maladies infectieuses (comme la poliomyélite, la rougeole, les oreillons, la rubéole, l'influenza, l'hépatite A) (Plummer & Manchester, 2011). Les technologies traditionnelles utilisées en vaccination contre des maladies infectieuses sont principalement basées sur les pathogènes atténués ou les pathogènes physiquement ou chimiquement inactivés (Kushnir et al., 2012; Plummer & Manchester, 2011). Ces technologies ne sont pas sans dangers. Le risque d'inactivation incomplète ou de réversion du pathogène atténué peut mener au développement de la maladie chez le patient vacciné (Noad & Roy, 2003). De plus, la vaccination avec les pathogènes atténués peut causer la maladie chez les gens immunodéficients ou encore causer divers effets indésirables chez les patients (Huang, Wu, & Tying, 2004; Noad & Roy, 2003). La production de ces vaccins occasionne d'autres risques. En effet, la production de pathogène/virus pour les vaccins nécessite une infection active. Or, ces vaccins vivants atténués ou inactivés nécessitent la croissance des pathogènes cibles dangereux en laboratoire mettant les travailleurs à risque d'exposition. Le virus de l'influenza doit être produit dans les embryons fertilisés, un travail coûteux et laborieux s'étalant sur plusieurs mois, générant des doses de vaccins limitées. Pour d'autres pathogènes la culture est impossible et il n'est donc pas envisageable de produire des vaccins traditionnels pour ceux-ci (Ma & Li, 2011).

Bien que ces vaccins traditionnels aient connu de grands succès pour certains pathogènes, pour de nombreux autres, ces technologies ne fonctionnent pas (Lee, Twyman, Fiering, & Steinmetz, 2016; Ludwig & Wagner, 2007). Par exemple, le virus de l'influenza A qui possède un haut taux de mutation nécessite une reformulation annuelle du vaccin. De plus, les vaccins contre l'influenza sont faiblement immunogéniques et ne possèdent qu'une efficacité partielle contre les différentes souches circulantes (Coughlan, Mullarkey, & Gilbert, 2015; de Vries, Altenburg, & Rimmelzwaan, 2015; Kesik-Brodacka & Plucienniczak, 2014; Han Zhang, Wang, Compans, & Wang, 2014). En effet, la réponse neutralisante sollicitée par les vaccins inactivés ou atténués n'est pas efficace contre les virus qui modifient constamment leurs antigènes de surfaces. Ce mécanisme d'évasion de la neutralisation contourne l'immunité générée par ces vaccins et les rend inefficaces (Leclerc et al., 2007). De nombreux pathogènes occasionnant de sévères symptômes, tel que les virus de

l'immunodéficience humaine (HIV), de fièvres hémorragiques comme l'ébola, etc., ne peuvent toujours pas être contrôlés par des vaccins (Lee et al., 2016; Ludwig & Wagner, 2007). Les risques associés aux technologies vaccinales traditionnelles, la difficulté de production et leur efficacité partielle démontrent de l'importance du développement de nouvelles approches vaccinales plus sécuritaires et efficaces.

1.1. Les vaccins sous-unitaires

Les nouvelles avancées technologiques dans le domaine de l'ingénierie génétique et de l'ADN recombinant ont mené au développement de vaccins sous-unitaires (SUVs) (Kushnir et al., 2012). Les SUVs sont basés sur l'utilisation d'une ou plusieurs composantes spécifiques de l'agent pathogène cible, plutôt que le pathogène entier (Kushnir et al., 2012). Les composantes structurales du pathogène, sont souvent ciblées par les SUVs. Par exemple, chez les virus, les protéines de surface du virus cible seront utilisées pour le vaccin tandis que les polysaccharides présents à la surface du pathogène bactérien seraient utilisés dans un SUVs (Dudek, Perlmutter, Aguilar, Croft, & Purcell, 2010). Chez les bactéries, les toxines inactivées peuvent aussi être utilisées comme agents vaccinaux (M.-G. Kim et al., 2014). Les SUVs peuvent être composés de peptides/protéines recombinantes ou résulter d'une purification des composantes virales. Par exemple, le vaccin sous-unitaire contre l'Influenza A où les protéines HA et NA ont été purifiées pour éliminer toutes les autres composantes virales (<http://www.who.int/biologicals/vaccines/influenza/en/>). Contrairement aux vaccins traditionnels, les protéines recombinantes souvent utilisées dans les SUVs peuvent facilement être produites en toute sécurité dans des systèmes d'expression recombinants. En effet, les vaccins traditionnels nécessitent une infection active pour récolter le pathogène ajoutant un niveau de risque supplémentaire pour les gens s'occupant de la production. Les systèmes recombinants (bactéries, cellules d'insectes, plantes, etc.) sont sécuritaires, économiques et très performants, permettant une grande production de doses plus rapidement. Les SUVs, avec l'élimination du potentiel de réversion et d'inactivation incomplète, sont considérés comme étant plus sécuritaires que les technologies traditionnelles basées sur les virus vivants atténués ou inactivés. Cependant, leur immunogénicité est souvent réduite avec l'élimination du matériel génétique et la structure virale comprenant les éléments importants pour déclencher une bonne réponse immunitaire (Kushnir et al., 2012; Noad & Roy, 2003; Plummer & Manchester, 2011). Ainsi, ils nécessitent de plus nombreuses administrations en plus grandes doses en plus de l'ajout d'adjuvant pour augmenter l'immunité induite contre la cible (Kushnir et al., 2012; Noad & Roy, 2003).

1.2. Les nanoparticules virales

Les nanoparticules virales constituent un avancement majeur dans le domaine des SUVs avec une immunogénicité accrue (Kushnir et al., 2012). Ces nanoparticules virales sont des unités multimériques non infectieuses de protéines structurales virales qui s'autoassemble pour former des structures qui ressemblent à celles des pathogènes natifs (figure 1-1) (Chroboczek, Szurgot, & Szolajska, 2014; Kushnir et al., 2012; Lee et al., 2016; Lua et al., 2014; Noad & Roy, 2003; Rodríguez-Limas, Sekar, & Tyo, 2013; Zeltins, 2013; Zhao et al., 2014). Elles peuvent être formées d'une ou plusieurs composantes structurales du pathogène natif. Ces particules virales peuvent être séparées en deux grandes classes soit les « virus-based nanoparticles » (VNPs) qui comprennent toutes les composantes virales y compris le génome, et les pseudoparticules virales ou « virus-like nanoparticles » (VLPs) qui sont formées seulement de composantes protéiques (Lee et al., 2016). Les VLPs sont non infectieux, mais conservent l'organisation et la conformation native du virus. L'utilisation de VNPs par rapport aux VLPs serait justifiée seulement si le virus natif ne peut se répliquer chez l'humain comme les bactériophages ou les virus de plantes (Lee et al., 2016; Steinmetz & Evans, 2007; Steinmetz, 2010). Or, même si du matériel génétique est présenté par les VNPs, celui-ci ne pourrait pas être exprimé chez l'humain.

Tout comme les virus natifs, les VNPs et VLPs sont caractérisées par une structure hautement ordonnée et répétitive permettant une bonne stimulation du système immunitaire comparativement aux protéine ou peptide seul des SUVs (Lee et al., 2016; Roldão, Mellado, Castilho, Carrondo, & Alves, 2010). C'est cette structure ordonnée et la grande répétition des épitopes viraux qui permettent une forte induction de la réponse humorale en liant plusieurs des récepteurs d'un lymphocyte B à la fois (Kushnir et al., 2012; Lee et al., 2016; Plummer & Manchester, 2011; Roldão et al., 2010). Avec leur taille de 20 à 500 nm et leur antigène exogène, les VLPs sont efficacement internalisés par les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques, permettant la stimulation et la prolifération de lymphocytes T (Fifis et al., 2004; Kushnir et al., 2012; M.-È. Lebel, Chartrand, Leclerc, & Lamarre, 2015; Lee et al., 2016; Lua et al., 2014; Manolova et al., 2008; Zeltins, 2013). Plusieurs particules virales présentent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogene associated molecular patterns- PAMPs) permettant d'activer le système immunitaire inné par leur reconnaissance par des récepteurs spécifiques (pattern recognition receptors- PRRs) (M.-È. Lebel, Chartrand, Leclerc, & Lamarre, 2015; Lee et al., 2016; Plummer & Manchester, 2011). De plus, les VNPs peuvent présenter d'autres PAMPs par l'encapsulation d'acide nucléique du génome viral permettant de stimuler des récepteurs « Toll-Like » (TLRs) de l'endosome spécifiques et induire la sécrétion de différentes cytokines inflammatoires/antivirales, telles que les interférons de type 1 (Lee et al., 2016; Plummer & Manchester, 2011). L'activation des PRRs induit une réponse spécifique à l'antigène plus forte et de plus longue durée (Jennings & Bachmann, 2008; Lee et al., 2016; Peacey, Wilson, Baird, & Ward, 2007; W. Zhang

et al., 2014). Un résumé des différentes caractéristiques immunologiques des particules virales est schématisé dans la figure 1-2.

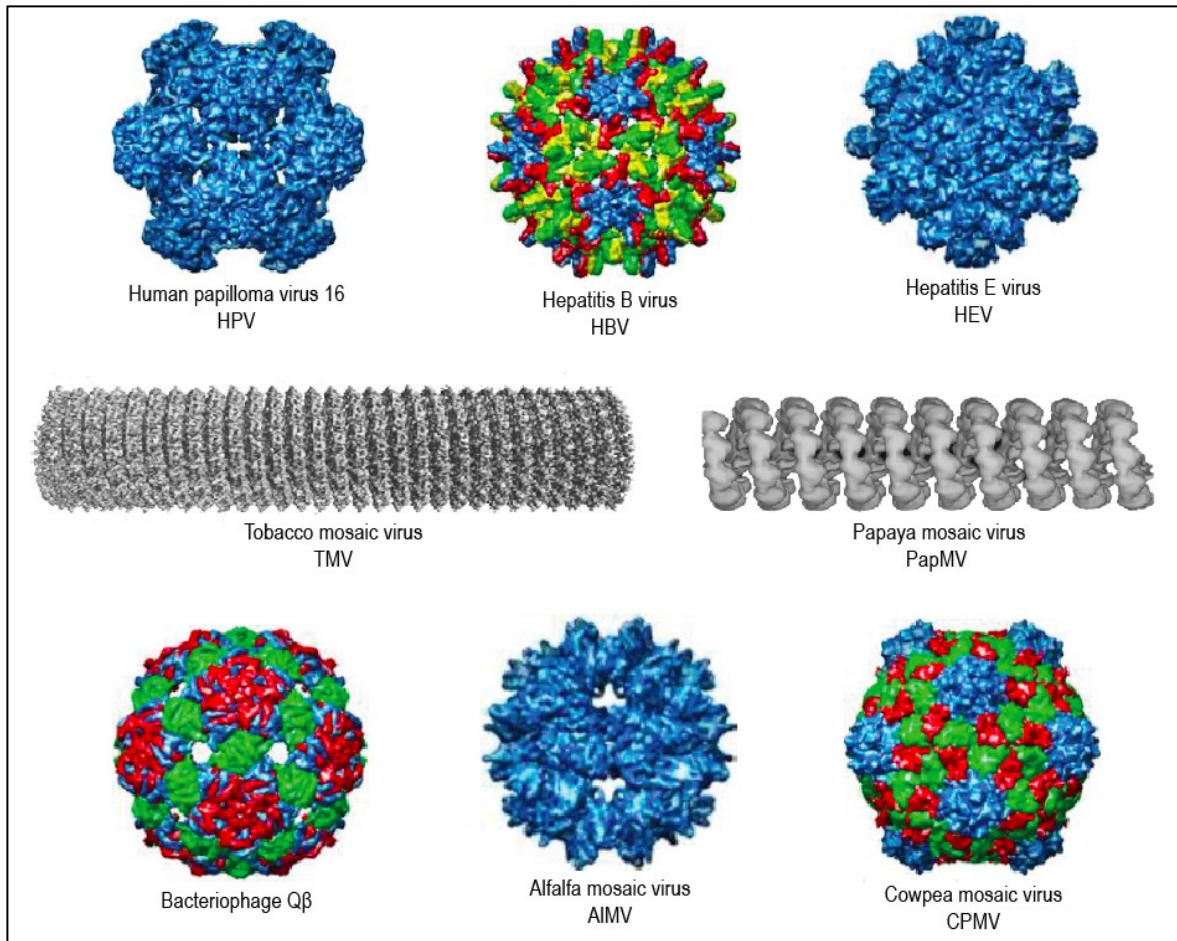


Figure 1-1. Exemples de différentes capsides virales ayant été développées comme vaccin à base de particules viral ou comme plateforme vaccinale hétérologue.

PDB IDs : Human papilloma virus 16, 1DZL; Hepatitis B capsid, 1QGT; Hepatitis E virus-like particle, 3HAG; Bacteriophage QB capsid, 1QBE; Alfalfa mosaic virus, AMV; Cowpea mosaic virus, INY7. Les images correspondantes à ces virus ont été reproduites de la base de donnée VIPERdb² (<http://viperdbscripps.edu>) (Carrillo-Tripp et al., 2009). Les images du « Tobacco mosaic virus » et du « Papaya mosaic virus » ont été réimprimées avec permission de (Sachse et al., 2007.) et (Yang et al., 2012) respectivement.

Contrairement aux SUVs, l'utilisation de nanoparticules virales ne nécessite pas obligatoirement l'ajout d'adjuvants exogènes ou l'administration de plusieurs doses pour générer une réponse immunitaire efficace (Lee et al., 2016; Ludwig & Wagner, 2007; Rodríguez-Limas et al., 2013). Les protéines composant les nanoparticules virales peuvent être efficacement produites en grande quantité dans les systèmes recombinants réduisant d'avantages les coûts associés. En effet, des particules virales ont été générées avec succès et en grande quantité par expression dans les systèmes recombinants de baculovirus, bactérie, levure,

cellule végétale et cellule de mammifère pour de nombreux virus animaux et végétaux. Avec leur caractère non infectieux, les particules virales, VLPs et VNPs, sont des candidats vaccinaux plus sécuritaires que les virus natifs tout en étant hautement immunogéniques (Chroboczek et al., 2014; Rodríguez-Limas et al., 2013). Actuellement, il existe trois vaccins basés sur l'utilisation de VLPs sur le marché: les vaccins contre l'hépatite B (HBV), le virus du papillome humain (VPH) et plus récemment le vaccin contre l'hépatite E approuvé pour la mise en marché en Chine (M.-È. Lebel et al., 2015; Tan & Jiang, 2014).

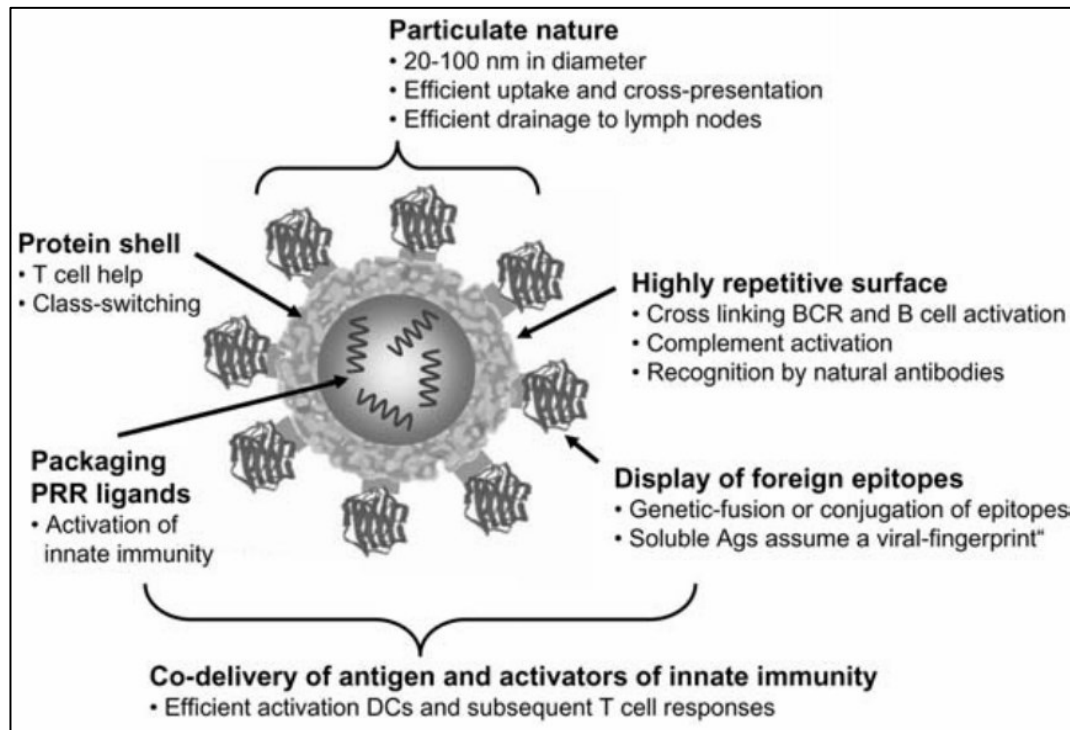


Figure 1-2. Résumé des différentes propriétés immunologiques des particules virales. L'image a été réimprimée avec permission de Jennings & Bachmann, 2008.

2. Les particules virales comme plateforme vaccinale

Les particules virales peuvent non seulement servir de vaccin homologue contre leur virus natif, mais peuvent aussi être adaptées en plateforme multivalente pour la présentation antigénique hétérologue (particules virales chimériques) (figure 1-2) (Chroboczek et al., 2014; Lee et al., 2016; Plummer & Manchester, 2011; Rodríguez-Limas et al., 2013; Tan & Jiang, 2014). Les protéines de capsides peuvent ainsi servir d'échafaud moléculaire pour la présentation d'antigènes étrangers et la génération d'une réponse immunitaire envers un pathogène différent (Plummer & Manchester, 2011; Roldão et al., 2010). De plus, les particules

virales, avec leurs caractéristiques immunologiques intrinsèques, montrent un potentiel adjuvant permettant d'améliorer l'immunogénicité de ces antigènes étrangers normalement faiblement immunogènes (Chroboczek et al., 2014a; Lua et al., 2014; Plummer & Manchester, 2011; Tan & Jiang, 2014). Les particules virales dirigent les antigènes aux DCs immatures et activent leur maturation. La présentation de ces particules virales chimériques permet donc la génération d'une réponse immunitaire antigène spécifique efficace pouvant mener au contrôle du pathogène ciblé.

Les particules virales sont utilisées comme plateforme dans le développement de vaccins prophylactique et thérapeutique pour augmenter la présentation antigénique ou comme adjuvant pour augmenter l'immunité (Zhao et al., 2014). Les VLPs/VNPs chimériques sont principalement utilisées en vaccinologie thérapeutique pour le traitement de cancer (Kozako et al., 2009; Y. Zhang et al., 2007). Toutefois, leur utilisation est de plus en plus explorée dans le traitement de d'autres pathologies comme des maladies neurologiques et immunologiques (McCormick et al., 2006; Ana et al., 2010; G. Feng, Wang, Qian, & Jin, 2013; Fu et al., 2015; Jin et al., 2014; Jobsri et al., 2015; Kündig et al., 2006; Kozako et al., 2009; Lin et al., 2012; Röhn et al., 2006; Sonderegger et al., 2006; Spohn et al., 2008; Wiessner et al., 2011; Z Yin, Nguyen, Chowdhury, & Bentley, 2012; Zhaojun Yin et al., 2013) (Tableau 1-1 et 1-2). Leur utilisation en vaccinologie prophylactique est appliquée dans la prévention et le contrôle de nombreuses maladies infectieuses (Tableau 1-1 et 1-2).

2.1. Plateformes vaccinales basées sur les virus animaux

Une démarche communément employée dans le développement de plateforme vaccinale est de modifier des VLPs qui sont déjà approuvées comme vaccin par les organismes de réglementation (Plummer & Manchester, 2011). Ainsi de nombreuses recherches portent sur l'insertion de différents antigènes vaccinaux sur les VLPs du HBV ou du HPV (Plummer & Manchester, 2011). Les VLPs du HBV ont été largement étudiées comme plateforme vaccinale pour la présentation antigénique hétérologue. En effet, depuis sa mise en marché en 1986 jusqu'à aujourd'hui, de nombreux antigènes vaccinaux d'intérêt, d'origine bactérienne, virale, tumorale, de maladie neurologique et immunitaire, ont été efficacement présentés sur des VLPs du HBV (protéine core et/ou l'antigène de surface) (Tableau 1-1). L'utilisation des VLPs de HBV comme plateforme vaccinale a majoritairement servi pour la génération de forte réponse humorale. En effet, la capacité des VLPs du HBV à induire de fortes réponses humorales a été mise à profit pour l'obtention d'anticorps possédant un certain pouvoir protecteur contre plusieurs infections virales telles que l'influenza, le HRV, le FMDV, la fièvre de dengue et même contre des infections bactériennes (tableau 1-1). Le potentiel thérapeutique des anticorps spécifiques générés contre les antigènes présentés par les VLPs du HBV a aussi été étudié dans le traitement de maladies immunologique tel que l'Alzheimer et l'hypersensibilité de type 1 (G.

Feng et al., 2013; Jin et al., 2014; Lin et al., 2012). Les anticorps induits par la vaccination avec des VLPs HBV-A β ont permis la réduction de la formation de plaques amyloïdes et l'amélioration des symptômes cognitifs chez des souris (Jin et al., 2014). Dans le contexte de l'hypersensibilité de type 1, les anticorps induits contre le domaine C ϵ mX des IgE étaient capables d'induire l'apoptose de cellules exprimant des IgE (Lin et al., 2012). En plus d'induire de fortes réponses humorales contre des antigènes hétérologues, certains ont démontré le potentiel de la plateforme à induire des réponses CTL dans un contexte tumoral (Kozako et al., 2009; Y. Zhang et al., 2007) ou d'infection virale (S. Chen et al., 2015; Cheong, Reiseger, Turner, Boyd, & Netter, 2009) et bactérienne (P. Jiang et al., 2015; Y. Yin et al., 2011) (tableau 1-1). Ces études ont démontré que les VLPs du HBV étaient en mesure de stimuler la prolifération de lymphocytes T CD4+ et CD8+ ainsi qu'induire la sécrétion d'IFN- γ .

D'autres études ont démontré le potentiel vaccinal de la plateforme HPV contre le HIV et l'Alzheimer (Chackerian, Rangel, Hunter, & Peabody, 2006; Dale et al., 2002; Sadeyen, Tourne, Shkreli, Sizaret, & Coursaget, 2003). Certaines études évaluent le potentiel d'autres virus comme plateforme vaccinale. Récemment, le potentiel des VLPs du HEV en tant que vaccin oral a été démontré avec différents antigènes hétérologues (Jariyapong et al., 2013; Niikura et al., 2002). Les VLPs du Norovirus P et les VLPs « penton-dodecahedron » d'adénovirus humain de type 3 (Ad3) ont aussi été démontré comme bonne plateforme vaccinale en augmentant la réponse envers divers antigènes viraux, tumoraux ainsi que provenant de l'Alzheimer (Ana et al., 2010; Fu et al., 2015; A Naskalska et al., 2009; Antonina Naskalska, Szolajska, Andreev, Podsiadla, & Chroboczek, 2013; Szurgot et al., 2013; Tan et al., 2011).

2.2. Plateformes vaccinales basées sur les bactériophages

Contrairement aux plateformes vaccinales basées sur virus animaux (HBV, HPV, HEV et etc.), les bactériophages peuvent être exploités en tant que VLP et VNP. En effet, les bactériophages ne sont pas infectieux qu'envers leur hôte naturel soit les bactéries. Or, la présence du matériel génétique ne présente aucun danger immédiat pour l'humain. Parmi les différents bactériophages utilisés comme plateforme vaccinales, les VLPs du bactériophage Q β ont été les des plus étudiées. En effet, certaines des VLPs chimériques du bactériophage Q β sont actuellement en phase clinique chez l'humain soit dans le traitement de dépendance à la nicotine (Cornuz et al., 2008; Maurer & Bachmann, 2007), l'hypertension (Tissot et al., 2008), d'allergie contre l'allergène *Der p 1* du « house dust mite » (Kündig et al., 2006), ou encore dans la prévention de maladie infectieuse telle que l'influenza A (Low et al., 2014). D'autres chimères contre diverses maladies telles que le HIV, l'Alzheimer (Chackerian et al., 2006; Wiessner et al., 2011), la leucémie (Zhaojun

Yin et al., 2013) ainsi que des maladies auto-immunes (Röhn et al., 2006; Sonderegger et al., 2006; Spohn et al., 2008) sont

Tableau 1-1. Exemples d'utilisation des pseudoparticules virales (VLPs) du virus de l'hépatite B (HBV) comme plateforme vaccinale. Adapté de Lee et al., 2016; Plummer & Manchester, 2011.

Cible vaccinale	Antigène	Éléments de réponse	Références
HIV	Protéine d'enveloppe (ENV)	Anticorps anti-ENV	(Stahl & Murray, 1989)
	Épitope de la protéine gp41	Anticorps anti-gp41 à spectre large, reconnaissance de gp41 et gp160,	(Eckhart et al., 1996)
	Épitope de la protéine gp41 ou du peptide p34	Prolifération de PBMC de patients HIV positif	(Isagulians et al., 1996)
	Peptide V3 de la protéine gp120	Anticorps anti-V3	(von Brunn et al., 1993)
<i>Bacillus anthracis</i>	Épitope de la protéine PA	Anticorps anti-PA, protection partielle contre infection	(Y. Yin et al., 2008)
Influenza A	Épitope M2e	Anticorps anti-M2e, protection contre infection [partielle ou complète]	(Gao et al., 2013; Neiryck et al., 1999; Ravin et al., 2015; Tsybalova et al., 2015)
	LAH de la protéine HA	Anticorps anti-HA, production d'IFN- γ , protection contre infection	(S. Chen et al., 2015)
	Épitope CTL de la protéine M1	Production d'IFN- γ	(Cheong et al., 2009)
HCV	Épitope de la protéine core et NS3	Anticorps anti-core et anti-NS3, faible stimulation de prolifération de splénocytes	(Mihailova et al., 2006)
HRV	Épitope VP2	Anticorps anti-VP2, potentiel neutralisant <i>in vitro</i>	(Brown et al., 1991)
<i>Plasmodium falciparum</i>	Épitopes de la protéine CS	Anticorps anti-CS, prolifération de CD4+	(Birkett et al., 2002; Milich, Hughes, Jones, Sällberg, & Phillips, 2001)
FMDV	Épitope de la protéine VP1	Anticorps anti-VP1 neutralisants	(Clarke et al., 1987)

Cible vaccinale	Antigène	Éléments de réponse	Références
Virus fièvre de Dengue	Protéine d'enveloppe E (dengue type 2)	Anticorps anti-Den2E reconnaissant des cellules infectées, neutralisation <i>in vitro</i> modérée	(Arora, Tyagi, Swaminathan, & Khanna, 2013; Bisht, Chugh, Raje, Swaminathan, & Khanna, 2002)
HCMV	Épitope de la protéine de surface gp58	Anticorps anti-gp58, reconnaissance de cellules infectées	(Tarar, Emery, & Harrison, 1996)
Puumala hantavirus	Épitope de la protéine de nucléocapside (N)	Anticorps anti-N. Protection partielle contre une infection subséquente	(Koletzki et al., 2000)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Épitope ESAT-6	Anticorps anti-ESAT-6, activation des CD8+ et CD4+, production d'IFN- γ	(Y. Yin et al., 2011)
HPV	Épitope CTL de la protéine E7	Échec à engendrer une réponse CTL	(Street et al., 1999)
	Épitopes de cellule B et Th de la protéine E7	Anticorps anti-E7, production IL-2 et IL-4	(Tindle et al., 1994)
Hypersensibilité de type 1	Épitopes C ϵ mX	Anticorps anti- C ϵ mX, destruction de cellules exprimant IgE	(Lin et al., 2012)
Alzheimer	Épitope A β ₁₋₁₅	Anticorps anti-A β , Réduction des fibres A β , Diminution des plaques amyloïdes, amélioration des symptômes cognitifs	(G. Feng et al., 2013; Jin et al., 2014)
Adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL)	Peptide Tax11-19 de HTLV-1	Production d'INF- γ , prolifération de CD8+, destruction de cellules infectées	(Kozako et al., 2009)
Hepatocellular carcinoma (HCC)/ mélanome B16	Épitopes de HCC : MAGE-1(278-286aa), MAGE-3(271-279aa) ou AFP1 (158-166aa)	<i>In vitro</i> internalisation par des DCs, activation CD8+, sécrétion d'IFN- γ , réduction de croissance tumorale	(Y. Zhang et al., 2007)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Épitopes de la protéine MOMP	Anticorps anti-MOMP, production d'IFN- γ et d'IL-4, activation de cellules T cytotoxique, protection contre infection	(P. Jiang et al., 2015)

étudiés. La vaccination avec ces VLPs Q β chimériques permet l'induction d'anticorps spécifiques contre les immunogènes chimiquement liés à la surface des particules. Ces anticorps ont aussi permis de diminuer la quantité de nicotine se rendant au cerveau, d'inhiber une infection *in vitro* du SIV, de reconnaître des cellules exprimant les antigènes ou encore améliorer le pronostic des maladies auto-immunes dans les modèles animaux. Parmi d'autres bactériophages ayant été utilisés efficacement comme plateforme vaccinale, on retrouve les bactériophages M13, MS2, AP205, T7 et PP7 (Caldeira et al., 2010; Dong, Zhang, Huang, Chen, & Chen, 2015; Manoutcharian et al., 2004; Morales et al., 2008; Pastori et al., 2012; Peabody et al., 2008; Pouyanfard, Bamdad, Hashemi, Bandehpour, & Kazemi, 2012; H.-W. W. Wu et al., 2006).

2.3. Plateformes vaccinales basées sur les virus de plantes

De nombreux virus végétaux ont été étudiés pour leur implication dans diverses maladies chez les plantes, mais certains ont suscité beaucoup d'intérêt pour leur utilisation comme outil médical dans la livraison de molécules pharmacologiques, mais particulièrement comme plateforme vaccinale. Tout comme les VLP de virus animal et les bactériophages, les particules virales de plantes peuvent être génétiquement ou chimiquement modifiées pour présenter des antigènes hétérologues afin de générer de fortes réponses immunitaires contre ces derniers. De nombreuses particules virales (VLPs et VNPs) de plante ont été développées comme plateforme de présentation antigénique (tableau 1-2). Le « Tobacco mosaic virus » (TMV) est l'une des plateformes les plus étudiées avec le « Cowpea mosaic virus » (CPMV), « Alfalfa mosaic virus » (AIMV), « Papaya mosaic virus » (PapMV) et le « Potato X virus » (PVX) (tableau 1-2).

La vaccination avec les nanoparticules chimériques de TMV permet l'induction de réponse humorale envers divers antigènes bactériens, viraux et cancéreux (tableau 1-2). Les anticorps générés contre les antigènes des pathogènes FMDV, *P. aeruginosa*, CRPV et Influenza ont permis d'induire des niveaux de protection chez les animaux vaccinés contre les infections respectives (Gilleland et al., 2000; L. Jiang et al., 2006; J. K. Mallajosyula et al., 2014; Palmer et al., 2006; Staczek, Bendahmane, Gilleland, Beachy, & Gilleland, 2000; L. Wu et al., 2003). De plus, McCormick et al., (2006) ont démontré que les particules de TMV étaient efficacement internalisées par les cellules présentatrice d'antigènes permettant la sécrétion d'IFN- γ en réponse aux peptides CTL attachés. La vaccination du TMV avec des antigènes CTL a permis de créer un environnement favorable antitumoral améliorant la survie des souris atteintes. Tout comme le TMV, les nanoparticules (VLPs et VNPs) de CPMV, AIMV et PVX génèrent des réponses immunitaires spécifiques contre les antigènes qu'on leur attache (tableau 1-2).

Tableau 1-2. Exemples de divers virus de plante utilisés en tant que plateforme vaccinale. Adapté de Cañizares, Nicholson, & Lomonossoff, 2005; Hassani-Mehraban, Creutzburg, van Heereveld, & Kormelink, 2015; M.-È. È. Lebel et al., 2014; Lee et al., 2016; Plummer & Manchester, 2011.

Plateforme	Cible vaccinale	Antigène	Élément de réponse	Références
BaMV	vvIBDV	Épitope de la protéine VP2	Anticorps anti-VP2, protection contre une infection	(T.-H. H. Chen et al., 2012)
CCMV	Influenza	Épitope de M2e, HA,	S.O	(Hassani-Mehraban et al., 2015)
	FMDV	VP1 et/ou CP	S.O	(Hassani-Mehraban et al., 2015)
CPMV	<i>S.aureus</i>	Épitope du domaine D2 de la protéine FnBP	Anticorps anti-D2, protection contre une endocardite, stimulation <i>in vitro</i> de neutrophile et de macrophage par <i>S.aureus</i> opsonisé	(Rennermalm et al., 2001)
	CPV	Épitope de la protéine VP2	Anticorps anti-VP2, protection contre une infection subséquente <i>in vivo</i> , neutralisation du virus <i>in vitro</i>	(Langeveld et al., 2001)
	<i>P.aeruginosa</i>	Épitopes de la protéine F de la membrane externe	Anticorps anti-OMF, reconnaissance des différentes souches Fisher-Devlin de <i>P.aeruginosa in vitro</i> , liaison du complément aux anticorps induits et stimulation de neutrophile humain <i>in vitro</i>	(Brennan, Jones, Gilleland, et al., 1999)
	<i>P.aeruginosa</i>	Épitopes de la protéine F de la membrane externe	Anticorps anti-OMF, protection <i>in vivo</i> contre deux souches différentes, stimulation <i>in vitro</i> de neutrophile par <i>P.aeruginosa</i> opsonisé	(Brennan, Gilleland, et al., 1999)
	HRV-14	Épitope Nim-1A de la protéine de capsid VP1	Anticorps anti-HRV, reconnaissance du virus intact <i>in vitro</i>	(Taylor et al., 2000)

Plateforme	Cible vaccinale	Antigène	Élément de réponse	Références
CPMV	Mink enteritis virus	Épitope de la protéine VP2	Anticorps anti-VP2, protection contre une infection subséquente	(Dalsgaard et al., 1997)
TMV	FMDV	Épitopes de VP1	Anticorps anti-FMDV, neutralisation <i>in vivo</i> , protection contre une infection	(L. Wu et al., 2003)
	<i>P.aeruginosa</i>	Épitopes de la protéine F de la membrane externe	Anticorps anti-OMF, reconnaissance des différentes souches Fisher-Devlin de <i>P.aeruginosa in vitro</i> , protection contre une infection subséquente	(Gilleland et al., 2000; Staczek et al., 2000)
	Murine hepatitis virus	Épitope 5B19 de la protéine S2	Anticorps anti-5B19, protection contre une infection létale	(Koo et al., 1999)
	Influenza	HA chimiquement conjugué au TMV	Anticorps anti-HA, inhibition de l'hémagglutination, protection contre une infection subséquente	(V. V. A. Mallajosyula et al., 2014)
	COPV	Protéine L2	Anticorps anti-L2	(Smith et al., 2006)
	CRPV/ROPV	Épitopes de la protéine L2	Anticorps anti-L2, neutralisation CRPV <i>in vitro</i> , protection contre une infection de CRPV <i>in vivo</i>	(Palmer et al., 2006)
	FMDV	Épitopes F11 et F25 de la protéine VP1	Anticorps anti-VP1, reconnaissance du virus <i>in vitro</i> , protection contre une infection subséquente	(L. Jiang et al., 2006)
	FMDV	Épitopes de la protéine VP1	Anticorps anti-VPI, protection contre une infection subséquente	(L. Wu et al., 2003)
	Mélanome B16	Épitope de OVA et p15e	Internalisation par les DCs, sécrétion d'IFN- γ , amélioration de la survie	(McCormick et al., 2006)
	Leucémie	Antigène Tn (TACA)	Anticorps anti-Tn, reconnaissance <i>in vitro</i> de différents antigènes TN synthétique, reconnaissance <i>in vitro</i> de cellules Jurkat	(Z Yin et al., 2012)

Plateforme	Cible vaccinale	Antigène	Élément de réponse	Références
AIMV	Rabies virus	Épitope G5-24 de la glycoprotéine	Anticorps anti-G5-24, neutralisation <i>in vitro</i> , protection partielle contre une infection subséquente (Modelska)	(Modelska et al., 1998)
	Rabies virus	Antigène Drg24 contenant les épitopes G5-24 de la glycoprotéine et 31D de la nucléoprotéine	Anticorps anti-Drg24, reconnaissance du virus inactivé <i>in vitro</i> , neutralisation <i>in vitro</i>	(Yusibov et al., 1997)
	HIV	Boucle V3 de l'isolat HIV-1/MN	Anticorps anti-V3, neutralisation <i>in vitro</i>	(Yusibov et al., 1997)
	Plasmodium falciparum	Protéine Pfs25	Anticorps anti-Pfs25, inhibition complète de la transmission jusqu'à 6 mois	(Jones et al., 2013)
	<i>Bacillus anthracis</i>	Épitope PA-D4s	Anticorps anti-PA, reconnaissance <i>in vitro</i> de l'antigène PA natif	(Brodzik, Bandurska, Deka, Golovkin, & Koprowski, 2005)
	RSV	Peptide de la protéine G	Réponse humorale et cellulaire contre l'épitope <i>in vivo</i> , stimulation <i>in vitro</i> de DCs humaines et induction de cellules T CD4+, CD8+ et CD56+ (NK)	(Yusibov et al., 2005)
CMV	HCV	Épitope R9 de la protéine E2	Anticorps anti-R9, induction de la sécrétion d'IFN- γ , IL-15 et IL-12 p70 par les PBMCs de patients HCV positifs, production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8+ de patients HCV positif	(Piazzolla et al., 2005)
	HCV	Épitopes R9 de la protéine E2	Reconnaissance des particules R9 et 2R9-CMV par le sérum de patient HCV positif, induction de la production d'IFN- γ par les PBMCs de patients HCV positifs	(Nuzzaci et al., 2007)
PapMV	LCMV	Épitope p33	Induction de lymphocytes T CD8+ spécifiques, protection contre une infection subséquente	(Lacasse, Denis, Lapointe, Leclerc, & Lamarre, 2008)

Plateforme	Cible vaccinale	Antigène	Élément de réponse	Références
PapMV	HCV	Épitope de la protéine E2	Internalisation des particules PapMV-E2 par les DCs humaines, anticorps anti-E2 de longue durée	(Denis, Majeau, Elizabeth, et al., 2007)
	Influenza A	Épitope de la protéine NP	Réponse cellulaire T CD8+ spécifique	(Babin, Majeau, & Leclerc, 2013)
	Influenza A	Épitope M2e	Anticorps anti-M2e, protection contre une infection subséquente	(Denis, Elizabeth, et al., 2008)
	Influenza A	Épitope EVEPTIRNE de M2e	Anticorps anti-M2e, protection complète contre une infection subséquente	(Carignan et al., 2015)
	Influenza A	Épitope HA11 de la protéine HA	Anticorps anti-HA11	(Rioux, Babin, Majeau, & Leclerc, 2012)
PVX	HIV type 1	Épitope ELDKWA de gp41	Anticorps anti-gp41, activité neutralisante <i>in vitro</i>	(Marusic et al., 2001)
	Influenza A	Épitope H-2D ^b ASNENMETM de la protéine NP	Activation des lymphocytes T CD8 +, production d'IFN- γ	(Lico et al., 2009)
	HCV	Épitope R9	Anticorps anti-R9, reconnaissance des particules PVX-R9 par le sérum de patients HCV positif	(Uhde-Holzem, Schlösser, Viazov, Fischer, & Commandeur, 2010)
	CSFV	Épitopes de la protéine E2	Anticorps anti-E2	(Marconi et al., 2006)
	Lymphome BCL1	Antigène tumorale idiotypic (Id) d'immunoglobulin (Ig) de lymphome de cellules B	Anticorps anti-Id, activation des DCs, sécrétion IL-12 et IFN- α , amélioration de la survie	(Jobsri et al., 2015)
PVX	<i>S.aureus</i>	Épitope du domaine D2 de la protéine FnBP	Anticorps anti-FnBP, inhibition de la liaison de la fibronectine	(Brennan, Jones, Longstaff, et al., 1999)
PPV	CPV (canine parvovirus)	Épitope 2L21 de la protéine VP2	Anticorps anti-2L21 et anti-CPV, neutralisation virale <i>in vitro</i>	(Fernández-Fernández, Martínez-Torrecedrada, Casal, & García, 1998)

Plateforme	Cible vaccinale	Antigène	Élément de réponse	Références
PhMV	FMDV	Épitopes 3B1, 3B2, 3AB, 3D et 3ABD de protéine non structurales	Réactivité avec l'anticorps polyclonal anti-3AB, détection d'anticorps anti-NSP chez des animaux infectés	(Hema et al., 2007)
TuMV	S.O	Épitope de la protéine VEGFR-3	Anticorps anti-VEGFR-3	(Sánchez, Sáez, Lunello, & Ponz, 2013)
TBSV	HIV	Épitope de la boucle V3 de la protéine gp120	Reconnaissance des particules TBSV-V3 par le sérum de patients HIV positifs	(Joelson et al., 1997)
	Bioterrorisme	Épitope de la chaîne A de la toxine ricin (ricin toxin chain-A; RTA)	Anticorps anti-RTA, reconnaissance de la toxine native	(Kumar et al., 2009)
JGMV	Japanese encephalitis virus	Peptides A, B, C, D	Anticorps anti-peptide et anti-JEV, induction d'anticorps neutralisant par JGMV-A <i>in vivo</i>	(Saini & Vрати, 2003)
AMCV	HIV	Épitope 2F5	Reconnaissance des particules AMCV-2F5 par l'anticorps neutralisant humain 2F5 (mAB 2F5)	(Arcangeli, Circelli, & Donini, 2014)
CymRSV	S.O	Épitope de la protéine Myc	Reconnaissance des particules CymRSV-Myc par un sérum Myc-spécifique	(Rubino, Stradis, Russo, & Martelli, 2011)
CdMV	HIV	Épitope de la protéine gp41	Reconnaissance des particules par le sérum de patient HIV positif, production d'IL-6, IL-10, IL-8, IL-1 β , MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES par les PBMC de patients HIV positifs	(Damodharan, Gujar, & Pattabiraman, 2013)
PVY	HBV	Épitope preS1	S.O	(Kalnciema, Skrastina, Ose, Pumpens, & Zeltins, 2012)
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Protéine Rubredoxin (RBX)	S.O	

2.3.1. Le virus mosaïque de la papaye comme plateforme vaccinale

Le virus mosaïque de la papaye (PapMV) est un virus filamenteux flexible appartenant à la famille des *Flexiviridae* du genre *Potexvirus* (Adams et al., 2004). Les particules virales du PapMV sont formées de 1200 copies de la protéine de capsid (CP) (Hong Zhang, Todderud, & Stubbs, 1993) entourant un ARN simple brin à polarité positive de 6656 nucléotides (Sit, Abouhaidar, & Holy, 1989). Les particules virales formées possèdent une forme de bâtonnet d'une longueur de 500 nm et d'un diamètre de 13 nm (Hong Zhang et al., 1993). En laboratoire, la CP du PapMV peut être facilement exprimée et produite dans un système de production bactérien tel qu'*E.coli*. Le remplacement de l'ARN viral du PapMV par un ARN non codant permet de générer des VLPs non infectieuses conservant la structure cristalline du virus natif. L'assemblage *in vitro* des CPs du PapMV avec un ARNsb non codant de plus petite masse moléculaire que celui du virus sauvage génère des VLPs d'environ 15x100 nm (Figure 1-3). Cela élimine les risques associés à la réplication de l'ARN virale dans les cellules humaines. L'encapsidation de l'ARN par les CP du PapMV assure la livraison de l'ARN intact dans l'endosome des APCs qui ingère les VLPs du PapMV telles que les cellules dendritiques (Lacasse et al., 2008). Une fois dans l'endosome, le changement de pH et les protéases dénaturent les VLPs et libèrent l'ARN encapsidé. L'ARN simple brin du PapMV, un PAMP, agit sur le "toll like receptor 7" (TLR7) dans l'endosome pour activer la cellule et induire la sécrétion de différentes cytokines telles que l'interféron de type-1 (figure 1-4) (M.-È. Lebel et al., 2014).

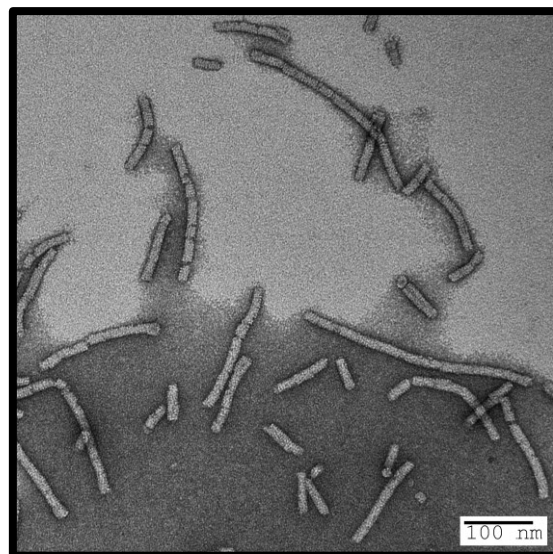


Figure 1-3. Image de microscopie électronique à transmission des VLPs de PapMV produites *in vitro*.

Comme illustrées dans le tableau 1.2, les nanoparticules du PapMV ont été utilisées comme plateforme vaccinale avec succès à plusieurs reprises. La fusion d'épitope en N ou C terminal de la CP permet l'obtention de VNPs chimériques immunogéniques menant à l'activation du système immunitaire (Babin et al., 2013; Carignan et al., 2015; Denis, Acosta-Ramirez, et al., 2008; Denis, Majeau, Acosta-Ramirez, et al., 2007; Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007; Rioux, Babin, et al., 2012). Cette forte réponse humorale induite par la vaccination avec des VNPs de PapMV chimériques permet une protection contre une infection virale subséquente (Carignan et al., 2015; Denis, Acosta-Ramirez, et al., 2008). En effet, la fusion d'un court épitope dérivé de M2e ou M2e au complet protège les souris immunisées contre une infection à l'influenza (Carignan et al., 2015; Denis, Acosta-Ramirez, et al., 2008).

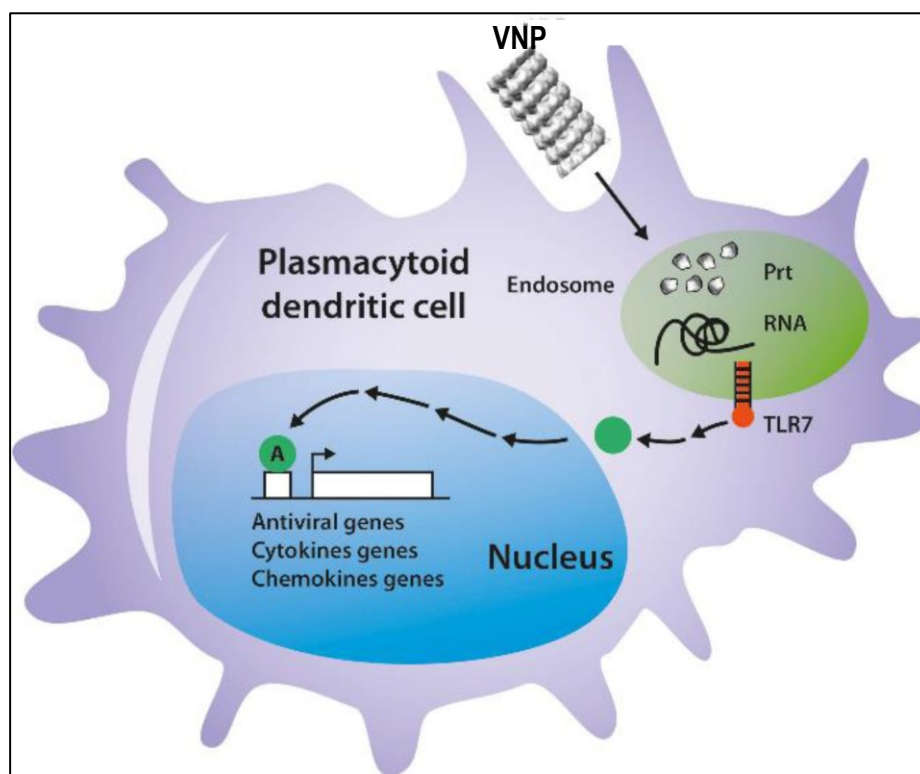


Figure 1-4. Schématisation du mécanisme d'activation de cellules immunitaires par les VNPs du PapMV. Les VNP du PapMV sont internalisés par les cellules présentatrices d'antigène par endocytose. Dans l'endosome, l'acidification et les protéases dénaturent les VNPs libérant l'ARN. L'ARN du PapMV engage le récepteur endosomal TLR7 activant une cascade de signalisation menant à l'activation de la cellule et à la sécrétion de cytokines telles que l'interféron de type 1.

Les VNPs chimériques du PapMV possèdent l'avantage de pouvoir efficacement stimuler les deux bras du système immunitaire soit l'immunité humorale et cellulaire cytotoxique (CTL), une caractéristique recherchée pour une plateforme vaccinale. En effet, des VNPs de PapMV portant des épitopes CTL induisent l'activation et la prolifération de lymphocytes T CD8+ antigène spécifique (Babin et al., 2013; Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007). Des VNPs de PapMV portant des épitopes CTL dérivés de la protéine M1 de l'influenza et de la protéine gp100 d'un mélanome humain, induisent la présentation croisée des épitopes sur les CMH de classe 1 d'APCs (Leclerc et al., 2007). Cette présentation permet l'activation et la prolifération de cellules T CD8+ antigène spécifique (Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007). Cette prolifération rapide de lymphocytes T CD8+ antigène spécifique, induite par les VNPs du PapMV portant des épitopes CTL, conduit à la protection contre une infection au virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (Lacasse et al., 2008).

3. Méthodes de modification traditionnelles des particules virales

Deux techniques sont communément employées pour générer des particules chimériques : (1) la fusion génétique et (2) la conjugaison chimique. La fusion génétique a été largement utilisée pour l'insertion de peptides. L'insertion de séquences peptidiques exogènes dans les composantes structurales de particules virales par ingénierie génétique permet l'expression d'un exemplaire de cet antigène par copie de protéine structurale. Autrement dit, pour une particule virale qui est composée de 1500 copies de sa protéine de capsid, chacune de ces 1500 copies portera la séquence insérée par ingénierie protéique. Cependant, cette technique possède une grande limitation. La fusion génétique ne permet pas l'insertion de longues séquences protéiques. Les insertions peuvent avoir un effet sur les interactions intra et inter protéiques et nuire à l'autoassemblage de la protéine de capsid.

Alternativement, les antigènes d'intérêt peuvent être chimiquement liés aux particules virales éliminant les contraintes structurales d'assemblage. La conjugaison chimique implique la réaction d'acides aminés naturels, possédant des chaînes latérales réactives, telles que les lysines, cystéines, acide aspartiques et glutamiques et les tyrosines avec des molécules réactives telles que le N-hydroxysuccinimydryl (NHS) et autre (figure 1-5) (Lee et al., 2016). Contrairement à la fusion génétique, des molécules non peptidiques peuvent aussi être conjuguées sur les particules virales. En effet, ces techniques ont permis la conjugaison de peptides et diverses molécules biochimiques (fluorophore, polymère, acide nucléique, etc.) aux surfaces internes et externes de capsides virales (Pokorski & Steinmetz, 2011). Bien que ces techniques éliminent les différentes contraintes associées à la fusion génétique, elles sont plutôt non-spécifiques et dépendent de la présence de l'un de ces acides aminés réactifs. Si aucun de ces acides aminés n'est présent à la surface, l'un doit être

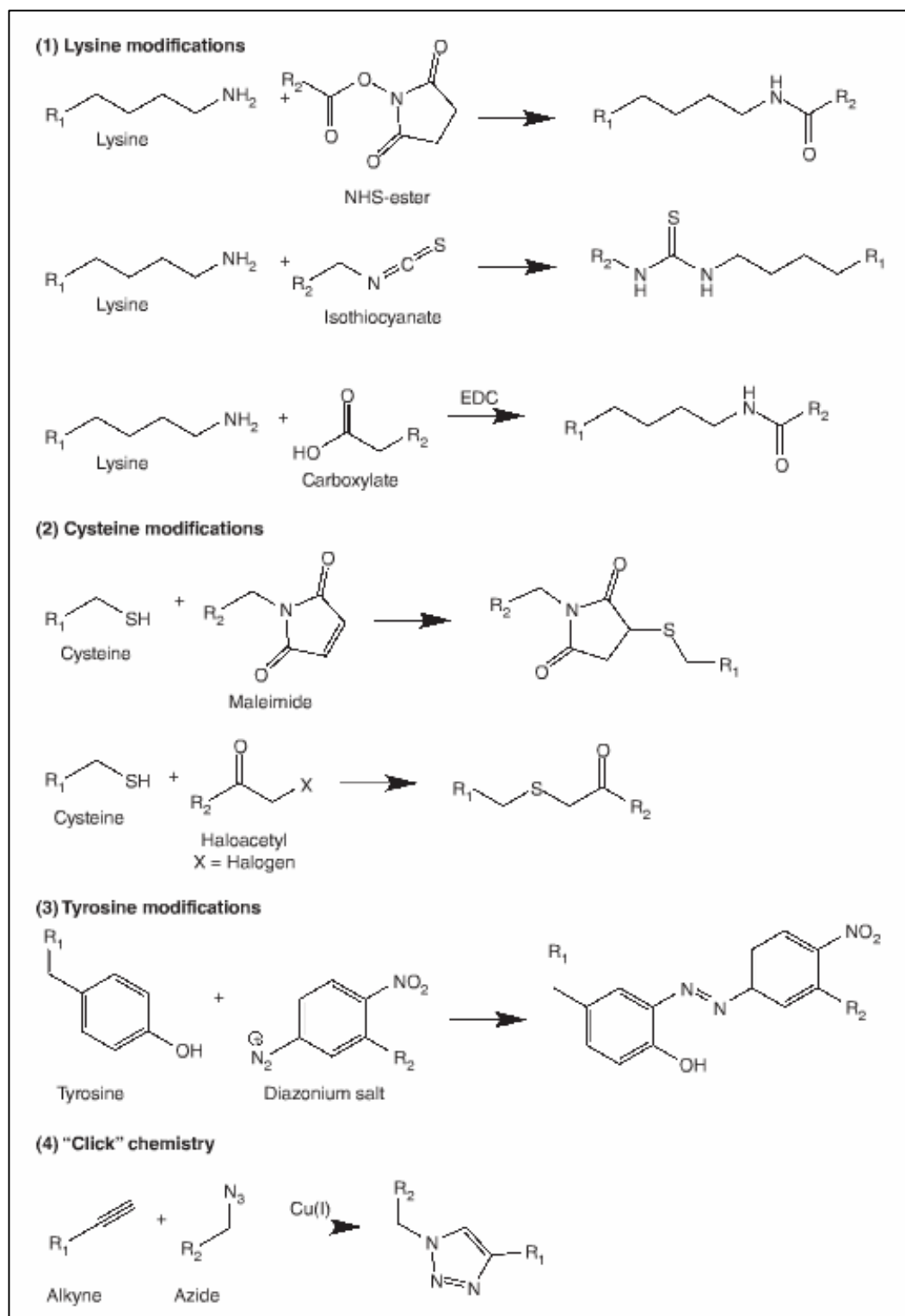


Figure 1-5. Illustration des différentes techniques de conjugaison chimique.
 NHS= N-Hydroxysuccinimide; EDC= 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide. L'image a été réimprimée avec permission de Lee et al., 2016.

inséré par mutagenèse dans la capsid (Zeltins, 2013). De plus, la conjugaison chimique ne permet pas d'obtenir une molécule ou peptide exogène par copie de protéine structurale comme par fusion génétique.

L'incorporation d'acides aminés non-naturels permet une conjugaison site-spécifique comparativement à la réaction avec les acides aminés réactionnels. Le « click-chemistry », copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC), est une technique de plus en plus populaire qui nécessite l'insertion de molécules non-naturelles dans la protéine que l'on souhaite modifier. La réaction CuAAC a lieu entre la molécule couplée à un groupement azide et la molécule couplée à un groupement alkyne en présence d'une source de cuivre (Cu) (Pokorski & Steinmetz, 2011). Cette réaction se déroule plus rapidement et avec plus de spécificité que les réactions NHS-ester (Pokorski & Steinmetz, 2011). Il existe beaucoup de substrats commerciaux conjugués avec soit un groupement azide ou alkyne contribuant à la popularité grimpe de la technique. Toutefois, l'insertion de ces groupements réactionnels dans une protéine est difficile (H. Kim et al., 2015).

L'utilisation du « click-chemistry » sur les nanoparticules demande en premier lieu l'ajout du groupement azide (ou alkyne) par réaction NHS-ester traditionnelle (Pokorski & Steinmetz, 2011). Une fois les nanoparticules fonctionnalisés avec le groupement azide, elles peuvent réagir avec le groupement alkyne conjugué à un cargo (un fluorophore par exemple) de façon hautement fidèle et efficace (Pokorski & Steinmetz, 2011). Cette technique a été utilisée pour modifier les particules virales du CPMV (Prasuhn, Yeh, Obenaus, Manchester, & Finn, 2007; Steinmetz et al., 2009) et du bactériophage Q β (Prasuhn et al., 2007; Steinmetz et al., 2009). Bien que cette technique de « click chemistry » soit hautement efficace et fidèle, elle dépend d'abord d'une réaction NHS-ester qui elle n'est pas toujours efficace. Alternativement, Strable et al., (2008) ont inséré des acides aminés non-naturels avec un groupement azide ou alkyne dans la séquence des protéines de capsid du bactériophage Q β et du HBV par réaffectation des codons. Dans tous les cas, la réaction CuAAC ne nécessite pas l'utilisation d'excès de réactifs (comme pour la réaction NHS-ester) qui est considérablement avantageux lorsqu'on utilise un réactif coûteux.

3.1. La transpeptidation catalysée par Sortase A

L'utilisation d'enzymes qui catalysent la liaison covalente de deux substrats est une solution à une liaison spécifique. Par exemple, les biotine-ligases qui ajoutent des molécules de d-biotine sur des protéines ou peptides accepteurs, ou encore les ligases d'acide lipoiique, les transglutaminases et les sortases bactériennes (Stephanopoulos & Francis, 2011). En insérant les motifs de reconnaissance de ces diverses enzymes sur les particules virales, il devient possible d'ajouter à ces dernières des antigènes d'intérêt. Parmi ces différentes enzymes, les sortases bactériennes ont été grandement utilisées pour la l'ingénierie protéique.

Les sortases représentent une famille d'enzymes membranaires catalysant des réactions de transpeptidation pour attacher diverses protéines à la surface des bactéries Gram positives (Marraffini, DeDent, & Schneewind, 2006; Proft, 2010; Sijbrandij, Cukkemane, Nazmi, Veerman, & Bikker, 2013; Z. Wu & Guo, 2012). Elles sont responsables du phénomène de « triage » (cell wall sorting) à la membrane bactérienne où les protéines de surfaces sont attachées au peptidoglycan de la membrane. Elles permettent de décorer la surface des bactéries avec diverses protéines pour favoriser l'interaction avec leur environnement (Spirig, Weiner, & Clubb, 2011).

Il existe plusieurs classes de sortases, classe A à F, possédant différentes fonctions chez la bactérie, de l'attachement de protéine pour l'adhésion cellulaire, l'évasion du système immunitaire jusqu'à la polymérisation des pilis (Figure 1-6) (Clancy, Melvin, & McCafferty, 2010). Les sortases de la classe A (SrtA) ont été étudiées extensivement du fait que la première enzyme sortase identifiée fut la SrtA de *Staphylococcus aureus* (Spirig et al., 2011). Les SrtA constituent une classe de sortase constitutive pouvant catalyser l'attachement d'un grand nombre de protéines avec des fonctionnalités bien différentes (Clancy et al., 2010; Ritzefeld, 2014; Spirig et al., 2011). Elles sont entre autres responsables de l'attachement de nombreux facteurs de virulence tels que la protéine A ou les antigènes I/II. Toutes les sortases caractérisées possèdent essentiellement le même mécanisme. La réaction de transpeptidation de la SrtA de *S.aureus* a été la plus étudiée et est la mieux comprise (Spirig et al., 2011). La SrtA de *S.aureus* reconnaît le motif de triage conservé LPXTG, où X peut être n'importe quel acide aminé, sur les protéines destinées à la membrane bactérienne. En clivant entre la thréonine et la glycine, la SrtA forme un intermédiaire acyle enzyme avec son substrat protéique. Cet intermédiaire est ensuite résolu par l'attaque d'un substrat nucléophile, typiquement le motif d'oligoglycines sur les peptidoglycans membranaire. Le mécanisme de la SrtA est illustré dans la figure 1-7.

3.1.1. Les utilisations *in vitro* de la SrtA

Le domaine transmembranaire de la SrtA peut être éliminé pour générer une forme soluble de l'enzyme, conservant toute son activité catalytique, qui peut facilement être produite chez *E.coli*. Cette forme soluble permet de facilement exploiter l'activité transpeptidase de la SrtA en solution. En modifiant les composantes que l'on souhaite lier ensemble avec les motifs LPXTG et oligoglycine respectivement, la SrtA peut catalyser leur attachement covalent. De nombreuses études démontrent ce potentiel d'exploitation de la SrtA par la modification de protéines, d'anticorps, de peptides, d'acides nucléiques, de fluorophores, de nanoparticules, etc. (Ritzefeld, 2014; Tsukiji & Nagamune, 2009). La SrtA a aussi été utilisée pour le marquage de surface et

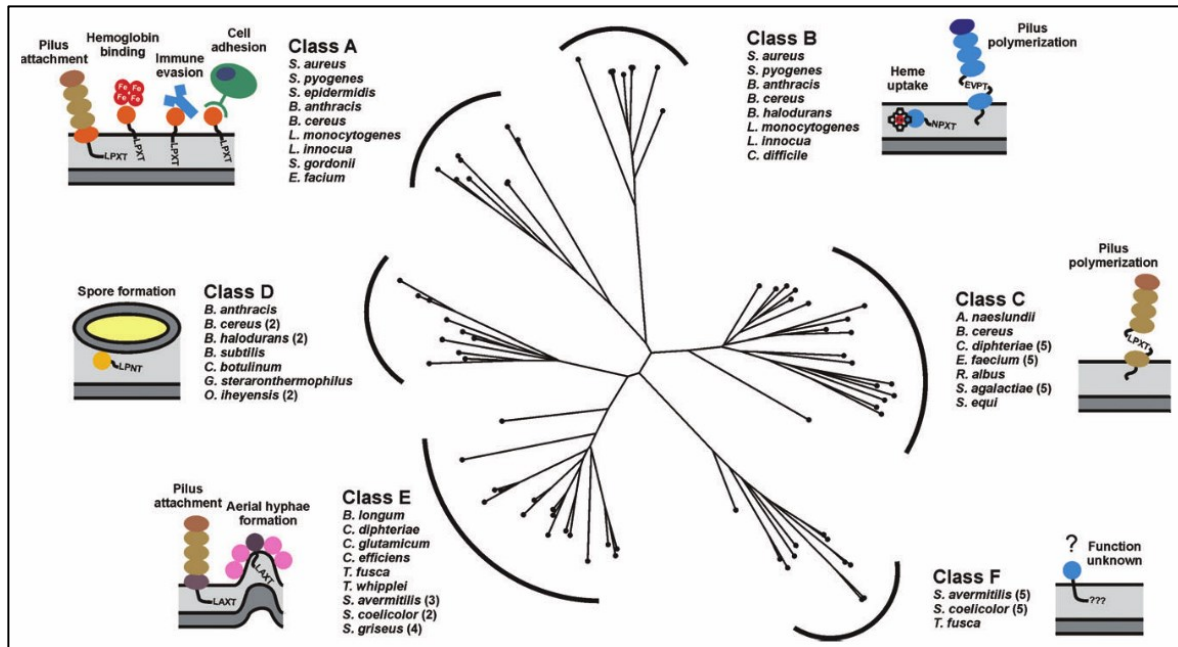


Figure 1-6. Les différentes classes de sortase et leur fonction respective. L'image a été réimprimée avec permission de Spirig, Weiner, & Clubb, 2011.

intracellulaire de cellules vivantes (Strijbis, Spooner, & Ploegh, 2012; Tanaka, Yamamoto, Tsukiji, & Nagamune, 2008; Yamamoto & Nagamune, 2009). De la même façon, les supports solides peuvent être décorés de différentes molécules telles que le PEG ou même avec des protéines (Parthasarathy, Subramanian, & Boder, 2007; Proft, 2010; Raeeszadeh-Sarmazdeh, Parthasarathy, & Boder, 2015; Sijbrandij et al., 2013). La SrtA a même été utilisée pour circulariser des peptides ou des protéines comme la GFP, ayant en N-terminal un motif oligoglycine et en C-terminal le motif de reconnaissance LPXTG (Antos, Popp, et al., 2009; Parthasarathy et al., 2007; Ritzefeld, 2014). Mao (2004) a démontré qu'il était possible d'utiliser l'activité transpeptidase de la SrtA pour la purification de protéine en une seule étape. La protéine recombinante doit présenter à son extrémité N-terminale l'agencement étiquette d'histidine-SrtA-motif de reconnaissance LPXTG (6HIS-SrtA-LPETGG-Protéine recombinante). Avec l'ajout de Ca^{2+} et de molécules d'oligoglycines sur la colonne de purification, la SrtA est activée et libère la protéine d'intérêt en couplant le motif oligoglycine au motif LPXTG. Le procédé a été appliqué à la purification de GFP, CRE et la protéine p27 (Mao, 2004). Une autre application intéressante de la SrtA est la modification de nanoparticules synthétiques et biologiques (Hata, Matsumoto, Tanaka, & Kondo, 2015; Hess et al., 2012; Schoonen, Pille, Borrmann, Nolte, & van Hest, 2015; Sun, Chen, Blackstock, & Chen, 2015). Des molécules fluorescentes et/ou protéiques ont pu être conjuguées par la SrtA à la surface de nanoparticules de la protéine E2 et du bactériophage M13 plus efficacement que par des méthodes traditionnelles (Hess et al., 2012; Sun et al., 2015). La conjugaison

de molécules portant un motif LPXTG au motif oligoglycine exprimé à l'extrémité N-terminale de la protéine de capsid du CCMV par la SrtA a permis l'encapsulation de ces molécules à l'intérieur des particules virales après l'assemblage des protéines de capsides (Schoonen et al., 2015).

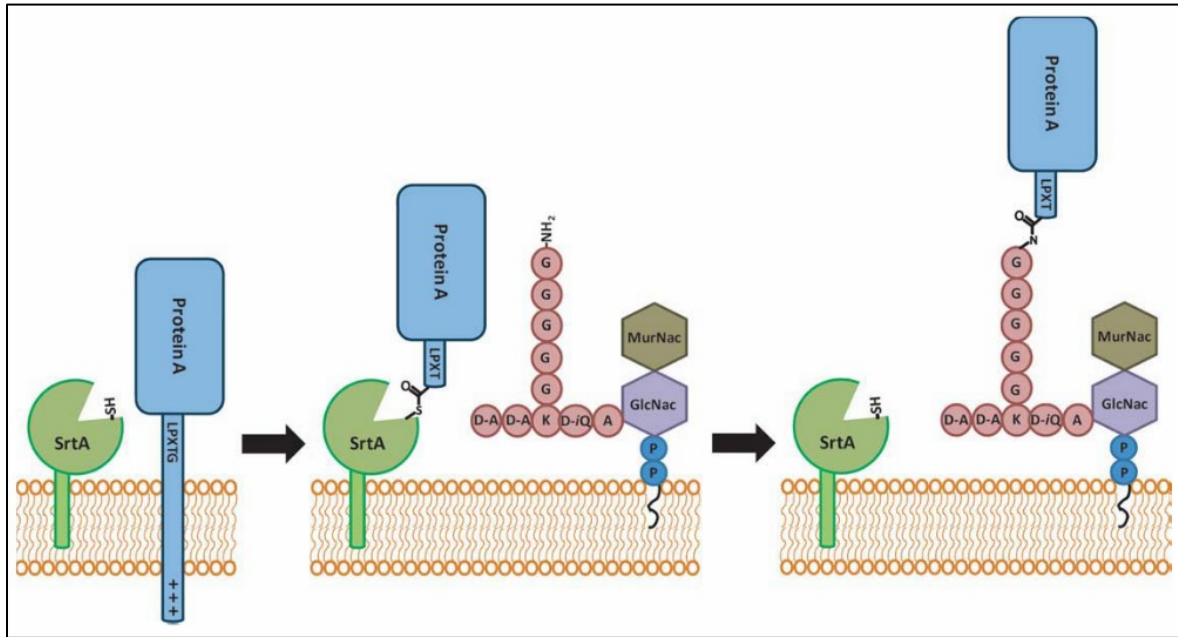


Figure 1-7. Schématisation de la réaction SrtA chez *Staphylococcus aureus*. La SrtA reconnaît la protéine A par le motif de triage conservé LPXTG. La réaction se déroule à travers la formation d'un intermédiaire acyle enzyme thioester entre la SrtA et la protéine A par le clivage du motif LPETG entre la thréonine et la glycine par la SrtA. Cet intermédiaire est résolu par une attaque du nucléophile amine du motif pentaglycine ramifié au lipide II. L'image a été réimprimée avec permission de Clancy, Melvin, & McCafferty, 2010.

Chapitre 2 : Problématique, hypothèse et objectifs

Les nanoparticules du virus mosaïque de la papaye (PapMV) ont été déjà utilisées comme plateforme vaccinale par la fusion de peptides directement dans la séquence de la protéine de capsid (CP). La vaccination avec ces nanoparticules chimériques a permis l'induction d'une réponse humorale ou cellulaire dirigée envers des peptides fusionnés à la plateforme (Babin et al., 2013; Carignan et al., 2015; Denis, Elizabeth, et al., 2008; Denis, Majeau, Elizabeth, et al., 2007; Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007; Rioux, Babin, et al., 2012). L'engagement du TLR7 par l'ARN simple brin transporté par les nanoparticules du PapMV permet de stimuler l'immunité innée, ce qui contribue au développement d'une réponse immunitaire de longue durée (Leclerc, 2014) : une caractéristique recherchée dans le développement de vaccins.

Cependant, la génération de nanoparticules chimériques du PapMV comporte des limitations. L'assemblage des CP en nanoparticules peut être affecté par l'insertion de peptides qui peuvent modifier la conformation de la CP et conséquemment la stabilité et l'immunogénicité des nanoparticules (Rioux, Majeau, & Leclerc, 2012). En effet, les modifications à l'extrémité C-terminale de la CP affectent grandement l'intégrité structurale des nanoparticules les rendant moins stables et moins immunogéniques (Rioux, Majeau, et al., 2012). L'insertion de petit antigène (peptide de 9-10 acides aminés) à l'extrémité N-terminale de la CP semble mieux tolérée et génère des nanoparticules plus immunogéniques (Carignan et al., 2015; Rioux, Majeau, et al., 2012). Toutefois, l'insertion de peptides plus longs (>10 acides aminés) en N-terminal inhibe l'autoassemblage de la CP en nanoparticules (Rioux, Majeau, et al., 2012). Dans ce contexte limitant, il serait donc souhaitable de fusionner les peptides sur les nanoparticules déjà assemblées afin de réduire les stress structuraux induits par la fusion.

Afin de fusionner des peptides à la surface des nanoparticules du PapMV et d'ainsi profiter de la structure cristalline et répétitive pour en augmenter l'immunogénicité, nous proposons d'utiliser une transpeptidase bactérienne, la SrtA de *Staphylococcus aureus*, qui permettra de connecter le peptide directement à la surface des nanoparticules. Le projet se divise en trois objectifs spécifiques : (1) ingénierie des nanoparticules du PapMV au C-terminus avec le motif de reconnaissance de la SrtA (LPETGG) afin que la séquence soit disponible à la surface, (2) valider l'efficacité du couplage de peptides de structures différentes à la surface des nanoparticules du PapMV et (3) évaluer la qualité de la réponse immunitaire dirigée envers les peptides conjugués à la surface des nanoparticules du PapMV.

Chapitre 3 : Development of a versatile vaccine platform based on papaya mosaic virus nanoparticles

Résumé

Les nanoparticules du virus mosaïque de la papaye peuvent être utilisées comme plateforme vaccinale efficace par la fusion d'antigène dans le cadre de lecture ouvert (ORF) de la protéine de capsid (CP). Bien qu'elles aient démontré un grand potentiel, la fusion d'antigène dans l'ORF peut affecter le repliement de la CP et nuire à sa capacité d'autoassemblage en nanoparticules réduisant considérablement son immunogénicité. Dans cette étude, nous avons développé une méthode alternative pour la fusion d'antigènes à la surface des nanoparticules du PapMV. Nous avons exploité une transpeptidase bactérienne (Sortase A; SrtA) de *S.aureus* pour conjuguer des antigènes vaccinaux sur les nanoparticules du PapMV post-assemblage. Les CPs exprimant le motif de reconnaissance LPETGG de la SrtA (PapMV-StrA) ont été assemblées avec succès en nanoparticules cristallines comparables à celle du PapMV natif. La SrtA a permis la conjugaison de deux longs antigènes peptidiques, soit M2e de l'influenza (27 acides aminés) et T20 du HIV (39 acides aminés), sur les nanoparticules PapMV-SrtA. Chez la souris, les nanoparticules PapMV-SrtA-T20 et PapMV-SrtA-M2e ont induit de fortes réponses humorales spécifiques à l'antigène. Les niveaux d'anticorps anti-M2e induit par PapMV-SrtA-M2e exprimant seulement 30% de peptides M2e étaient comparables à ceux induits par PapMV-sM2e qui exprime l'épitope EVETPIRNE de M2e sur chacune de ces sous-unités. Les souris vaccinées avec PapMV-Srt-A ont été complètement protégées contre une infection avec le virus de l'influenza. La technologie SrtA nous a permis de facilement et rapidement modifier les nanoparticules du PapMV avec différents antigènes vaccinaux. Étant donné que la réaction de conjugaison a lieu post-assemblage, un même lot de nanoparticules PapMV-SrtA pourrait être utilisé pour générer de nombreux vaccins. Ces résultats démontrent le potentiel de la plateforme PapMV-SrtA dans le développement de nouveaux vaccins contre diverses maladies infectieuses et immunologiques.

Development of a versatile vaccine platform based on papaya mosaic virus nanoparticles

**Ariane Thérien, Damien Carignan, Gervais Rioux, Marie-Ève Laliberté-Gagné, Marilène Bolduc, Pierre
Savard, and Denis Leclerc***

Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Infectious disease research center, Laval
University, 2705 boul. Laurier, Quebec City, PQ, Canada G1V 4G2

Contact: Phone numbers: (418) 654-2705, E-mail: denis.Leclerc@crchudequebec.ulaval.ca

Abstract

Papaya mosaic virus nanoparticles have been shown to be an efficient vaccine platform when a peptide antigen is fused directly into the open reading frame (ORF) of the coat protein (CP). Although this approach has shown great potential, the fusion of antigens in the CP ORF can affect the folding of the protein and alter its capacity to self assemble into nanoparticles, thus greatly reducing its immunogenicity. In this study, we have developed an alternative approach for the fusion of antigens at the surface of the PapMV nanoparticles. We exploited a bacterial transpeptidase (Sortase A; SrtA) from *S.aureus* to conjugate vaccine antigens to PapMV nanoparticles post-assembly. CP harbouring the LPETGG SrtA recognition motif was successfully assembled into crystalline nanoparticles (PapMV-SrtA) comparable to WT PapMV. SrtA transpeptidation allowed successful conjugation of two long antigens: Influenza's M2e peptide (27 amino acids) and HIV's T20 peptide (39 amino acids) onto PapMV-SrtA nanoparticles. PapMV-SrtA-T20 and PapMV-SrtA-M2e were shown to induce strong antigen-specific antibody responses in mice. Anti-M2e antibody levels induced by PapMV-SrtA-M2e, harbouring only 30% of M2e peptide, were similar to those induced by PapMV-sM2e, which harbours the EVETPIRNE epitope of M2e on every coat protein. Mice vaccinated with PapMV-SrtA-M2e were completely protected against an influenza challenge. The SrtA technology allowed us to easily and rapidly modify the PapMV nanoparticles with different vaccine antigens. Given that the SrtA conjugation reaction is post-assembly, one batch of PapMV-SrtA nanoparticles could serve for numerous different vaccines. These results bring forward the potential of the PapMV-SrtA platform in the development of new vaccines against various infectious and immunological diseases.

Introduction

The use of viral nanoparticles (or virus like particles; VLPs) as vaccine platforms was shown to be a very promising approach to improve the immune response directed against poorly immunogenic antigens. These nanoparticles are made of viral structural proteins that self assemble to mimic the native organisation and conformation of a viral pathogen (Chroboczek, Szurgot, & Szolajska, 2014; Kushnir et al., 2012; Lee et al., 2016; Lua et al., 2014; Noad & Roy, 2003; Plummer & Manchester, 2011; Rodríguez-Limas et al., 2013; Zeltins, 2013; Zhao et al., 2014). These nanostructures allow for the presentation of antigens in a highly structured and repetitive manner that can efficiently bind B cell receptors in a T-cell independent manner and induce a potent humoral response against the antigen (Kushnir et al., 2012; Lee et al., 2016; Plummer & Manchester, 2011; Roldão et al., 2010). Due to their size, nanoparticles are efficiently recognized and processed by antigen-presenting cells (APCs) such as dendritic cells (DC) (Fifis et al., 2004; Manolova et al., 2008). They also activate innate immunity through recognition of their pathogen associated molecular patterns (PAMPs) by innate receptors (pathogen recognition receptors; PRRs) (M.-È. È. Lebel et al., 2015). Their use to display heterologous epitopes is a promising strategy for the development of vaccines against chronic and infectious diseases where conventional vaccine technologies have failed.

Recently, we have developed a novel technology based on the use of a rod-shape nanoparticle made of the papaya mosaic virus (PapMV) coat protein (CP) self assembled around a ssRNA. PapMV nanoparticles were shown to be efficient vaccine platforms through fusion of peptidic antigens directly into the open reading frame (ORF) of the CP. The resulting chimeric nanoparticles harbour the peptide at its surface for presentation to immune cells. They can trigger either a humoral response (Carignan et al., 2015; Rioux, Babin, et al., 2012) or a CTL response against the fused antigen (Babin, Majeau, & Leclerc, 2013). Also, PapMV nanoparticle were shown to trigger innate immunity (Mathieu, Rioux, Dumas, & Leclerc, 2013) through engagement of toll like receptor 7 (TLR7) (M.-È. È. Lebel et al., 2014) which contribute to the development of a strong and long lasting immune response (Leclerc, 2014). Therefore, PapMV nanoparticles are now classified as a TLR7 agonist that can be used either for the development or improvement of vaccine antigen (Leclerc, 2014) or for cancer immunotherapy (M.-È. È. Lebel et al., 2016).

Even if PapMV nanoparticles have shown their potential as a vaccine platform, the generation of chimeric PapMV nanoparticles has its limitations. The insertion of antigens in the ORF of the CP can alter its structure and affect its capacity to self-assemble into immunogenic nanoparticles. Consequently, fusion of long peptides (>10 amino acids) by genetic engineering is rather challenging. Ideally, to decrease the stress

induced on the structure of the CP, the fusion should be performed on an already self-assembled nanoparticles. This approach will allow the fusion of longer peptides that can harbour several relevant CTL and B cell epitopes at the same time and improve the quality of the vaccine candidate.

In this study, we describe an approach where the fusion of peptides on already self-assembled PapMV nanoparticles is performed by the bacterial transpeptidase sortase A (SrtA). This enzyme anchors surface proteins, like virulence factors, to the bacterial cell wall peptidoglycans of Gram-positive bacteria (Clancy et al., 2010; Ritzefeld, 2014; Spirig et al., 2011). Target proteins get linked to the polyG motif at the N-terminus of the acceptor peptidoglycan through the recognition and cleavage of their LPXTG sorting signal by SrtA. SrtA enzymes have been widely used for site-specific labelling of proteins with a wide range of functional groups such as fluorescent labels and green fluorescent protein (GFP) (R. Jiang, Wang, Weingart, & Sun, 2014; Matsumoto et al., 2011; Parthasarathy et al., 2007; Schoonen et al., 2015), biotin (Steinhagen, Zunker, Nordsieck, & Beck-Sickinger, 2013), PEG (R. Jiang et al., 2014; Parthasarathy et al., 2007; Sijbrandij et al., 2013), peptide nucleic acids (Pritz et al., 2007), lipids (Antos, Miller, Grotenbreg, & Ploegh, 2008), sugars (Samantaray, Marathe, Dasgupta, Nandicoori, & Roy, 2008) and other proteins (Levary, Parthasarathy, Boder, & Ackerman, 2011; Madej et al., 2012; Matsumoto et al., 2011). A soluble form of SrtA lacking the transmembrane domain can be produced efficiently in *E.coli* and allows for its use for *in vitro* transpeptidation reactions. Taking advantage of this system, we describe in this manuscript how we adapted the SrtA system to the PapMV vaccine platform. This technology allows conjugation of long peptidic antigens (27 and 39 amino acids) to PapMV nanoparticles without affecting their structure. SrtA conjugated PapMV nanoparticles are immunogenic and induce protection against an influenza infection.

Materials and methods

Production and purification of PapMV nanoparticles

The PapMV nanoparticles harboring the C-terminal LPETGG SrtA recognition site (named PapMV-SrtA), PapMV-M2e and PapMV nanoparticles were kindly provided by Folia Biotech (Quebec City, Quebec, Canada). The nanoparticles were produced and purified as described elsewhere (Carignan et al., 2015). Briefly, PapMV CPs were produced in *E. coli*. Purified CPs were assembled *in vitro* with a non-coding ssRNA derived from the native sequence of papaya mosaic virus RNA. Levels of contaminant LPS were measured by Limulus Amebocyte Lysate assay (LAL) (Lonza, Walkersville, Maryland, USA). The LPS concentration in the final nanoparticles samples was always below 50 eu/mg of protein and considered negligible.

Expression and purification of recombinant Sortase A

The expression and purification steps were performed as described elsewhere (Popp, Antos, & Ploegh, 2009). The following modifications were made to the original protocol: (1) 2xYT (16g bacto-tryptone, 10g yeast extract, 5g NaCl, pH 7.0) culture medium was used instead of LB medium, (2) IPTG induction was made when culture OD_{600nm} reached 1.0 +/- 0.1, (3) Bacteria cells were harvested by one 15 minutes centrifugation at 9000 x *g* at 4°C, (4) bacterial pellet from 1 L of culture was resuspended in 40 mL of cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole), (5) bacteria were lysed by three passage through an Emulsiflex C5 homogenizer (Avestin, Ottawa, Ontario, Canada) at 15000-25000 psi, (6) 100 U of benzonase (Sigma-Aldrich Inc., Saint-Louis, Missouri, USA) and 5mM of MgCl₂ were added to the cell lysate and incubated for 20 minutes with gentle agitation before cell lysate clarification by centrifugation at 20 442 x *g* for 20 minutes, (7) the clarified supernatant was applied on a 40 mL IMAC column packed with Ni Sepharose 6 Fast Flow Resin (GE healthcare life sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) and washed with 10 column volumes (CV) of lysis buffer and 5 CV of wash 2 buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 25 mM imidazole). Purification on the IMAC column was done with a ÄKTA purifier 10 FPLC (GE healthcare life sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Imidazole removal was done using a Sartoflow(R) Slice 200 benchtop crossflow system for diafiltration with a 10 kDa cutoff (Sartorius, Göttingen, Germany). The LPS contaminants were removed on an ion exchange membrane bound to quaternary ammonium ligands using the ÄKTA purifier 10 and measured by the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay (Lonza, Basel, Switzerland). LPS levels were under 50 endotoxin units (EU)/mg of protein and considered negligible. The yield of SrtA was approximately 100 mg per liter of culture.

Peptides

Synthetic peptides used for SrtA labelling, GGG-M2e (GGGSLLETVETPIRNEWGCRCNDSSD), and GGG-T20 (GGGYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF) were purchased from GenScript (United States) and Biomatik (Canada) respectively with over 90% purity.

3D peptide structure prediction

Three dimensional structure of the human influenza A consensus M2e peptide and HIV T20 peptide were predicted using the online *de novo* peptide structure prediction software PEP-FOLD (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) (Maupetit, Derreumaux, & Tuffery, 2009; Maupetit & Derreumaux, 2010; Shen, Maupetit, & Derreumaux, 2014; Thévenet, Shen, Maupetit, & Guyon, 2012). The models with the highest scores were chosen (Fig. 1).

Evaluation of nanoparticles structural properties by Dynamic Light Scattering (DLS) and Transmission electron microscopy (TEM)

Nanoparticle size is determined by dynamic light scattering (DLS) with a ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Malvern, Worcestershire, United Kingdom). PapMV nanoparticles were diluted to 0.12 mg/mL in Tris-HCl 10 mM pH 8.0 and loaded into a cuvette. Samples are measured 4 times and average results are generated by cumulant analysis.

Nanoparticles shape was assessed by transmission electron microscopy (TEM). Samples are diluted to 0.02 mg/mL and mixed at a 1:1 ration with a 3% solution of uranyl acetate for 7 minutes in the dark. Eight microliters of this mixture are then loaded on carbon formvar grids for 5 minutes in the dark. Excess solution is absorbed and grids dry for at least 2 hours before observation. Grids are observed with a FEI-TECNAl-Spirit transmission electron microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, USA). DLS and TEM are done on the nanoparticles before and after the Sortase A transpeptidation reaction to assess the effect of the ligation on the physical properties of the nanoparticles.

Sortase A- mediated transpeptidation reaction

SrtA conjugation reactions were performed in 1X SrtA reaction buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂). Reactions containing 50 μ M SrtA, 50 μ M GGG-peptide and 25 μ M PapMV VLPs were

incubated 2.5 hours at room temperature. Unconjugated peptides and SrtA were removed with an amicon centrifugal filter unit with a cutoff size of 100 kDa (EMD Millipore, Darmstadt, Germany). Being larger than 100 kDa, PapMV nanoparticles are retained by the filter unit. Conjugation efficiency was analyzed by 15% Tris-Glycine SDS-PAGE colored with Sypro-Ruby gel stain (Life Technologies Inc., Carlsbad, California, USA).

SDS-Page analysis for peptide coupling quantification

Peptide conjugated PapMV VLPs were diluted to 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in Tris-Glycine migration buffer 1X supplemented with 30% of SDS loading buffer (50% glycerol, 2% SDS, 0,002% bromophenol blue, 14% B-mercaptoethanol). Samples were then heated at 95°C for 10 minutes 4 μL of solution (0.4 μg) were loaded on a 15% Tris/Glycine SDS-Page. Migrated gels were colored with Sypro-Ruby gel stain (Life Technologies Inc., Carlsbad, California, USA) following the manufacturer's rapid staining protocol. Sypro-Ruby fluorescence was detected with the 610 nm emission filter following excitation with the green laser (532 nm) with the Typhoon 9200 imager (GE Healthcare life sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Protein bands were quantified using the image analysis software ImageQuant 5.2. The protein band signals are expressed as the number of pixels counted by the software in the square defining the protein band. Background is subtracted from the protein band volumes. Labelling efficiency is expressed as the percentage of peptide labelled PapMV in the sample. Conjugation ratio is calculated by dividing the signal of labelled PapMV protein band by the sum of conjugated and unconjugated PapMV signals.

Western Blot

After SDS-PAGE migration, proteins were transferred onto PVDF Immobilon®-FL membranes (EMD Millipore, Darmstadt, Germany) and blocked using bløck™-FL buffer (EMD Millipore, Darmstadt, Germany). Membranes were incubated overnight with the following primary antibodies diluted in the bløck™-FL buffer: rabbit anti-PapMV polyclonal antibody, mouse anti-M2e monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA) or mouse anti-his polyclonal antibody (Roche, Basel, Switzerland). After washing with PBS/0.1% Tween-20, membranes were incubated two hours with either Alexa Fluor® 532 coupled goat anti-rabbit IgG (H+L) (Life Technologies Inc., Carlsbad, California, USA) or Alexa Fluor® 488 coupled goat anti-mouse IgG (H+L) (Life Technologies Inc., Carlsbad, California, USA). After washing, membranes were dried to reduce background and fluorescent signals were captured using the Typhoon 9200 imager (GE Healthcare life sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom).

Animals and Immunization

Six to eight weeks-old female BALB/c mice were immunized by intramuscular injection (i.m) twice two weeks apart with buffer (50 μ L of Tris-HCl 10 mM pH 8.0) or PapMV-SrtA-M2e, PapMV-sM2e, PapMV-SrtA-T20 or PapMV-SrtA with free T20 peptide. Blood samples were collected before each immunization on day 13 and 27. Sera was separated from the blood by centrifugation in BD Microtainer SST blood collection tubes (BD, East Rutherford, New Jersey, USA) for 2 minutes at 10 000 x g. Total IgG and IgG2a serotype against M2e and T20 peptides in the sera of immunized mice were quantified by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) as described below.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

M2e (CSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD) and T20 peptides (GGGYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL ELDKWASLWNWF) were coated overnight at 4°C in 96-well flat bottom nunc™ MaxiSorp plates (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) at 1 μ g/mL and 2.5 μ g/mL respectively in 100 μ L 0.1M NaHCO₃ buffer pH 9.6. Plates were blocked with 150 μ L per well of PBS/0.1% Tween-20/2% BSA. Plates were washed three times with PBS/0.1% Tween-20, before adding mice sera in two-fold serial dilutions starting at 1:50. Plate were incubated 1.5 hours at 37°C and washed 4 times in PBS/0.1% Tween-20 before adding the peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG or IgG2a secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA). After washing the plates four times, peptide specific antibodies were detected with the addition of TMB substrate (Fitzgerald Industries International, Acton, Massachusetts, USA). The reaction was stopped with the addition of 0.18 M H₂SO₄. Results are expressed as antibody endpoint titers greater than threefold the OD 450 nm of the background value of the preimmune sera at the same dilution.

Influenza Challenge

Two weeks following the last immunization, M2e immunized mice were infected with 1 LD₅₀ of the mouse adapted influenza A/WSN/33 (H1N1) virus in 50 μ L intranasal instillation. Weight loss and clinical sign of disease were monitored for 14 days post-infection. Symptoms are rated from 0 to 4 as follow: (0) no symptoms: (1) lightly spiked fur and curved back, (2) spiked fur and curved back, (3) difficulty to move and slight dehydration and (4) severe dehydration, lack of reflexes and ocular secretions. Mice reaching the score of 4 or having lost 20% or more of their initial body weight were euthanized.

Statistical Analysis

Differences (antibody titers, weight and symptoms) between immunized groups were measured by Holm-Šídák multiple comparisons test or Tukey's multiple comparisons test. Survival differences were evaluated by Kaplan-Meier survival analysis. *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using PRISM 6.0.

Ethics Statement

All animal work has been done with institution approved ethics protocol by the "Comité de Protection des Animaux - CHUQ (CPA-CHUQ)". The approval of this project is found under the authorization number 2013142-2.

Results

Engineering and coupling of peptide at the surface of PapMV-SrtA VLPs

To insure SrtA transpeptidation on PapMV VLPs, the LPETGG SrtA recognition site was inserted before the 6xH tag at the C-terminus of the PapMV CP. This insertion did not affect the capacity of the CP to self-assemble around the ssRNA and generate nanoparticles that are similar to the WT PapMV nanoparticle in size, as shown by dynamic light scattering (DLS) (Fig. 2-2A) and in appearance, as shown by electron microscopy (EM)(Fig. 2-2B).

The transpeptidation reaction was performed using 25 μM of PapMV-SrtA nanoparticles incubated with 50 μM of the 27 amino acid long M2e peptide or of the 39 amino acid long T20 peptide. The M2e peptide derived from the extracellular domain of the matrix protein 2 (M2e) of influenza virus, is a highly conserved epitope in all the influenza strains (Neiryneck et al., 1999) that was shown to induce protection against an influenza challenge in mice (Carignan et al., 2015). The T20 peptide is derived from the surface glycoprotein gp41 of HIV (He, 2013). These peptides were chosen because they are predicted to have different secondary structure; the M2e peptide is made of two β -sheets while the T20 peptide is a long α -helix (Fig. 2-1), as well as their difference in length.

Following the conjugation reaction, SrtA and the free peptides were removed and the product was loaded on a SDS-PAGE to reveal the conjugation efficiency (Fig. 2-3A). Bands showing a higher molecular weight correspond to the PapMV CP conjugated to either the M2e or the T20 peptide (Fig. 2-3A). The conjugation efficiency was calculated as the ratio between the intensity of the fluorescence of the CP conjugated to the peptides on the total fluorescence of unconjugated and conjugated CP. In both cases, the transpeptidation reaction was shown to couple approximately 30% of total PapMV CP available on nanoparticles (data not shown). The nature of the protein bands was determined using the PapMV, 6xH or M2e specific antibodies, (Fig. 2-3A). As expected, PapMV-SrtA-M2e and PapMV-SrtA-T20 protein bands were revealed by the anti-PapMV antibody but not anti-6xH antibody since the tag was removed by the proteolytic activity of the SrtA. Also, the PapMV CP peptide conjugated band was further confirmed by revelation using specific M2e antibodies.

To evaluate whether the structure of the nanoparticles was not affected by the coupling reaction, we measured the length of the PapMV-SrtA nanoparticles and those conjugated with either the M2e or the T20 peptides (Fig. 2-3B). The three nanoparticles showed similar length and appearance (Fig 2-3B-C). They

maintain a crystalline rod-shape structure post SrtA modification like the native PapMV VLPs and PapMV-SrtA VLPs (Fig. 2-2).

PapMV-SrtA-T20s nanoparticle is an efficient vaccine platform

To assess the immunogenic potential of the PapMV-SrtA vaccination platform, Balb/C mice, 5 per group, were immunized twice at 14 day intervals with either 30 or 90 µg of PapMV-SrtA-T20, 90 µg of PapMV-SrtA or 90µg of PapMV-SrtA with 40 µg of free T20 peptide. Blood levels of total anti-T20 IgG and IgG2 were measured by ELISA thirteen days after each immunization (Fig. 2-4A-D). Mice vaccinated with PapMV-SrtA only or PapMV-SrtA and free T20 peptide did not develop any T20 antibodies. However, 30µg of PapMV-SrtA-T20 was sufficient to mount an antibody response against the T20 peptide after a single immunization (Fig. 2-4A). This confirms that peptides need to be covalently attached to the PapMV vaccine platform in order to become immunogenic. We also observed a rapid class switch towards a TH1 response since a strong IgG2a response specific to the T20 peptide was recorded after the first immunization (Fig. 4B). The boost immunization raised the total IgG and IgG2a titers significantly (Fig. 2-4C-D).

PapMV-SrtA-M2e immunization results in protective humoral response

To evaluate the efficacy of this approach in an animal infectious model, we conjugated the M2e peptide to the PapMV-SrtA vaccine platform. We included in this study, as a comparison, the PapMV-sM2e construct that was previously tested in our laboratory (Carignan et al., 2015). PapMV-sM2e harbours the fusion of a 9 amino acid long peptide (EVETPIRNE) corresponding to the central region of the M2e peptide and known to induce production of antibodies capable of recognizing the full length M2e peptide. To compare the efficacy of the two constructs, five mice per group received prime and booster immunizations at 14 days intervals with 30 or 90 µg of PapMV-SrtA-M2e, 30µg PapMVCP-sM2e or formulation buffer. Thirteen days following the first and the second immunization, sera were collected and levels of total IgG and IgG2a directed against the M2e peptide were measured by ELISA. Interestingly, the levels of antibodies directed against the M2e (total IgG and IgG2a) were similar between all groups following the first immunization (Fig. S2-1). After two immunizations, total IgG and IgG2a were comparable between groups immunized with 30 µg of PapMV-SrtA-M2e or 30µg of PapMV-sM2e (Fig. 2-5AB). This suggests that the surface density of the peptide on nanoparticles can be reduced by 70% without affecting the quality of the humoral response measured. However, immunization with 90µg of PapMV-SrtA-M2e triggered a humoral response against the M2e peptide that is significantly higher than PapMV-sM2e.

To further assess the vaccination potential of the PapMV-SrtA platform, we sought to determine whether the triggered response against PapMV-SrtA-M2e could protect mice against an influenza challenge. We challenged immunized mice with the mouse adapted influenza strain A/WSN/33. Fourteen days after the second immunization mice were infected with 1 x LD50 of influenza A/WSN/33 virus and monitored for weight loss, clinical signs of infection and survival. Mice immunized with PapMV-SrtA-M2e (30 and 90µg) and PapMV-sM2e (30µg) showed minimal weight loss as compared to mice immunized with the formulation buffer (Fig. 2-5C). Clinical signs of infection (ruffled fur, curved back, mobility loss) were significantly reduced in mice immunized with 90 µg of PapMV-SrtA-M2e although weight loss was not significantly different between mice immunized with PapMV-SrtA-M2e or PapMV-sM2e (Fig, 2-5C-D). Formulation buffer immunized mice showed severe clinical symptoms and significant weight loss reaching a mean of 79.3 % of their initial weight, at day 8 post-infection. Only groups immunized with 90 µg of PapMV-SrtA-M2e or with PapMV-sM2e showed 100% survival. Sixty percent of mice immunized with 30 µg of PapMV-SrtA-M2e survived the infection while only 20% of formulation buffer immunized mice survived (Fig. 2-5E).

Discussion

We have showed that the engineering of the PapMV vaccine platform to express the SrtA recognition motif was successful and allowed efficient coupling of the M2e and T20 peptides, two peptides that harbour a different secondary structures. We could for the first time covalently attached a long peptide of 39 amino acids to PapMV nanoparticles which revealed the flexibility of the approach and circumvent the limitations related to fusion directly into the open reading frame of the PapMV CP. Conjugation through SrtA-mediated transpeptidation renders the M2e and T20 peptides very immunogenic through their presentation on a crystalline and repetitive structure. This approach was shown to be as efficient as the direct fusion into the ORF of the PapMV CP without the limitations imposed by this approach.

While SrtA has been widely used for the modification and conjugation of diverse proteins including antibodies, protein-protein and protein to solid support conjugates, not many studies have investigated the modification of nanoparticles by SrtA-mediated conjugation. A recent study showed that SrtA could be used to link FITC or GFP to the N-terminus of cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) coat protein expressing an N-terminal glycine residue (Schoonen et al., 2015). Although they did not use SrtA to functionalize the coat proteins post-assembly, they were able to co-assemble coupled and uncoupled CCMV into VLPs to encapsulate the cargo. In our case, SrtA conjugation on already assembled VLPs ensured structural integrity while modification of the monomers can affect its capacity to self-assemble into nanoparticles. Gaelen T. Hess et al. (2012) (Hess et al., 2012) were able to modify the different surface proteins of the M13 bacteriophage framework using N-terminal site-specific modification by SrtA from *S.aureus* and *S.pyogenes*. Various LPETG or LPETA molecules were decorated onto the pIII, pIX, pVIII bacteriophage proteins expressing N-terminal glycines. They were able to decorate the bacteriophage with more efficiency than classic methods. Both these groups used SrtA to modify the N-terminus of the core nanoparticle protein with LPETG-cargo or modules, while our system conjugates peptides on the capsid C-termini. These studies show the potential of the SrtA-mediated conjugation of nanoparticles for the surface functionalization or cargo encapsulation. In this study, we show that SrtA-mediated conjugation allows post-assembly modifications of PapMV nanoparticles, but also we show that these SrtA conjugated nanoparticles can be used to efficiently trigger an antigen-specific immune response. We also show for the first time the potential of the SrtA-mediated conjugation in the development of a vaccine.

The use of SrtA-mediated conjugation allowed us to overcome the numerous limitations of genetic engineering of the PapMV coat protein. C-terminus modifications greatly affect VLP structural integrity and render the generated particles unstable (Rioux, Babin, et al., 2012). While small N-terminal fusion of 9-10

amino acids are more tolerated and generate better antibody responses (Carignan et al., 2015; Rioux, Majeau, & Leclerc, 2012), the insertion of longer epitopes impair VLP assembly and stability (Rioux, Majeau, et al., 2012). SrtA allowed for the conjugation of a 39 amino acid long T20 peptide to the C-terminus of PapMV-SrtA VLPs. Coupling efficiency of the longer T20 peptides was very similar to that of the shorter M2e peptide. Around 30% of PapMV coat proteins were conjugated to either peptides. It is known that the SrtA reaction reaches equilibrium due to the liberation of a G-substrate after the SrtA cleavage between the T and the G in the LPETG motif. The liberated G-substrate is free to compete with the polyG substrate of interest. While there are strategies that have been used to increase the SrtA conjugation yields by rendering the substrates poorly recognisable (Antos, Chew, et al., 2009; Li et al., 2014; Liu, Luo, Flora, & Mezo, 2014; Yamamura, Hirakawa, Yamaguchi, & Nagamune, 2011), we show that 30% of conjugation is sufficient for the induction of strong humoral responses against both M2e and T20 peptides. Nonetheless, it would be interesting to investigate such strategies to see if the PapMV-SrtA platform could be further improved.

The PapMV-sM2e construct tested in our laboratory was showed to be the most efficient construct tested to produce antibodies able to protect mice against an influenza infection (Carignan et al., 2015). Each CP subunit of the PapMV nanoparticle is fused to the 9 amino acid M2e peptide (EVETPIRNE). In contrast, there is only approximately 30% of M2e peptide and PapMV CP conjugates in the PapMV-SrtA-M2e samples. Nonetheless, PapMV-SrtA-M2e was able to induce similar levels of protective antibodies as PapMV-sM2e with considerably less antigen. It is however possible that the complete M2e peptide fused to the PapMV-SrtA vaccine platform can provide more epitopes and consequently, generate a more diverse set of antibodies reacting against the complete M2e peptide. All the ELISAs were performed on the full length M2e peptide and could have therefore detected other antibodies then just those directed towards the EVETPIRNE epitope.

In this study, we developed a novel strategy for the coupling of peptides at the surface of PapMV nanoparticles that is more flexible and allows the attachment of antigens larger than 10 amino acids to the vaccine platform. This approach increases the potential of our technology for the development of vaccine candidates against infectious diseases and for cancer immunotherapy treatments (M.-È. È. Lebel et al., 2016). The SrtA technology allows for rapid and easy modification of PapMV nanoparticles and could be a promising tool for the development of pandemic vaccines. By changing the nature of the antigens coupled to the PapMV-SrtA platform, new vaccines could be easily and rapidly produced using a unique batch of PapMV-SrtA nanoparticles.

Acknowledgment

We would like to thank Folia Biotech for kindly providing the proteins used in this study as well as the “Plateforme de bio-imagerie du Centre de Recherche en Infectiologie” for the use of the transmission electron microscope.

References

- Antos, J. M., Chew, G. L., Guimaraes, C. P., Yoder, N. C., Grotenbreg, G. M., Popp, M. W. L., & Ploegh, H. L. (2009). Site-specific N- and C-terminal labeling of a single polypeptide using sortases of different specificity. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(31), 10800–10801.
- Antos, J. M., Miller, G. M., Grotenbreg, G. M., & Ploegh, H. L. (2008). Lipid Modification of Proteins through Sortase-Catalyzed Transpeptidation. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(48), 16338–16343. <http://doi.org/10.1021/ja806779e>
- Babin, C., Majeau, N., & Leclerc, D. (2013). Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles with a CTL epitope derived from influenza NP. *Journal of Nanobiotechnology*, *11*, 10. <http://doi.org/10.1186/1477-3155-11-10>
- Carignan, D., Thérien, A., Rioux, G., Paquet, G., Gagné, M.-È. L., Bolduc, M., ... Leclerc, D. (2015). Engineering of the PapMV vaccine platform with a shortened M2e peptide leads to an effective one dose influenza vaccine. *Vaccine*. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.123>
- Chroboczek, J., Szurgot, I., & Szolajska, E. (2014). Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochimica Polonica*, *61*(3), 531–539.
- Clancy, K. W., Melvin, J. a., & McCafferty, D. G. (2010). Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition. *Biopolymers*, *94*(4), 385–96. <http://doi.org/10.1002/bip.21472>
- Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G. A., Li, J., Mottram, P. L., ... Plebanski, M. (2004). Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *The Journal of Immunology*, *173*(5), 3148–3154. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3148>
- He, Y. (2013). Synthesized peptide inhibitors of HIV-1 gp41-dependent membrane fusion.
- Hess, G. T., Cragnolini, J. J., Popp, M. W., Allen, M. a., Dougan, S. K., Spooner, E., ... Guimaraes, C. P. (2012). M13 bacteriophage display framework that allows sortase-mediated modification of surface-accessible phage proteins. *Bioconjugate Chemistry*, *23*(7), 1478–1487.
- Jiang, R., Wang, L., Weingart, J., & Sun, X.-L. L. (2014). Chemoenzymatic bio-orthogonal chemistry for site-specific double modification of recombinant thrombomodulin. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, *15*(1), 42–46. <http://doi.org/10.1002/cbic.201300641>
- Kushnir, N., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, *31*(1), 58–83. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.083>
- Lebel, M.-È. È., Chartrand, K., Leclerc, D., & Lamarre, A. (2015). Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants. *Vaccines*, *3*(3), 620–637. <http://doi.org/10.3390/vaccines3030620>
- Lebel, M.-È. È., Chartrand, K., Tarrab, E., Savard, P., Leclerc, D., & Lamarre, A. (2016). Potentiating Cancer Immunotherapy Using Papaya Mosaic Virus-Derived Nanoparticles. *Nano Letters*, *16*(3), 1826–1832. <http://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b04877>
- Lebel, M.-È. È., Daudelin, J.-F. F., Chartrand, K., Tarrab, E., Kalinke, U., Savard, P., ... Lamarre, A. (2014). Nanoparticle adjuvant sensing by TLR7 enhances CD8+ T cell-mediated protection from *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *192*(3), 1071–1078. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1302030>
- Leclerc, D. (2014). Plant viral epitope display systems for vaccine development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *375*, 47–59. http://doi.org/10.1007/82_2011_183
- Lee, K. L., Twyman, R. M., Fiering, S., & Steinmetz, N. F. (2016). Virus-based nanoparticles as platform technologies for modern vaccines. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, (Figure 1).

- <http://doi.org/10.1002/wnan.1383>
- Levary, D. A., Parthasarathy, R., Boder, E. T., & Ackerman, M. E. (2011). Protein-protein fusion catalyzed by sortase A. *{PloS} One*, 6(4), e18342. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0018342>
- Li, Y. M., Li, Y. T., Pan, M., Kong, X. Q., Huang, Y. C., Hong, Z. Y., & Liu, L. (2014). Irreversible site-specific hydrazinolysis of proteins by use of sortase. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(8), 2198–2202. <http://doi.org/10.1002/anie.201310010>
- Liu, F., Luo, E. Y., Flora, D. B., & Mezo, A. R. (2014). Irreversible sortase a-mediated ligation driven by diketopiperazine formation. *Journal of Organic Chemistry*, 79(2), 487–492.
- Lua, L. H. L., Connors, N. K., Sainsbury, F., Chuan, Y. P., Wibowo, N., & Middelberg, A. P. J. (2014). Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(3), 425–440. <http://doi.org/10.1002/bit.25159>
- Madej, M. P., Coia, G., Williams, C. C., Caine, J. M., Pearce, L. A., Attwood, R., ... Adams, T. E. (2012). Engineering of an anti-epidermal growth factor receptor antibody to single chain format and labeling by sortase A-mediated protein ligation. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(6), 1461–1470. <http://doi.org/10.1002/bit.24407>
- Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., & Bachmann, M. F. (2008). Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European Journal of Immunology*, 38(5), 1404–1413. <http://doi.org/10.1002/eji.200737984>
- Mathieu, C., Rioux, G., Dumas, M.-C. C., & Leclerc, D. (2013). Induction of innate immunity in lungs with virus-like nanoparticles leads to protection against influenza and Streptococcus pneumoniae challenge. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(7), 839–848. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2013.02.009>
- Matsumoto, T., Sawamoto, S., Sakamoto, T., Tanaka, T., Fukuda, H., & Kondo, A. (2011). Site-specific tetrameric streptavidin-protein conjugation using sortase A. *Journal of Biotechnology*, 152(1-2), 37–42. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.008>
- Maupetit, J., & Derreumaux, P. (2010). A fast method for large-scale De Novo peptide and miniprotein structure prediction. <http://doi.org/10.1002/jcc.21365>
- Maupetit, J., Derreumaux, P., & Tuffery, P. (2009). PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction. <http://doi.org/10.1093/nar/gkp323>
- Neiryneck, S., Deroo, T., Saelens, X., Vanlandschoot, P., Jou, W. M., & Fiers, W. (1999). A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nature Medicine*, 5(10), 1157–1163. <http://doi.org/10.1038/13484>
- Noad, R., & Roy, P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology*, 11(9), 438–444. [http://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00208-7](http://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00208-7)
- Parthasarathy, R., Subramanian, S., & Boder, E. T. (2007). Sortase A as a novel molecular “stapler” for sequence-specific protein conjugation. *Bioconjugate Chemistry*, 18(2), 469–476. <http://doi.org/10.1021/bc060339w>
- Plummer, E. M., & Manchester, M. (2011). Viral nanoparticles and virus-like particles: Platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3(2), 174–196. <http://doi.org/10.1002/wnan.119>
- Popp, M. W., Antos, J. M., & Ploegh, H. L. (2009). Site-specific protein labeling via sortase-mediated transpeptidation. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.], Chapter 15*, Unit 15.3. <http://doi.org/10.1002/0471140864.ps1503s56>
- Pritz, S., Wolf, Y., Kraetke, O., Klose, J., Bienert, M., & Beyermann, M. (2007). Synthesis of Biologically Active

- Peptide Nucleic {Acid–Peptide} Conjugates by {Sortase-Mediated} Ligation. *The Journal of Organic Chemistry*, 72(10), 39093912. <http://doi.org/10.1021/jo0623311>
- Rioux, G., Babin, C., Majeau, N., & Leclerc, D. (2012). Engineering of papaya mosaic virus (papmv) nanoparticles through fusion of the ha11 peptide to several putative surface-exposed sites. *PLoS ONE*, 7(2), 5–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0031925>
- Rioux, G., Majeau, N., & Leclerc, D. (2012). Mapping the surface-exposed regions of papaya mosaic virus nanoparticles. *FEBS Journal*, 279(11), 2004–2011. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08583.x>
- Ritzefeld, M. (2014). Sortagging: a robust and efficient chemoenzymatic ligation strategy. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 20(28), 8516–8529. <http://doi.org/10.1002/chem.201402072>
- Rodríguez-Limas, W. A., Sekar, K., & Tyo, K. E. (2013). Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6), 1089–1093. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.008>
- Roldão, A., Mellado, M. C. M., Castilho, L. R., Carrondo, M. J. T., & Alves, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 9(10), 1149–1176. <http://doi.org/10.1586/erv.10.115>
- Samantaray, S., Marathe, U., Dasgupta, S., Nandicoori, V. K., & Roy, R. P. (2008). Peptide-sugar ligation catalyzed by transpeptidase sortase: a facile approach to neoglycoconjugate synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 130(7), 2132–2133. <http://doi.org/10.1021/ja077358g>
- Schoonen, L., Pille, J., Borrmann, A., Nolte, R. J., & van Hest, J. C. (2015). Sortase A-Mediated N-Terminal Modification of Cowpea Chlorotic Mottle Virus for Highly Efficient Cargo Loading. *Bioconjugate Chemistry*, 26(12), 2429–2434. <http://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00485>
- Shen, Y., Maupetit, J., & Derreumaux, P. (2014). Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction. <http://doi.org/10.1021/ct500592m>
- Sijbrandij, T., Cukkemane, N., Nazmi, K., Veerman, E. C., & Bikker, F. J. (2013). Sortase A as a tool to functionalize surfaces. *Bioconjugate Chemistry*, 24(5), 828–831. <http://doi.org/10.1021/bc4000146>
- Spirig, T., Weiner, E. M., & Clubb, R. T. (2011). Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 82(5), 1044–1059. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07887.x>
- Steinhagen, M., Zunker, K., Nordsieck, K., & Beck-Sickinger, A. G. (2013). Large scale modification of biomolecules using immobilized sortase A from *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(12). <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.039>
- Thévenet, P., Shen, Y., Maupetit, J., & Guyon, F. (2012). PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides.
- Yamamura, Y., Hirakawa, H., Yamaguchi, S., & Nagamune, T. (2011). Enhancement of sortase A-mediated protein ligation by inducing a β -hairpin structure around the ligation site. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 47(16), 4742–4. <http://doi.org/10.1039/c0cc05334a>
- Zeltins, A. (2013). Construction and characterization of virus-like particles: A review. *Molecular Biotechnology*, 53(1), 92–107. <http://doi.org/10.1007/s12033-012-9598-4>
- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C. X., Mitter, N., Yu, C., & Middelberg, A. P. J. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32(3), 327–337. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>

Figure Legends

Figure 2-1. The 3D structure prediction of GGG-M2e and GGG-T20 peptides. The 3D structures of human influenza consensus M2e peptide (A) and HIV T20 peptides (B) were predicted by the online software PEP-FOLD (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>). The added glycines to the N-terminus of the peptides are shown in green. The last three amino acids of the T20 peptide sequence (shown in red) were removed for the PEP-FOLD structure prediction to accommodate the 36 amino acid limit.

Figure 2-2. PapMV-SrtA VLPs resemble native PapMV VLPs. The six amino acid LPETGG SrtA recognition motif was inserted at the C-terminus of the PapMV coat protein. (A) The size of the VLPs was assessed by dynamic light scattering. PapMV-SrtA (40 nm) and PapMV (65nm) have similar lengths. (B) Transmission electron microscopy of PapMV (left) and PapMV-SrtA (right) VLPs.

Figure 2-3. Peptides are conjugated to PapMV-SrtA VLPs without affecting structural integrity. (A) SDS-PAGE and Western Blot of SrtA conjugated VLPs PapMV-SrtA-M2e and PapMV-SrtA-T20. Peptide conjugated PapMV were confirmed by anti-PapMV and anti-His western blots. Additional confirmation for M2e anchored PapMV was obtained by anti-M2e western blot. (B) Dynamic light scattering analysis comparing PapMV-SrtA non conjugated VLPs (40 nm) to conjugated PapMV-SrtA-M2e (43 nm) and PapMV-SrtA-T20 (52 nm) VLPs. (C) Transmission electron microscopy of PapMV-SrtA-M2e (left) and PapMV-SrtA-T20 (right) VLPs.

Figure 2-4. SrtA conjugated PapMV-SrtA-T20 induces T20 specific antibody responses. Female Balb/C mice (5/group) were immunized twice with the indicated amounts of PapMV-SrtA-T20, PapMV-SrtA or T20 peptide. Blood samples were collected 14 days following each immunization and ELISA assays were performed to evaluate levels of anti-T20 total IgG (A) or IgG2a (B) after the first immunization and anti-T20 total IgG (C) or IgG2A (D) after the booster immunization. **** $P < 0.0001$ all PapMV-SrtA-T20 groups against PapMV-SrtA alone or PapMV-SrtA and T20 peptide. *** $P < 0.001$ between 30 μ g and 90 μ g of PapMV-SrtA-T20 total IgG (d27), **** $P < 0.0001$ total IgG (d13) and ** $P < 0.01$ IgG2a (d13 and d27).

Figure 2-5. PapMV-SrtA-M2e induces specific M2e immunity with protection against influenza induced morbidity and mortality. Female Balb/C mice (5 per group) were immunized twice with the indicated formulations. Blood samples were collected 13 days following the last immunization and ELISA assays were performed to evaluate levels of anti-M2e total IgG (A) or IgG2a (B). ** $P < 0.01$ for groups 2 vs 3 total IgG titers

and $*P < 0.05$ for group 2 vs 3 IgG2a titers. Fourteen days after the last immunization, mice were infected with 1 x LD50 of influenza A/WSN/33 virus and followed for clinical symptoms and survival for 14 days. (C) Mean clinical score of infection signs on a scale of 0 to 4. $*P < 0.05$ for group 1 vs 4, $**P < 0.01$ for group 1 vs 4, $***P < 0.001$ for group 2 vs 3 and $****P < 0.0001$ for groups 2-3 vs 4 and for group 1 vs 2 all at day 8 post-challenge. (D) Mean weight loss expressed as percentage of initial weight. $***P < 0.001$ for group 1 vs 4, and $****P < 0.0001$ for group 2-3 vs 4. (E) Survival of mice expressed as Kaplan-Meier survival curves. $*P < 0.5$ for groups 2-3 vs 4.

Supplementary Figure Legend

Figure S2-1. Anti-M2e immunity induced after the first immunization of PapMV-SrtA-M2e. Female Balb/C mice, 5 per group, were immunized twice with the indicated formulations. Thirteen days after the first immunization, mice were bled and levels of anti-M2e total IgG (A) and IgG2a (B) were measured by ELISA.

Figures

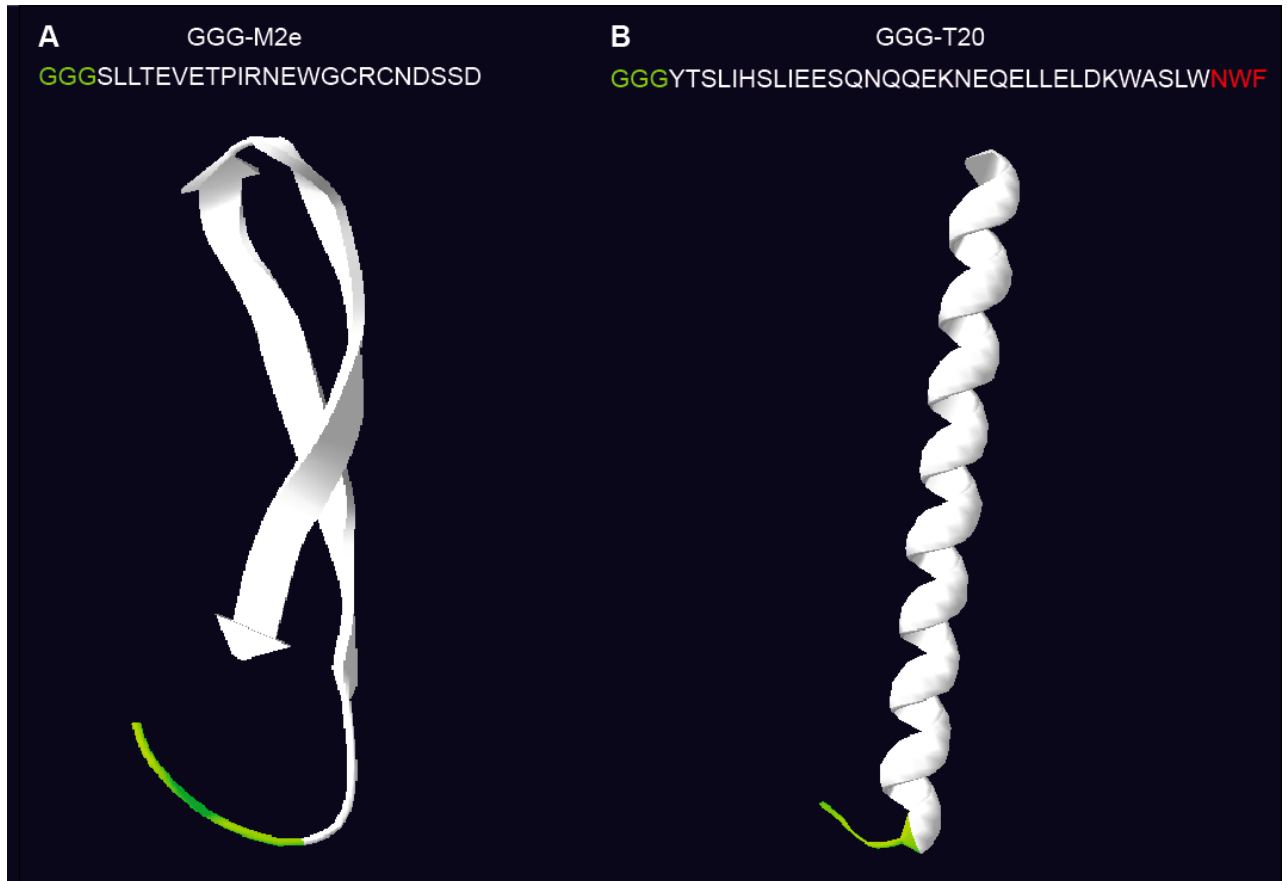


Figure 2-1. The 3D structure prediction of the GGG-M2e and GGG-T20 peptides.

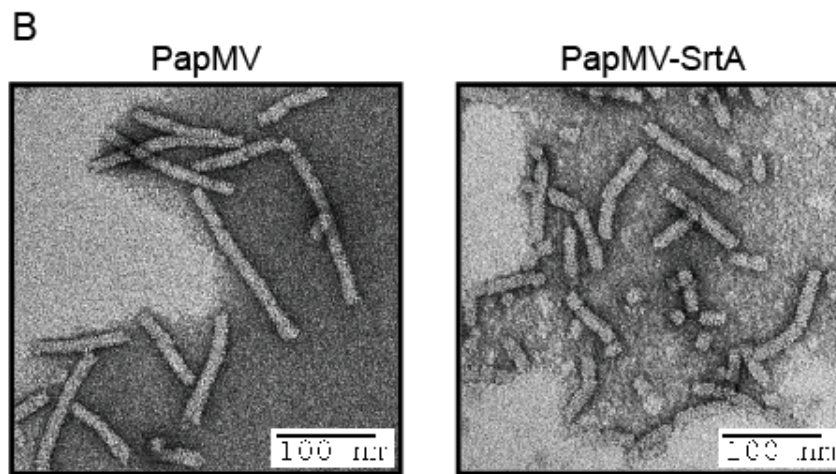
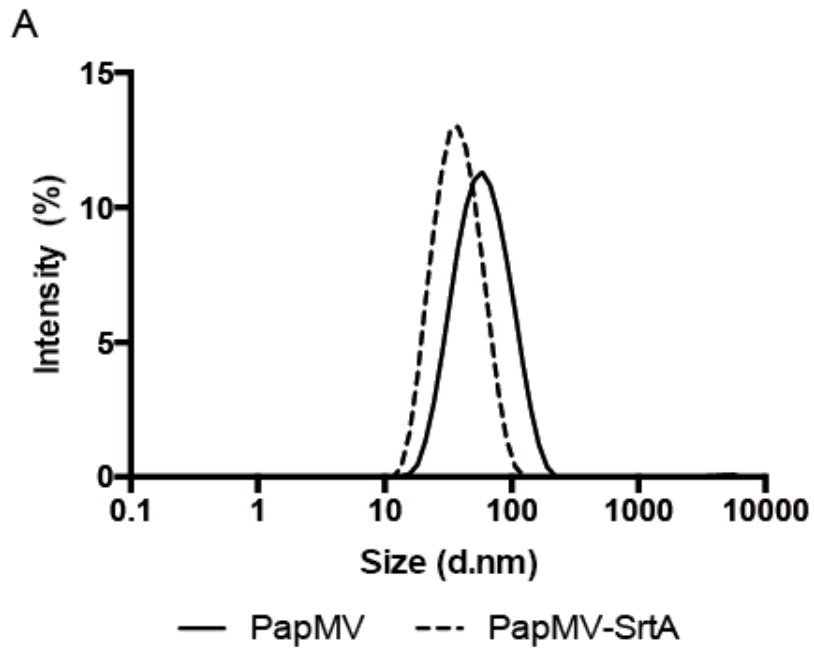


Figure 2-2. PapMV-SrtA VLPs resemble native PapMV VLPs.

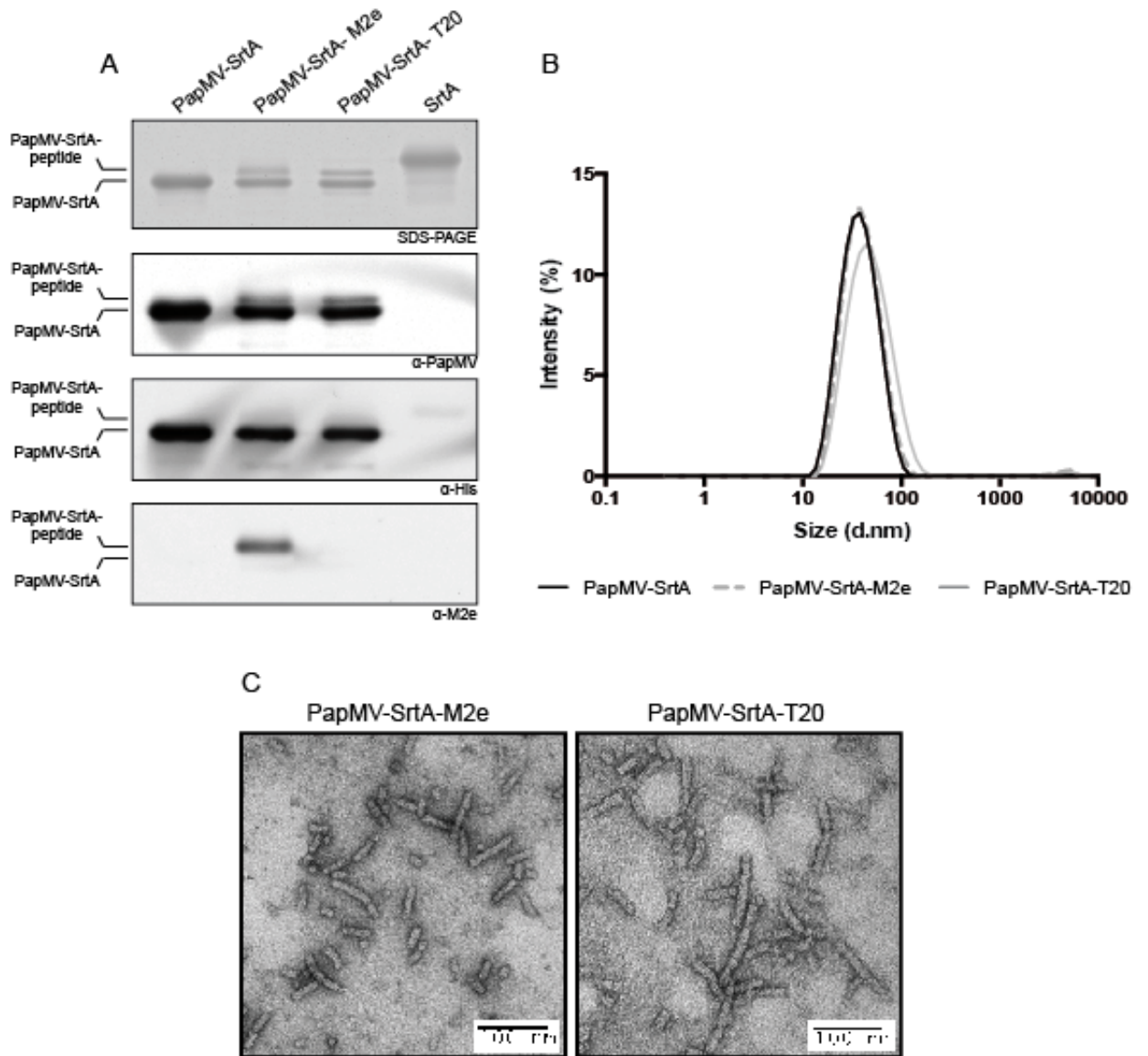


Figure 2-3. Peptides are efficiently conjugated to PapMV-SrtA VLPs without affecting VLPs structural integrity.

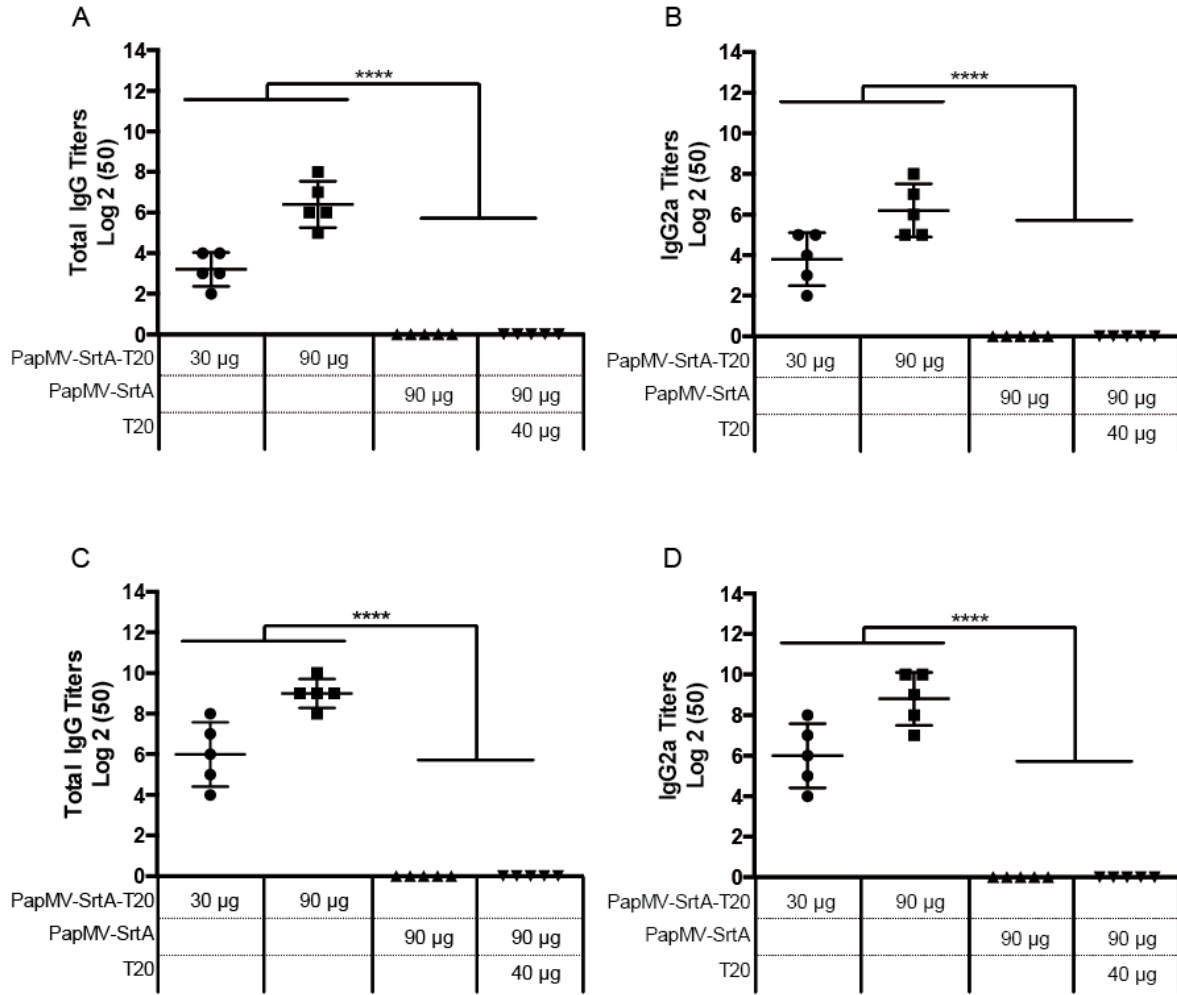


Figure 2-4. SrtA conjugated PapMV-SrtA-T20 induces strong T20 specific antibody responses.

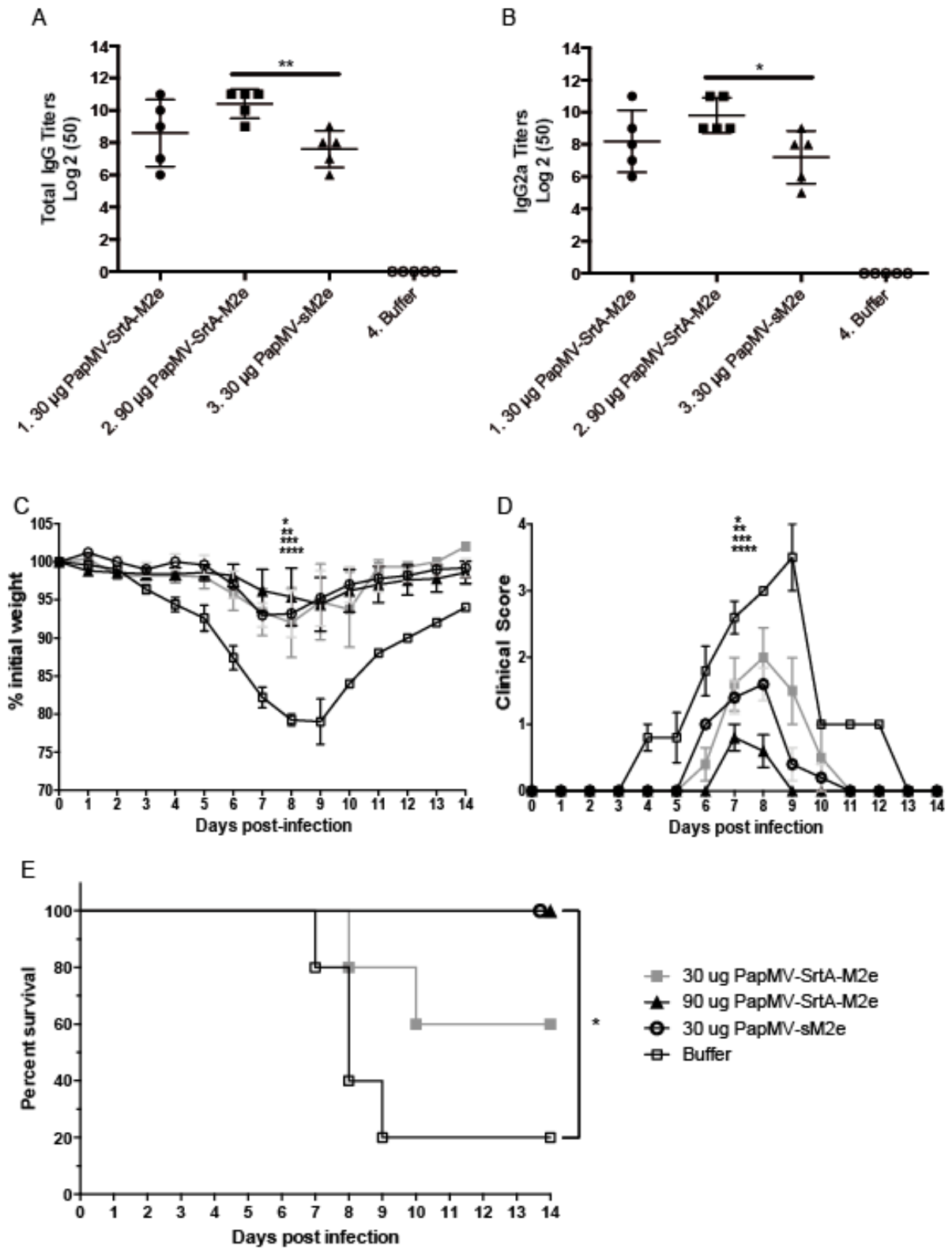


Figure 2-5. PapMV-SrtA-M2e induces specific M2e immunity with protection against influenza induced morbidity and mortality.

Supplementary figures

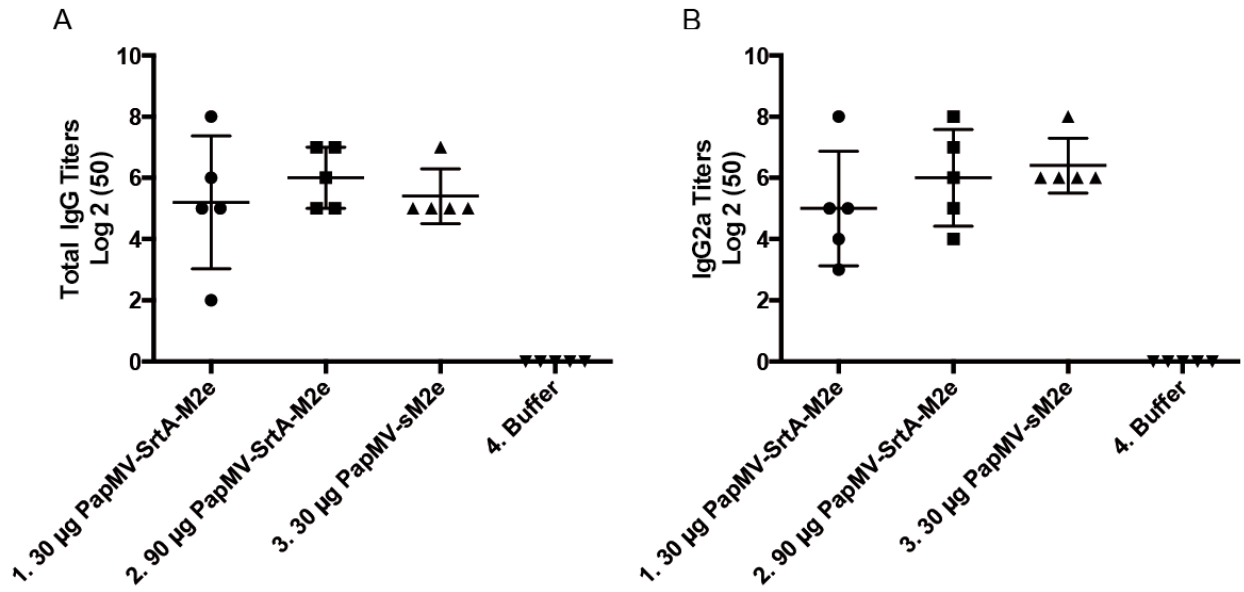


Figure S2-1. Anti-M2e immunity induced after the first immunization of PapMV-SrtA-M2e.

Chapitre 4 : Discussion

Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent le potentiel d'utilisation de la SrtA pour conjuguer des peptides à la surface des nanoparticules du PapMV. Le couplage des longs peptides M2e (27 acides aminés, influenza A) et T20 (39 acides aminés, HIV) a été montré efficace avec cette approche. Il s'agit des peptides les plus longs attachés à la plateforme du PapMV jusqu'ici. Nous avons montré que cette technique n'affecte ni la structure ni l'immunogénicité des nanoparticules. Le niveau de conjugaison sur la CP est d'environ 30 %, ce qui s'est avéré suffisant pour induire de fortes réponses humorales contre les peptides M2e et T20. Le potentiel immunologique de PapMV-SrtA-M2e conjugué à 30 % était comparable à d'autres nanoparticules (PapMV-sM2e) portant l'épitope EVETPIRNE sur 100% des sous-unités. Conséquemment, cette approche s'avère prometteuse. Cependant, il reste à valider si ce niveau d'efficacité peut-être reproduit pour un grand nombre de peptides différents.

Quoique l'efficacité de couplage démontrée pour les peptides M2e et T20 soit efficace, il est aussi possible que ce niveau de conjugaison puisse être amélioré en jouant sur les paramètres de la réaction de transpeptidation (temps, température, quantité de SrtA, de PapMV-SrtA et/ou de peptide). Certains paramètres ont été modifiés, mais nous n'avons pas pu obtenir une efficacité de conjugaison supérieure. De plus, diverses étapes d'optimisation seront nécessaires afin de rendre la conjugaison de peptides plus efficace et nécessiter moins de matériel. Par exemple, le site de reconnaissance sur la CP peut aussi être amélioré en ajoutant un bras de glycine avant le motif LPETGG et ainsi rendre cette région plus flexible. La flexibilité de la région entourant le site de reconnaissance est un paramètre important pour la réaction (Ritzefeld, 2014). Le niveau de conjugaison maximal dû à des encombrements stériques et à la nature réversible de la réaction SrtA est possiblement déjà atteint, malgré une efficacité d'environ 30%. L'environnement et la solution de la réaction (pH, excès de NaCl) semblent cependant avoir un effet sur l'efficacité de couplage. En effet, des résultats préliminaires ont montré que l'ajout de NaCl en excès (500 mM) augmente l'efficacité de conjugaison de peptide GGG-M2e à environ 50%. Il demeure à vérifier si cette technique permet de générer le même résultat pour différents substrats polyG.

Diverses techniques chimiques/génétiques ont été développées pour favoriser une certaine irréversibilité de la réaction (Antos, Chew, et al., 2009; Li et al., 2014; Liu et al., 2014; Yamamura et al., 2011). Par exemple, Yamamura et al. (2011) ont démontré que la génération d'une structure rigide en « β -hairpin » après la réaction de couplage entre le substrat polyG et le motif LPXTG permet d'augmenter le niveau de conversion du produit final de 20 %. La structure rigide induite rend le substrat LPXTG méconnaissable par la

SrtA ainsi l'empêchant de revenir et de cliver le produit de conjugaison d'intérêt. Une deuxième stratégie pour augmenter l'efficacité de la réaction SrtA est de remplacer la glycine au C-terminal du motif LPXTG par un méthyle ester (LPXT-OMe) (Antos, Chew, et al., 2009). La reconnaissance du motif LPXT-OMe libère du MeOH, un mauvais nucléophile, au lieu d'un substrat nucléophile avec une glycine au N-terminus. Si l'on adaptait une de ces techniques pour la plateforme PapMV-SrtA, nous pourrions évaluer l'influence de la densité peptidique sur la réponse immunitaire. Cet outil pourrait aussi être utile dans les cas de peptides et/ou protéines difficiles à conjuguer.

Le peptide M2e (24 aa) est le plus long peptide à avoir été efficacement inséré par fusion génétique dans l'histoire du laboratoire. La fusion de M2e à l'extrémité C-terminale de la CP du PapMV (PapMVCP-M2e) avait permis l'assemblage de nanoparticules, cependant, la structure et l'immunogénicité de ces nanoparticules étaient déficientes à cause de la fusion. Ainsi, plusieurs immunisations et l'ajout d'adjuvant étaient nécessaires pour induire une réponse protectrice contre une infection subséquente par le virus de l'influenza chez les souris immunisées (Denis, Elizabeth, et al., 2008). Afin de résoudre ce problème structural, l'insertion d'un plus petit (9 aa) peptide dérivé de M2e (EVETPIRNE) au N-terminus de la CP (PapMV-sM2e) a diminué les effets engendrés sur la structure des nanoparticules et a permis de générer une réponse protectrice contre une infection à l'influenza chez les souris après une seule immunisation, mettant ainsi en évidence l'importance de la structure sur la qualité de la réponse immunitaire (Carignan et al., 2015). Les 30% de peptides M2e complet conjugués sur les nanoparticules PapMV-SrtA ont été suffisants pour induire des niveaux comparables d'anticorps à ceux obtenus par PapMV-sM2e après une ou deux immunisations (Fig. 2-5AB et S2-1). La réponse humorale induite par PapMV-SrtA-M2e a permis de protéger les souris contre une infection subséquente à l'influenza A après deux immunisations. Étant donné que les niveaux d'anticorps anti-M2e obtenus après une immunisation avec PapMV-SrtA-M2e étaient comparables à ceux obtenus par Carignan et al. (2015), les souris auraient possiblement été protégées contre une infection dès la première immunisation. L'utilisation du peptide M2e complet au lieu de l'épitope EVETPIRNE pourrait avoir généré une réponse humorale plus complexe envers d'autres épitopes résultants en un pouvoir protecteur semblable à celui induit par PapMV-sM2e tout en contenant 70% moins d'antigène. Ce résultat montre toute la force et le potentiel de cette approche.

Considérant le grand effet de l'insertion génétique du peptide M2e de 24 acides aminés sur l'intégrité et l'immunogénicité des nanoparticules, il est possible que la CP génétiquement fusionnée avec le peptide T20 de 39 acides aminés n'ait pu être produite ou assemblée en nanoparticules immunogéniques. La SrtA n'a eu aucun problème à conjuguer le peptide T20 sur les nanoparticules PapMV-SrtA avec la même efficacité que le peptide M2e. Tout comme M2e, la conjugaison du peptide T20 qui est relativement plus long n'a pas affecté l'intégrité structurale et l'immunogénicité des nanoparticules. De hauts taux d'anticorps anti-T20 ont été induits

après une immunisation et ont augmenté suivant une deuxième immunisation. Malgré cette forte réponse humorale spécifique, aucune neutralisation significative du VIH n'a été observée lors de tests *in vitro* standards. La neutralisation de l'infection par le VIH demeure très complexe. Temporellement, la fenêtre d'accès à cette région est relativement courte, de l'ordre d'une quinzaine de minutes ou moins (Frey, Peng, & S, 2008). De plus, l'encombrement stérique de cette région lors de la fusion pourrait restreindre l'accès aux anticorps, qui sont des structures beaucoup plus imposantes que le peptide T20 de 36 acides aminés libre (enfuvirtide) (Nelson et al., 2007). La présence d'anticorps naturel neutralisant reconnaissant cette région MPER chez des patients infectés (mAb 2F5 (Muster et al., 1993), 4E10 (Stiegler et al., 2001; Zwick et al., 2001), Z13 (Zwick et al., 2001)) indique qu'il est possible de neutraliser le VIH avec des anticorps dirigés contre cette région. Cependant, le niveau de prévalence de ces anticorps neutralisants chez les patients infectés est extrêmement bas indiquant que ces antigènes sont faiblement immunogéniques (Nelson et al., 2007). Guohua Yi et al., (2015) ont démontré qu'il était toutefois possible d'induire des anticorps neutralisants envers l'épitope 4E10 du HIV présenté sur le rhinovirus humain (HRV14). Ils ont aussi démontré que ces anticorps reconnaissent le trimère de gp41 et qu'ils étaient en mesure de neutraliser divers isolats primaires du VIH.

On sait que la protéine gp41 possède trois différentes conformations selon le stade de l'infection (native, pré et post fusion) (Hinz et al., 2009). Il est possible que les épitopes ne soient pas présentés de la même façon sur une hélice alpha simple que sur le faisceau en triple superhélice de la conformation intermédiaire pré-tige-boucle puisque l'enroulement des superhélices est légèrement plus serré qu'une hélice alpha simple (3.5 acides aminés par tour comparativement à 3.6). Ainsi, il serait intéressant de vérifier si les anticorps induits par PapMV-SrtA-T20 reconnaissent le trimère gp41 (comme dans les travaux de G Yi et al., 2015). De plus, l'épitope de l'anticorps humain neutralisant 2F5 (ELDKWA) étant présent dans la séquence du peptide T20, il serait possible de vérifier si ce dernier réagit avec les nanoparticules PapMV-SrtA-T20. Alternativement, une meilleure cible à tester sur le PapMV, au niveau de l'accessibilité aux anticorps induits par la plateforme, serait le site de liaison au récepteur CD4 de la protéine gp120 tel que reconnu par l'anticorps humain neutralisant b12 (Burton et al., 1994) ou encore contre les carbohydrates sur la surface externe de gp120 reconnu par l'anticorps humain 2G12 (Trkola, Purtscher, Muster, & Ballaun, 1996). Contrairement aux anticorps dirigés contre la région MPER de la protéine gp41, ces anticorps contre gp120 peuvent neutraliser des virions libres en circulation (Burton et al., 1994; Trkola et al., 1996), ce qui pourrait ainsi permettre la création d'un vaccin prophylactique efficace. Les régions ciblées par les anticorps 2G12 et b12 sont tout de même variables et pour un meilleur vaccin prophylactique plusieurs antigènes différents devraient être utilisés. Le virus aurait beaucoup plus de difficulté à muter pour contrer un mélange d'anticorps spécifiques comparativement à l'utilisation d'un seul antigène qui force le processus de sélection naturelle vers un mutant non reconnaissable par le seul anticorps induit par le vaccin. Le choix de peptide conjugué sur la

plateforme PapMV-SrtA est essentiel à l'efficacité et au succès de celle-ci. Si le peptide conjugué à la plateforme est difficilement accessible sur le virus natif ou s'il n'a pas un grand effet sur la protection, la plateforme ne sera pas efficace même si elle augmente l'immunogénicité du peptide.

Les travaux présentés avec les peptides M2e et T20 démontrent le potentiel la plateforme PapMV-SrtA dans le développement de vaccin induisant de fortes réponses humorales. La protection contre des pathogènes infectieux, plus particulièrement pour les infections chroniques ou encore contre le cancer, nécessite l'induction de réponse cellulaire cytotoxique. Ainsi, il serait intéressant de conjuguer des peptides contenant des épitopes CTL sur la plateforme afin de voir si elle peut les rendre immunogéniques. Des expériences préliminaires ont démontré que la conjugaison des épitopes CTL choisis à l'aide de la SrtA sur les nanoparticules du PapMV était plus difficile que prévu. Il est possible que les propriétés chimiques (charge, polarité, etc.) des peptides aient un effet sur la capacité de conjugaison sur les nanoparticules. La SrtA n'attache pas elle-même les peptides sur le motif donneur LPXTG, mais c'est plutôt le substrat polyG qui fait une attaque nucléophile pour décrocher la SrtA et se lier. Il est donc possible que les peptides CTL modèles que nous avons testés, GG-Trp2_178-203 et GGG-AH1 n'ont pas le même caractère nucléophile que les peptides M2e et T20, ou qu'il ne soit pas assez fort pour déplacer la SrtA. L'analyse des caractéristiques chimiques des peptides GGG-T20 et GGG-M2e montrent qu'ils possèdent tous deux un caractère acide tandis que les peptides CTL GGG-AH1 et GGG-Trp2_178-203, eux sont très basiques (annexes 1, 2, 3 et 4). Par définition, un nucléophile est attiré par les charges positives, donc, un nucléophile est chargé négativement. Un peptide possédant une charge globale négative correspond à un peptide à caractère acide. Comparativement, un peptide à caractère basique possède une charge globale positive. Or, par définition, les peptides à caractère basique ne peuvent pas agir comme nucléophile puisqu'ils sont des électrophiles et sont repoussés par les charges négatives. Dans cette logique, les peptides CTL GGG-AH1 et GGG-Trp2_178-203 possédant des caractères basiques ne seraient pas des substrats polyG compétents pour résoudre l'intermédiaire LPXT-SrtA par attaque nucléophile. Ainsi, il serait pertinent de faire des essais de conjugaison avec des peptides possédant les caractéristiques d'un nucléophile. Une analyse sur un grand nombre de peptides de différentes charges serait pertinente pour déterminer les caractéristiques nécessaires pour obtenir une conjugaison efficace sur la plateforme PapMV-SrtA.

Il reste beaucoup de travail à faire pour comprendre le fonctionnement de la réaction de transpeptidation sur la plateforme du PapMV-SrtA. Il est important d'élucider les propriétés peptidiques permettant la conjugaison d'un peptide X comparativement au peptide Y pour l'utilisation de la plateforme du PapMV-SrtA dans le développement de nouveaux vaccins. Il serait aussi nécessaire de déterminer le potentiel de conjugaison d'une protéine complète sur la plateforme à l'aide de la SrtA et comment les caractères chimiques affecteront le potentiel de conjugaison comparativement aux peptides. La conjugaison d'une

protéine complète au lieu d'un peptide pourrait permettre une réponse immunitaire plus complexe et complète contre le pathogène cible puisque la protéine complète peut présenter de nombreux épitopes.

Bien qu'il reste des questions en suspens, cette approche de conjugaison par la SrtA augmente le potentiel de la plateforme du PapMV et facilite son utilisation dans le développement rapide de nouveaux vaccins. Au point de vue pratique, en moins d'un mois il est possible d'obtenir un vaccin candidat prêt à être testé. En une journée, il est possible d'obtenir une nouvelle particule chimérique portant un antigène vaccinal d'intérêt. En une à deux semaines, les différentes analyses biochimiques et structurales peuvent être complétées pour donner lieu à des particules chimériques prêtes à être utilisées et testées chez les animaux. Étant donné que la conjugaison a lieu sur les protéines du PapMV post-assemblage et sous forme de nanoparticules, à partir d'un seul lot de PapMV-SrtA on pourrait générer plusieurs vaccins contre différents pathogènes ou maladies. Par exemple, le lot pourrait être séparé en quatre pour faire quatre différents vaccins : (1) conjugaison à des antigènes de l'influenza (2) conjugaison à des antigènes du HIV (3) conjugaison à des antigènes de l'Alzheimer et (4) conjugaison à des antigènes tumoraux. De plus, il serait aussi possible de conjuguer plusieurs antigènes sur une même nanoparticule permettant d'avoir plusieurs antigènes dans un vaccin sans avoir à produire plusieurs différents lots de nanoparticules PapMV-SrtA pour chacun des antigènes. Par exemple, dans un vaccin universel contre l'Influenza, on voudrait avoir plusieurs des antigènes conservés de la tige de HA, M2e et la protéine NP. Au lieu de produire trois différents lots (PapMV-SrtA-M2e, PapMV-SrtA-HA, PapMV-SrtA-NP) et de les mélanger, les trois antigènes pourraient être conjugués en même temps pour faire un lot de PapMV-SrtA qui les présente tous.

Il est évident que cette technologie possède un grand potentiel dans le développement de nouveaux vaccins. Si l'on regarde les différents substrats ayant été conjugués par la SrtA sur des substrats protéiques ou synthétiques dans la littérature, la SrtA pourrait être utilisée pour conjuguer beaucoup plus que des simples peptides sur les nanoparticules du PapMV. Dans l'optique de développement de vaccin prophylactique et thérapeutique contre le cancer, la SrtA pourrait être utilisée pour conjuguer des sucres antigéniques associés aux tumeurs (TACAs- tumor associated carbohydrate antigens) qui sont surexprimés chez de nombreux types de cellules malignes (D. Feng, Shaikh, & Wang, 2016; Zhaojun Yin et al., 2013).

Chapitre 5 : Conclusion

Le projet décrit dans ce mémoire met en évidence que la transpeptidation par la SrtA permet la génération de particules de PapMV plus rapidement et facilement que par fusion génétique. Cette technologie est plus flexible et permet l'insertion de plus gros antigène sur les nanoparticules du PapMV. L'insertion du motif de reconnaissance de la SrtA à l'extrémité C-terminale de la CP n'a ni affecté l'auto-assemblage des protéines ni les caractéristiques structurales des nanoparticules du PapMV. La conjugaison d'antigène par la SrtA permet de générer des nanoparticules chimériques hautement immunogéniques. Ces antigènes peuvent être considérablement plus longs que ceux permis par la fusion génétique. Toutefois, cette technique n'est pas être sans limitation. Une conjugaison efficace n'a pu être obtenue pour tous les antigènes testés. Les propriétés chimiques des peptides semblent s'avérer un déterminant important dans le potentiel de la conjugaison du peptide d'intérêt sur la plateforme PapMV-SrtA. Nous travaillons actuellement sur l'élucidation des caractéristiques chimiques nécessaires pour la conjugaison sur la plateforme PapMV-SrtA. Cette nouvelle plateforme vaccinale PapMV-SrtA permet la génération de nouveaux vaccins plus facilement et plus rapidement qu'avec les technologies traditionnelles. Il est évident que cette nouvelle plateforme vaccinale possède un grand potentiel d'utilisation polyvalent.

Bibliographie

- A, M. A., Corbo, T. A., Sherri, W.-C., Nguyen, L. V, Smith, M. L., Palmer, K. E., & Pogue, G. P. (2006). TMV-peptide fusion vaccines induce cell-mediated immune responses and tumor protection in two murine models. *Vaccine*, 24(40-41), 6414–6423. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.003>
- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., ... Fauquet, C. M. (2004). Erratum: The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation (*Archives of Virology* (2004) 149 (1045-1060)). *Archives of Virology*, 149(8), 1672. <http://doi.org/10.1007/s00705-004-0384-x>
- Albrecht von Brunn; Margarethe Brand; Christine Reichhuber; Corinna Morys-Wortmann; Fritz Deinhardt; Florian Schödel. (1993). Principal neutralizing domain of HIV-1 is highly immunogenic when expressed on the surface of hepatitis B core particles. *Vaccine*, 11(8), 817–824. [http://doi.org/10.1016/0264-410x\(93\)90356-3](http://doi.org/10.1016/0264-410x(93)90356-3)
- Ana, V.-M., Garin, M. I., Estela, P.-M., Veratti, E., Bueren, J. A., Fender, P., & Lenormand, J.-L. L. (2010). In vivo delivery of antigens by adenovirus dodecahedron induces cellular and humoral immune responses to elicit antitumor immunity. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(5), 1046–1053. <http://doi.org/10.1038/mt.2010.16>
- Antos, J. M., Chew, G. L., Guimaraes, C. P., Yoder, N. C., Grotenbreg, G. M., Popp, M. W. L., & Ploegh, H. L. (2009). Site-specific N- and C-terminal labeling of a single polypeptide using sortases of different specificity. *Journal of the American Chemical Society*, 131(31), 10800–10801.
- Antos, J. M., Miller, G. M., Grotenbreg, G. M., & Ploegh, H. L. (2008). Lipid Modification of Proteins through Sortase-Catalyzed Transpeptidation. *Journal of the American Chemical Society*, 130(48), 16338–16343. <http://doi.org/10.1021/ja806779e>
- Antos, J. M., Popp, M. W., Ernst, R., Chew, G.-L. L., Spooner, E., & Ploegh, H. L. (2009). A straight path to circular proteins. *J. Biol. Chem.*, 284(23), 16028–16036. <http://doi.org/10.1074/jbc.M901752200>
- Arcangeli, C., Circelli, P., & Donini, M. (2014). Structure-based design and experimental engineering of a plant virus nanoparticle for the presentation of immunogenic epitopes and as a drug carrier. <http://doi.org/10.1080/07391102.2013.785920>
- Arora, U., Tyagi, P., Swaminathan, S., & Khanna, N. (2013). Virus-like particles displaying envelope domain III of dengue virus type 2 induce virus-specific antibody response in mice. *Vaccine*, 31(6), 873–878. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.12.016>
- Babin, C., Majeau, N., & Leclerc, D. (2013). Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles with a CTL epitope derived from influenza NP. *Journal of Nanobiotechnology*, 11(1), 10. <http://doi.org/10.1186/1477-3155-11-10>
- Birkett, A., Lyons, K., Schmidt, A., Boyd, D., Oliveira, G. A., Siddique, A., ... Nardin, E. (2002). A modified hepatitis B virus core particle containing multiple epitopes of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein provides a highly immunogenic malaria vaccine in preclinical analyses in rodent and primate hosts. *Infection and Immunity*, 70(12), 6860–6870. <http://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6860-6870.2002>
- Bisht, H., Chugh, D. A., Raje, M., Swaminathan, S. S., & Khanna, N. (2002). Recombinant dengue virus type 2 envelope/hepatitis B surface antigen hybrid protein expressed in Pichia pastoris can function as a bivalent immunogen. *Journal of Biotechnology*, 99(2), 97–9110.
- Brennan, F. R., Gilleland, L. B., Staczek, J., Bendig, M. M., Hamilton, W. D., & Gilleland, H. E. (1999). A chimaeric plant virus vaccine protects mice against a bacterial infection. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 8, 2061–2067. <http://doi.org/10.1099/13500872-145-8-2061>
- Brennan, F. R., Jones, T. D., Gilleland, L. B., Bellaby, T., Xu, F., North, P. C., ... Gilleland, H. E. (1999). Pseudomonas aeruginosa outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 1, 211–220. <http://doi.org/10.1099/13500872-145-1-211>
- Brennan, F. R., Jones, T. D., Longstaff, M., Chapman, S., Bellaby, T., Smith, H., ... Flock, J. I. (1999).

- Immunogenicity of peptides derived from a fibronectin-binding protein of *S. aureus* expressed on two different plant viruses. *Vaccine*, 17(15-16), 1846–1857.
- Brodzik, R., Bandurska, K., Deka, D., Golovkin, M., & Koprowski, H. (2005). Advances in alfalfa mosaic virus-mediated expression of anthrax antigen in planta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(2), 717–722. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.196>
- Brown, A. L., Francis, M. J., Hastings, G. Z., Parry, N. R., Barnett, P. V., Rowlands, D. J., & Clarke, B. E. (1991). Foreign epitopes in immunodominant regions of hepatitis B core particles are highly immunogenic and conformationally restricted. *Vaccine*, 9(8), 595–601.
- Burton, D. R., Pyati, J., Koduri, R., Sharp, S. J., Thornton, G. B., Parren, P. W., ... Nara, P. L. (1994). Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5187), 1024–1027.
- Caldeira, J. do C., Medford, A., Kines, R. C., Lino, C. A., Schiller, J. T., Chackerian, B., & Peabody, D. S. (2010). Immunogenic display of diverse peptides, including a broadly cross-type neutralizing human papillomavirus L2 epitope, on virus-like particles of the RNA bacteriophage PP7. *Vaccine*, 28(27), 4384–4393. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.049>
- Cañizares, M. C., Nicholson, L., & Lomonosoff, G. P. (2005). Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunology and Cell Biology*, 83(3), 263–270. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01339.x>
- Carignan, D., Thérien, A., Rioux, G., Paquet, G., Gagné, M.-È. L., Bolduc, M., ... Leclerc, D. (2015). Engineering of the PapMV vaccine platform with a shortened M2e peptide leads to an effective one dose influenza vaccine. *Vaccine*. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.123>
- Carrillo-Tripp, M., Shepherd, C. M., Borelli, I. A., Venkataraman, S., Lander, G., Natarajan, P., ... Reddy, V. S. (2009). VIPERdb2: An enhanced and web API enabled relational database for structural virology. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), 436–442. <http://doi.org/10.1093/nar/gkn840>
- Chackerian, B., Rangel, M., Hunter, Z., & Peabody, D. S. (2006). Virus and virus-like particle-based immunogens for Alzheimer's disease induce antibody responses against amyloid-beta without concomitant T cell responses. *Vaccine*, 24(37-39), 6321–6331. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.059>
- Chen, S., Zheng, D., Li, C., Zhang, W., Xu, W., Liu, X., ... Chen, Z. (2015). Protection against multiple subtypes of influenza viruses by virus-like particle vaccines based on a hemagglutinin conserved epitope. *{BioMed} Research International*, 2015, 901817. <http://doi.org/10.1155/2015/901817>
- Chen, T.-H. H., Chen, T.-H. H., Hu, C.-C. C., Liao, J.-T. T., Lee, C.-W. W., Liao, J.-W. W., ... Hsu, Y.-H. H. (2012). Induction of protective immunity in chickens immunized with plant-made chimeric Bamboo mosaic virus particles expressing very virulent Infectious bursal disease virus antigen. *Virus Research*, 166(1-2), 109–115. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.02.021>
- Cheong, W.-S. S., Reiseiger, J., Turner, S. J., Boyd, R., & Netter, H.-J. J. (2009). Chimeric virus-like particles for the delivery of an inserted conserved influenza A-specific CTL epitope. *Antiviral Research*, 81(2), 113–122. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.003>
- Chroboczek, J., Szurgot, I., & Szolajska, E. (2014). Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochimica Polonica*, 61(3), 531–539.
- Clancy, K. W., Melvin, J. a, & McCafferty, D. G. (2010). Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition. *Biopolymers*, 94(4), 385–96. <http://doi.org/10.1002/bip.21472>
- Clarke, B. E., Newton, S. E., Carroll, A. R., Francis, M. J., Appleyard, G., Syred, A. D., ... Brown, F. (1987). Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. *Nature*, 330(6146), 381–384. <http://doi.org/10.1038/330381a0>
- Cornuz, J., Zwahlen, S., Jungi, W. F., Osterwalder, J., Klingler, K., van Melle, G., ... Cerny, T. (2008). A vaccine against nicotine for smoking cessation: a randomized controlled trial. *PloS One*, 3(6), e2547. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0002547>
- Coughlan, L., Mullarkey, C., & Gilbert, S. (2015). Adenoviral vectors as novel vaccines for influenza. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(3), 382–399. <http://doi.org/10.1111/jphp.12350>
- Dale, C. J., Liu, X. S., De Rose, R., Purcell, D. F. J., Anderson, J., Xu, Y., ... Kent, S. J. (2002). Chimeric Human Papilloma Virus–Simian/Human Immunodeficiency Virus Virus-like-Particle Vaccines:

- Immunogenicity and Protective Efficacy in Macaques. *Virology*, 301(1), 176–187.
<http://doi.org/10.1006/viro.2002.1589>
- Dalsgaard, K., Uttenthal, A., Jones, T. D., Xu, F., Merryweather, A., Hamilton, W. D., ... Rodgers, P. B. (1997). Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature Biotechnology*, 15(3), 248–252. <http://doi.org/10.1038/nbt0397-248>
- Damodharan, S., Gujar, R., & Pattabiraman, S. (2013). Expression and immunological characterization of cardamom mosaic virus coat protein displaying HIV gp41 epitopes. <http://doi.org/10.1111/1348-0421.12045>
- de Vries, R. D., Altenburg, A. F., & Rimmelzwaan, G. F. (2015). Universal influenza vaccines, science fiction or soon reality? *Expert Review of Vaccines*, 14(10), 1299–301.
<http://doi.org/10.1586/14760584.2015.1060860>
- Denis, J., Acosta-Ramirez, E., Zhao, Y., Hamelin, M. E., Koukavica, I., Baz, M., ... Leclerc, D. (2008). Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine*, 26(27-28), 3395–3403.
<http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.052>
- Denis, J., Elizabeth, A.-R., Zhao, Y., Hamelin, M.-E. E., Koukavica, I., Baz, M., ... Leclerc, D. (2008). Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus {(PapMV)} vaccine platform. *Vaccine*, 26(27-28), 3395–3403.
<http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.052>
- Denis, J., Majeau, N., Acosta-Ramirez, E., Savard, C., Bedard, M. C., Simard, S., ... Leclerc, D. (2007). Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: Evidence for the critical function of multimerization. *Virology*, 363(1), 59–68. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2007.01.011>
- Dong, Y., Zhang, G., Huang, X., Chen, L., & Chen, H. (2015). Promising MS2 mediated virus-like particle vaccine against foot-and-mouth disease. *Antiviral Research*, 117, 39–43.
<http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.01.005>
- Dudek, N. L., Perlmutter, P., Aguilar, M.-I. I., Croft, N. P., & Purcell, A. W. (2010). Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Current Pharmaceutical Design*, 16(28), 3149–3157.
- Eckhart, L., Raffelsberger, W., Ferko, B., Klima, A., Purtscher, M., Katinger, H., & R"uker, F. (1996). Immunogenic presentation of a conserved gp41 epitope of human immunodeficiency virus type 1 on recombinant surface antigen of hepatitis B virus. *The Journal of General Virology*, 77 (Pt 9), 2001–2008.
<http://doi.org/10.1099/0022-1317-77-9-2001>
- Feng, D., Shaikh, A. S., & Wang, F. (2016). Recent Advance in Tumor-associated Carbohydrate Antigens (TACAs)-based Antitumor Vaccines. *ACS Chem. Biol.*, 11(4), 850–863.
<http://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00084>
- Feng, G., Wang, W., Qian, Y., & Jin, H. (2013). Anti-A β antibodies induced by A β -HBc virus-like particles prevent A β aggregation and protect PC12 cells against toxicity of A β 1-40. *Journal of Neuroscience Methods*, 218(1), 48–54. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.05.006>
- Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G. A., Li, J., Mottram, P. L., ... Plebanski, M. (2004). Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *The Journal of Immunology*, 173(5), 3148–3154. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3148>
- Frey, G., Peng, H., & S, R.-V. (2008). A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 targeted by broadly neutralizing antibodies. <http://doi.org/10.1073/pnas.0800255105>
- Fu, L., Li, Y., Hu, Y., Yu, B., Zhang, H., Wu, J., ... Kong, W. (2015). Norovirus P particle: An excellent vaccine platform for antibody production against Alzheimer's disease. *Immunology Letters*, 168(1), 22–30.
<http://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.09.002>
- Gao, X., Wang, W., Li, Y., Zhang, S., Duan, Y., Xing, L., ... Yang, P. (2013). Enhanced Influenza VLP vaccines comprising matrix-2 ectodomain and nucleoprotein epitopes protects mice from lethal challenge. *Antiviral Research*, 98(1), 4–11. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.01.010>
- Gilleland, H. E., Gilleland, L. B., Staczek, J., Harty, R. N., A, G.-S., Palese, P., ... Beachy, R. N. (2000). Chimeric animal and plant viruses expressing epitopes of outer membrane protein F as a combined vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*,

27(4), 291–297.

- Hassani-Mehraban, A., Creutzburg, S., van Heereveld, L., & Kormelink, R. (2015). Feasibility of Cowpea chlorotic mottle virus-like particles as scaffold for epitope presentations. *BMC Biotechnology*, *15*(1), 80. <http://doi.org/10.1186/s12896-015-0180-6>
- Hata, Y., Matsumoto, T., Tanaka, T., & Kondo, A. (2015). C-Terminal-oriented Immobilization of Enzymes Using Sortase A-mediated Technique. *Macromolecular Bioscience*, *15*(10), 1375–1380. <http://doi.org/10.1002/mabi.201500113>
- He, Y. (2013). Synthesized peptide inhibitors of HIV-1 gp41-dependent membrane fusion.
- Hema, M., Nagendrakumar, S. B., Yamini, R., Chandran, D., Rajendra, L., Thiagarajan, D., ... Srinivasan, V. A. (2007). Chimeric tymovirus-like particles displaying foot-and-mouth disease virus non-structural protein epitopes and its use for detection of FMDV-NSP antibodies. *Vaccine*, *25*(25), 4784–4794. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.023>
- Hess, G. T., Cragolini, J. J., Popp, M. W., Allen, M. a., Dougan, S. K., Spooner, E., ... Guimaraes, C. P. (2012). M13 bacteriophage display framework that allows sortase-mediated modification of surface-accessible phage proteins. *Bioconjugate Chemistry*, *23*(7), 1478–1487.
- Hinz, A., Schoehn, G., Quendler, H., Hulsik, D. L., Stiegler, G., Katinger, H., ... Weissenhorn, W. (2009). Characterization of a trimeric MPER containing HIV-1 gp41 antigen. *Virology*, *390*(2), 221–227. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2009.05.015>
- Huang, D. B., Wu, J. J., & Tyring, S. K. (2004). A review of licensed viral vaccines, some of their safety concerns, and the advances in the development of investigational viral vaccines. *The Journal of Infection*, *49*(3), 179–209. <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.05.018>
- Isagulians, M. G., Nordlund, S., S"allberg, M., Smirnov, V. D., Rudén, U., & Wahren, B. (1996). HIV-1 epitopes exposed by hybrid hepatitis B core particles affect proliferation of peripheral blood mononuclear cells from HIV-1 positive donors. *Immunology Letters*, *52*(1), 37–44.
- Jariyapong, P., Xing, L., van Houten, N. E., Li, T.-C. C., Weerachatanukul, W., Hsieh, B., ... Cheng, R. H. (2013). Chimeric hepatitis E virus-like particle as a carrier for oral-delivery. *Vaccine*, *31*(2), 417–424. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.073>
- Jennings, G. T., & Bachmann, M. F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological Chemistry*, *389*(5), 521–536. <http://doi.org/10.1515/BC.2008.064>
- Jiang, L., Li, Q., Li, M., Zhou, Z., Wu, L., Fan, J., ... Xu, Z. (2006). A modified TMV-based vector facilitates the expression of longer foreign epitopes in tobacco. *Vaccine*, *24*(2), 109–115. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.060>
- Jiang, P., Du, W., Xiong, Y., Lv, Y., Feng, J., Zhu, S., ... Zhang, L. (2015). Hepatitis B virus core antigen as a carrier for Chlamydia trachomatis MOMP multi-epitope peptide enhances protection against genital chlamydial infection. *Oncotarget*, *6*(41), 43281–43292. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.6533>
- Jiang, R., Wang, L., Weingart, J., & Sun, X.-L. L. (2014). Chemoenzymatic bio-orthogonal chemistry for site-specific double modification of recombinant thrombomodulin. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, *15*(1), 42–46. <http://doi.org/10.1002/cbic.201300641>
- Jin, H., Wang, W., Zhao, S., Yang, W., Qian, Y., Jia, N., & Feng, G. (2014). A β -Hbc virus-like particles immunization without additional adjuvant ameliorates the learning and memory and reduces A β deposit in PDAPP mice. *Vaccine*, *32*(35), 4450–4456. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.051>
- Jobsri, J., Allen, A., Rajagopal, D., Shipton, M., Kanyuka, K., Lomonossoff, G. P., ... Savelyeva, N. (2015). Plant virus particles carrying tumour antigen activate TLR7 and induce high levels of protective antibody. *PLoS ONE*, *10*(2), 1–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0118096>
- Joelson, T., Akerblom, L., Oxelfelt, P., Strandberg, B., Tomenius, K., & Morris, T. J. (1997). Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *The Journal of General Virology*, *78* (Pt 6), 1213–1217. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-78-6-1213>
- Jones, R. M., Chichester, J. A., Mett, V., Jaje, J., Tottey, S., Manceva, S., ... Yusibov, V. (2013). A plant-produced Pfs25 VLP malaria vaccine candidate induces persistent transmission blocking antibodies against plasmodium falciparum in immunized mice. *PLoS ONE*, *8*(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0079538>

- Kündig, T. M., Senti, G., Schnetzler, G., Wolf, C., Prinz Vavricka, B. M., Fulurija, A., ... Bachmann, M. F. (2006). Der p 1 peptide on virus-like particles is safe and highly immunogenic in healthy adults. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(6), 1470–1476. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.01.040>
- Kalnciema, I., Skrastina, D., Ose, V., Pumpens, P., & Zeltins, A. (2012). Potato virus Y-like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches. *Molecular Biotechnology*, 52(2), 129–139. <http://doi.org/10.1007/s12033-011-9480-9>
- Kesik-Brodacka, M., & Plucienniczak, G. (2014). A universal flu vaccine. *Acta Biochimica Polonica*, 61(3), 523–530.
- Kim, H., Siu, K.-H., Raeeszadeh-Sarmazdeh, M., Sun, Q., Chen, Q., & Chen, W. (2015). Bioengineering strategies to generate artificial protein complexes. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(8), 1495–1505. <http://doi.org/10.1002/bit.25637>
- Kim, M.-G., Park, J. Y., Shon, Y., Kim, G., Shim, G., & Oh, Y.-K. (2014). Nanotechnology and vaccine development. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(5), 227–235. <http://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.06.002>
- Koletzki, D., Lundkvist, a, Sjölander, K. B., Gelderblom, H. R., Niedrig, M., Meisel, H., ... Ulrich, R. (2000). Puumala (PUU) hantavirus strain differences and insertion positions in the hepatitis B virus core antigen influence B-cell immunogenicity and protective potential of core-derived particles. *Virology*, 276(2), 364–375. <http://doi.org/10.1006/viro.2000.0540>
- Koo, M., Bendahmane, M., Lettieri, G. a, Paoletti, a D., Lane, T. E., Fitchen, J. H., ... Beachy, R. N. (1999). Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 7774–7779. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7774>
- Kozako, T., Fukada, K., Hirata, S., White, Y., Harao, M., Nishimura, Y., ... Arima, N. (2009). Efficient induction of human T-cell leukemia virus-1-specific CTL by chimeric particle without adjuvant as a prophylactic for adult T-cell leukemia. *Molecular Immunology*, 47(2-3), 606–613. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.09.006>
- Kumar, S., Ochoa, W., Singh, P., Hsu, C., Schneemann, A., Manchester, M., ... Reddy, V. (2009). Tomato bushy stunt virus (TBSV), a versatile platform for polyvalent display of antigenic epitopes and vaccine design. *Virology*, 388(1), 185–190. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.051>
- Kushnir, N., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31(1), 58–83. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.083>
- Lacasse, P., Denis, J., Lapointe, R., Leclerc, D., & Lamarre, A. (2008). Novel Plant Virus-Based Vaccine Induces Protective Cytotoxic T-Lymphocyte-Mediated Antiviral Immunity through Dendritic Cell Maturation. *Journal of Virology*, 82(2), 785–794. <http://doi.org/10.1128/JVI.01811-07>
- Langeveld, J. P., Brennan, F. R., JL, M.-T., Jones, T. D., Boshuizen, R. S., Vela, C., ... Hamilton, W. D. (2001). Inactivated recombinant plant virus protects dogs from a lethal challenge with canine parvovirus. *Vaccine*, 19(27), 3661–3670.
- Lebel, M.-È., Chartrand, K., Leclerc, D., & Lamarre, A. (2015). Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants. *Vaccines*, 3(3), 620–37. <http://doi.org/10.3390/vaccines3030620>
- Lebel, M.-È., Daudelin, J.-F., Chartrand, K., Tarrab, E., Kalinke, U., Savard, P., ... Lamarre, A. (2014). Nanoparticle adjuvant sensing by TLR7 enhances CD8+ T cell-mediated protection from *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Immunology*, 192, 1071–8. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1302030>
- Lebel, M.-È. È., Chartrand, K., Leclerc, D., & Lamarre, A. (2015). Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants. *Vaccines*, 3(3), 620–637. <http://doi.org/10.3390/vaccines3030620>
- Lebel, M.-È. È., Chartrand, K., Tarrab, E., Savard, P., Leclerc, D., & Lamarre, A. (2016). Potentiating Cancer Immunotherapy Using Papaya Mosaic Virus-Derived Nanoparticles. *Nano Letters*, 16(3), 1826–1832. <http://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b04877>
- Lebel, M.-È. È., Daudelin, J.-F. F., Chartrand, K., Tarrab, E., Kalinke, U., Savard, P., ... Lamarre, A. (2014). Nanoparticle adjuvant sensing by TLR7 enhances CD8+ T cell-mediated protection from *Listeria*

- monocytogenes infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *192*(3), 1071–1078. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1302030>
- Leclerc, D. (2014). Plant viral epitope display systems for vaccine development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *375*, 47–59. http://doi.org/10.1007/82_2011_183
- Leclerc, D., Beauseigle, D., Denis, J., Morin, H., Paré, C., Lamarre, A., & Lapointe, R. (2007). Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *Journal of Virology*, *81*(3), 1319–1326. <http://doi.org/10.1128/JVI.01720-06>
- Lee, K. L., Twyman, R. M., Fiering, S., & Steinmetz, N. F. (2016). Virus-based nanoparticles as platform technologies for modern vaccines. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, (Figure 1). <http://doi.org/10.1002/wnan.1383>
- Levary, D. A., Parthasarathy, R., Boder, E. T., & Ackerman, M. E. (2011). Protein-protein fusion catalyzed by sortase A. *PLoS One*, *6*(4), e18342. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0018342>
- Li, Y. M., Li, Y. T., Pan, M., Kong, X. Q., Huang, Y. C., Hong, Z. Y., & Liu, L. (2014). Irreversible site-specific hydrazinolysis of proteins by use of sortase. *Angewandte Chemie - International Edition*, *53*(8), 2198–2202. <http://doi.org/10.1002/anie.201310010>
- Lico, C., Mancini, C., Italiani, P., Betti, C., Boraschi, D., Benvenuto, E., & Baschieri, S. (2009). Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8+ T cells in mice. *Vaccine*, *27*(37), 5069–5076. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.045>
- Lin, C.-J. J., Chen, N.-Y. Y., Chen, J.-B. B., Lu, C.-S. S., Hung, A. F., Shiung, Y.-Y. Y., ... Chang, T. W. (2012). CεmX peptide-carrying HBcAg virus-like particles induced antibodies that down-regulate mlgE-B lymphocytes. *Molecular Immunology*, *52*(3-4), 190–199. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.015>
- Liu, F., Luo, E. Y., Flora, D. B., & Mezo, A. R. (2014). Irreversible sortase a-mediated ligation driven by diketopiperazine formation. *Journal of Organic Chemistry*, *79*(2), 487–492.
- Low, J. G., Lee, L. S., Ooi, E. E., Ethirajulu, K., Yeo, P., Matter, A., ... Veronica, N.-D. (2014). Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine: results from a double-blinded, randomized Phase I clinical trial in healthy Asian volunteers. *Vaccine*, *32*(39), 5041–5048. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.011>
- Lua, L. H. L., Connors, N. K., Sainsbury, F., Chuan, Y. P., Wibowo, N., & Middelberg, A. P. J. (2014). Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*, *111*(3), 425–440. <http://doi.org/10.1002/bit.25159>
- Ludwig, C., & Wagner, R. (2007). Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Current Opinion in Biotechnology*, *18*(6), 537–545. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.013>
- Ma, Y., & Li, J. (2011). Vesicular stomatitis virus as a vector to deliver virus-like particles of human norovirus: a new vaccine candidate against an important noncultivable virus. *J. Virol.*, *85*(6), 2942–2952. <http://doi.org/10.1128/JVI.02332-10>
- Madej, M. P., Coia, G., Williams, C. C., Caine, J. M., Pearce, L. A., Attwood, R., ... Adams, T. E. (2012). Engineering of an anti-epidermal growth factor receptor antibody to single chain format and labeling by sortase A-mediated protein ligation. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(6), 1461–1470. <http://doi.org/10.1002/bit.24407>
- Mallajosyula, J. K., Hiatt, E., Hume, S., Johnson, A., Jeevan, T., Chikwamba, R., ... A, M. A. (2014). Single-dose monomeric HA subunit vaccine generates full protection from influenza challenge. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *10*(3), 586–595. <http://doi.org/10.4161/hv.27567>
- Mallajosyula, V. V. A., Citron, M., Ferrara, F., Lu, X., Callahan, C., Heidecker, G. J., ... Varadarajan, R. (2014). Influenza hemagglutinin stem-fragment immunogen elicits broadly neutralizing antibodies and confers heterologous protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(25), E2514–E2523. <http://doi.org/10.1073/pnas.1402766111>
- Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., & Bachmann, M. F. (2008). Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European Journal of Immunology*, *38*(5), 1404–1413. <http://doi.org/10.1002/eji.200737984>
- Manoutcharian, K., Alicia, D.-O., Gevorkian, G., Fragoso, G., Acero, G., González, E., ... Sciotto, E. (2004).

- Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 99(1-2), 11–24.
<http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2003.12.009>
- Mao, H. (2004). A self-cleavable sortase fusion for one-step purification of free recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 37(1), 253–263. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2004.06.013>
- Marconi, G., Albertini, E., Barone, P., De Marchis, F., Lico, C., Marusic, C., ... Porceddu, A. (2006). In planta production of two peptides of the Classical Swine Fever Virus (CSFV) E2 glycoprotein fused to the coat protein of potato virus X. *BMC Biotechnology*, 6, 29. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-6-29>
- Marraffini, L. A., DeDent, A. C., & Schneewind, O. (2006). Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 192–221. <http://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.192-221.2006>
- Marusic, C., Rizza, P., Lattanzi, L., Mancini, C., Spada, M., Belardelli, F., ... Capone, I. (2001). Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 75(18), 8434–8439.
- Mathieu, C., Rioux, G., Dumas, M.-C. C., & Leclerc, D. (2013). Induction of innate immunity in lungs with virus-like nanoparticles leads to protection against influenza and *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(7), 839–848. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2013.02.009>
- Matsumoto, T., Sawamoto, S., Sakamoto, T., Tanaka, T., Fukuda, H., & Kondo, A. (2011). Site-specific tetrameric streptavidin-protein conjugation using sortase A. *Journal of Biotechnology*, 152(1-2), 37–42. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.008>
- Maupetit, J., & Derreumaux, P. (2010). A fast method for large-scale De Novo peptide and miniprotein structure prediction. <http://doi.org/10.1002/jcc.21365>
- Maupetit, J., Derreumaux, P., & Tuffery, P. (2009). PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction. <http://doi.org/10.1093/nar/gkp323>
- Maurer, P., & Bachmann, M. F. (2007). Vaccination against nicotine: an emerging therapy for tobacco dependence. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(11), 1775–1783. <http://doi.org/10.1517/13543784.16.11.1775>
- Mihailova, M., Boos, M., Petrovskis, I., Ose, V., Skrastina, D., Fiedler, M., ... Viazov, S. (2006). Recombinant virus-like particles as a carrier of B- and T-cell epitopes of hepatitis C virus (HCV). *Vaccine*, 24(20), 4369–4377. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.02.051>
- Milich, D. R., Hughes, J., Jones, J., Sällberg, M., & Phillips, T. R. (2001). Conversion of poorly immunogenic malaria repeat sequences into a highly immunogenic vaccine candidate. *Vaccine*, 20(5-6), 771–788.
- Modelska, a, Dietzschold, B., Sleysh, N., Fu, Z. F., Steplewski, K., Hooper, D. C., ... Yusibov, V. (1998). Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2481–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2481>
- Morales, J., Martínez, J. J. J., Manoutcharian, K., Hernández, M., Fleury, A., Gevorkian, G., ... Sciotto, E. (2008). Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine*, 26(23), 2899–2905. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.042>
- Fernández-Fernández, M. R., Martínez-Torrecedrada, J. L., Casal, J. I., & García, J. A. (1998). Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FEBS Letters*, 427(2), 229–235. [http://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00429-3](http://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00429-3)
- Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., ... Katinger, H. (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 67(11), 6642–6647.
- Naskalska, A., Szolajska, E., Andreev, I., Podsiadla, M., & Chroboczek, J. (2013). Towards a novel influenza vaccine: engineering of hemagglutinin on a platform of adenovirus dodecahedron. *BMC Biotechnology*, 13, 50. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-13-50>
- Naskalska, A., Szolajska, E., Chaperot, L., Angel, J., Plumas, J., & Chroboczek, J. (2009). Influenza recombinant vaccine: matrix protein M1 on the platform of the adenovirus dodecahedron. *Vaccine*,

- 27(52), 7385–7393. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.021>
- Neiryneck, S., Deroo, T., Saelens, X., Vanlandschoot, P., Jou, W. M., & Fiers, W. (1999). A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nature Medicine*, 5(10), 1157–1163. <http://doi.org/10.1038/13484>
- Nelson, J. D., Brunel, F. M., Jensen, R., Crooks, E. T., Cardoso, R. M., Wang, M., ... Zwick, M. B. (2007). An affinity-enhanced neutralizing antibody against the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 recognizes an epitope between those of 2F5 and 4E10. *Journal of Virology*, 81(8), 4033–4043. <http://doi.org/10.1128/JVI.02588-06>
- Niikura, M., Takamura, S., Kim, G., Kawai, S., Saijo, M., Morikawa, S., ... Yasutomi, Y. (2002). Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology*, 293(2), 273–280. <http://doi.org/10.1006/viro.2001.1240>
- Noad, R., & Roy, P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology*, 11(9), 438–444. [http://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00208-7](http://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00208-7)
- Nuzzaci, M., Piazzolla, G., Vitti, A., Lapelosa, M., Tortorella, C., Stella, I., ... Piazzolla, P. (2007). Cucumber mosaic virus as a presentation system for a double hepatitis C virus-derived epitope. *Archives of Virology*, 152(5), 915–928. <http://doi.org/10.1007/s00705-006-0916-7>
- Palmer, K. E., Benko, A., Doucette, S. A., Cameron, T. I., Foster, T., Hanley, K. M., ... Christensen, N. D. (2006). Protection of rabbits against cutaneous papillomavirus infection using recombinant tobacco mosaic virus containing L2 capsid epitopes. *Vaccine*, 24(26), 5516–5525. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.04.058>
- Parthasarathy, R., Subramanian, S., & Boder, E. T. (2007). Sortase A as a novel molecular “stapler” for sequence-specific protein conjugation. *Bioconjugate Chemistry*, 18(2), 469–476. <http://doi.org/10.1021/bc060339w>
- Pastori, C., Tudor, D., Diomede, L., Drillet, A. S., Jegerlehner, A., Rohn, T. A., ... Lopalco, L. (2012). Virus like particle based strategy to elicit HIV-protective antibodies to the alpha-helic regions of gp41. *Virology*, 431(1-2), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2012.05.005>
- Peabody, D. S., Brett, M.-W., Medford, A., Jordan, S. K., do Carmo Caldeira, J., & Chackerian, B. (2008). Immunogenic display of diverse peptides on virus-like particles of RNA phage MS2. *Journal of Molecular Biology*, 380(1), 252–263. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.049>
- Peacey, M., Wilson, S., Baird, M. A., & Ward, V. K. (2007). Versatile RHDV virus-like particles: incorporation of antigens by genetic modification and chemical conjugation. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(5), 968–977. <http://doi.org/10.1002/bit.21518>
- Piazzolla, G., Nuzzaci, M., Tortorella, C., Panella, E., Natilla, A., Boscia, D., ... Antonaci, S. (2005). Immunogenic properties of a chimeric plant virus expressing a hepatitis C virus (HCV)-derived epitope: new prospects for an HCV vaccine. *Journal of Clinical Immunology*, 25(2), 142–152. <http://doi.org/10.1007/s10875-005-2820-4>
- Plummer, E. M., & Manchester, M. (2011). Viral nanoparticles and virus-like particles: Platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3(2), 174–196. <http://doi.org/10.1002/wnan.119>
- Pokorski, J. K., & Steinmetz, N. F. (2011). The art of engineering viral nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 8(1), 29–43. <http://doi.org/10.1021/mp100225y>
- Popp, M. W., Antos, J. M., & Ploegh, H. L. (2009). Site-specific protein labeling via sortase-mediated transpeptidation. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, Chapter 15, Unit 15.3. <http://doi.org/10.1002/0471140864.ps1503s56>
- Pouyanfard, S., Bamdad, T., Hashemi, H., Bandehpour, M., & Kazemi, B. (2012). Induction of protective anti-CTL epitope responses against HER-2-positive breast cancer based on multivalent T7 phage nanoparticles. *Plos One*, 7(11), e49539. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0049539>
- Prasuhn, D. E., Yeh, R. M., Obenaus, A., Manchester, M., & Finn, M. G. (2007). Viral MRI contrast agents: coordination of Gd by native virions and attachment of Gd complexes by azide-alkyne cycloaddition. *Chem. Commun. (Camb.)*, (12), 1269–1271. <http://doi.org/10.1039/b615084e>
- Pritz, S., Wolf, Y., Kraetke, O., Klose, J., Bienert, M., & Beyermann, M. (2007). Synthesis of Biologically Active

- Peptide Nucleic Acid–Peptide Conjugates by Sortase-Mediated Ligation. *The Journal of Organic Chemistry*, 72(10), 39093912. <http://doi.org/10.1021/jo0623311>
- Proft, T. (2010). Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilisation. *Biotechnology Letters*, 32(1), 1–10. <http://doi.org/10.1007/s10529-009-0116-0>
- R^ohn, T. A., Jennings, G. T., Hernandez, M., Grest, P., Beck, M., Zou, Y., ... Bachmann, M. F. (2006). Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *European Journal of Immunology*, 36(11), 2857–2867. <http://doi.org/10.1002/eji.200636658>
- Raezadeh-Sarmazdeh, M., Parthasarathy, R., & Boder, E. T. (2015). Site-specific immobilization of protein layers on gold surfaces via orthogonal sortases. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 457–463. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.02.044>
- Ravin, N. V., Blokhina, E. A., Kuprianov, V. V., Stepanova, L. A., Shaldjan, A. A., Kovaleva, A. A., ... Skryabin, K. G. (2015). Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant loop region of hepatitis B core antigen: Insertion of multiple copies of M2e increases immunogenicity and protective effici. *Vaccine*, 33(29), 3392–3397. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.066>
- Rennermalm, A., Li, Y. H., Bohaufs, L., Jarstrand, C., Brauner, A., Brennan, F. R., & Flock, J. I. (2001). Antibodies against a truncated *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein protect against dissemination of infection in the rat. *Vaccine*, 19(25-26), 3376–3383.
- Rioux, G., Babin, C., Majeau, N., & Leclerc, D. (2012). Engineering of papaya mosaic virus (papmv) nanoparticles through fusion of the ha11 peptide to several putative surface-exposed sites. *PLoS ONE*, 7(2), 5–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0031925>
- Rioux, G., Majeau, N., & Leclerc, D. (2012). Mapping the surface-exposed regions of papaya mosaic virus nanoparticles. *FEBS Journal*, 279(11), 2004–2011. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08583.x>
- Ritzefeld, M. (2014). Sortagging: a robust and efficient chemoenzymatic ligation strategy. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 20(28), 8516–8529. <http://doi.org/10.1002/chem.201402072>
- Rodriguez-Limas, W. A., Sekar, K., & Tyo, K. E. (2013). Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6), 1089–1093. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.008>
- Roldão, A., Mellado, M. C. M., Castilho, L. R., Carrondo, M. J. T., & Alves, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 9(10), 1149–1176. <http://doi.org/10.1586/erv.10.115>
- Rubino, L., Stradis, D. A., Russo, M., & Martelli, G. P. (2011). Generation of virus-like particles in plants expressing the capsid protein of Cymbidium ringspot virus. <http://doi.org/10.2307/41999056>
- Sachse, C., Chen, J. Z., Coureux, P.-D. D., Stroupe, M. E., Fändrich, M., & Grigorieff, N. (2007). High-resolution electron microscopy of helical specimens: a fresh look at tobacco mosaic virus. *J. Mol. Biol.*, 371(3), 812–835. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.088>
- Sadeyen, J.-R. R., Tourne, S., Shkreli, M., Sizaret, P.-Y. Y., & Coursaget, P. (2003). Insertion of a foreign sequence on capsid surface loops of human papillomavirus type 16 virus-like particles reduces their capacity to induce neutralizing antibodies and delineates a conformational neutralizing epitope. *Virology*, 309(1), 32–40. [http://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00134-4](http://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00134-4)
- Saini, M., & Vрати, S. (2003). A Japanese encephalitis virus peptide present on Johnson grass mosaic virus-like particles induces virus-neutralizing antibodies and protects mice against lethal <http://doi.org/10.1128/JVI.77.6.3487-3494.2003>
- Samantaray, S., Marathe, U., Dasgupta, S., Nandicoori, V. K., & Roy, R. P. (2008). Peptide-sugar ligation catalyzed by transpeptidase sortase: a facile approach to neoglycoconjugate synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 130(7), 2132–2133. <http://doi.org/10.1021/ja077358g>
- Sánchez, F., Sáez, M., Lunello, P., & Ponz, F. (2013). Plant viral elongated nanoparticles modified for log-increases of foreign peptide immunogenicity and specific antibody detection. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 409–415. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.09.002>
- Schoonen, L., Pille, J., Borrmann, A., Nolte, R. J., & van Hest, J. C. (2015). Sortase A-Mediated N-Terminal Modification of Cowpea Chlorotic Mottle Virus for Highly Efficient Cargo Loading. *Bioconjugate Chemistry*, 26(12), 2429–2434. <http://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00485>


- Shen, Y., Maupetit, J., & Derreumaux, P. (2014). Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction. <http://doi.org/10.1021/ct500592m>
- Sijbrandij, T., Cukkemane, N., Nazmi, K., Veerman, E. C., & Bikker, F. J. (2013). Sortase A as a tool to functionalize surfaces. *Bioconjugate Chemistry*, 24(5), 828–831. <http://doi.org/10.1021/bc4000146>
- Sit, T. L., Abouhaidar, M. G., & Holy, S. (1989). Nucleotide sequence of papaya mosaic virus RNA. *The Journal of General Virology*, 70 (Pt 9)(1989), 2325–2331. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-70-9-2325>
- Smith, M. L., Lindbo, J. A., Dillard-Telm, S., Brosio, P. M., Lasnik, A. B., McCormick, A. A., ... Palmer, K. E. (2006). Modified Tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications. *Virology*, 348(2), 475–488. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2005.12.039>
- Sonderegger, I., R"ohn, T. A., Kurrer, M. O., Iezzi, G., Zou, Y., Kastelein, R. A., ... Kopf, M. (2006). Neutralization of IL-17 by active vaccination inhibits IL-23-dependent autoimmune myocarditis. *European Journal of Immunology*, 36(11), 2849–2856. <http://doi.org/10.1002/eji.200636484>
- Spirig, T., Weiner, E. M., & Clubb, R. T. (2011). Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 82(5), 1044–1059. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07887.x>
- Spohn, G., Keller, I., Beck, M., Grest, P., Jennings, G. T., & Bachmann, M. F. (2008). Active immunization with IL-1 displayed on virus-like particles protects from autoimmune arthritis. *European Journal of Immunology*, 38(3), 877–887. <http://doi.org/10.1002/eji.200737989>
- Staczek, J., Bendahmane, M., Gilleland, L. B., Beachy, R. N., & Gilleland, H. E. (2000). Immunization with a chimeric tobacco mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* provides protection against challenge with *P. aeruginosa*. *Vaccine*, 18(21), 2266–2274.
- Stahl, S. J., & Murray, K. (1989). Immunogenicity of peptide fusions to hepatitis B virus core antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(16), 6283–6287.
- Steinhagen, M., Zunker, K., Nordsieck, K., & Beck-Sickinger, A. G. (2013). Large scale modification of biomolecules using immobilized sortase A from *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(12). <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.039>
- Steinmetz, N. F. (2010). Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(5), 634–641. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2010.04.005>
- Steinmetz, N. F., & Evans, D. J. (2007). Utilisation of plant viruses in bionanotechnology. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 5(18), 2891–2902. <http://doi.org/10.1039/B708175H>
- Steinmetz, N. F., Hong, V., Spoerke, E. D., Lu, P., Breitenkamp, K., Finn, M. G., & Manchester, M. (2009). Buckyballs meet viral nanoparticles: candidates for biomedicine. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(47), 17093–17095. <http://doi.org/10.1021/ja902293w>
- Stephanopoulos, N., & Francis, M. B. (2011). Choosing an effective protein bioconjugation strategy. *Nature Chemical Biology*, 7(12), 876–884. <http://doi.org/10.1038/nchembio.720>
- Stiegler, G., Kunert, R., Purtscher, M., Wolbank, S., Voglauer, R., Steindl, F., & Katinger, H. (2001). A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *{AIDS} Research and Human Retroviruses*, 17(18), 1757–1765. <http://doi.org/10.1089/0889220152741450>
- Strable, E., Prasuhn, D. E., Udit, A. K., Brown, S., Link, A. J., Ngo, J. T., ... Finn, M. G. (2008). Unnatural amino acid incorporation into virus-like particles. *Bioconjug. Chem.*, 19(4), 866–875. <http://doi.org/10.1021/bc700390r>
- Street, M., Herd, K., Londono, P., Doan, T., Dougan, G., Kast, W. M., & Tindle, R. W. (1999). Differences in the effectiveness of delivery of B- and CTL-epitopes incorporated into the hepatitis B core antigen (HBcAg) c/e1-region. *Archives of Virology*, 144(7), 1323–1343.
- Strijbis, K., Spooner, E., & Ploegh, H. L. (2012). Protein ligation in living cells using sortase. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 13(6), 780–9. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01345.x>
- Sun, Q., Chen, Q., Blackstock, D., & Chen, W. (2015). Post-Translational Modification of Bionanoparticles as a Modular Platform for Biosensor Assembly. *ACS Nano*, 9(8), 8554–8561. <http://doi.org/10.1021/acs.nano.5b03688>
- Szurgot, I., Szolajska, E., Laurin, D., Lambrecht, B., Chaperot, L., Schoehn, G., & Chroboczek, J. (2013). Self-

- adjuvanting influenza candidate vaccine presenting epitopes for cell-mediated immunity on a proteinaceous multivalent nanoplatform. *Vaccine*, 31(40), 4338–4346. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.021>
- Tan, M., Huang, P., Xia, M., Fang, P.-A., Zhong, W., McNeal, M., ... Jiang, X. (2011). Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *Journal of Virology*, 85(2), 753–764. <http://doi.org/10.1128/JVI.01835-10>
- Tan, M., & Jiang, X. (2014). Subviral particle as vaccine and vaccine platform. *Current Opinion in Virology*, 6(1), 24–33. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.02.009>
- Tanaka, T., Yamamoto, T., Tsukiji, S., & Nagamune, T. (2008). Site-Specific Protein Modification on Living Cells Catalyzed by Sortase. *ChemBioChem*, 9(5), 802–807. <http://doi.org/10.1002/cbic.200700614>
- Tarar, M. R., Emery, V. C., & Harrison, T. J. (1996). Expression of a human cytomegalovirus gp58 antigenic domain fused to the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 16(3-4), 183–192.
- Taylor, K. M., Lin, T., Porta, C., Mosser, A. G., Giesing, H. A., Lomonosoff, G. P., & Johnson, J. E. (2000). Influence of three-dimensional structure on the immunogenicity of a peptide expressed on the surface of a plant virus. *Journal of Molecular Recognition : JMR*, 13(2), 71–82. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(200003/04\)13:2<71::AID-JMR489>3.0.CO;2-V](http://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(200003/04)13:2<71::AID-JMR489>3.0.CO;2-V)
- Thévenet, P., Shen, Y., Maupetit, J., & Guyon, F. (2012). PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides.
- Tindle, R. W., Herd, K., Londoño, P., Fernando, G. J., Chatfield, S. N., Malcolm, K., & Dougan, G. (1994). Chimeric hepatitis B core antigen particles containing B- and Th-epitopes of human papillomavirus type 16 E7 protein induce specific antibody and T-helper responses in immunised mice. *Virology*, 200(2), 547–557. <http://doi.org/10.1006/viro.1994.1217>
- Tissot, A. C., Maurer, P., Nussberger, J., Sabat, R., Pfister, T., Ignatenko, S., ... Bachmann, M. F. (2008). Effect of immunisation against angiotensin II with CYT006-AngQb on ambulatory blood pressure: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase IIa study. *Lancet (London, England)*, 371(9615), 821–827. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60381-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60381-5)
- Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., & Ballaun, C. (1996). Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1.
- Tsukiji, S., & Nagamune, T. (2009). Sortase-mediated ligation: a gift from Gram-positive bacteria to protein engineering. *ChemBiochem : A European Journal of Chemical Biology*, 10(5), 787–98. <http://doi.org/10.1002/cbic.200800724>
- Tsybalova, L. M., Stepanova, L. A., Kuprianov, V. V., Blokhina, E. A., Potapchuk, M. V., Korotkov, A. V., ... Kiselev, O. I. (2015). Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant region of hepatitis B core antigen: Broad protective efficacy of particles carrying four copies of M2e. *Vaccine*, 33(29), 3398–3406. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.073>
- Uhde-Holzem, K., Schlösser, V., Viazov, S., Fischer, R., & Commandeur, U. (2010). Immunogenic properties of chimeric potato virus X particles displaying the hepatitis C virus hypervariable region I peptide R9. *Journal of Virological Methods*, 166(1-2), 12–20. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.01.017>
- Wiessner, C., Wiederhold, K.-H. H., Tissot, A. C., Frey, P., Danner, S., Jacobson, L. H., ... Staufenbiel, M. (2011). The second-generation active Aβ immunotherapy CAD106 reduces amyloid accumulation in APP transgenic mice while minimizing potential side effects. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(25), 9323–9331. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0293-11.2011>
- Wu, H.-W. W., Hu, X.-M. M., Wang, Y., Kurtis, J. D., Zeng, F.-J. J., ST, M., ... Hua, Z.-C. C. (2006). Protective immunity induced by phage displayed mitochondrial related peptides of *Schistosoma japonicum*. *Acta Tropica*, 99(2-3), 200–207. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.08.006>
- Wu, L., Jiang, L., Zhou, Z., Fan, J., Zhang, Q., Zhu, H., ... Xu, Z. (2003). Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector. *Vaccine*, 21(27-30), 4390–4398.

- Wu, Z., & Guo, Z. (2012). Sortase-Mediated Transpeptidation for Site-Specific Modification of Peptides, Glycopeptides, and Proteins. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 31(1), 48–66. <http://doi.org/10.1080/07328303.2011.635251>
- Yamamoto, T., & Nagamune, T. (2009). Expansion of the sortase-mediated labeling method for site-specific N-terminal labeling of cell surface proteins on living cells. <http://doi.org/10.1039/b818792d>
- Yamamura, Y., Hirakawa, H., Yamaguchi, S., & Nagamune, T. (2011). Enhancement of sortase A-mediated protein ligation by inducing a β -hairpin structure around the ligation site. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 47(16), 4742–4. <http://doi.org/10.1039/c0cc05334a>
- Yang, S., Wang, T., Bohon, J., Gagné, M.-É. L. É., Bolduc, M., Leclerc, D., & Li, H. (2012). Crystal structure of the coat protein of the flexible filamentous papaya mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*, 422(2), 263–273. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.05.032>
- Yi, G., Tu, X., Bharaj, P., Guo, H., Zhang, J., Shankar, P., & Manjunath, N. (2015). Human Rhinovirus Presenting 4E10 Epitope of HIV-1 MPER Elicits Neutralizing Antibodies in Human ICAM-1 Transgenic Mice. *Molecular Therapy*, 23(10), 1663–1670. <http://doi.org/10.1038/mt.2015.107>
- Yi, G., Tu, X., Bharaj, P., Guo, H., Zhang, J., Shankar, P., & Manjunath, N. (2015). Human Rhinovirus Presenting 4E10 Epitope of HIV-1 MPER Elicits Neutralizing Antibodies in Human ICAM-1 Transgenic Mice. *Mol Ther*, 23(10), 1663–1670. <http://doi.org/10.1038/mt.2015.107>
- Yin, Y., Li, H., Wu, S., Dong, D., Zhang, J., Fu, L., ... Chen, W. (2011). Hepatitis B virus core particles displaying Mycobacterium tuberculosis antigen ESAT-6 enhance ESAT-6-specific immune responses. *Vaccine*, 29(34), 5645–5651. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.012>
- Yin, Y., Zhang, J., Dong, D., Liu, S., Guo, Q., Song, X., ... Chen, W. (2008). Chimeric hepatitis B virus core particles carrying an epitope of anthrax protective antigen induce protective immunity against Bacillus anthracis. *Vaccine*, 26(46), 5814–5821. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.08.031>
- Yin, Z., Marta, C.-A., Chowdhury, S., Bentley, P., Kaczanowska, K., Benmohamed, L., ... Huang, X. (2013). Boosting immunity to small tumor-associated carbohydrates with bacteriophage $q\beta$ capsids. *{ACS} Chemical Biology*, 8(6), 1253–1262. <http://doi.org/10.1021/cb400060x>
- Yin, Z., Nguyen, H. G., Chowdhury, S., & Bentley, P. (2012). Tobacco mosaic virus as a new carrier for tumor associated carbohydrate antigens. <http://doi.org/10.1021/bc300244a>
- Yusibov, V., Mett, V., Mett, V., Davidson, C., Musiychuk, K., Gilliam, S., ... Mann, D. (2005). Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus. *Vaccine*, 23(17-18), 2261–2265. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.039>
- Yusibov, V., Modelska, a, Steplewski, K., Agadjanyan, M., Weiner, D., Hooper, D. C., & Koprowski, H. (1997). Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(11), 5784–5788. <http://doi.org/10.1073/pnas.94.11.5784>
- Zeltins, A. (2013). Construction and characterization of virus-like particles: A review. *Molecular Biotechnology*, 53(1), 92–107. <http://doi.org/10.1007/s12033-012-9598-4>
- Zhang, H., Todderud, E., & Stubbs, G. (1993). Crystallization and preliminary X-ray analysis of papaya mosaic virus coat protein. *Journal of Molecular Biology*, 234(3), 885–7. <http://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1634>
- Zhang, H., Wang, L., Compans, R. W., & Wang, B. Z. (2014). Universal influenza vaccines, a dream to be realized soon. *Viruses*, 6(5), 1974–1991. <http://doi.org/10.3390/v6051974>
- Zhang, W., Wang, L., Liu, Y., Chen, X., Liu, Q., Jia, J., ... Ma, G. (2014). Immune responses to vaccines involving a combined antigen-nanoparticle mixture and nanoparticle-encapsulated antigen formulation. *Biomaterials*, 35(23), 6086–6097. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.022>
- Zhang, Y., Song, S., Liu, C., Wang, Y., Xian, X., He, Y., ... Sun, S. (2007). Generation of chimeric {Hbc} proteins with epitopes in E.coli: formation of virus-like particles and a potent inducer of antigen-specific cytotoxic immune response and anti-tumor effect in vivo. *Cellular Immunology*, 247(1), 18–27. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.07.003>
- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C. X., Mitter, N., Yu, C., & Middelberg, A. P. J. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32(3), 327–337. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>
- Zwick, M. B., Labrijn, A. F., Wang, M., Spennlehauser, C., Saphire, E. O., Binley, J. M., ... Parren, P. W. (2001).

Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *Journal of Virology*, 75(22), 10892–10905. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10892-10905.2001>

Annexe I- Propriétés chimiques du peptide GGG-M2e


PepCalc.com - Peptide property calculator

N-terminus Sequence C-terminus AA code used
 ↓ GGGSLLEVEVETPIRNEWGCRNDSSD ↓ single-le ↓ **Calculate!**
 Disulphide connectivity

Show abbreviations 20 standard amino acids modified amino acids unusual amino acids

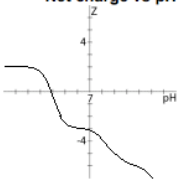
Sequence submission
 Single letter code: GGGSLLEVEVETPIRNEWGCRNDSSD **Get a quotation**

Sequence interpretation
 Single letter code: NH2- GGGSLLEVEVETPIRNEWGCRNDSSD -COOH
 Triple letter code: NH2- Gly - Gly - Gly - Ser - Leu - Leu - Thr - Glu - Val - Glu - Thr - Pro - Ile - Arg - Asn - Glu - Trp - Gly - Cys - Arg - Cys - Asn - Asp - Ser - Ser - Asp -COOH

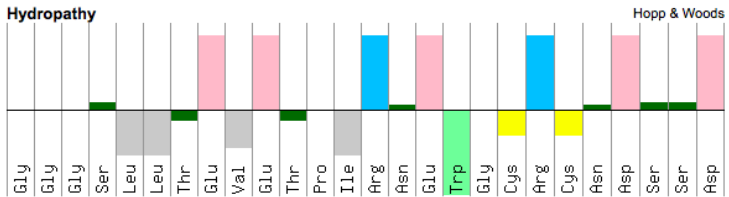
Physicochemical properties
 Number of residues: 26 *notes on MW*
 Molecular weight: 2795.97 g/mol *notes on Ext. Coefficient*
 Extinction coefficient: 5690 M⁻¹cm⁻¹ *notes on pI*
 Iso-electric point: pH 3.79 *notes on net charge*
 Net charge at pH 7: -3.1

Estimated solubility: Good water solubility. *notes on solubility*

Net charge vs pH



Hydropathy Hopp & Woods



Top is hydrophilic
 Bottom is hydrophobic
 Color codes: Acidic Aromatic Basic Aliphatic Polar Cysteine

Peptide Sequence:
GGGSLLEVEVETPIRNEWGCRNDSSD

Modifications:
No modifications.

Chemical Formula:
C₁₁₃H₁₇₉N₃₅O₄₄S₂

Molecular Weight:
2795.98

Isoelectric Point:
3.95


Hydrophilicity Analysis:

Peptide	Charge	Attribute
GGGSLLEVEVETPIRNEWGCRNDSSD	-3	acidic

Note:

- Red: acidic residues, like D E and C-terminal -COOH
- Blue: basic residues, like R K H and N-terminal -NH₂
- Green: hydrophobic uncharged residues, like F I L M V W A and P
- Black: other residues, like G S T C N Q and P
- Z: Unrecognized codes are replaced of 'Z'.

Annexe II- Propriétés chimiques du peptide GGG-T20


PepCalc.com - Peptide property calculator

N-terminus Sequence C-terminus AA code used
 ↓ GGGYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF ↓ single-le ↓ **Calculate!**
 Disulphide connectivity

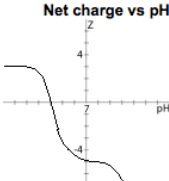
Show abbreviations 20 standard amino acids modified amino acids unusual amino acids

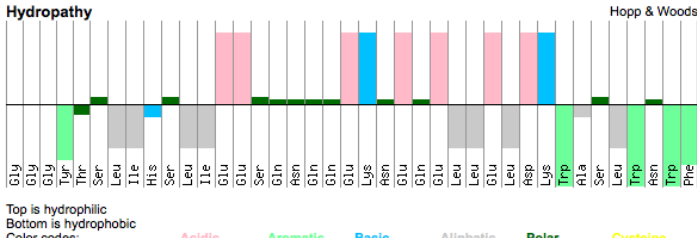
Sequence submission
 Single letter code: GGGYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF **Get a quotation**

Sequence interpretation
 Single letter code: NH2- GGGYTSLIHS LIEESQNQQE KNEQELLELD KWASLWNWF -COOH
 Triple letter code: NH2- Gly - Gly - Gly - Tyr - Thr - Ser - Leu - Ile - His - Ser - Leu - Ile - Glu - Glu - Ser - Gln - Asn - Gln - Gln - Glu - Lys - Asn - Glu - Gln - Glu - Leu - Leu - Glu - Leu - Asp - Lys - Trp - Ala - Ser - Leu - Trp - Asn - Trp - Phe -COOH

Physicochemical properties
 Number of residues: 39
 Molecular weight: 4621.98 g/mol *notes on MW*
 Extinction coefficient: 18350 M⁻¹cm⁻¹ *notes on Ext. Coefficient*
 Iso-electric point: pH 3.96 *notes on pI*
 Net charge at pH 7: -4.9 *notes on net charge*

Estimated solubility: Good water solubility. *notes on solubility*

Net charge vs pH


Hydropathy


Top is hydrophilic
 Bottom is hydrophobic
 Color codes: Acidic Aromatic Basic Aliphatic Polar Cysteine

Peptide Sequence:

GGGYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF

Modifications:

No modifications.

Chemical Formula:

C₂₀₈H₃₀₇N₅₃O₆₇

Molecular Weight:

4622.00

Isoelectric Point:

4.01

Hydrophilicity Analysis:

Peptide	Charge	Attribute
GGGYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	-4	acidic

Note:

Red: acidic residues, like D E and C-terminal -COOH


Blue: basic residues, like R K H and N-terminal -NH₂

Green: hydrophobic uncharged residues, like F I L M V W A and P

Black: other residues, like G S T C N Q and P

Z: Unrecognized codes are replaced of 'Z'.

Annexe III- Propriétés chimiques du peptide GGG-AH1



PepCalc.com - Peptide property calculator

N-terminus Sequence C-terminus AA code used

Disulphide connectivity

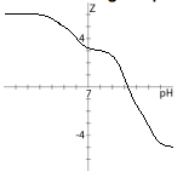
Show abbreviations 20 standard amino acids modified amino acids unusual amino acids

Sequence submission
 Single letter code: GGGRVTYHSPSYVYHQFERRAK

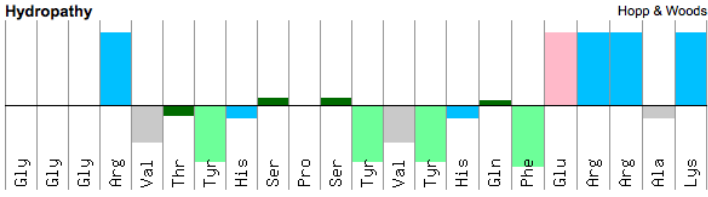
Sequence interpretation
 Single letter code: NH2- GGGRVTYHSP SYVYHQFERR AK -COOH
 Triple letter code: NH2- Gly - Gly - Gly - Arg - Val - Thr - Tyr - His - Ser - Pro - Ser - Tyr - Val - Tyr - His - Gln - Phe - Glu - Arg - Arg - Ala - Lys -COOH

Physicochemical properties
 Number of residues: 22
 Molecular weight: 2595.83 g/mol *notes on MW*
 Extinction coefficient: 3840 M⁻¹cm⁻¹ *notes on Ext. Coefficient*
 Iso-electric point: pH 10.29 *notes on pI*
 Net charge at pH 7: 3.2 *notes on net charge*

Estimated solubility: Good water solubility. *notes on solubility*



Hydropathy Hopp & Woods



Top is hydrophilic
 Bottom is hydrophobic
 Color codes: Acidic Aromatic Basic Aliphatic Polar Cysteine

Peptide Sequence:
GGGRVTYHSPSYVYHQFERRAK

Modifications:
No modifications.

Chemical Formula:
C₁₁₆H₁₇₁N₃₇O₃₂

Molecular Weight:
2595.84

Isoelectric Point:
10.26

Hydrophilicity Analysis:

Peptide	Charge	Attribute
GGGRVTYHSPSYVYHQFERRAK	5	basic

Note:

Red: acidic residues, like D E and C-terminal -COOH


Blue: basic residues, like R K H and N-terminal -NH₂

Green: hydrophobic uncharged residues, like F I L M V W A and P

Black: other residues, like G S T C N Q and P

Z: Unrecognized codes are replaced of 'Z'.

Annexe IV- Propriétés chimiques du peptide GG-Trp2_178-203


PepCalc.com - Peptide property calculator

N-terminus C-terminus

Disulphide connectivity

Show abbreviations 20 standard amino acids modified amino acids unusual amino acids

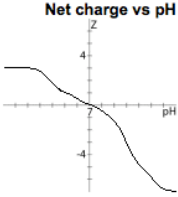
Sequence submission
Single letter code: GGNCSVYDFFVWLHYYSVRDILLGPGR

Sequence interpretation
Single letter code: NH2- GGNCSVYDFF VWLHYYSVRD ILLGPGR -COOH
Triple letter code: NH2- Gly - Gly - Asn - Cys - Ser - Val - Tyr - Asp - Phe - Phe - Val - Trp - Leu - His - Tyr - Tyr - Ser - Val - Arg - Asp - Thr - Leu - Leu - Gly - Pro - Gly - Arg -COOH

Physicochemical properties

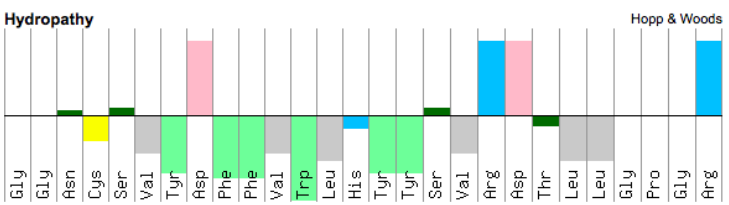
Number of residues:	27	
Molecular weight:	3122.47 g/mol	<i>notes on MW</i>
Extinction coefficient:	9530 M ⁻¹ cm ⁻¹	<i>notes on Ext. Coefficient</i>
Iso-electric point:	pH 7.08	<i>notes on pI</i>
Net charge at pH 7:	0	<i>notes on net charge</i>

Net charge vs pH



Estimated solubility: Poor water solubility. *notes on solubility*

Hydropathy Hopp & Woods



Top is hydrophilic
Bottom is hydrophobic
Color codes: Acidic Aromatic Basic Aliphatic Polar Cysteine

Peptide Sequence:
GGNCSVYDFFVWLHYYSVRDILLGPGR

Modifications:
No modifications.

Chemical Formula:
C₁₄₅H₂₀₅N₃₇O₃₉S₁

Molecular Weight:
3122.48

Isoelectric Point:
7.34

Hydrophilicity Analysis:

Peptide	Charge	Attribute
GGNCSVYDFFVWLHYYSVRDILLGPGR	1	basic

Note:

- Red: acidic residues, like D E and C-terminal -COOH
- Blue: basic residues, like R K H and N-terminal -NH₂
- Green: hydrophobic uncharged residues, like F I L M V W A and P
- Black: other residues, like G S T C N Q and P
- Z**: Unrecognized codes are replaced of 'Z'.