

Université du Québec
INRS – Institut Armand-Frappier

**Évaluation du potentiel vaccinal de pseudoparticules du virus
de la mosaïque du papayer exprimant un épitope T cytotoxique
immunodominant du virus de la chorioméningite lymphocytaire**

Par
Patrick Lacasse

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc) en immunologie et virologie

Jury d'évaluation

Président du jury : Dr Jean-François Laliberté
Examineur externe : Dr Claude Perreault
Directeur de recherche : Dr Alain Lamarre

REMERCIEMENTS

Tout au long de mon aventure en tant qu'étudiant à l'Institut Armand-Frappier, j'ai eu la chance de rencontrer et de côtoyer plusieurs personnes qui ont joué un rôle important dans l'accomplissement de mes études de maîtrise en immunologie et virologie. Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche Alain Lamarre pour m'avoir donné la chance de faire partie d'une équipe exceptionnelle et pour m'avoir confié un projet de recherche qui a grandement suscité mon intérêt et ma curiosité. En plus de m'avoir appuyé tout au long de mes études, Alain m'a fourni de précieux conseils qui m'aideront tout au long de ma carrière. D'autre part, j'aimerais souligner ma grande reconnaissance pour le travail effectué par l'équipe du Dr Denis Leclerc du CHUL de Québec. Sans les efforts acharnés des membres de cette équipe pour la production et la caractérisation des protéines vaccinales utilisées dans le cadre de ce projet, cette étude n'aurait jamais pu être menée à terme. J'aimerais également remercier Esther Tarrab qui, en plus d'avoir été une collègue de travail douée et extrêmement serviable, elle a toujours été disponible pour m'écouter et m'appuyer lors des moments plus difficiles de ma vie académique et personnelle. Un gros merci à tous les étudiants lamariens avec qui j'ai eu la chance de travailler au cours de ma maîtrise (Marie-Hélène, Emmanuel, Maude, Isabelle, Véronique, Marie-Ève, Tanya, Bélinda et Julie). En plus du support technique et des nombreux conseils que vous m'avez apportés, votre gentillesse et votre grand sens de l'humour m'auront fait sourire pendant ces trois années et auront grandement contribué à instaurer un climat de travail extraordinaire dans le laboratoire. Merci également à Francine Lambert pour sa générosité, son grand sens de l'humour et son aide précieuse ainsi que Marcel Desrosiers pour ses nombreux conseils en cytométrie de flux et en microscopie confocale. Finalement, sans le soutien moral et financier de mes parents et de mon amoureuse, je n'aurais jamais pu mener à terme mes études de maîtrise. Je vous adore énormément Papa, Maman et Kristina.

RÉSUMÉ

La plupart des vaccins utilisés de nos jours permettent le développement de réponses immunitaires protectrices contre certains pathogènes en induisant des anticorps (Ac) spécifiques et neutralisants chez les patients immunisés. Malgré l'efficacité indéniable de ces vaccins dans certains cas, ils sont souvent inefficaces dans la lutte contre les infections virales chroniques qui requièrent habituellement, pour être résorbées, le développement de réponses cellulaires spécifiques et la production de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL). Grâce aux récentes découvertes et avancées dans le domaine de la vaccinologie, de nouvelles stratégies vaccinales ont été mises de l'avant afin de remédier à ce problème. Plusieurs études ont démontré l'efficacité des pseudoparticules virales (PPV) dans l'induction de réponses immunitaires à médiation cellulaire. Cependant, la co-administration d'adjuvant est souvent nécessaire afin de permettre l'induction de réponses cytotoxiques protectrices et de longue durée. Récemment, nous avons démontré que la surexpression de la protéine de la capsid (CP) du virus de la mosaïque du papayer (PapMV) dans *Escherichia coli* (*E. coli*) mène à la production de PPV via l'auto-assemblage des protéines en des particules quasi identiques au virus sauvage. De plus, nous avons démontré la possibilité d'exposer des épitopes de virus murins ou humains à la surface de ces PPV sans nuire à leur capacité d'assemblage. Dans la présente étude, nous évaluons la capacité des PPV du PapMV exposant l'épitope T CD8⁺ immunodominant p33 (PPV du PapMV-p33) du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) à induire, chez la souris, une réponse cellulaire protectrice en absence d'adjuvant. Tout d'abord, nous démontrons, autant *in vitro* qu'*in vivo*, que les diverses PPV du PapMV sont efficacement captées par les cellules dendritiques (DC) de la rate des souris immunisées. De plus, notre étude met en évidence la capacité des diverses PPV du PapMV à entraîner la maturation des DC *in vivo*. D'autre part, des tests *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les PPV du PapMV-p33 sont efficacement apprêtées et présentées par les DC dans le contexte du complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), permettant ainsi d'exposer l'épitope viral étranger à des CTL p33-spécifiques et d'entraîner leur activation et leur prolifération. De plus, l'immunisation de souris C57BL/6 en absence d'adjuvant induit la production d'un grand nombre de CTL p33-spécifiques. D'ailleurs, l'infection subséquente des souris immunisées par le

LCMV induit l'expansion de la population de CTL p33-spécifiques et l'activation de leur fonctions effectrices, permettant ainsi de protéger les souris contre l'infection. Nous démontrons également que le niveau de protection induit par les PPV du PapMV-p33 est dépendant de la dose et de la fréquence d'administration. En conclusion, ces résultats mettent en évidence la grande efficacité des PPV du PapMV à cibler les DC. De plus, grâce à leur capacité à induire la maturation des DC, les PPV du PapMV présentent une activité intrinsèque d'adjuvant qui optimise probablement leur capacité à induire des réponses cellulaires efficaces. Ces résultats démontrent l'efficacité des PPV du PapMV à être utilisées comme plateforme vaccinale capable d'induire une réponse cellulaire spécifique contre un épitope étranger présenté à leur surface.

Patrick Lacasse

Alain Lamarre

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	II
RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES	V
Liste des figures	VII
Liste des abréviations	VIII
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1. L'essor de la vaccination.....	4
2. LES TYPES D'IMMUNISATION	7
2.1 IMMUNISATION PASSIVE.....	7
2.2 IMMUNISATION ACTIVE.....	8
3. LES PRINCIPAUX TYPES DE VACCINS	8
3.1 LES VACCINS À BASE DE MICROORGANISMES MORTS ET INACTIVÉS	8
3.2 LES VACCINS À BASE DE MICROORGANISMES VIVANTS ET ATTÉNUÉS	9
3.3 LES VACCINS À BASE DE TOXOÏDES	10
3.4 LES VACCINS À BASE DE POLYSACCHARIDES.....	11
3.5 LES VACCINS À BASE DE VECTEURS RECOMBINANTS.....	12
3.6 LES VACCINS À BASE D'ACIDES DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES.....	13
3.7 LES VACCINS À BASE D'ANTIGÈNES RECOMBINANTS.....	15
4. LES PSEUDOPARTICULES VIRALES.....	16
4.1 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DES PSEUDOPARTICULES VIRALES	16
4.2 STRUCTURE DES PSEUDOPARTICULES VIRALES	17
4.3 PRODUCTION DES PSEUDOPARTICULES VIRALES	18
4.4 UTILISATION DES PSEUDOPARTICULES VIRALES EN VACCINOLOGIE.....	19
4.4.1 UTILISATION DES PSEUDOPARTICULES VIRALES COMME IMMUNOGÈNE DIRECT	19
4.4.2 UTILISATION DES PSEUDOPARTICULES VIRALES COMME PLATEFORME VACCINALE	24
4.4.3 UTILISATION DES PSEUDOPARTICULES VIRALES POUR LA LIVRAISON DE MOLÉCULES	28
5. RÔLE DES CELLULES DENDRITIQUES AU NIVEAU DU SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	29
5.1 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DES CELLULES DENDRITIQUES	29
5.2 CLASSIFICATION DES CELLULES DENDRITIQUES	31
5.3 MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES	33
5.3.1 CARACTÉRISTIQUES DES CELLULES DENDRITIQUES IMMATURES	33
5.3.2 CARACTÉRISTIQUES DES CELLULES DENDRITIQUES MATURES.....	35
5.3.3 ÉTAPES DU PROCESSUS DE MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES	36
5.3.4 DÉTECTION DE SIGNAUX DE DANGER PAR LES CELLULES DENDRITIQUES	37
5.3.4.1 LES PSEUDOPARTICULES VIRALES COMME SIGNAL DE DANGER	41
5.4 CAPTURE D'ANTIGÈNES EXOGÈNES PAR LES CELLULES DENDRITIQUES.....	43
5.4.1 CAPTURE DES PSEUDOPARTICULES VIRALES PAR LES CELLULES DENDRITIQUES	44
5.5 APPRÊTEMENT ET PRÉSENTATION D'ANTIGÈNES PAR LES CELLULES DENDRITIQUES.....	45
5.5.1 APPRÊTEMENT ET PRÉSENTATION D'ANTIGÈNES SUR CMH-II	45
5.5.2 APPRÊTEMENT ET PRÉSENTATION D'ANTIGÈNES SUR CMH-I (VOIE CLASSIQUE)	46
5.5.3 APPRÊTEMENT ET PRÉSENTATION CROISÉE D'ANTIGÈNES SUR CMH-I.....	47
5.5.3.1 PRÉSENTATION CROISÉE DES PSEUDOPARTICULES VIRALES.....	49

6. MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT DE RÉPONSES CELLULAIRES	50
6.1 RÉPONSES CELLULAIRES IMPLIQUANT LES LYMPHOCYTES T CD4 ⁺	51
6.2 RÉPONSES CELLULAIRES IMPLIQUANT LES LYMPHOCYTES T CD8 ⁺	52
6.3 RÔLE DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LE DÉVELOPPEMENT DES RÉPONSES CELLULAIRES.....	54
7. LES PSEUDOPARTICULES DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU PAPAYER	57
7.1 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU PAPAYER.....	57
7.2 PRODUCTION DE PSEUDOPARTICULES DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU PAPAYER	58
7.3 IMMUNOGÉNÉICITÉ DES PSEUDOPARTICULES DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU PAPAYER	59
7.4 LES PSEUDOPARTICULES DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU PAPAYER COMME PLATEFORME VACCINALE.....	60
7.4.1 AVANTAGES À UTILISER LES PSEUDOPARTICULES DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU PAPAYER COMME PLATEFORME VACCINALE	62
ARTICLE	63
CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	64
ABSTRACT	66
INTRODUCTION	67
MATERIALS AND METHODS	70
RESULTS	76
DISCUSSION	80
ACKNOWLEDGEMENTS	83
FOOTNOTES	84
REFERENCES	85
FIGURES AND FIGURES LEGENDS.....	90
FIGURES SUPPLÉMENTAIRES	96
DISCUSSION.....	113
RÉFÉRENCES.....	118
ANNEXE A: COURRIEL D'ACCEPTION DU JOURNAL OF VIROLOGY.....	136

LISTE DES FIGURES

FIGURE A. ANALYSE DES PSEUDOPARTICULES DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU PAPAYER PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE.....	59
FIGURE 1. EXPRESSION AND PURIFICATION OF PAPMV-LIKE PARTICLES.....	90
FIGURE 2. SPLENIC DCs TAKE-UP PAPMV-LIKE PARTICLES IN VIVO AND ACQUIRE A MATURE PHENOTYPE	91
FIGURE 3. IN VITRO AND IN VIVO PROCESSING OF THE LCMV P33 CTL EPITOPE DISPLAYED ON PAPMV-LIKE PARTICLES BY SPLENIC DCs AND CROSS-PRIMING OF NAÏVE T CELLS.....	92
FIGURE 4. IMMUNIZATION WITH PAPMV-P33 VLPs GENERATES P33-SPECIFIC CD8⁺ T LYMPHOCYTES.....	93
FIGURE 5. EXPANSION OF EFFECTOR P33-SPECIFIC CTLs FOLLOWING LCMV INFECTION OF IMMUNIZED MICE	94
FIGURE 6. IMMUNIZATION WITH PAPMV-P33 VLPs INDUCES PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST LCMV INFECTION.	95
FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 1. EXPRESSION AND PURIFICATION OF PAPMV-OVA PARTICLES.....	97
FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 2. SPLENIC CD4⁺ OR CD8⁺ T LYMPHOCYTES ARE INEFFICIENT IN CAPTURING PAPMV-LIKE PARTICLES IN VIVO.	99
FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 3. SPLENIC DCs TAKE-UP PAPMV-LIKE PARTICLES IN VITRO.	101
FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 4. SPLENIC DCs TAKE-UP PAPMV-OVA PARTICLES IN VIVO.....	103
FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 5. EFFECT OF LPS CONTAMINANTS CONTAINED IN PAPMV-LIKE PARTICLES STOCKS ON SPLENIC DCs MATURATION.....	105
FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 6. PAPMV-P33 VLPs INDUCES IMMATURE MONOCYTE-DERIVED DCs (IMMODCs) MATURATION IN VITRO	107
FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 7. EXPANSION OF EFFECTOR P33-SPECIFIC CTLs FOLLOWING LCMV INFECTION OF IMMUNIZED MICE.	109
FIGURE SUPPLÉMENTAIRE 8. GENERATION OF P33-SPECIFIC T CELLS BY THE PRIMARY RESPONSE TO LCMV.....	111

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
ADN	Acides désoxyribonucléiques
Ag	Antigènes
AP-1	Protéine activatrice-1
ARN	Acides ribonucléiques
ATP	Adénosine triphosphate
BCR	Récepteurs des lymphocytes B
CMH-I	Complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II
CP	Protéine de la capside
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CpG	Motifs cytosine-guanosine non-méthylés
CTL	Lymphocytes T CD8 ⁺ cytotoxiques
dbARN	ARN double brin
DC	Cellules dendritiques
DC-SIGN	«DC-specific ICAM3-grabbing nonintegrin»
ELC	«Epstein-Barr virus-induced ligand chemokine»
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FcR	Récepteurs des immunoglobulines
fMLP	«Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine»
HBsAg	Antigène de surface du virus de l'hépatite B
HSP	Protéines de choc thermique
IFN	Interféron
Ii	Chaîne invariante
IL	Interleukine
LB	Lymphocytes B
LPS	Lipopolysaccharides bactériens
LT	Lymphocytes T
LT _{reg}	Lymphocytes T régulateurs
MΦ	Macrophages
MCP-1	«Monocyte chemotactic protein-1»
MIP-1α	«Macrophage inflammatory protein-1α»
MR	Récepteur du mannose
NOD	«Nucleotide oligomerization domains»
OVA	Ovalbumine
PAF	«Platelet activating factor»
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PapMV	Virus de la mosaïque du papayer
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
p-CMH	Complexes peptide-CMH
pDC	Précurseurs des cellules dendritiques
PKR	Protéine kinase R
PPV	Pseudoparticules virales
PPV du PapMV	Pseudoparticules du virus de la mosaïque du papayer
PPV du PapMV-p33	Pseudoparticules du virus de la mosaïque du papayer exposant l'épitope CTL p33 du virus de la chorioméningite lymphocytaire

PPV du PapMV-OVA	Pseudoparticules du virus de la mosaïque du papayer exposant l'épitope CTL SIINFEKL de l'ovalbumine
PPV du PapMV-E2	Pseudoparticules du virus de la mosaïque du papayer exposant l'épitope B E2 du virus de l'hépatite C
PPV du PapMV-FLU	Pseudoparticules du virus de la mosaïque du papayer exposant l'épitope CTL M1 du virus de l'influenza
PRR	Récepteurs reconnaissant les pathogènes
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted chemokine»
sbARN	ARN simple brin
SLC	«Secondary lymphoid tissue chemokine»
SR	Récepteurs de type «scavenger»
TAP	Transporteur associé à l'apprêtement d'antigène
TGB	Protéines du «triple gene block»
TCR	Récepteurs des lymphocytes T
Tet-gp33	Tétramères p33-spécifiques
TIR	Domaines TLR/IL-1R
TLR	Récepteurs de la famille «Toll»
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VHE	Virus de l'hépatite E
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VPH	Virus du papillome humain

INTRODUCTION

Depuis la création, en 1796, du premier vaccin contre la variole par Edward Jenner, les nombreuses avancées dans le domaine de l'immunologie, de la vaccinologie et de la biologie moléculaire ont permis le développement de plusieurs vaccins efficaces permettant de lutter contre divers agents pathogènes. Cependant, malgré la disponibilité de ces vaccins et l'efficacité des diverses campagnes de vaccination, l'émergence de certaines maladies infectieuses et l'incapacité d'approvisionner les pays en voie de développement avec des vaccins économiquement abordables pousse l'industrie à revoir les stratégies vaccinales utilisées.

Le développement de vaccins pouvant susciter des réponses cellulaires spécifiques et protectrices est sans aucun doute l'un des plus importants objectifs visés par ces nouvelles stratégies. En effet, la plupart des vaccins présentement utilisés induisent des réponses protectrices via la stimulation de l'immunité humorale (*i.e.* la production d'Ac neutralisants). Or, plusieurs agents pathogènes intracellulaires nécessitent la présence de CTL spécifiques pour être efficacement éliminés. Par exemple, les virus résistants de façon intrinsèque aux Ac neutralisants (*e.g.* virus de l'immunodéficience humaine (VIH)), les virus dont la grande variabilité antigénique rend l'action des Ac inefficace (*e.g.* virus de l'influenza) et les virus qui établissent des infections chroniques entraînant l'épuisement des réponses cytotoxiques normales (*e.g.* virus de l'hépatite C) requièrent la mise en place de réponse immunitaires à médiation cellulaire pour être efficacement éliminés ou contrôlés. Les PPV sont des candidats de choix pour le développement de nouveaux vaccins répondant aux exigences actuelles du domaine de la vaccinologie. En effet, comme nous le verrons au cours de la revue de littérature, des études ont démontré l'efficacité de certaines pseudoparticules issues de virus humains, murins ou de plantes dans l'induction de réponses humorales et/ou cellulaires protectrices chez un hôte donné. De plus, diverses PPV se sont montrées efficaces en tant que plateforme vaccinale capable d'induire des réponses immunitaires spécifiques contre des épitopes de virus étrangers exposés à leur surface.

Les DC jouent un rôle central dans le développement des réponses immunitaires adaptatives. De plus, en raison de leur grande efficacité à capter et à présenter des

antigènes (Ag) et grâce à l'expression de molécules clés à leur surface, les DC jouent un rôle essentiel dans l'induction des réponses cellulaires. Pour ces raisons, l'une des stratégies de l'heure actuellement exploitée dans le domaine de la vaccinologie est de cibler le matériel vaccinal vers les DC afin de favoriser l'induction de réponses cellulaires protectrices. Il est cependant à noter qu'afin d'exercer leur plein potentiel immunostimulant, les DC doivent recevoir un signal activateur leur permettant d'atteindre leur pleine maturité. Comme le matériel vaccinal est souvent inefficace pour induire la maturation des DC par lui-même, la co-administration d'adjuvant lors des immunisations est souvent requise pour assurer une forte immunogénicité aux vaccins. Malgré l'efficacité de certains adjuvants (*e.g.* lipopolysaccharides (LPS), sels d'alun) dans l'induction de la maturation des DC et, conséquemment, dans la promotion du développement des réponses cellulaires, leur utilisation comporte souvent plusieurs désavantages (*e.g.* toxicité chez l'hôte, coûts plus élevés des immunisations) qui limitent leur utilisation chez l'humain. Les nouvelles stratégies en matière de vaccination mettent donc également l'emphase sur le développement de vaccins possédant une activité intrinsèque d'adjuvant.

Nous avons récemment mis au point un système d'expression permettant de produire de grandes quantités de PPV du PapMV. En effet, en surexprimant la CP de ce virus de plante dans *E. coli*, les protéines produites s'auto-assemblent en particules hautement semblables aux particules virales sauvages. Suite à l'observation que ces pseudoparticules sont très immunogènes chez la souris (*i.e.* production de hauts titres d'Ac spécifiques après une seule injection), nous avons voulu déterminer si elles pouvaient être utilisées comme plateforme vaccinale capable de présenter des épitopes CTL de virus étrangers au système immunitaire murin afin d'induire des réponses cellulaires spécifiques contre ces épitopes. Tout d'abord, nous avons évalué l'effet de ces pseudoparticules sur la maturation des DC. Des analyses de cytométrie de flux et de microscopie confocale nous ont permis de mettre en évidence la capacité des DC à capter et à internaliser efficacement les PPV du PapMV *in vitro* et *in vivo*. De plus, en analysant l'expression de divers marqueurs de maturation à la surface de DC exposées aux PPV du PapMV, nous avons pu démontrer l'efficacité de ces dernières à induire la maturation des DC, reflétant ainsi leur forte activité intrinsèque d'adjuvant. D'autre part, suite à la production de PPV du PapMV-p33, nous avons évalué le potentiel de ces PPV à induire des réponses cellulaires protectrices chez des souris immunisées en

absence d'adjuvant. Premièrement, grâce à divers tests *in vitro* et *in vivo*, nous avons mis en évidence la capacité des DC exposées à ces PPV à induire l'activation et la prolifération de CTL p33-spécifiques. Ce résultat permet de confirmer que l'épitope viral étranger présenté à la surface de nos PPV est efficacement apprêté et présenté dans le contexte du CMH-I par les DC via un mécanisme de présentation croisée. Deuxièmement, grâce au marquage, à l'aide de tétramères p33-spécifiques (Tet-gp33), de cellules issues de la rate de souris immunisées en absence d'adjuvant, nous avons démontré que les PPV du PapMV-p33 permettent le développement de CTL p33-spécifiques. Des tests de cytotoxicité cellulaire et de production d'interféron (IFN) γ ont également permis de démontrer que les CTL p33-spécifiques induits lors des immunisations exercent efficacement leur activité effectrice suite à une infection par le LCMV. Finalement, suite à des tests de titrage viral effectués sur la rate de souris immunisées, en absence d'adjuvant, à l'aide des PPV du PapMV-p33 et infectées par le LCMV, nous avons pu prouver que les réponses cellulaires cytotoxiques p33-spécifique induites lors des immunisations sont protectrices.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats confirme la possibilité d'utiliser les PPV du PapMV comme plateforme vaccinale capable de présenter des épitopes de virus étrangers au système immunitaire. De plus, cette étude démontre que la forte immunogénicité intrinsèque des PPV du PapMV permet à ces dernières d'induire efficacement la maturation des DC et le développement de réponses cellulaires protectrices en absence d'adjuvant. Nous croyons donc qu'en plus d'offrir plusieurs avantages sur les autres types de vaccins couramment utilisés, cette nouvelle plateforme vaccinale répond aux exigences actuelles dans le domaine de la vaccinologie et pourrait, un jour, être utilisée pour le développement de vaccins permettant de lutter contre diverses maladies émergentes.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. L'essor de la vaccination

La vaccination reste à ce jour l'approche la plus efficace pour prévenir le développement de maladies infectieuses. Son origine scientifique remonte aux travaux de Edward Jenner qui, en 1796, effectua avec succès une première immunisation contre la variole. Il inocula à un jeune garçon de 8 ans du pus provenant d'une pustule portée par une femme infectée par la variole de la vache (virus de la vaccine). Dix jours suivant l'inoculation, une pustule vaccinale apparue au point d'inoculation sans toutefois affecter la santé du jeune garçon. Le patient immunisé subit ensuite une variolisation qui n'aboutit au développement d'aucune maladie (Payette et Davis, 2001). Cette importante découverte de Jenner allait lancer la première campagne de vaccination contre la variole au début du 19^e siècle dans plusieurs pays d'Europe. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), c'est en 1979, soit environ 200 ans après le début des travaux de Jenner, que le dernier cas de variole affectant l'humain fut déclaré (Andre, 2003).

Les travaux de Jenner furent suivis par ceux de Robert Koch et de Louis Pasteur. La formulation des postulats de Koch vers 1880 permit d'établir pour une première fois les règles de base pour l'identification du rôle étiologique d'un microorganisme lors d'une maladie. Grâce à ses postulats et au milieu de culture solide qu'il développa, Koch réussit à identifier l'agent causal de l'anthrax (*i.e. anthrax bacillus*) en 1876 et de la tuberculose (*i.e. Mycobacterium tuberculosis*) en 1882 (Kaufmann et Schaible, 2005). Pour sa part, Pasteur fut à l'origine du rejet de la théorie de la génération spontanée en proposant que plusieurs maladies étaient causées par de minuscules organismes qu'il appela «germes». Il décrit également pour la première fois les principes et les premières techniques d'atténuation de la virulence des microbes grâce à ses études sur le choléra de la poule. De plus, en 1885, Pasteur développa un vaccin contre la rage chez l'humain (Payette et Davis, 2001).

L'importance scientifique des travaux de Jenner, Koch et Pasteur allait ainsi précipiter le développement du domaine de la vaccinologie. En 1886, Salmon et Smith

démontrèrent que certains microorganismes inactivés (*i.e.* tués) par la chaleur conservaient leur capacité à induire une immunité protectrice, découverte qui mena au développement des vaccins inactivés (Plotkin, 2005). En peu de temps, la conception de vaccins contre la fièvre typhoïde (1886), le choléra (1896) et la peste (1897) allait suivre (Makela, 2000). À la même époque, le domaine de l'immunologie connut aussi ses moments de gloire. Des études révolutionnaires comme celles de Metchnikoff (qui démontra l'importance des phagocytes du sang et de l'immunité cellulaire en 1883) et celles de Von Behring et Kitasato (qui découvrirent les Ac en 1890) aidèrent grandement à la compréhension des mécanismes immunitaires et favorisèrent les avancées dans le domaine de la vaccinologie (Payette et Davis, 2001). Les travaux de Von Behring et Kitasato menèrent également au développement des principes de l'immunothérapie passive, technique qui domina grandement la médecine thérapeutique pendant la première moitié du 20^e siècle (Hilleman, 2000). La fin du 19^e siècle fut aussi marquée par la découverte de la toxine diphtérique par Roux et Yersin (1888), de la toxine tétanique par Faber (1889) et de la toxine botulique par Van Ermengem (1898). À partir de 1920, Ramon effectua des études plus approfondies sur ces toxines et démontra que celles-ci gardaient leur immunogénicité une fois inactivées (*e.g.* par le formaldéhyde). Les toxines dénaturées, appelées toxoïdes, furent ensuite utilisées pour la conception de vaccins contre la diphtérie et le tétanos. Ces deux vaccins eurent un impact positif majeur dans les villes industrialisées. On note aussi à la fin du 19^e siècle l'élaboration du concept de virus. Mayer, Ivanofsky et Beijerinck, qui travaillaient indépendamment sur la maladie de la mosaïque de tabac, établirent que l'agent pathogène provoquant cette maladie nécessitait absolument un hôte vivant pour survivre et se répliquer. Ce n'est toutefois pas avant le perfectionnement des techniques de propagation virale que l'importance étiologique des virus dans plusieurs maladies fut démontrée sans équivoque. En 1931, le développement d'une technique efficace de culture virale dans des œufs de poules par Goodpasture et Woodruff révolutionna le domaine de la virologie et permit la conception d'un vaccin contre l'influenza (1936) et contre la fièvre jaune (1937) (Payette et Davis, 2001). Une autre innovation majeure dans le domaine de la production de vaccins viraux fut la mise au point par Sanford, en 1948, d'un système permettant la culture d'un type cellulaire donné à partir de tissus. Ce système fut ensuite exploité par Enders pour la culture et la production du virus de la polyomyélite à l'aide de cellules non-neuronales embryonnaires humaines. Cette

avancée mena à la création du vaccin anti-polyomyélite Salk en 1955. Ce vaccin fut produit suite à l'inactivation, au formaldéhyde, du virus de la polyomyélite cultivé *in vitro* (Babiuk, 1999). Cependant, la distribution d'un stock de vaccin Salk ayant subi une inactivation insuffisante causa la maladie chez environ 150 patients. Cet événement précipita le développement, en 1961, du vaccin oral Sabin. Ce nouveau vaccin, plus sécuritaire, fut produit à partir de virus de la polyomyélite vivants mais atténués (Nathanson et Langmuir, 1995). Le succès du vaccin Sabin fut suivi par celui du très populaire vaccin trivalent pédiatrique rougeole-rubéole-oreillons (RRO) en 1971.

En parallèle aux nombreuses découvertes dans le domaine de la virologie et des vaccins viraux, la lutte contre les infections bactériennes prit également de l'ampleur au début du 20^e siècle. Par exemple, en 1921, les Dr Calmette et Guérin développèrent leur vaccin BCG contre *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent causal de la tuberculose. De plus, un vaccin inactivé contre la coqueluche fut également introduit en 1926. Éventuellement, ce vaccin allait être combiné aux toxoïdes tétaniques et diphtériques pour former le vaccin trivalent DTP, un vaccin qui a longtemps fait parti du programme vaccinal pédiatrique. Toutefois, l'événement clé ayant le plus marqué le développement des vaccins anti-bactériens fut la découverte, au début des années 1940, du rôle crucial des polysaccharides capsulaires dans la virulence des bactéries (Lindberg, 1999). En 1945, MacLeod *et al* démontrèrent qu'une immunisation avec des polysaccharides purifiés de *Streptococcus pneumoniae* permettait de prévenir le développement de pneumonies causées par cette bactérie. Cette découverte allait ouvrir la voie au développement du premier vaccin polysaccharidique. Finalement, afin d'améliorer l'efficacité et l'immunogénicité de ce nouveau type de vaccin, plusieurs chercheurs entreprirent des études sur la conjugaison de polysaccharides à des protéines immunogènes (*e.g.* sur des toxoïdes). Ces études menèrent, en 1987, à la mise en marché du premier vaccin polysaccharidique conjugué contre *Haemophilus influenzae* de type b (Lesinski et Westerink, 2001).

La fin du 20^e siècle fut pour sa part marquée par de nombreuses avancées dans les domaines de la génétique, de la biologie moléculaire, de l'immunologie, de la virologie et de la microbiologie. Les nombreuses découvertes effectuées permirent l'élaboration de nouvelles stratégies vaccinales innovatrices pour lutter contre les

maladies infectieuses importantes et/ou émergentes. En 1984, les nouvelles techniques de clonage allaient permettre la production d'un premier vaccin recombinant contre le virus de l'hépatite B (VHB) (McAlear *et al.*, 1984). Pour la première fois de l'histoire, les chercheurs réussirent à identifier, à produire synthétiquement, à purifier et à utiliser une composante antigénique provenant d'un agent infectieux afin de conférer une protection chez un hôte. Ceci confirma le grand potentiel des vaccins recombinants dans la lutte contre les maladies infectieuses. De plus, le déchiffrement du génome de plusieurs organismes infectieux facilita grandement l'identification de protéines pathogéniques ayant un potentiel vaccinal (Liu, 1999). Les vaccins à base d'acides désoxyribonucléiques (ADN) (Shedlock et Weiner, 2000), les adjuvants (Moyle *et al.*, 2004) et les thérapies géniques (Morenweiser, 2005) sont également d'autres exemples d'outils innovateurs maintenant utilisés en vaccinologie. Finalement, une meilleure compréhension des mécanismes de développement des réponses humorales et cellulaires a rendu possible l'optimisation des divers programmes de vaccination en facilitant le choix de la voie et de la fréquence d'administration des divers vaccins en fonction du type de réponse immunitaire recherché (Payette et Davis, 2001).

2. Les types d'immunisation

2.1 Immunisation passive

L'immunisation passive consiste à transférer des Ac préformés à un hôte donné. Il existe également un phénomène d'immunité passive naturelle dans lequel le fœtus ou le nouveau-né reçoit des Ac maternels via le placenta, le colostrum ou le lait maternel. Les Ac ainsi transférés permettent d'apporter, au fœtus ou à l'enfant, une protection temporaire contre certains microorganismes déjà rencontrés par la mère. L'immunisation passive peut aussi être utilisée dans un contexte médical lors duquel des Ac préformés sont injectés à un patient nouvellement infecté. Même si cette technique était amplement utilisée avant l'avènement de la vaccinologie moderne, elle comporte certains risques (*e.g.* choc anaphylactique systémique, réaction d'hypersensibilité de type III). Afin d'éviter ces effets dangereux, l'immunisation passive est principalement réservée aux patients ayant des déficiences au niveau de la production d'Ac, aux patients qui ne disposent pas de suffisamment de temps pour

développer une protection adéquate via une immunisation active, ou aux patients atteints d'une maladie dont les symptômes pourraient être éliminés à l'aide d'Ac. L'injection d'anti-toxine de cheval pour contrer le botulisme, la diphtérie, le tétanos ou l'effet d'un venin est un exemple d'immunisation passive.

2.2 Immunisation active

L'immunisation active consiste à induire une réponse immunitaire protectrice de longue durée caractérisée par le développement de lymphocytes B (LB) et/ou de lymphocytes T (LT) spécifiques à un microorganisme donné. Ceci peut se faire de façon naturelle (*i.e.* lors d'une infection normale par un microorganisme) ou artificielle (*i.e.* suite à l'administration d'un vaccin). Au cours de l'histoire, les divers programmes de vaccination instaurés au niveau mondial, dont celui couramment donné aux enfants à partir de l'âge de 2 mois, ont contribué considérablement à la diminution de la fréquence de plusieurs maladies. Cependant, l'administration d'un vaccin ne confère pas toujours une protection parfaite. En effet, certaines personnes ne répondront que faiblement à une immunisation et ne seront pas totalement protégées contre la maladie. De plus, selon le type de vaccin utilisé, des doses de rappel ou l'utilisation d'adjuvant peuvent être requises afin d'assurer le développement d'une réponse immunitaire optimale.

3. Les principaux types de vaccins

La prochaine section a pour but de faire un survol des diverses stratégies vaccinales présentement utilisées et/ou testé chez l'humain. Une attention particulière sera accordée à l'utilisation des PPV pour la conception de nouveaux vaccins.

3.1 Les vaccins à base de microorganismes morts et inactivés

L'inactivation d'un microorganisme pour la conception d'un vaccin consiste à rendre ce microorganisme incapable de réplication chez l'hôte tout en conservant l'intégrité structurale des épitopes importants provenant des Ag de surface. L'inactivation peut se faire par un traitement à la chaleur ou par un traitement chimique à l'aide d'agents alkylants (*e.g.* formaldéhyde). Les traitements chimiques sont les plus couramment

utilisés puisque l'inactivation par la chaleur provoque souvent la dénaturation des protéines et la perte de leur immunogénicité (Makela, 2000). Les vaccins Salk contre la poliomyélite, contre la coqueluche, contre la rubéole et contre le choléra sont tous des exemples de vaccins inactivés.

Les principaux désavantages des vaccins inactivés se situent au niveau de leur sécurité et de leur efficacité. Tout d'abord, même si les microorganismes devraient théoriquement tous mourir suite à une inactivation, il arrive que certains virions réussissent à survivre et à contaminer les préparations vaccinales. D'autre part, comme les microorganismes inactivés sont incapables de se répliquer chez un hôte, ceci influence négativement l'efficacité des vaccins inactivés. En effet, ce type de vaccin nécessite souvent des rappels répétés et l'utilisation d'un adjuvant pour maintenir une réponse immune adéquate chez l'hôte. Finalement, ce type de vaccin induit principalement des réponses immunitaires à médiation humorale et est très peu efficace dans l'induction de réponses cellulaires (Makela, 2000).

3.2 Les vaccins à base de microorganismes vivants et atténués

L'atténuation d'un microorganisme a pour but d'éliminer les propriétés pathogéniques et virulentes du microorganisme tout en conservant sa capacité à croître au sein d'un hôte inoculé. Dans le cas des virus, la sélection d'un clone atténué à partir d'une population pathogène initiale peut être faite par des passages répétés en culture cellulaire. Les bactéries peuvent pour leur part être cultivées dans des milieux appauvris ou encore dans des conditions de culture anormales. De plus, il est également possible de traiter les souches initiales à l'aide d'agents mutagènes, favorisant ainsi l'apparition de mutations délétères au niveau de la pathogénicité (Makela, 2000). Toutefois, comme ces mutations sont généralement aléatoires, ces techniques ne permettent pas de prévoir la stabilité de l'atténuation obtenue et les risques de réversion. Heureusement, les nouvelles techniques de biologie moléculaire permettent maintenant l'atténuation de microorganismes par génie génétique, soit en éliminant complètement du génome de l'agent pathogène un ou plusieurs gènes responsables de sa virulence. Ce meilleur contrôle de l'atténuation réduit considérablement les risques de réversion (Babiuk, 1999). Des exemples de vaccins atténués utilisés chez l'humain sont le vaccin contre la rougeole, le vaccin Sabin

contre la poliomyélite, le vaccin à base de bacilles de Calmette-Guérin contre la tuberculose, le vaccin contre les oreillons, le vaccin contre la fièvre typhoïde et le vaccin contre la fièvre jaune (Ada, 2001).

Due à leur croissance lente au sein de l'hôte, les vaccins vivants atténués jouissent d'une plus longue période d'exposition au système immunitaire. Ceci a l'avantage de générer de meilleures réponses mémoires et d'éliminer le besoin d'administrer des doses de rappel répétées. Notons aussi que ce type de vaccin a l'avantage de pouvoir induire à la fois une immunité humorales et cellulaire. En revanche, l'utilisation de microorganismes atténués comporte un désavantage majeur, soit un risque que le microorganisme retrouve sa virulence et sa pathogénicité au sein de l'hôte. L'atténuation par génie génétique a toutefois permis de réduire considérablement les risques de réversion (Ada, 2001).

3.3 Les vaccins à base de toxoïdes

Le caractère pathogénique de certaines bactéries repose sur la production de toxines responsables de la plupart des symptômes de la maladie engendrés suite à une infection. C'est le cas des bactéries *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* et *Bordetella pertussis* qui produisent respectivement la toxine tétanique, la toxine diphtérique et la toxine de la coqueluche. Un moyen efficace de se défendre contre les effets nocifs des toxines bactériennes est l'immunisation à l'aide de toxoïdes. Un toxoïde est une toxine bactérienne dont la toxicité a été diminuée ou complètement éliminée et dont l'immunogénicité a été maintenue. L'inactivation des toxines est généralement accomplie par un traitement chimique ou par génie génétique (Robbins *et al.*, 2005). L'immunisation à l'aide de toxoïdes, comme dans le cas du vaccin trivalent contre le tétanos, la diphtérie et coqueluche, permet l'induction d'Ac capables de lier les toxines naturelles et de neutraliser leurs effets. Finalement, certains toxoïdes comme ceux à base de la toxine du choléra ou de la «heat-labile enterotoxin» de la bactérie *E. coli* ont efficacement été utilisés comme adjuvants capables d'induire de plus fortes réponses immunitaires contre d'autres Ag (Del Giudice et Rappuoli, 1999).

L'utilisation de toxoïdes à des fins vaccinales comporte cependant certains désavantages. Il existe tout d'abord un risque que la toxine d'intérêt n'est pas été suffisamment inactivée, entraînant ainsi le développement de symptômes similaires à ceux rencontrés lors de la maladie. De plus, les toxoïdes requièrent souvent une co-administration d'adjuvant afin d'induire une réponse efficace et protectrice (Jefferson, Rudin et Di Pietrantonj, 2004).

3.4 Les vaccins à base de polysaccharides

Plusieurs vaccins à base de polysaccharides de capsules bactériennes sont présentement utilisés dans la prévention d'infections par diverses bactéries pathogènes. L'utilisation de ce type de vaccin repose sur le fait que les capsules polysaccharidiques de plusieurs bactéries pathogènes comme *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhi* agissent comme facteur de virulence capable de protéger les bactéries de la phagocytose (Lindberg, 1999). De plus, plusieurs études ont démontré que l'induction d'Ac spécifiques aux polysaccharides de capsules bactériennes augmente considérablement l'efficacité de l'activité phagocytaire des macrophages (MΦ) et des neutrophiles. (Lee, Wang et Tai, 1997; Romero-Steiner *et al.*, 2006). Le recouvrement des capsules bactériennes par les composantes du complément facilite également les mécanismes de phagocytose. L'effet opsonisant des Ac et des composantes du complément permet donc une élimination rapide et efficace des bactéries. Pour assurer leur efficacité contre l'hétérogénéité antigénique des polysaccharides capsulaires d'une population bactérienne donnée, ce type de vaccin inclus habituellement divers sérotypes de polysaccharides retrouvés au sein d'une même population bactérienne. C'est le cas du vaccin actuel contre *Streptococcus pneumoniae* (Pneumovax 23 ou Pnu-Immune 23) qui contient 23 différents polysaccharides capsulaires antigéniquement différents (Lindberg, 1999). D'autres exemples de vaccins à base de polysaccharides approuvés et utilisés dans la lutte contre des infections bactériennes sont les vaccins contre *Streptococcus pneumoniae*, contre *Neisseria meningitidis* de type C et contre *Staphylococcus aureus* (Ada, 2001).

L'utilisation de préparations vaccinales composées uniquement de polysaccharides purifiés comporte un désavantage majeur. En effet, les polysaccharides purifiés et administrés seuls sont souvent peu immunogènes et incapables d'activer l'immunité cellulaire. Ils activent plutôt les LB de façon thymo-indépendante de type 2, sans qu'il se produise une commutation de classe des immunoglobulines (Ig), une maturation de l'affinité de Ig et le développement d'une réponse mémoire efficace (Lesinski et Westerink, 2001). De plus, les jeunes enfants (< 2 ans), les personnes âgées ainsi que les personnes immunodéprimées répondent généralement peu à plusieurs types d'Ag polysaccharidiques (Jodar, Griffiths et Feavers, 2004). Toutefois, même si cette technique multiplie les coûts de production, la conjugaison de polysaccharides d'intérêt à des protéines porteuses ayant une forte immunogénicité (*e.g.* toxoïdes) permet d'augmenter l'immunogénicité des polysaccharides et d'induire la commutation de classe des Ig, la maturation de l'affinité des Ig et la production de LB mémoires. (Lesinski et Westerink, 2001).

3.5 Les vaccins à base de vecteurs recombinants

La production de vecteurs recombinants consiste à insérer, directement dans le génome d'un microorganisme atténué, le ou les gènes codant pour une ou des protéines d'agents pathogènes. De plus, dans le cas des vecteurs bactériens, il est possible de transmettre le ou les gènes d'intérêt par l'entremise d'un plasmide. Lorsque le vecteur recombinant pénètre les cellules de l'hôte, le ou les Ag étrangers peuvent être produits en très grande quantité à partir du ou des gènes nouvellement acquis. Selon le tropisme cellulaire du vecteur utilisé, certaines cellules de l'hôte pourront alors exposer les Ag d'intérêt aux cellules du système immunitaire, induisant ainsi le développement de réponses immunitaires adaptatives. En plus de permettre le développement de réponse humorales dirigées à la fois contre le vecteur et l'Ag étranger, les vecteurs recombinants induisent efficacement des réponses cellulaires protectrice. Il est également possible d'utiliser les vecteurs recombinants dans un contexte thérapeutique pour lutter contre une tumeur ou une déficience génétique. Dans ce cas-ci, les gènes transférés codent pour des protéines régulant le développement de tumeurs ou ayant un rôle précis dans certaines activités biologiques normales (Gherardi et Esteban, 2005; Saklani-Jusforgues *et al.*, 2003). Même s'il n'existe encore aucun candidat parfait, plusieurs vecteurs recombinants ont démontré

divers niveau d'efficacité dans un contexte vaccinal ou thérapeutique (Souza *et al.*, 2005). Du côté des vecteurs viraux, l'utilisation de poxvirus, d'adénovirus, d'alphavirus, de poliovirus et d'herpesvirus atténués a jusqu'à maintenant suscité beaucoup d'intérêt. Pour leur part les souches atténuées de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella*, *Mycobacterium bovis*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis* sont toutes des exemples de vecteurs bactériens utilisés avec succès (Konjufca *et al.*, 2006; Pაცეზ *et al.*, 2006; Kochi, Killeen et Ryan, 2003; Ikonomidis *et al.*, 1997). Mentionnons aussi que certaines levures recombinantes peuvent également être utilisées pour la conception de vaccins capables d'induire des réponses humorales et cellulaires spécifiques (Stubbs et Wilson, 2002; Georgiou *et al.*, 1997).

Les vecteurs recombinants offrent plusieurs avantages par rapport aux autres techniques de vaccination traditionnelles. Ils permettent d'abord de produire une très grande quantité d'Ag directement à l'intérieur des cellules de l'hôte immunisé. De plus, plusieurs des vecteurs couramment utilisés sont capables de cibler et d'infecter les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), favorisant ainsi le développement des réponses immunes (Souza *et al.*, 2005). Finalement, les vecteurs recombinants jouissent souvent d'une activité adjuvante intrinsèque qui leur confère une forte immunogénicité. En effet, comme nous le verrons plus tard, les virus et les bactéries expriment tous des structures moléculaires conservées reconnues par des récepteurs de l'immunité innée exprimés par les CPA. La reconnaissance des vecteurs par les récepteurs de l'immunité innée entraîne l'activation des CPA et induit la production de cytokines et de chimiokines. Ces événements favorisent grandement le déclenchement et la polarisation des réponses immunitaires adaptatives (Singh et Srivastava, 2003).

3.6 Les vaccins à base d'acides désoxyribonucléiques

La vaccination à l'aide ADN consiste à administrer des plasmides circulaires bactériens possédant le gène codant pour un Ag protéique afin d'induire une réponse immunitaire contre cet Ag (Lewis et Babiuk, 1999). Depuis le début de leur utilisation à des fins expérimentales au début des années 90, les vaccins à ADN ont démontré, chez la souris, leur efficacité dans l'induction de réponses humorales et cellulaires protectrices contre plusieurs maladies de nature virale, bactérienne, parasitaire,

allergique ou tumorale (Gurunathan, Klinman et Seder, 2000). En plus de posséder le gène codant pour l'Ag d'intérêt, les plasmides utilisés sont généralement constitués d'un promoteur viral fort et constitutif, d'un gène de résistance à un antibiotique pour permettre la sélection des bactéries transformées, et d'une séquence permettant la polyadénylation terminale des acides ribonucléiques (ARN) messagers afin d'optimiser l'expression protéique dans les cellules de mammifères. De plus, un gène codant pour une molécule adjuvante (*e.g.* cytokine) est souvent ajouté au sein du plasmide afin d'augmenter l'immunogénicité du vaccin et d'amplifier la réponse immunitaire résultante (Sheets *et al.*, 2006). Après avoir été produits en grande quantité dans des bactéries (*e.g.* *E. coli*), les plasmides sont purifiés, dissous dans une solution saline, et administrés à un hôte donné par voie intramusculaire ou cutanée (Donnelly, Wahren et Liu, 2005; Donnelly *et al.*, 1997). La capture de ces Ag par les CPA et leur reconnaissance par les LB via leurs Ig de surface permet d'initier le développement de réponses humorales (Lowe, Shearer et Kennedy, 2006). Pour ce qui est des réponses cellulaires cytotoxiques, les mécanismes impliqués dans leur induction sont moins connus et suscitent encore la controverse (Fu *et al.*, 1997). Finalement, la présence de motifs cytosine-guanosine non-méthylés (CpG) au sein même des plasmides bactériens confère une activité intrinsèque d'adjuvant aux vaccins à ADN (Barouch, 2006).

Les vaccins à ADN possèdent plusieurs avantages sur les autres types de vaccin. Tout d'abord, grâce à leur production endogène par les cellules du Soi, les Ag protéiques codés par les vaccins à ADN adoptent une conformation authentique, sans aucune dénaturation ou modification. Ainsi, l'intégrité des épitopes immunogènes est généralement conservée et ceux-ci sont exposés au système immunitaire comme s'il s'agissait d'une infection naturelle (Berzofsky, Ahlers et Belyakov, 2001). De plus, la production endogène d'Ag favorise à la fois le développement de réponses humorales et cellulaires, facteur important dans la lutte contre plusieurs pathogènes. Les vaccins à ADN sont également à l'origine d'une expression prolongée de l'Ag, permettant ainsi de créer une mémoire immunitaire de longue durée. La possibilité d'un même plasmide à transporter les gènes codant pour diverses protéines d'intérêt avantage également ce type de vaccin (Berzofsky, Ahlers et Belyakov, 2001). Contrairement à plusieurs autres stratégies vaccinales, les vaccins à ADN sont capables d'induire une immunité protectrice chez les nouveau-nés même en présence d'Ac maternels. Les

vaccins à ADN sont également peu dispendieux à produire, à entreposer et à utiliser. Finalement, la mise au point d'une technique d'administration utilisant un canon à air appelé «gene gun» évite l'utilisation d'aiguille, facteur important dans l'acceptation de la technique de vaccination par la population. Malgré les nombreux avantages potentiels des vaccins à ADN, leur efficacité chez l'humain s'est avérée décevante lors de plusieurs essais cliniques. En effet, pour des raisons encore inconnues, les vaccins à ADN sont beaucoup moins immunogènes chez les gros mammifères et chez l'humain comparativement à chez la souris (Barouch, 2006; Babiuk *et al.*, 2003). Heureusement, des stratégies ont été développées afin d'amplifier l'immunogénicité de ces vaccins chez l'humain, comme l'insertion de gènes codant pour des cytokines, chimiokines ou molécules de costimulation (Donnelly, Wahren et Liu, 2005; Scheerlinck, 2001).

3.7 Les vaccins à base d'antigènes recombinants

Les premières tentatives d'immunisation à l'aide d'Ag purifiés à partir de culture de certains microorganismes ont démontré le potentiel de cette approche dans l'induction de réponses immunitaires protectrices. Cependant, comme certains pathogènes sont difficiles ou encore impossibles à cultiver *in vitro* (e.g. VHC, *Mycobacterium leprae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Plasmodia*), le développement de cette stratégie a longtemps été freiné par l'incapacité d'obtenir suffisamment de matériel purifié pour instaurer des programmes de vaccination à grande échelle (Makela, 2000). Heureusement, le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de surmonter cette difficulté. En effet, en clonant le gène d'une protéine immunogène d'intérêt dans un système d'expression (e.g. bactéries, levures, cellules d'insecte ou cellules de mammifère), la protéine en question peut être rapidement synthétisée en très grande quantité et à très faible coût. Des étapes subséquentes de purification permettent ensuite d'obtenir une préparation d'Ag homogènes pouvant être utilisée à grande échelle à des fins vaccinales. Comme il en sera discuté dans une prochaine section, les PPV sont issues de la production d'Ag recombinants et suscite maintenant beaucoup d'intérêt dans le domaine de la vaccinologie.

Il existe divers avantages à produire, de façon contrôlée, des Ag recombinants à l'aide d'un système d'expression. Tout d'abord, les hôtes disponibles pour la production

d'Ag recombinants sont généralement faciles et peu coûteux à cultiver. De plus, comme les protéines recombinantes sont produites en très grande quantité, la purification de celles-ci devient beaucoup plus facile. Cependant, à la suite de leur production, certaines protéines recombinantes n'adoptent pas leur conformation «naturelle», ce qui empêche, dans plusieurs cas, la production d'Ac protecteurs. De plus, afin d'assurer leur pleine antigénicité et stabilité, certaines protéines doivent subir des modifications post-traductionnelles (e.g. glycosylation). Dans ce cas-ci, le choix du système d'expression devient critique. Par exemple, l'utilisation de bactéries mène habituellement à la production de protéines recombinantes non-glycosylées tandis que l'utilisation de levures ou de cellules d'insecte favorise la glycosylation des protéines (Makela, 2000).

La prochaine section de ce document portera exclusivement sur la présentation des diverses caractéristiques des PPV et sur les différentes façons de les utiliser dans un contexte vaccinal ou thérapeutique.

4. Les pseudoparticules virales

4.1 Caractéristiques générales des pseudoparticules virales

L'utilisation d'ADN recombinant et d'un système d'expression pour la production de protéines structurales de divers virus mène souvent à l'auto-assemblage de ces protéines en PPV présentant une structure organisée très similaire à celle des virus d'origines (Pattenden *et al.*, 2005). Par exemple, l'expression de la petite protéine de l'enveloppe du VHB dans des levures ou des cellules de mammifère mène à la formation de particules de 22 nm identiques à celles retrouvées lors d'une infection naturelle (McAleer *et al.*, 1984). Lors de tests d'immunisation menés tant chez les animaux que chez les humains, plusieurs PPV issues de divers virus se sont montrées très immunogènes et efficaces pour induire des réponses immunitaires spécifiques et protectrices en absence d'adjuvant (Noad et Roy, 2003). D'ailleurs, pour plusieurs raisons, les PPV représentent une alternative intéressante pour le développement de nouveaux vaccins et suscitent beaucoup d'intérêt auprès de la communauté scientifique. Tout d'abord, comparativement aux autres types de vaccins, les techniques de production des PPV sont simples et peu dispendieuses. De plus, comme

les PPV sont non-répliquatives et ne contiennent aucun matériel génétique infectieux, leur utilisation est beaucoup plus sécuritaire que celle des vaccins vivants atténués ou des vaccins inactivés (Eriksson et Holmgren, 2002). Finalement, certaines caractéristiques intrinsèques des PPV, soit leur nature particulière, leur expression de motifs antigéniques reconnus par les récepteurs de l'immunité innée, et leur haut niveau d'organisation et de répétitivité antigénique, leur confèrent une forte immunogénicité permettant l'induction de réponses immunitaires spécifiques à médiation humorale et/ou cellulaire, souvent sans l'aide d'adjuvant.

4.2 Structure des pseudoparticules virales

Jusqu'à maintenant, des PPV issues de virus possédant diverses caractéristiques structurales ont été produites. La taille de ces particules, qui varie en fonction du type de protéines virales incorporées, se situe en moyenne entre 22 et 150 nm (Grgacic et Anderson, 2006). Selon la structure finale des particules, on distingue une première classe de PPV, dite simple, qui inclue les PPV formées d'une ou, dans certains cas, de deux protéines majeures de la capsid (e.g. virus du papillome humain (VPH), parvovirus porcin et canin, virus Norwalk, circovirus, et polyomavirus) (Noad et Roy, 2003). Il est également possible de produire des PPV formées par l'assemblage de plusieurs protéines de la capsid (e.g. poliovirus, virus bluetongue, rotavirus). Cependant, la production de ces PPV représente un plus grand défi technique puisque toutes les protéines structurales doivent être co-exprimées au sein de la même cellule afin d'assurer un assemblage efficace. Une des façons d'arriver à cette fin est de produire une seule polyprotéine qui est ensuite clivée dans la cellule pour permettre la formation des particules. Finalement, la production de PPV issues de divers virus possédant une enveloppe lipidique est également possible (e.g. virus de l'influenza, VHC, virus Hantaan). Dans ce cas-ci, bien qu'il ne s'agit pas d'une règle s'appliquant à tous les virus enveloppés, le choix du système d'expression semble avoir un impact important sur l'efficacité de la formation de ce type de PPV (Noad et Roy, 2003). Par exemple, alors que la production de PPV du virus Hantaan est peu efficace avec le système baculovirus/cellules d'insecte, les PPV du virus de l'influenza et du VHC sont produites sans problème avec ce même système (Betenbaugh *et al.*, 1995; Baumert *et al.*, 1998; Latham et Galarza, 2001).

4.3 Production des pseudoparticules virales

Afin d'assurer la distribution de nouveaux vaccins à l'ensemble de la population mondiale, incluant celle des pays sous-développés, il est important de maximiser l'efficacité des techniques de production de vaccins tout en minimisant les coûts s'y rattachant. L'utilisation de PPV à des fins vaccinales représente une stratégie prometteuse pour répondre à cette demande. En effet, la production des Ag nécessaires à la formation des PPV repose sur la technologie de l'ADN recombinant, qui demeure une technique simple, rapide, et peu dispendieuse de produire des Ag vaccinaux (Leclerc, 2003). Depuis longtemps, la production de PPV peut se faire à l'aide d'un système d'expression procaryote (*i.e. E. coli*) ou d'un système d'expression eucaryote (*i.e. levures*). En plus de permettre la production de grandes quantités de protéines en très peu de temps, les coûts liés à l'utilisation de ces deux systèmes sont peu élevés. Cependant, certains désavantages limitent l'utilisation d'*E. coli* et des levures pour la production de PPV. Dans certains cas, les protéines produites dans *E. coli* ou dans les levures subissent un repliement inefficace qui avorte ou réduit la production de PPV. D'autre part, les protéines issues de cellules bactériennes ne peuvent subir les mêmes modifications post-traductionnelles (*e.g. glycosylation*) que celles issues de cellules de mammifère. En plus d'affecter l'efficacité du repliement des protéines, l'absence de certaines modifications post-traductionnelles empêche souvent l'obtention de PPV présentant les mêmes caractéristiques observées sur les particules virales sauvages lors d'une infection naturelle. De plus, la surexpression de protéines dans des cellules bactériennes entraîne la formation de corps d'inclusion qui rendent les protéines insolubles et plus difficiles à purifier et à utiliser (Brumfield *et al.*, 2004). Tous ces inconvénients ont donc, pendant longtemps, limité la variété de PPV pouvant être produites et utilisées. Heureusement, la mise au point récente de nouveaux systèmes d'expression permet maintenant d'élargir l'éventail de PPV pouvant être produites. Par exemple, l'un de ces systèmes fait appel à des baculovirus recombinants qui produisent les protéines d'intérêt dans des cellules d'insectes. En plus d'assurer une expression suffisante de protéines recombinantes, ce système permet le déroulement des modifications post-traductionnelles nécessaires au bon repliement des protéines nouvellement synthétisées. De plus, ce système s'avère également un moyen très sécuritaire de produire des protéines vaccinales en vue d'une utilisation chez l'humain (Casal,

Rueda et Hurtado, 1999). Comme les baculovirus sont très facilement inactivés par des traitements chimiques et possèdent un nombre très réduit d'hôtes (*i.e.* quelques espèces de lépidoptères, un type d'insecte), les risques encourus par les individus vaccinés sont pratiquement inexistantes (Rueda *et al.*, 2000). De plus, les cellules d'insectes utilisées peuvent être cultivées en absence de suppléments dévirés de cellules de mammifère, ce qui assure un niveau supplémentaire de sécurité en empêchant la croissance de pathogènes opportunistes indésirables (Maranga *et al.*, 2002). Malgré ces nombreux avantages, le système baculovirus/cellules d'insecte possèdent aussi certains inconvénients comme un coût d'utilisation et un temps de production plus élevé que les autres systèmes (Rueda *et al.*, 2000). Finalement, un nouveau système reposant sur l'expression de protéines recombinantes au sein de cellules de mammifère a aussi récemment été développé mais reste encore peu utilisé pour la production de protéines vaccinales. Comme il n'existe aucun système d'expression parfait, le choix de celui-ci doit se faire en fonction du type de PPV, des exigences personnelles ou publiques, et des limites techniques rencontrées.

4.4 Utilisation des pseudoparticules virales en vaccinologie

4.4.1 Utilisation des pseudoparticules virales comme immunogène direct

Comme les PPV miment la structure originale des virus et exposent les épitopes naturels de ces virus au système immunitaire, il est possible de les utiliser comme immunogènes directs pour l'induction de réponses humorales et/ou cellulaires protectrices (Harro *et al.*, 2001). Le type de réponse immunitaire suscitée et les mécanismes empruntés pour induire ces réponses varient grandement en fonction du type de PPV. De plus, alors que certaines PPV sont suffisamment immunogènes pour induire des réponses immunitaires efficaces par elles-mêmes, d'autres nécessitent la co-administration d'adjuvant. Jusqu'à maintenant, deux vaccins à base de PPV sont autorisés à être utilisés chez l'humain, soit un vaccin contre le VHB et un autre contre le VPH. En plus de la présentation de ces deux vaccins, d'autres exemples de PPV ayant démontré une efficacité sur le plan vaccinal seront présentés ci-dessous.

Le VHB, qui touche des millions de personnes à travers le monde, est responsable du développement de maladies chroniques du foie, de cirrhose du foie et

d'hépatocarcinome. En 1965, Blumberg *et al* découvrirent que le sang des patients porteurs chroniques du VHB contenait l'antigène de surface du VHB (HBsAg). Après des années d'étude sur les caractéristiques du HBsAg, un premier vaccin fut mis au point à partir de HBsAg purifiés du plasma d'individus infectés. Or, plusieurs facteurs limitaient l'utilisation et la distribution à grande échelle de ce vaccin. En effet, la nécessité d'avoir accès à un nombre important de patients infectés pour l'approvisionnement en Ag et la difficulté d'obtenir des préparations pures et sécuritaires d'Ag, c'est-à-dire libres de tous contaminants ou particules infectieuses, poussa les chercheurs à tenter de développer une version améliorée du vaccin (Payette et Davis, 2001). C'est ainsi qu'en 1984, le tout premier vaccin à base de PPV à être autorisé d'utilisation chez l'humain fut mis sur le marché pour lutter contre le VHB. Ce vaccin fut produit en surexprimant l'HBsAg dans des levures recombinantes de type *Saccharomyces cerevisiae*. Les protéines virales ainsi produites se replient spontanément pour former des particules identiques aux particules virales sauvages mais ne contenant aucun matériel génétique infectieux. Des études menées chez la souris, chez le singe vert et chez le chimpanzé démontrèrent qu'une co-administration de ces PPV et de sels d'alun (un adjuvant composé de sulfate de potassium et d'aluminium hydraté) induisait de fortes réponses humorales caractérisées par le développement d'Ac spécifiques, neutralisants et protecteurs (McAleer *et al.*, 1984). Suite au succès des tests d'immunisations menées chez les animaux, des études cliniques chez l'humain ont été mises en place et ont apporté des résultats tout aussi satisfaisants. En effet, entre février 1984 et août 1986, plus de 58 études cliniques différentes ont démontré que le nouveau vaccin à base de PPV du VHB permettait d'obtenir des réponses immunitaires quantitativement et qualitativement semblables à celles obtenue à l'aide du vaccin à base de HBsAg purifiés du plasma de patients infectés (Andre et Safary, 1987). Aujourd'hui, deux vaccins à base de PPV du VHB sont couramment utilisés, soit le Recombivax-HB[®] (produit par Merck) et le Engerix-B[®] (produit par GlaxoSmithKline). Ces deux vaccins, qui peuvent être administrés dès la naissance, sont très sécuritaires et bien tolérés par les patients. De plus, ils offrent une excellente immunogénicité et permettent d'obtenir des taux de séroprotection (titre d'Ac spécifiques ≥ 10 IU/L) de 85 à 100% chez les nouveaux-nés, les enfants, les adolescents et les adultes (Keating et Noble, 2003).

Le VPH est responsable de l'une des infections transmises sexuellement les plus répandues au monde. Ce virus non-enveloppé possède un génome circulaire d'environ 8 kb codant pour deux protéines structurales (L1 et L2) et pour d'autres protéines non-structurales importantes pour le cycle de vie du virus mais qui ne sont pas incorporées dans les virions. Lorsque le virus réussit à pénétrer la couche épithéliale basale, il infecte les cellules résidentes et, dans certains cas, réussit à échapper au système immunitaire en limitant sa réplication au niveau de la couche cellulaire suprabasale (Lowy et Schiller, 2006). Une infection par certains types de VPH peut mener au développement de lésions bénignes sous forme de verrues anogénitales ou non-génitales ou sous forme de papillomes de la bouche ou du larynx (Schiffman et Kjaer, 2003). Les types VPH-6 et VPH-11 sont responsables de plus de 90% des cas de verrues génitales chez l'homme et chez la femme (Hymel, 2006). De plus, une infection à long terme par certains types de VPH peut mener au développement de tumeurs malignes, incluant le cancer du col de l'utérus, de l'anus, de la vulve, du vagin et du pénis et de certains cancers oraux (Lowy et Schiller, 2006 ; Gillison et Lowy, 2004). Même si 15 types de VPH dit «à haut risque» peuvent mener au développement du cancer du col, une infection par le VPH-16 et/ou le VPH-18 y est associée dans 70% des cas. Afin de lutter contre ce type d'infection, plusieurs équipes tentèrent de développer un vaccin à base de PPV du VPH. La surexpression de la protéine L1 du VPH à l'aide de baculovirus entraîne la formation de PPV pratiquement identiques aux particules virales sauvages (McLemore, 2006). Des tests d'immunisation effectués chez le chimpanzé à l'aide de PPV du VPH de type 6, 11, 16 et 18 donnèrent des résultats impressionnants. En effet, la co-injection de ces PPV et de sels d'alun permit une forte induction d'Ac spécifiques et neutralisants. De plus, les chimpanzés immunisés démontrèrent une production spécifique d'IFN- γ et d'interleukine (IL) 5 et le développement d'une réponse cytotoxique spécifique à la protéine L1 du VPH (Palker *et al.*, 2001). Des essais cliniques tout aussi convaincants furent également effectués chez l'humain. C'est ainsi que Santé Canada approuva, en 2006, un tout nouveau vaccin quadrivalent à base de PPV du VPH. Commercialisé par Merck sous le nom de Gardasil[®] et prescrit pour les jeunes filles et les femmes entre 9 et 26 ans, ce vaccin est composé de PPV du VPH de type 6, 11, 16 et 18 (Garcea et Gissmann, 2004). Lorsqu'administré en présence de sels d'alun, le Gardasil[®] permet la production d'Ac spécifiques qui bloquent la progression de l'infection et prévient

l'apparition du cancer du col et de verrues génitales chez près de 100% des sujets vaccinés (Ljubojevic, 2006; Schmiedeskamp et Kockler, 2006). Toutefois, malgré l'efficacité du Gardasil[®], plusieurs données restent à être établies quant à la durée de protection, au degré de protection croisée contre les autres types de VPH et au niveau de l'efficacité du vaccin chez l'homme (Schiller et Lowy, 2006). Toujours dans la lutte contre le VPH, un autre vaccin à base de PPV du VPH devrait prochainement être approuvé par Santé Canada. Commercialisé par GlaxoSmithKline sous le nom de Cervarix[®], ce vaccin divalent diffère du Gardasil[®] en ciblant uniquement le VPH de types 16 et 18 et en étant administré avec du AS04, un adjuvant composé de «aluminum hydroxide plus 3-deacylated monophosphoryl lipid A» (Hymel, 2006). Une comparaison entre l'efficacité des deux vaccins reste à être effectuée.

Le virus de Norwalk est un virus entérique de la famille des Caliciviridae responsable d'épidémies mondiales de gastro-entérite (Estes *et al.*, 2000). La capside de ce virus est formée de 180 copies d'une protéine de 58 kDa et l'expression de cette protéine à l'aide du système baculovirus/cellules d'insecte permet la formation spontanée de PPV identiques aux particules sauvages. La forte immunogénicité des PPV du virus de Norwalk fut tout d'abord démontrée chez la souris. En effet, suite à une administration orale en absence d'adjuvant, les souris développèrent des taux élevés d'IgG sériques et d'IgA fécaux (Ball *et al.*, 1996). Des études cliniques de phase I démontrèrent également la forte immunogénicité des PPV du virus de Norwalk chez l'humain. Environ 85% des patients présentèrent une importante augmentation du taux d'IgG sériques spécifiques après l'administration orale d'une seule dose de 250 µg de PPV sans adjuvant (Ball *et al.*, 1999). De plus, environ 40% des patients présentèrent un taux appréciable d'IgA spécifiques au niveau des muqueuses orales et génitales. Finalement, une réponse lymphoproliférative spécifique caractérisée par la production d'IFN- γ pouvait également être détectée chez les patients immunisés (Tacket *et al.*, 2003).

L'immunogénicité des PPV du VHC, formées par la surexpression des protéines virales core, E1 et E2, fut d'abord démontrée par l'équipe de Lechmann *et al.* En effet, suite à l'administration, sans adjuvant, de cinq doses de 20 µg de PPV du VHC à des souris BALB/c, ces dernières développèrent de fortes réponses humorales. Une

analyse isotypique des Ac produits révéla la production d'Ac spécifiques à E1 et E2 et le développement d'une réponse de type T_H1 . Ces Ac pouvaient être détectés jusqu'à six mois après la dernière immunisation. La restimulation *in vitro* des cellules de rates issues des souris immunisées permis de mettre en évidence une prolifération cellulaire et une production d'IFN- γ en réponse à l'Ag core, démontrant ainsi la capacité de ces PPV à induire l'activation des LT $CD4^+$. De plus, des réponses cytotoxiques spécifiques à E2 ont pu être détectées chez les souris immunisées. Finalement, des immunisations menées avec des PPV du VHC dénaturées à la chaleur inhibent grandement le développement de ces réponses immunitaires, prouvant ainsi la nécessité de préserver l'intégrité structurale de ces PPV afin de maintenir leur immunogénicité. Il est également à noter que la co-administration d'adjuvant lors de ces immunisations n'influçait pas significativement l'ampleur des réponses immunitaires induites (Lechmann *et al.*, 2001). L'efficacité des même PPV a également été démontrée chez les babouins. L'administration de quatre doses de 100 μ g de PPV du VHC sans adjuvant permit une forte production d'Ac spécifiques à E1 et à E2. De plus, des Ac spécifiques à l'Ag core pouvaient être détectés après la quatrième dose. Chez tous les babouins immunisés, ces Ac persistaient dans le sérum pour plus de huit mois suivant le dernier rappel. Une production d'IFN- γ par les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) des primates immunisés pouvait être détectée, suggérant le développement d'une réponse de type T_H1 . D'ailleurs, cette production d'IFN- γ pouvait encore être détectée huit mois suivant le dernier rappel. Finalement, des réponses cellulaires cytotoxiques spécifiques pouvaient être détectées suite à l'administration de la quatrième dose de PPV (Jeong *et al.*, 2004).

La forte immunogénicité des PPV du VIH, formées par la surexpression de la protéine Pr55^{gag}, a été démontré à plusieurs reprises dans différents modèles animaux. Des réponses humorales spécifiques dirigées contre l'Ag Gag ont pu efficacement être induites chez des lapins et chez des macaques rhésus en présence ou non d'un adjuvant (Montefiori *et al.*, 2001; Wagner, 1997; Wagner *et al.*, 1996). De plus, une étude de Paliard *et al* mit en évidence le fort potentiel des PPV du VIH pour l'induction de réponses cytotoxiques spécifiques sans l'aide d'adjuvant. En effet, des macaques rhésus immunisés à l'aide de ces PPV développèrent un vaste répertoire de CTL spécifiques. En plus de rester en circulation pour une longue période (*i.e.* plus de

huit mois), ces CTL démontraient une spécificité contre divers épitopes de la polyprotéine Gag. Finalement, il est à noter que la co-administration de divers adjuvants lors de ces immunisations ne permettait pas d'augmenter significativement l'ampleur des réponses immunitaires induites (Paliard *et al.*, 2000).

Des tests d'immunisation sur des souris BALB/c à l'aide de PPV du rotavirus ont été effectués en présence ou non de divers adjuvants (*i.e.* toxine thermolabile d'*E. coli*, CpG). Six semaines suivant la réception de deux doses de 10 µg de PPV par voie rectale, les souris immunisées furent infectées par une souche murine du rotavirus. En absence d'adjuvant, les PPV du rotavirus ne démontrèrent aucune immunogénicité (*i.e.* aucune production d'Ac spécifiques) et ne permirent pas de protéger les souris contre l'infection. Cependant, la co-injection de PPV et de «heat-labeled toxins» permit l'induction d'IgA et d'IgG spécifiques permettant de protéger les souris contre l'infection. Finalement, même si l'utilisation de CpG lors des immunisations permet la production d'IgA et d'IgG spécifiques au rotavirus, elle ne permet pas le développement d'une réponse protectrice chez les souris immunisées (Parez *et al.*, 2006).

Finalement, plusieurs autres exemples de PPV ayant démontré leur potentiel à être utilisées comme immunogènes directs pour la lutte contre diverses maladies infectieuses ont été décrits (*e.g.* PPV du virus influenza, PPV du virus Ebola, PPV du virus de Marburg, PPV du poliovirus, PPV du coronavirus SARS) (Grgacic et Anderson, 2006).

4.4.2 Utilisation des pseudoparticules virales comme plateforme vaccinale

En plus d'être utilisées comme immunogènes directs, les PPV peuvent servir de plateforme vaccinale pour la présentation d'épitopes de microorganismes étrangers au système immunitaire. En effet, il est possible d'exploiter la forte immunogénicité des PPV afin d'induire des réponses humorales et/ou cellulaires contre des peptides étrangers. L'ajout d'épitopes étrangers à la surface des PPV peut se faire selon deux techniques. La première consiste à modifier la séquence du ou des gènes codant pour la ou les protéines nécessaires à la formation des PPV en y ajoutant la séquence

codant pour l'Ag protéique d'intérêt. En choisissant un site d'insertion approprié qui n'interfère pas avec le repliement des particules, la protéine de fusion résultante conservera sa capacité à former des PPV une fois synthétisée (Grgacic et Anderson, 2006). La deuxième technique consiste quant à elle à conjuguer chimiquement l'Ag vaccinal à des PPV pré-formées. L'avantage majeur de cette technique est qu'elle rend possible la conjugaison d'Ag non-protéique à la surface des PPV. D'ailleurs, cette technique a été utilisée avec succès pour le couplage de l'haptène nicotine à la surface de PPV du bactériophage Q β et cette construction fait présentement l'objet d'études cliniques prometteuses dans le but de développer un vaccin anti-nicotine (Maurer et Bachmann, 2006). Finalement, la longueur des peptides pouvant être insérés sur un type de PPV donné est plutôt limitée. En effet, plus les peptides à insérer sont longs, plus les chances de rencontrer des problèmes d'encombrement stérique limitant ou inhibant le repliement adéquat des PPV sont grandes. Des études structurales approfondies sur les PPV (*e.g.* résonance magnétique nucléaire, dichroïsme circulaire, microscopie électronique, analyses mutationnelles) sont donc requises afin d'effectuer l'insertion efficace d'épitopes à la surface des PPV (Johnson et Chiu, 2000).

Au cours des dix dernières années, l'équipe de Leclerc *et al* publia une multitude d'études portant sur l'efficacité des PPV du parvovirus porcin comme plateforme vaccinale. Ces PPV, produites à l'aide de baculovirus recombinants, sont formées par l'auto-assemblage de la CP virale VP2 (Casal, Rueda et Hurtado, 1999). Les études structurales menées sur ces particules ont permis d'identifier deux principaux sites d'insertion d'épitopes B et T. Tout d'abord, le «loop 2» de VP2 est propice à l'insertion d'épitopes B et permet l'exposition de ces épitopes à la surface des PPV. D'autre part, la région N-terminale de VP2 peut être utilisée efficacement pour l'insertion d'épitopes T CD4⁺ et CD8⁺. Les épitopes insérés au niveau de la région N-terminale se retrouvent d'ailleurs à l'intérieur des particules (Casal, 1999). Plusieurs tests d'immunisation menés avec des PPV du parvovirus porcin exposant divers épitopes ont été effectués. Par exemple la séquence 118-132 de la nucléoprotéine du LCMV, qui contient à la fois un épitope T CD4⁺ et CD8⁺, a été insérée avec succès sur les PPV du parvovirus porcin. L'injection intrapéritonéale d'une seule dose de 10 μ g de cette construction, sans adjuvant, à des souris BALB/c permet l'induction d'une

forte réponse T CD8⁺ cytotoxique spécifique au LCMV (Sedlik *et al.*, 2000; Lo-Man *et al.*, 1998; Sedlik *et al.*, 1997). Cette réponse cytotoxique était persistante chez les souris immunisées puisque des CTL spécifiques pouvaient encore être détectés neuf mois suivant l'immunisation (Sedlik *et al.*, 1997). De plus, une forte réponse proliférative régulée par les LT CD4⁺ fut également détectée, démontrant la capacité de la plateforme à entraîner l'activation des LT CD4⁺. Suite à la restimulation *in vitro* de cellules issues des ganglions lymphatiques des souris immunisées à l'aide de ces PPV, des quantités importantes d'IFN- γ et d'IL-2 étaient produites, indiquant le développement d'une réponse cellulaire de type T_{H1} (Lo-Man *et al.*, 1998). Finalement, l'utilisation de ces PPV confère aux souris immunisées une protection totale contre une infection normalement mortelle par le LCMV (Sedlik *et al.*, 2000). Des PPV du parvovirus porcin présentant l'épitope B C3:B du poliovirus ont également été produites. La production d'Ac spécifiques chez des souris BALB/c immunisées par voie intrapéritonéale et en présence ou non d'adjuvant incomplet de Freund fut analysée. Les souris immunisées avec ou sans adjuvant présentèrent toutes de hauts titres d'Ac spécifiques à la plateforme vaccinale. Toutefois, les titres d'Ac spécifiques à C3:B étaient faibles les souris immunisées en absence d'adjuvant et élevés pour les souris immunisées en présence d'adjuvant (Rueda *et al.*, 1999).

Des PPV formées de l'Ag core du VHB ainsi que des PPV du bactériophage Q β , sont également efficaces dans la présentation d'épitopes B étrangers au système immunitaire. En effet, l'équipe de Zinkernagel *et al* réussit à exposer, à la surface de ces deux types de PPV, l'épitope B immunodominant du domaine pre-S1 du HBsAg. L'administration, par voie intraveineuse, de 50 μ g de ces constructions suivi d'une dose de rappel 13 jours suivant la première injection, permit l'induction, chez des souris C57BL/6, d'IgM et d'IgG spécifiques aux PPV et à l'épitope B étranger. La même étude permit également de déterminer que cette réponse humorale était induite indépendamment de l'aide des LT CD4⁺ (Fehr *et al.*, 1998). Une autre étude effectuée avec les PPV formées de l'Ag core du VHB exposant cette fois-ci l'épitope NS3 du VHC a démontré la capacité d'induire, chez la souris, une forte production d'IgG2a et une plus faible production d'IgG1 spécifiques au VHB et à NS3 (Mihailova *et al.*, 2006). Les PPV formées de l'Ag core du VHB peuvent également être utilisées pour l'induction de réponses cellulaires contre des épitopes T étrangers. Ceci a été

démontré en exposant l'épitope p33 du LCMV à la surface de ces PPV. Tout d'abord, l'immunisation de souris à l'aide de cette construction permet l'activation de LT CD8⁺ p33-spécifiques et l'induction de réponses cytotoxiques (Storni *et al.*, 2002). De plus, lorsqu'elles sont injectées en présence d'adjuvant (*i.e.* CpG), ces PPV permettent l'induction de réponses cellulaires protectrices contre le LCMV (Storni *et al.*, 2004)

Des PPV du virus de l'hépatite E (VHE) ont également été utilisées avec succès comme plateforme vaccinale. En effet, l'insertion d'un épitope B «tag» d'une longueur de 11 acides aminés à l'extrémité c-terminale de la protéine ORF2 du VHE ne nuit pas à l'assemblage des protéines en PPV. Les fluides intestinaux de souris BALB/c immunisées par voie orale quatre fois, à deux semaines d'intervalle, avec 50 µg de ces PPV sans adjuvant présentent des taux appréciables d'IgG et d'IgA spécifiques au VHE et à l'épitope B «tag» (Niikura *et al.*, 2002).

Des PPV issues de certains virus de plante ont également été utilisées efficacement comme plateforme vaccinale pour la présentation d'épitopes de virus étrangers. Par exemple, des PPV du virus X de la pomme de terre exposant l'épitope gp41 du VIH permettent l'induction d'IgG et d'IgA spécifiques à gp41 lorsqu'elles sont administrées à des souris par voie intrapéritonéale ou intranasale (Marusic *et al.*, 2001). D'autre part, l'immunisation de souris à l'aide de PPV du «Johnson grass mosaic virus» présentant un épitope B du virus de l'encéphalite japonaise permet, via la production d'Ac neutralisants, de protéger ces souris contre une infection normalement mortelle par ce virus (Saini et Vрати, 2003). D'autres exemples de PPV issues de virus de plantes suscitant de l'intérêt pour la présentation d'épitopes de virus étrangers dans un contexte vaccinal sont les PPV du «cowpea mosaic virus», du «tobacco mosaic virus», du «alfalfa mosaic virus», du «tomato bushy stunt virus», du «Zucchini yellow mosaic virus» et du «Plum pox virus» (Denis *et al.*, 2007; Canizares, Lomonossoff et Nicholson, 2005; Natilla *et al.*, 2004).

Finalement, l'utilisation de PPV comme plateforme vaccinale induit nécessairement la production d'Ac dirigés spécifiquement contre la plateforme. L'effet de ces Ac sur l'efficacité d'une plateforme vaccinale donnée est encore source de controverse. Certaines études ont démontré que la production d'Ac spécifiques à la plateforme nuit

à l'efficacité des immunisations en bloquant, par exemple, la capture des PPV par certains récepteurs cellulaires. Cet effet fut d'ailleurs démontré lors d'une étude sur l'efficacité des PPV du VPH pour la présentation de peptides étrangers (Da Silva, Schiller et Kast, 2003). Néanmoins, une étude effectuée à l'aide de PPV formées de l'Ag core du VHB et exposant des épitopes étrangers semble démontrer que les Ac spécifiques produits contre la plateforme vaccinale n'affectent en rien les réponses immunitaires induites contre l'épitope étranger (Ruedl *et al.*, 2005). Les auteurs suggèrent même que ces Ac, en formant des complexes immuns avec les PPV, facilitent probablement leur capture par les CPA qui expriment des récepteurs des immunoglobulines (FcR).

4.4.3 Utilisation des pseudoparticules virales pour la livraison de molécules

Certaines caractéristiques naturelles des capsides virales leur permettent de contenir et de protéger le matériel génétique viral. En effet, des domaines polypeptidiques orientés vers l'intérieur des particules virales neutralisent la charge négative globale du squelette phosphate des acides nucléiques, établissant ainsi des interactions ioniques stables et de haute affinité avec le matériel génétique (Garcea et Gissmann, 2004). Comme les PPV conservent la même capacité d'encapsulation et le même tropisme cellulaire que les virus d'origine, certains groupes tentent de les exploiter afin de mettre au point de nouveaux systèmes de livraison de molécules et de gènes. (Petry *et al.*, 2003). Par exemple, cette approche pourrait permettre de livrer, à un type cellulaire précis, du matériel génétique codant pour des gènes d'intérêt thérapeutique ou des molécules possédant des propriétés pharmacologiques (Garcea et Gissmann, 2004). Jusqu'à maintenant, deux stratégies sont utilisées pour l'inclusion de molécules ou d'acides nucléiques à l'intérieur des PPV. La première technique consiste à effectuer l'assemblage *in vitro* des PPV en présence de la molécule d'intérêt afin que cette dernière puisse se retrouver emprisonnée, de façon aléatoire, à l'intérieur des PPV (Henke *et al.*, 2000). La deuxième technique est de faire subir un choc osmotique à des PPV déjà formées en les diluant dans un tampon de faible force ionique. Ceci aurait pour effet d'augmenter l'espace entre les sous-unités constituant les PPV afin d'y faire pénétrer la molécule d'intérêt (Garcea et Gissmann, 2004).

5. Rôle des cellules dendritiques au niveau du système immunitaire

À la fin du 19^e siècle, suite à l'observation de cellules similaires à des neurones, Paul Langerhans décrit pour la première fois un type de DC (*i.e.* cellules de Langerhans) dans des échantillons de peau humaine marquée à l'or. Les travaux de Langerhans ne permirent toutefois pas d'associer une fonction précise à ces cellules (Becker, 2003). Il fallu attendre la publication des travaux de Steinman et Cohn, de 1973 à 1979, pour voir naître le terme «cellule dendritique» et pour mieux comprendre le rôle et l'importance de ces cellules dans le système immunitaire (Trinchieri, 2007).

La prochaine partie de cette revue de littérature a pour but de présenter les divers types de DC, leurs principales caractéristiques, et leur rôle dans l'induction des réponses immunitaires, particulièrement contre les PPV. Comme nos études ont été effectuées chez la souris, une attention particulière sera accordée aux DC murines.

5.1 Caractéristiques générales des cellules dendritiques

Les DC sont un type de CPA formant une population hétérogène de leucocytes migratoires (Ardavin, 2003). Elles sont retrouvées dans les organes lymphoïdes primaires (*e.g.* thymus) et secondaires (*e.g.* rate, ganglions lymphatiques, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) et dans pratiquement tous les tissus périphériques non-lymphoïdes (sauf le cerveau et les testicules) (Lipscomb et Masten, 2002). En général, les DC présentent de longs prolongements membranaires (*i.e.* dendrites) leur donnant un aspect étoilé. L'expression de divers niveaux d'intégrine CD11c et de complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) à leur surface est une caractéristique commune à tous les types de DC (Itano et Jenkins, 2003). Au niveau fonctionnel, les DC jouent plusieurs rôles clés dans le système immunitaire inné et adaptatif. Grâce à l'expression de récepteurs associés au système immunitaire inné, elles peuvent détecter rapidement les moindres signes d'infections afin de mettre en branle, tout aussi rapidement, les mécanismes de défense innés (Pulendran, 2005). De plus, les DC sont essentielles dans l'induction et la régulation des réponses immunitaires adaptatives, particulièrement celles impliquant les LT. D'ailleurs, les DC sont les seules CPA à être équipées pour activer efficacement les LT naïfs, entraînant ainsi, de façon Ag-spécifique, leur expansion et leur

différentiation en cellules effectrices (Heath *et al.*, 2004). Un nombre grandissant d'études démontrent également l'importance des DC dans l'induction et le maintien des mécanismes de tolérance (Tan et O'Neill, 2005).

Malgré les nombreuses études effectuées dans le domaine, l'origine et les mécanismes de développement des divers types de DC sont encore source d'incertitude et de controverse. Néanmoins, il est généralement reconnu que les DC sont issues de précurseurs des DC (pDC) dérivés des cellules souches CD34⁺ de la moelle osseuse, de PBMC et de cellules du sang de cordon (Zou et Tam, 2002; Robinson, Saraya et Reid, 1998). Pendant longtemps, les études chez la souris semblaient démontrer l'existence de deux principaux types de pDC. Il avait été établi que toutes les DC CD8⁺ provenaient de pDC d'origine lymphoïde tandis que toutes les DC CD8⁻ dérivait de pDC d'origine myéloïde. Toutefois, de nouvelles études semblent démontrer l'existence d'une très grande plasticité développementale pour ces deux types de pDC, permettant à chacun d'entre eux de produire toutes les sous-populations de DC retrouvées dans les organes lymphoïdes murins (Shortman et Liu, 2002). D'ailleurs, comme il en sera discuté dans la prochaine section, les chercheurs ont jusqu'à maintenant caractérisé six sous-populations de DC phénotypiquement distinctes. Chacune de ces sous-populations peut être retrouvée sous deux formes fonctionnellement différentes, soit la forme immature et la forme mature.

Une fois dans la circulation sanguine, les pDC infiltrent les organes lymphoïdes et les divers tissus de l'organisme pour y devenir des DC immatures pouvant échantillonner l'environnement antigénique local. Lors de la capture d'Ag et de la réception de signaux de danger, les DC immatures entreprennent un processus de maturation complexe, quittent les tissus périphériques, et débutent leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires pour y induire les réponses immunitaires (Lipscomb et Masten, 2002). Tous les processus migratoires des DC (*i.e.* du sang ou de la lymphe vers les tissus périphériques, des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes) sont orchestrés par la production de molécules chimiotactiques (*e.g.* chimiokines). Au niveau de tissus périphériques, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les leucocytes produisent des chimiokines inflammatoires qui attirent les DC en périphérie. Pour leur part, les cellules endothéliales, les cellules stromales et les leucocytes des organes lymphoïdes secondaires produisent des chimiokines

lymphoïdes qui régulent les rencontres entre les DC et les LT ou les LB (Lipscomb et Masten, 2002; Cyster, 1999). La capacité des DC à répondre aux diverses chimiokines est grandement influencée par leur niveau de maturité. En effet, au cours de leur maturation, les DC perdent peu à peu leur capacité à répondre aux chimiokines inflammatoires mais augmentent considérablement leur capacité à répondre aux chimiokines lymphoïdes (Allavena *et al.*, 2000). D'autre part, selon le compartiment anatomique dans lequel les DC captent les Ag, le site d'induction des réponses immunitaires peut varier. En effet, chacun des organes lymphoïdes secondaires assure la surveillance de différentes parties de l'organisme. Ainsi, les DC ayant capté des Ag sanguins se dirigeront dans la rate tandis que les DC ayant capté des Ag dans les autres tissus périphériques migreront dans les ganglions lymphatiques desservant la région anatomique concernée (Heath *et al.*, 2004).

5.2 Classification des cellules dendritiques

La classification des DC peut être faite selon divers critères phénotypiques, fonctionnels ou anatomiques. Au niveau phénotypique, divers marqueurs sont utilisés afin de ségréguer les divers types de DC (*e.g.* CD4, CD8, CD11b, CD11c, B220, DEC-205, langérine) (Valladeau et Saeland, 2005). Selon l'expression de ces marqueurs, les DC murines sont généralement classées en six sous-populations phénotypiquement distinctes.

Les DC sont tout d'abord divisées en DC plasmacytoïdes (DC B220⁺) et en DC dites conventionnelles. Les DC B220⁺ diffèrent des DC conventionnelles par l'expression des molécules CD45R (B220) et Ly6C et par une plus faible expression de CD11c. Lors de l'activation des DC B220⁺, il se produit une augmentation de leur viabilité en culture et une régulation à la hausse du niveau d'expression des CMH-II et des molécules co-stimulatrices. De plus, les DC B220⁺ activés expriment de plus hauts niveaux de CD8 α (O'Keeffe *et al.*, 2002; Nakano, Yanagita et Gunn, 2001). Chez la souris, les DC B220⁺ de la rate sont surtout regroupées au niveau des manchons lymphoïdes périartériolaires de la pulpe blanche. Toutefois, elles sont également retrouvées dispersées dans la zone marginale et la pulpe rouge. En condition d'inflammation, les DC B220⁺ forment des amas dans la zone marginale et les régions

riches en LT de la rate où sont recrutées dans le ganglion lymphatique correspondant (Colonna, Trinchieri et Liu, 2004). Au niveau fonctionnel, les DC B220⁺ sont principalement impliquées dans les réponses antivirales (Asselin-Paturel *et al.*, 2001). En réponse à l'ARN ou à l'ADN viral, elles produisent de grandes quantités d'IFN de type I et des cytokines IL-6 et IL-12, ce qui assure une résistance antivirale rapide, une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK et une production d'IFN- γ . La production d'IFN de type I facilite également l'activation des LT, augmentent leur durée de vie, et favorise le développement de réponses cytotoxiques. Les IFN de type I et l'IL-6 permettent aussi aux DC B220⁺ d'exercer un contrôle sur les réponses humorales en favorisant la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines γ (IgG) (Colonna, Trinchieri et Liu, 2004). Les DC B220⁺ produisent également des chimiokines qui favorisent le recrutement de LT activés (Penna *et al.*, 2002). Notons finalement que les DC B220⁺ activées sont moins efficaces que les DC conventionnelles dans la présentation d'Ag sur les CMH et dans l'induction des réponses cellulaires spécifiques (Colonna, Trinchieri et Liu, 2004).

Cinq autres sous-populations de DC, dites conventionnelles, sont retrouvées chez la souris. La rate contient trois de ces sous-populations, principalement classées selon l'expression des molécules CD4 et CD8 α (Kamath *et al.*, 2000). Ces trois sous-populations, qui dérivent de pDC du sang, incluent les DC CD4⁺CD8 α ⁻DEC205⁻CD11b⁺, les DC CD4⁻CD8 α ⁺DEC205^{lo}CD11b⁻ et les DC CD4⁻CD8 α ⁻DEC205^{lo}CD11b⁻ (Lipscomb et Masten, 2002). Au stade immature, ces trois types de DC expriment un niveau basal appréciable des molécules CD40, CD80, CD86 et CMH-II et sont très efficaces pour la capture d'Ag particuliers par phagocytose. Dans la rate, les DC CD4⁺CD8 α ⁻DEC205⁻CD11b⁺ et CD4⁻CD8 α ⁻DEC205^{lo}CD11b⁻ sont concentrées au niveau des zones marginales tandis que les DC CD4⁻CD8 α ⁺DEC205^{lo}CD11b⁻ sont surtout retrouvées dans les régions riches en LT. Cependant, suite à la rencontre d'un signal de danger, les DC CD4⁺CD8 α ⁻DEC205⁻CD11b⁺ et CD4⁻CD8 α ⁻DEC205^{lo}CD11b⁻ quittent rapidement les zones marginales pour se rendre dans les régions de LT (Shortman et Liu, 2002).

En plus des trois sous-populations de DC conventionnelles précédemment décrites, les ganglions lymphatiques contiennent deux autres sous-populations issues de pDC

dérivés des tissus. Les DC dermiques (provenant de la peau) ou interstitielles (provenant d'autres tissus), représentent l'une de ces sous-populations et possèdent le phénotype $CD4^+CD8\alpha^-CD11b^+CD205^{int}$. La dernière sous-population, appelée cellules de Langerhans, est quant à elle retrouvée uniquement dans les ganglions lymphatiques drainant la peau. En plus de leur phénotype $CD4^+CD8\alpha^{lo}CD11b^+CD205^{hi}$, les cellules de Langerhans se distinguent par leur plus forte expression basale de CMH-II et des molécules CD40, CD80 et CD86 (Shortman et Liu, 2002).

5.3 Maturation des cellules dendritiques

Les DC ne peuvent exercer leur plein potentiel immunostimulant de façon constitutive. Elles doivent préalablement acquérir un phénotype mature via la réception de signaux activateurs. Le passage au stade mature induit de profonds changements au niveau du profil phénotypique, migratoire et fonctionnel des DC, permettant ainsi le développement de réponses cellulaires et humorales optimales. Pour cette raison, plusieurs nouvelles stratégies vaccinales tentent de cibler les DC et d'induire leur maturation afin de maximiser l'efficacité des vaccins. La présente section a pour but d'énumérer les principales caractéristiques des DC immatures et matures, de présenter les étapes du processus de maturation, et de définir les principaux signaux et récepteurs impliqués dans l'induction de la maturation des DC.

5.3.1 Caractéristiques des cellules dendritiques immatures

En absence de réponses inflammatoires, les DC se retrouvent sous la forme immature. Elles agissent alors comme sentinelles dans l'organisme, échantillonnant constamment leur environnement antigénique (Guermonprez *et al.*, 2002). L'expression de divers récepteurs permet aux DC immatures d'être recrutées aux sites inflammatoires afin d'y capter des Ag. Par exemple, l'expression des récepteurs de chimiokines de type CC (*e.g.* CCR1, CCR2, CCR5) et CXC (*e.g.* CXCR1) permet aux DC immatures de répondre efficacement à la production de certaines chimiokines inflammatoires, comme la «macrophage inflammatory protein-1 α » (MIP-1 α), la «monocyte chemotactic protein-1» (MCP-1), et la «regulated on activation normal T

cell expressed and secreted chemokine» (RANTES). De plus, les DC immatures expriment des récepteurs pour certains produits du clivage de protéines bactériennes (*e.g.* «formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine» (fMLP)), pour des produits du système du complément (*e.g.* la composante C5a), et pour certains métabolites lipidiques (*e.g.* «platelet activating factor» (PAF)) (Lipscomb et Masten, 2002). Les DC immatures sont également des productrices de chimiokines inflammatoires (*e.g.* MIP-1 α , IL-8, RANTES, MCP-1). Cette production de chimiokines exerce à la fois un effet autocrine et paracrine. De façon autocrine, elle régule l'expression de plusieurs récepteurs impliqués dans la reconnaissance de molécules chimioattractantes. De façon paracrine, les chimiokines inflammatoires produites par les DC permettent le maintien des processus inflammatoires en induisant le recrutement de monocytes, de DC immatures et d'autres cellules inflammatoires au site antigénique (Tang et Cyster, 1999).

Une fois rendu au site d'inflammation, les DC immatures utilisent divers mécanismes de capture pour échantillonner les Ag (Villadangos et Heath, 2005). Par exemple, elles peuvent capter des Ag solubles par macropinocytose, des protéines ou des complexes immuns par endocytose médiée par des récepteurs ou des cellules entières par phagocytose (Tan et O'Neill, 2005; Steinman *et al.*, 1999). Malgré cette grande aptitude à échantillonner les Ag, les DC immatures sont peu efficaces pour présenter ces Ag dans le contexte du CMH et pour activer les LT naïfs. En effet, elles exposent des taux relativement faibles de complexes peptide-CMH (p-CMH) et de molécules de costimulation (CD40, CD80 et CD86) à leur surface, ce qui les empêche d'établir les interactions nécessaires à l'activation des LT naïfs (Heath et Villadangos, 2005; Guermonprez *et al.*, 2002). Finalement, les DC immatures sont depuis longtemps associées à l'induction et la régulation des mécanismes de tolérance (Tan et O'Neill, 2005; Hawiger *et al.*, 2001). Cependant, de plus en plus d'études démontrent que cette règle n'est pas aussi simple. En effet, certaines DC matures semblent pouvoir induire et contrôler la tolérance, notamment via l'activation de LT régulateurs (LT_{reg}) (Tan et O'Neill, 2005; Heath et Villadangos, 2005).

5.3.2 Caractéristiques des cellules dendritiques matures

Les DC matures régulent à la baisse l'expression de leurs récepteurs antigéniques et leur capacité de phagocytose et d'endocytose, ce qui explique leur difficulté à capter de nouveaux Ag (Tan et O'Neill, 2005; Sallusto *et al.*, 1995). Elles augmentent toutefois considérablement les mécanismes de dégradation des Ag internalisés et de présentation des peptides antigéniques dans le contexte du CMH. Elles exposent donc un nombre de plus en plus grand de complexes p-CMH à leur surface, favorisant ainsi le début des interactions avec les LT de même spécificité antigénique et la transmission de signaux activateurs à ces LT.

Afin d'établir des interactions avec les LT, les DC doivent quitter la périphérie et être relocalisées au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Cette relocalisation repose sur une modification du profil d'expression des récepteurs de chimiokines (Veerawamy *et al.*, 2003). Ceci est caractérisé par une régulation à la baisse de l'expression des récepteurs de chimiokines inflammatoires et une augmentation de l'expression des récepteurs des chimiokines lymphoïdes. Grâce à sa capacité à reconnaître la «secondary lymphoid tissue chemokine» (SLC) et la «Epstein-Barr virus-induced ligand chemokine» (ELC), le récepteur CCR7 joue un rôle crucial dans le processus de relocalisation des DC. Sous l'influence des SLC produites par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques, le récepteur CCR7 permet tout d'abord aux DC matures de migrer des tissus périphériques aux vaisseaux lymphatiques afférents. Par la suite, les DC sont dirigées vers les organes lymphoïdes secondaires grâce à la production de SLC et de ELC par les cellules stromales et par d'autres DC déjà présentes dans les régions T des organes lymphoïdes secondaires (Lipscomb et Masten, 2002). Les DC matures expriment également le récepteur de la composante C5a du complément. Comme les LB naïfs présents dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires sont une source importante de C5a, certains chercheurs ont proposé que l'expression du récepteur de C5a permettrait de guider les DC vers ces follicules pour participer aux réponses humorales (Yang *et al.*, 2000).

Finalement, la maturation des DC permet de réguler à la hausse l'expression des molécules costimulatrices CD40, CD80 et CD86 ainsi que de plusieurs molécules d'adhésion (*e.g.* CD2, CD11a, CD54, CD58, intégrines β 1 et β 2). Les DC matures

débutent également l'expression de diverses chimiokines lymphoïdes, comme DC-CK1, qui possèdent la capacité d'attirer préférentiellement les LT naïfs (Quah et O'Neill, 2005). L'ensemble de ces changements a pour but de favoriser et de maintenir les interactions avec les LT spécifiques afin d'optimiser le développement des réponses immunitaires.

5.3.3 Étapes du processus de maturation des cellules dendritiques

Malgré son déroulement transitoire et sa grande complexité, le processus de maturation des DC peut être divisé en deux principales étapes. La première étape se déroule au site d'entrée de l'Ag et implique la détection, par des récepteurs du système immunitaire inné, de signaux de danger dont la présence reflète habituellement le déroulement d'une infection (Kapsenberg, 2003). Cette étape, d'une importance cruciale pour la mise en place des mécanismes de défense innés et pour le passage à l'immunité adaptative, sera abordée plus en détail dans la prochaine section.

La deuxième étape de la maturation des DC survient suite à leur migration dans les régions T des organes lymphoïdes secondaires. Elle repose sur la réception de signaux transmis lors de l'établissement de contacts Ag-spécifiques entre les DC et les LT CD4⁺ (Guermontprez *et al.*, 2002). Lors de l'activation des LT CD4⁺ par les DC matures, les LT augmentent leur expression de CD40L qui peut à son tour interagir avec CD40 à la surface des DC. Cette interaction transmet un signal essentiel permettant aux DC d'amplifier leur expression de molécules costimulatrices et de compléter leur processus de maturation. Les DC pourront alors activer efficacement les LT CD8⁺ et produire divers facteurs solubles et membranaires permettant de polariser les réponses T CD4⁺ (Kapsenberg, 2003). L'aide apportée par les LT CD4⁺ par rapport à la maturation et à l'activité des DC peut également se faire de façon CD40-indépendante. Par exemple, l'interaction entre les molécules Fas et OX40L à la surface des DC et les molécules FasL et OX40 à la surface des LT peut induire une maturation fonctionnelle des DC. De plus, l'activation, par les LT, de certains récepteurs de la famille TNF-R (*e.g.* RANK/TRANCE-L) à la surface des DC permettrait de prolonger la survie des DC dans les organes lymphoïdes secondaires et assurerait le maintien de l'expansion des LT spécifiques (Guermontprez *et al.*, 2002)

Même si les deux étapes décrites ci-dessus, sont sans aucun doute les plus importantes dans le processus de maturation des DC, notons que de récentes études semblent démontrer que les LB joueraient également un rôle dans la modulation du processus de maturation des DC via la production de cytokines, de chimiokines, d'Ac et de complexes immuns (Bayry *et al.*, 2005). Ceci est rendu possible grâce à l'expression de FcR à la surface des DC. La fixation d'Ig ou de complexes immuns aux FcR déclenche la phosphorylation des motifs ITAM de la région cytoplasmique du FcR, provoquant ainsi une cascade de signalisation menant à la maturation des DC (Regnault *et al.*, 1999).

5.3.4 Détection de signaux de danger par les cellules dendritiques

Les signaux de danger, terme popularisé par Polly Matzinger, peuvent être d'origine exogène ou endogène et sont détectés par des récepteurs reconnaissant les pathogènes (PRR). En exprimant divers types de PRR, les DC font partie intégrante du système immunitaire inné et peuvent efficacement distinguer les molécules du Soi des molécules du non-Soi (Azuma, 2006). Lors de la reconnaissance de signaux de danger via les PRR, le déclenchement de signaux intracellulaires permet l'activation de certains facteurs de transcription et induit le début du processus de maturation des DC, étape cruciale au passage à l'immunité adaptative (Gallucci et Matzinger, 2001; Matzinger, 1998). Il est également reconnu que certains PRR sont impliqués dans les processus d'opsonisation d'Ag, d'endocytose, d'activation du complément, d'activation des voies de signalisation des réponses inflammatoires, d'induction de l'apoptose et d'activation de la coagulation (Kapsenberg, 2003; Janeway et Medzhitov, 2002).

La réception de signaux de danger exogènes implique la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP), c'est-à-dire de structures antigéniques conservées exprimées par des virus, des bactéries, des mycètes et des protozoaires (Kapsenberg, 2003). L'exemple classique d'un signal de danger exogène est le LPS bactérien qui, via sa détection par le TLR-4, induit efficacement la maturation des DC. La réception de signaux de danger endogènes est pour sa part un processus PAMP-indépendants qui implique la reconnaissance de molécules dérivées des tissus de l'hôte et relâchées ou exprimées en situation de dommage ou de mort cellulaire

anormale (Gallucci et Matzinger, 2001). En plus d'alerter les cellules du système immunitaire inné de la présence d'une infection ou d'un stress cellulaire, les signaux de danger endogènes peuvent également induire la maturation des DC (Matzinger, 1994). Par exemple, les DC peuvent être alertées de la présence d'un danger via la détection de médiateurs inflammatoires (*e.g.* TNF- α , IL-1 β , PGE-2) dont la production est déclenchée par des pathogènes. De plus, lors de dommages tissulaires, il se produit une libération d'IL-1 et d'hyaluronates qui exerce également un effet positif sur le niveau de maturation des DC. L'expression de récepteurs des composantes du complément permet également aux DC d'acquérir des signaux de danger endogènes. Les protéines de choc thermique (HSP) sont un autre exemple de signaux de danger endogènes pouvant être détectés par les DC. Les HSP agissent d'ailleurs en chaperonnes pour la présentation de peptides antigéniques sur les CMH-I et CMH-II. En liant les HSP, l'affinité de certains peptides pour les CMH augmente considérablement, ce qui facilite le développement des réponses immunes (McLellan, Brocker et Kampgen, 2000). Fait important, seules les cellules nécrotiques (et non les cellules apoptotiques) induisent la maturation des DC. Cette observation illustre la capacité des DC à discriminer une mort cellulaire anormale d'une mort cellulaire normale (Gallucci, Lolkema et Matzinger, 1999). Finalement, en plus d'induire la maturation des DC, les signaux de danger endogènes peuvent provoquer une activation plaquettaire, une production de radicaux libres, de cytokines et de chimiokines, une modification de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules immunitaires et une augmentation du recrutement de ces dernières (McLellan, Brocker et Kampgen, 2000).

Parmi tous les PRR, les récepteurs de la famille «Toll» (TLR) sont sans aucun doute les plus étudiés et les mieux caractérisés. Ils sont responsables de la liaison d'un répertoire restreint de ligands (*i.e.* lipides, acides nucléiques, protéines) associés à des microorganismes pathogènes ou à certains constituants endogènes (*e.g.* cellules nécrotiques, HSP, composant de la matrice extracellulaire) (Tipping, 2006). Jusqu'à maintenant, 11 et 13 différents TLR ont respectivement été identifiés chez l'humain et chez la souris. En plus d'être conservés entre l'homme et la souris, les TLR-1 à TLR-9 sont sans aucun doute les mieux caractérisés et assurent la détection de divers signaux de danger associés à la présence d'une infection (Azuma, 2006; Takeda et

Akira, 2005). Par exemple, alors que le TLR-3 et le TLR-7 reconnaissent respectivement les ARN double brin (dbARN) et simple brin (sbARN) d'origine virale, le TLR-9 lie efficacement les ADN bactériens ou viraux contenant des CpG (Takeda et Akira, 2005; Alexopoulou *et al.*, 2001; Hemmi *et al.*, 2000). D'autre part, les LPS bactériens et la flagelline issues des flagelles bactériens sont respectivement reconnus par le TLR-4 et le TLR-5 (Re et Strominger, 2004; Hayashi *et al.*, 2001). Alors que la plupart des TLR sont exprimés au niveau de la surface cellulaire, d'autres (*i.e.* TLR-3, TLR-7, TLR-8 et TLR-9) sont retrouvés dans des compartiments intracellulaires de la voie endosomale (Takeda et Akira, 2005; Akira et Takeda, 2004). Une grande variété de cellules d'origine lymphoïde et non-lymphoïde expriment au moins un type de TLR (Azuma, 2006; Boehme et Compton, 2004). Les cellules phagocytaires (*i.e.* DC, M Φ , neutrophiles) sont cependant les cellules exprimant le plus grand nombre et la plus grande variété de TLR. Ceci représente un avantage certain pour le système immunitaire car ces cellules, qui sont à l'origine des mécanismes de défense innés et de l'initiation des réponses adaptatives, peuvent capter un Ag et recevoir un signal activateur simultanément (Boehme et Compton, 2004).

L'expression des TLR et la réception de signaux activateurs via les TLR influence considérablement l'activité des DC et le déroulement des réponses immunitaires. Tout d'abord, les TLR peuvent être impliqués dans la capture d'Ag par endocytose (West *et al.*, 2004) et dans le transfert de ces Ag dans les voies de présentation croisée (Datta et Raz, 2005). L'activation des TLR mène à la production de cytokines et de chimiokines qui permettent d'instaurer un état inflammatoire et qui influencent le développement des réponses immunitaires adaptatives (Azuma, 2006). D'autre part, en reconnaissant du matériel génétique d'origine virale, les TLR-7 et TLR-9 exprimés au niveau intracellulaire par les DC B220⁺ permettent d'établir un état antiviral en induisant la production d'IFN de type I (Iwasaki et Medzhitov, 2004). Il est à noter que les cytokines induites par les ligands d'un TLR donné peuvent varier selon le type de DC en jeu (Hemmi *et al.*, 2003). La signalisation via les TLR joue également un rôle crucial dans le processus de maturation des DC et dans le passage de l'immunité innée à l'immunité adaptative. En effet, suite à l'activation d'un TLR donné, il se produit une augmentation rapide de l'expression des molécules costimulatrices à la

surface des DC. Par la suite, comme les signaux transmis par les TLR permettent la modulation de l'expression de certains récepteurs de chimiokines à la surface des DC, ces dernières peuvent migrer vers les ganglions lymphatiques régionaux, lieux où les Ag pourront être présentés dans le contexte du CMH aux LT spécifiques (Azuma, 2006; Iwasaki et Medzhitov, 2004). Il est généralement reconnu que l'activation des TLR induit également la production de cytokines impliquées dans la polarisation des réponses cellulaires adaptatives vers un type T_H1 (Dabbagh et Lewis, 2003). Contrairement aux réponses T_H1 , très peu de preuves ont été apportées sur l'implication des TLR dans l'induction de réponses adaptatives de type T_H2 . Cependant, de récentes études semblent démontrer que, dans certains cas, l'activation du TLR-4 par les LPS peut mener au développement de réponses cellulaires de type T_H2 . Dans ce cas-ci, la dose et la durée d'exposition aux LPS seraient les facteurs influençant le choix entre la polarisation des réponses vers un type T_H1 ou T_H2 (Eisenbarth *et al.*, 2002).

Outre les TLR, plusieurs autres PRR ont également été identifiés et caractérisés. Par exemple, diverses lectines de type C ont la capacité à lier les résidus carbohydrates de microorganismes de façon Ca^{2+} -dépendante. La «DC-specific ICAM3-grabbing nonintegrin» (DC-SIGN), exprimée par les DC dermiques et par les DC interstitiels des tissus muqueux, est impliquée dans l'interaction et la capture de plusieurs virus (*e.g.* VIH, VHC, virus de dengue, virus Ebola), bactéries (*e.g.* *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumonia*), et levures (Barth *et al.*, 2005; Cambi *et al.*, 2004; Geijtenbeek et van Kooyk, 2003). De plus, DC-SIGN serait impliquée dans la capture des PPV du VPH par les DC et dans l'activation subséquente de ces dernières (Garcia-Pineros *et al.*, 2006). Dectin-1, une autre lectine de type C, peut lier les polysaccharides β -glucans (*e.g.* zymosan) et semble jouer un rôle important dans l'activation des DC par les levures (Brown *et al.*, 2003). Dectin-1 aurait également la capacité de collaborer avec le TLR-2 pour répondre aux levures (Gantner *et al.*, 2003). Le récepteur du mannose (MR) est un autre exemple de lectine de type C ayant une activité de PRR. En reconnaissant, par exemple, des résidus mannose à la surface de certains Ag, le MR entraîne l'endocytose des Ag et permet leur transfert vers la voie endocytaire (Sheng *et al.*, 2006). Une autre classe de récepteurs, les récepteurs de type «scavenger» (SR), peuvent également agir en PRR

en liant et en permettant l'endocytose d'une variété de ligands polyanioniques (*e.g.* lipoprotéines modifiées de faible densité, LPS, bactéries Gram + et Gram -, acides lipoteichoïques) (Shakushiro *et al.*, 2004). La protéine kinase R (PKR) permet pour sa part la détection de virus via la reconnaissance de dbARN au niveau du cytosol (Reis e Sousa, 2004). Finalement, certaines protéines de la famille des «nucleotide oligomerization domains» (NOD) exercent aussi une activité de PRR dans le cytosol en permettant la reconnaissance de bactéries intracellulaires. En effet, les protéines NOD1 et NOD2 détectent respectivement les acides diaminopiméliques (Chamaillard *et al.*, 2003) et les muramyl-dipeptides (Girardin *et al.*, 2003) retrouvés dans les peptidoglycane bactériens.

5.3.4.1 Les pseudoparticules virales comme signal de danger

Comme elles miment fidèlement la structure des particules virales sauvages, les PPV représentent une source de signaux de danger pouvant potentiellement induire la maturation des DC. D'ailleurs, l'utilisation de formulations vaccinales conçues à base de PPV pouvant directement entraîner la maturation des DC représenterait un avantage certain sur d'autres types de vaccins nécessitant la co-administration d'adjuvant afin d'obtenir des réponses immunitaires efficaces et protectrices.

Jusqu'à maintenant, diverses études ont démontré la capacité de certaines PPV à induire la maturation des DC. Par exemple, une étude de Lenz *et al* permet de démontrer la grande efficacité des PPV du VPH à induire l'activation et la maturation des DC murines. L'exposition de DC à diverses constructions de PPV du VPH mène à une régulation à la hausse des marqueurs de maturation CD40, CD80 et CD86 et des CMH-I/CMH-II (Lenz *et al.*, 2001). Cet effet n'est toutefois pas observé avec tous les types de DC. En effet, même si les cellules de Langerhans captent et internalisent les PPV du VPH avec une efficacité quantitativement équivalente à celle des autres DC, aucune régulation à la hausse de l'expression des molécules de costimulation n'est observée à leur surface. Ceci explique probablement pourquoi, contrairement aux autres DC, les cellules de Langerhans sont inefficaces dans l'induction des réponses T contre ces PPV (Fausch, Da Silva et Kast, 2003). L'équipe de Lenz *et al* a également observé que des PPV du VPH possédant une mutation compromettant l'organisation structurale des particules perdent leur capacité à activer et à entraîner la maturation

des DC. Cette observation démontre que l'intégrité structurale des PPV du VPH est essentielle à leur effet immunostimulant sur les DC (Lenz *et al.*, 2001). Les PPV du VPH permettent aussi d'induire la production des cytokines IL-6 et TNF- α par les DC. De plus, lorsqu'un signal activateur supplémentaire provenant des LT est fourni aux DC (*e.g.* production d'IFN- γ , interaction CD40-CD40L), les PPV du VPH induisent la production d'IL-12p70. Ces cytokines, particulièrement l'IL-12p70, jouent un rôle critique dans la polarisation des réponses immunitaires vers un type T_{H1}, permettant ainsi l'activation et l'expansion de LT spécifiques et la production de hauts titres d'Ac neutralisants (Evans *et al.*, 2001; Harro *et al.*, 2001; Lenz *et al.*, 2001). Finalement, des études plus approfondies sur la transmission des signaux activateurs par les PPV du VPH ont démontré que l'ensemble des effets de ces PPV sur les DC reposait sur la transmission de signaux activateurs dépendants des récepteurs de protéoglycane, du récepteur TLR-4, de la molécule adaptatrice MyD88 et du facteur nucléaire NF κ B (Yan *et al.*, 2005).

D'autres exemples de PPV pouvant entraîner la maturation des DC ont été décrits. Les PPV du VIH entraînent la maturation des DC humaines et induisent la production, par ces dernières, de cytokines permettant la polarisation des réponses immunitaire vers un type T_{H1} (*i.e.* IL-2, IL-18R, IL23A, IL-6, IL-12p70, IL-10 et TNF- α) et vers un type T_{H2} (*i.e.* IL-13, IL-15) (Sailaja *et al.*, 2007; Buonaguro *et al.*, 2006; Arico *et al.*, 2005). La pré-incubation de ces mêmes DC avec des Ac spécifiques au TLR-2 et au TLR-4 n'affectent en rien la capacité des PPV du VIH à induire la maturation des DC, ce qui exclu la participation de ces récepteurs dans la reconnaissance des particules (Buonaguro *et al.*, 2006). Les PPV du parvovirus porcine (Moron *et al.*, 2002), du polyomavirus murin (Bickert *et al.*, 2007) et du VHB (Ruedl *et al.*, 2002) peuvent également induire, à divers niveau, la maturation des DC murines en entraînant une régulation à la hausse des marqueurs CD40, CD80 et CD86. Les PPV du VHC exercent le même effet stimulant sur les DC humaines. Dans ce cas-ci, il a été démontré que l'intégrité structurale des PPV du VHC était importante afin de maintenir leur capacité à induire la maturation des DC (Barth *et al.*, 2005). Les PPV du virus Ebola et du virus de Marburg induisent aussi l'activation et la maturation des DC humaines et entraînent la production de cytokines pro-inflammatoires (*i.e.* IL-6, IL-8, TNF- α , et MIP-1 α). (Bosio *et al.*, 2004). Certaines PPV issues de virus de plante

(*e.g.* virus de la mosaïque du tabac) semblent également démontrer une aptitude à induire la maturation des DC (McCormick *et al.*, 2006).

5.4 Capture d'antigènes exogènes par les cellules dendritiques

L'internalisation d'Ag exogènes par les DC peut se dérouler selon diverses voies d'endocytose. Le choix d'une voie d'endocytose donnée dépend de plusieurs facteurs, dont le type, la taille et la solubilité de l'Ag rencontré et si l'Ag est incorporé ou non dans des complexes immuns. Les diverses voies d'endocytose peuvent dépendre ou non de la formation de puits de clathrine (Brode et Macary, 2004). L'endocytose dépendante de la formation de puits de clathrine implique la capture d'Ag particuliers via divers récepteurs exprimés à la surface des DC. Lorsque ces récepteurs reconnaissent un ligand, la membrane plasmique s'invagine et forme des puits de clathrine qui donneront naissance à des vésicules mesurant entre 150 et 200 nm. Pour leur part, les voies d'endocytose clathrine-indépendantes incluent la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la caveoline et l'endocytose indépendante de la caveoline mais dépendante des radeaux lipidiques (Xiang *et al.*, 2006). La phagocytose est généralement utilisée lors de la rencontre d'Ag particuliers de grande dimension et destinés à une dégradation lysosomale (*e.g.* débris cellulaires, cellules apoptotiques, bactéries). Les Ag s'attachent tout d'abord à la surface des DC via divers récepteurs. Les DC réorganisent ensuite leur membrane plasmique afin d'entourer les Ag et former des phagosomes qui seront détachés de la membrane plasmique et relâchés au niveau du cytoplasme. Les phagosomes peuvent finalement fusionner avec des lysosomes afin de former des phagolysosomes, lieu de dégradation du matériel antigénique. Finalement, la macropinocytose permet la capture non-spécifique de grands volumes de milieu extracellulaire et d'Ag solubles dans des vacuoles pouvant atteindre un diamètre de 200 à 500 nm.

Comme mentionné ci-dessus, l'endocytose et la phagocytose dépendent de l'activité de divers récepteurs. Par exemple, les TLR et les lectines de type C jouent un rôle très important dans l'internalisation de plusieurs microorganismes. Les récepteurs de type MR, dectin-1, et SR sont tous impliqués dans l'endocytose d'Ag bactériens. La phagocytose d'Ag issus de corps apoptotiques ou nécrotiques est quant à elle grandement dépendante de certains récepteurs du complément, du complexe

calreticuline/CD91, de l'intégrine $\alpha 5$, de SR-A et de CD36. Finalement, les FcR sont impliqués dans l'internalisation de complexes immuns, c'est-à-dire d'Ag complexés à des Ac et/ou à des composantes du complément (Brode et Macary, 2004).

5.4.1 Capture des pseudoparticules virales par les cellules dendritiques

La nature particulière des PPV et leur taille qui varie généralement entre 22 et 150 nm les rendent très accessibles aux divers mécanismes d'endocytose. Cependant, les mécanismes exacts utilisés par les DC pour la capture et l'internalisation de plusieurs types de PPV sont encore inconnus. Néanmoins, certaines études ont permis de caractériser ces mécanismes et d'identifier un ou des récepteurs potentiels. Dans certains cas, les régions impliquées dans la liaison du virus sauvage à son récepteur normal sont conservées sur les PPV, ce qui permet à ces dernières d'être internalisées via ce même récepteur (Grgacic et Anderson, 2006). C'est le cas des PPV du parvovirus canin qui, tout comme les particules virales sauvages, sont internalisées par endocytose dépendante de la clathrine via une liaison aux récepteurs des transfélines (Singh *et al.*, 2006). D'autres études ont démontré que certaines PPV peuvent être internalisées par endocytose non-spécifique et/ou par endocytose régulée par des PRR. Par exemple, les PPV du VPH interagissent avec les chaînes héparane-sulfate des protéoglycanes situées à la surface des DC et sont internalisées, de façon actine-dépendante, par endocytose dépendante de la formation de puits de clathrine ou par macropinocytose. À l'inverse, l'internalisation des mêmes PPV du VPH par les cellules de Langerhans se déroule selon des mécanismes indépendants de la clathrine et de l'actine. Malgré ces différences dans les mécanismes d'internalisation, les DC et les cellules de Langerhans captent les PPV du VPH avec une efficacité similaire (Bousarghin *et al.*, 2005; Fausch, Da Silva et Kast, 2003). L'équipe de Buonaguro *et al* observa que les PPV du VIH semblent être principalement captées par macropinocytose (selon un processus actine-dépendant) mais aussi par endocytose régulée par le récepteur DC-SIGN (Buonaguro *et al.*, 2006). Les PPV du parvovirus porcine sont internalisées très efficacement par macropinocytose par les DC $CD8\alpha^+$ et $CD8\alpha^-$ et se retrouvent dans les endosomes tardifs peu de temps après leur internalisation (Moron *et al.*, 2003; Moron *et al.*, 2002).

5.5 Apprêtement et présentation d'antigènes par les cellules dendritiques

5.5.1 Apprêtement et présentation d'antigènes sur CMH-II

L'apprêtement et la présentation de peptides antigéniques sur les CMH-II permet d'activer les LT CD4⁺ exprimant un récepteur des LT (TCR) de même spécificité antigénique. La présentation d'Ag dans le contexte du CMH-II implique généralement des protéines exogènes internalisées par les CPA ou des protéines endogènes retrouvées dans les compartiments de la voie endocytaire (Ackerman et Cresswell, 2004). De plus, dans certains cas, des protéines provenant du cytosol (*e.g.* protéines virales, protéines du Soi) et ayant été transférées dans des compartiments de la voie endocytaire peuvent également être présentées sur les CMH-II (Trombetta et Mellman, 2005).

Les CMH-II, qui sont principalement exprimés par les CPA, sont formés d'une chaîne α (34 kDa) et d'une chaîne β (29 kDa) et possèdent une niche peptidique ouverte aux deux extrémités. Cette niche permet d'accueillir des ligands antigéniques de longueur variable, allant de polypeptides d'au moins 13 résidus à des protéines entières (Trombetta et Mellman, 2005). Lors de la synthèse des CMH-II dans le réticulum endoplasmique (RE), un trimère de protéines chaperonnes, appelée chaîne invariante (Ii), s'associe à trois dimères $\alpha\beta$ pour former un complexe $\alpha\beta I$ (Hiltbold et Roche, 2002). En plus d'empêcher temporairement la liaison de peptides au niveau de la niche peptidique, la Ii permet de diriger les complexes $\alpha\beta I$ vers le système endocytaire (Cresswell, 1996). Jusqu'à maintenant, les nombreuses études effectuées sur le sujet ont permis d'identifier trois voies impliquées dans le transfert des complexes $\alpha\beta I$ vers le système endocytaire et, conséquemment, dans la liaison de peptides antigéniques au niveau de la niche peptidique. Dans la première voie, les complexes $\alpha\beta I$ sont transférés directement du réseau golgien aux lysosomes, sans passer par les endosomes ou par les intermédiaires pré-lysosomiaux (Hiltbold et Roche, 2002). Dans la deuxième voie, les complexes $\alpha\beta I$ nouvellement synthétisés dans le RE sont transférés à la surface cellulaire via des vésicules du réseau golgien. Grâce à la présence de deux signaux di-leucine dans le domaine cytoplasmique des Ii, les complexes $\alpha\beta I$ sont ensuite internalisés, via la formation d'endosomes, à partir de

la membrane plasmique. Les complexes $\alpha\beta$ I peuvent alors être transférés aux compartiments riches en protéases pour y être chargés par des polypeptides antigéniques (Pieters, 2000). Dans la troisième voie, les complexes $\alpha\beta$ I transitent, via le réseau golgien, vers les endosomes précoces qui fusionnent ensuite avec les lysosomes. Dans chacune de ces trois voies, l'apprêtement des Ag repose sur l'activité de certaines protéases contenues dans les divers compartiments de la voie endocytaire (*e.g.* cathepsine S, L, B, D et AEP) et sur l'acidification de ces compartiments. L'activité protéolytique des protéases et le pH acide sont également impliqués dans la dégradation progressive de la Ii, jusqu'à l'obtention du peptide CLIP, qui possède une faible affinité pour la niche peptidique (Watts, 2004). Grâce à l'action de la protéine HLA-DM (chez l'humain) ou H2-M (chez la souris), le peptide CLIP est éventuellement délogé par un peptide de plus grande affinité issu de la dégradation d'Ag (Jutras et Desjardins, 2005). Le complexe p-CMH-II résultant peut ensuite être redirigé à la surface cellulaire où il sera exposé aux LT CD4⁺. Finalement, soulignons qu'une voie de recyclage des complexes p-CMH-II a également été identifiée. En effet, des complexes «matures» (*i.e.* dont la niche est déjà occupée par un Ag) exposés sur la membrane plasmique peuvent réintégrer la voie endocytaire via la formation d'un endosome. Le peptide antigénique déjà présent dans la niche peptidique du CMH-II peut alors être délogé par un autre peptide de plus forte affinité (Hiltbold et Roche, 2002).

5.5.2 Apprêtement et présentation d'antigènes sur CMH-I (voie classique)

L'apprêtement et la présentation de peptides antigéniques sur les CMH-I permet d'activer les LT CD8⁺ exprimant un TCR de même spécificité antigénique. La voie classique d'apprêtement et de présentation d'Ag sur les CMH-I implique la présentation de peptides antigéniques dérivés de protéines endogènes (*e.g.* protéines cellulaires recyclées, protéines virales ou bactériennes produites au sein des cellules lors d'une infection, protéines anormales apparaissant lors du développement de tumeurs, produits ribosomiaux défectueux) (Trombetta et Mellman, 2005; Williams, Peh et Elliott, 2002).

Les CMH-I sont exprimés par pratiquement toutes les cellules de l'organisme et sont composés de deux protéines, soit la chaîne lourde α (43 kDa) et la β 2-microglobuline (12 kDa). La chaîne lourde α se replie en trois domaines globulaires (α 1, α 2 et α 3) et possède, à son extrémité carboxy-terminale, une portion transmembranaire et une portion cytoplasmique. Pour sa part, la β 2-microglobuline est associée au domaine α 3 de la chaîne lourde et sa présence est essentielle à la stabilité du CMH-I (Ackerman et Cresswell, 2004). Le repliement des domaines α 1 et α 2 de la chaîne lourde forme une niche peptidique fermée aux deux extrémités. La conformation de cette niche peptidique permet la liaison de peptides possédant entre 8 et 9 acides aminés. La formation de ces peptides passe par la dégradation des Ag endogènes dans le cytosol par un complexe multiprotéique appelé protéasome. Ce processus, qui est dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP), nécessite l'ubiquitination des protéines antigéniques. Les polypeptides obtenus suite à la dégradation par le protéasome subissent ensuite une étape de protéolyse par des peptidases cytoplasmiques (Williams, Peh et Elliott, 2002). Après avoir atteint une longueur optimale, les peptides antigéniques sont transférés dans le RE grâce au transporteur associé à l'apprêtement d'Ag (TAP) afin d'être chargés sur les CMH-I nouvellement synthétisés. Les complexes p-CMH-I ainsi formés sont finalement redirigés à la surface cellulaire via le système golgien afin d'être présentés aux LT CD8⁺ spécifiques (Trombetta et Mellman, 2005).

5.5.3 Apprêtement et présentation croisée d'antigènes sur CMH-I

Comme mentionné précédemment, la voie dite «classique» d'apprêtement et de présentation d'Ag sur les CMH-I implique le chargement d'Ag endogènes sur les molécules de CMH-I. Cependant, cette voie à elle seule ne permet pas d'expliquer comment les DC peuvent induire une réponse cytotoxique contre un pathogène sans la nécessité d'être elles-mêmes infectées par le pathogène en question. Ce problème fut élucidé par la découverte d'une voie alternative pour la présentation d'Ag exogènes sur les CMH-I, c'est-à-dire la voie de présentation croisée (Xiang *et al.*, 2006). Dans cette voie, les DC peuvent acquérir des Ag exogènes et les présenter dans le contexte du CMH-I sans la nécessité d'être infectées. Ces Ag peuvent pénétrer la voie de présentation croisée via la plupart des voies d'endocytose. De plus, divers types d'Ag

exogènes peuvent accéder à cette voie (*e.g.* Ag particuliers, Ag solubles, virus, bactéries intracellulaires, parasites, Ag tumoraux, protéines purifiées, Ag cellulaires, cellules apoptotiques, complexes immuns, complexes HSP-peptides, acides nucléiques, peptides) (Shen et Rock, 2006; Brode et Macary, 2004). La présentation croisée d'Ag particuliers internalisés par phagocytose ou par micropinocytose semblent toutefois donné le meilleur rendement (Shen et Rock, 2006; Ackerman et Cresswell, 2004). En plus d'être les seules cellules à pouvoir activer efficacement les LT CD8⁺ naïfs, les DC sont sans aucun doute les cellules les plus efficaces pour effectuer la présentation croisée d'Ag. L'efficacité de ce processus dépend toutefois du type de DC impliqué (Shen et Rock, 2006). En effet, les DC CD8⁺ semblent être le type le plus apte à induire des réponses cytotoxiques via la présentation croisée d'Ag exogènes (den Haan, Lehar et Bevan, 2000). Les DC CD8⁺ peuvent également effectuer la présentation croisée d'Ag du Soi dérivés des tissus afin d'induire la tolérance chez l'hôte (Heath *et al.*, 2004). Pour leur part, les DC CD8^α ont été associées à la présentation croisée de complexes immuns (Shen et Rock, 2006). Finalement, notons que les MΦ, les LB, les kératinocytes, les cellules L, les neutrophiles et les cellules endothéliales sont également capables d'effectuer la présentation croisée d'Ag exogènes, mais avec un rendement beaucoup moins efficace que celui des DC (Shen et Rock, 2006; Rock, 1996).

Jusqu'à maintenant, cinq voies différentes de présentation croisée ont été caractérisées. Brièvement, ces voies sont : 1) La voie vacuolaire : Les Ag sont dégradés dans les endosomes grâce à l'action d'une cystéine protéase (*i.e.* cathepsin S) et les peptides résultants sont ensuite chargés sur des CMH-I présents dans les phagosomes. Cette voie se déroule de façon TAP- et protéasome-indépendante. 2) La voie endosome-cytosol-endosome : L'Ag est exporté de l'endosome au cytosol possiblement via Sec61. L'Ag est ensuite apprêté par le protéasome et les peptides résultants retournent dans l'endosome via TAP afin d'être chargés sur les CMH-I. Des études semblent démontrer que l'endosome acquiert les CMH-I, TAP, Sec61 et autres molécules du RE via une fusion avec le RE. 3) La voie endosome-cytosol-RE : L'Ag est exporté de l'endosome au cytosol possiblement via Sec61. L'Ag est ensuite apprêté par le protéasome et les peptides résultants pénètrent le RE via TAP afin d'être chargés sur les CMH-I. 4) La voie des jonctions GAP : Les DC acquièrent les

peptides antigéniques d'autres cellules environnantes via les jonctions GAP. 5) La voie endosome-RE : Les Ag contenus dans les endosomes sont transportés dans le RE pour être ensuite exportés dans le cytosol où ils seront dégradés. Les peptides résultants sont ensuite redirigés dans le RE via TAP (Shen et Rock, 2006; Ackerman et Cresswell, 2004; Ramirez et Sigal, 2004).

5.5.3.1 Présentation croisée des pseudoparticules virales

Les PPV peuvent être utilisées pour induire des réponses cellulaires cytotoxiques chez des hôtes immunisés. Il est également possible d'induire ce type de réponse contre des épitopes étrangers présentés à la surface des PPV. Dans les deux cas, le succès des immunisations repose sur la capacité des DC à apprêter et présenter les PPV sur les CMH-I via les mécanismes de présentation croisée. L'efficacité de ce processus a été démontrée pour plusieurs PPV, comme les PPV du VPH (Yan *et al.*, 2004), du VIH (Tsunetsugu-Yokota *et al.*, 2003), de VHC (Barth *et al.*, 2005), du parvovirus porcin (Moron *et al.*, 2003), du virus Ebola (Warfield *et al.*, 2005), et du virus de Norwalk (Tacket *et al.*, 2003). Dans certain cas, la ou les voies exactes utilisées pour la présentation croisée de PPV ont été précisément identifiées. C'est le cas des PPV du parvovirus porcin exposant l'épitope CTL SIINFEKL de l'ovalbumine (OVA). En effet, une étude de Moron *et al* démontra que l'incubation de DC avec de la chloroquine (un inhibiteur de l'acidification des endosomes), de la pepstatine (un inhibiteur de l'action des protéases à aspartate comme les cathepsines D et E), des inhibiteurs du protéasome et un inhibiteur du transport golgien (*i.e.* BFA) inhibe grandement l'apprêtement et la présentation de l'épitope OVA à partir des PPV du parvovirus porcin. De plus, l'utilisation de DC issues de souris déficientes en TAP confirma la nécessité de ce transporteur dans la translocation des peptides apprêtés du cytosol au RE. Ces observations permirent de conclure que les PPV du parvovirus porcin exposant l'épitope OVA sont apprêtées et présentées sur les CMH-I via la voie endosome-cytosol-RE (Moron *et al.*, 2003). D'autre part, l'apprêtement des PPV formées par le HBsAg du VHB nécessite l'acidification des endosomes et se déroule de façon TAP-indépendante, ce qui laisse croire à l'utilisation de la voie vacuolaire (Stober *et al.*, 2002). L'épitope p33 du LCMV exposés à la surface des mêmes PPV est présenté sur les CMH-I selon des mécanismes TAP-dépendants ou TAP-indépendants, démontrant ainsi la capacité des DC à utiliser diverses voie de

présentation croisée pour un même type de PPV (Ruedl *et al.*, 2002). L'ensemble de ces études indique que, selon les PPV utilisées, les DC peuvent recourir à diverses voies de présentation croisée.

Comme mentionné précédemment, plusieurs PPV ont démontré leur efficacité en tant que plateforme pouvant exposer des épitopes T CD8⁺ étrangers aux cellules du système immunitaire et permettre l'induction de réponses cytotoxiques spécifiques. Afin d'optimiser l'apprêtement et la présentation des épitopes étrangers via les voies de présentation croisée, le choix de la longueur et de la séquence des épitopes à coupler aux protéines constituant les PPV devient un facteur important. Dans certains cas, l'apprêtement efficace d'épitopes CD8⁺ à la surface de vecteurs vaccinaux peut s'effectuer peu importe le contexte dans lequel les épitopes sont insérés (Gilbert *et al.*, 1997; Thomson *et al.*, 1995). Dans d'autres cas, la présence des acides aminés flanquants naturels aux extrémités des épitopes est requise. Par exemple, suite à une étude visant à comparer l'efficacité d'apprêtement de l'épitope CTL SIINFEKL d'OVA exposé à la surface de PPV du parvovirus porcin, il a été observé que la présence de courtes séquences d'acides aminés naturels aux abords de l'épitope augmentait considérablement l'efficacité de l'apprêtement sur les CMH-I (Rueda *et al.*, 2004). L'étude de Bergmann *et al.* permis de démontrer que les types d'acides aminés présents dans les régions flanquantes naturelles influencent grandement, dans certains cas, l'antigénicité et l'immunogénicité des épitopes CD8⁺. Par exemple, la présence d'acides aminés aromatiques (*e.g.* tyrosine), basiques (*e.g.* lysine), ou comportant des petites chaînes aliphatiques (*e.g.* alanine) permet un apprêtement efficace des épitopes tandis que la présence de résidus acides ou interférant avec la formation d'hélice (*e.g.* glycine, proline) nuit au processus (Bergmann *et al.*, 1996). Comme ces observations ne permettent pas d'établir une règle générale et dépendent en grande partie de la plateforme vaccinale utilisée, il devient essentiel d'effectuer des études structurales afin d'établir les conditions et le contexte d'insertion optimal d'un épitope donné à la surface d'une plateforme vaccinale.

6. Mécanismes impliqués dans le développement de réponses cellulaires

Les réponses immunitaires à médiation cellulaire impliquent deux différents types de LT (*i.e.* LT CD4⁺ et LT CD8⁺). Alors que les LT CD8⁺ sont responsables des

processus cytotoxiques permettant l'attaque et la destruction de cellules infectées ou de cellules anormales, les LT CD4⁺ modulent l'ensemble des réponses immunitaires via la production de facteurs solubles et membranaires. Malgré les différents rôles exercés par ces deux types de LT, il est possible de distinguer trois étapes communes au développement de cellules mémoires à partir de ces populations. La première étape, qui est initiée dans les tissus lymphoïdes, est une phase d'expansion lors de laquelle la présentation d'Ag et la transmission de signaux de costimulation par les CPA induit l'activation et la prolifération des LT CD4⁺ ou CD8⁺ naïfs et leur différenciation en cellules effectrices. Lorsque la source d'Ag est éliminée, la deuxième étape, appelée phase de contraction, entraîne la mort d'environ 90% des cellules effectrices. Finalement, la troisième étape, appelée phase mémoire, permet aux LT ayant survécu à la phase de contraction de devenir des LT mémoires ayant une longue durée de vie. Lorsque les LT mémoires rencontrent à nouveau le même Ag, ils sont rapidement réactivés et exercent leur activité effectrice sans la nécessité de recevoir des signaux de costimulation de la part des CPA (van Lier, ten Berge et Gamadia, 2003; Kaech, Wherry et Ahmed, 2002).

Cette section de la revue de littérature a pour but de présenter les mécanismes généraux impliqués dans le développement et le déroulement des réponses T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que le rôle des DC dans ces processus.

6.1 Réponses cellulaires impliquant les lymphocytes T CD4⁺

Les réponses immunitaires sont sous le contrôle de trois différentes populations de LT CD4⁺, soit les LT CD4⁺ de type T_{H1}, T_{H2}, ou T_{Reg}. Les LT CD4⁺ de type T_{H1} et T_{H2} sont responsables du contrôle de différents aspects des réponses cellulaires et humorales. Les réponses de type T_{H1} permettent la production de cytokines pro-inflammatoires et l'augmentation de l'ampleur et du maintien des réponses cytotoxiques. De plus, la production d'IFN- γ par les LT CD4⁺ de type T_{H1} permet d'activer certains mécanismes de défense menant à l'élimination de pathogènes intracellulaires et/ou intravésiculaires (Dong et Flavell, 2000). Pour leur part, les LT CD4⁺ de type T_{H2} produisent une variété différente de cytokines (*e.g.* IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) permettant la prolifération et la différenciation des LB en plasmocytes

sécréteurs d'Ac et l'optimisation de l'activité antiparasitaire de divers types de cellules immunitaires. Les réponses cellulaires de type T_H2 sont donc essentielles aux mécanismes de défense contre plusieurs pathogènes extracellulaires (Kapsenberg, 2003; Dong et Flavell, 2000). Finalement, en plus d'assurer le développement de réponses immunitaires mémoires robustes en contrôlant la cinétique d'éradication des agents pathogènes, les LT $CD4^+$ de type T_{Reg} sont impliqués dans les mécanismes de tolérance et de prévention du développement de réponses auto-immunes qui pourraient potentiellement entraîner la destruction des tissus de l'hôte (Kapsenberg, 2003).

6.2 Réponses cellulaires impliquant les lymphocytes T $CD8^+$

Les CTL jouent un rôle de première importance dans les mécanismes de défense immunitaire contre plusieurs virus, contre certaines bactéries intracellulaires (*e.g. Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, Mycobacterium tuberculosis*), contre certains protozoaires (*e.g. Plasmodium, Toxoplasma gondii, Trypanosoma cruzi*) et contre les tumeurs (Wong et Pamer, 2003). Comme pratiquement toutes les cellules de l'organisme peuvent exprimer des complexes p-CMH-I, elles ont toutes la capacité d'être scrutées et reconnues de façon Ag-spécifique par les LT $CD8^+$. Lorsque des LT $CD8^+$ se différencient en CTL effecteurs et que ces derniers reconnaissent, via leur TCR, des complexes p-CMH-I à la surface des cellules infectées, ils entraînent la lyse spécifique des cellules et permettent l'élimination des agents infectieux intracellulaires. L'activité cytotoxique des CTL repose principalement sur un mécanisme impliquant l'exocytose calcium-dépendante de granules contenant diverses molécules effectrices (Smyth *et al.*, 2001; Kagi *et al.*, 1996). Lors de la reconnaissance Ag-spécifique d'un complexe p-CMH-I à la surface d'une cellule cible, les CTL réorganisent l'actine de leur cytosquelette vers le site de contact avec la cellule cible, ce qui permet d'aligner le centre organisateur des microtubules et d'orienter l'appareil de golgi en direction de la cellule cible. Cette réorganisation du système de sécrétion assure que l'exocytose des molécules effectrices se fasse uniquement en direction de la cellule à éliminer (Griffiths, 1995). Parmi les molécules effectrices relâchées, la perforine et les granzymes sont les mieux caractérisées. La perforine possède la capacité de se polymériser afin de former des pores dans la membrane des cellules cibles. Ces pores, de forme cylindrique, sont

lipophiles à l'extérieur mais hydrophiles à l'intérieur, ce qui permet l'entrée d'eau et de constituants du milieu extracellulaire à l'intérieur de la cellule cible. Les granzymes, qui regroupent au moins trois protéases à sérine, pénètrent dans le cytoplasme des cellules cibles via les pores préalablement formés par la perforine et déclenchent une cascade enzymatique qui mène à l'activation de l'apoptose. L'activité cytotoxique des CTL peut également dépendre d'un mécanisme indépendant de la perforine, des granzymes et du calcium. Brièvement, ce mécanisme implique l'interaction entre la molécule FasL exprimée à la surface des CTL et la molécule Fas exprimée à la surface des cellules cibles. Cette interaction provoque l'apoptose des cellules cibles via l'activation de certaines caspases (Kagi *et al.*, 1996).

Plusieurs études ont démontré l'importance de l'aide fournie par les LT CD4⁺ dans la génération de réponses cytotoxiques primaires contre divers types Ag *in vivo* (Prilliman *et al.*, 2002). Des observations contradictoires ont toutefois permis de mettre en évidence la capacité du système immunitaire à développer des réponses cytotoxiques en absence de l'aide des LT CD4⁺, particulièrement contre certains virus (*e.g.* LCMV, virus de la vaccine) (Bevan, 1995). Néanmoins, de telles réponses cytotoxiques ont tendance à s'estomper avec le temps et à devenir incapables de contrôler la réplication virale et les infections persistantes. L'aide fournie par les LT CD4⁺ est donc essentielle au maintien des réponses cytotoxiques et du pool de CTL mémoires (Kalams et Walker, 1998). D'autre part, même si des cas contraires ont été observés, la présentation croisée d'Ag exogènes (*e.g.* PPV) aux LT CD8⁺ se déroule également selon des mécanismes dépendants de l'aide des LT CD4⁺ (Bennett *et al.*, 1997).

Finalement, comme il en sera discuté davantage ci-dessous, l'activation et la différenciation des LT CD8⁺ naïfs en CTL effecteurs et en CTL mémoires requiert plus qu'une simple reconnaissance de complexes p-CMH-I à la surface des cellules cibles. En effet, le développement de réponses cytotoxiques efficaces et de longue durée nécessite la réception, par les LT CD8⁺ naïfs, de signaux de costimulation provenant des CPA (principalement des DC) et de signaux polarisant provenant de cytokines exogènes (Sperling et Bluestone, 1996).

6.3 Rôle des cellules dendritiques dans le développement des réponses cellulaires

En plus d'être très efficaces dans la capture, l'apprêtement et la présentation d'Ag sur les CMH-I et les CMH-II, les DC sont les seules CPA à pouvoir activer efficacement les LT naïfs (Guermonprez *et al.*, 2002). Grâce à leur capacité à fournir, aux LT, trois signaux essentiels à leur activation et à la régulation de leur activité, les DC jouent un rôle essentiel dans l'initiation et le déroulement des réponses cellulaires. Lors de leur passage dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT naïfs sont exposés aux DC matures ayant capté un Ag donné. Ils peuvent alors établir des contacts de faible affinité avec les DC afin de scruter et de tester l'éventail de peptides antigéniques présentés dans le contexte du CMH. Ces premiers contacts entre les DC et les LT naïfs sont régulés via des interactions transitoires entre certaines molécules de surface. Ainsi, les molécules CD2, LFA-1 et ICAM-3 à la surface des LT lient respectivement les molécules LFA-3, ICAM-1/ICAM-2 et DC-SIGN à la surface des DC (Grakoui *et al.*, 1999). Lorsque les LT CD4⁺ ou CD8⁺ naïfs reconnaissent respectivement, via leur TCR, un complexe p-CMH-II ou p-CMH-I de même spécificité antigénique, ils reçoivent un premier signal activateur (signal DC-T #1). La spécificité antigénique du signal DC-T #1 assure que seuls les LT pouvant répondre à un microorganisme donné seront activés (Guermonprez *et al.*, 2002). De plus, la réception de ce signal induit un changement de conformation de la molécule LFA-1 à la surface des LT, ce qui augmente l'affinité de cette molécule pour ICAM-1/ICAM-2 et stabilise le contact entre les LT et les DC (Grakoui *et al.*, 1999).

La réception du signal DC-T #1 n'est toutefois pas suffisant pour entraîner la prolifération des LT naïfs et leur différenciation en LT effecteurs. En effet, les LT naïfs requièrent la réception d'un deuxième signal de costimulation provenant des DC (signal DC-T #2). Comme mentionné précédemment, la maturation des DC entraîne une régulation à la hausse de l'expression des molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40. En interagissant avec la molécule CD28 exprimée à la surface des LT, les molécules CD80 et CD86 permettent la transmission du signal DC-T #2 (Guermonprez *et al.*, 2002; Dong et Flavell, 2000). L'acquisition de ce signal de costimulation est essentielle à l'induction de réponses cellulaires robustes et efficaces. En son absence, les DC entraînent habituellement l'anergie des LT, ce qui mène au développement des mécanismes de tolérance (Guermonprez *et al.*, 2002). D'autre

part, la réception des signaux DC-T #1 et #2 régule à la hausse l'expression de CD40L à la surface des LT. Cette molécule peut à son tour interagir avec CD40 à la surface des DC afin de transmettre des signaux bidirectionnels qui augmentent à la fois le niveau d'activation des LT et le niveau de maturation des DC (Dong et Flavell, 2000). La transmission des signaux DC-T #1 et #2 permet également d'accentuer la production d'IL-2, une cytokine essentielle à la prolifération et l'expansion des LT. De plus, l'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 est également augmentée. Celle-ci, en s'associant aux chaînes β et γ qui composent le récepteur de l'IL-2 sur les LT au repos, augmente considérablement l'affinité de ce récepteur pour l'IL-2, ce qui facilite la réponse à cette cytokine et permet une progression plus rapide des LT dans le cycle cellulaire. Finalement, Les molécules CD80 et CD86 peuvent également interagir avec la molécule CTLA-4 à la surface des LT. Cette dernière, qui se lie aux molécules de costimulation avec une affinité vingt fois plus élevée à celle de CD28, transmet un signal inhibiteur aux LT activés qui réduit leur sensibilité à la stimulation par les DC, limite leur production d'IL-2 et réduit leur niveau de prolifération (Henry, Miller et Pontarotti, 1999).

Le troisième et dernier signal fourni par les DC (signal DC-T #3) provient de divers facteurs solubles et membranaires issus des DC et est responsable de la polarisation des réponses T CD4⁺ et. Par exemple, l'IL-12, l'IL-23, l'IL-27, l'IFN- γ et les IFN de type I sécrétés ainsi que la molécule ICAM1 exprimée à la surface des DC sont tous des exemples de facteurs permettant la polarisation des réponses cellulaires vers un type T_H1. De plus, l'IL-18 permettrait d'amplifier l'effet de l'IL-12 afin d'optimiser les réponses T_H1 (Kapsenberg, 2003; Dong et Flavell, 2000). L'IL-4, l'IL-6, l'IL-13, la «monocytic chemotactic protein 1» (MCP1 ou CCL2) et OX40L favorisent pour leur part le développement de réponses T de type T_H2 (Mazzoni et Segal, 2004; Kapsenberg, 2003; Dong et Flavell, 2000). Finalement, la production d'IL-10 et de TGF- β assure le développement de LT CD4⁺ de type T_{Reg} (Kapsenberg, 2003). Il est à noter qu'en plus de maximiser le niveau de maturation des DC, l'interaction CD40L-CD40 entre les LT et les DC permet à ces dernières d'augmenter leur expression de cytokines et d'autres facteurs polarisants (Dong et Flavell, 2000).

La réception des trois signaux activateurs par les LT est essentielle à l'obtention de réponses immunitaires efficaces. Dû au rôle de première importance que jouent les DC dans la transmission de ces trois signaux, les conditions dans lesquelles les DC rencontrent les Ag influencent grandement le développement des réponses cellulaires. Ainsi, des facteurs comme le site d'entrée des Ag, la localisation anatomique et cellulaire des Ag, le type de DC impliqué et la capacité des Ag à entraîner la maturation des DC ont tous un impact sur le déroulement des réponses cellulaires. Par exemple, la capture d'un Ag n'entraînant pas la maturation des DC ne permet pas à ces dernières de réguler à la hausse l'expression des molécules de costimulation. Ceci a pour effet d'empêcher la transmission du signal DC-T #2 aux LT et mène habituellement au développement des mécanismes de tolérance (Guermonprez *et al.*, 2002). D'autre part, la nature du signal #3 fourni par les DC varie considérablement en fonction du type d'Ag rencontré. Par exemple, le virus influenza, la levure *Candida albicans* ainsi que plusieurs ligands des TLR comme le LPS d'*E. coli* (via le TLR-4), les dsRNA (via le TLR-3), la flagelline (via le TLR-5) et les CpG (via le TLR-9) sont tous des exemples d'Ag induisant la production de cytokines permettant la polarisation des réponses cellulaires vers un type T_H1. D'autre part, les réponses cellulaires peuvent être polarisées vers un type T_H2 par les helminthes, les hyphes de *Candida albicans* et par certains ligands des TLR comme les LPS de *Porphyromonas gingivalis* (via le TLR-2), le zymosan (via le complexe TLR-2/TLR-6) et les lipopeptides de type Pam3Cys (via le complexe TLR-2/TLR-1). Finalement, certains microorganismes ont la capacité d'échapper au système immunitaire en stimulant la production de LT CD4⁺ de type T_{Reg} ou en inhibant l'induction de la maturation des DC. Ceci a pour effet de favoriser les mécanismes de tolérance immunitaire, facilitant ainsi la survie des microorganismes au sein de l'hôte (Kapsenberg, 2003). Des exemples de tels microorganismes sont la bactérie *Bordetella pertussis*, le parasite *Schistosoma mansoni*, le VHC, le virus de l'herpes simplex et les cytomegalovirus (Mazzoni et Segal, 2004; Kapsenberg, 2003).

7. Les pseudoparticules du virus de la mosaïque du papayer

7.1 Caractéristiques générales du virus de la mosaïque du papayer

Le PapMV est un virus de plante faisant partie de la famille des *Flexiviridae* et du genre *Potexvirus*. Même si l'hôte naturel du PapMV est la papaye (*Carica papaya*), plusieurs autres espèces de plantes peuvent également être infectées. L'infection par le PapMV, qui se fait par inoculation mécanique, provoque des symptômes de mosaïques ou de nécroses sur les feuilles des plants infectés. Les particules virales du PapMV forment des bâtonnets filamenteux flexibles d'environ 500 nm de long et 15 nm de diamètre (Tremblay *et al.*, 2006). Les particules du PapMV sont composées d'environ 1400 sous-unités identiques de la CP enroulées en hélice autour d'une copie de l'ARN viral (Morin *et al.*, 2007). Le génome de PapMV comporte 6656 nucléotides codant pour 5 protéines, soit une réplicase, trois protéines du «triple gene block» (TGB) et la protéine CP. La réplicase est impliquée dans le processus de réplication virale. Les trois protéines TGB (*i.e.* TGB1, TGB2 et TGB3) sont pour leur part impliquées dans le mouvement du virus dans les plants infectés. Finalement, la CP, qui est composée de 215 acides aminés et qui possède un poids moléculaire de 23 kDa, est impliquée dans la formation de la capsid, dans la protection de l'ARN viral et dans le mouvement du virus au sein de l'hôte infecté. L'ARN viral possède une coiffe à l'extrémité 5' et une queue polyadénylée à l'extrémité 3' (Tremblay *et al.*, 2006). La région incluant les 47 premiers nucléotides de l'extrémité 5' de l'ARN viral, qui représentent une région non-codante dépourvue de structure secondaire, est impliquée dans l'initiation de l'assemblage des CP autour de l'ARN (Sit, Leclerc et AbouHaidar, 1994). L'élongation de la particule se déroule de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' (Abouhaidar et Bancroft, 1979). Chaque sous-unité des particules du PapMV possède un atome Ca^{2+} qui influence la structure finale de la protéine (Durham et Bancroft, 1979). Finalement, notons qu'il est possible d'entraîner l'assemblage des CP du PapMV autour d'ARN et d'ADN étrangers (Erickson et Bancroft, 1980; Abouhaidar et Bancroft, 1979).

7.2 Production de pseudoparticules du virus de la mosaïque du papayer

Grâce à l'utilisation d'un système d'expression bactérien, l'équipe du Dr Denis Leclerc a mis au point une technique permettant la production *in vitro* efficace de PPV du PapMV. Le gène codant pour la CP du PapMV, dont les 5 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale ont été exclus (CP Δ N5), a été cloné dans un plasmide. Suite au transfert de ce dernier dans la bactérie *E. coli*, de grandes quantités de CP Δ N5 sont produites (*i.e.* plus de 25mg/L). Les CP Δ N5 obtenues peuvent être facilement purifiées sur une colonne d'affinité grâce à la présence d'une queue d'histidine («6xH-tag») à l'extrémité C-terminale. La surexpression des CP Δ N5 dans *E. coli* permet d'obtenir des multimères de diverses tailles (formés de CP assemblées autour de l'ARN bactérien positif) ainsi que des disques ou des monomères de CP (ne contenant aucun ARN). Les multimères (*i.e.* PPV), qui ont la forme de longs bâtonnets filamenteux flexibles (longueur moyenne de 50 nm) et qui sont très similaires aux particules virales sauvages, sont obtenues dans une proportion de 20%. D'autre part, les disques (composées d'environ 18 à 20 CP) ainsi que les monomères de CP sont obtenues dans une proportion de 80%. L'utilisation d'un mutant E128A (*i.e.* CP Δ N5 ayant subi, en position 128, la substitution de son acide glutamique (résidu acide chargé négativement) par une alanine (résidu hydrophobe)), permet d'augmenter considérablement la production de multimères (proportion d'environ 100%). De plus, les PPV obtenues à l'aide du mutant E128A, qui ont une longueur moyenne de 280 nm, présentent une taille beaucoup plus semblable à celle des particules sauvages. Notons toutefois que l'utilisation des clones CP Δ N5 et E128A permet, dans les deux cas, d'obtenir un niveau d'expression protéique équivalent. Ces résultats semblent indiquer que la substitution d'un résidu chargé négativement par un résidu hydrophobe en position 128 de la CP augmente l'affinité des disques de CP pour l'ARN, facilitant ainsi l'assemblage des particules (Tremblay *et al.*, 2006). Des analyses de microscopie électronique permettent de comparer l'apparence des diverses PPV obtenues avec celle des particules virales sauvages (Figure A).

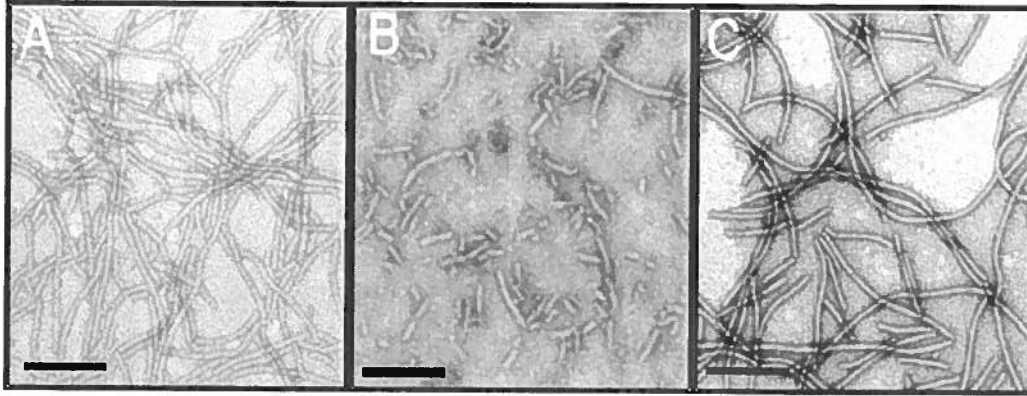


Figure A. Analyse des pseudoparticules du virus de la mosaïque du papayer par microscopie électronique. (A) Particules sauvages du virus de la mosaïque du papayer (B) Pseudoparticules CPΔN5 du virus de la mosaïque du papayer (C) Pseudoparticules E128A du virus de la mosaïque du papayer (Tremblay *et al.*, 2006)

7.3 Immunogénicité des pseudoparticules du virus de la mosaïque du papayer

Tout comme le PapMV sauvage, les PPV du PapMV présentent une structure cristalline hautement répétitive. Or, les structures antigéniques répétitives sont très efficaces pour induire des réponses humorales en entraînant le pontage des BCR à la surface des LB (Bachmann *et al.*, 1993). Nous avons donc voulu vérifier l'immunogénicité des PPV du PapMV chez la souris. L'injection sous-cutanée de 25 µg de PPV du PapMV à des souris C3H/HeJ permet l'induction de hauts niveaux d'IgM et d'IgG spécifiques à la CP sans l'aide d'adjuvant (Denis *et al.*, 2007). De plus, l'injection intraveineuse de 100 µg des mêmes PPV à des souris C57BL/6 permet également l'induction de hauts titres d'IgM et d'IgG CP-spécifiques en absence d'adjuvant (Lacasse *et al.*, résultats non-publiés). Ces résultats ont permis de confirmer la forte immunogénicité des PPV du PapMV chez la souris. Nous avons également réussi à associer cette forte immunogénicité à la structure répétitive des PPV du PapMV en démontrant que l'immunisation de souris à l'aide de monomères réduit drastiquement les titres d'IgM et d'IgG spécifiques obtenus (Denis *et al.*, 2007). Cependant, comme les monomères sont dépourvus d'ARN bactérien et que ce dernier peut induire l'activation des CPA via certains TLR, nous ne pouvons pas exclure que l'immunogénicité des PPV du PapMV repose en partie sur la l'action de l'ARN bactérien contenu dans les PPV. Finalement, il est à noter que la nature particulière

des PPV du PapMV joue sans aucun doute un rôle important dans leur forte immunogénicité en favorisant leur capture et leur présentation par les DC.

7.4 Les pseudoparticules du virus de la mosaïque du papayer comme plateforme vaccinale

Comme mentionné précédemment, il est possible d'induire des réponses humorales et/ou cellulaires spécifiques contre des épitopes étrangers présentés à la surface de diverses PPV. Notre équipe a donc tenté d'exploiter la forte immunogénicité des PPV du PapMV afin de développer une nouvelle plateforme vaccinale versatile pouvant présenter des épitopes de virus étrangers au système immunitaire. Les diverses études que nous avons menées ont permis de démontrer la possibilité d'exposer divers épitopes étrangers à la surface des PPV du PapMV sans affecter considérablement la formation de ces PPV. Par exemple, l'insertion de l'épitope B E2 du VHC sur la CP du PapMV permet d'obtenir une quantité comparable de protéines recombinantes. De plus, des analyses de microscopie électronique ont confirmé que l'insertion de l'épitope E2 sur la CP ne nuisait pas à la formation des PPV (PPV du PapMV-E2). Cependant, il est à noter que les PPV du PapMV-E2 obtenues présentent une longueur inférieure à celle des PPV du PapMV n'exposant aucun épitope étranger. D'autre part, des analyses d'immunoblot ont permis de prouver que l'épitope E2 était bel et bien accessible à la surface de ces PPV. La structure secondaire des PPV du PapMV-E2 a également été déterminé par des études de dichroïsme circulaire et s'est avérée très similaire à celle des PPV du PapMV (Denis *et al.*, 2007; Lecours *et al.*, 2006). Finalement, en plus de l'épitope E2 du VHC, nous avons également démontré la possibilité d'insérer d'autres épitopes à la surface des PPV du PapMV, comme l'épitope CTL p33 du LCMV (PPV du PapMV-p33) (Lacasse *et al.*, sous presse), l'épitope CTL SIINFEKL de d'OVA (PPV du PapMV-OVA) (Lacasse *et al.*, sous presse) et l'épitope CTL M1 du virus influenza (PapMV-FLU) (Leclerc *et al.*, 2007).

L'injection sous-cutanée de 25 µg de PPV du PapMV-E2 sans adjuvant à des souris C3H/HeJ et Balb/c suivie d'une dose de rappel au jour 14 post-injection permet l'induction de réponses humorales spécifiques de longue durée à la fois contre la CP de PapMV et contre l'épitope E2 du VHC. De plus, l'isotypage des Ac produits a

permis de mettre en évidence la prévalence des isotypes IgG1, IgG2a et IgG2b et une production moins élevée d'IgG3. La commutation de classe des Ig observée chez les souris immunisées permet de confirmer que les PPV du PapMV-E2 induisent une réponse humorale ayant un profil T_H1/T_H2 équilibré et suggère la participation des $LT\ CD4^+$. D'autre part, les Ac spécifiques à la CP et au peptide E2 étaient toujours détectés dans le sérum des souris immunisées 120 jours après la dernière immunisation. Ceci démontre que les PPV du PapMV-E2 permettent l'induction de réponses humorales mémoires. À l'inverse, des immunisations menées dans les mêmes conditions à l'aide de monomères PapMV-E2 n'ont induit que de faibles taux de d'IgG spécifiques à la CP alors qu'aucun Ac contre l'épitope E2 n'a pu être détecté. Ces résultats apportent une preuve supplémentaire de l'importance de l'intégrité structurale pour l'immunogénicité des PPV du PapMV. Curieusement, les multimères et les monomères sont captés et internalisés par les DC avec une efficacité similaire *in vitro*. Suite à leur capture, les PPV et les monomères se retrouvent dans des compartiments intracytoplasmiques, vésiculaires et périnucléaires. Finalement, cette étude a permis de démontrer sans équivoque que la présence possible de LPS bactériens contaminants dans nos échantillons de PPV n'a aucun impact sur les réponses humorales observées (Denis *et al.*, 2007).

Dans une autre série d'expériences effectuées à l'aide de PPV du PapMV-FLU, notre laboratoire a démontré que cet épitope pouvait efficacement être apprêté et présenté sur les CMH-I par des CPA d'origine humaine via un mécanisme de présentation croisée. En effet, les deux types de CPA humaines testés (*i.e.* DC et LB stimulés via CD40) se sont montrés efficaces pour entraîner l'activation (*i.e.* production d'IFN- γ) et l'expansion d'une population de CTL M1-spécifiques. Il a également été possible de déterminer que la voie de présentation croisée utilisée par les DC et les LB humains ne requiert pas la participation du protéasome pour l'apprêtement et pour la présentation de l'épitope M1 à partir des PPV du PapMV. De plus, l'acidification des endosomes ne semble pas jouer un rôle essentiel dans ce processus (Leclerc *et al.*, 2007).

Les résultats des études menées jusqu'à maintenant sur les PPV du PapMV permettent de croire qu'elles pourraient être utilisées efficacement comme plateforme vaccinale capable de présenter des épitopes étrangers au système immunitaire. En effet, en plus

d'avoir démontré l'efficacité de cette plateforme dans l'induction de réponses humorales spécifiques de longue durée, nous avons déterminé que des PPV du PapMV présentant des épitopes CTL pouvait être dirigées vers les voies de présentation croisée pour y être apprêtées sur les CMH-I et permettre l'activation et la prolifération de LT CD8⁺ spécifiques. Des aspects importants du pouvoir immunogène des PPV du PapMV restent toutefois à être analysés, soit leur capacité à induire la maturation des DC et à induire des réponses immunitaires protectrices chez un hôte immunisé. Ces deux aspects seront d'ailleurs évalués dans la présente étude.

7.4.1 Avantages à utiliser les pseudoparticules du virus de la mosaïque du papayer comme plateforme vaccinale

Le besoin de produire des vaccins efficaces à faibles coûts est criant afin d'assurer l'approvisionnement en vaccins aux pays en voie de développement et de freiner le développement de plusieurs maladies infectieuses qui sévissent dans ces pays. En plus de leur forte immunogénicité, l'utilisation de PPV du PapMV comme plateforme vaccinale comporte plusieurs avantages qui répondent à ce besoin. Tout d'abord, cette plateforme est versatile et permet l'insertion de divers épitopes étrangers. D'autre part, ces PPV sont issues d'un virus de plante qui a évolué pour résister à des conditions environnementales variables. Ceci confère aux PPV du PapMV une très grande stabilité à température ambiante, ce qui élimine la nécessité de les réfrigérer afin de les conserver (Leclerc *et al.*, 2007; Tremblay *et al.*, 2006). En plus de réduire les coûts associés à leur transport et à leur entreposage, cette caractéristique des PPV du PapMV facilite grandement leur distribution dans les pays en voie de développement qui sont pour la plupart situés dans des régions tropicales. Finalement, comme l'hôte naturel du PapMV est le plant de papaye, il pourrait éventuellement être possible de produire les PPV du PapMV dans ces plantes. Notre équipe a d'ailleurs évalué que l'infection d'un hectare de plants de papaye permettrait la production d'un kilogramme de virus recombinants, ce qui représente des millions de doses vaccinales. Comme l'agriculture représente une façon simple et abordable de produire de la biomasse, ceci réduirait considérablement les coûts de production du vaccin tout en maximisant la quantité de matériel vaccinal obtenue.

ARTICLE

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Les résultats présentés dans l'article intitulé «Novel Plant Virus-Based Vaccine Induces Protective CTL-Mediated Antiviral Immunity Through Dendritic Cell Maturation» ont tous été générés par Patrick Lacasse à l'exception de ceux de la Figure 1 et de la Figure Supplémentaire 1 qui ont été obtenus par l'équipe du Dr Denis Leclerc du Centre de Recherche en infectiologie du CHUL à Québec.

Le Dr Alain Lamarre a supervisé le projet de recherche et a contribué à l'interprétation des résultats et à la discussion présentée dans l'article.

L'équipe du Dr Denis Leclerc a été responsable de la production et de la caractérisation des diverses PPV du PapMV. Elle a également été responsable de toutes les analyses de microscopie électronique effectuées sur les PPV produites.

Novel Plant Virus-Based Vaccine Induces Protective CTL-Mediated Antiviral Immunity Through Dendritic Cell Maturation¹

Running title: Papaya mosaic virus-like particles induce protective CTL responses

Patrick Lacasse^{*}, Jérôme Denis[†], Réjean Lapointe[‡], Denis Leclerc[†] and Alain Lamarre^{2,*}

^{*} Immunovirology Laboratory, Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Qc, Canada, H7V 1B7. Email address: alain.lamarre@iaf.inrs.ca

[†] Centre de Recherche en Infectiologie, Pavillon CHUL, Université Laval, 2705 boul. Laurier, Québec, Qc, Canada, G1V 4G2

[‡] Centre de Recherche, CHUM, Hôpital Notre-Dame, Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal, 2099, rue Alexandre-de-Sève, Montréal, Qc, Canada, H2L 4M1

Keywords: Vaccination, Viral, Dendritic cells, Cytotoxic T cells, Antigen presentation

ABSTRACT

Currently used vaccines protect mainly through the production of neutralizing antibodies. However, antibodies confer little or no protection for a majority of chronic viral infections that require an active involvement of cytotoxic T lymphocytes (CTLs). Virus-like particles (VLPs) have been shown to be efficient inducers of cell-mediated immune responses; however administration of adjuvant is generally required. We have recently reported the generation of a novel VLP system exploiting the self-assembly property of the papaya mosaic virus (PapMV) coat protein. We show here that uptake of PapMV-like particles by murine splenic dendritic cells (DCs) *in vivo* leads to their maturation suggesting that they possess intrinsic adjuvant-like properties. Dendritic cells pulsed with PapMV-like particles displaying the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) p33 immunodominant CTL epitope (PapMV-p33) efficiently process and cross-present the viral epitope to p33-specific transgenic T cells. Importantly, the CTL epitope is also properly processed and presented *in vivo* since immunization of p33-specific TCR transgenic mice with PapMV-p33 induces the activation of high numbers of specific CTLs. C57BL/6 mice immunized with PapMV-p33 VLPs in the absence of adjuvant develop p33-specific effector CTLs that rapidly expand following LCMV challenge and protect vaccinated mice against LCMV infection in a dose-dependant manner. These results demonstrate the efficiency of this novel plant virus-based vaccination platform in inducing DC maturation leading to protective CTL responses.

INTRODUCTION

For the past 200 years, vaccines have been widely used to prevent infections. Since the development of the first vaccine against smallpox by Jenner, multiple vaccination strategies have been tested in animals and humans, each of them showing variable levels of efficacy (13). However, the emergence of new infectious diseases and an incapacity to provide current vaccines to developing countries at low cost have prompted the development of novel vaccination strategies.

One of the major drawbacks of most currently available vaccines is their failure to induce cellular immunity against given antigens. Most vaccines promote the production of neutralizing antibodies that offer protection against acute viral infections (24, 47). In the context of chronic infections (*e.g.* HCV, HIV), neutralizing antibodies are potent in controlling free viral particles but are usually inefficient at eliminating infected cells (4, 9, 19). Recognition and destruction of infected cells by specific CTLs is essential to carry out an effective battle against such viruses. Professional APCs are key players in triggering adaptive immunity. In particular, dendritic cells (DCs) play a pivotal role in priming cellular immune responses (16, 36). To become strong inducers of immunity, DCs acquire a mature phenotype through diverse stimuli that induce a series of morphological and functional changes (20). These modifications include migration to lymphoid organs, production of cytokines and chemo-attractant molecules, and enhanced expression of essential cosignaling molecules like CD86, CD80 and CD40 that allows the establishment of key interactions between DCs and T cells. In addition to the classical MHC-I and MHC-II antigen presentation pathways, DCs were shown to be particularly potent in presenting exogenous antigens onto MHC-I molecules through a process known as cross-presentation (10). To this date, the *in vivo* importance of cross-presentation is still under debate, but recent studies have shown that this process probably plays a crucial role in driving T cell responses against exogenous antigens and to pathogens that do not infect DCs (29). Therefore, due to the efficacy of DCs to induce cellular immunity, new vaccination strategies should aim at targeting and activating these professional APCs to promote the development and maintenance of potent CTL responses.

Recently, virus-like particles (VLPs) have received much attention for their potential for vaccine development. VLPs mimic the structure of viral particles without containing infectious genetic material making them safe alternatives to conventional live or attenuated vaccines (23). A number of different VLPs were shown to be highly immunogenic antigen carriers capable of inducing humoral immune responses. As examples, VLPs expressing proteins from influenza virus, papillomavirus and rotavirus all induce high titers of neutralizing or protective antibodies (25, 28, 35). Some VLPs were also shown to induce CTL responses. Recombinant parvovirus-like particles expressing an epitope from the nucleoprotein of LCMV induce protective CTL responses (33). Hepatitis B surface antigen VLPs expressing both respiratory syncytial virus and human papillomavirus CTL epitopes elicit simultaneous responses to both pathogens (42). However, many VLPs require the co-administration of adjuvant-like molecules (i.e. CpGs or anti-CD40 antibodies) for the induction of strong CTL immunity (18, 27, 37, 44). In recent years, the use of plant virus-derived VLPs as novel systems for the expression of foreign epitopes and for the development of new vaccines has triggered much interest. By genetically modifying these viruses, immunogenic peptides can be efficiently fused to the coat protein (CP) and exposed on the surface of the assembled plant VLPs. To date, cowpea mosaic virus, tobacco mosaic virus, alfalfa mosaic virus, potato virus C, tomato bushy stunt virus, zucchini yellow mosaic virus and plum pox virus are all examples of plant viruses that have been successfully produced and used for the presentation of murine and human epitopes (6, 7, 22).

We have recently described the generation of a VLP system based on the papaya mosaic virus (PapMV) (39). PapMV, a member of the potexvirus family, displays a flexible rod-like structure composed of 1400 subunits of the viral coat protein assembled around a positive-strand RNA (8, 34, 39, 46). PapMV VLPs, formed by the self-assembly of the CP after over expression in *E. coli* (39), can carry foreign epitopes and induce the production of specific antibodies in vaccinated mice (7). Moreover, we have recently shown that a human B cell line can cross-present CTL epitopes displayed on PapMV VLPs to specific T cells *in vitro* in a proteasome-independent fashion (14). To determine whether such VLPs could also trigger the development of protective cellular immunity *in vivo*, a PapMV VLP carrying the H-

2^b-restricted dominant p33 CTL epitope (PapMV-p33 VLPs) from lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) was engineered and evaluated for its capacity to induce CTL responses against LCMV. We show here that vaccination with PapMV-p33 VLPs induces DC maturation and cross-presentation of the p33 CTL epitope *in vivo* resulting in the induction of protective cell-mediated antiviral immunity.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Female 6-10 week-old C57BL/6 mice were purchased from Charles River (Saint-Constant, Canada). P14 TCR-transgenic mice were obtained from P. Ohashi (Princess Margaret Hospital, Toronto, Canada). P14 mice express a transgenic V α 2 and V β 8.1 TCR specific for the p33 CTL epitope from the LCMV surface glycoprotein. 70-90% of their CD8⁺ T cells are p33-specific. All animal experiments were reviewed and approved by the INRS-IAF Animal Care and Use Committee.

Cells, virus and peptides

LCMV WE was obtained from R. M. Zinkernagel (Institute of Experimental Immunology, Zurich, Switzerland). The p33 synthetic peptide KAVYNFATM corresponding to a H-2^b-restricted CTL epitope from the LCMV surface glycoprotein was synthesized by Sigma-Genosys (Oakville, Ontario). EL-4 thymoma cells (H-2^b) were grown in MEM (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ontario) containing 10% heat-inactivated FBS (Invitrogen). MC57G fibroblasts were cultured in MEM containing 5% heat-inactivated FBS.

Cloning of the recombinant PapMV-p33 construct

The PapMV CP gene was cloned into the pET-3d-derived CP Δ N5 vector as previously described (26). The recombinant protein PapMV-p33 was derived from the PapMV CP construct fused to the p33 peptide (PapMV-p33) (Fig. 1A). To fuse the p33 peptide at the C-terminus of CP Δ N5, the following oligonucleotides, 5'CTAGTGGTGGCGGTCTGTTGCTGAAAGCGGTGTATAACTTTGCGACCAT GA-3' and 5'CGCGTCATGGTCGCAAAGTTATACACCGCTTTCAGCAACAGACCGCCACCA3', were annealed in 10mM Tris, pH 8 and 50mM NaCl and used directly for cloning in the plasmid containing the PapMV CP linearized with the SpeI-MluI cloning sites. The p33 peptide was flanked by 3 leucine and 3 glycine residues at

its N-terminus and 2 threonine and 1 arginine residues at the C-terminus. The insertion was positioned between the C-terminus of the PapMV CP and a 6xHis tag.

Expression and purification of recombinant proteins from E. coli

The *E. coli* expression strain BL21 (DE3) RIL (Stratagene, Torrey Pines Road, La Jolla, CA, USA) was transformed with the pET-3d plasmid containing the constructs of interest, and maintained in 2xYT medium containing ampicillin (50 mg/ml). Recombinant proteins were purified by affinity chromatography on a nickel sepharose column as previously described (26). Two additional washing steps were done sequentially using buffer A:10 mM Tris-HCl 50 mM Imidazole 0.5% Triton X100 pH8, and then buffer B:10 mM Tris-HCl, 50 mM Imidazol, 1% Zwittergent pH8 to remove endotoxin contamination. Protein purity was determined by SDS-PAGE and confirmed by immunoblot analysis using rabbit polyclonal antibodies specific to PapMV. LPS levels were determined by the limulus amebocyte lysate assay according to manufacturer's instructions (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD) and were always under 0.005 endotoxin units (EU)/ μ g of protein.

Electron microscopy

VLPs were diluted in 10 mM Tris-HCl pH 8 and were absorbed for 3 min on a carbon-coated formvar grid. The grid was then washed 3 times for 1 min using the same buffer and stained with 0.1% uranyl acetate for 10 min at room temperature. The grids were then observed on a Jeol JEM220FS transmission electron microscope.

Antibodies and flow cytometry

For cytometry analysis of mouse surface antigens, the following mAbs were used: anti-CD4-FITC (clone H129.19), anti-CD8 α -FITC or anti-CD8 α -PE (clone 53-6.7), anti-CD11c-FITC (clone HL3), anti-CD40-PE (clone 3/23), anti-CD45R-FITC (clone RA3-6B2), anti-CD69-PerCP-Cy5.5 (clone H1.2F3), anti-CD80-PE (clone 16-10A1), anti-CD86-PE (clone GL1), isotype controls for the anti-CD40 and anti-CD86 mAbs (Rat IgG2a, κ) and anti-CD80 mAbs (Armenian Hamster IgG2, κ) (all from BD

Biosciences, Mississauga, Ontario). FITC-coupled F4/80 mAb (clone BM8) and anti-IFN- γ -FITC (clone XMG1.2) were obtained from eBioscience (San Diego, CA). Stainings were performed for 20 min at 4°C. PE-coupled p33-H-2^b tetrameric complexes (Tet-gp33) were synthesized as previously described (30) and stainings were performed for 20 min at 37°C. All cytometry analysis were performed on a FACScalibur cytometer (BD Bioscience) and data were analyzed using the WinMDI software.

Isolation of splenic DCs

Spleens of C57BL/6 mice were treated with 400 U/mL collagenase type IV (Roche Diagnostics, Laval, Quebec) for 45 min at 37°C, 5 % CO₂. Spleen cells were isolated by passing through a 100 μ m cell strainer and incubated 20 min at 4°C with CD11c-specific colloidal paramagnetic beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) in pre-filtered running buffer (0.5% BSA in PBS). After washing the cells once with running buffer, CD11c⁺ spleen cells were positively selected using an autoMACS system (Miltenyi Biotec). The purity of the positive fraction was always above 95%. Where indicated, the negative fraction was kept for subsequent analysis. CD11c⁺ cells were cultured in MEM 10% and were analyzed by flow cytometry after staining with FITC-coupled anti-mouse CD11c mAbs.

Capture assay of PapMV-like particles

PapMV-like particles were labelled using an Alexa Fluor 647 Protein Labelling Kit (Molecular Probes, Eugene, OR) according to manufacturer's instructions. Labelling efficiency was determined by spectrophotometry and was similar for both control and PapMV-p33 VLPs. For the *in vivo* capture assay, C57BL/6 mice were injected i.v. with 100 μ g of labelled VLPs and CD11c⁺ cells were purified from spleens 2h post-injection. Samples from the negative fraction obtain after purification of splenic CD11c⁺ cells were stained with FITC-coupled anti-mouse CD45R, F4/80, X Δ 8 α or CD4 mAbs. For the *in vitro* capture assay, purified CD11c⁺ spleen cells from C57BL/6 mice were pulsed 2h with various concentrations (0.5, 1 or 5 μ g) of Alexa Fluor 647-labelled VLPs. All samples were analyzed as previously described.

Confocal microscopy

For the *in vivo* internalization assay, mice were injected with 100 µg of Alexa Fluor 647-labelled VLPs i.v. and spleens were collected 2h later. CD11c⁺ spleen cells were adhered on slides coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) by centrifugation at 650 rpm for 1 min. Cells were fixed with 10% formalin for 20 min and labelled 45 min at room temperature with Alexa Fluor 488-conjugated wheatgerm agglutinin (Molecular Probes) as a membrane marker. After 3 washes with PBS, slides were mounted using ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes) and analyzed using a Zeiss LSM 510 META scanning confocal microscope mounted on an Axiovert 100 oil immersion objective (Carl Zeiss, Jena, Germany). Images were processed using the LSM 510 v3.2 software (Carl Zeiss). For the *in vitro* capture assay, purified CD11c⁺ spleen cells from naïve C57BL/6 mice were incubated 2h at 37°C with different quantities (0.5, 1 or 5 µg) of Alexa Fluor 647-labelled VLPs. Cells were then washed, stained and analyzed as described above.

In vivo DCs maturation assay

C57BL/6 mice were immunized i.v. with 100 µg of control PapMV VLPs, PapMV-p33 VLPs or with 25 µg of LPS from *E. coli* serotype 5 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) as a positive control. At 2, 6 or 24h post-injection, CD11c⁺ spleen cells were stained with FITC-coupled anti-mouse CD11c mAb in combination with PE-coupled anti-mouse CD40, CD80, CD86 or isotype control mAbs. Samples were acquired and analyzed by flow cytometry as described above.

T cell proliferation assay

For the *in vitro* assay, CD11c⁺ spleen cells were treated 2h with mitomycin C (Sigma-Aldrich). Following three washes in MEM 5% FBS, 5x10⁴ cells/well were added in 96-well round-bottom plates and pulsed 8h with various concentrations (10, 100, 500 or 1000 ng) of control PapMV or PapMV-p33 VLPs. LCMV p33 synthetic peptide-pulsed DCs served as positive controls. Magnetically isolated splenic p33-specific

CD8 T lymphocytes from P14 transgenic mice were added (1×10^5 /well) to pulsed DCs. After 24h, 0,4 μ Ci of 3 H-thymidine was added to each well and cells were cultured for another 24h. Cells were harvested with a MACH 2 Harvester 96 (TomTec, Hamden, CT) and proliferation of p33-specific CD8⁺ T lymphocytes was evaluated by measuring 3 H-thymidine incorporation in cellular DNA with a Trillux 1450 MicroBeta counter (Perkin-Elmer, Woodbridge, Ontario). Surface expression of CD69 on proliferating p33-specific CD8⁺ T lymphocytes was also analyzed. Briefly, cells were stained with PE-coupled p33-H-2^b tetrameric complexes, FITC-coupled anti-mouse CD8 α and PerCP-coupled anti-mouse CD69 mAbs. Samples were acquired and analyzed by flow cytometry as described above. For the *in vivo* assay, P14 transgenic mice were injected i.v. with 100 μ g of control PapMV or PapMV-p33 VLPs. Spleens were collected 24h post-immunization and the activation state of p33-specific CD8⁺ T lymphocytes was evaluated as described above.

Detection of p33-specific CD8⁺ T lymphocytes in immunized mice

Spleens of immunized mice were collected 7 days following the last recall injection. Cells were stained with PE-coupled p33-H-2^b tetrameric complexes and FITC-coupled anti-mouse CD8 α mAb. 7-AAD (BD Bioscience) was used for exclusion of dead cells. Samples (50,000 events in the lymphocyte gate) were acquired and analyzed by flow cytometry as described above. Statistical analysis was done by an unpaired t test using the GraphPad Prism 4.0 software.

Detection of IFN- γ producing CD8⁺ T lymphocytes

Five days following LCMV infection, spleen cells were restimulated for 5h at 37°C and production of IFN- γ by CD8⁺ cells was evaluated. Briefly, 1×10^6 spleen cells were incubated in 96-well round-bottom plates in 5% RPMI supplemented with 100 units/mL mouse rIL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 μ g/mL Brefeldin A (Sigma) and either PBS, 100 ng/mL PMA (Sigma) and 1 μ g/mL ionomycin (Sigma) or 10 μ M p33 peptide (Sigma Genosys). Cells were then stained with PE-coupled anti-mouse CD8 α mAb and 7-AAD (BD Bioscience). Cells were fixed, permeabilized

and stained with an anti-IFN- γ -FITC mAb (eBioscience) and analyzed by flow cytometry as described above.

⁵¹Cr release assay

Five days following LCMV infection of immunized mice, spleen cells were tested for their cytotoxic activity in a standard ⁵¹Cr release assay. Briefly, EL-4 target cells were pulsed with 10⁻⁶ M of p33 synthetic peptide and labelled with 250 mCi ⁵¹Cr for 2h at 37°C on a rocking platform. Labelled EL-4 cells were washed three times with MEM 2% FBS and 10⁴ cells were added to splenic effector cells in 96-well round-bottom plates and incubated for 5h at 37°C. Thirty microliters of each supernatant was mixed for 30 min with 150 μ L of OptiPhase SuperMix (Perkin-Elmer). Radioactivity release was measured using a Trillux 1450 MicroBeta counter (Perkin-Elmer). The percentage of specific lysis was calculated as 100 x (experimental release - spontaneous release) / (maximum release - spontaneous release). Maximum release was accomplished by adding 2% Triton X-100 (prepared in MEM) to target cells alone and spontaneous release was obtained by incubating target cells without effector cells.

LCMV focus assay

Immunized C57BL/6 mice were injected i.v. with 200 PFU of LCMV WE. Five days post-infection spleens were collected and a LCMV focus-forming assay was performed as previously described (31). Briefly, 2-fold serial dilutions of spleen homogenates were added onto MC57G cell monolayers in 24-well culture plates. Cells were cultured for 48h under an overlay of 1% methylcellulose and fixed with 25% formalin in PBS. Fixed cells were stained with rat anti-LCMV VL-4 mAb (kindly given by Dr R. M. Zinkernagel), HRP-conjugated goat anti-rat mAbs (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and HRP-conjugated swine anti-goat mAbs (Biosource, Camarillo, CA). Ortho-phenylene diamine (Sigma-Aldrich) was used to reveal the infectious foci.

RESULTS

Dendritic cells internalize PapMV VLPs and acquire a mature phenotype.

Overexpression of PapMV CP in *E. coli* produces VLPs that display a structure similar to the wild type plant virus (39). We generated VLPs expressing the p33 immunodominant CTL epitope from the LCMV glycoprotein genetically fused to the CP through a triglycine, tri-leucine linker (Fig. 1A). Bacterial expression of control PapMV CP or PapMV-p33 yielded 29 kDa proteins (Fig. 1B, lane 3) that were purified by nickel affinity chromatography (Fig. 1B, lane 4). Extensive washes were performed to remove all traces of LPS and VLPs were isolated by high-speed ultracentrifugation (Fig. 1B, lane 5). Electron microscopy analysis revealed that PapMV-p33 VLPs displayed a rod-like structure resembling native PapMV virions and control PapMV VLPs with, however a rougher appearance (Fig. 1C).

We next evaluated the capacity of various murine splenic cells to interact with PapMV VLPs labeled with Alexa-Fluor 647 *in vivo*. Fluorescent VLPs were administered to C57BL/6 mice by i.v. injection and 2h later, the amount of VLPs associated with different cell types was determined by flow cytometry (Fig. 2A). All APCs (DCs, B cells and macrophages) were able to interact with labeled PapMV-p33 VLPs at various extents but DCs were the most efficient with more than 40% of CD11c⁺ cells being associated with PapMV-p33 labeled-VLPs. As expected, both CD4⁺ and CD8⁺ T cells did not significantly interact with the VLPs (data not shown). Interestingly, higher amounts of PapMV-p33 VLPs were associated with all APC types compared to control PapMV VLPs suggesting that the presence of the CTL epitope influences the interaction. To determine whether this is due to differences in VLP capture or dissemination *in vivo*, splenic DCs were purified and pulsed *in vitro* for 2h with labeled-VLPs and the levels of VLPs associated with DCs were determined by flow cytometry (data not shown). Both VLPs associated with purified DCs with similar efficiency suggesting that differences observed *in vivo* were probably the result of different degradation or dissemination kinetics. Confocal microscopy analysis of sorted CD11c⁺ DCs from VLP immunized mice confirmed that the fluorescently labeled material is localized in the cytoplasm (Fig. 2B).

Fluorescently labeled PapMV-p33 VLPs are mostly found in large vesicular structures in contrast to control PapMV particles that appear more evenly distributed in the cytoplasm. This suggests that insertion of the p33 epitope in PapMV VLPs possibly modified their structure allowing them to be internalized by DCs in a more stable particulate form. This hypothesis is supported by the observation that PapMV VLPs fused to an irrelevant ovalbumin epitope shows a similar vesicular localization pattern as PapMV-p33 VLPs (data not shown).

Mature DCs are the most efficient APC type capable of priming naive T cells, we therefore evaluated whether PapMV VLP uptake by splenic DCs could lead to their maturation. Six hours following i.v. immunization of C57BL/6 mice with PapMV VLPs, splenic CD11c⁺ DCs were isolated by magnetic cell sorting and the upregulation of cosignaling molecules (CD40, CD80 and CD86) was determined by flow cytometry (Fig. 2C). Both control PapMV and PapMV-p33 VLPs similarly induce significant upregulation of CD40, CD80 and CD86 suggesting that the presence of the p33 epitope does not affect this process. To ensure that maturation was not resulting from traces of LPS contaminating the preparations, endotoxin levels in each purified VLP stocks was quantified using the limulus amoebocyte lysate assay. The corresponding trace amounts of contaminating LPS were administered to C57BL/6 mice and cytometric analysis of cosignaling molecules expression levels on DCs revealed that such minute amounts of LPS had no significant effect on DC maturation (data not shown). These results suggest that PapMV VLPs possess an intrinsic adjuvant-like property that induces DC maturation. Compared to other VLP-based systems, PapMV VLPs seem one of the more potent at inducing the upregulation of cosignaling molecules on DCs (15, 18, 40, 41).

DCs efficiently process and present the p33 CTL epitope displayed on PapMV VLPs

To assess whether the LCMV p33 CTL epitope displayed on PapMV VLPs could be correctly cleaved, processed and presented by DCs to specific T cells, purified splenic CD11c⁺ DCs were pulsed for 8h with various concentrations of VLPs and co-cultured with p33-specific naive CTLs isolated from TCR transgenic P14 mice. Proliferation of p33-specific CTLs was assessed by thymidine incorporation (Fig. 3A). PapMV-p33 was very efficiently processed and presented by DCs as it induced high levels of CTL

proliferation. As little as 100 ng of VLP (equivalent to 2 ng of free peptide) induced significant T cell proliferation whereas up to 1 µg of control PapMV VLPs did not. The ability of pulsed DCs to activate p33-specific naive T cells was next analyzed by quantifying the upregulation of the T cell activation marker CD69 by flow cytometry (Fig. 3B). P33-specific CTLs co-cultured with PapMV-p33 pulsed DCs became fully activated with more than 90% upregulating CD69. To determine whether the efficient capture, processing and presentation of heterologous epitopes presented on PapMV VLPs could also be observed *in vivo*, p33-specific P14 TCR transgenic mice were injected i.v. with 100 µg of PapMV VLPs and the activation of splenic p33-specific CTLs was analyzed 24h after injection by evaluating CD69 surface expression (Fig. 3C). More than 80% of splenic p33-specific T cells from PapMV-p33-injected P14 mice express CD69, compared to less than 4% for mice injected with control PapMV VLPs. Taken together, these results clearly demonstrate that DCs can efficiently process and cross-present the p33 CTL epitope displayed on PapMV VLPs.

Vaccination with PapMV-p33 VLPs generates specific CTLs

The ability of PapMV-p33 VLPs to induce the development of a specific CTL response in mice was then evaluated. Having showed that PapMV VLPs possess adjuvant-like properties, C57BL/6 mice were injected i.v. with 100 µg of VLPs in PBS without adjuvant. Following the administration of three identical booster injections at 10-day intervals, total spleen cells were directly analyzed *ex vivo* by p33-tetramer staining (Fig.4). Mice administered with PapMV-p33 VLPs developed significant numbers of p33-specific T cells ($0.75 \pm 0.05\%$) compared to mice injected with control PapMV VLPs ($0.03 \pm 0.008\%$) ($p < 0.0001$, N=6). This shows that PapMV VLPs can efficiently prime peptide-specific T cell responses *in vivo* without the need for using adjuvant.

Immunization with PapMV-p33 VLPs induces protective effector CTL responses against LCMV infection

Acute LCMV infection is exclusively controlled by CTLs (35-37). To determine whether the CTL responses induced by PapMV VLP immunization could protect against viral infections, vaccinated mice were challenged with LCMV. Mice were

primed with an i.v. injection of 100 µg of PapMV VLPs without adjuvant and received two or three identical booster injections at 10-day intervals. Mice were challenged with 200 PFU of LCMV 7 days after the last booster injection. To visualize CTL expansion, the number of p33-specific T cells was determined by tetramer staining 5 days following infection (Fig. 5A), at a time when p33-specific T cells generated by the primary response to LCMV are not yet detectable (data not shown). Mice having received two booster injections of PapMV-p33 VLPs showed p33-specific T cell frequencies of ~3.3% of CD8⁺ T cells (data not shown) whereas mice receiving three booster injections had even higher numbers of specific T cells (~7.3%) suggesting that the frequency of specific T cells generated by vaccination increased through repeated injections. Importantly, mice vaccinated with either two (data not shown) or three booster injections of the control PapMV VLPs showed no detectable p33-specific CTLs (Fig. 5A). We next determined whether the p33-specific T cells generated through VLP vaccination displayed effector function by intracellular IFN-γ staining (Fig. 5B). Mice vaccinated with PapMV-p33 VLPs showed frequencies of IFN-γ production of (~6.9%) of CD8⁺ T cells whereas no significant IFN-γ production was detected in the control PapMV vaccinated group. It is noteworthy that the frequencies detected by tetramer staining and IFN-γ staining were very similar suggesting that most p33-specific T cells detected by tetramer staining display effector function. We then evaluated whether these CTLs also displayed lytic effector function using a standard ⁵¹Cr release assay (Fig. 5C). PapMV-p33 vaccinated group showed high levels of cytolytic activity whereas no cytotoxicity could be observed in the PapMV vaccinated control group. To determine if such cytotoxic responses are protective against LCMV infection, splenic viral titers were determined 5 days following challenge (Fig. 6). Mice having received one or two booster injections of PapMV-p33 VLPs were partially protected from LCMV infection whereas mice receiving three boosts of the same VLP preparation were fully protected as indicated by the absence of detectable virus in the spleen. In contrast, mice receiving three booster injections of control PapMV VLPs showed high LCMV titers in the spleen. Taken together these results demonstrate that vaccination with PapMV-p33 VLPs induces the development of p33-specific effector T cells in a dose-dependant manner and that protection from LCMV infection correlates with the number of effector T cells generated.

DISCUSSION

There is an urgent need for the development of vaccines capable of inducing cellular responses against chronic viral infections and cancers. We describe here a novel plant virus-based vaccination platform that induces protective cellular immune responses. PapMV-like particles displaying the immunodominant p33 CTL epitope from LCMV are internalized by DCs and cross-presented to specific CTLs. We have recently reported that this is achieved through a proteasome-independent pathway (14) as was shown for another VLP-based system (30). Importantly, and in contrast to many VLPs described so far, PapMV-like particles directly prime protective CTL responses *in vivo* without adjuvant (i.e. CPGs, anti-CD40). This ability probably resides in their intrinsic capacity to induce DC maturation. The critical importance of activating APCs for priming CTL responses to VLPs was demonstrated in a study by Storni *et al.* (37). Hepatitis B VLPs fused to the p33 CTL epitope induced effective protection against LCMV infection only when co-administered with anti-CD40 antibodies or CpG oligonucleotides suggesting that these particular VLPs do not directly induce DC maturation. Similarly, another VLP system based on bacteriophage Q β could induce high numbers of peptide specific T cells using a prime-boost regimen but again CpG oligonucleotides were required (32). CpGs have been shown to be potentially harmful by destroying splenic architecture and inducing immunosuppression following repetitive treatment and by altering fetal development at high doses (11, 26). Thus, the ability of PapMV VLPs to induce DC maturation without the need of co-injecting CpGs offers a significant advantage compared to other systems more dependent on adjuvant administration. Our results suggest that PapMV particles possess pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) recognized by a pattern-recognition receptor (PRR) on DCs, which upon binding, leads to their maturation. We have previously showed that assembly of PapMV VLPs into rodlike structures requires RNA (39). Thus, one possible PAMP candidate associated with PapMV VLPs could be bacterial RNA. PRRs, such as Toll-like receptors (TLRs) have been implicated in the activation of DCs by VLPs as illustrated by the failure of human papillomavirus VLPs to up regulate IL-12 and IFN- α and - γ in MyD88^{-/-} DCs, a key adaptor protein involved in the signaling pathway of many TLRs (43). Recently, McCormick *et al.* reported that Tobacco mosaic virus (TMV)-like particles also induce DC maturation demonstrating that recognition of plant virus PAMPs by DCs is not restricted to PapMV but is

probably a more general phenomenon (18). However in this system, the ability of TMV VLPs to induce DC maturation was not sufficient to allow avoiding the use adjuvant since administration of CpG DNA was needed to confer partial protection against tumor challenge (18).

We showed that higher amounts of PapMV-p33 VLPs compared to control PapMV VLPs were found associated with splenic APCs 2h post-immunization. This is not due to different binding and uptake efficiencies since *in vitro*, both VLPs are similarly internalized by purified DCs. This suggests that PapMV-p33 VLPs have different dissemination or degradation kinetics *in vivo* than control PapMV-VLPs indirectly influencing uptake by splenic APCs. Supporting evidence for this comes from confocal microscopy analysis showing that PapMV-p33 VLPs are mostly found in intracytoplasmic vesicles as large aggregates in contrast to control PapMV VLPs that appear more evenly distributed in the cytoplasm. A similar observation was made using a control VLP expressing the SIINFEKL CTL epitope from ovalbumin (data not shown). Slight modifications in the overall VLP structure induced by the insertion of the foreign epitopes might render the VLPs more stable *in vivo*. Additional experiments will be required to pinpoint the exact mechanism involved and the precise intracellular localization of the internalized VLPs.

In this study we show that vaccination of naive C57BL/6 mice with PapMV VLPs without adjuvant induces p33-specific CTLs. Relatively high p33-specific CTL frequencies were generated by VLP vaccination as shown by their direct *ex vivo* detection by tetramer staining. Most other VLP systems displaying the p33 epitope have been shown to require the use of adjuvant to generate significant CTL responses (32, 37, 38). Moreover when compared to vaccination with peptide loaded DCs or peptide in adjuvant, PapMV-p33 VLPs induce either higher or similar numbers of p33-specific T cells as such systems (17, 37, 45). In addition, the p33-specific CTLs induced by PapMV-p33 VLP vaccination rapidly expand following LCMV infection and their frequency augments with the number of injections given. Moreover, induced CTLs produce IFN- γ and show strong cytolytic activity against p33-pulsed target cells. Importantly, protection from LCMV infection correlates with the frequency of specific T cells generated and the number of VLP doses given. This situation is reminiscent of prime-boost protocols used to trigger highly effective T cell responses.

It is well recognized that the heterologous prime-boost approach is a highly effective way of generating specific CTLs (2, 12, 31). However, the efficiency of a homologous prime-boost regimen is less well documented. Nevertheless, a study by Schwarz *et al.* showed that vaccines based on VLPs are equally effective at inducing antiviral CTL responses if administered in a homologous or heterologous prime-boost setting (32). In addition, they showed that repeated injections of VLPs were required to maintain high frequencies of specific CTLs. Our results support these data and suggest that repeated homologous recall injections of a CTL épitope displayed on PapMV VLPs also induce a highly efficient T cell response that can protect against a rapidly spreading viral infection.

In conclusion, our data demonstrate that PapMV-based VLPs can directly interact with DCs inducing their maturation and leading to the efficient processing and cross presentation of a LCMV CTL épitope triggering a protective antiviral T cell response. We believe that the future use of plant virus-based vaccines should provide a safe, stable, and economical prophylactic tool for the fight against chronic viral infections and cancer.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pamela Ohashi for providing P14 mice and Marcel Desrosiers for assistance with flow cytometry analysis. We also thank Tanya Girard, Veronika von Messling and Emmanuel Moreau for critically reviewing the manuscript.

FOOTNOTES

¹ This work was supported by grants 53355 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and 262607 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. A. Lamarre is a CIHR New Investigator Award recipient and holds the Jeanne et J.-Louis Lévesque chair in immunovirology from the J.-Louis Lévesque Foundation. P. Lacasse wishes to thank the Armand-Frappier Foundation for studentship support.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Alain Lamarre, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

³ Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; VLP, virus-like particle; PapMV, papaya mosaic virus; CP, coat protein; *E. coli*, *E. coli*; LCMV, lymphocytic choriomeningitis virus

REFERENCES

1. Altman, J. D., P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, and M. M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-6.
2. Amara, R. R., F. Villinger, J. D. Altman, S. L. Lydy, S. P. O'Neil, S. I. Staprans, D. C. Montefiori, Y. Xu, J. G. Herndon, L. S. Wyatt, M. A. Candido, N. L. Kozyr, P. L. Earl, J. M. Smith, H. L. Ma, B. D. Grimm, M. L. Hulsey, J. Miller, H. M. McClure, J. M. McNicholl, B. Moss, and H. L. Robinson. 2001. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292:69-74.
3. Battegay, M., S. Cooper, A. Althage, J. Banziger, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1991. Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *J. Virol. Methods* 33:191-8.
4. Bramwell, V. W., and Y. Perrie. 2005. The rational design of vaccines. *Drug Discov. Today* 10:1527-34.
5. Byrne, J. A., and M. B. Oldstone. 1984. Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus: clearance of virus in vivo. *J. Virol.* 51:682-6.
6. Canizares, M. C., L. Nicholson, and G. P. Lomonossoff. 2005. Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol. Cell Biol.* 83:263-70.
7. Denis, J., N. Majeau, E. Acosta-Ramirez, C. Savard, M. C. Bedard, S. Simard, K. Lecours, M. Bolduc, C. Pare, B. Willems, N. Shoukry, P. Tessier, P. Lacasse, A. Lamarre, R. Lapointe, C. Lopez Macias, and D. Leclerc. 2007. Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization. *Virology* 363:59-68.
8. Erickson, J. W., J. B. Bancroft, and R. W. Horne. 1976. The assembly of papaya mosaic virus protein. *Virology* 72:514-7.
9. Freeman, A. J., G. Marinos, R. A. French, and A. R. Lloyd. 2001. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol. Cell Biol.* 79:515-36.
10. Heath, W. R., G. T. Belz, G. M. Behrens, C. M. Smith, S. P. Forehan, I. A. Parish, G. M. Davey, N. S. Wilson, F. R. Carbone, and J. A. Villadangos. 2004. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.* 199:9-26.
11. Heikenwalder, M., M. Polymenidou, T. Junt, C. Sigurdson, H. Wagner, S. Akira, R. Zinkernagel, and A. Aguzzi. 2004. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat. Med.* 10:187-92.

12. Kent, S. J., A. Zhao, S. J. Best, J. D. Chandler, D. B. Boyle, and I. A. Ramshaw. 1998. Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. *J. Virol.* 72:10180-8.
13. Leclerc, C. 2003. New approaches in vaccine development. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26:329-41.
14. Leclerc, D., D. Beauseigle, J. Denis, H. Morin, C. Pare, A. Lamarre, and R. Lapointe. 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. *J. Virol.* 81:1319-26.
15. Lenz, P., P. M. Day, Y. Y. Pang, S. A. Frye, P. N. Jensen, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 2001. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J. Immunol.* 166:5346-55.
16. Levin, D., S. Constant, T. Pasqualini, R. Flavell, and K. Bottomly. 1993. Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen in vivo. *J. Immunol.* 151:6742-50.
17. Ludewig, B., S. Ehl, U. Karrer, B. Odermatt, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1998. Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity. *J. Virol.* 72:3812-8.
18. McCormick, A. A., T. A. Corbo, S. Wykoff-Clary, L. V. Nguyen, M. L. Smith, K. E. Palmer, and G. P. Pogue. 2006. TMV-peptide fusion vaccines induce cell-mediated immune responses and tumor protection in two murine models. *Vaccine* 24:6414-23.
19. McMichael, A. J. 2006. HIV vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 24:227-55.
20. Mellman, I., and R. M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255-8.
21. Moskophidis, D., S. P. Cobbold, H. Waldmann, and F. Lehmann-Grube. 1987. Mechanism of recovery from acute virus infection: treatment of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice with monoclonal antibodies reveals that Lyt-2+ T lymphocytes mediate clearance of virus and regulate the antiviral antibody response. *J. Virol.* 61:1867-74.
22. Natilla, A., G. Piazzolla, M. Nuzzaci, P. Saldarelli, C. Tortorella, S. Antonaci, and P. Piazzolla. 2004. Cucumber mosaic virus as carrier of a hepatitis C virus-derived epitope. *Arch. Virol.* 149:137-54.
23. Noad, R., and P. Roy. 2003. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11:438-44.

24. Pantaleo, G., and R. A. Koup. 2004. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat. Med.* 10:806-10.
25. Perez, N., C. Fourgeux, A. Mohamed, C. Dubuquoy, M. Pillot, A. Dehee, A. Charpilienne, D. Poncet, I. Schwartz-Cornil, and A. Garbarg-Chenon. 2006. Rectal immunization with rotavirus virus-like particles induces systemic and mucosal humoral immune responses and protects mice against rotavirus infection. *J. Virol.* 80:1752-61.
26. Prater, M. R., V. J. Johnson, D. R. Germolec, M. I. Luster, and S. D. Holladay. 2006. Maternal treatment with a high dose of CpG ODN during gestation alters fetal craniofacial and distal limb development in C57BL/6 mice. *Vaccine* 24:263-71.
27. Qian, J., Y. Dong, Y. Y. Pang, R. Ibrahim, J. A. Berzofsky, J. T. Schiller, and S. N. Khleif. 2006. Combined prophylactic and therapeutic cancer vaccine: enhancing CTL responses to HPV16 E2 using a chimeric VLP in HLA-A2 mice. *Int. J. Cancer* 118:3022-9.
28. Quan, F. S., C. Huang, R. W. Compans, and S. M. Kang. 2007. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. *J. Virol.* 81:3514-24.
29. Rock, K. L., and L. Shen. 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol. Rev.* 207:166-83.
30. Ruedl, C., T. Storni, F. Lechner, T. Bachi, and M. F. Bachmann. 2002. Crosspresentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur. J. Immunol.* 32:818-25.
31. Schneider, J., S. C. Gilbert, T. J. Blanchard, T. Hanke, K. J. Robson, C. M. Hannan, M. Becker, R. Sinden, G. L. Smith, and A. V. Hill. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat. Med.* 4:397-402.
32. Schwarz, K., E. Meijerink, D. E. Speiser, A. C. Tissot, I. Cielens, R. Renhof, A. Dishlers, P. Pumpens, and M. F. Bachmann. 2005. Efficient homologous prime-boost strategies for T cell vaccination based on virus-like particles. *Eur. J. Immunol.* 35:816-21.
33. Sedlik, C., M. Saron, J. Sarraseca, I. Casal, and C. Leclerc. 1997. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:7503-8.
34. Sit, T. L., M. G. Abouhaidar, and S. Holy. 1989. Nucleotide sequence of papaya mosaic virus RNA. *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 9):2325-31.

35. Slupetzky, K., R. Gambhira, T. D. Culp, S. Shafti-Keramat, C. Schellenbacher, N. D. Christensen, R. B. Roden, and R. Kirnbauer. 2007. A papillomavirus-like particle (VLP) vaccine displaying HPV16 L2 epitopes induces cross-neutralizing antibodies to HPV11. *Vaccine* 25:2001-10.
36. Steinman, R. M., and M. Pope. 2002. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J. Clin. Invest.* 109:1519-26.
37. Storni, T., F. Lechner, I. Erdmann, T. Bachi, A. Jegerlehner, T. Dumrese, T. M. Kundig, C. Ruedl, and M. F. Bachmann. 2002. Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles. *J. Immunol.* 168:2880-6.
38. Storni, T., C. Ruedl, K. Schwarz, R. A. Schwendener, W. A. Renner, and M. F. Bachmann. 2004. Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J. Immunol.* 172:1777-85.
39. Tremblay, M. H., N. Majeau, M. E. Gagne, K. Lecours, H. Morin, J. B. Duvignaud, M. Bolduc, N. Chouinard, C. Pare, S. Gagne, and D. Leclerc. 2006. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. *FEBS J.* 273:14-25.
40. Tsunetsugu-Yokota, Y., Y. Morikawa, M. Isogai, A. Kawana-Tachikawa, T. Odawara, T. Nakamura, F. Grassi, B. Autran, and A. Iwamoto. 2003. Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs. *J. Virol.* 77:10250-9.
41. Warrino, D. E., W. C. Olson, M. I. Scarrow, L. J. D'Ambrosio-Brennan, R. S. Guido, D. M. Da Silva, W. M. Kast, and W. J. Storkus. 2005. Human papillomavirus L1L2-E7 virus-like particles partially mature human dendritic cells and elicit E7-specific T-helper responses from patients with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer in vitro. *Hum. Immunol.* 66:762-72.
42. Woo, W. P., T. Doan, K. A. Herd, H. J. Netter, and R. W. Tindle. 2006. Hepatitis B surface antigen vector delivers protective cytotoxic T-lymphocyte responses to disease-relevant foreign epitopes. *J. Virol.* 80:3975-84.
43. Yang, R., F. M. Murillo, H. Cui, R. Blosser, S. Uematsu, K. Takeda, S. Akira, R. P. Viscidi, and R. B. Roden. 2004. Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J. Virol.* 78:11152-60.
44. Young, S. L., M. Wilson, S. Wilson, K. W. Beagley, V. Ward, and M. A. Baird. 2006. Transcutaneous vaccination with virus-like particles. *Vaccine* 24:5406-12.
45. Zarei, S., S. Abraham, J. F. Arrighi, O. Haller, T. Calzascia, P. R. Walker, T. M. Kundig, C. Hauser, and V. Piguet. 2004. Lentiviral transduction of dendritic cells confers protective antiviral immunity in vivo. *J. Virol.* 78:7843-5.

46. Zhang, H., E. Todderud, and G. Stubbs. 1993. Crystallization and preliminary X-ray analysis of papaya mosaic virus coat protein. *J. Mol. Biol.* 234:885-7.
- Zinkernagel, R. M., A. Lamarre, A. Ciurea, L. Hunziker, A. F. Ochsenbein, K. D. McCoy, T. Fehr, M. F. Bachmann, U. Kalinke, and H. Hengartner. 2001. Neutralizing antiviral antibody responses. *Adv. Immunol.* 79:1-53.
47. Zinkernagel, R. M., T. Leist, H. Hengartner, and A. Althage. 1985. Susceptibility to lymphocytic choriomeningitis virus isolates correlates directly with early and high cytotoxic T cell activity, as well as with footpad swelling reaction, and all three are regulated by H-2D. *J. Exp. Med.* 162:2125-41.
48. Zinkernagel, R. M., and R. M. Welsh. 1976. H-2 compatibility requirement for virus-specific T cell-mediated effector functions in vivo. I. Specificity of T cells conferring antiviral protection against lymphocytic choriomeningitis virus is associated with H-2K and H-2D. *J. Immunol.* 117:1495-502.

FIGURES AND FIGURES LEGENDS

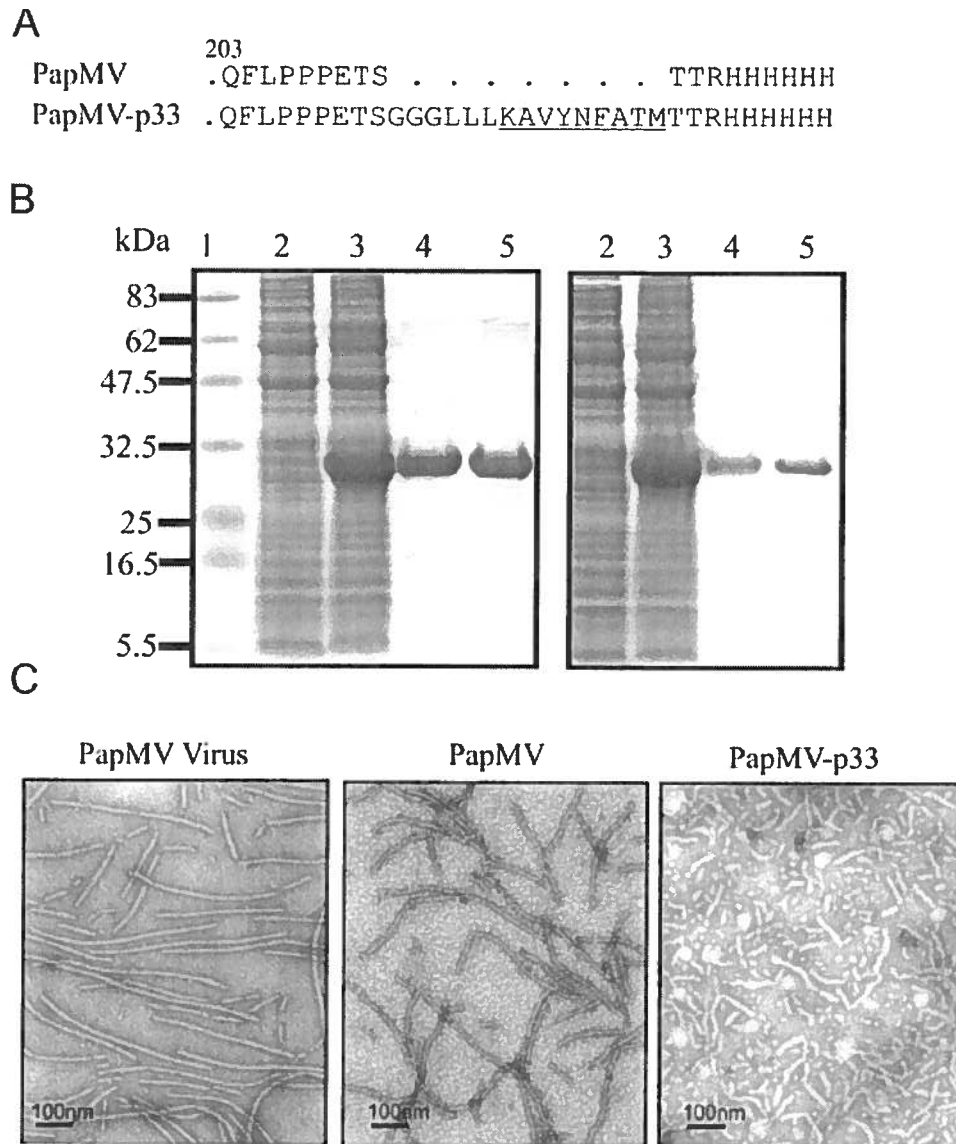


Figure 1. Expression and purification of PapMV-like particles. (A) The LCMV immunodominant p33 peptide (**bold** and underlined) was fused between the PapMV CP and a 6x His tag (6His) located at the C-terminus of the protein. (B) Purification of recombinant proteins. The size and purity of the recombinant proteins were confirmed by SDS-PAGE. (1) Molecular weight markers (2) total bacterial lysates without plasmid (3) total bacterial lysates expressing the recombinant protein (4) proteins purified by nickel affinity chromatography (5) purified VLPs concentrated by ultracentrifugation. (C) Electron microscopy of PapMV native virions, PapMV VLPs and PapMV-p33 VLPs. Bars are 100 nm.

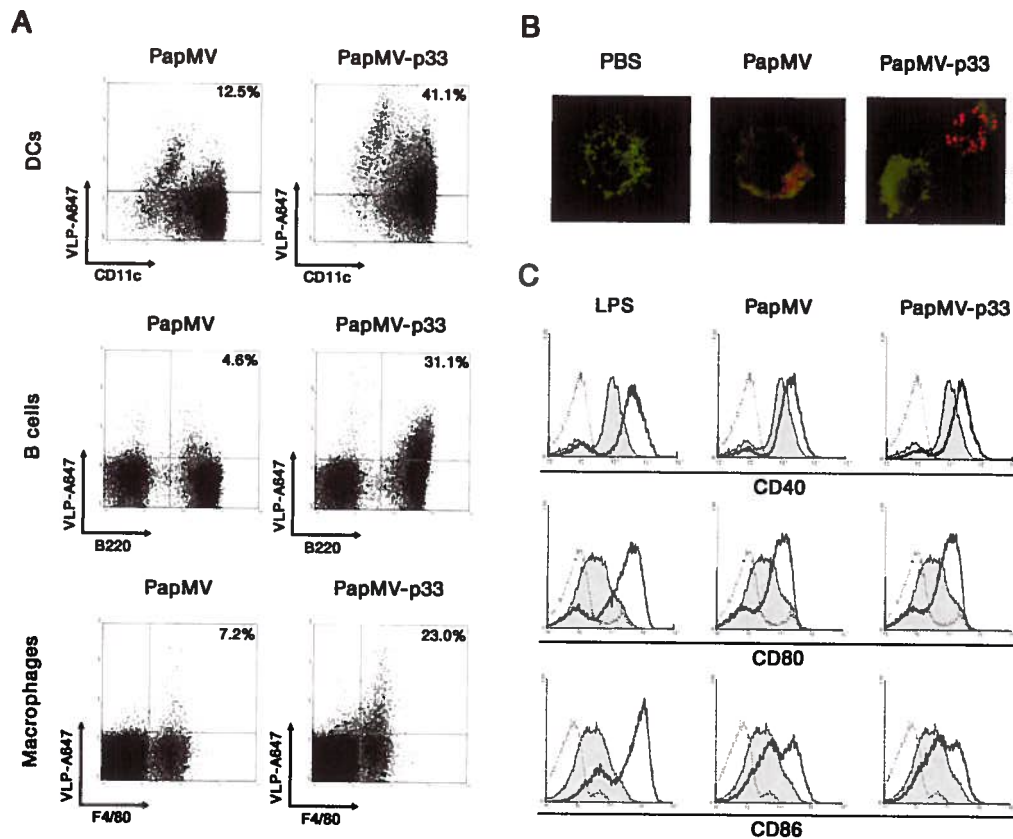


Figure 2. Splenic DCs take-up PapMV-like particles *in vivo* and acquire a mature phenotype. (A) C57BL/6 mice were injected *i.v.* with 100 μg of AlexaFluor 647-labeled VLPs in PBS or 100 μL of sterile PBS as negative control. Spleens were collected 2h post immunization and total CD11c⁺ splenic DCs were isolated by magnetic bead separation and stained with FITC-labelled CD11c-specific mAbs. The negative fraction obtain after magnetic purification of CD11c⁺ cells was stained with FITC-coupled B220 or F4/80 specific mAbs. Cells were analyzed by flow cytometry. Values shown in the upper right quadrants represent the percentages of a given cell population associated with labeled VLPs within the total population. (B) *In vivo* capture of VLPs was visualized by confocal microscopy analysis. Mice were injected with 100 μg of AlexaFluor 647-labeled VLPs (Red) in PBS or 100 μL of sterile PBS as negative control and CD11c⁺ spleen cells were purified 2h later. Purified CD11c⁺ spleen cells were allowed to adhere 12h to glass slides coated with poly-L-lysine and were fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were labeled with wheat-germ agglutinin conjugated to AlexaFluor 488 (green) to visualize the plasma membrane. (C) C57BL/6 mice were injected *i.v.* with 100 μg VLPs in PBS. Spleens were collected 6h post immunization and CD11c⁺ cells were isolated by magnetic separation. Mice injected with 25 μg LPS served as positive controls. Purified CD11c⁺ DCs were stained with FITC-labelled CD11c-specific antibodies in combination with PE-labeled anti-CD40, CD80, CD86 or isotypic control antibodies. Data are gated on the CD11c⁺ population. Isotypic controls (dotted lines), PBS injected mice (filled histogram) and VLP injected mice (bold line). These results are representative of three independent experiments.

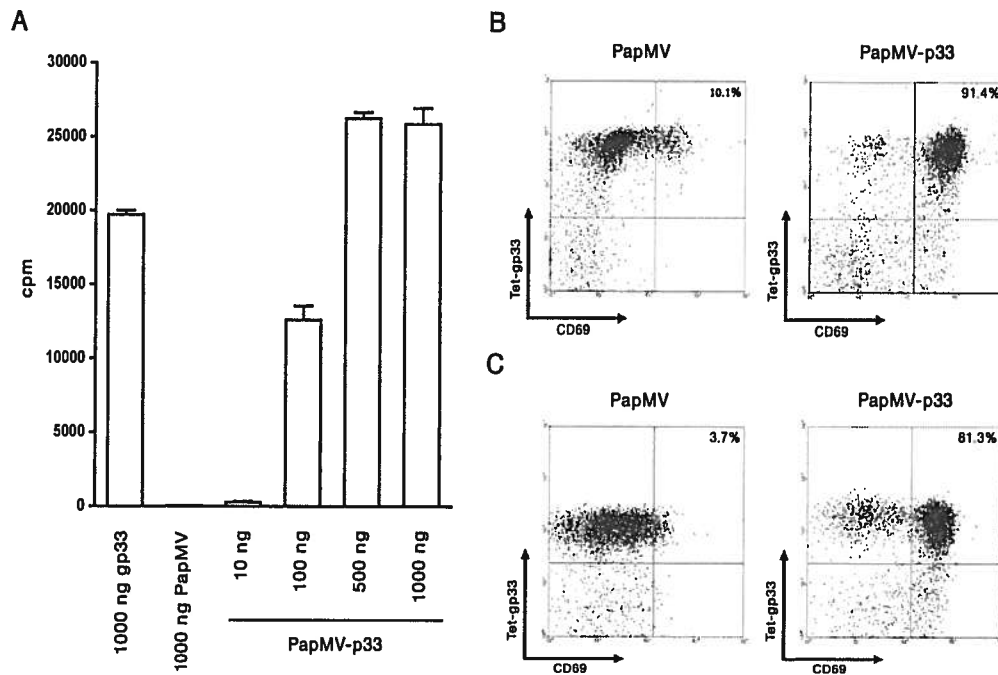


Figure 3. In vitro and in vivo processing of the LCMV p33 CTL epitope displayed on PapMV-like particles by splenic DCs and cross-priming of naïve T cells. (A) Splenic DCs were purified by CD11c magnetic bead separation and pulsed for 8h with indicated concentrations of VLPs in 96-wells culture plates. DCs pulsed with the p33 synthetic peptide served as positive control. Splenic p33-specific CD8⁺ T lymphocytes purified from TCR transgenic P14 mice were then added to the pulsed DC cultures. Proliferation of p33-specific CD8⁺ T lymphocytes was assayed 48h later by ³H-thymidine incorporation to cellular DNA. (B) Activation of p33-specific CD8⁺ T lymphocytes was analyzed by flow cytometry following 24h of co-cultures between specific T cells and DCs pulsed for 8h with 1 µg of VLPs. Cells were stained with FITC-labelled anti-CD8 antibodies, PerCP-labelled anti-CD69 antibodies and PE-labelled p33-specific tetramers. (C) P14 mice were injected i.v. with 100 µg of VLPs in PBS and 24h later, total spleen cells were stained with FITC-labelled anti-CD8 antibodies, PerCP-labelled anti-CD69 antibodies and PE-labelled p33-specific tetramers. Data are gated on the CD8⁺ T cell population. Values shown in the upper right quadrants represent the percentages of activated p33-specific CD8⁺ T lymphocytes within the total spleen p33-specific CD8⁺ T lymphocytes population. These results are representative of three independent experiments.

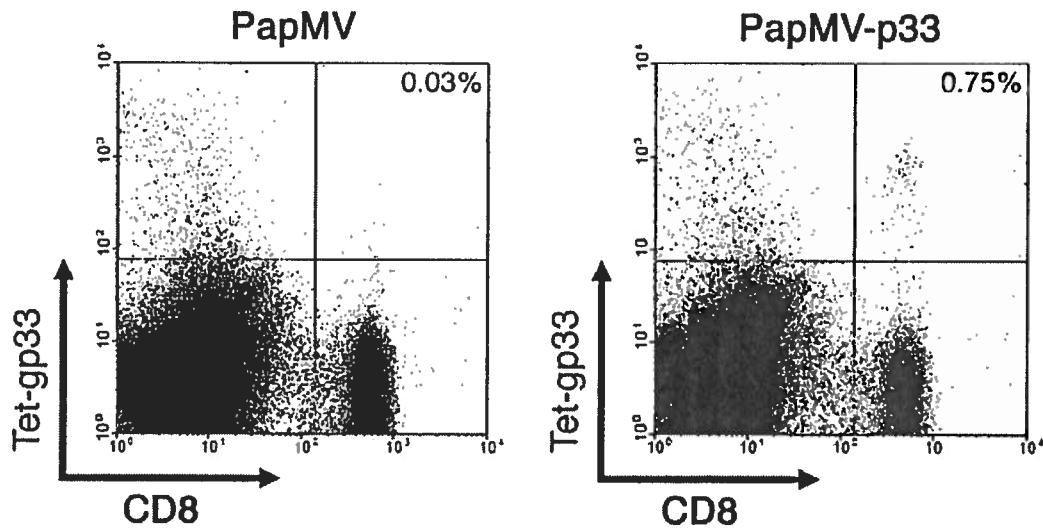


Figure 4. Immunization with PapMV-p33 VLPs generates p33-specific CD8⁺ T lymphocytes. C57BL/6 mice were injected i.v. with 100 µg of VLPs in PBS and identical recall injections were given 10, 20 and 30 days later. Total spleen cells were then doublestained with FITC-labelled anti-CD8 antibodies and PE-labelled p33-specific tetramers. 7-AAD was used for dead cells exclusion. Data are gated on total lymphocyte populations. Values shown in the upper right quadrants represent the percentage of p33-specific CD8⁺ T lymphocytes within the total CD8⁺ T lymphocyte population. These results are representative of four independent experiments.

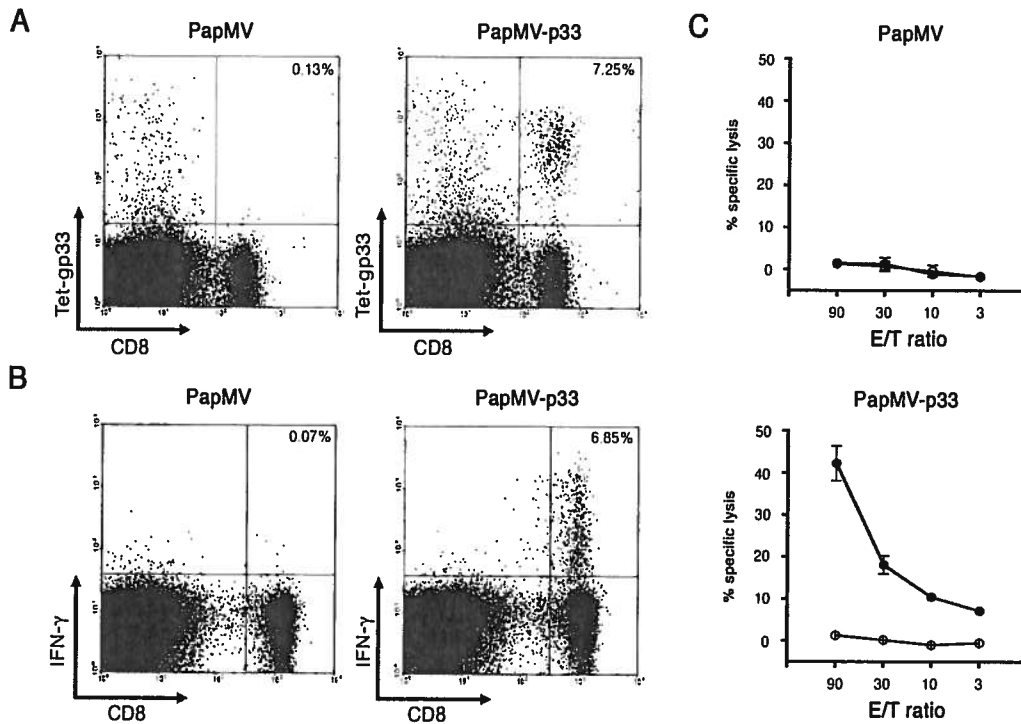


Figure 5. Expansion of effector p33-specific CTLs following LCMV infection of immunized mice. C57BL/6 mice were injected i.v. with 100 μ g of VLPs in PBS followed by three recall injections at 10-day intervals. Seven days after the last recall injection, immunized mice were infected i.v. with 200 PFU of LCMV. (A) Expansion of p33-specific CD8⁺ T lymphocytes was assayed 5 days post infection by flow cytometry. Total spleen cells were double-stained with FITC-labelled anti-CD8 antibodies and PE-labelled p33-specific tetramers. 7-AAD was used for dead cells exclusion. Data are gated on total lymphocyte populations. Values shown in the upper right quadrants represent percentages of p33-specific CD8⁺ T lymphocytes within the total CD8⁺ T lymphocyte population. (B) Production of IFN- γ by CD8⁺ T lymphocytes was also assayed 5 days post infection by flow cytometry. Total spleen cells were restimulated for 5h *in vitro* with the p33 peptide. Spleen cells were then surface stained with a PE-labelled anti-CD8 antibody. After fixation and permeabilization cells were stained with an anti-IFN- γ -FITC mAb. 7-AAD was used to exclude dead cells. Data are gated on the total lymphocyte population. Values shown in the upper right quadrants represent percentages of CD8⁺IFN- γ ⁺ T lymphocytes within the total CD8⁺ T lymphocyte population. (C) Spleen cells were tested for cytotoxic activity in a standard 5h ⁵¹Cr release assay on unpulsed (open circle) or p33-pulsed (closed circle) EL-4 target cells. Results are representative of four independent experiments.

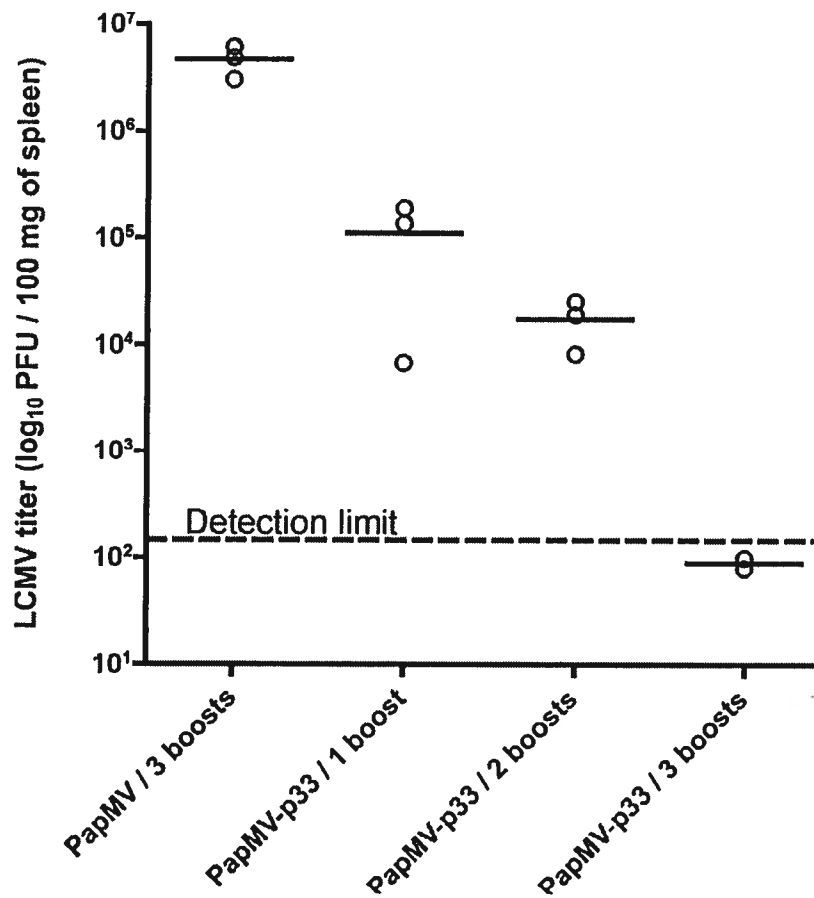


Figure 6. Immunization with PapMV-p33 VLPs induces protective immunity against LCMV infection. C57BL/6 mice were injected i.v. with 100 µg of VLPs in PBS followed by identical recall injections were given 10, 20 and 30 days later. Seven days after the last recall injection, immunized mice were infected i.v. with 200 PFU of LCMV. Spleens from infected mice were removed 5 days after infection and LCMV titers were determined by a standard focus forming assay. Results are representative of three identical and independent experiments.

FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

A

PapMV²⁰³ .QFLPPPETS.....TTRHHHHHH

PapMV-OVA .QFLPPPETSGGGLLS**SIINFEKL**TTRHHHHHH

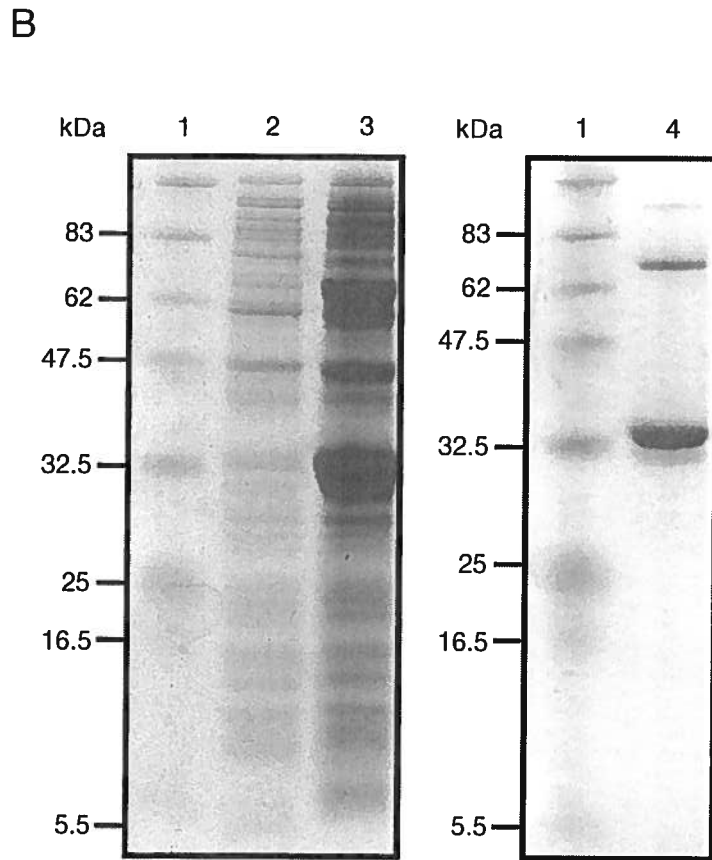


Figure Supplémentaire 1. Expression and purification of PapMV-OVA particles. (A) The immunodominant CTL SIINFEKL peptide from the ovalbumin (**bold** and underlined) was fused between the PapMV CP linked to 3 leucine and a 6x His tag (6His) located at the C-terminus of the protein. (B) Purification of the recombinant PapMV-OVA protein. The size and purity of the recombinant proteins were confirmed by SDS-PAGE. (1) Molecular weight markers (2) total bacterial lysates without plasmid (3) total bacterial lysates expressing the recombinant protein (4) purified PapMV-OVA VLPs concentrated by ultracentrifugation.

La Figure Supplémentaire 1 présente certaines étapes de la production et de la purification des PPV du PapMV-OVA par l'entremise d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Tout d'abord, en comparant les échantillons des puits #2 et #3, il est possible de confirmer que la synthèse protéique a été efficace (*i.e.* présence d'une large bande à environ 32.5 kDa). De plus, lorsque l'on observe l'échantillon contenu dans le puit #4, il est possible de constater que la purification des protéines recombinantes par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel et par ultracentrifugation permet d'obtenir un échantillon pur et concentré de PPV du PapMV-OVA. La production et la purification des PPV du PapMV-OVA peut donc se faire tout aussi efficacement que celle des PPV du PapMV et des PPV du PapMV-p33 (Figure 1).

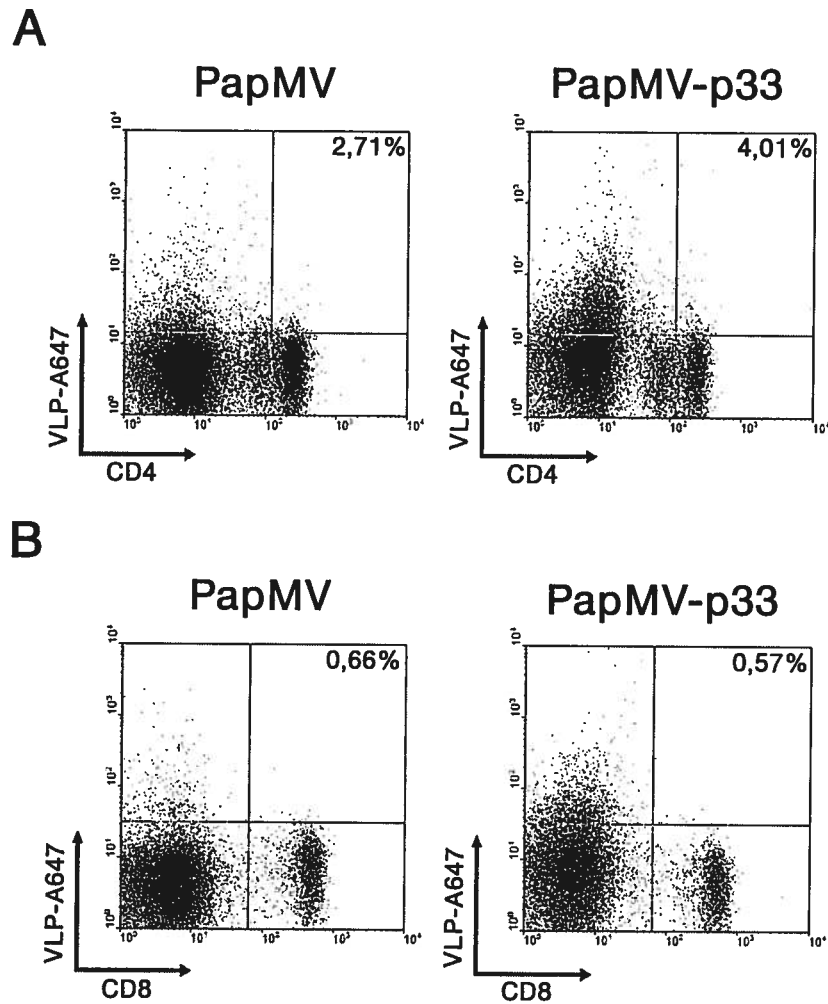


Figure Supplémentaire 2. Splenic CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes are inefficient in capturing PapMV-like particles *in vivo*. C57BL/6 mice were injected *i.v.* with 100 µg of AlexaFluor 647-labeled VLPs in PBS or 100 µL of sterile PBS as negative control. Spleens were collected 2h post immunization and total CD11c⁺ splenic DCs were isolated by magnetic bead separation, stained with FITC-labelled CD11c-specific mAbs and used for another experiment. The negative fraction obtain after magnetic purification of CD11c⁺ cells was stained with FITC-coupled CD4 or CD8 specific mAbs. Cells were analyzed by flow cytometry. Values shown in the upper right quadrants represent the percentages of a given cell population associated with labeled VLPs within the total population. (A) *In vivo* capture of PapMV-like particles by splenic CD4⁺ T lymphocytes (B) *In vivo* capture of PapMV-like particles by splenic CD8⁺ T lymphocytes.

Les résultats de cytométrie de flux de la Figure Supplémentaire 2 mettent en évidence l'incapacité des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺ issus de la rate de souris C57BL/6 immunisées à capter les PPV du PapMV ou du PapMV-p33. Cette observation n'est guère surprenante puisque la capture d'Ag est principalement exercée par les CPA. D'ailleurs, rappelons qu'à la Figure 2a, nous avons démontré l'efficacité des CPA de la rate, particulièrement des DC, à capter les diverses PPV du PapMV suite à l'immunisation de souris C57BL/6.

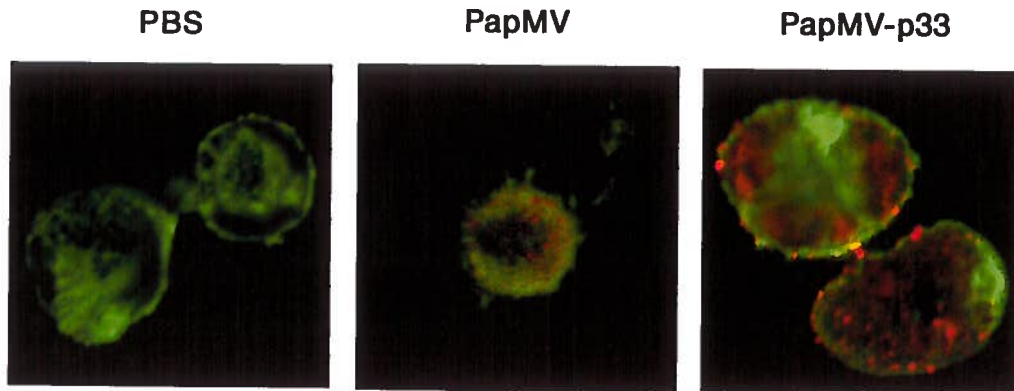


Figure Supplémentaire 3. Splenic DCs take-up PapMV-like particles *in vitro*. *In vitro* capture of AlexaFluor 647-labeled VLPs (Red) by DCs was visualized by confocal microscopy analysis. Total CD11c⁺ splenic DCs from C57BL/6 were isolated by magnetic bead separation and exposed for 2h to PBS or to 5 µg of AlexaFluor 647-labeled PapMV-like particles. DCs were then washed three times with PBS and were allowed to adhere 12h to glass slides coated with poly-L-lysine and were fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were labeled with wheat-germ agglutinin conjugated to AlexaFluor 488 (green) to visualize the plasma membrane.

Les résultats de microscopie confocale présentés à la Figure Supplémentaire 3 permettent de visualiser la capacité des DC issues de la rate de souris C57BL/6 à capter les diverses PPV du PapMV *in vitro*. En effet, lorsque ces DC sont incubées 2h *in vitro* en présence de 5 µg de PPV marquées par un fluorochrome, les diverses PPV se retrouvent internalisées par ces DC. En concordance avec les résultats obtenus lors des tests d'internalisation *in vivo* (Figure 2b), les PPV du PapMV semblent se retrouver dispersées un peu partout dans le cytoplasme des DC alors que les PPV du PapMV-p33 sont regroupées dans des compartiments vacuolaires.

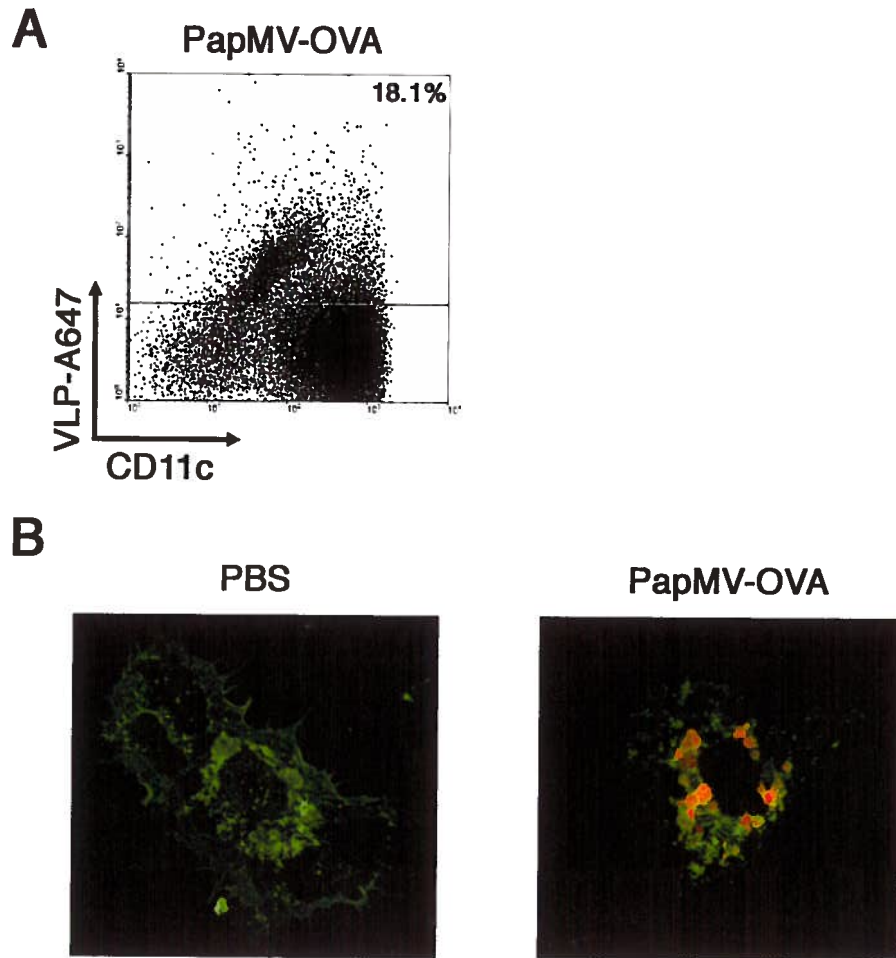


Figure Supplémentaire 4. Splenic DCs take-up PapMV-OVA particles in vivo. (A) C57BL/6 mice were injected i.v. with 100 μg of AlexaFluor 647-labeled PapMV-OVA VLPs in PBS or 100 μL of sterile PBS as negative control. Spleens were collected 2h post immunization and total CD11c⁺ splenic DCs were isolated by magnetic bead separation and stained with FITC-labelled CD11c-specific mAbs. Cells were analyzed by flow cytometry. Values shown in the upper right corner represent the percentages of CD11c⁺ cells associated with labeled VLPs within the total population. (B) *In vivo* capture of PapMV-OVA VLPs was visualized by confocal microscopy analysis. Mice were injected with 100 μg of AlexaFluor 647-labeled PapMV-OVA VLPs (Red) in PBS and CD11c⁺ spleen cells were purified 2h later. Purified CD11c⁺ spleen cells were allowed to adhere 12h to glass slides coated with poly-L-lysine and were fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were labeled with wheat-germ agglutinin conjugated to AlexaFluor 488 (green) to visualize the plasma membrane.

Les résultats présentés à la Figure Supplémentaire 4 démontrent que, comme dans le cas des PPV du PapMV et des PPV du PapMV-p33, les DC peuvent capter les PPV du PapMV-OVA. En effet, une analyse de cytométrie de flux démontre qu'environ 18% des DC CD11c⁺ issues de la rate de souris C57BL/6 immunisées sont associées avec les PPV du PapMV-OVA, 2h suivant l'injection (Figure Supplémentaire 4a). Il est possible de constater que l'efficacité de la capture des PPV du PapMV-OVA par les DC CD11c⁺ est légèrement supérieure à celle observée pour les PPV du PapMV mais grandement inférieure à celle observée pour les PPV du PapMV-p33 (Figure 2a). D'autre part, des analyses de microscopie confocale permettent de confirmer que les PPV du PapMV-OVA sont bel et bien internalisées par les DC CD11c⁺ issues de la rate des souris immunisées (Figure Supplémentaires 4b). De plus, comme dans le cas des PPV du PapMV-p33 (Figure 2b), les PPV du PapMV-OVA sont concentrées dans des compartiments vacuolaires.

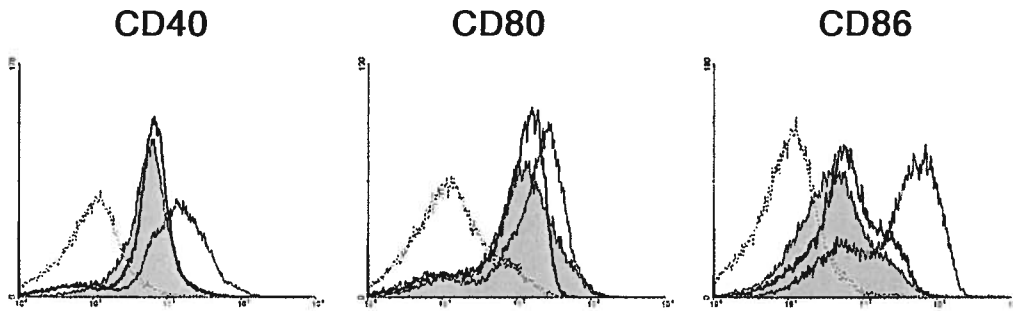


Figure Supplémentaire 5. Effect of LPS contaminants contained in PapMV-like particles stocks on splenic DCs maturation. The concentration of *Escherichia coli* derived LPS contained in the PapMV-p33 VLPs preparation was determined by the limulus ameocyte lysate assay according to manufacturer's instructions. The amount of LPS corresponding to the one present when administering 100 µg PapMV-p33 VLPs was i.v. injected to a first group of C57BL/6 mice. Other groups of mice received either 200 µL of sterile PBS or 100 µg PapMV-p33 VLPs. For all groups, spleens were collected 6h post injection and CD11c⁺ cells were isolated by magnetic separation. Mice injected with 25 µg LPS served as positive controls. Purified CD11c⁺ DCs were stained with FITC-labelled CD11c-specific antibodies in combination with PE-labeled anti-CD40, CD80, CD86 or isotypic control antibodies. Data are gated on the CD11c⁺ population. Isotypic controls (dotted lines), PBS injected mice (filled histogram), LPS contaminants injected mice (bold line) and PapMV-p33 VLPs injected mice (fine line). These results are representative of two independent experiments.

Les résultats présentés à la Figure Supplémentaire 5 présentent l'influence des contaminants LPS dérivés d'*E. coli* et contenus dans nos préparations de PPV du PapMV-p33 sur la maturation des DC de la rate des souris C57BL/6 immunisées en absence d'adjuvant. Des analyses par cytométrie de flux de l'expression des marqueurs de maturation CD40, CD80 et CD86 ont été effectuées sur les DC CD11c⁺ issues de la rate de souris C57BL/6 injectées, 2h plus tôt, d'une quantité de LPS correspondante à celle contenue dans une dose de 100 µg de PPV du PapMV-p33. En comparant la régulation à la hausse des marqueurs de maturation induite par les LPS contaminants (ligne grasse) à celle induite par les PPV du PapMV-p33 (ligne fine), il est possible de constater que la maturation des DC est principalement due aux PPV. En effet, les LPS contaminants n'ont pratiquement aucun effet sur le niveau d'expression de CD40 et de CD80 à la surface des DC CD11c⁺. Même si on note une certaine régulation à la hausse de l'expression de CD86 à la surface de ces mêmes DC, celle-ci est négligable par rapport à celle observée chez les souris immunisées à l'aide des PPV du PapMV-p33. Ces résultats permettent donc de conclure que les LPS contaminants contenus dans nos échantillons de PPV n'ont pratiquement aucun effet sur l'induction de la maturation des DC de la rate des souris immunisées. De plus, ils apportent la preuve que les diverses PPV du PapMV possèdent une activité intrinsèque d'adjuvant leur permettant d'induire, par elles-mêmes, la maturation des DC CD11c⁺.

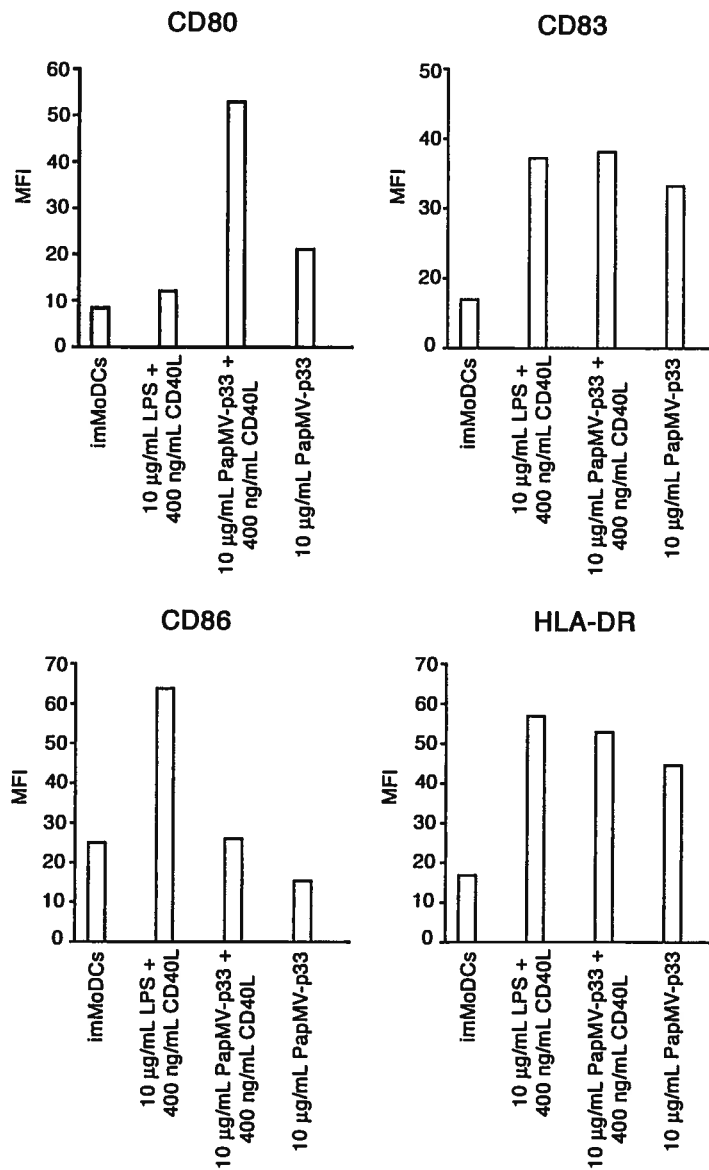


Figure Supplémentaire 6. PapMV-p33 VLPs induces immature monocyte-derived DCs (ImMoDCs) maturation in vitro. ImMoDCs were generated from freshly isolated PBMCs using a standard technique as described previously except that IL-4 was used at 40 ng/ml and GM-CSF at 5 ng/ml (9). ImMoDCs were next exposed for 24h, in 96-wells culture plates, to maturation stimuli (LPS 10 µg/ml; CD40L 400 ng/ml and PapMV-p33 VLPs at 10 µg/ml) and analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensity (MFI) was compared between different maturation conditions.

Les résultats présentés à la Figure Supplémentaire 6 mettent en évidence la capacité des PPV du PapMV-p33 à induire la maturation *in vitro* de DC d'origine humaine. En effet, des DC dérivées de monocytes humains exposés pour 24h *in vitro* à 10 µg/mL de PPV du PapMV-p33 présentent de plus hauts niveaux d'expression des marqueurs de maturation CD80, CD83 et HLA-DR que les mêmes DC non-stimulées. Notons toutefois qu'aucune régulation à la hausse du marqueur de maturation CD86 n'est observée. Lorsqu'un signal activateur supplémentaire (*i.e.* CD40L) est fourni aux DC lors de leur incubation avec les PPV du PapMV-p33, il se produit une légère augmentation du niveau d'expression des marqueurs de maturation, sauf dans le cas du CD80 où l'augmentation du niveau d'expression est plus significative. Finalement, la régulation à la hausse des marqueurs de maturation CD80, CD83 et HLA-DR induite par les PPV du PapMV-p33 est comparable à celle observée pour le groupe contrôle positif, c'est-à-dire lors de l'incubation des mêmes DC avec du LPS et du CD40L.

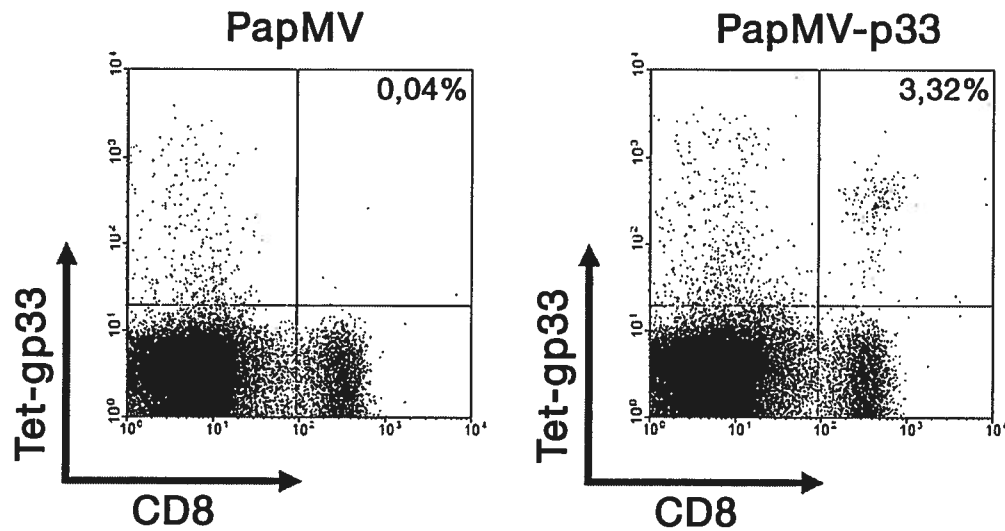


Figure Supplémentaire 7. Expansion of effector p33-specific CTLs following LCMV infection of immunized mice. C57BL/6 mice were injected i.v. with 100 µg of VLPs in PBS followed by two recall injections at 10-day intervals. Seven days after the last recall injection, immunized mice were infected i.v. with 200 PFU of LCMV. Expansion of p33-specific CD8⁺ T lymphocytes was assayed 5 days post infection by flow cytometry. Total spleen cells were double-stained with FITC-labelled anti-CD8 antibodies and PE-labelled p33-specific tetramers. 7-AAD was used for dead cells exclusion. Data are gated on total lymphocyte populations. Values shown in the upper right quadrants represent percentages of p33-specific CD8⁺ T lymphocytes within the total CD8⁺ T lymphocyte population.

Les résultats présentés à la Figure Supplémentaire 7 démontrent que des souris C57BL/6 immunisées par la voie i.v., en absence d'adjuvant, à l'aide de 100 µg de PPV du PapMV-p33 suivi de deux rappels identiques à 10 jours d'intervalle, développent une population de LT CD8⁺ spécifiques au LCMV, 5 jours suivants une infection. En effet, plus de 3,3% des LT CD8⁺ de la rate des souris immunisées et infectées sont spécifiques au peptide p33 du LCMV. Ce pourcentage de LT CD8⁺ p33-spécifiques est toutefois inférieur à celui observé chez des souris ayant reçu un rappel de plus (Figure 5b). Cette observation laisse sous entendre que l'ampleur de la réponse cellulaire spécifique au LCMV se développant suite à l'immunisation de souris à l'aide des PPV du PapMV-p33 est proportionnelle à la dose administrée et/ou à la fréquence d'administration. Cette conclusion peut également être appuyée par les résultats présentés à la Figure 6. En effet, alors que le LCMV n'est plus détecté, 5 jours suivant l'infection, dans la rate des souris ayant reçu 3 rappels, le virus est toujours présent dans la rate des souris ayant uniquement reçu 2 rappels.

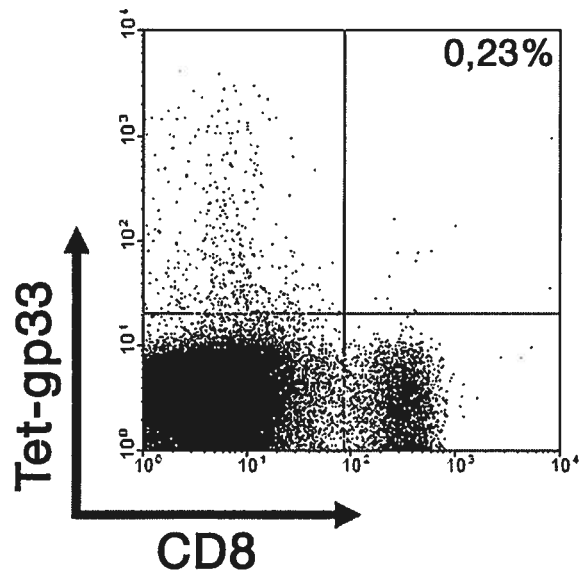


Figure Supplémentaire 8. Generation of p33-specific T cells by the primary response to LCMV. C57BL/6 mice were infected i.v. with 200 PFU of LCMV. Expansion of p33-specific CD8⁺ T lymphocytes was assayed 5 days post infection by flow cytometry. Total spleen cells were double-stained with FITC-labelled anti-CD8 antibodies and PE-labelled p33-specific tetramers. 7-AAD was used for dead cells exclusion. Data are gated on total lymphocyte populations. The value shown in the upper right quadrant, represent the percentage of p33-specific CD8⁺ T lymphocytes within the total CD8⁺ T lymphocyte population.

La Figure Supplémentaire 8 démontre que 5 jours suivant l'infection, par le LCMV, de souris C57BL/6 non-immunisées, aucune réponse cytotoxique primaire ne peut encore être détectée. En effet, une analyse de cytométrie de flux permet de mettre en évidence qu'aucun LT CD8⁺ p33-spécifique ne peut être détecté dans la rate d'une souris infectée par le LCMV, 5 jours suivant l'infection. Lorsque les résultats de la Figure Supplémentaire 8 sont comparés à ceux de la Figure 5a et de la Figure Supplémentaire 7, il est possible de confirmer que l'immunisation de souris à l'aide de PPV du PapMV-p33 permet au système immunitaire de ces dernières d'accélérer et d'amplifier la production de LT CD8⁺ p33-spécifiques et de favoriser le développement d'une réponse cellulaire cytotoxique spécifique au LCMV.

DISCUSSION

Notre étude avait pour but d'évaluer la capacité de PPV issues du PapMV, un virus de plante, à exposer au système immunitaire un épitope CTL immunodominant appartenant au LCMV afin d'induire une réponse cytotoxique spécifique et protectrice contre ce virus. Nous voulions également déterminer l'influence exercée par ces PPV sur la maturation et sur l'activité des DC.

Dans plusieurs cas, la surexpression de protéines structurales virales à l'aide d'un système d'expression comme *E. coli* mène à l'auto-assemblage de ces protéines en PPV structurellement identiques au virus d'origine (Pattenden *et al.*, 2005). Une étude antérieure effectuée par notre équipe a permis de démontrer la possibilité de produire des PPV du PapMV en transférant, à *E. coli*, un plasmide codant pour la CP du PapMV, une protéine structurale de 23 kDa (Tremblay *et al.*, 2006). Dans la présente étude, nous démontrons la capacité de produire des PPV du PapMV exprimant, à l'extrémité C-terminale de la CP, l'épitope CTL immunodominant p33 du LCMV (Figure 1). En effet, suite à la surexpression des protéines recombinantes dans *E. coli* et à la purification de ces dernières par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel et par ultracentrifugation, nous avons obtenu des échantillons purs et concentrés de CP recombinantes. Lors de l'analyse de ces échantillons sur un gel de polyacrylamide (Figure 1b), une différence entre le poids moléculaires des protéines recombinantes (environ 29 kDa) et le poids moléculaire de la CP sauvage (23 kDa) a pu être observée. Cette différence s'explique par la présence de l'épitope p33 et d'une queue d'histidine ajoutée afin de faciliter la purification des protéines produites (Figure 1a). Des PPV du PapMV exposant l'épitope CTL SIINFEKL d'OVA ont également été produites avec succès selon la même méthode (Figure Supplémentaire 1). Des analyses par microscopie électronique des PPV du PapMV-p33 ont pour leur part démontré que celles-ci adoptaient une structure en forme de bâtonnet, de longueur variable, similaire à celle adoptée par les PPV du PapMV et par le virus PapMV sauvage (Figure 1c). La fusion génétique d'épitopes étrangers à l'extrémité C-terminale de la CP du PapMV ne nuit donc pas à l'expression de la protéine virale et à la formation des PPV. Cette première série d'observations nous a donc permis de croire que les PPV du PapMV pourraient potentiellement être utilisées comme

plateforme vaccinale capable de présenter des épitopes étrangers au système immunitaire.

Afin de permettre l'induction de réponses cytotoxiques spécifiques contre des épitopes présentés à la surface des PPV du PapMV, ces dernières doivent pouvoir être captées et présentées, dans le contexte du CMH-I, par les CPA via un mécanisme de présentation croisée. En plus d'être le type de CPA le plus efficace pour exercer la présentation croisée d'Ag exogènes aux LT CD8⁺, les DC sont les seules CPA à pouvoir activer efficacement les LT naïfs (Guermonprez *et al.*, 2002). Nous avons donc évalué l'efficacité de DC issues de la rate de souris C57BL/6 à capter, *in vivo* et *in vitro*, les diverses PPV du PapMV. Suite à des analyses de cytométrie en flux et de microscopie confocale effectuées sur des DC exposées à des PPV du PapMV marquées à l'aide d'un fluorochrome, nous avons mis en évidence la grande efficacité des DC à capter les diverses PPV du PapMV tant *in vivo* (Figure 2a-2b et Figure Supplémentaire 4) qu'*in vitro* (Figure Supplémentaire 3). Cependant, nous démontrons que cette efficacité de capture varie considérablement en fonction de l'épitope exposé à la surface des PPV. Ainsi, la capture des PPV du PapMV-p33 par les DC est beaucoup plus importante que celle des PPV du PapMV ou des PPV du PapMV-OVA. Même si d'autres tests devront être effectués afin d'expliquer précisément les raisons de cette différence, nous suggérons que l'insertion d'un épitope donné sur les PPV influence la stabilité des particules ou engendre de légères modifications au niveau de la structure des particules, influençant ainsi leur capacité à interagir avec les DC ou avec un récepteur à la surface des DC. D'autre part, cette différence pourrait être due à l'utilisation de différents mécanismes d'internalisation par les DC selon le type de PPV du PapMV rencontré. Finalement, nos travaux ont également démontré que la capacité des DC à capter les PPV du PapMV est largement supérieure à celle observée chez les autres types de CPA, soit les MΦ et les LB (Figure 2a-2b), et à celle observée chez les LT CD4⁺ et CD8⁺ (Figure Supplémentaire 2).

Afin d'exercer leur plein potentiel immunostimulant, les DC doivent acquérir des signaux activateurs permettant d'induire leur maturation et de réguler à la hausse l'expression de molécules de co-stimulation à leur surface. Ces molécules de co-

stimulation sont essentielles pour assurer une activation optimale des LT naïfs et le développement de réponses cellulaires robustes et protectrices (Kapsenberg, 2003). Il était donc crucial d'établir l'effet d'une exposition *in vivo* aux diverses PPV du PapMV sur le niveau de maturation des DC. Des analyses de cytométrie de flux cherchant à établir le niveau d'expression de divers marqueurs de maturation à la surface de DC issues de la rate de souris C57BL/6 immunisées en absence d'adjuvant ont révélé la grande efficacité des diverses PPV du PapMV à induire la maturation des DC (Figure 2c). Notre étude permet d'ailleurs de confirmer que cette induction de la maturation des DC est bel et bien due à une exposition aux diverses PPV du PapMV et non à la présence d'endotoxines bactériennes contaminantes issues de *E. coli* (Figure Supplémentaire 5). D'autre part, suite à des tests préliminaires, nous démontrons également la capacité des PPV du PapMV-p33 à induire la maturation de DC d'origine humaine (Figure Supplémentaire 6). Nous pouvons donc conclure que les PPV du PapMV possèdent une activité intrinsèque d'adjuvant permettant d'induire la maturation des DC. Comme les PPV miment fidèlement la structure répétitive et organisée du virus PapMV sauvage, elles sont probablement perçues comme un signal de danger par les DC. Même si cette hypothèse reste à être explorée et prouvée, nous pouvons supposer que l'activité intrinsèque d'adjuvant des PPV du PapMV passe par la détection de ces dernières via certains récepteurs de l'immunité innée exprimés à la surface des DC et impliqués dans la détection de virus (*e.g.* TLR).

Afin d'induire des réponses cellulaires cytotoxiques, les DC doivent apprêter et présenter les Ag exogènes sur les CMH-I via l'une des voies de présentation croisée. Jusqu'à maintenant, diverses études ont démontré la capacité des DC à capter et à diriger certains types de PPV vers l'une de ces voies afin d'induire des réponses cellulaires spécifiques contre des épitopes étrangers exposés à leur surface (Moron *et al.*, 2003; Ruedl *et al.*, 2005). Dans la présente étude, nous démontrons que l'épitope p33 du LCMV exposé à la surface des PPV du PapMV est bel et bien apprêté et présenté sur les CMH-I par les DC issues de la rate de souris C57BL/6. L'efficacité de ce processus de présentation croisée est reflétée à la fois par la capacité des DC à entraîner l'activation et la prolifération de LT CD8⁺ p33-spécifiques dans un modèle de souris transgénique (Figure 3) et par la capacité de souris C57BL/6 à développer une population de LT CD8⁺ p33-spécifiques lorsqu'immunisées à l'aide de PPV du PapMV-p33 en absence d'adjuvant (Figure 4). En concordance avec nos résultats, une

autre étude menée par notre groupe a démontré la capacité de DC humaines à présenter, dans le contexte du CMH-I, un épitope CTL du virus influenza exposé à la surface de PPV du PapMV afin d'induire la prolifération de LT CD8⁺ spécifiques (Leclerc *et al.*, 2007). Nous pouvons donc conclure que des épitopes CTL exposés à la surface des PPV du PapMV peuvent efficacement être apprêtés et présentés dans le contexte du CMH-I par les DC. D'autres études devront éventuellement être menées afin de préciser la ou les voies de présentation croisée utilisées par les DC pour l'apprêtement et la présentation, dans le contexte du CMH-I, de l'épitope CTL p33 du LCMV à partir des PPV du PapMV.

Nous avons ensuite évalué l'activité effectrice des LT CD8⁺ p33-spécifiques produits suite à l'immunisation de souris C57BL/6 à l'aide de PPV du PapMV-p33 en absence d'adjuvant. Ainsi, par des analyses de cytométrie de flux effectuées sur les cellules issues de la rate de souris immunisées en absence d'adjuvant, nous mettons en évidence l'expansion de la population de CTL p33-spécifiques suite à une infection par le LCMV (Figure 5a et Figure Supplémentaire 7). De plus, nous démontrons que lors d'une infection par le LCMV, la majorité des CTL p33-spécifiques induits chez les souris immunisées produit de l'IFN- γ (Figure 5b). Finalement, par des tests de cytotoxicité cellulaire, nous démontrons la capacité de ces mêmes CTL à induire, de façon spécifique, la lyse de cellules cibles exposant l'épitope p33 du LCMV (Figure 5c). L'ensemble de ces résultats permet de confirmer que l'immunisation de souris C57BL/6 à l'aide de la plateforme PapMV exposant un épitope CTL étranger permet d'induire des CTL spécifiques capables d'exercer, de façon spécifique, leur activité effectrice en réponse à une infection virale.

Notre étude a finalement permis de démontrer que l'immunisation de souris à l'aide de PPV du PapMV exposant un épitope CTL de virus étranger permet d'induire une réponse cytotoxique protectrice contre ce virus sans la nécessité de co-administrer un adjuvant. En effet, l'administration, en absence d'adjuvant, de quatre doses de 100 μ g de PPV du PapMV-p33 à un intervalle de 10 jours à des souris C57BL/6 permet d'induire des CTL p33-spécifiques capables d'éliminer complètement le virus LCMV, 5 jours suivant une infection (Figure 6). En immunisant les souris selon divers programmes de vaccination, nous avons également établi une corrélation entre le

niveau de protection, le nombre de CTL p33-spécifiques générés et le nombre de doses de PPV du PapMV-p33 administrées (Figure 6). Éventuellement, il serait important d'effectuer de nouveaux tests d'immunisation afin d'établir les meilleurs paramètres de vaccination (*i.e.* dose, fréquence d'administration, voie d'administration) permettant d'optimiser l'ampleur des réponses cellulaires induites et du niveau de protection conféré.

En conclusion, même si d'autres études devront être accomplies afin d'établir, de préciser et de caractériser plusieurs des mécanismes immunitaires impliqués dans la réponse contre les PPV du PapMV, les résultats de notre étude nous permettent de croire que la plateforme PapMV pourrait éventuellement être utilisée dans la lutte contre diverses maladies émergentes nécessitant une participation active de l'immunité cellulaire pour être résorbées. En effet, nos résultats démontrent le grand potentiel de la plateforme PapMV à être utilisée comme vecteur de vaccination capable de présenter des épitopes CTL étrangers au système immunitaire et d'induire des réponses cellulaires cytotoxiques protectrices contre ces épitopes en absence d'adjuvant. En plus d'être efficacement captées, apprêtées et présentées dans le contexte du CMH-I par les DC, les PPV du PapMV possèdent une activité intrinsèque d'adjuvant leur permettant d'induire directement la maturation des DC. Cette caractéristique donne encore plus d'intérêt à la plateforme PapMV puisque, comme mentionné précédemment, l'utilisation d'adjuvants peut comporter des désavantages importants pour les personnes immunisées. D'autre part, nous pouvons même proposer que les PPV du PapMV pourraient aussi être utilisées directement comme adjuvant pour augmenter l'immunogénicité d'autres vaccins. Finalement, comme les diverses publications de notre laboratoire ont démontré la possibilité d'insérer efficacement divers types d'épitope à la surface des PPV du PapMV, il est également possible d'envisager la possibilité d'utiliser la plateforme PapMV pour immuniser simultanément un hôte contre divers agents infectieux.

RÉFÉRENCES

- Abouhaidar, M. et J. B. Bancroft. 1979. «Sequential encapsidation of heterologous RNAs with papaya mosaic virus protein». Virology, 93, 253-5.
- Ackerman, A. L. et P. Cresswell. 2004. «Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens». Nat Immunol, 5, 678-84.
- Ada, G. 2001. «Vaccines and vaccination». N Engl J Med, 345, 1042-53.
- Akira, S. et K. Takeda. 2004. «Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice». C R Biol, 327, 581-9.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov et R. A. Flavell. 2001. «Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3». Nature, 413, 732-8.
- Allavena, P., A. Sica, A. Vecchi, M. Locati, S. Sozzani et A. Mantovani. 2000. «The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues». Immunol Rev, 177, 141-9.
- Andre, F. E. 2003. «Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises». Vaccine, 21, 593-5.
- Andre, F. E. et A. Safary. 1987. «Summary of clinical findings on Engerix-B, a genetically engineered yeast derived hepatitis B vaccine». Postgrad Med J, 63 Suppl 2, 169-77.
- Ardavin, C. 2003. «Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells». Nat Rev Immunol, 3, 582-90.
- Arico, E., E. Wang, M. L. Tornesello, M. Tagliamonte, G. K. Lewis, F. M. Marincola, F. M. Buonaguro et L. Buonaguro. 2005. «Immature monocyte derived dendritic cells gene expression profile in response to Virus-Like Particles stimulation». J Transl Med, 3, 45.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere et G. Trinchieri. 2001. «Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology». Nat Immunol, 2, 1144-50.
- Azuma, M. 2006. «Fundamental mechanisms of host immune responses to infection». J Periodontal Res, 41, 361-73.
- Babiuk, L. A. 1999. «Broadening the approaches to developing more effective vaccines». Vaccine, 17, 1587-95.

- Babiuk, L. A., R. Pontarollo, S. Babiuk, B. Loehr et S. van Drunen Littel-van den Hurk. 2003. «Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals». Vaccine, 21, 649-58.
- Bachmann, M. F., U. H. Rohrer, T. M. Kundig, K. Burki, H. Hengartner et R. M. Zinkernagel. 1993. «The influence of antigen organization on B cell responsiveness». Science, 262, 1448-51.
- Ball, J. M., M. K. Estes, M. E. Hardy, M. E. Conner, A. R. Opekun et D. Y. Graham. 1996. «Recombinant Norwalk virus-like particles as an oral vaccine». Arch Virol Suppl, 12, 243-9.
- Ball, J. M., D. Y. Graham, A. R. Opekun, M. A. Gilger, R. A. Guerrero et M. K. Estes. 1999. «Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study». Gastroenterology, 117, 40-8.
- Barouch, D. H. 2006. «Rational design of gene-based vaccines». J Pathol, 208, 283-9.
- Barth, H., A. Ulsenheimer, G. R. Pape, H. M. Diepolder, M. Hoffmann, C. Neumann-Haefelin, R. Thimme, P. Henneke, R. Klein, G. Paranhos-Baccala, E. Depla, T. J. Liang, H. E. Blum et T. F. Baumert. 2005. «Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells». Blood, 105, 3605-14.
- Baumert, T. F., S. Ito, D. T. Wong et T. J. Liang. 1998. «Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells». J Virol, 72, 3827-36.
- Bayry, J., S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, O. Hermine, D. F. Tough et S. V. Kaveri. 2005. «Modulation of dendritic cell maturation and function by B lymphocytes». J Immunol, 175, 15-20.
- Becker, Y. 2003. «Milestones in the research on skin epidermal Langerhans/dendritic cells (LCs/DCs) from the discovery of Paul Langerhans 1868-1989». Virus Genes, 26, 131-4.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, J. F. Miller et W. R. Heath. 1997. «Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help». J Exp Med, 186, 65-70.
- Bergmann, C. C., Q. Yao, C. K. Ho et S. L. Buckwold. 1996. «Flanking residues alter antigenicity and immunogenicity of multi-unit CTL epitopes». J Immunol, 157, 3242-9.
- Berzofsky, J. A., J. D. Ahlers et I. M. Belyakov. 2001. «Strategies for designing and optimizing new generation vaccines». Nat Rev Immunol, 1, 209-19.
- Betenbaugh, M., M. Yu, K. Kuehl, J. White, D. Pennock, K. Spik et C. Schmaljohn. 1995. «Nucleocapsid- and virus-like particles assemble in cells infected with recombinant baculoviruses or vaccinia viruses expressing the M and the S segments of Hantaan virus». Virus Res, 38, 111-24.

Bevan, M. J. 1995. «Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes in vivo». J Exp Med, 182, 639-41.

Bickert, T., G. Wohlleben, M. Brinkman, C. M. Trujillo-Vargas, C. Ruehland, C. O. Reiser, J. Hess et K. J. Erb. 2007. «Murine polyomavirus-like particles induce maturation of bone marrow-derived dendritic cells and proliferation of T cells». Med Microbiol Immunol (Berl), 196, 31-9.

Boehme, K. W. et T. Compton. 2004. «Innate sensing of viruses by toll-like receptors». J Virol, 78, 7867-73.

Bosio, C. M., B. D. Moore, K. L. Warfield, G. Ruthel, M. Mohamadzadeh, M. J. Aman et S. Bavari. 2004. «Ebola and Marburg virus-like particles activate human myeloid dendritic cells». Virology, 326, 280-7.

Bousarghin, L., P. Hubert, E. Franzen, N. Jacobs, J. Boniver et P. Delvenne. 2005. «Human papillomavirus 16 virus-like particles use heparan sulfates to bind dendritic cells and colocalize with langerin in Langerhans cells». J Gen Virol, 86, 1297-305.

Brode, S. et P. A. Macary. 2004. «Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew!». Immunology, 112, 345-51.

Brown, G. D., J. Herre, D. L. Williams, J. A. Willment, A. S. Marshall et S. Gordon. 2003. «Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans». J Exp Med, 197, 1119-24.

Brumfield, S., D. Willits, L. Tang, J. E. Johnson, T. Douglas et M. Young. 2004. «Heterologous expression of the modified coat protein of Cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function». J Gen Virol, 85, 1049-53.

Buonaguro, L., M. L. Tornesello, M. Tagliamonte, R. C. Gallo, L. X. Wang, R. Kamin-Lewis, S. Abdelwahab, G. K. Lewis et F. M. Buonaguro. 2006. «Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses». J Virol, 80, 9134-43.

Cambi, A., F. de Lange, N. M. van Maarseveen, M. Nijhuis, B. Joosten, E. M. van Dijk, B. I. de Bakker, J. A. Fransen, P. H. Bovee-Geurts, F. N. van Leeuwen, N. F. Van Hulst et C. G. Figdor. 2004. «Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells». J Cell Biol, 164, 145-55.

Canizares, M. C., G. P. Lomonossoff et L. Nicholson. 2005. «Development of cowpea mosaic virus-based vectors for the production of vaccines in plants». Expert Rev Vaccines, 4, 687-97.

Casal, J. I. 1999. «Use of parvovirus-like particles for vaccination and induction of multiple immune responses». Biotechnol Appl Biochem, 29 (Pt 2), 141-50.

Casal, J. I., P. Rueda et A. Hurtado. 1999. «Parvovirus-like particles as vaccine vectors». Methods, 19, 174-86.

- Chamaillard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M. A. Valvano, S. J. Foster, T. W. Mak, G. Nunez et N. Inohara. 2003. «An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid». Nat Immunol, 4, 702-7.
- Colonna, M., G. Trinchieri et Y. J. Liu. 2004. «Plasmacytoid dendritic cells in immunity». Nat Immunol, 5, 1219-26.
- Cresswell, P. 1996. «Invariant chain structure and MHC class II function». Cell, 84, 505-7.
- Cyster, J. G. 1999. «Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs». Science, 286, 2098-102.
- Da Silva, D. M., J. T. Schiller et W. M. Kast. 2003. «Heterologous boosting increases immunogenicity of chimeric papillomavirus virus-like particle vaccines». Vaccine, 21, 3219-27.
- Dabbagh, K. et D. B. Lewis. 2003. «Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses». Curr Opin Infect Dis, 16, 199-204.
- Datta, S. K. et E. Raz. 2005. «Induction of antigen cross-presentation by Toll-like receptors». Springer Semin Immunopathol, 26, 247-55.
- Del Giudice, G. et R. Rappuoli. 1999. «Genetically derived toxoids for use as vaccines and adjuvants». Vaccine, 17 Suppl 2, S44-52.
- den Haan, J. M., S. M. Lehar et M. J. Bevan. 2000. «CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo». J Exp Med, 192, 1685-96.
- Denis, J., N. Majeau, E. Acosta-Ramirez, C. Savard, M. C. Bedard, S. Simard, K. Lecours, M. Bolduc, C. Pare, B. Willems, N. Shoukry, P. Tessier, P. Lacasse, A. Lamarre, R. Lapointe, C. Lopez Macias et D. Leclerc. 2007. «Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization». Virology, 363, 59-68.
- Dong, C. et R. A. Flavell. 2000. «Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses». Arthritis Res, 2, 179-188.
- Donnelly, J. J., J. B. Ulmer, J. W. Shiver et M. A. Liu. 1997. «DNA vaccines». Annu Rev Immunol, 15, 617-48.
- Donnelly, J. J., B. Wahren et M. A. Liu. 2005. «DNA vaccines: progress and challenges». J Immunol, 175, 633-9.
- Durham, A. C. et J. B. Bancroft. 1979. «Cation binding by papaya mosaic virus and its protein». Virology, 93, 246-52.

- Eisenbarth, S. C., D. A. Piggott, J. W. Huleatt, I. Visintin, C. A. Herrick et K. Bottomly. 2002. «Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen». J Exp Med, 196, 1645-51.
- Erickson, J. W. et J. B. Bancroft. 1980. «The assembly of papaya mosaic virus coat protein with DNA». Prog Clin Biol Res, 40, 293-300.
- Eriksson, K. et J. Holmgren. 2002. «Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants». Curr Opin Immunol, 14, 666-72.
- Estes, M. K., J. M. Ball, R. A. Guerrero, A. R. Opekun, M. A. Gilger, S. S. Pacheco et D. Y. Graham. 2000. «Norwalk virus vaccines: challenges and progress». J Infect Dis, 181 Suppl 2, S367-73.
- Evans, T. G., W. Bonnez, R. C. Rose, S. Koenig, L. Demeter, J. A. Suzich, D. O'Brien, M. Campbell, W. I. White, J. Balsley et R. C. Reichman. 2001. «A Phase I study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers». J Infect Dis, 183, 1485-93.
- Fausch, S. C., D. M. Da Silva et W. M. Kast. 2003. «Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells». Cancer Res, 63, 3478-82.
- Fehr, T., D. Skrastina, P. Pumpens et R. M. Zinkernagel. 1998. «T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles». Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 9477-81.
- Fu, T. M., A. Friedman, J. B. Ulmer, M. A. Liu et J. J. Donnelly. 1997. «Protective cellular immunity: cytotoxic T-lymphocyte responses against dominant and recessive epitopes of influenza virus nucleoprotein induced by DNA immunization». J Virol, 71, 2715-21.
- Gallucci, S., M. Lolkema et P. Matzinger. 1999. «Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells». Nat Med, 5, 1249-55.
- Gallucci, S. et P. Matzinger. 2001. «Danger signals: SOS to the immune system». Curr Opin Immunol, 13, 114-9.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira et D. M. Underhill. 2003. «Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2». J Exp Med, 197, 1107-17.
- Garcea, R. L. et L. Gissmann. 2004. «Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules». Curr Opin Biotechnol, 15, 513-7.
- Garcia-Pineros, A. J., A. Hildesheim, M. Trivett, M. Williams, L. Wu, V. N. Kewalramani et L. A. Pinto. 2006. «Role of DC-SIGN in the activation of dendritic cells by HPV-16 L1 virus-like particle vaccine». Eur J Immunol, 36, 437-45.

- Geijtenbeek, T. B. et Y. van Kooyk. 2003. «Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity». *Apmis*, 111, 698-714.
- Georgiou, G., C. Stathopoulos, P. S. Daugherty, A. R. Nayak, B. L. Iverson et R. Curtiss, 3rd. 1997. «Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines». *Nat Biotechnol*, 15, 29-34.
- Gherardi, M. M. et M. Esteban. 2005. «Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors». *J Gen Virol*, 86, 2925-36.
- Gilbert, S. C., M. Plebanski, S. J. Harris, C. E. Allsopp, R. Thomas, G. T. Layton et A. V. Hill. 1997. «A protein particle vaccine containing multiple malaria epitopes». *Nat Biotechnol*, 15, 1280-4.
- Gillison, M. L. et D. R. Lowy. 2004. «A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer». *Lancet*, 363, 1488-9.
- Girardin, S. E., I. G. Boneca, L. A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M. K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, J. Bertin, P. J. Sansonetti et D. J. Philpott. 2003. «Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan». *Science*, 300, 1584-7.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen et M. L. Dustin. 1999. «The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation». *Science*, 285, 221-7.
- Grgacic, E. V. et D. A. Anderson. 2006. «Virus-like particles: passport to immune recognition». *Methods*, 40, 60-5.
- Griffiths, G. M. 1995. «The cell biology of CTL killing». *Curr Opin Immunol*, 7, 343-8.
- Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery et S. Amigorena. 2002. «Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells». *Annu Rev Immunol*, 20, 621-67.
- Gurunathan, S., D. M. Klinman et R. A. Seder. 2000. «DNA vaccines: immunology, application, and optimization*». *Annu Rev Immunol*, 18, 927-74.
- Harro, C. D., Y. Y. Pang, R. B. Roden, A. Hildesheim, Z. Wang, M. J. Reynolds, T. C. Mast, R. Robinson, B. R. Murphy, R. A. Karron, J. Dillner, J. T. Schiller et D. R. Lowy. 2001. «Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine». *J Natl Cancer Inst*, 93, 284-92.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman et M. C. Nussenzweig. 2001. «Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo». *J Exp Med*, 194, 769-79.

Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill et A. Aderem. 2001. «The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5». Nature, 410, 1099-103.

Heath, W. R., G. T. Belz, G. M. Behrens, C. M. Smith, S. P. Forehan, I. A. Parish, G. M. Davey, N. S. Wilson, F. R. Carbone et J. A. Villadangos. 2004. «Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens». Immunol Rev, 199, 9-26.

Heath, W. R. et J. A. Villadangos. 2005. «No driving without a license». Nat Immunol, 6, 125-6.

Hemmi, H., T. Kaisho, K. Takeda et S. Akira. 2003. «The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets». J Immunol, 170, 3059-64.

Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda et S. Akira. 2000. «A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA». Nature, 408, 740-5.

Henke, S., A. Rohmann, W. M. Bertling, T. Dingermann et A. Zimmer. 2000. «Enhanced in vitro oligonucleotide and plasmid DNA transport by VPI virus-like particles». Pharm Res, 17, 1062-70.

Henry, J., M. M. Miller et P. Pontarotti. 1999. «Structure and evolution of the extended B7 family». Immunol Today, 20, 285-8.

Hilleman, M. R. 2000. «Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries». J Hum Virol, 3, 63-76.

Hiltbold, E. M. et P. A. Roche. 2002. «Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway». Curr Opin Immunol, 14, 30-5.

Hymel, P. A. 2006. «Decreasing risk: impact of HPV vaccination on outcomes». Am J Manag Care, 12, S473-83.

Ikonomidis, G., D. A. Portnoy, W. Gerhard et Y. Paterson. 1997. «Influenza-specific immunity induced by recombinant *Listeria monocytogenes* vaccines». Vaccine, 15, 433-40.

Itano, A. A. et M. K. Jenkins. 2003. «Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node». Nat Immunol, 4, 733-9.

Iwasaki, A. et R. Medzhitov. 2004. «Toll-like receptor control of the adaptive immune responses». Nat Immunol, 5, 987-95.

Janeway, C. A., Jr. et R. Medzhitov. 2002. «Innate immune recognition». Annu Rev Immunol, 20, 197-216.

- Jefferson, T., M. Rudin et C. Di Pietrantonj. 2004. «Adverse events after immunisation with aluminium-containing DTP vaccines: systematic review of the evidence». Lancet Infect Dis, 4, 84-90.
- Jeong, S. H., M. Qiao, M. Nascimbeni, Z. Hu, B. Rehermann, K. Murthy et T. J. Liang. 2004. «Immunization with hepatitis C virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in nonhuman primates». J Virol, 78, 6995-7003.
- Jodar, L., E. Griffiths et I. Feavers. 2004. «Scientific challenges for the quality control and production of group C meningococcal conjugate vaccines». Vaccine, 22, 1047-53.
- Johnson, J. E. et W. Chiu. 2000. «Structures of virus and virus-like particles». Curr Opin Struct Biol, 10, 229-35.
- Jutras, I. et M. Desjardins. 2005. «Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity». Annu Rev Cell Dev Biol, 21, 511-27.
- Kaech, S. M., E. J. Wherry et R. Ahmed. 2002. «Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development». Nat Rev Immunol, 2, 251-62.
- Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, R. M. Zinkernagel et H. Hengartner. 1996. «Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo». Annu Rev Immunol, 14, 207-32.
- Kalams, S. A. et B. D. Walker. 1998. «The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses». J Exp Med, 188, 2199-204.
- Kamath, A. T., J. Pooley, M. A. O'Keeffe, D. Vremec, Y. Zhan, A. M. Lew, A. D'Amico, L. Wu, D. F. Tough et K. Shortman. 2000. «The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations». J Immunol, 165, 6762-70.
- Kapsenberg, M. L. 2003. «Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization». Nat Rev Immunol, 3, 984-93.
- Kaufmann, S. H. et U. E. Schaible. 2005. «100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus». Trends Microbiol, 13, 469-75.
- Keating, G. M. et S. Noble. 2003. «Recombinant hepatitis B vaccine (Engerix-B): a review of its immunogenicity and protective efficacy against hepatitis B». Drugs, 63, 1021-51.
- Kochi, S. K., K. P. Killeen et U. S. Ryan. 2003. «Advances in the development of bacterial vector technology». Expert Rev Vaccines, 2, 31-43.
- Konjufca, V., S. Y. Wanda, M. C. Jenkins et R. Curtiss, 3rd. 2006. «A recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine encoding *Eimeria acervulina* antigen offers protection against *E. acervulina* challenge». Infect Immun, 74, 6785-96.

- Latham, T. et J. M. Galarza. 2001. «Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins». J Virol, 75, 6154-65.
- Lechmann, M., K. Murata, J. Sato, J. Vergalla, T. F. Baumert et T. J. Liang. 2001. «Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice». Hepatology, 34, 417-23.
- Leclerc, C. 2003. «New approaches in vaccine development». Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 26, 329-41.
- Leclerc, D., D. Beauseigle, J. Denis, H. Morin, C. Pare, A. Lamarre et R. Lapointe. 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». J Virol, 81, 1319-26.
- Lecours, K., M. H. Tremblay, M. E. Gagne, S. M. Gagne et D. Leclerc. 2006. «Purification and biochemical characterization of a monomeric form of papaya mosaic potexvirus coat protein». Protein Expr Purif, 47, 273-80.
- Lee, C. J., T. R. Wang et S. S. Tai. 1997. «Immunologic epitope, gene, and immunity involved in pneumococcal glycoconjugate». Crit Rev Microbiol, 23, 121-42.
- Lenz, P., P. M. Day, Y. Y. Pang, S. A. Frye, P. N. Jensen, D. R. Lowy et J. T. Schiller. 2001. «Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells». J Immunol, 166, 5346-55.
- Lesinski, G. B. et M. A. Westerink. 2001. «Novel vaccine strategies to T-independent antigens». J Microbiol Methods, 47, 135-49.
- Lesinski, G. B. et M. A. Westerink. 2001. «Vaccines against polysaccharide antigens». Curr Drug Targets Infect Disord, 1, 325-34.
- Lewis, P. J. et L. A. Babiuk. 1999. «DNA vaccines: a review». Adv Virus Res, 54, 129-88.
- Lindberg, A. A. 1999. «Glycoprotein conjugate vaccines». Vaccine, 17 Suppl 2, S28-36.
- Lipscomb, M. F. et B. J. Masten. 2002. «Dendritic cells: immune regulators in health and disease». Physiol Rev, 82, 97-130.
- Liu, M. A. 1999. «Vaccines timeline. Interview by Philip Cohen». Bmj, 319, 1301.
- Ljubojevic, S. 2006. «The human papillomavirus vaccines». Acta Dermatovenerol Croat, 14, 208.
- Lo-Man, R., P. Rueda, C. Sedlik, E. Deriaud, I. Casal et C. Leclerc. 1998. «A recombinant virus-like particle system derived from parvovirus as an efficient antigen

carrier to elicit a polarized Th1 immune response without adjuvant». Eur J Immunol, 28, 1401-7.

Lowe, D. B., M. H. Shearer et R. C. Kennedy. 2006. «DNA vaccines: successes and limitations in cancer and infectious disease». J Cell Biochem, 98, 235-42.

Lowy, D. R. et J. T. Schiller. 2006. «Prophylactic human papillomavirus vaccines». J Clin Invest, 116, 1167-73.

Makela, P. H. 2000. «Vaccines, coming of age after 200 years». FEMS Microbiol Rev, 24, 9-20.

Maranga, L., P. Rueda, A. F. Antonis, C. Vela, J. P. Langeveld, J. I. Casal et M. J. Carrondo. 2002. «Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine». Appl Microbiol Biotechnol, 59, 45-50.

Marusic, C., P. Rizza, L. Lattanzi, C. Mancini, M. Spada, F. Belardelli, E. Benvenuto et I. Capone. 2001. «Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1». J Virol, 75, 8434-9.

Matzinger, P. 1994. «Tolerance, danger, and the extended family». Annu Rev Immunol, 12, 991-1045.

Matzinger, P. 1998. «An innate sense of danger». Semin Immunol, 10, 399-415.

Maurer, P. et M. F. Bachmann. 2006. «Therapeutic vaccines for nicotine dependence». Curr Opin Mol Ther, 8, 11-6.

Mazzoni, A. et D. M. Segal. 2004. «Controlling the Toll road to dendritic cell polarization». J Leukoc Biol, 75, 721-30.

McAleer, W. J., E. B. Buynak, R. Z. Maigetter, D. E. Wampler, W. J. Miller et M. R. Hilleman. 1984. «Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast». Nature, 307, 178-80.

McCormick, A. A., T. A. Corbo, S. Wykoff-Clary, L. V. Nguyen, M. L. Smith, K. E. Palmer et G. P. Pogue. 2006. «TMV-peptide fusion vaccines induce cell-mediated immune responses and tumor protection in two murine models». Vaccine, 24, 6414-23.

McLellan, A. D., E. B. Brocker et E. Kampgen. 2000. «Dendritic cell activation by danger and antigen-specific T-cell signalling». Exp Dermatol, 9, 313-22.

McLemore, M. R. 2006. «Gardasil: Introducing the new human papillomavirus vaccine». Clin J Oncol Nurs, 10, 559-60.

Mihailova, M., M. Boos, I. Petrovskis, V. Ose, D. Skrastina, M. Fiedler, I. Sominskaya, S. Ross, P. Pumpens, M. Roggendorf et S. Viazov. 2006. «Recombinant

virus-like particles as a carrier of B- and T-cell epitopes of hepatitis C virus (HCV)». Vaccine, 24, 4369-77.

Montefiori, D. C., J. T. Safrit, S. L. Lydy, A. P. Barry, M. Bilaska, H. T. Vo, M. Klein, J. Tartaglia, H. L. Robinson et B. Rovinski. 2001. «Induction of neutralizing antibodies and gag-specific cellular immune responses to an R5 primary isolate of human immunodeficiency virus type 1 in rhesus macaques». J Virol, 75, 5879-90.

Morenweiser, R. 2005. «Downstream processing of viral vectors and vaccines». Gene Ther, 12 Suppl 1, S103-10.

Morin, H., M. H. Tremblay, E. Plante, C. Pare, N. Majeau, R. Hogue et D. Leclerc. 2007. «High avidity binding of engineered papaya mosaic virus virus-like particles to resting spores of *Plasmodiophora brassicae*». J Biotechnol, 128, 423-34.

Moron, G., P. Rueda, I. Casal et C. Leclerc. 2002. «CD8alpha- CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules». J Exp Med, 195, 1233-45.

Moron, V. G., P. Rueda, C. Sedlik et C. Leclerc. 2003. «In vivo, dendritic cells can cross-present virus-like particles using an endosome-to-cytosol pathway». J Immunol, 171, 2242-50.

Moyle, P. M., R. P. McGeary, J. T. Blanchfield et I. Toth. 2004. «Mucosal immunisation: adjuvants and delivery systems». Curr Drug Deliv, 1, 385-96.

Nakano, H., M. Yanagita et M. D. Gunn. 2001. «CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells». J Exp Med, 194, 1171-8.

Nathanson, N. et A. D. Langmuir. 1995. «The Cutter incident. Poliomyelitis following formaldehyde-inactivated poliovirus vaccination in the United States during the Spring of 1955. II. Relationship of poliomyelitis to Cutter vaccine. 1963». Am J Epidemiol, 142, 109-40; discussion 107-8.

Natilla, A., G. Piazzolla, M. Nuzzaci, P. Saldarelli, C. Tortorella, S. Antonaci et P. Piazzolla. 2004. «Cucumber mosaic virus as carrier of a hepatitis C virus-derived epitope». Arch Virol, 149, 137-54.

Niikura, M., S. Takamura, G. Kim, S. Kawai, M. Saijo, S. Morikawa, I. Kurane, T. C. Li, N. Takeda et Y. Yasutomi. 2002. «Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes». Virology, 293, 273-80.

Noad, R. et P. Roy. 2003. «Virus-like particles as immunogens». Trends Microbiol, 11, 438-44.

O'Keefe, M., H. Hochrein, D. Vremec, I. Caminschi, J. L. Miller, E. M. Anders, L. Wu, M. H. Lahoud, S. Henri, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch et K. Shortman. 2002. «Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface

phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus». J Exp Med, 196, 1307-19.

Paccez, J. D., W. B. Luiz, M. E. Sbrogio-Almeida, R. C. Ferreira, W. Schumann et L. C. Ferreira. 2006. «Stable episomal expression system under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of *Bacillus subtilis* as a vector for antigen delivery». Vaccine, 24, 2935-43.

Paliard, X., Y. Liu, R. Wagner, H. Wolf, J. Baenziger et C. M. Walker. 2000. «Priming of strong, broad, and long-lived HIV type 1 p55gag-specific CD8+ cytotoxic T cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques». AIDS Res Hum Retroviruses, 16, 273-82.

Palker, T. J., J. M. Monteiro, M. M. Martin, C. Kakareka, J. F. Smith, J. C. Cook, J. G. Joyce et K. U. Jansen. 2001. «Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles». Vaccine, 19, 3733-43.

Parez, N., C. Fourgeux, A. Mohamed, C. Dubuquoy, M. Pillot, A. Dehee, A. Charpilienne, D. Poncet, I. Schwartz-Cornil et A. Garbarg-Chenon. 2006. «Rectal immunization with rotavirus virus-like particles induces systemic and mucosal humoral immune responses and protects mice against rotavirus infection». J Virol, 80, 1752-61.

Pattenden, L. K., A. P. Middelberg, M. Niebert et D. I. Lipin. 2005. «Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles». Trends Biotechnol, 23, 523-9.

Payette, P. J. et H. L. Davis. 2001. «History of vaccines and positioning of current trends». Curr Drug Targets Infect Disord, 1, 241-7.

Penna, G., M. Vulcano, S. Sozzani et L. Adorini. 2002. «Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells». Hum Immunol, 63, 1164-71.

Petry, H., C. Goldmann, O. Ast et W. Luke. 2003. «The use of virus-like particles for gene transfer». Curr Opin Mol Ther, 5, 524-8.

Pieters, J. 2000. «MHC class II-restricted antigen processing and presentation». Adv Immunol, 75, 159-208.

Plotkin, S. A. 2005. «Vaccines: past, present and future». Nat Med, 11, S5-11.

Prilliman, K. R., E. E. Lemmens, G. Palioungas, T. G. Wolfe, J. P. Allison, A. H. Sharpe et S. P. Schoenberger. 2002. «Cutting edge: a crucial role for B7-CD28 in transmitting T help from APC to CTL». J Immunol, 169, 4094-7.

Pulendran, B. 2005. «Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors». J Immunol, 174, 2457-65.

- Quah, B. J. et H. C. O'Neill. 2005. «Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity». J Cell Mol Med, 9, 643-54.
- Ramirez, M. C. et L. J. Sigal. 2004. «The multiple routes of MHC-I cross-presentation». Trends Microbiol, 12, 204-7.
- Re, F. et J. L. Strominger. 2004. «Heterogeneity of TLR-induced responses in dendritic cells: from innate to adaptive immunity». Immunobiology, 209, 191-8.
- Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli et S. Amigorena. 1999. «Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization». J Exp Med, 189, 371-80.
- Reis e Sousa, C. 2004. «Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity». Curr Opin Immunol, 16, 21-5.
- Robbins, J. B., R. Schneerson, B. Trollfors, H. Sato, Y. Sato, R. Rappuoli et J. M. Keith. 2005. «The diphtheria and pertussis components of diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine should be genetically inactivated mutant toxins». J Infect Dis, 191, 81-8.
- Robinson, S. P., K. Saraya et C. D. Reid. 1998. «Developmental aspects of dendritic cells in vitro and in vivo». Leuk Lymphoma, 29, 477-90.
- Rock, K. L. 1996. «A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world». Immunol Today, 17, 131-7.
- Romero-Steiner, S., J. Caba, G. Rajam, T. Langley, A. Floyd, S. E. Johnson, J. S. Sampson, G. M. Carlone et E. Ades. 2006. «Adherence of recombinant pneumococcal surface adhesin A (rPsaA)-coated particles to human nasopharyngeal epithelial cells for the evaluation of anti-PsaA functional antibodies». Vaccine, 24, 3224-31.
- Rueda, P., J. Fominaya, J. P. Langeveld, C. Brusckhe, C. Vela et J. I. Casal. 2000. «Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles». Vaccine, 19, 726-34.
- Rueda, P., J. L. Martinez-Torrecuadrada, J. Sarraseca, C. Sedlik, M. del Barrio, A. Hurtado, C. Leclerc et J. I. Casal. 1999. «Engineering parvovirus-like particles for the induction of B-cell, CD4(+) and CTL responses». Vaccine, 18, 325-32.
- Rueda, P., G. Moron, J. Sarraseca, C. Leclerc et J. I. Casal. 2004. «Influence of flanking sequences on presentation efficiency of a CD8+ cytotoxic T-cell epitope delivered by parvovirus-like particles». J Gen Virol, 85, 563-72.
- Ruedl, C., K. Schwarz, A. Jegerlehner, T. Storni, V. Manolova et M. F. Bachmann. 2005. «Virus-like particles as carriers for T-cell epitopes: limited inhibition of T-cell priming by carrier-specific antibodies». J Virol, 79, 717-24.

Ruedl, C., T. Storni, F. Lechner, T. Bachi et M. F. Bachmann. 2002. «Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP». Eur J Immunol, 32, 818-25.

Sailaja, G., I. Skountzou, F. S. Quan, R. W. Compans et S. M. Kang. 2007. «Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells». Virology, 362, 331-41.

Saini, M. et S. Vрати. 2003. «A Japanese encephalitis virus peptide present on Johnson grass mosaic virus-like particles induces virus-neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge». J Virol, 77, 3487-94.

Saklani-Jusforgues, H., E. Fontan, N. Soussi, G. Milon et P. L. Goossens. 2003. «Enteral immunization with attenuated recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vector: organ-dependent dynamics of CD4 T lymphocytes reactive to a *Leishmania major* tracer epitope». Infect Immun, 71, 1083-90.

Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli et A. Lanzavecchia. 1995. «Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products». J Exp Med, 182, 389-400.

Scheerlinck, J. Y. 2001. «Genetic adjuvants for DNA vaccines». Vaccine, 19, 2647-56.

Schiffman, M. et S. K. Kjaer. 2003. «Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia». J Natl Cancer Inst Monogr, 14-9.

Schiller, J. T. et D. R. Lowy. 2006. «Prospects for cervical cancer prevention by human papillomavirus vaccination». Cancer Res, 66, 10229-32.

Schmiedeskamp, M. R. et D. R. Kockler. 2006. «Human papillomavirus vaccines». Ann Pharmacother, 40, 1344-52.

Sedlik, C., G. Dadaglio, M. F. Saron, E. Deriaud, M. Rojas, S. I. Casal et C. Leclerc. 2000. «In vivo induction of a high-avidity, high-frequency cytotoxic T-lymphocyte response is associated with antiviral protective immunity». J Virol, 74, 5769-75.

Sedlik, C., M. Saron, J. Sarraseca, I. Casal et C. Leclerc. 1997. «Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells». Proc Natl Acad Sci U S A, 94, 7503-8.

Shakushiro, K., Y. Yamasaki, M. Nishikawa et Y. Takakura. 2004. «Efficient scavenger receptor-mediated uptake and cross-presentation of negatively charged soluble antigens by dendritic cells». Immunology, 112, 211-8.

Shedlock, D. J. et D. B. Weiner. 2000. «DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity». J Leukoc Biol, 68, 793-806.

- Sheets, R. L., J. Stein, T. S. Manetz, C. Andrews, R. Bailer, J. Rathmann et P. L. Gomez. 2006. «Toxicological safety evaluation of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar despite differing plasmid backbones or gene-inserts». Toxicol Sci, 91, 620-30.
- Shen, L. et K. L. Rock. 2006. «Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules». Curr Opin Immunol, 18, 85-91.
- Sheng, K. C., D. S. Pouniotis, M. D. Wright, C. K. Tang, E. Lazoura, G. A. Pietersz et V. Apostolopoulos. 2006. «Mannan derivatives induce phenotypic and functional maturation of mouse dendritic cells». Immunology, 118, 372-83.
- Shortman, K. et Y. J. Liu. 2002. «Mouse and human dendritic cell subtypes». Nat Rev Immunol, 2, 151-61.
- Singh, M. et I. Srivastava. 2003. «Advances in vaccine adjuvants for infectious diseases». Curr HIV Res, 1, 309-20.
- Singh, P., G. Destito, A. Schneemann et M. Manchester. 2006. «Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting». J Nanobiotechnology, 4, 2.
- Sit, T. L., D. Leclerc et M. G. AbouHaidar. 1994. «The minimal 5' sequence for in vitro initiation of papaya mosaic potexvirus assembly». Virology, 199, 238-42.
- Smyth, M. J., J. M. Kelly, V. R. Sutton, J. E. Davis, K. A. Browne, T. J. Sayers et J. A. Trapani. 2001. «Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins». J Leukoc Biol, 70, 18-29.
- Souza, A. P., L. Haut, A. Reyes-Sandoval et A. R. Pinto. 2005. «Recombinant viruses as vaccines against viral diseases». Braz J Med Biol Res, 38, 509-22.
- Sperling, A. I. et J. A. Bluestone. 1996. «The complexities of T-cell co-stimulation: CD28 and beyond». Immunol Rev, 153, 155-82.
- Steinman, R. M., K. Inaba, S. Turley, P. Pierre et I. Mellman. 1999. «Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies». Hum Immunol, 60, 562-7.
- Stober, D., Z. Trobonjaca, J. Reimann et R. Schirmbeck. 2002. «Dendritic cells pulsed with exogenous hepatitis B surface antigen particles efficiently present epitopes to MHC class I-restricted cytotoxic T cells». Eur J Immunol, 32, 1099-108.
- Storni, T., F. Lechner, I. Erdmann, T. Bachi, A. Jegerlehner, T. Dumrese, T. M. Kundig, C. Ruedl et M. F. Bachmann. 2002. «Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles». J Immunol, 168, 2880-6.
- Storni, T., C. Ruedl, K. Schwarz, R. A. Schwendener, W. A. Renner et M. F. Bachmann. 2004. «Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles

induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects». J Immunol, 172, 1777-85.

Stubbs, A. C. et C. C. Wilson. 2002. «Recombinant yeast as a vaccine vector for the induction of cytotoxic T-lymphocyte responses». Curr Opin Mol Ther, 4, 35-40.

Tacket, C. O., M. B. Sztein, G. A. Losonsky, S. S. Wasserman et M. K. Estes. 2003. «Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers». Clin Immunol, 108, 241-7.

Takeda, K. et S. Akira. 2005. «Toll-like receptors in innate immunity». Int Immunol, 17, 1-14.

Tan, J. K. et H. C. O'Neill. 2005. «Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity». J Leukoc Biol, 78, 319-24.

Tang, H. L. et J. G. Cyster. 1999. «Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells». Science, 284, 819-22.

Thomson, S. A., R. Khanna, J. Gardner, S. R. Burrows, B. Coupar, D. J. Moss et A. Suhrbier. 1995. «Minimal epitopes expressed in a recombinant polyepitope protein are processed and presented to CD8+ cytotoxic T cells: implications for vaccine design». Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 5845-9.

Tipping, P. G. 2006. «Toll-like receptors: the interface between innate and adaptive immunity». J Am Soc Nephrol, 17, 1769-71.

Tremblay, M. H., N. Majeau, M. E. Gagne, K. Lecours, H. Morin, J. B. Duvignaud, M. Bolduc, N. Chouinard, C. Pare, S. Gagne et D. Leclerc. 2006. «Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein». Febs J, 273, 14-25.

Trinchieri, G. 2007. «Pillars of immunology: The birth of a cell type». J Immunol, 178, 3-4.

Trombetta, E. S. et I. Mellman. 2005. «Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo». Annu Rev Immunol, 23, 975-1028.

Tsunetsugu-Yokota, Y., Y. Morikawa, M. Isogai, A. Kawana-Tachikawa, T. Odawara, T. Nakamura, F. Grassi, B. Autran et A. Iwamoto. 2003. «Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs». J Virol, 77, 10250-9.

Valladeau, J. et S. Saeland. 2005. «Cutaneous dendritic cells». Semin Immunol, 17, 273-83.

van Lier, R. A., I. J. ten Berge et L. E. Gamadia. 2003. «Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses». Nat Rev Immunol, 3, 931-9.

- Veeraswamy, R. K., M. Cella, M. Colonna et E. R. Unanue. 2003. «Dendritic cells process and present antigens across a range of maturation states». J Immunol, 170, 5367-72.
- Villadangos, J. A. et W. R. Heath. 2005. «Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm». Semin Immunol, 17, 262-72.
- Wagner, L. 1997. «A vaccine against AIDS. Hope at last». Tenn Nurse, 60, 19, 21.
- Wagner, R., L. Deml, F. Notka, H. Wolf, R. Schirmbeck, J. Reimann, V. Teeuwesen et J. Heeney. 1996. «Safety and immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus-like particles in rodents and rhesus macaques». Intervirology, 39, 93-103.
- Warfield, K. L., G. Olinger, E. M. Deal, D. L. Swenson, M. Bailey, D. L. Negley, M. K. Hart et S. Bavari. 2005. «Induction of humoral and CD8+ T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection». J Immunol, 175, 1184-91.
- Watts, C. 2004. «Class II MHC: sweetening the peptide only diet?». Cell, 117, 558-9.
- West, M. A., R. P. Wallin, S. P. Matthews, H. G. Svensson, R. Zaru, H. G. Ljunggren, A. R. Prescott et C. Watts. 2004. «Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling». Science, 305, 1153-7.
- Williams, A., C. A. Peh et T. Elliott. 2002. «The cell biology of MHC class I antigen presentation». Tissue Antigens, 59, 3-17.
- Wong, P. et E. G. Pamer. 2003. «CD8 T cell responses to infectious pathogens». Annu Rev Immunol, 21, 29-70.
- Xiang, S. D., A. Scholzen, G. Minigo, C. David, V. Apostolopoulos, P. L. Mottram et M. Plebanski. 2006. «Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter?». Methods, 40, 1-9.
- Yan, M., J. Peng, I. A. Jabbar, X. Liu, L. Filgueira, I. H. Frazer et R. Thomas. 2004. «Despite differences between dendritic cells and Langerhans cells in the mechanism of papillomavirus-like particle antigen uptake, both cells cross-prime T cells». Virology, 324, 297-310.
- Yan, M., J. Peng, I. A. Jabbar, X. Liu, L. Filgueira, I. H. Frazer et R. Thomas. 2005. «Activation of dendritic cells by human papillomavirus-like particles through TLR4 and NF-kappaB-mediated signalling, moderated by TGF-beta». Immunol Cell Biol, 83, 83-91.
- Yang, D., Q. Chen, S. Stoll, X. Chen, O. M. Howard et J. J. Oppenheim. 2000. «Differential regulation of responsiveness to fMLP and C5a upon dendritic cell maturation: correlation with receptor expression». J Immunol, 165, 2694-702.

Zou, G. M. et Y. K. Tam. 2002. «Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances». Eur Cytokine Netw, 13, 186-99.

ANNEXE A:
COURRIEL D'ACCEPTION DU JOURNAL OF VIROLOGY

From: simona@umd.edu

Date: 27 septembre 2007 14:20:18 HAE

To: alain.lamarre@iaf.inrs.ca

Subject: Decision on manuscript JVI01811-07 Version 2

Dear Dr. Lamarre,

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Journal of Virology. I look forward to seeing the paper in press and I will be recommending it for the Spotlight section. I look forward to receiving additional manuscripts in the future.

Sincerely yours,
Anne Simon
Editor, JVI
