

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**La protection naturelle contre une infection par le virus de l'influenza
et celle induite par un vaccin combiné à l'adjuvant Proteosome est
indépendante de l'IL-17A et de l'IL-17F**

Par
Benoît Bélanger

Thèse présentée pour l'obtention du grade
de *Philosophiae doctor*, Ph.D.
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Présidente du jury et examineur interne	Simona Stäger INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Lucie Lamontagne Département des sciences biologique UQAM
Examineur externe	Brian Ward Vaccine Study Center McGill University
Directeur de recherche	Claude Daniel INRS- Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier dans un premier temps le Dr Claude Daniel, mon directeur de recherche, de m'avoir permis d'entreprendre cette thèse dans son laboratoire et surtout de m'avoir soutenu tout au long de mon doctorat.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire, présent et passé, Caroline, Véronique, Gabrielle, Meriam, William, Alexandre et Grégory pour les bons moments passés ensemble ainsi que pour leur conseils et leur aide tout au long de mon doctorat.

Je voudrais aussi dire merci à mes collègues de l'institut, dont certains sont devenus des amis, pour leur aide et leur soutien moral.

J'aimerais finalement remercier les membres de ma famille, Louise, Pierre, Christian, Luc et Louise, qui m'ont encouragé et soutenu durant mes études universitaires. Pour finir, je remercie infiniment Philippe, mon conjoint, pour son aide, son soutien et sa patience. Il a plus que quiconque cru en moi et a toujours su trouver les mots pour m'encourager à persévérer. Il a été une source d'inspiration quotidienne. Cette thèse ne serait pas sans lui.

RÉSUMÉ

Chaque année, la grippe saisonnière est responsable de trois à cinq millions de cas graves et entre 250 000 à 500 000 décès. De plus, la grippe engendre des pertes économiques élevées, malgré les programmes de vaccination. Les vaccins actuellement utilisés sont efficaces chez les personnes âgées de 17 à 49 ans. Par contre, les populations à risque sont peu ou pas protégées par ces vaccins. La conception de nouveaux adjuvants ciblant les muqueuses va permettre de cibler les voies naturelles d'infection et d'induire une réponse immunitaire systémique et des muqueuses. Parmi ces nouveaux adjuvants, les adjuvants/systèmes de libération à base de Proteosome ont été utilisés dans plusieurs études cliniques et animales et ont démontré leur efficacité. Ils sont formés de protéines de la membrane externe (OMP) non covalamment associées avec un antigène (p. ex. hémagglutinine) ou le LPS (Protollin). Le but de notre étude était de caractériser la réponse immunitaire adaptative induite par les adjuvants à base de Proteosome, en utilisant un modèle murin d'immunisation intranasale/intrapulmonaire avec un vaccin contre le virus de l'influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1).

Des souris BALB/c ont été immunisées avec Proteosome, Protollin et CpG et la réponse induite entre 7 et 21 jours post-immunisation a été analysée dans le but de comparer l'habileté de ces adjuvants à potentialiser la réponse immune contre l'antigène hémagglutinine (HA). Nous avons trouvé que les adjuvants à base de Proteosome induisent la différenciation des cellules Th17, et ce, dès 7 jours post-immunisation. Cela corrèle avec une régulation à la hausse de l'expression de l'IL-17A, l'IL-17F, de l'IL-21, du CXCL9, du CXCL10 et du CXCL11. Des souris BALB/c immunisées avec l'antigène HA coadministré avec ces adjuvants étaient protégées suite à une infection expérimentale par le virus de l'influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1), mais une perte de poids (morbidity) était toujours présente chez les souris immunisées avec l'adjuvant Proteosome. Étonnamment, les souris déficientes en IL-17A/F étaient aussi protégées d'un défi létal après immunisation, et la morbidité était réduite significativement en comparaison aux souris sauvages BALB/c. De plus, la déficience en IL-17A et en IL-17F a un faible impact sur la production d'anticorps au niveau systémique (IgG) et des muqueuses (IgG et IgA).

De plus, à la suite d'une infection primaire, non mortelle, par le virus de l'influenza, les souris déficientes en IL-17A et en IL-17F ont une plus faible morbidité ainsi qu'un taux de survie plus élevé que les souris BALB/c sauvages ou les souris IL-17AKO. Nous avons observé que les souris IL-17A/FKO, infectées par le virus de l'influenza, ont un nombre de cellules NK et de lymphocytes T $\gamma\delta$ augmenté en comparaison aux souris BALB/c. De plus, ces mêmes souris ont une augmentation de l'expression génique de l'IFN- α et de l'IFN- β avant l'infection.

Tous ces résultats nous permettent de conclure que la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome est indépendante de l'IL-17A et de l'IL-17F et que ces cytokines ne sont pas essentielles pour la protection contre une infection par le virus de l'influenza.

Mots clés : Vaccination, Th17, adjuvants à base de Proteosome, influenza, réponse adaptative, réponse antivirale

Benoît Bélanger

Claude Daniel

ABSTRACT

Every year, seasonal flu is responsible for between three and five million severe cases, of which 250,000 to 500,000 result in death. Influenza also generates important economic costs, despite the vaccination programs available. The vaccines currently in usage are effective in people aged 17 to 49. However, at-risk populations are either protected less or not at all by these vaccines. The development of new adjuvants targeting the mucosa will enable the vaccines to target natural infection pathways and to induce a systemic and mucosal immune response. Among these new adjuvants, the Proteosome-based adjuvants/delivery systems have been used in multiple clinical and animal studies, where their efficiency was successfully demonstrated. These adjuvants/delivery systems are made up of outer membrane proteins (OMPs) bonded non-covalently with to an antigen (e.g. hemagglutinin) or with LPS (Protollin). We aimed to characterize the adaptive immune response induced by Proteosome-based adjuvants, using a murine model of intranasal immunization with an influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) vaccine.

BALB/c mice were immunized with Proteosome, Protollin and CpG, and the induced response between days 7 and 21 post-immunization was analyzed, in order to compare these adjuvants' capacity to potentiate the immune response to hemagglutinin (HA). We found that Proteosome-based adjuvants induced the differentiation of Th17 cells as soon as 7 d.p.i., and this correlates with the upregulation of IL-17A, IL-17F, IL-21, CXCL9, CXCL10 and CXCL11 expression. BALB/c mice immunized with HA antigen, co-administered with these adjuvants were protected against a lethal influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) virus challenge, although weight loss (morbidity) was still observed in mice immunized with the Proteosome-based adjuvant. Surprisingly, IL-17A/F-deficient mice were also protected against a lethal virus challenge after immunization, and morbidity was significantly reduced when compared with wild-type BALB/c mice. Furthermore, IL-17A/F deficiency had little impact on systemic (IgG) and mucosal (IgG and IgA) antibody production.

Moreover, following sublethal infection by the influenza virus, IL-17A/F-deficient mice had lower morbidity and a higher survival rate than wild-type BALB/c and IL/17AKO mice. We found that IL-17A/FKO mice infected with the influenza virus had a higher number of NK cells and T $\gamma\delta$ lymphocytes, compared with BALB/c mice. These same mice express higher levels of IFN- α and IFN- β before infection.

These results have allowed us to conclude that the protection induced by Proteosome-based adjuvants is independent from IL-17A and IL-17 F, and that these cytokines are not essential for protection against influenza virus infection.

Keywords: Vaccination, Th17, Proteosome-based adjuvants, influenza, adaptive response, antiviral response

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	XVII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I ÉTAT DES CONNAISSANCES	5
1. LE VIRUS DE L'INFLUENZA	6
1.1. ÉPIDÉMIOLOGIE	6
1.2. PHYLOGÉNIE	6
1.3. PROTÉINES VIRALES	7
1.3.1. <i>Hémagglutinine</i>	7
1.4. LA DÉRIVE ANTIGÉNIQUE ET LE RÉASSORTIMENT ANTIGÉNIQUE.....	8
1.4.1. <i>La dérive antigénique</i>	8
1.4.2. <i>Le réassortiment antigénique</i>	9
1.5. MODÈLES ANIMAUX POUR LES ÉTUDES DU VIRUS DE L'INFLUENZA.....	9
1.5.1. <i>Le modèle murin</i>	11
2. PATHOGENÈSE DU VIRUS DE L'INFLUENZA ET RÉPONSE IMMUNITAIRE INDUITE	12
2.1. PATHOGENÈSE DU VIRUS	12
2.2. RÉPONSE IMMUNITAIRE INDUITE	13
2.2.1. <i>Réponse immunitaire innée</i>	13
2.2.2. <i>Réponse immunitaire adaptative</i>	16
3. LA VACCINATION CONTRE LE VIRUS DE L'INFLUENZA	19
3.1. LES VACCINS INACTIVÉS.....	19
3.2. LES VACCINS VIVANTS ATTÉNUÉS	20
3.3. IMMUNITÉ INDUITE PAR LES VACCINS	21
3.3.1. <i>La réponse humorale</i>	21
3.3.2. <i>La réponse cellulaire</i>	22
3.4. EFFICACITÉ DES VACCINS.....	22
3.5. APPROCHES VACCINALES EN DÉVELOPPEMENT.....	23
4. ADJUVANTS À BASE DE PROTEOSOME	26
4.1. ADJUVANTS	26
4.2. LA TECHNOLOGIE PROTEOSOME POUR VACCIN ET ADJUVANT	27
4.2.1. <i>Le complexe proteosome-antigène (Proteosome)</i>	27
4.2.2. <i>Le complexe proteosome-LPS (Protollin)</i>	28
4.2.3. <i>Mécanisme d'action</i>	29
4.2.4. <i>Réponse immunitaire induite suite à la vaccination avec les adjuvants à base de Proteosome contre le virus de l'influenza</i>	31
5. TH17 ET IL-17.....	33

5.1. GÉNÉRALITÉS.....	34
5.2. RÔLE DES CELLULES TH17	37
5.2.1. <i>Immunité microbienne</i>	37
5.2.2. <i>Maladies inflammatoires</i>	39
5.2.3. <i>Vaccination</i>	39
5.3. LES CELLULES PRODUCTRICES D'IL-17 ET LE VIRUS DE L'INFLUENZA	40
6. PROBLÉMATIQUE.....	42
CHAPITRE II LES RÉSULTATS	45
1. PUBLICATION NO 1	46
1.1. RÉSUMÉ.....	47
1.2. ABSTRACT.....	48
1.3. INTRODUCTION	49
1.4. MATERIALS AND METHODS.....	52
1.5. RESULTS.....	56
1.6. DISCUSSION	59
1.7. REFERENCES	62
1.8. FIGURE LEGENDS	67
1.9. TABLES	73
2. PUBLICATION NO 2	74
2.1. RÉSUMÉ.....	75
2.2. ABSTRACT.....	76
2.3. INTRODUCTION	77
2.4. MATERIALS AND METHODS.....	79
2.5. RESULTS AND DISCUSSION.....	81
2.6. REFERENCES	84
2.7. FIGURE LEGENDS	87
2.8. TABLES	90
3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	91
3.1. INTRODUCTION	91
3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	91
3.2.1. <i>Réponse humorale spécifique de l'antigène</i>	92
3.2.2. <i>Cytométrie en flux</i>	92
3.3. RÉSULTATS	93
3.3.1. <i>L'IL-17A n'a pas d'impact sur la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome ainsi que sur la production d'anticorps</i>	93
3.3.2. <i>L'adjuvant Proteosome induit la surexpression d'IL-17F</i>	94
3.3.3. <i>Les adjuvants à base de Proteosome induisent une persistance des anticorps contre l'hémagglutinine</i>	94
3.3.4. <i>Une réponse spécifique contre les particules de proteosome est induite, mais pas contre l'hémagglutinine</i>	95
CHAPITRE III DISCUSSION	103
1. LIMITATIONS DES VACCINS ACTUELS CONTRE LE VIRUS DE L'INFLUENZA.....	105
2. EFFICACITÉ DES ADJUVANTS À BASE DE PROTEOSOME	107
3. LES ADJUVANTS À BASE DE PROTEOSOME ET LES CELLULES TH17.....	110
3.1. <i>Résumé</i>	112
4. LA PROTECTION INDUITE PAR LES ADJUVANTS À BASE DE PROTEOSOME EST INDÉPENDANTE DE L'IL-17A ET DE L'IL-17F	113
4.1. RÉSUMÉ.....	114

5. L'ABSENCE D'IL-17A ET D'IL-17F A PEU D'IMPACT SUR LA RÉPONSE HUMORALE INDUITE PAR LES ADJUVANTS À BASE DE PROTEOSOME.....	115
5.1. <i>Résumé</i>	116
6. LES SOURIS DÉFICIENTE EN IL-17A ET EN IL-17F ONT UN ENVIRONNEMENT INFLAMMATOIRE FAVORISANT LA SURVIE DE L'HÔTE.....	117
5.1 <i>Résumé</i>	119
CONCLUSION	121
BIBLIOGRAPHIE	123

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Circulation épidémique des virus grippaux A et B au cours du XXe siècle.....	7
Figure 2 : Exemple de réassortiment antigénique avec la phylogénie du virus pandémique H1N1v	10
Figure 3 : Voie de signalisation classique des interférons de type 1	15
Figure 4 : Formation du vaccin nasale Proteosome	28
Figure 5: Formation du vaccin nasale Protollin	29
Figure 6 : Différenciation des différents types de cellules T auxiliaires.....	34

Publication No 1

Figure 1.....	67
Figure 2.....	68
Figure 3.....	69
Figure 4.....	70
Figure 5.....	71
Figure 6.....	72

Publication No 2

Figure 1.....	87
Figure 2.....	88
Figure 3.....	89

Figure complémentaire

Figure 7.....	97
Figure 8.....	98
Figure 9.....	99
Figure 10.....	100
Figure 11.....	101
Figure 12.....	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques des vaccins anti-grippaux homologués au Canada, 2013-2014	20
Tableau II : Récepteurs de l'immunité innée et adjuvants impliqués dans la génération des cellules Th17	35
Publication No 1	
Tableau I.....	73
Publication No2	
Tableau I.....	90

LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

2-ME	2-Mercaptoéthanol
ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APC	Allophycocyanine
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BALF	Fluide des lavages broncho-alvéolaire (Bronchoalveolar lavage fluid)
BSA	Albumine sérique bovine
CD	Marqueur de surface cellulaire (Cluster of differentiation)
CTL	Lymphocytes T cytotoxique
CXCL	C-X-C ligand
EDTA	Éthylène Diamine Tétra Acétique
FCS	Sérum de veau fœtal
FITC	Isothiocyanate fluorescent
Gapdh	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
G-CSF	Facteur de stimulation de colonie des granulocytes
GM-CSF	Facteur de stimulation de colonie des granulocytes et des macrophages
HA	Hémagglutinine
HTLV	Virus T-lymphotropique humain
HSV	Herpès simplex virus
IFN	Interféron

IgA	Immunoglobuline A
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL-	Interleukine-
IL- ??R	Récepteur de l'interleukine ??
IP-10	Protéine inductible par l'IFN- γ 10 (IFN- γ -inducible protein 10)
i.n.	Intranasale
ISCOMs	Complexes immunes stimulants (Immune stimulating complexes)
KO	Déficiente (Knockout)
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
LPP	Lipoprotéine
LPS	Lipopolysaccharide
LOS	Lipooligosaccharide
M1	Protéine de la matrice 1
M2	Protéine de la matrice 2
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP	Protéine chemoattractante des monocytes (monocytes chemoattractant protein)
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MIP	Protéine inflammatoire des monocytes (monocytes inflammatory protein)
MPL	Monophosphoryl lipid A
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
Mx	<i>interferon-inducible Mx protein</i>
NA	Neuraminidase
NCR	Récepteur cytotoxique naturel (natural cytotoxicity receptor)
NEP/NS2	Protéine d'export nucléaire/protéine non-structurale 2

NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR	Récepteur de type Nod (Nod-like receptor)
NP	Nucléoprotéine
NS1	protéine non-structurale 1
OMP	Protéine de la membrane externe (Outer membrane protein)
PA	Polymérase acide
PAMP	Motifs moléculaires associé aux pathogènes (Pathogen-associated molecular patterns)
PB1	Polymérase basique 1
PB1-F2	Polymérase basique 1-F2
PB2	Polymérase basique 2
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate buffered saline
PE	Phycoérythrine
PRR	Récepteur de reconnaissance de motifs (Pattern recognition receptors)
RA	Arthrite rhumatoïde
rHA	Hémagglutinine recombinante
RLR	Récepteur de type RIG-1 (RIG-I-like receptors)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ROR	RAR-related orphan receptor
ROR γ t	RAR-related orphan receptor γ
SIgA	Immunoglobuline A sécrétoire
STAT3	transducteur de signal et activateur de transcription 3
TCR	Récepteur des cellules T
Tfh	Lymphocyte T auxiliaire folliculaire
TGF	Facteur de croissance tumorale

Th	Lymphocyte T auxiliaire (T helper)
TLR	Récepteur de type Toll (Toll-like receptor)
TMEV	Theiler's murine encephalomyelitis virus
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TRAF-6	Facteur 6 associé au récepteur TNF (TNF receptor associated factors 6)
Treg	Lymphocytes T régulateurs
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VTI	Vaccins trivalents inactivés
VVAI	Vaccins anti-grippaux vivants atténués

INTRODUCTION

Les infections par le virus de l'influenza causent une maladie peu ou moyennement sévère qui peut dégénérer en cas graves, voire mortels. Les épidémies saisonnières de grippe sont responsables de trois à cinq millions de cas graves et de 250 000 à 500 000 décès annuellement (WHO, 2014). Normalement, les symptômes de la grippe disparaissent après une semaine, mais chez les personnes hautement à risque, tel que les personnes âgées, les enfants, les malades chroniques ainsi que les personnes immunovulnérables, elle peut causer la mort. De plus, les épidémies saisonnières causent des pertes économiques élevées, et ce, malgré l'existence des traitements anti-grippaux et de programmes de vaccination. Les vaccins actuellement utilisés sont très efficaces chez les personnes âgées de 17 à 49 ans. Par contre, les personnes à risques sont peu ou pas protégées par ces vaccins (Beyer *et al.*, 2002).

Depuis son introduction dans la pratique médicale au 19^e siècle, la vaccination a été reconnue comme une des approches ayant le plus de succès dans la prévention des maladies infectieuses, en diminuant la mortalité et la morbidité. Par contre, certains des mécanismes de protection induits par ces vaccins sont encore inconnus. L'amélioration ou le développement de nouveaux vaccins comptent sur la compréhension des mécanismes conduisant à l'induction et à la maintenance d'une immunité efficace et de longue durée contre les pathogènes. Depuis la découverte des récepteurs de reconnaissance de motifs (PRRs) et la compréhension de leurs rôles dans l'immunité innée, de nouveaux adjuvants ont été créés. De plus, ces nouveaux adjuvants ciblent les voies naturelles d'infection, qui sont les muqueuses. Il a été démontré que les protéines de la membrane externe (OMP) de *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*, plus spécifiquement les porines, pouvaient agir comme un agent mitogène sur les cellules B, induire la maturation des cellules dendritiques et augmenter la réponse immune à des substances faiblement immunogéniques, tels les peptides synthétiques. En raison de leur nature hydrophobe, les OMP isolés par extraction au détergent s'assemblent spontanément en particule ressemblant à des vésicules, nommées Proteosome. Le système de libération/adjuvant Proteosome est capable de faire des liaisons non covalentes avec des antigènes afin de former des vaccins, lesquels administrés par voie intranasale (i.n.) augmentent la réponse immunitaire systémique ainsi que celle des muqueuses (S. M. Chabot *et al.*, 2007, T. Jones *et al.*, 2003, T. Jones *et al.*, 2004, Plante *et al.*, 2001).

Les adjuvants et systèmes de libération d'antigènes basés sur le Proteosome sont particulièrement efficaces pour l'induction d'une immunité protectrice parce qu'ils sont capables d'activer les cellules de l'immunité innée, en particulier les cellules dendritiques, lesquelles permettent une présentation antigénique optimale et l'activation des réponses immunes

adaptatives. Une protection est observée chez les souris et les humains ayant été vaccinés par la voie intranasale, avec les vaccins à base de Proteosome. De plus, une immunisation par la voie intranasale va induire la différenciation des lymphocytes Th17 (Zygmunt *et al.*, 2009), qui ont un rôle dans l'homéostasie des voies respiratoires ainsi que dans la protection contre certaines infections bactériennes, fongiques et virales (Lin *et al.*, 2010). De plus, plusieurs études ont démontré un rôle des lymphocytes Th17 pulmonaires dans l'immunité induite par les vaccins (Higgins *et al.*, 2006, Khader *et al.*, 2007, Lin *et al.*, 2010).

Sachant que les adjuvants à base de Proteosome protègent contre les infections par le virus de l'influenza, nous avons voulu déterminer quels étaient les types cellulaires qui engendraient cette protection ainsi que les mécanismes impliqués. Nous avons émis l'hypothèse que les lymphocytes Th17 pourraient avoir un rôle dans la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome, puisqu'ils sont impliqués dans la protection vaccinale d'autres infections pulmonaires (Lin *et al.*, 2010). Avec notre étude, nous avons démontré que la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome ainsi que celle contre le virus de l'influenza est indépendante de l'IL-17A et de l'IL-17F.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1. Le virus de l'influenza

1.1. Épidémiologie

Le virus de l'influenza A est l'agent pathogène responsable de l'influenza (la grippe). La grippe saisonnière se caractérise par de fortes fièvres, de la toux, des maux de tête, un malaise généralisé, des écoulements nasaux et des douleurs musculaires (Eccles, 2005, WHO, 2014, Zambon, 1999). Normalement, les symptômes de la grippe disparaissent après une semaine, mais la grippe peut entraîner une maladie grave pouvant aller jusqu'au décès, chez les groupes à haut risque, tels que les jeunes, les personnes âgées, les malades chroniques et les personnes immunovulnérables. Les épidémies saisonnières de grippe sont responsables de trois à cinq millions de cas graves et de 250 000 à 500 000 décès annuellement. Dans les pays industrialisés, les décès liés à l'influenza se produisent majoritairement chez les personnes âgées de 65 ans et plus (WHO, 2014).

1.2. Phylogénie

Le virus de l'influenza fait partie de la famille des *Orthomyxoviridae* qui comprend cinq genres différents, soit l'influenza A, B et C, le Thogotovirus et l'Isavirus. Il s'agit de virus enveloppés avec un génome segmenté d'ARN à polarité négative.

Chaque souche virale possède une désignation selon les règles internationales mentionnant successivement différentes informations : le type de virus/l'hôte d'origine (uniquement pour les souches animales)/le lieu d'isolement (ville ou pays)/le numéro de la souche/l'année d'isolement. Ces indications sont suivies par les caractéristiques antigéniques de l'hémagglutinine et de la neuraminidase pour les souches de type A (Hayden *et al.*, 2009, Wright *et al.*, 2007).

Les genres de virus sont différenciés par le séquençage des gènes codant pour les protéines de la matrice (M1) et de la nucléocapside (NP) (Hayden *et al.*, 2009, Suzuki, 2005). Dans cette thèse, nous allons principalement discuter du virus de l'influenza de type A. Les virus de l'influenza A sont catégorisés en sous-types en fonction de leurs protéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). Il existe 17 sous-types de HA (Tong *et al.*, 2012) et neuf sous-types de NA distincts, mais seulement trois sous-types de HA (H1, H2 et H3) et deux sous-types de NA (N1 et N2) ont la capacité d'induire des épidémies et des pandémies chez l'homme, et ce, depuis le début du 20^e siècle. En ce moment, les sous-types H1N1 et

H3N2 sont en circulation et sont responsables des épidémies saisonnières (Figure 1) (Beby-Defaux *et al.*, 2003, N. J. Cox *et al.*, 1999, Zambon, 1999).

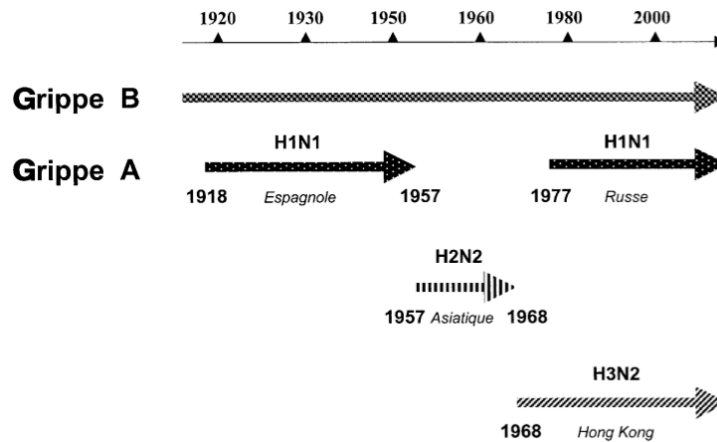


Figure 1 : Circulation épidémique des virus grippaux A et B au cours du 20^e siècle (Tiré de (Beby-Defaux *et al.*, 2003)

1.3. Protéines virales

Les virus grippaux sont enveloppés, de forme sphérique, ovale ou allongée, possédant une nucléocapside à symétrie hélicoïdale. Les virions ont un diamètre d'environ 100 nm (Rossman *et al.*, 2011). La particule virale d'influenza est composée de huit segments génomiques codants pour 11 protéines (Jegaskanda *et al.*, 2014). Les segments 1, 3, 4, 5, 6 mènent à la synthèse d'un seul ARNm, respectivement PB2, PA, HA, NP et NA. Le segment 2 code pour la polymérase PB1, le facteur de virulence proapoptotique PB1-F2, issu d'un cadre de lecture alternatif. Les segments 7 et 8 donnent naissance aux protéines M1 et NS1, et par épissage alternatif M2 et NEP/NS2 (Bouvier *et al.*, 2008, Hayden *et al.*, 2009). Dans cette thèse, nous allons seulement aborder de manière plus détaillée la protéine HA.

1.3.1. Hémagglutinine

La protéine HA est responsable de l'attachement du virus et subséquemment de la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire (Wright *et al.*, 2007). La protéine HA est une protéine transmembranaire de type 1 synthétisée sous forme de précurseur HA0 qui nécessite une activation par des protéases cellulaires provoquant le clivage en deux sous-unités HA1 et

HA2 (Cross *et al.*, 2009). Ce clivage est essentiel pour l'infectivité, puisqu'il permet l'exposition des acides aminés hydrophobes terminaux du HA2, lesquels servent d'intermédiaires lors de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane des endosomes (Beby-Defaux *et al.*, 2003, Wright *et al.*, 2007). De plus, le HA1 se lie de façon spécifique avec son récepteur cellulaire constitué de glycoprotéines contenant soit de l'acide sialique ou de l'acide N-acétyl neuraminique présent sur les cellules de l'épithélium cilié (Beby-Defaux *et al.*, 2003).

1.4. La dérive antigénique et le réassortiment antigénique

Afin de se maintenir dans la population et d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, le virus de la grippe a développé diverses stratégies. Une première, la dérive antigénique, lui permet d'accumuler des changements mineurs afin de mieux s'adapter à son hôte et de diminuer la reconnaissance du système immunitaire. La seconde, le réassortiment antigénique, implique des changements plus importants et permet le passage d'une espèce à l'autre et est associée à la génération des virus pandémiques.

1.4.1. La dérive antigénique

La dérive antigénique implique une série de mutations ponctuelles et spontanées qui apparaissent graduellement et qui conduisent à des changements mineurs dans le HA et le NA. Ces mutations ponctuelles sont induites par l'ARN polymérase virale qui ne contient pas de mécanismes de correction de la transcription, ce qui mène à l'accumulation de mutations suite à chaque ronde de réplication (Stephenson *et al.*, 2002). À titre d'exemple, il est estimé que le taux de mutation dans le gène HA est de 2 à 4 x 10⁻³ substitutions par nucléotide par année (Webster *et al.*, 1992, Wright *et al.*, 2007). L'accumulation de mutations ponctuelles modifie suffisamment l'antigénicité de certains variants pour que ces derniers soient capables d'échapper au système immunitaire. Ces nouveaux variants deviennent une nouvelle souche d'influenza, à l'origine d'un autre cycle d'épidémie saisonnière annuelle (Carrat *et al.*, 2007). De plus, la réponse immunitaire de l'hôte, principalement la réponse humorale, joue un rôle important en exerçant une pression pour la sélection des variants ayant accumulé des mutations dans les sites antigéniques. Ces dernières sont généralement localisées dans la partie globulaire des protéines (Hayden *et al.*, 2009). De plus, il est possible que d'autres mutations ponctuelles s'accumulent dans d'autres segments, mais à une moins grande fréquence que dans les protéines de surface, probablement dues à une pression sélective plus faible.

1.4.2. Le réassortiment antigénique

Le réassortiment antigénique se produit seulement chez les virus de l'influenza de type A et résulte en le remplacement du sous-type du HA et moins fréquemment du NA avec un nouveau sous-type, et ce, lorsque deux virus infectent la même cellule (Figure 2). De plus, des remplacements dans les protéines internes du virus sont aussi possibles (Stephenson *et al.*, 2002, Wright *et al.*, 2007). Un réassortiment antigénique apparaît grâce à des réassortiments génétiques de segments homologues entre les virions de l'influenza humain et ceux animaux. Ceci est possible en raison de la nature segmentée du génome viral, pouvant se solder par 256 (2^8) combinaisons théoriquement possibles pouvant mener à la génération d'un nouveau virus. Il est estimé qu'un réassortiment antigénique peut se produire trois fois par siècle et engendre une plus grande morbidité ainsi que des pandémies (Carrat *et al.*, 2007).

1.5. Modèles animaux pour les études du virus de l'influenza

Les virus d'influenza A infectent une grande variété d'animaux, incluant les mammifères et les oiseaux. Les virus de tous les sous-types de HA et de NA se retrouvent chez les oiseaux aquatiques, lesquels sont considérés comme le réservoir naturel des virus d'influenza de type A (N. J. Cox *et al.*, 1999, Wright *et al.*, 2007). La capacité du virus à passer la barrière des espèces est due au fait que le virus cible des récepteurs cellulaires présents chez une grande variété d'animaux (Suzuki, 2005). Ce large éventail d'hôtes permet d'avoir un vaste choix de modèles animaux. Un des facteurs importants dans le choix du modèle animal, c'est qu'il doit représenter l'humain en terme de signes cliniques, de changements histopathologiques, de cinétiques de réplication virale ou de transmission (Bouvier *et al.*, 2010). Des infections expérimentales ont été réalisées chez une grande variété d'espèces, incluant les hamsters, les rats de coton, les cochons d'Inde, les chevaux et les primates non humains, mais les souris, les furets, les poulets et les porcs restent les modèles les plus utilisés (Hayden *et al.*, 2009). Dans notre étude, le modèle murin sera utilisé.

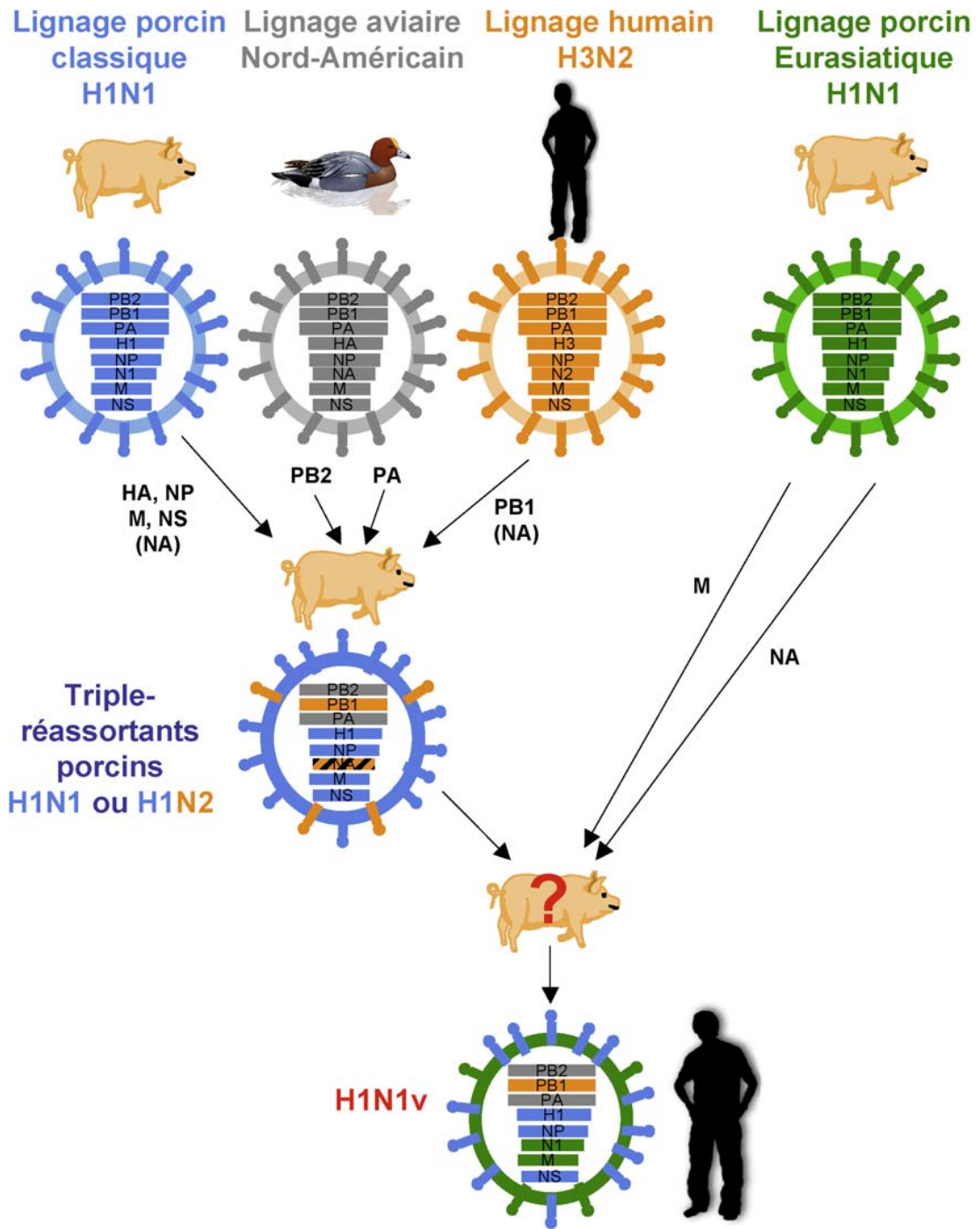


Figure 2 : Exemple de réassortiment antigénique avec la phylogénie du virus pandémique H1N1v (tiré de (Munier *et al.*, 2010)).

1.5.1. Le modèle murin

Le modèle de la souris, dit murin, est celui qui est le plus fréquemment utilisé dans l'étude du virus de l'influenza, et ce, malgré le fait qu'elle ne soit pas un hôte naturel de celui-ci. Afin de rendre pathogène le virus chez la souris, celui-ci doit préalablement être adapté (Mount *et al.*, 2010, Wright *et al.*, 2007). Toutefois, il a été observé que les souches du virus de l'influenza de type H5N1 d'isolat humain (H. M. Kang *et al.*, 2013) ou celles hautement pathogènes telles que les souches pandémiques de 1918 (Medina *et al.*, 2010) ou de 2009 (Manicassamy *et al.*, 2010) étaient naturellement pathogènes chez la souris. En raison de la prédominance des acides sialiques α -2,3 dans leur tractus respiratoire, les souris sont peu susceptibles aux virus humains qui reconnaissent préférentiellement les acides sialiques α -2,6 (Glaser *et al.*, 2007, Ibricevic *et al.*, 2006). La plupart des souches de souris sont susceptibles à l'infection avec un virus de l'influenza A. De plus, elles ont été largement utilisées pour étudier la pathogenèse ainsi que la réponse immunitaire au virus de l'influenza (Wright *et al.*, 2007). Par contre, la majorité des souches de souris utilisée en laboratoire est déficiente pour le gène MX1, qui code pour la protéine inductible par l'interféron Mx, lequel joue un rôle important dans la réponse antivirale contre le virus de l'influenza (Haller *et al.*, 1998). De plus, la pathologie et la transmission du virus ne sont pas comparables à ce qui est observé chez l'humain. Malgré tout, l'abondance de réactifs et la diversité des souches permettent à la souris de rester un modèle favorisé pour l'étude des acteurs de la réponse immunitaire et dans l'élaboration de traitements antiviraux.

2. Pathogénèse du virus de l'influenza et réponse immunitaire induite

2.1. Pathogénèse du virus

Une infection par le virus de l'influenza cause généralement une maladie peu ou moyennement sévère qui peut dégénérer en cas graves, voire mortels. Le virus se transmet par aérosol, de personne à personne, sous forme de gouttelettes. La période d'incubation est courte, soit d'un à quatre jours, en moyenne deux jours, suivant l'infection et le début de la maladie est généralement prompt (WHO, 2014).

Le virus de l'influenza se réplique presque exclusivement dans les cellules superficielles des voies respiratoires. L'infection se produit dans les cellules de l'épithélium trachéo-bronchial, où le premier cycle de réplication prend de quatre à six heures (Zambon, 1999). Cette première réplication permet la production de milliers de particules virales et la mort des cellules infectées. Les particules virales sont préférentiellement libérées à la surface apicale de la membrane plasmique des cellules épithéliales, dans le tractus broncho-alvéolaire (Behrens *et al.*, 2006). Le site optimal de réplication, dans les voies respiratoires, est régulé par la prédominance des acides sialiques α -2,3 ou α -2,6, puisque ces dernières permettent l'attachement du virus à la cellule cible (Shinya *et al.*, 2006). Chez l'humain, les acides sialiques α -2,6 se situent préférentiellement dans les voies respiratoires supérieures, tandis que les acides sialiques α -2,3 se situent dans les voies respiratoires inférieures. Le récepteur cellulaire reconnu pour la protéine HA, des souches d'influenza infectant les humaines, est l'acide sialique α -2,6 (Fukuyama *et al.*, 2011, Kuiken *et al.*, 2012, Zambon, 2001). Cette spécificité dans l'expression des acides sialiques explique pourquoi les virus de souches aviaires hautement pathogènes ne sont pas transmissibles d'humain à humain, puisqu'ils se lient préférentiellement aux acides sialiques α -2,3 (Hayden *et al.*, 2009, Wright *et al.*, 2007). De plus, la réplication virale est généralement restreinte aux cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures et inférieures. Cette restriction est causée par l'expression limitée de sérine protéase, en particulier la tryptase Clara, qui est sécrétée par les cellules de Clara non ciliées de l'épithélium bronchique (Behrens *et al.*, 2006).

La rupture de la barrière épithéliale (Mori *et al.*, 1995), la diminution de la motilité mucociliaire (Pittet *et al.*, 2010), l'augmentation de l'adhérence bactérienne (McCullers, 2014) ainsi qu'une altération dans la fonction des neutrophiles (McNamee *et al.*, 2006) contribuent aux risques de

surinfection bactérienne dans le tractus respiratoire, associés aux cas de morbidité sévère et de mortalité observés chez les patients infectés par le virus de l'influenza (Behrens *et al.*, 2006, Morens *et al.*, 2008).

2.2. Réponse immunitaire induite

La protection contre le virus de l'influenza est due autant à l'immunité systémique qu'à celle des muqueuses. De plus, les anticorps générés localement dans les voies respiratoires supérieures constituent la principale défense contre les infections naturelles. Les immunoglobulines de type A (IgA) sécrétées sont impliquées dans la défense des voies respiratoires supérieures tandis que les immunoglobulines de type G (IgG) sériques protègent les voies respiratoires inférieures. L'élimination des cellules infectées par le virus de l'influenza est principalement causée par les cellules T cytotoxiques (Gasparini *et al.*, 2011).

2.2.1. Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense contre une infection par le virus de la grippe. Le tractus respiratoire possède plusieurs mécanismes de défense non spécifiques comme les mucines, les collectines, les protéines du surfactant, les cils présents sur certaines cellules ainsi que certains inhibiteurs de protéases. L'action concertée de tous ces mécanismes contribue à prévenir l'infection (Hayden *et al.*, 2009, Wright *et al.*, 2007). Finalement, les cellules épithéliales infectées et les cellules du système immunitaire inné vont générer une réponse immunitaire qui permet le contrôle de l'infection et l'induction de la réponse immunitaire adaptative.

2.2.1.1. Récepteurs intracellulaires

Les cellules épithéliales, les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques échantillonnent continuellement les constituants de la lumière respiratoire et détectent la présence des microorganismes par différents types de récepteurs (Kohlmeier *et al.*, 2009). Ces récepteurs, nommé récepteur de reconnaissance de motifs (PRR), reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) tels que les sucres, les peptidoglycanes, les acides nucléiques, les peptides bactériens et les acides lipotéichoïques. Les PRRs sont divisés en trois familles distinctes soit les *Toll-like receptor* (TLR), les *Nod-like receptor* (NLR) et les *Retinoic-*

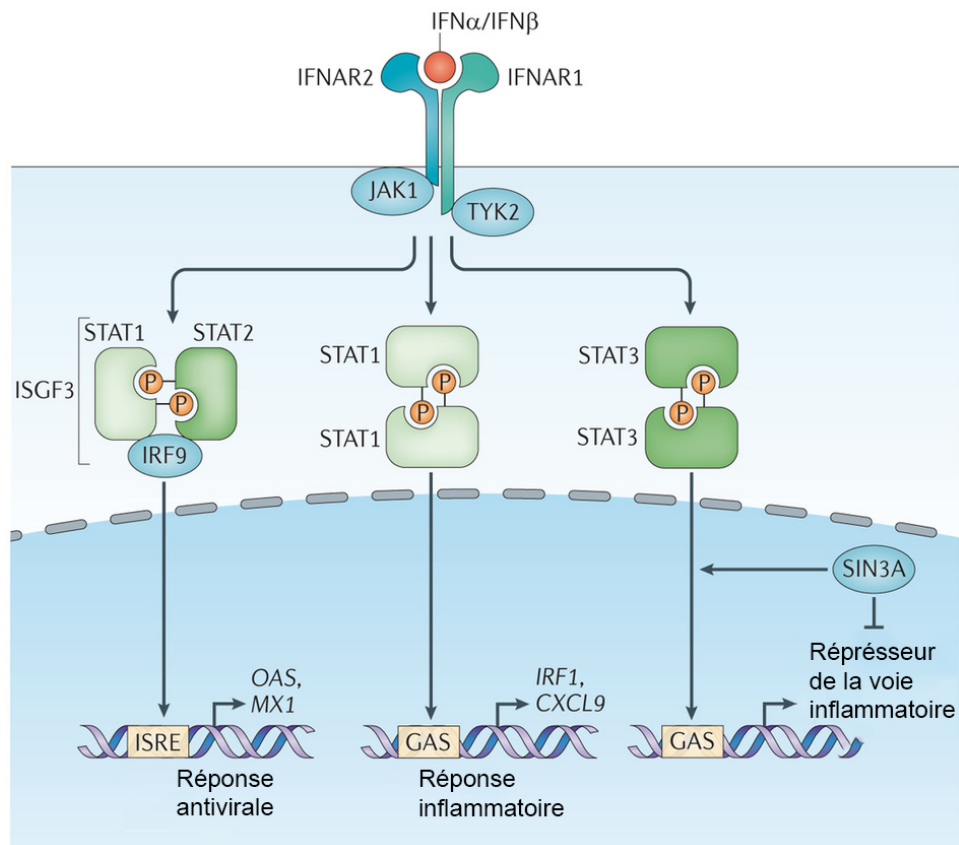
acid inducible gene 1 (RIG-1)-like helicases (RLR) (Kumagai *et al.*, 2008). Le virus de l'influenza est reconnu par le système immunitaire inné et par certains membres des trois classes de PRR soit le TLR3 qui reconnaît l'ARNdb, le TLR7/8 qui lie l'ARNsb et le TLR9 qui reconnaît le motif CpG, le RIG-1 et le NLRP3 (McGill *et al.*, 2009). Les différents TLRs présents dans les endosomes ont des rôles distincts lors d'une infection par le virus de l'influenza. Le TLR3 reconnaît l'ARNdb dans les endosomes. Par contre, le virus de l'influenza ne produit pas d'ARNdb, dû à l'activité d'une hélicase cellulaire (UAP56) (Iwasaki *et al.*, 2014). Par contre, le TLR3 reconnaît des structures d'ARN non-identifiées présentes dans les cellules infectées par le virus qui ont été phagocytées. Cette reconnaissance va induire l'expression de chimiokines dans les poumons avec l'effet de recruter des cellules inflammatoires ayant un effet néfaste sur la réponse immunitaire. Le TLR7 induit une réponse de type interféron (IFN) pour bloquer la réplication virale et pour promouvoir la réponse humorale (Iwasaki *et al.*, 2014). Le récepteur RIG-1, qui va reconnaître des ARNdb contenant un 5'-triphosphate, est crucial pour la détection du virus ainsi que pour la production des interférons de type I par les cellules épithéliales infectées, les cellules dendritiques et les macrophages alvéolaires (Kato *et al.*, 2005). Le NLRP3/inflammasome est exprimé chez les monocytes, les cellules dendritiques myéloïdes, les neutrophiles, les macrophages et aussi dans les cellules épithéliales des bronches. L'activation de NLRP3 induit la production d'interleukine (IL)-1 β et d'IL-18 (Iwasaki *et al.*, 2014).

2.2.1.2. Cytokines induites par les récepteurs intracellulaires

Après la reconnaissance des PAMPs par les PRRs, une cascade de signalisations engendre la production de cytokines et chimiokines. La libération de ces médiateurs inflammatoires dans l'environnement alerte le système immunitaire inné de la présence d'une infection et établit un état antiviral. De plus, les chimiokines présentes fournissent les signaux nécessaires pour le recrutement des leucocytes au site d'inflammation. Les premières cytokines produites en réponse à l'infection par le virus de l'influenza sont les interférons de type I, soit l'IFN- α et les l'IFN- β , qui sont associés à la réponse antivirale dans les poumons (Kohlmeier *et al.*, 2009). Les IFN de type I engendrent une boucle de rétroaction en signalant par le récepteur de l'IFN- α/β (Figure 3), et agissent de concert avec les PRRs pour induire la production des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF), l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, l'IL-12, l'IFN- γ , l'*interferon gamma inducible protein 10* (IP-10), RANTES, les *monocytes chemoattractant protein* (MCP) et les *monocytes inflammatory protein* (MIP) (Hayden *et al.*, 2009, Kohlmeier *et al.*, 2009). De plus, les IFN de type I induisent la transcription de

plusieurs gènes dépendants de l'IFN, tels que le Mx, dont plusieurs peuvent protéger ou interférer dans l'infection des cellules non infectées (McGill *et al.*, 2009).

L'importance des IFNs dans la régulation de la réplication du virus de l'influenza est confirmée par le fait que la protéine virale NS1 est un antagoniste de l'IFN. La déplétion de NS1 permet une augmentation de l'induction d'IFN et le virus est fortement atténué (Garcia-Sastre, 2004).



Nature Reviews | Immunology

Figure 3 : Voie de signalisation classique des interférons de type 1 (modifié de (Ivashkiv *et al.*, 2014)

2.2.2. Réponse immunitaire adaptative

2.2.2.1. La réponse humorale

L'infection par le virus de l'influenza induit la production d'anticorps, qui commencent à être détectables dans le sérum et les lavages nasaux à environ huit jours post-infection. Ils atteignent une concentration maximale entre 14 et 21 jours post-infection et persistent à un niveau détectable pendant plusieurs mois, voire plusieurs années (Kunzel *et al.*, 1996). À la suite de l'infection par le virus de l'influenza A, des anticorps contre les protéines HA, NA, NP et M2 sont produits (Wright *et al.*, 2007). Les anticorps contre les glycoprotéines de surfaces NA et NA sont associés à une résistance à l'infection, ce qui n'est pas le cas pour les anticorps contre les protéines internes (R. J. Cox *et al.*, 2004). Par contre, le transfert passif d'anticorps monoclonaux anti-M2 induit une protection chez la souris (J. J. Treanor *et al.*, 1990). Les anticorps produits sont majoritairement d'isotypes IgG, IgA et IgM, lors de l'infection primaire (B. R. Murphy *et al.*, 1989). Les anticorps anti-HA qui se lient à la tête globulaire de la protéine préviennent l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule cible. De plus, il favorise aussi la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) induite par les cellules NK et les neutrophiles (Kreijtz *et al.*, 2011). Les anticorps anti-HA sont donc capables d'empêcher une seconde infection par un virus homologue. En effet, des souris déficientes en cellules T et B, auxquelles on injecte des anticorps contre le HA survivent à une infection par le virus de l'influenza (Mozdzanowska *et al.*, 1997, Scherle *et al.*, 1992, Waffarn *et al.*, 2011). Les anticorps anti-NA ne neutralisent pas l'entrée du virus, mais limitent sa propagation en inhibant l'activité neuraminidase. La neuraminidase a un rôle dans le clivage du HA avec son récepteur, ce qui permet la libération du virion. L'ajout d'anti-NA et d'anti-M2 ne bloque pas l'infection, mais permet une diminution de la charge virale dans les poumons (Kreijtz *et al.*, 2011).

Une infection par le virus de l'influenza va engendrer une réponse humorale sérique et des muqueuses (Hayden *et al.*, 2009, Kohlmeier *et al.*, 2009, Kreijtz *et al.*, 2011, Wright *et al.*, 2007). Le principal isotype dans les muqueuses est l'IgA qui est produit localement et transporté par transport transépithélial (Tuma *et al.*, 2003). Il a été proposé que les IgA agissent de manière intracellulaire, durant la transcytose du virus sur la surface apicale, en inhibant la réplication et en participant ainsi à l'élimination du virus des cellules épithéliales et de la lumière du tractus respiratoire (Renegar *et al.*, 1991, J. J. Treanor *et al.*, 1990). Les anticorps sécrétés dans les voies respiratoires sont un des facteurs majeurs dans la résistance à une infection. Les IgA sécrétoires (SIgA) sont impliquées dans la protection des voies respiratoires supérieures tandis

que les IgG sériques sont impliquées dans la protection des voies respiratoires inférieures (R. J. Cox *et al.*, 2004). Pour ce qui est des IgG, il existe une concordance entre le niveau d'IgG muqueux et d'IgG sérique, ce qui suggère une diffusion passive au niveau des épithéliums alvéolaires, que vient confirmer la présence d'un transporteur pour les IgG sur les cellules épithéliales bronchiques (M. Yoshida *et al.*, 2004). Les anticorps IgM amorcent la neutralisation du virus de l'influenza induite par le complément et sont la signature de la réponse primaire (Kreijtz *et al.*, 2011). Les anticorps muqueux (IgG et IgA) seuls ou les anticorps sériques (IgG et IgM) seuls sont suffisants pour protéger contre une réinfection s'ils sont présents en concentrations suffisantes (Clements *et al.*, 1986, Renegar *et al.*, 2004).

2.2.2.2. La réponse cellulaire

Les cellules dendritiques résidentes du poumon, caractérisées par des phénotypes distincts (CD103⁺ et CD11b^{hi}CD103⁻), ayant acquises l'antigène provenant du virus de l'influenza, deviennent activées et migrent jusqu'aux ganglions drainants. Cette migration dans les ganglions va permettre aux cellules dendritiques de présenter les antigènes aux lymphocytes T CD8⁺ ou aux lymphocytes T CD4⁺ par le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I ou de classe II, respectivement (McGill *et al.*, 2009). Lorsque les lymphocytes T sont activés, ils migrent vers le site d'infection, par exemple les poumons, où ils produisent leur activité antivirale (Behrens *et al.*, 2006, Kohlmeier *et al.*, 2009).

La réponse cellulaire joue un rôle dans la guérison suite à l'infection par le virus de l'influenza et elle peut aussi prévenir les complications associées à cette infection. Par contre, elle ne semble pas contribuer de manière considérable à la prévention d'une infection subséquente (R. J. Cox *et al.*, 2004). L'infection par le virus de l'influenza induit l'activation des lymphocytes T CD8⁺ (lymphocytes T cytotoxiques [CTL]), des lymphocytes T CD4⁺ (lymphocytes T auxiliaires ou T helper cells [Th]) ainsi que des lymphocytes T régulateurs (Tregs) (Kreijtz *et al.*, 2011). Les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du virus sont activés dans les organes lymphoïdes secondaires et sont recrutés au site d'infection dans les jours cinq à sept suivant l'infection (Kohlmeier *et al.*, 2009, Wright *et al.*, 2007). Ces lymphocytes disparaissent, en grande partie, 21 jours après l'infection (Wright *et al.*, 2007). Les lymphocytes T cytotoxiques peuvent éliminer une cellule infectée grâce à la libération des perforines et des granzymes qui induisent la lyse des cellules infectées. Ils peuvent aussi induire l'apoptose des cellules infectées grâce à l'interaction de FAS (CD95) et FAS Ligand (CD95L) (Andersen *et al.*, 2006, Topham *et al.*, 1997). De plus, les CTLs produisent des cytokines, telles que l'IL-2, IL-4, IL-6 et l'IFN- γ , qui améliorent

la présentation antigénique en stimulant l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité ainsi qu'une action antivirale (Kreijtz *et al.*, 2011, Wiley *et al.*, 2001). Les protéines virales principalement reconnues par les lymphocytes T CD8⁺ sont les protéines HA, M, NP et PA (Kreijtz *et al.*, 2011, Wright *et al.*, 2007). Puisque les protéines M1, NP et PA sont assez bien conservées, les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques à ces protéines peuvent induire une protection croisée entre les différents sous-types du virus de l'influenza A (Boon *et al.*, 2002, Fleischer *et al.*, 1985, M. Wang *et al.*, 2007).

Bien qu'un rôle cytotoxique direct des lymphocytes T CD4⁺, dans l'élimination des cellules infectées par le virus de l'influenza, par l'exocytose des perforines et des granzymes a été récemment postulé (Soghoian *et al.*, 2010), le rôle principal des lymphocytes T CD4⁺ est l'activation des lymphocytes T cytotoxiques ainsi que le changement de classe et l'hypermutation somatique des lymphocytes B. Les lymphocytes T CD4⁺ sont sous-divisés en plusieurs sous-types, soient les Th1, les Th2, les Th9, les Th17 et les Tfh. Les deux principaux sous-types, Th1 et Th2, seront activés suite à l'infection et auront des fonctions différentes. Les Th1 sécrètent de l'IFN- γ et de IL-2 afin de soutenir la réponse cytotoxique (Kreijtz *et al.*, 2011) tandis que les Th2 vont produire de l'IL-4 et de l'IL-13, ce qui est crucial pour la protection contre les helminthes (Cannons *et al.*, 2013, Lamb *et al.*, 1982, Wright *et al.*, 2007). Les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfh) aident les lymphocytes B à la génération des centres germinatifs et sont requis pour la génération d'une réponse des lymphocytes B dépendante des lymphocytes T (Cannons *et al.*, 2013, Crotty, 2011, Ma *et al.*, 2012). L'autre sous-population de lymphocytes Th, les lymphocytes Th17, a un rôle plus nébuleux lors de l'infection par le virus de l'influenza. Certaines études démontrent un rôle protecteur (McKinstry *et al.*, 2009), tandis que d'autres montrent un effet néfaste (Crowe *et al.*, 2009), mais il en sera discuté ultérieurement.

Le rôle des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ est primordial pour la protection suite à une infection par le virus de l'influenza. Puisque des animaux déficients en lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ succombent à l'infection, cela démontre que les médiateurs non spécifiques ne sont pas suffisants pour restreindre l'infection (Brown *et al.*, 2004, Gerhard, 2001, Wright *et al.*, 2007).

3. La vaccination contre le virus de l'influenza

La vaccination est l'un des plus grands succès et l'un des plus rentables outils de santé publique pour la prévention des maladies. En conjonction avec l'introduction des antibiotiques ainsi que des pratiques d'hygiène moderne, la vaccination a contribué à la diminution constante de la mortalité et de la morbidité causées par les agents infectieux (O'Hagan *et al.*, 2004). Le plus grand succès de la vaccination est l'éradication de la variole (Kersten *et al.*, 2011). Chaque année, la vaccination générale prévient jusqu'à trois millions de morts et plus de 750 000 enfants sont protégés contre une grave invalidité (O'Hagan *et al.*, 2004). La vaccination a pour but d'induire une réponse spécifique contre un microorganisme pathogène par l'administration d'organismes atténués ou morts, ainsi que sous forme de particules. Si la vaccination est un succès lors de l'infection par le pathogène, la réponse immunitaire spécifique sera rapide et permettra une élimination de celui-ci. La vaccination contre l'influenza est efficace pour la prévention de la maladie et de la mort chez les groupes de personnes fortement à risques, et ce, dans un contexte de vaccination de routine. La vaccination contre l'influenza reste la mesure de prévention la plus efficace (Korsman, 2006).

Il existe deux approches vaccinales contre le virus de l'influenza, les vaccins inactivés et les vaccins vivants atténués. Ces vaccins sont trivalents, puisque constitués des souches circulantes, soit deux souches d'influenza de type A (H1N1 et H3N2) et d'une souche d'influenza de type B. Les variants qui constituent les vaccins sont sélectionnés selon les recommandations de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) qui se réunit deux fois par année afin d'anticiper les futures souches circulantes (Barr *et al.*, 2010). Au Canada, huit vaccins contre la grippe sont actuellement homologués, sept vaccins inactivés et un vaccin vivant atténués (Tableau I) (Canada *et al.*, 2013).

3.1. Les vaccins inactivés

Au Canada, nous utilisons deux types de vaccins trivalents inactivés (VTI) contre l'influenza, soit les vaccins sous-unitaires et les vaccins à virions fragmentés. Par contre, les premiers vaccins inactivés étaient faits à partir de virus entier (Korsman, 2006). Les virus réassortis, produits dans des œufs de poule, sont constitués de la souche A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34) auxquelles les gènes HA et NA ont été remplacés par les gènes de la souche ciblée (Gerdil, 2003). Pour les vaccins sous-unitaires, le HA et le NA ont été purifiés par élimination des autres composantes

virales, tandis que pour les vaccins à virions fragmentés, le virus a été fragmenté au moyen d'un détergent (Bridges *et al.*, 2008). Un seul VTI est administré avec un adjuvant, le Fluad®, et il est uniquement utilisé chez les personnes âgées (Tsai, 2013). La principale voie d'administration est la voie intramusculaire car elle permet d'induire une immunité systémique humorale. Le degré de protection après la vaccination est dépendant de la correspondance antigénique entre les souches choisies et celles circulantes, l'âge de la personne vaccinée et son historique de vaccination passé contre l'influenza (R. J. Cox *et al.*, 2004). Quelques-uns des désavantages des VTI sont sa mauvaise induction d'IgA et de la réponse adaptative cellulaire ainsi que sa faible immunogénicité et efficacité chez les personnes âgées (N. J. Cox *et al.*, 1999, R. J. Cox *et al.*, 2004, Ellebedy *et al.*, 2009).

Tableau I : Caractéristiques des vaccins anti-grippaux homologués au Canada, 2013-2014 (Canada *et al.*, 2013)

Fabricant et nom du produit	Abbott Influvac®	GSK Fluviral®	Novartis Agriful®	Novartis Fluad®	Sanofi Pasteur Vaxigrip®	Sanofi Pasteur FluZone®	Sanofi Pasteur Intanza®	AstraZeneca FluMist®
Préparations vaccinales	VTI	VTI	VTI	VTI	VTI	VTI	VTI	VVAI
Type de vaccin	Inactivé - sous-unitaire	Inactivé - virion fragmenté	Inactivé - sous-unitaire	Inactivé - sous-unitaire	Inactivé - virion fragmenté	Inactivé - virion fragmenté	Inactivé - virion fragmenté	Vivant atténué
Voie d'administration	IM	IM	IM	IM	IM	IM	ID	Vaporisation intranasale
Adjuvant	Non	Non	Non	MF59 (émulsion huile dans eau)	Non	Non	Non	Non

3.2. Les vaccins vivants atténués

Le but de la vaccination par des vaccins anti-grippaux vivants atténués (VVAI) est d'induire une réponse systémique et des muqueuses qui ressemblent à celles produites par l'infection naturelle. Le vaccin actuellement disponible est atténué, génétiquement stable, non transmissible, sécuritaire, immunogène, et induit une protection et une immunité efficace (R. J. Cox *et al.*, 2004). Les vaccins vivants atténués contiennent les gènes codants pour les glycoprotéines de surfaces (le HA et le NA) du virus d'intérêt et les six autres segments proviennent de la souche donneuse atténuée. Il existe deux souches donneuses, une pour les virus de type A (A/Ann Arbor/6/60 [H2N2]) et une pour les virus de type B (B/Ann Arbor/1/66) (N. J. Cox *et al.*, 1999, R. J. Cox *et al.*, 2004, Korsman, 2006). Les souches donneuses sont adaptées au froid, ce qui implique qu'elles se répliquent dans les muqueuses nasales plutôt que dans les voies respiratoires inférieures (Canada *et al.*, 2013, R. J. Cox *et al.*, 2004). Les avantages de l'instillation d'un vaccin vivant sont : son habileté à induire une réponse

immunitaire des muqueuses, en plus de la réponse immunitaire systémique cellulaire et humorale, sa facilité d'administration et son acceptabilité. Un vaccin vivant atténué peut aussi induire une réponse d'une plus longue durée que les vaccins inactivés (N. J. Cox *et al.*, 1999).

Une des plus importante question par rapport au vaccin vivant atténué est leur stabilité. Il est redouté que le virus présent dans le vaccin retourne à son état sauvage. Une étude, en 1999, par Cha *et al.*, a démontré que la souche adaptée par le froid était stable après répllication chez l'humain (Cha *et al.*, 2000, Gasparini *et al.*, 2011). De plus, pour que la souche vaccinale redevienne virulente, il faudrait que des mutations indépendantes se produisent dans quatre gènes différents (Tosh *et al.*, 2008). De plus, la transmission du vaccin à une autre personne n'a été observée qu'une seule fois et cette personne n'a présenté aucun symptôme (Gasparini *et al.*, 2011, Talbot *et al.*, 2005, Tosh *et al.*, 2008).

3.3. Immunité induite par les vaccins

Plusieurs facteurs vont avoir un impact sur la réponse immunitaire induite suite à une vaccination. Le type du vaccin, la nature de l'antigène ainsi que le calendrier de vaccination vont exercer une influence directe sur le type d'effecteurs immunitaires qui seront principalement suscités. Cela induit une protection efficace. De plus, la voie d'administration a aussi une grande influence dans la protection induite. Les vaccins vivants (immunisation intranasale) en comparaison avec les vaccins inactivés (immunisation intramusculaire) induisent plus fortement la réponse innée, car une plus forte présence de l'antigène causée par la répllication et une persistance de ce dernier, ce qui résulte en une meilleure réponse en anticorps (Siegrist, 2008).

3.3.1. La réponse humorale

La vaccination par un vaccin inactivé contre le virus de l'influenza va induire une production d'anticorps contre les protéines de surfaces, HA et NA, et dans certains cas contre les protéines NP et M1. La robustesse de la réponse humorale sérique dépend de l'âge, ainsi que du niveau d'anticorps préexistants. Chez les individus préalablement vaccinés ou infectés, on observe une réponse majoritairement de type IgG (IgG1) avec un pic d'anticorps sériques atteint entre deux et quatre semaines après la vaccination (Brokstad *et al.*, 1995, R. J. Cox *et al.*, 2004, el-Madhun *et al.*, 1998). Par contre, chez les personnes âgées ou naïves, le pic d'anticorps est atteint après plus de quatre semaines (Dormitzer *et al.*, 2011, Gross *et al.*, 1997). Les vaccins inactivés contre le virus de l'influenza, administrés par la voie intramusculaire, peuvent induire une faible

production d'anticorps IgA spécifiques au niveau oral et des fluides respiratoires (Bridges *et al.*, 2008, el-Madhun *et al.*, 1998).

Suite à la vaccination avec un VVAI, il y a une production d'anticorps contre toutes les protéines virales. À la différence des vaccins inactivés, les vaccins vivants atténués induisent des réponses immunitaires systémiques et des muqueuses qui sont semblables à celles induites par une infection naturelle (Bridges *et al.*, 2008, R. J. Cox *et al.*, 2004, Ellebedy *et al.*, 2009, Korsman, 2006). Les anticorps sériques IgA et IgM vont atteindre leur pic environ deux semaines après la vaccination, tandis que pour les IgG ceux-ci vont y arriver entre quatre à 12 semaines. Pour les différents types d'anticorps, cette présence perdure jusqu'à un an. Dans les lavages nasaux, on observe la production d'IgA, lesquelles atteignent leur apogée entre deux et 11 semaines post-vaccination et décline ensuite graduellement pendant six mois (R. J. Cox *et al.*, 2004).

3.3.2. La réponse cellulaire

Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ont un rôle important dans l'immunité à l'influenza. En contraste à la réponse souche spécifique des anticorps, la réponse immunitaire des lymphocytes T semble être contre des épitopes plus conservés, et ce, autant pour les glycoprotéines de surface que pour les protéines internes (Bridges *et al.*, 2008). Chez les personnes vaccinées, avec un vaccin entier contre l'influenza, on remarque une production de lymphocytes T cytotoxiques tandis qu'une immunisation avec un vaccin sous-unitaire engendre une faible induction de ceux-ci (Bridges *et al.*, 2008). Pour ce qui est de la réponse cellulaire induite par les vaccins vivants atténués, une production de lymphocytes T cytotoxiques est observée (R. J. Cox *et al.*, 2004, Lambert *et al.*, 2010, Rimmelzwaan *et al.*, 2008, Siegrist, 2008). Face à ces observations, une corrélation a été établie entre l'efficacité de la réponse CTL induite suite à la vaccination et la diminution de la morbidité associée au virus de l'influenza (Forrest *et al.*, 2008, Moskophidis *et al.*, 1998). Il est à noter qu'une production de lymphocytes T CD4⁺ est induite et ce peu importe le type de vaccin inoculé (Rimmelzwaan *et al.*, 2008).

3.4. Efficacité des vaccins

Le degré de protection après la vaccination varie en fonction de la similarité antigénique entre les souches vaccinales et les souches circulantes, l'âge de la personne vaccinée et son historique de vaccination (Ambrose *et al.*, 2011). Il a été démontré que les vaccins VTI et VVAI

sont efficaces pour prévenir la morbidité et la mortalité induite par une infection par le virus de l'influenza. Les vaccins inactivés sont efficaces dans 60 à 100 % des cas pour la prévention de la morbidité et de la mortalité chez les personnes âgées de 17 à 49 ans, mais ils ont un effet plus faible chez les enfants et les personnes âgées (Beyer *et al.*, 2002). Les vaccins trivalents inactivés comme les vaccins vivants atténués peuvent induire une réponse immune et stimuler une réponse immunitaire préexistante anti-influenza. Par contre, le VVAI semble être plus efficace que le VTI dans l'induction d'une réponse immune anti-influenza primaire, tandis que les VTI sont plus efficaces pour stimuler une réponse immunitaire anti-influenza préexistante (R. J. Cox *et al.*, 2004, Johnson *et al.*, 1986). Chez les enfants de 6 mois à 17 ans, les VVAI sont plus efficaces que les VTI (Ambrose *et al.*, 2011, Fleming *et al.*, 2006). Pour les personnes âgées de 17 à 49 ans, des études ont démontré que les VTI et les VVAI ont une efficacité similaire tandis que d'autres démontrent que les VTI sont plus efficaces (Ambrose *et al.*, 2011, Monto *et al.*, 2009, Ohmit *et al.*, 2008). Les vaccins trivalents inactivés pourraient être plus efficaces chez les adultes en raison de leur réponse anti-influenza préexistante, causée par leurs antécédents médicaux (vaccination ou infection). De plus, l'efficacité de VVAI décline chez les adultes, parce qu'il existe une immunité anti-influenza préexistante qui pourrait réduire la réplication de VVAI (Monto *et al.*, 2009, Ohmit *et al.*, 2008).

3.5. Approches vaccinales en développement

Plusieurs approches vaccinales sont en cours de développement afin d'améliorer ou d'optimiser l'étendue de la protection des vaccins contre le virus de l'influenza.

Une des approches consiste à administrer par voie intranasale ou intramusculaire des pseudoparticules virales (VLP) contenant uniquement les protéines de l'enveloppe du virus HA, NA et M2 dans le but de mimer une infection virale (Y. T. Lee *et al.*, 2014). Les VLP sont avantageux comme vaccins, puisqu'ils peuvent induire autant l'immunité systémique que des muqueuses, exposer un large répertoire de sites antigéniques et présenter des épitopes discontinus qui miment les particules virales (Conner *et al.*, 2004). Il a été observé dans un modèle de souris (Quan *et al.*, 2007) et de furet (Mahmood *et al.*, 2008) que l'injection de VLP contenant des protéines du virus de l'influenza induit une réponse immunitaire humorale et cellulaire menant une protection croisée contre le virus de l'influenza. De plus, le VLP représente une solution de remplacement attrayante aux vaccins inactivés et pourrait servir d'assise à un vaccin universel contre le virus de l'influenza (S. M. Kang *et al.*, 2012, Y. T. Lee *et al.*, 2014).

Une autre approche vaccinale consiste en l'injection de plasmide (pDNA) codant pour différentes protéines du virus de l'influenza. L'utilisation de tels vaccins à ADN est déjà en application contre d'autres pathogènes (revue par (Kutzler *et al.*, 2008). Il a été démontré que l'injection de pDNA codant pour les protéines HA, NP et M2 du virus de l'influenza peut induire une immunité protectrice chez le furet (Lalor *et al.*, 2008), ainsi que chez la souris (Fu *et al.*, 1999, Laddy *et al.*, 2008). Cette approche permet d'induire une immunité spécifique sans être dépendant du long processus de production des vaccins traditionnels (Y. T. Lee *et al.*, 2014).

La dernière approche vaccinale, qui sera discutée dans le prochain chapitre, est l'utilisation d'adjuvants ciblant les muqueuses. Ces dernières années, de nouvelles formulations vaccinales ont été étudiées, celles-ci ne ciblent plus uniquement les agents infectieux, mais aussi des structures antigéniques reliées à certains types de cancers, d'allergies ou de maladies auto-immunes. La recherche sur les vaccins sous-unitaires a démontré que l'utilisation de petits antigènes, ou de portions de ceux-ci, ont la capacité d'induire une protection. Cependant, le développement de la majorité de ces vaccins est dépendant des adjuvants, et ce, à cause de leur faible immunogénicité (O'Hagan *et al.*, 2004). Mais, même les antigènes suffisamment immunogéniques en combinaison avec un adjuvant, restent moins efficaces lorsqu'ils sont administrés par une voie ciblant les muqueuses. Par exemple, l'alum, qui est l'adjuvant parentéral le plus utilisé, est totalement inefficace lorsqu'il est administré par la voie orale ou nasale (Petrovsky *et al.*, 2004). La majorité des vaccins à l'étude en ce moment sont constitués de protéines sous-unitaires purifiées de pathogènes. Ces protéines hautement purifiées manquent la majorité des particularités du pathogène original et sont normalement moins immunogéniques, d'où la nécessité d'adjuvants vaccinaux pour améliorer l'immunogénicité de celle-ci (O'Hagan *et al.*, 2004).

Les muqueuses (les tractus aéro-digestif et uro-génital, la conjonctive, la paroi de l'oreille interne ainsi que les canaux des glandes exocrines) couvrent une vaste surface et sont vulnérables aux infections par des microorganismes pathogènes (Anjuere *et al.*, 2007). Face à ce fait, il devient donc de plus en plus évident que la réponse induite dans les muqueuses est importante pour la protection contre certaines maladies. Par exemple, les anticorps muqueux contre la bactérie *Vibrio cholerae* et la toxine du choléra sont associés à une résistance au choléra (Neutra *et al.*, 2006). De plus, la réponse immunitaire des muqueuses est induite de façon plus efficace lorsque le vaccin est administré par une des muqueuses (Anjuere *et al.*, 2007), alors que les vaccins injectés sont généralement de faibles inducteurs de l'immunité des muqueuses, donc protègent moins efficacement contre une infection par ces surfaces (Lamm, 1997, Neutra *et al.*,

2006, Petrovsky *et al.*, 2004). Seulement quelques vaccins muqueux ont été approuvés pour être utilisés chez l'humain comme le vaccin oral contre la poliomyélite (Modlin, 2004), contre le rotavirus (Kapikian *et al.*, 1996), ainsi qu'un vaccin intranasal contre le virus de l'influenza (Belshe *et al.*, 1998). Deux adjuvants ciblant les muqueuses, la CT (la toxine du choléra) et la LT (la toxine thermolabile d'*Escherichia coli*) ont démontré qu'en combinaison avec la protéine HA de l'influenza, et en réponse à une immunisation intranasale, on induit une production d'anticorps sériques et des muqueuses, ainsi qu'une protection supérieure aux vaccins couramment utilisés chez la souris (Barackman *et al.*, 1999, Tamura *et al.*, 1994). Par contre, ces deux adjuvants sont trop toxiques pour être utilisés chez l'humain. Récemment, une étude a démontré que l'administration d'un adjuvant par la voie nasale induit une réponse immunitaire de type Th17 (Zygmunt *et al.*, 2009), connue pour induire une protection lors d'infections pulmonaires (Sonnenberg *et al.*, 2009).

4. Adjuvants à base de Proteosome

La reconnaissance de l'importance de la réponse immunitaire innée a coïncidé avec la prise de conscience que la majorité des adjuvants classiques était des composantes de pathogènes. Lesquels sont connus pour activer les cellules de l'immunité innée incluant les cellules présentatrices d'antigène, comme les cellules dendritiques. Il devient donc évident que plusieurs adjuvants incluant le monophosphoryl lipid A (MPL), l'ARN double brin (ARNdb), le lipopolysaccharide (LPS), la lipoprotéine (LPP) et l'ADN bactérien, lesquels sont riches en motifs CpG, sont efficaces en raison de leur habilité à reconnaître et activer les PRRs présents, entre autres, sur les cellules de l'immunité innée (Bendelac *et al.*, 2002, Medzhitov, 2001, O'Hagan *et al.*, 2004).

4.1. Adjuvants

Un vaccin sous-unitaire efficace est composé de deux composantes essentielles, la première composante est l'antigène contre lequel la réponse immunitaire doit être générée. Ces antigènes peuvent être des protéines, des polysaccharides, des lipopolysaccharides (LPS) purifiés de l'organisme d'intérêt ou des peptides synthétiques. La seconde composante est l'adjuvant et/ou le véhicule de vaccination. Le rôle de l'adjuvant est de promouvoir la reconnaissance de l'antigène, la présentation ainsi que le traitement qui génère la réponse immunitaire optimale au lieu requis (Lowell *et al.*, 2004). De plus, l'utilisation d'un adjuvant permet de réduire la quantité d'antigènes utilisée ou le nombre d'immunisations requis pour induire une immunité protectrice. Les adjuvants peuvent aussi augmenter l'efficacité des vaccins chez les personnes âgées (Fluad[®], VTI contenant l'adjuvant MF59), chez les nouveau-nés et chez les personnes immunovulnérables (J. C. Cox *et al.*, 1997, Petrovsky *et al.*, 2004). À l'inverse de l'immunisation par la voie parentérale, qui permet de résoudre les infections avant le début de la maladie, l'immunisation par les muqueuses permet de prévenir les infections (Freytag *et al.*, 2005).

Différentes stratégies ont été développées pour faciliter et augmenter la réponse immunitaire obtenue après une immunisation par les muqueuses, incluant l'utilisation de bactéries mutantes atténuées (i.e. *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) comme porteuses d'antigènes hétérologues, l'encapsulation de l'antigène dans des microsphères, l'utilisation de capsules de gélatine, différentes formulations de liposomes, l'adsorption sur des nanoparticules, l'utilisation de

complexes lipophiles immunostimulateurs ainsi que l'addition de produits bactériens ayant des propriétés adjuvantes (Freytag *et al.*, 2005). De plus, plusieurs systèmes qui combinent un effet transporteur et adjuvant pour la présentation de peptides synthétiques sont actuellement à l'étude. Ces systèmes incluent les liposomes, les complexes immunostimulateurs (ISCOMs) et la technologie Proteosome, qui sera le sujet de ce chapitre (Levi *et al.*, 1995).

4.2. La technologie Proteosome pour vaccin et adjuvant

La nomenclature proteosome a été choisie pour mettre l'accent sur les propriétés physiques et biologiques de la préparation des protéines de la membrane externe (OMPs) de *Neisseria meningococci*. Deux formes de vaccins formées à partir des adjuvants proteosome seront décrites, soient le complexe proteosome-antigène (Proteosome) et le complexe proteosome-LPS (Protollin).

L'immunisation par la voie intranasale nécessite la création de nouveaux adjuvants, puisque ceux actuellement utilisés chez l'humain sont inefficaces lorsqu'ils sont utilisés par la voie intranasale ou orale (Petrovsky *et al.*, 2004). De plus, les infections par le virus de l'influenza sont restreintes aux voies respirations supérieures et inférieures. Une vaccination administrée par la voie nasale est une approche qui permettrait d'augmenter la protection chez toute la population. De plus, la vaccination intranasale est plus efficace que l'immunisation intramusculaire puisque la production SIgA dans les voies respiratoires supérieures permet la protection contre les infections par le virus de l'influenza. Les particules de proteosomes ont été choisies puisqu'elles sont de taille comparable à certains virus, hydrophobes et sécuritaires pour une utilisation chez l'humain (Lowell *et al.*, 1988, Lynch *et al.*, 1984).

4.2.1. Le complexe proteosome-antigène (Proteosome)

Les protéines constituant le proteosome sont très hydrophobes et lorsqu'elles sont isolées par extraction sous détergent, les interactions hydrophobes protéines-protéines entraînent un assemblage sous forme de vésicules (Lowell *et al.*, 1988). De plus, le processus d'extraction influence fortement la dimension des vésicules de proteosome, lesquelles peuvent atteindre des diamètres de centaines de nanomètres (Lowell *et al.*, 2004).

Les complexes proteosome-antigène sont définis par l'interaction entre les domaines hydrophobes des OMPs et l'antigène amphiphile tels que des glycoprotéines de la membrane

virale, des lipopeptides et des lipooligosaccharides (Lowell *et al.*, 2004, Lowell *et al.*, 1988). Brièvement, ces complexes OMPs-antigène, qui forment les vaccins Proteosome, sont produits en mélangeant l'antigène avec des OMPs solubilisés dans du détergent, qui est éliminé par dialyse (Lowell *et al.*, 2004). Ce processus peut aboutir en particules de vaccin Proteosome solubles quand la fraction hydrophobe de l'antigène satisfait les sites hydrophobes des particules de proteosome et que la fraction hydrophile de l'antigène reste exposée. Cela crée un microenvironnement hydrophile autour des vaccins Proteosome (Figure 4) (Lowell *et al.*, 2004). Dans notre cas, l'antigène utilisé est le HA provenant du virus de l'influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1).

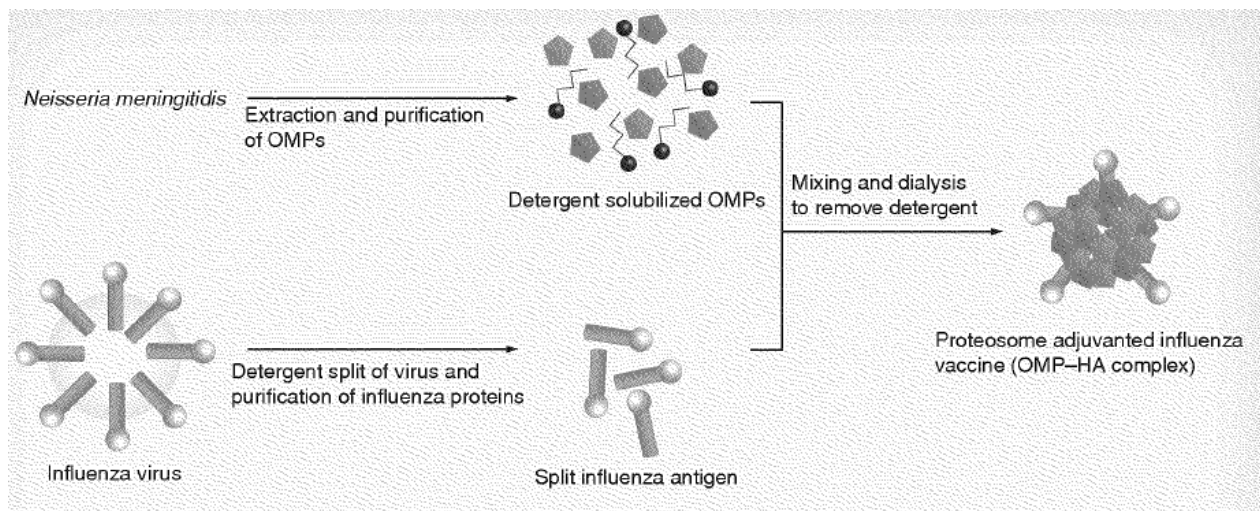


Figure 4 : Formation du vaccin nasal Proteosome (Tiré de (Burt *et al.*, 2011).

4.2.2. Le complexe proteosome-LPS (Protollin)

Une seconde approche pour développer des vaccins à base de proteosome est de formuler une mixture contenant l'antigène vaccinal avec une forme soluble des adjuvants proteosomes associés avec le LPS (Lowell *et al.*, 2004). Ce système diffère du précédent par le fait que l'antigène peut-être amphiphile ou hydrophile, dépourvu de fraction hydrophobe et que l'antigène est en suspension avec le complexe Proteosome-LPS (Lowell *et al.*, 2004). Un exemple de ce type d'adjuvant est le Protollin, lequel comprend du proteosome associé avec du LPS, provenant de *Shigella flexneri*, de manière non covalente (Burt *et al.*, 2011). Pour le reste de la thèse, nous allons faire référence à Protollin en tant qu'adjuvant par les capacités immunomodulatrices de proteosome ainsi que pour les propriétés adjuvantes du LPS (Figure 5) (Lowell *et al.*, 2004). Tout comme pour le vaccin Proteosome, l'antigène utilisé est le HA provenant du virus de l'influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1).

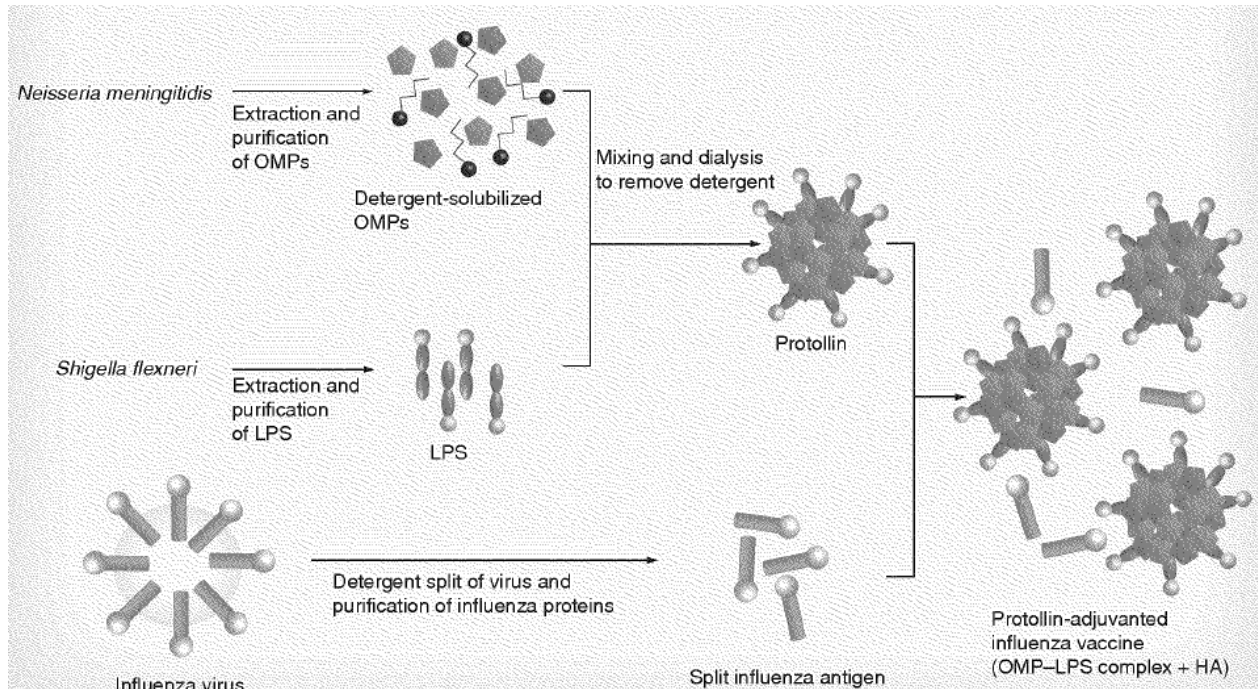


Figure 5: Formation du vaccin nasal Protollin (tiré de (Burt *et al.*, 2011)).

4.2.3. Mécanisme d'action

4.2.3.1. Caractéristiques des adjuvants à base de Proteosome : Structure particulaire et hydrophobe

Les particules de proteosome sont constituées des protéines de la membrane externe (OMPs) de *Neisseria meningitidis* et d'autres *Neisseria* (Lowell *et al.*, 2004). Les porines représentent approximativement 60 % des OMPs contenues chez *Neisseria*. Chez *Neisseria meningococcus*, les différentes classes de porines sont désignées par PorA (protéine de classe 1) ou PorB (protéine de classe 2 ou 3) (Massari *et al.*, 2003, Wetzler, 2010). Les particules de proteosome sont constituées d'environ 20 % de PorA, 75 % de PorB et de 5 % de protéine de classe IV (S. M. Chabot *et al.*, 2007). La structure native des porines de *Neisseria* est trimérique, et chacune est composée de trois polypeptides de 35 kDa (Massari *et al.*, 2003). Les porines ont une fonction de pores et sont essentielles pour la survie bactérienne par leur action modulatrice dans l'échange d'ions entre la bactérie et l'environnement. De plus, les porines peuvent interagir directement avec les membranes artificielles et les membranes de cellules eucaryotes (Lynch *et al.*, 1984, Massari *et al.*, 2003).

Les particules de proteosomes servent de système de livraison aux antigènes qui leur sont

associés en vertu de leur nature de vésicule. Les systèmes de livraison pour les antigènes ont les propriétés suivantes : la protection de l'antigène en transit de la dégradation par les enzymes (p. ex. les protéases), la bile ou les acides, l'habilité de maintenir un relargage de l'antigène sur une période de temps étendu, la livraison de l'antigène à l'intérieur des cellules présentatrices d'antigène contribuant à la réponse des lymphocytes T cytotoxiques et cible les APCs (Collins, 2011, Li Wan Po *et al.*, 1995, Mohan *et al.*, 2013, Neutra *et al.*, 2006, Perez *et al.*, 2004). Les particules de vaccin Proteosome sont généralement comparables à la taille de certains virus, entre 20 et 800 nm de diamètre (S. M. Chabot *et al.*, 2007). De plus, le caractère hydrophobe des porines de *Neisseria* ainsi que de l'antigène amphiphile pourrait contribuer à la capacité vaccinale, et ce en inhibant la dégradation de l'antigène, en facilitant l'absorption de l'antigène par les lymphocytes B ou les cellules présentatrices de l'antigène et/ou en dirigeant l'antigène dans le processus intracellulaire qui promeut la réponse cellulaire de type Th1 (S. Chabot *et al.*, 2005, Lowell *et al.*, 2004, Plante *et al.*, 2001). Les caractéristiques biophysiques de l'antigène vaccinal associé avec les particules de proteosomes sont traitées comme étant des particules plutôt que comme des antigènes solubles. Cela représente un avantage, puisque le système immunitaire reconnaît et répond aux particules de façon plus efficace qu'aux antigènes solubles (S. M. Chabot *et al.*, 2007, Lowell *et al.*, 2004).

Les caractéristiques intrinsèques des porines constituant les particules de proteosomes ainsi que leur capacité immunostimulatrice (décrite ultérieurement) les distinguent clairement des systèmes inertes qui comptent uniquement sur leur nature particulière pour promouvoir une réponse immunitaire (Lowell *et al.*, 2004).

4.2.3.2. Caractéristiques des adjuvants à base de Proteosome : Immunostimulation

Le potentiel des adjuvants proteosome a été suggéré par la capacité des OMPs, mais plus particulièrement les PorB, à amorcer une activation des cellules B, déterminée par une prolifération de celles-ci et par une sécrétion d'anticorps polyclonaux chez l'humain (Lowell *et al.*, 2004) et la souris (Wetzler *et al.*, 1996). Il a été démontré que cette activation des cellules B n'était pas due au LPS, composante mineure dans la préparation du proteosome (moins de 2 %) ou au lipooligosaccharide (LOS) (Lowell *et al.*, 2004, Wetzler, 2010), car en utilisant des souris C3H/HeJ résistantes au LPS, on observe toujours une activation des cellules B. Cette souche de souris est résistante au LPS, car une mutation présente dans le gène codant pour le TLR4 empêche sa signalisation (Poltorak *et al.*, 1998).

Il a été démontré que les OMPs de *Neisseria* agissent comme adjuvant dans la réponse immunitaire par l'activation des cellules B. Cette activité adjuvante est induite par une augmentation de l'expression de la molécule de costimulation CD86 à la surface des cellules B, et résulte en une augmentation de l'interaction entre les cellules T, via leur récepteur CD28, et les cellules B (Massari *et al.*, 2003). Cette activation des cellules B peut aussi délivrer de l'aide aux CTLs antivirales et conséquemment les IgG anti-influenza augmentent l'activité des CTLs (McLain *et al.*, 1991). De plus, en utilisant des souris déficientes en TLR2, il a été démontré que ces OMPs induisent l'activation des cellules B par un mécanisme dépendant du TLR2, de NF- κ B et de MyD88 (S. M. Chabot *et al.*, 2007, Lowell *et al.*, 2004). Plus récemment, des études ont démontré que les PorB, une des constituantes majeures des particules de Proteosome, pouvaient induire une maturation des cellules dendritiques en augmentant l'expression de CD86, du MHC de classe I et du MHC de classe II. Au même titre que pour les cellules B, cette augmentation de l'expression de CD86 sur les cellules dendritiques, procure le second signal qui accroît la costimulation des cellules T (Lowell *et al.*, 2004).

Le complexe Proteosome-antigène induit la sécrétion de TNF et d'IL-6 par des cellules adhérentes provenant de cellules mononucléées humaines du sang périphérique (PBMC) et de lignées cellulaires de type macrophage. Ces réponses étaient inhibées par des anticorps anti-TLR1 ou anti-TLR2, alors qu'un anticorps anti-TLR4 n'avait que peu d'effet, démontrant le rôle des OMPs dans la stimulation immunitaire induite à cet adjuvant (Burt *et al.*, 2011). De plus, en utilisant des souris déficientes pour le TLR2, il a été démontré que Proteosome induisait la migration des cellules dendritiques de façon dépendante du TLR2 (S. M. Chabot *et al.*, 2007). Par contre, Protollin active des lignées cellulaires de monocytes par son action sur le TLR1, TLR2 et le TLR4, signifiant que le LPS et les OMPs ont un rôle dans l'immunostimulation induite par cet adjuvant (Burt *et al.*, 2011, Lowell *et al.*, 2004).

4.2.4. Réponse immunitaire induite suite à la vaccination avec les adjuvants à base de Proteosome contre le virus de l'influenza

Les études chez la souris ont démontré que le vaccin nasal Proteosome contre l'influenza montre une induction d'IgG sériques spécifiques du virus, ayant une capacité d'inhibition de l'hémagglutinine (HAI) et en plus, le titre d'anticorps spécifiques neutralisants est équivalent à celui induit par le vaccin classique administré de façon intramusculaire ou à une dose sublétales avec un virus homologue. De plus, l'induction des réponses IgA sériques spécifiques du virus, tout comme des IgA nasaux et pulmonaires a été obtenue chez les souris vaccinées par voie

intranasale avec le vaccin Proteosome contre l'influenza, mais non lors d'une immunisation intramusculaire avec le vaccin classique ou avec le HA seul sans particule de proteosome (T. Jones *et al.*, 2003, Lowell *et al.*, 2004, Plante *et al.*, 2001). De plus, les vaccins à base de Proteosomes engendrent une réponse en cytokines de type Th1 (IFN- γ), sans activation de la réponse Th2 (IL-5), spécifique du virus de l'influenza. Cela diffère lorsque l'antigène est donné seul ou par voie intramusculaire, car il induit une réponse majoritairement de type Th2 et une faible production de type Th1, donc une réponse mixte (Plante *et al.*, 2001). Le type de réponse engendrée par le vaccin Proteosome contre l'influenza est consistant avec celui qui est normalement associé avec une réponse des CTLs, qui prévient la propagation du virus. De plus, le vaccin nasal Proteosome contre l'influenza induit une protection efficace contre une infection expérimentale avec un virus homologue adapté à la souris, comparable à celle obtenue par l'antigène seul administré par la voie intramusculaire (Lowell *et al.*, 2004, Plante *et al.*, 2001). Une réponse humorale et cellulaire, systémique et des muqueuses, similaire est obtenue lors de la vaccination avec Protollin mélangé avec l'antigène HA (Lowell *et al.*, 2004). De plus, une hémagglutinine recombinante (rHA) purifiée du virus A/Texas/91 (H1N1) et mélangée avec Protollin protège complètement les souris contre un défi avec une souche ayant une dérive homotypique A/Taiwan/86 (H1N1). Par contre, la rHA seul parvient uniquement à induire une protection partielle chez les souris lorsqu'administrée par la voie intramusculaire (Burt *et al.*, 2011, T. Jones *et al.*, 2004).

Il a aussi été démontré que les particules de Proteosome pouvaient être utilisées comme adjuvants avec des peptides synthétiques, soient des épitopes de cellules B de la glycoprotéine de surface HA ou des épitopes de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ de la nucléoprotéine du virus de l'influenza. Tous ces peptides induisent une réponse immunitaire protectrice partielle chez la souris (Levi *et al.*, 1995).

Des études cliniques de phase I et II ont démontré que les vaccins à base de Proteosome induisent une protection chez l'humain et que l'utilisation de ces adjuvants est sécuritaire (Langley *et al.*, 2006).

Tous ces résultats appuient le concept que la technologie Proteosome est un système de livraison intranasal multifonctionnel, pour des peptides vaccinaux, qui améliore l'immunité cellulaire et humorale, systémique et des muqueuses, contre des microbes pathogènes.

5. Th17 et IL-17

Les cellules T auxiliaires CD4⁺ (cellules Th) sont d'importants médiateurs de la réponse immunitaire adaptative. Lors de l'interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules T reçoivent un signal par l'engagement du récepteur des cellules T (TCR) (signal 1), des récepteurs de costimulation (signal 2), et un réseau complexe de signaux de cytokines (signal 3) et vont subir l'activation et la différenciation en cellules T effectrices CD4⁺. Leurs rôles critiques dans la défense de l'hôte contre les infections se manifestent clairement chez l'humain avec une déficience congénitale (par exemple, le syndrome de Di George) ou acquise (virus de l'immunodéficience humaine [VIH]) de la lignée des cellules T (Khader *et al.*, 2009). Les cellules T naïves peuvent se différencier en cellules de type Th1 ou Th2 en réponse à la stimulation qui est dépendante des cytokines présentes dans l'environnement exogène (D. Chen *et al.*, 2013). L'IL-12 et l'IL-4 dirigent le développement des cellules Th1 et Th2, respectivement. Les cellules effectrices Th1 produisent de l'IFN- γ , et régulent l'immunité cellulaire contre les infections intracellulaires, tandis que les cellules Th2 produisent de l'IL-4, l'IL-5 et de l'IL-13 qui ont un rôle dans la protection contre les infections parasitaires intestinales et servent d'intermédiaire dans l'immunité humorale (D. Chen *et al.*, 2013). Récemment, le paradigme Th1/Th2 a été élargi, suivant la découverte d'un troisième type de cellules T auxiliaires qui produisent de l'IL-17A, nommé Th17, et qui ont des fonctions distinctes des cellules Th1 et Th2 (Korn *et al.*, 2009). La fonction primaire des cellules Th17 apparaît être l'élimination des pathogènes qui ne sont pas adéquatement détruits par les cellules de type Th1 et Th2. Un rôle dans l'élimination des infections fongiques a été identifié (Moseley *et al.*, 2003, Waite *et al.*, 2012). À l'inverse des cellules Th1 et Th2, les cellules Th17 sont considérées comme ayant une forte plasticité. Les cellules Th17 ont la capacité d'acquies les caractéristiques fonctionnelles des Th1 (Muranski *et al.*, 2013). Il a été démontré que des cellules Th17 peuvent produire les cytokines IL-17A ainsi que l'IFN- γ , ce qui suggère que les cellules Th17 peuvent agir comme des Th1 (Muranski *et al.*, 2013). En plus des Th17, une nouvelle classe de cellules T auxiliaires a été découverte, les lymphocytes Th9. La différenciation des cellules Th9 nécessite du TGF- β et d'IL-4. De plus, les cellules Th9 semblent être impliqués dans les maladies auto-immunes inflammatoires, l'allergie inflammatoire ainsi que dans l'immunité anti-tumorale (Kaplan, 2013, Tan *et al.*, 2012).

5.1. Généralités

Chez les souris, la différenciation des cellules Th17 (Figure 6) requière du TGF- β et de l'IL-6 ou de l'IL-21 (Korn *et al.*, 2007, Lankford *et al.*, 2003) et une activité coordonnée de l'IL-1 β et du TNF accélère la différenciation (Bettelli *et al.*, 2007, Iwakura *et al.*, 2008, Veldhoen *et al.*, 2006). L'IL-23 est requise pour la croissance, la survie et pour les fonctions effectrices des cellules Th17, ainsi que dans l'induction de l'IL-17A et de l'IL-17F par ces cellules (Stritesky *et al.*, 2008). Après la différenciation initiale des Th17, la disponibilité de l'IL-23 serait un facteur limitant pour déterminer si la réponse Th17 sera soutenue durant la réponse immunitaire et inflammatoire (Veldhoen *et al.*, 2006). Il a été établi que l'IL-23 agit en synergie avec les agonistes du TLR2 afin d'améliorer la différenciation des Th17 ainsi que la production d'IL-17A par les lymphocytes Th17 (Bird, 2010, Kwok *et al.*, 2012). De plus, plusieurs agonistes, dont certains ont des capacités adjuvantes, ont la capacité d'induire la génération des cellules Th17 en se liant à d'autres PRRs. (Tableau II).

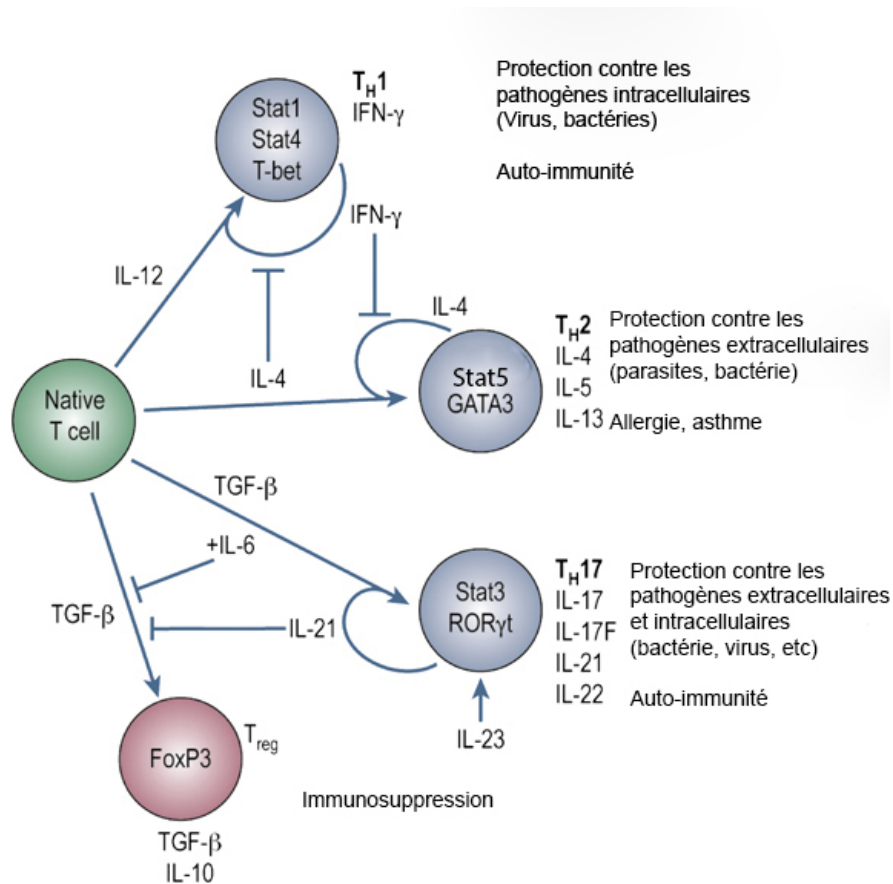


Figure 6 : Différenciation des différents types de cellules T auxiliaires (modifiée de (Deenick *et al.*, 2007))

Si de récentes études démontrent que le TGF- β n'est pas indispensable, il semble qu'il pourrait aussi aider à renforcer la réponse Th17 en inhibant les cellules Th1 et Th2, lesquelles inhibent la différenciation des cellules Th17 (Das *et al.*, 2009, Schumann *et al.*, 2012). Suite à leur différenciation, les cellules Th17 vont sécréter de l'IL-17A, de l'IL-17F, de l'IL-21 et de l'IL-22 (Bettelli *et al.*, 2007, Jin *et al.*, 2013, Korn *et al.*, 2009, Weaver *et al.*, 2007). Tout comme les cellules Th1 et Th2, les cellules Th17 ont des facteurs de transcription qui leur sont spécifiques, tels que le *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), le ROR γ T et le ROR α (Jin *et al.*, 2013, Korn *et al.*, 2009, Marwaha *et al.*, 2012, Moseley *et al.*, 2003). De plus, un mécanisme d'autorégulation existe chez les cellules Th17 murines. Ce mécanisme se produit lorsque les cellules effectrices Th17 sont stimulées à nouveau avec des cytokines leur permettant de se différencier (IL-6 et TGF- β) en absence d'IL-23. Cela engendre la coexpression de la cytokine régulatrice, l'IL-10 (Gaffen, 2009).

Tableau II : Récepteurs de l'immunité innée et adjuvants impliqués dans la génération des cellules Th17 (modifié de (Lin *et al.*, 2010))

Adjuvants	Récepteur	Cytokines produites par les CPA	Réponse T auxiliaire
Peptidoglycan	TLR2	IL-23, IL-1 β	Th17
LPS	TLR4	IL-23, IL-6, IL-1 β , IL-12	
Acide lipoteichoïque	TLR2	IL-23	Th1 et Th17
Pam2c	TLR2/6	IL-23	
Pam3c	TLR1/2	IL-23	
Toxine pertussis	TLR2/TLR4	IL-12, IL-1 β , IL-23	Th1 et Th17
Resimiquod (R848)	TLR7/8	IL-23, IL-6, IL-1 β	
β -glucan	Dectin 1	IL-23, IL-10	Th17
Adjuvant complet de Freund	MyD88 dépendant	TGF- β , IL-6, IL-23	Th17

La famille de l'IL-17 est composée de six membres, incluant l'IL-17A (communément appelé IL-17), l'IL-17B, l'IL-17C, l'IL-17D, IL-17E (aussi connu sous le nom d'IL-25) et l'IL-17F. De ces derniers, les fonctions biologiques ainsi que la régulation de l'IL-17A et de l'IL-17F sont les plus connues. Elles partagent aussi la plus grande homologie. De plus, la proximité sur le même chromosome des gènes codants pour l'IL-17A et l'IL-17F, chez l'humain (chromosome six) et la souris (chromosome un), mettant en évidence leur profil d'expression partagé (D. Chen *et al.*, 2013, Korn *et al.*, 2009). Les cellules Th17 sont la principale source d'IL-17A et d'IL-17F dans la réponse adaptative. Plusieurs autres types cellulaires peuvent produire de l'IL-17A ainsi que de l'IL-17F, tels que les cellules T CD8, les cellules B, les cellules T $\gamma\delta$, les cellules NK et NK T ainsi que les granulocytes, démontrant le rôle de ces cytokines dans les réponses immunitaires

innées et adaptatives (Cua *et al.*, 2010, K. A. Lee *et al.*, 2008, Leon *et al.*, 2013, Lockhart *et al.*, 2006, Weaver *et al.*, 2007). Puisque l'IL-17A et IL-17F sont des cytokines effectrices qui sont produites par les cellules de l'immunité innée et adaptative, ceci suggère une fonction de ponts entre ces deux types d'immunité. De plus, cette production par les cellules de l'immunité innée et adaptative suggère que l'IL-17 puisse combattre l'invasion des pathogènes à différents moments ainsi qu'en différents lieux de l'infection (Jin *et al.*, 2013).

L'interleukine-17A et l'IL-17F ont des propriétés pro-inflammatoires (Jin *et al.*, 2013) et agissent sur une grande variété de types cellulaires pour induire l'expression de cytokines (TNF, IL-1 β , IL-6, GM-CSF et G-CSF), de chimiokines (CXCL1, CXCL8 et CXCL10) et de métalloprotéinases (Korn *et al.*, 2009). De plus, IL-17A et IL-17F ont un rôle clé dans l'activation, la migration et le recrutement des neutrophiles (Aggarwal *et al.*, 2003, Moseley *et al.*, 2003). Cette mobilisation de neutrophiles est régulée par la production de cytokines et chimiokines telles que l'IL-6, l'IL-8, le CXCL1 (KC, Gro α), le CXCL2 (MIP2), mais aussi par le G-CSF (Langrish *et al.*, 2004, Miyamoto *et al.*, 2003, Ye *et al.*, 2001a). De plus, l'IL-17A augmente la granulopoïèse en provoquant l'expression de GM-CSF et de G-CSF (Waite *et al.*, 2012).

La famille des récepteurs de l'IL-17 (IL-17R) est constituée de cinq membres, incluant IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD et IL-17RE (Gaffen, 2009, Korn *et al.*, 2009, Moseley *et al.*, 2003). L'IL-17RA et l'IL-17RC sont les récepteurs pour l'IL-17A et l'IL-17F. L'IL-17RA lie autant l'IL-17A que l'IL-17F, mais son affinité avec l'IL-17A est supérieure (Korn *et al.*, 2009, Moseley *et al.*, 2003). L'IL-17RA est fortement exprimé sur les cellules hématopoïétiques, mais aussi, à un plus faible niveau, sur les ostéoblastes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et sur les cellules épithéliales (Gaffen, 2009, Iwakura *et al.*, 2008, Korn *et al.*, 2009). Chez l'humain, l'IL-17RA forme un hétérodimère avec l'IL-17RC qui va lier l'IL-17A et l'IL-17F. L'IL-17RC est le récepteur analogue de l'IL-17F. Contrairement à l'IL-17RA, l'IL-17RC est exprimé très faiblement sur les cellules hématopoïétiques, mais il est fortement exprimé sur les cellules non hématopoïétiques (Gaffen, 2009, Iwakura *et al.*, 2008). Bien que chez l'humain l'IL-17RA peut lier l'IL-17F, chez la souris, l'IL-17RC apparaît être spécifique pour l'IL-17F et ne semble pas lier l'IL-17A (Gaffen, 2009, Kuestner *et al.*, 2007). La liaison de l'IL-17A à son récepteur IL-17R active les voies de signalisation des MAPK ainsi que la voie NF- κ B par le TRAF-6 grâce à l'interaction avec la protéine adaptatrice Act1 (Korn *et al.*, 2009).

5.2. Rôle des cellules Th17

L'inflammation est un processus dans lequel les cellules immunitaires sont mobilisées au site de l'infection ou de la blessure. Par contre, une inflammation chronique joue un rôle important dans la pathogenèse des maladies auto-immunes et des allergies. Les Th17 ont pris de l'importance à cause de leur implication dans les maladies auto-immunes (Dong, 2008). Par contre, ce ne sont pas tous les types de Th17 qui sont pathogéniques. La génération de cellules Th17 pathogénique est dépendante de la production de l'IL-23 en réponse à une stimulation par le TGF- β 1 et de l'IL-6, laquelle induit la production de TGF- β 3 par les cellules Th17. La combinaison de TGF- β 3 avec l'IL-6 induit la production de cellules Th17 pathogéniques, tandis que les cellules Th17 non pathogéniques sont induites par le TGF- β 1 et l'IL-6 (Jin *et al.*, 2013, Marwaha *et al.*, 2012). Par ailleurs, des études récentes ont démontré que l'IL-17A et l'IL-17F peuvent avoir des effets bénéfiques lors de certaines infections ou vaccinations (Dong, 2008, Sonnenberg *et al.*, 2009, Tong *et al.*, 2012). Dans cette section, le rôle des Th17 dans l'immunité sera discuté.

5.2.1. Immunité microbienne

Les cellules Th17 jouent un rôle très important dans la défense de l'hôte contre des infections bactériennes et fongiques, en particulier dans les muqueuses (Lin *et al.*, 2010). La production d'IL-17 et d'IL-22 par les cellules Th17 améliore la barrière de la surface des muqueuses en stimulant la production de peptides antimicrobiens et le recrutement des neutrophiles (Waite *et al.*, 2012). L'interleukine-17A et l'IL-17F ont un rôle protecteur dans la défense de l'hôte contre certains pathogènes au niveau des muqueuses et de l'épithélium. Ces cytokines sont importantes pour l'élimination des bactéries extracellulaires *Staphylococcus aureus*, *Clostridium rodentium* et *Klebsiella pneumoniae*, lesquelles infectent la peau, le colon et les poumons, respectivement (Aujla *et al.*, 2008, Cho *et al.*, 2010, Ishigame *et al.*, 2009). Tout dépendant du pathogène, l'IL17A et l'IL-17F ont des fonctions redondantes ou différentes. Par exemple, lors de l'infection par *S. aureus*, les animaux deviennent sensibles lorsqu'ils sont déficients pour les deux cytokines (IL-17A et IL-17F). De plus, lors de l'infection par *C. rodentium*, les deux cytokines sont requises pour la protection. Dans les temps précoces de l'infection autant l'IL-17A et l'IL-17F sont importantes, tandis que lors des temps plus tardifs, c'est l'IL-17F qui devient crucial (Ishigame *et al.*, 2009, Jin *et al.*, 2013). De plus, il a aussi été rapporté que les cellules productrices d'IL-17A sont aussi impliquées dans la protection contre certaines bactéries

intracellulaires, comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* (S. Hamada *et al.*, 2008, Lockhart *et al.*, 2006, Meeks *et al.*, 2009).

En plus de son rôle dans l'immunité antibactérienne, l'IL-17A est aussi impliquée dans le contrôle des infections fongiques (Jin *et al.*, 2013). La neutralisation de l'IL-17A durant l'infection par *Pneumocystis carinii* augmente de façon significative la charge microbienne et exacerbe la maladie (Rudner *et al.*, 2007). Les souris déficientes en IL-17A montrent une augmentation de la susceptibilité à l'infection systémique de *Candida albicans* avec un taux de survie réduit (Saijo *et al.*, 2010).

Les patients déficients en STAT3 sont plus susceptibles aux infections virales. Puisque le STAT3 est l'un des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des Th17, il se peut que les Th17 aient un rôle mineur dans la protection contre les infections virales (van de Veerdonk *et al.*, 2009). L'infection avec le *Theiler's murine encephalomyelitis virus* (TMEV) induit la production d'IL-23p19 et d'IL-12/23p40. De plus, il a été montré que les cellules Th17 promeuvent la persistance de l'infection virale et jouent un rôle important dans la maladie chronique démyélinisante (Hou *et al.*, 2009). Par exemple, chez les personnes atteintes d'une infection cornéenne par le virus de l'herpès (HSV), une induction d'IL-17 se produit. Cette augmentation d'IL-17 induit la migration de neutrophiles, ce qui augmente l'inflammation causant des dommages à la cornée et éventuellement la cécité (Maertzdorf *et al.*, 2002). Par contre, les souris déficientes en IL-17R ont une migration de neutrophiles réduite, mais cet effet est transitoire et le contrôle du virus n'est pas affecté (Molesworth-Kenyon *et al.*, 2008). Plusieurs autres virus, tels que le rhinovirus (Wiehler *et al.*, 2007), le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (Intlekofer *et al.*, 2008) et le virus T-lymphotropique humain (HTLV) (Dodon *et al.*, 2004), ont la capacité d'induire de l'IL-17A en réponse à leur infection, mais le rôle de cette production n'est pas encore défini (Khader *et al.*, 2009, van de Veerdonk *et al.*, 2009). Le virus de l'influenza induit lui aussi une production d'IL-17A et d'IL-17F, mais il en sera traité ultérieurement.

Lors d'une infection par *Toxoplasma gondii* ou *Leishmania major*, les souris déficientes pour le récepteur de IL-27 (IL-27R) développent une réponse inflammatoire qui exacerbe la maladie. L'IL-27 est une cytokine qui inhibe la différenciation des Th17, donc en absence de cette cytokine ou de son récepteur, la différenciation des cellules Th17 est accrue (H. Yoshida *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré que l'IL-17 est requise pour le développement de la leishmaniose cutanée (Lopez Kostka *et al.*, 2009).

5.2.2. Maladies inflammatoires

Malgré un rôle crucial dans la protection de l'hôte contre l'invasion de plusieurs types de pathogènes, une instabilité dans la production d'IL-17A et d'IL-17F peut entraîner une expression excessive de cytokines pro-inflammatoires et une inflammation chronique (Jin *et al.*, 2013). Les cellules Th17 sont associées à plusieurs maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, le psoriasis, le lupus, et le diabète de type 1 (Iwakura *et al.*, 2008, Jin *et al.*, 2013). La sclérose en plaques a longtemps été considérée comme une maladie dépendante des Th1. Depuis des études ont démontré que les cellules Th17 jouent un rôle clé dans cette maladie (Langrish *et al.*, 2005, Park *et al.*, 2005). Les cellules Th17 et les cytokines qui leurs sont associées sont la principale force qui entraîne la formation des lésions et l'inflammation du système nerveux central (Jin *et al.*, 2013).

L'IL-17A est facilement détectée dans le fluide synovial et le synovium des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (RA) (Chabaud *et al.*, 1998). Plusieurs études, utilisant les différents modèles murins de RA, ont démontré un rôle clé dans la progression de la maladie pour l'IL-17A (Lubberts *et al.*, 2004, C. A. Murphy *et al.*, 2003, Nakae *et al.*, 2003a, Nakae *et al.*, 2003b). Un blocage de l'IL-17A, après le commencement de la maladie, prévient l'érosion du cartilage et des os et réduit la sévérité des symptômes cliniques (Lubberts *et al.*, 2004).

Pour ce qui est de la maladie de Crohn ou de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin, le rôle des Th17 est toujours controversé. Une étude montre que les Th17 ont un rôle protecteur en inhibant la réponse Th1 (O'Connor *et al.*, 2009), tandis que d'autres groupes montrent que l'absence de Th17 n'a pas d'influence sur la maladie (Leppkes *et al.*, 2009) ou exacerbe la maladie (Ogawa *et al.*, 2004).

5.2.3. Vaccination

Plusieurs études ont démontré l'importance des cellules pulmonaires Th17 lors d'une immunité induite par un vaccin, mais plus précisément lors d'une réponse mémoire contre *Bordetella pertussis* (Higgins *et al.*, 2006), *M. tuberculosis* (Khader *et al.*, 2007), *Helicobacter pylori* et *Streptococcus pneumoniae* (Lin *et al.*, 2010). Si nous prenons le cas de *M. tuberculosis*, il a été démontré qu'une réponse de type Th1 et Th17 était produite lors de cette infection. La neutralisation ou l'absence d'IL-17A n'a pas d'impact sur la protection induite en réponse à une infection primaire avec *M. tuberculosis*. Malgré ce fait, il a été découvert qu'une réponse pulmonaire Th17 mémoire, induite à la suite d'une vaccination sous-cutanée, était

critique pour accélérer et augmenter la réponse immunitaire secondaire de type Th1 à une infection expérimentale par *M. tuberculosis* (Chackerian *et al.*, 2006, Khader *et al.*, 2007, Khader *et al.*, 2005). Cette accumulation de cellules Th17 était accompagnée par l'induction de chimiokines, CXCL9, CXCL10 et CXCL11, lesquelles sont connues pour réguler la migration des cellules Th1 en se liant au récepteur CXCR3 (Khader *et al.*, 2007, Lin *et al.*, 2010).

La protection observée après la vaccination avec des polysaccharides de parois cellulaires ou des cellules entières de *S. pneumoniae*, administrée avec l'adjuvant CT par les muqueuses, était exercée par une action de la cytokine IL-17. De plus, la neutralisation de l'IL-17 ou une infection expérimentale chez des souris déficientes pour le récepteur de IL-17, préalablement immunisées, résultent en une protection réduite et une colonisation plus élevée (Lin *et al.*, 2010, Lu *et al.*, 2008).

Une vaccination avec une construction d'ADN, codant pour le gène de l'hémagglutinine du virus de l'influenza et de l'IL-23, montre une protection cellulaire sur une longue période de temps et élimine plus de virus lors d'une infection expérimentale avec un virus de l'influenza en comparaison avec une vaccination avec la construction codant seulement pour le HA (Lin *et al.*, 2010, Williman *et al.*, 2008). Il semble alors exister un rôle pour l'IL-23 et l'IL-17 dans la génération d'une immunité de longue durée, induite par la vaccination, contre les virus.

Une vaccination induisant la cytokine IL-17 ou la différenciation en Th17 est bénéfique pour plusieurs microorganismes, tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus fumigatus* ainsi que le rotavirus (Lin *et al.*, 2010).

5.3. Les cellules productrices d'IL-17 et le virus de l'influenza

Nous avons précédemment discuté du fait que les cellules Th17 pouvaient induire une protection contre certains virus, mais nous avons seulement mentionné qu'une production d'IL-17A et d'IL-17F avait été observée lors d'une infection par le virus de l'influenza (Crowe *et al.*, 2009). Plusieurs études ont été effectuées afin de déterminer si l'IL-17A et l'IL-17F avaient un rôle dans la protection induite par le virus de l'influenza. Une de ces études démontra que les cellules Th17 et Tc17, cellules T CD8+ qui produisent de l'IL-17A, étaient présentes suite à une infection par le virus de l'influenza. De plus, une perte de poids plus grande ainsi qu'une plus forte mortalité était observée lors de la neutralisation de l'IL-17A. Cette étude a aussi démontré que les cellules Tc17 peuvent induire une protection suite à une infection létale, et ce après un transfert adoptif à des souris naïves (H. Hamada *et al.*, 2009). Ensuite, McKinstry *et al.* (2009)

ont montré qu'un transfert adoptif des cellules Th17 spécifiques du virus permet d'induire une protection suite à une infection létale du virus de l'influenza (McKinstry *et al.*, 2009). Par contre, Maroof *et al.* (2014) ont observé une perte de poids plus faible suite à la neutralisation de l'IL-17A (Maroof *et al.*, 2014).

Afin de confirmer l'impact de l'IL-17A et l'IL-17F, Crowe *et al.* (2009) ont utilisé des souris déficientes en IL-17RA, puisque les deux cytokines peuvent être liées par cette sous-unité. Ils ont observé que les souris déficientes en IL-17RA avaient une perte de poids plus faible ainsi qu'un taux de survie plus élevé. De plus, l'IL-17RA n'est pas nécessaire pour le recrutement des cellules T CD8+ spécifiques de la protéine de l'hémagglutinine et de la nucléocapside. Ils ont donc pu conclure que l'IL-17RA n'est pas nécessaire pour l'élimination du virus (Crowe *et al.*, 2009). Donc, le rôle de l'IL-17A et de l'IL-17F, lors d'une infection par le virus de l'influenza, n'est pas encore déterminé.

6. Problématique

Chaque année, les épidémies saisonnières de grippe causent entre trois et cinq millions de cas grave et entre 250 000 à 500 000 décès mondialement. De plus, ces épidémies engendrent des pertes économiques élevées et ce, malgré l'existence de traitements anti-grippaux et de programmes de vaccination. Cela s'explique principalement par l'apparition de souches résistantes aux traitements et par les fréquents changements antigéniques à la surface du virus. De plus, les vaccins actuellement utilisés sont très efficaces chez les personnes âgées de 17 et 49 ans. Par contre, les populations à risque (les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes immunovulnérables) ne sont peu ou pas protégées par ces vaccins. Ces problématiques soulèvent le fait qu'il faut développer de nouveaux adjuvants et de nouveaux vaccins qui protègent contre une plus grande variété de souches, mais aussi toutes les populations qui peuvent être atteintes.

Depuis la découverte des PRRs et la compréhension de leurs rôles dans l'immunité innée, de nouveaux adjuvants ont été créés. En plus de la création de nouveaux adjuvants, de plus en plus de vaccins ciblent les voies naturelles d'infection, qui pour une infection par le virus de l'influenza sont les voies respiratoires. L'un des principaux avantages de cibler les muqueuses est que les immunités systémiques et des muqueuses vont être induites. Différentes stratégies ont été développées pour faciliter et augmenter la réponse immunitaire obtenue après une immunisation par les muqueuses, incluant l'encapsulation de l'antigène dans des microsphères, l'utilisation de capsule de gélatine, différentes formulations de liposomes, l'adsorption sur des nanoparticules, l'utilisation de complexes immunostimulateurs lipophiles ainsi que l'addition de produits bactériens ayant des propriétés adjuvantes, tels que les Proteosomes (Freytag *et al.*, 2005).

Les adjuvants à base Proteosome ont la capacité d'être conjugués avec des protéines amphiphiles et de former des vésicules qui peuvent atteindre un diamètre comparable à certains virus. Dans notre cas, l'antigène utilisé est le split Flu donc la protéine hémagglutinine est majoritaire, du virus de l'influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1). Une protection est observée chez les souris et les humains ayant été vaccinés, par la voie intranasale/intrapulmonaire, avec les vaccins à base de Proteosome. Ces vaccins induisent une réponse immunitaire systémique et des muqueuses. De plus, une immunisation par la voie intranasale/intrapulmonaire va induire la différenciation des cellules Th17, qui ont un rôle dans l'homéostasie des voies respiratoires

ainsi que dans la protection contre certaines infections bactériennes, fongiques et virales (Lin *et al.*, 2010).

Sachant que les vaccins à base de Proteosome protègent contre une infection par le virus de l'influenza, nous avons voulu déterminer quels étaient les types cellulaires qui engendraient cette protection ainsi que les mécanismes qui étaient impliqués dans la protection. Nous avons émis l'hypothèse que les cellules Th17 pourraient avoir un rôle dans la protection induite par les vaccins à base de Proteosome. Afin de vérifier cette hypothèse, mon projet de doctorat a été divisé en trois parties :

1. Déterminer si une réponse Th17 pulmonaire est induite par les adjuvants à base de Proteosome;
2. Vérifier si les souris déficientes en IL-17A et en IL-17A/F sont toujours protégées suite à l'immunisation et à une infection expérimentale;
3. Caractériser la réponse immunitaire, chez des souris déficientes en IL-17A et en IL-17A/F, en réponse à une infection par le virus de l'influenza.

Pour déterminer si une réponse Th17 était induite par les adjuvants à base de Proteosome, nous avons immunisé des souris avec Proteosome et Protollin et récolté les poumons à différents temps post-immunisation afin de caractériser la réponse induite par les lymphocytes T CD4⁺ en plus de celle induite dans le poumon.

Pour atteindre le deuxième objectif, nous avons, dans un premier temps, immunisé des souris BALB/c sauvages et déficientes pour l'IL-17A (IL-17AKO) et pour l'IL-17A et l'IL-17F (IL-17A/FKO) avec les adjuvants à base de Proteosome. Par la suite, une infection expérimentale, avec une souche d'influenza adaptée à la souris, a été effectuée afin de déterminer si une protection ou une diminution de la morbidité était observée. De plus, les titres viraux ont été comparés entre les différentes souches de souris ainsi qu'entre les différentes vaccinations effectuées.

Dans le cadre de mon troisième objectif, nous avons voulu comparer les réponses immunitaires induites chez des souris IL-17AKO et IL-17A/FKO. Les souris sauvages et déficientes ont été infectées avec le virus de l'influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) adapté à la souris et la sévérité et la mortalité ont été observées. De plus, les titres viraux dans les poumons ont été comparés. Des coupes histologiques ont été réalisées à différents temps post-infection afin de comparer la pathologie. Finalement, les profils de cytokines ont été comparés entre les souris sauvages et déficientes.

CHAPITRE II

LES RÉSULTATS

1. Publication No 1

Proteosome-adjuvanted intranasal influenza vaccines mediate Th17-independent protection against influenza

Benoît Bélanger^{*} and Véronique Allard^{*}, Martin Plante[†], David S. Burt[†] and Claude Daniel^{2*}

^{*} Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, CA

[†] GlaxoSmithKline Biologicals North America, Laval, QC, CA

Correspondence should be addressed to Dr. Claude Daniel; Phone: (450) 687-5010; Fax: (450) 686-5301; Email: claudedaniel@iaf.inrs.ca

Pour cette publication, j'ai effectué les immunisations (jours 7 à 21) avec les différents adjuvants ainsi que les infections avec le virus de l'influenza pour les figures 3 à 6.

1.1. Résumé

La vaccination intranasale par les adjuvants/système de livraison à base de Proteosome a été utilisée dans plusieurs études animales et cliniques afin d'induire une immunité systémique et des muqueuses. Ces adjuvants sont formés de protéines de la membrane externe (OMP) non covalamment associées avec un antigène ou du LPS (Protollin). Le but de notre étude était de caractériser la réponse immunitaire innée et adaptative engendrée par les adjuvants à base de Proteosome en utilisant un modèle murin d'immunisation intranasale. Des souris BALB/c ont été immunisées avec Proteosome, Protollin ou oligonucléotides CpG, comme adjuvant inducteur de Th1, et la réponse induite entre deux heures et 21 jours a été analysée dans le but de comparer la capacité de ces adjuvants à potentialiser la réponse immune contre l'antigène HA. Nous avons trouvé que les adjuvants à base de Proteosome induisent rapidement une réponse spécifique pour IL-23/IL-17A, mais que CpG est associé avec une production d'IL-12. Bien que semblable, Protollin engendre une réponse immune plus forte que Proteosome et cette réponse a été caractérisée par un milieu particulier en cytokine/chimiokine dans lequel les chimiokines et cytokines CXCL1, CXCL2, CCL20, G-CSF, IL-6 et IL-1 β ont été fortement régulées à la hausse. Nous avons aussi trouvé que les adjuvants à base de Proteosome induisent la différenciation des cellules Th17, et ce, dès sept jours post-immunisation et ceci corrèle avec une régulation à la hausse de l'expression de l'IL-17A, l'IL-17F, de l'IL-21, du CXCL9, du CXCL10 et du CXCL11. Des souris BALB/c immunisées avec l'antigène HA coadministré avec ces adjuvants ont été protégées d'un défi léthal par le virus de l'influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1), mais la morbidité était toujours présente chez les souris immunisées avec l'adjuvant Proteosome. Étonnamment, les souris déficientes en IL-17A/F ont aussi été protégées d'un défi léthal après l'immunisation, et la morbidité était réduite significativement en comparaison aux souris sauvages BALB/c. De plus, la déficience en IL-17A et en IL-17F a un faible impact sur la production d'anticorps au niveau systémique (IgG) et des muqueuses (IgG et IgA). En conclusion, la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome est indépendante de l'IL-17A et de l'IL-17F.

1.2. Abstract

Intranasal vaccination with Proteosome-based adjuvant/delivery systems have been used in several animal studies and clinical trials in order to raise both mucosal and systemic immunity. These adjuvants are formed of outer-membrane proteins (OMP) non-covalently associated with antigens or LPS (Protollin). The aim of our work was to characterize the innate and adaptive immune responses elicited by Proteosome-based adjuvants using a murine model of intranasal immunisation. BALB/c mice were immunized with either Proteosome, Protollin or CpG oligodeoxynucleotides, as Th1-inducing adjuvants, and responses induced between 2h and 21 days were analysed in order to compare the ability of these adjuvants to potentiate immune responses against split flu antigens. We found that Proteosome-based adjuvants induced early specific IL-23/IL-17A responses while CpG was associated with IL-12 production. Although similar, Protollin actions on the immune response were far more potent than Proteosome and were characterized by a particular cytokine/chemokine milieu in which CXCL1, CXCL2, CCL20, G-CSF, IL-6 and IL-1 β were highly upregulated. We also found that Proteosome-based adjuvants induced the differentiation of Th17 cells as early as 7 days post-immunisation that correlated with upregulation of IL-17A, IL-17F, IL-21, CXCL9, CXCL10 and CXCL11 expression. BALB/c mice immunized with split flu antigens complexed with these adjuvants were also protected from a lethal challenge with influenza A/New Caledonia/20/99 virus H1N1, although morbidity was still present in mice immunized with Proteosome adjuvant. Surprisingly, IL-17A/F-deficient mice were also protected from lethal challenge after immunisation and morbidity was significantly reduced compared to wild-type BALB/c mice. Moreover, the deficiencies in IL-17A and IL-17F have a weak impact on the production of IgG in serum, and comparable mucosal IgG and IgA titers were observed in deficient mice. Thus, the protection induced by Proteosome-based adjuvants is independent of IL-17A and IL-17F.

1.3. Introduction

IL-17A is a cytokine that is mostly produced by a newly defined subset of effector CD4⁺ T lymphocytes, distinct from the classical Th1/Th2, called Th17 (Korn *et al.*, 2009, Lankford *et al.*, 2003). In mice, Th17 cell differentiation requires TGF- β and IL-6 or IL-21 (Korn *et al.*, 2007) and is augmented by the coordinated activities of IL-1 β and TNF (Iwakura *et al.*, 2008, Veldhoen *et al.*, 2006). IL-23 is required for the growth, survival, and effector functions of Th17 cells and promotes IL-17A and IL-17F production by this T cell subset (Stritesky *et al.*, 2008). Recent studies have shown that TGF- β is dispensable and may only help to strengthen Th17 responses by inhibiting Th1 or Th2 cells, which in turn suppress Th17 cells (Das *et al.*, 2009, Schumann *et al.*, 2012). In addition to Th17, CD8⁺ T cells, NK and NK T cells lacking the NK1.1 marker are known producers of IL-17A thus showing the contribution of this cytokine to both innate and adaptive compartments (K. A. Lee *et al.*, 2008, Lockhart *et al.*, 2006). Neutrophil recruitment as a result of IL-17A or IL-17F overproduction has also been reported (Miyamoto *et al.*, 2003). This neutrophil mobilization is regulated through cytokine/chemokine production (IL-6, IL-8, CXCL1, CXCL2, and G-CSF) from IL-17-stimulated local cells (Langrish *et al.*, 2004, Miyamoto *et al.*, 2003). While less potent than IL-17A, IL-17F is also produced by Th17 cells and signals through the same receptor complexes, consisting of IL-17RA and IL-17RC (Gaffen, 2009, Toy *et al.*, 2006). Consistent with the redundant function of IL-17A and IL-17F, both cytokines also induce microbial peptide production (Y. Chen *et al.*, 2003, Iwakura *et al.*, 2008, Kao *et al.*, 2004) and improve antigen presentation by enhancing ICAM-1 expression on epithelial cells (Aggarwal *et al.*, 2003, Bastos *et al.*, 2004, Kawaguchi *et al.*, 2001).

Although Th17 cells have already been associated with several inflammatory diseases, there is growing evidence for their relevance in protection against lung infection (Aujla *et al.*, 2007). Although many studies have shown the importance of IL-17A in murine models of bacterial, mycobacterial and fungal infections (Curtis *et al.*, 2009) such as *M. pneumoniae* (Wu *et al.*, 2007), *K. pneumonia* (Happel *et al.*, 2003), *M. tuberculosis* (Lockhart *et al.*, 2006), and *P. carinii* (Rudner *et al.*, 2007), only a few studies have assessed its role in airway viral infection. Lately, Hamada *et al.* showed that Tc17, a subset of CD8 T cells that secrete IL-17A, could protect mice against a lethal influenza challenge (H. Hamada *et al.*, 2009). Similarly, virus-specific Th17-polarized cells could mediate protection against lethal flu infection upon transfer in naive mice (McKinstry *et al.*, 2009). On the other hand, Crowe *et al.* suggest that IL-17RA knockout mice are able to better tolerate influenza challenge (Crowe *et al.*, 2009).

Vaccination offers the possibility to raise both cellular and humoral immunity by mimicking prior antigen encounter without the risk associated with natural infection. Proteosome-based adjuvants, which can promote mucosal and systemic immunity when given intranasally, are formed of outer membrane proteins (OMP) derived from *N. meningitidis* (T. Jones *et al.*, 2003, Plante *et al.*, 2001). The OMP of Proteosome-based adjuvants include PorB, a known agonist of TLR2 (S. M. Chabot *et al.*, 2007, Massari *et al.*, 2002, Singleton *et al.*, 2005). The OMP are associated non-covalently with antigens such as split flu influenza antigens (Proteosome) or with LPS from *S. flexneri 2a* or *P. shigelloides* (Protollin) (T. Jones *et al.*, 2004). The latter adjuvant was shown to induce specific responses when delivered with soluble antigens (S. Chabot *et al.*, 2005, T. Jones *et al.*, 2006). Proteosome has previously been shown to be safe and immunogenic in human trials (Langley *et al.*, 2006) and to induce protective immune responses in animal studies (T. Jones *et al.*, 2003, Plante *et al.*, 2001). Humoral responses elicited by Proteosome and Protollin are characterized by increased IgG and IgA production (T. Jones *et al.*, 2004, Plante *et al.*, 2001). Based on isotype ratios (IgG1/IgG2a) or cytokine quantification (IFN- γ /IL-5) in culture supernatants from in vitro stimulated splenocytes, cellular responses induced by these two adjuvants are thought to drive Th1 polarization compared to a mixed Th1/Th2 cell response following immunisation with antigen alone (T. Jones *et al.*, 2003, T. Jones *et al.*, 2004, Plante *et al.*, 2001).

Some studies have shown the importance of lung Th17 cells in vaccine-induced immunity, specifically in the recall response against *B. pertussis* (Higgins *et al.*, 2006), *M. tuberculosis* (Khader *et al.*, 2007), *H. pylori* and *S. pneumoniae* (Lin *et al.*, 2010). These studies, however, were based on intraperitoneal and subcutaneous vaccination. Little is known on the direct contribution of vaccine adjuvants, derived from bacterial product and administered via nasal route, to virus-specific Th17-mediated lung protection. Recently, Lee *et al.* showed that intranasal (i.n.) delivery of cholera toxin, another mucosal immunogen, lead to IL-6-dependent differentiation skewed toward Th17, and characterized by lung neutrophils infiltration (J. B. Lee *et al.*, 2009). Whereas a key role for IL-17A has been suggested in a Th17-dependent protection against bacterial pathogens after intraperitoneal or subcutaneous vaccination (Higgins *et al.*, 2006, Khader *et al.*, 2007), contribution of early IL-17A in i.n. immunisation against viral antigens has not been established. Moreover, little is known about the mechanisms by which Proteosome and Protollin mediate their immunogenicity, in contrast to responses elicited by CpG, which are well characterized. The aim of this study was to investigate the process by which these adjuvants, combined to split flu antigens, potentiate the immune responses using a murine model of nasal immunisation, and protect against an influenza challenge. Herein, we

demonstrated that Proteosome-based adjuvants induce early specific IL-23/IL-17A responses. Furthermore, these adjuvants induces the differentiation of Th17 cells and increases the expression of cytokines produced by this type of cell. Nevertheless, the protection induced by Proteosome-based adjuvants was independent of IL-17A and IL-17F.

1.4. Materials and Methods

Animals

8- to 12-week-old female BALB/c (H-2^d) mice were purchased from Charles River (St-Constant, QC, CA) and same aged BALB/c IL-17A/F-deficient (H-2^d) (IL-17A/FKO) mice (kindly provided by Dr Yoichiro Iwakura, Tokyo University, Tokyo, Japan) were used for immunisation and infection procedures. Animals were kept in our own pathogen-free facilities and experiments were all performed according to Canadian Council on Animal Care guidelines after approval by our institutional ethics committee.

Antigens and adjuvants

Influenza antigen (sFlu; A/New Caledonia/20/99, H1N1), Proteosome vaccine (monovalent New Caledonia Flu vaccine already formulated at 4:1 ratio of Proteosome-Hemagglutinin (HA)) and Protollin vaccine (Proteosome-*S.Flexneri 2a* LPS vaccine) were obtained from Dr. Martin Plante (GlaxoSmith Kline, Laval, QC, CA). HA concentration had previously been determined by a single radial immunodiffusion assay (SRID). CpG ODN 1826 of sequence TCCATGACGTTCTGACGTT was synthesized with a phosphorothioate nuclease resistant backbone (Sigma, Oakville, ON, CA).

Animal procedures and sample collection

The immunogenicity of the Proteosome-formulated vaccines was assessed by immunisation with 3 µg of vaccine based on rHA content. For i.n. immunisations, mice were lightly anesthetized by isoflurane inhalation and 25 µl of vaccine or control was applied to the nares (12.5µl per nostril). Control groups received PBS or sFlu. Mice were immunized on days 0 and 14. At day 21 post-immunisation, lungs were recovered, submerged in RNeasyTM (Qiagen, Mississauga, ON, CA) and kept at -80°C until processed for RNA isolation. Otherwise, lungs were mechanically disrupted between frosted slides. Broncho-alveolar lavage fluids (BALF) were obtained after cannulating the trachea and injecting twice 1 ml PBS 0.1% BSA containing general use protease inhibitor (Sigma). Serums were obtained from cardiac puncture. Collected fluids were centrifuged to remove cell debris and antibody titers were measured by ELISA.

Animals from each group were challenged, on day 28, by i.n. instillation with five LD₅₀ of mouse-adapted influenza virus A/New Caledonia/20/99 (H1N1), kindly provided by Dr Ioanna

Skountzo, Emory University, Atlanta, USA) to assess protection. Mice were weighed before challenge, and every days after challenge. Mice losing $\geq 20\%$ of their pre-challenge body weight or showing a smaller weight loss ($\leq 20\%$) in conjunction with other clinical signs of distress and morbidity (e.g. pilo-erection, hunched posture, reduced mobility) were deemed to have met experimental endpoint criteria and were euthanized. At day 34 post-immunisation, mice were euthanized by exsanguination under ketamine/xylazine/acepromazine anesthesia. Lungs were recovered, submerged in DMEM 5% FBS and kept at -80°C until processed for viral titration.

Lung cell culture and cytokine determination

Prior to retrieval, lungs were perfused through the pulmonary artery with 1 ml PBS containing 5 mM EDTA. A single cell suspension was obtained from mechanical disruption and filtration through a $40\mu\text{M}$ mesh. Cells were washed, resuspended at 2×10^6 cells/ml in complete medium (RPMI-1640, 10% FCS, 1x glutamax, 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin and 5×10^{-5} M 2-ME), and seeded in a 24-well plate. Cell stimulations were performed for 6 hours at 37°C with 50 ng/ml PMA (Sigma) and 500 ng/ml ionomycin (Sigma). Otherwise, cells were stimulated with 5 $\mu\text{g/ml}$ of pre-coated anti-CD3 mAb (145.2C11) and 10 $\mu\text{g/ml}$ of soluble anti-CD28 mAb (37.51). Unstimulated lung cell cultures were included as controls. After incubation, supernatants were collected and cytokine levels were measured using the Mouse IL-17A, Mouse IFN- γ or Mouse IL-4 Ready-SET-Go ELISA SET (eBioscience, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Flow Cytometry

Cells were stimulated with 50 ng/ml PMA (Sigma), 500 ng/ml ionomycin (Sigma) in the presence of $1\mu\text{M}$ monensin (eBioscience, San Diego, CA, USA) for 6 hr at 37°C . Intracellular cytokine staining was performed with Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer kit according to eBioscience procedure. Cells were treated with rat anti-mouse CD16/CD32 mAbs (93; eBioscience) in staining buffer (PBS containing 1% BSA and 0.02% sodium azide) to block FcR binding and then stained with APC rat anti-mouse CD4 (Gk1.5; eBioscience) and PerCP rat anti-mouse CD8a (53-6.7, BD Pharmingen). After washing, the cells were fixed with IC fixation buffer (eBioscience). After washing with permeabilization buffer (eBioscience), cells were incubated with FITC rat anti-mouse IFN- γ (XMG1.2; eBioscience) and PE rat anti-mouse IL-17A (TC11-18H10; BD Pharmingen). The cells were analysed on a FACSCalibur system (Becton Dickinson) and data analyses were performed using FCS Express v3 (DeNovo Software, Los Angeles, CA, USA).

Antibody response assessment

Nunc Maxisorb plates were first coated with 1 µg/ml of HA from sFlu overnight at 4°C. Samples were diluted in PBS 0.1% BSA for IgG and in PBS 5% dry skim milk for IgA assays. Detection of specific antibodies was achieved using HRP-conjugated anti-mouse IgG (whole molecule; Sigma) or IgA (α-chain specific; Sigma) and addition of substrate (OPD/peroxide). Reactions were stopped after 30 min by addition of 0.1N HCL. Plates were read at 490 nm and concentrations were calculated with a standard curve using purified immunoglobulins (mouse IgG or mouse IgA, kappa; Sigma).

Neutralizing antibodies were quantified by neutralization assay. Briefly, serial dilutions of serum or BALF samples starting at a dilution of 1:10 were incubated with 10^2 TCID₅₀ of influenza A/New Caledonia/20/99 and incubated for 15 min, before 2.5×10^4 MDCK cells were added. Viral neutralization was determined, after 3 days, by evaluation of CPE using an inverted microscope. Neutralizing titers were determined by the Kärber formula ($TCID_{50} = \Delta - \delta(S - 0.5)$) where Δ is the log₁₀ of the dilution with 100% positive cultures, δ the log₁₀ of the dilution factor and S is the sum of positive cultures per dilution including those at dilution with 100% infected cultures.

Viral titration

Determination of influenza viral titers in lung homogenates was accomplished by the tissue culture infectious dose 50% assay (TCID₅₀) with titers expressed as the reciprocal of the dilution of lung extract that corresponds to 50% virus growth in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, calculated by the Reed-Muench method (Cottey *et al.*, 2001).

RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative PCR

Lungs tissues were ground between frosty slides in TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) prior to chloroform extraction. The aqueous phase was recovered and ethanol was added before proceeding to total RNA extraction using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, CA). cDNA was synthesized from 100 ng to 1 µg of total RNA using the SuperScriptIII™ Reverse Transcriptase (Invitrogen) and Hexanucleotides (Roche Applied Science, Laval, QC, CA) according to manufacturer's specifications. qPCR was performed with a PerfeCTa™ SYBR Green Supermix, low ROX kit (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA) using the Mx3000P QPCR system (Stratagene, LaJollam CA, USA). Primer sequences were retrieved on PrimerBank and synthesized at Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA). The primers used in these experiments are listed in Table I. PCR conditions consisted of 40 cycles of

denaturation at 95°C for 10s, annealing at 60°C for 15s, and elongation at 72°C for 20s. The relative induction of cytokines and chemokines was quantified using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and was normalized to GAPDH expression.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v6.0d with either a one-way or two-way ANOVA analysis and a Bonferroni post-test to respectively compare all pairs of columns or compare columns to control value. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

1.5. Results

Protollin immunisation induces rapid IL-23p19 mRNA expression and IL-17A production in mouse lungs and BALF.

Mice were immunized with HA, either in PBS (sFlu), incorporated into Proteosome or co-instilled with Protollin or CpG. Lungs were retrieved 2, 12, 24, or 48h after immunisation. RNA was isolated, cDNA synthesized and qPCR was performed. Otherwise, BALF and lungs homogenates were assayed by ELISA. Figure 1A shows that Protollin induced early but transient expression of IL-23p19 mRNA, since expression returned to baseline level 48h post-immunisation. Interestingly, concomitant IL-23p19 down-regulation was associated with a rapid induction of IL-17A expression. Despite lower levels, Proteosome also induced early IL-23p19 expression, which suggests a specific role for IL-23 production in Proteosome-based vaccination, in contrast to CpG that failed to induce IL-23p19 and IL-17A mRNA above control (PBS) level. Detectable amounts of IL-23 and IL-17A cytokines were found in every sample tested though only IL-17A was shown to be modulated following administration of an adjuvant (Figure 1B; IL-23 data not shown). In the lungs, IL-17A production increased slightly after 24h of immunisation with either Proteosome or Protollin. Forty-eight hours post-immunisation (p.i.), IL-17A production in the lungs was further increased with Protollin vaccine and was detected at high levels in BALF of these mice.

Other pro-inflammatory mediators are rapidly expressed in lungs following vaccination with Proteosome-based adjuvants.

As IL-17 regulates granulopoiesis through the production of different cytokines/chemokines, we wanted to further characterize any modification of the lung cell environment following vaccination. Expression profiles of IL-1, IL-6, IL-12p40, CXCL1 (KC), CXCL2 (Mip2), CCL20 (Mip3), and G-CSF were established as previously described (Miyamoto *et al.*, 2003). Figure 2 shows that specific gene expression profiles were induced according to the adjuvants tested. IL-6 and IL-1 β , two pro-inflammatory cytokines, were both expressed early following immunisation with Proteosome, Protollin or CpG vaccine albeit at different levels. After only 2h, Protollin clearly induced more IL-6 and IL-1 β expression in lungs. However, CpG induced greater IL-12p40 mRNA and thus, most likely IL-12 production than the two other adjuvants. Proteosome or Protollin immunisation also correlated with high early expression of CXCL1, CXCL2, two

neutrophils chemoattractants, and CCL20, the ligand for CCR6, which is known to be expressed on lymphocytes and dendritic cells. Chemokine production correlated with massive neutrophil recruitment to the lung in mice immunized with Proteosome-based adjuvants, which numbers returned to baseline level by 96 hours post-immunization (data not shown). Strikingly, G-CSF expression was highly upregulated by Proteosome-based adjuvants vaccination.

Proteosome-based adjuvants trigger expression of genes associated with Th17/Th1 responses in lungs.

Mice were immunized with either PBS, sFlu, Proteosome, Protollin-sFlu or CpG-sFlu. Lungs were removed 21 days p.i. and RNA was isolated, cDNA synthesized and qPCR was performed. Naive mouse lungs were processed as described above and used to determine the relative gene induction following immunisation procedure. Figure 3 shows that Proteosome-based adjuvants induced cytokine expression known to be associated with Th17 cells such as IL-17A, IL-17F and IL-21. In contrast, those cytokines were not upregulated by CpG. Although we failed to detect any IFN- γ modulation (data not shown), increased expression of IFN- γ mediated T cell chemoattractants CXCL9, CXCL10 and CXCL11 was observed after Proteosome-based adjuvant immunisation suggesting that IL-17 could drive the recruitment of Th1 cells at the site of immunisation (Khader *et al.*, 2007).

Proteosome-based adjuvants induce Th17 differentiation.

In order to determine if those cytokines/chemokines specifically induced by Proteosome-based adjuvants could reflect a distinct differentiation of lung immune cells, lung cell suspensions prepared from mice immunized as described above were restimulated *in vitro* with PMA, ionomycin, in presence of monensin. Six hours later, cells were collected and IL-17A and IFN- γ production were assayed by intracellular flow cytometry. Figure 4A shows that upon restimulation, the number of CD4⁺ T cells producing IL-17A (Th17) was increased in mice immunized by Proteosome-based adjuvants, as early as seven days post-immunisation, and these cells persisted until day 21 p.i. Protollin immunisation also correlated with a significant raise in the number of CD8⁺ T cells producing IL-17A (Tc17), at day 21 p.i. Furthermore, sFlu and Proteosome immunisation were associated with a significant increase number of CD4⁺ T cells producing IFN- γ (Th1), at day 11 p.i.

Moreover, high level of IL-17A cytokine could be observed in supernatants of PMA/ionomycin-stimulated, lung cell cultures derived from mice immunized with Proteosome-based adjuvants, in contrast to CpG. CD3/CD28 stimulation also triggered similar IL-17A production, supporting our

previous results suggesting that immunisation with Proteosome-based adjuvants induced differentiation of Th17 cells. Low IFN- γ concentrations were detected in lung cell cultures from mice immunized with Protollin, which suggests that the latter could also induce weak Th1 differentiation (Figure 4B). As expected, all three adjuvants tested did not prompt Th2 differentiation, as revealed by the absence of IL-4 production above control group (data not shown).

The protection induced by Proteosome-based adjuvants is independent of IL-17A and IL-17F.

In order to determine whether IL-17A and IL-17F have a role in the protection induced by Proteosome-based adjuvants (33), BALB/c and IL-17A/FKO mice were infected with five LD₅₀ of mouse adapted Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1). All BALB/c mice immunized with Proteosome-based adjuvants or CpG survived the challenge infection, although significant weight loss was observed in Proteosome and CpG, in contrast to mice immunized with Protollin. Moreover, protection in mice immunized with Protollin correlated with a significant decrease in viral burden in comparison to Proteosome, CpG and control mice (Figure 5A). Proteosome immunisation also caused a slight decrease in viral replication, which was less important than in Protollin mice. Interestingly, no weight loss was observed in IL-17A/FKO immunized with Proteosome, Protollin or CpG adjuvants, which also correlated with an important decrease in viral replication (Figure 5B). These results show that IL-17A and IL-17F are not essential for the protection induced by Proteosome-based adjuvants in BALB/c mice.

The absence of IL-17A and IL-17F has no impact on antibody titers or neutralizing activity in mice vaccinated by Proteosome-based adjuvants.

Twenty-one days post-immunisation, HA-specific antibody production was assayed by ELISA on mice serum and BALF. Figure 6A shows that Proteosome, Protollin or CpG induced a strong humoral response in contrast to sFlu. The results show that IgG titer was similar between the three adjuvants, in serum of BALB/c and IL-17A/FKO mice. Of note, sFlu alone failed to induce IgG or IgA production in lungs, hence indicating the absolute requirement of adjuvant to potentiate mucosal immunity. Interestingly, Proteosome-based adjuvants and CpG induced a comparable production of mucosal IgG and IgA titer only in IL-17A/FKO mice. Furthermore, virus-neutralizing antibodies with similar titers were identified in serum and BALF after vaccination with Proteosome-based adjuvants or CpG. Production of neutralizing antibodies was not significantly altered in IL-17A/FKO mice, except after vaccination with CpG adjuvant where a significant decrease in serum neutralizing antibodies was observed (Figure 6B).

1.6. Discussion

In this study, two Proteosome-based adjuvants were compared for the first time in their ability to potentiate innate and adaptive immune responses in the context of vaccination against the influenza virus. We used CpG as a Th1 inducer control and showed, in a murine model of i.n. immunisation, that this adjuvant leads to increased IL-12 production in lungs. In contrast, vaccination with Proteosome-based adjuvants induced lower IL-12 but promoted early specific IL-23/IL-17A responses in lungs. Innate airway responses were also characterized by increased expression of pro-inflammatory mediators IL-1 β , IL-6, CXCL1, CXCL2 and G-CSF, which preceded neutrophil recruitment. Unlike CpG responses which were rapidly detected in other lymphoid organs and thus considered more systemic, responses to Proteosome-based adjuvants were mainly localized in the lungs (data not shown). One possible mechanism by which Proteosome-based adjuvants might trigger these events could be through direct interaction with TLR expressed by airway epithelial cells. This activation would result in cytokine and chemokine production. It was previously showed in vitro that Proteosome induces a TLR2-dependent release of DC-attracting chemokine CCL20 from epithelial cells (S. M. Chabot *et al.*, 2007). CCL20, on the other hand, has been linked to Th17 cell recruitment to the inflamed site (Hirota *et al.*, 2007). Another possible mechanism explaining the early cytokine/chemokine production initiated by Proteosome-based adjuvants could be dependent and consequent to initial IL-17A production. The receptor of IL-17A is ubiquitously expressed, in contrast to the restricted expression of its ligand. Messenger RNA for IL-17A receptor has been detected in many tissues, including lungs and non-immune cells such as epithelial cells and fibroblasts (Gaffen, 2009, Yao *et al.*, 1995). IL-17A was shown to amplify local inflammation via increased expression of IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, CXCL1 and CXCL6 from human bronchial epithelial cells (C. E. Jones *et al.*, 2002, Prause *et al.*, 2003). In murine models, IL-17 and IL-6 have been shown to drive expression of mucin genes and promote growth of airway epithelial cells thus showing a modulation of cytokine release from activated epithelium (Y. Chen *et al.*, 2003).

Adjuvant activity of porins has been shown to trigger TLR2 and MyD88-dependent IL-6 production from DC, which promote upregulation of costimulatory molecules, B-cell proliferation, Ig production and T cell differentiation (Massari *et al.*, 2003, Singleton *et al.*, 2005). In our study, Proteosome but mostly Protollin were shown to enhance IL-6 expression and production (data not shown). In addition, IL-23, which is mainly produced by activated APC, particularly macrophages and DC from myeloid lineage (Langrish *et al.*, 2004, Waibler *et al.*, 2007), was shown to be rapidly upregulated by Proteosome-based adjuvants, but not CpG. This is

consistent with previous reports showing that myeloid DC stimulation with TLR4 agonists leads to increased IL-23 production compared to other ligands such as CpG (Waibler *et al.*, 2007). TLR2 agonists were shown to be even more powerful than TLR4 ligand for triggering IL-23 production by human DCs (Re *et al.*, 2001). Whereas it is known that local IL-17 plays an important role in granulopoiesis, IL-23 was only recently demonstrated to be required for neutrophil homeostasis in mice (Smith *et al.*, 2007). Phagocytosis of apoptotic neutrophils reduces IL-23 production, leading to decreased IL-17 production and therefore reduced cytokine/chemokine production and neutrophil infiltration (Stark *et al.*, 2005). In our study, a decreased expression of IL-23p19, CXCL1 and CXCL2 was detected at 48h post-immunisation and lung infiltration was cleared by 96 hours, demonstrating neutrophil regulation, and re-establishment of homeostasis.

Proteosome-based adjuvants were previously reported to polarize T cell responses toward a type 1 phenotype, with increase IFN- γ and IgG2a production, similar to CpG (T. Jones *et al.*, 2003, T. Jones *et al.*, 2004, Plante *et al.*, 2001). It has been reported that the induction of Th17 responses is a universal feature of intranasal immunisation (Zygmunt *et al.*, 2009), consistent with our results showing that Proteosome-based adjuvants drive a Th17 cell differentiation. In addition, IL-17A, IL-17F and IL-21, which are cytokines mainly produced by Th17 cells (Curtis *et al.*, 2009, Korn *et al.*, 2009, S. G. Zheng, 2013), were shown to be upregulated by Proteosome-based adjuvants, but not CpG. The accumulation of IL-17-producing cells was associated with the production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 chemokines, which are known to enhance migration of Th1 cells by binding to the receptor CXCR3 (Groom *et al.*, 2012), which is also upregulated by Proteosome-based adjuvants (data not shown). The promoters of *cxcl9*, *cxcl10*, and *cxcl11* chemokine genes have IL-17-responsive elements suggesting that IL-17 may directly induce these chemokines in the lung (Lin *et al.*, 2010). As observed in many mucosal vaccines, Proteosome-based adjuvants induce a robust Th17 response, suggesting Th17 cells may be useful targets for vaccine-induced immunity (Kumar *et al.*, 2013).

Th17 cells have been implicated in the response to a number of pathogens (Bedoya *et al.*, 2013, McAleer *et al.*, 2011) and we show here that both CD4 and CD8 IL-17A-secreting cells can be detected in the lungs of mice responding to immunisation with Proteosome-based adjuvants. The role of IL-17A during influenza virus infection remains controversial, as reports showed either a role in protection or pathogenesis (Crowe *et al.*, 2009, H. Hamada *et al.*, 2009, McKinstry *et al.*, 2009). Knowing that Th17 cells can be implicated in vaccinal immunity (Higgins *et al.*, 2006, Khader *et al.*, 2007, Kumar *et al.*, 2013, Lin *et al.*, 2010), we wanted to determine

whether the protection induced by the Proteosome-based adjuvants (Burt *et al.*, 2011, T. Jones *et al.*, 2003, T. Jones *et al.*, 2004, Plante *et al.*, 2001) was dependent on Th17 cells, more specifically on IL-17A and IL-17F (Dubin *et al.*, 2009, Korn *et al.*, 2009). Our data conclusively showed that neither cytokine is critical for protection against influenza virus infection. In addition, reduced weight loss and morbidity were observed in IL-17A and IL-17F deficient mice, confirming a detrimental role of these cytokines in the pathology of influenza infection.

Mucosal adjuvants are known to induce mucosal and systemic immune responses. The protection induced by the majority of influenza vaccines is mediated by the antibody response against the HA protein (Waffarn *et al.*, 2011). Efficient virus clearance is dependent on both the cellular and humoral arms of the immune system. After demonstrating that IL-17-producing cells have no impact on the protection induced by Proteosome-based adjuvants, we want to determine whether IL-17A and IL-17F have an impact on antibody production. It was recently shown that IL-17A, together with BAFF, but not by itself, can enhance survival, proliferation and Ig class switching in B cells in vitro (Doreau *et al.*, 2009). Similar to IL-17AKO mice, IL-17FKO mice showed reduced Ig production in certain immune responses (Ishigame *et al.*, 2009). In contrast, we observed that IL-17A and IL-17F KO mice have a better mucosal antibody production in mice immunized with Proteosome and CpG, and this may explain why IL-17A/FKO mice are protected when immunized with Proteosome and CpG. Moreover, the deficiencies in IL-17A and IL-17F, in mice immunized with Proteosome-based adjuvants, have no effect on the neutralizing capacity of Ig in serum and BALF. It seems that IL-17A and IL-17F influence the antibody responses when mice are immunized with a Th1 inducer, CpG, but have no influence on the antibody response induced by Proteosome-based adjuvants.

Our data suggest that IL-17A and IL-17F are dispensable for the resolution of influenza responses in vaccinated mice. Moreover, the absence of IL-17A and IL-17F reduces the morbidity caused by influenza infection. The protection induced by Proteosome-based adjuvants is independent on IL-17A and IL-17F and presumably mediated by antibody production. The contribution of cells producing IL-17A and IL-17F remains to be investigated.

1.7. References

- Aggarwal, S., N. Ghilardi, M. H. Xie, F. J. de Sauvage and A. L. Gurney (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." J Biol Chem **278**(3): 1910-1914.
- Aujla, S. J., P. J. Dubin and J. K. Kolls (2007). "Interleukin-17 in pulmonary host defense." Exp Lung Res **33**(10): 507-518.
- Bastos, K. R., C. R. Marinho, R. Barboza, M. Russo, J. M. Alvarez and M. R. D'Imperio Lima (2004). "What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells?" Microbes Infect **6**(6): 630-636.
- Bedoya, S. K., B. Lam, K. Lau and J. Larkin, 3rd (2013). "Th17 cells in immunity and autoimmunity." Clin Dev Immunol **2013**: 986789.
- Burt, D., C. Mallett, M. Plante, J. Zimmermann, K. Torossian and L. Fries (2011). "Proteosome-adjuvanted intranasal influenza vaccines: advantages, progress and future considerations." Expert Rev Vaccines **10**(3): 365-375.
- Chabot, S., A. Brewer, G. Lowell, M. Plante, S. Cyr, D. S. Burt and B. J. Ward (2005). "A novel intranasal Protollin-based measles vaccine induces mucosal and systemic neutralizing antibody responses and cell-mediated immunity in mice." Vaccine **23**(11): 1374-1383.
- Chabot, S. M., T. S. Chernin, M. Shawi, J. Wagner, S. Farrant, D. S. Burt, S. Cyr and M. R. Neutra (2007). "TLR2 activation by proteosomes promotes uptake of particulate vaccines at mucosal surfaces." Vaccine **25**(29): 5348-5358.
- Chen, Y., P. Thai, Y. H. Zhao, Y. S. Ho, M. M. DeSouza and R. Wu (2003). "Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop." J Biol Chem **278**(19): 17036-17043.
- Cotter, R., C. A. Rowe and B. S. Bender (2001). "Influenza virus." Curr Protoc Immunol **Chapter 19**: Unit 19 11.
- Crowe, C. R., K. Chen, D. A. Pociask, J. F. Alcorn, C. Krivich, R. I. Enelow, T. M. Ross, J. L. Witztum and J. K. Kolls (2009). "Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection." J Immunol **183**(8): 5301-5310.
- Curtis, M. M. and S. S. Way (2009). "Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens." Immunology **126**(2): 177-185.
- Das, J., G. Ren, L. Zhang, A. I. Roberts, X. Zhao, A. L. Bothwell, L. Van Kaer, Y. Shi and G. Das (2009). "Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation." J Exp Med **206**(11): 2407-2416.
- Doreau, A., A. Belot, J. Bastid, B. Riche, M. C. Trescol-Biemont, B. Ranchin, N. Fabien, P. Cochat, C. Pouteil-Noble, P. Trolliet, I. Durieu, J. Tebib, B. Kassai, S. Ansieau, A. Puisieux, J. F. Eliaou and N. Bonnefoy-Berard (2009). "Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating

factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus." Nat Immunol **10**(7): 778-785.

Dubin, P. J. and J. K. Kolls (2009). "Interleukin-17A and interleukin-17F: a tale of two cytokines." Immunity **30**(1): 9-11.

Gaffen, S. L. (2009). "Structure and signalling in the IL-17 receptor family." Nat Rev Immunol **9**(8): 556-567.

Groom, J. R., J. Richmond, T. T. Murooka, E. W. Sorensen, J. H. Sung, K. Bankert, U. H. von Andrian, J. J. Moon, T. R. Mempel and A. D. Luster (2012). "CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation." Immunity **37**(6): 1091-1103.

Hamada, H., L. Garcia-Hernandez Mde, J. B. Reome, S. K. Misra, T. M. Strutt, K. K. McKinstry, A. M. Cooper, S. L. Swain and R. W. Dutton (2009). "Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge." J Immunol **182**(6): 3469-3481.

Happel, K. I., M. Zheng, E. Young, L. J. Quinton, E. Lockhart, A. J. Ramsay, J. E. Shellito, J. R. Schurr, G. J. Bagby, S. Nelson and J. K. Kolls (2003). "Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection." J Immunol **170**(9): 4432-4436.

Higgins, S. C., A. G. Jarnicki, E. C. Lavelle and K. H. Mills (2006). "TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells." J Immunol **177**(11): 7980-7989.

Hirota, K., H. Yoshitomi, M. Hashimoto, S. Maeda, S. Teradaira, N. Sugimoto, T. Yamaguchi, T. Nomura, H. Ito, T. Nakamura, N. Sakaguchi and S. Sakaguchi (2007). "Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model." J Exp Med **204**(12): 2803-2812.

Ishigame, H., S. Kakuta, T. Nagai, M. Kadoki, A. Nambu, Y. Komiyama, N. Fujikado, Y. Tanahashi, A. Akitsu, H. Kotaki, K. Sudo, S. Nakae, C. Sasakawa and Y. Iwakura (2009). "Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses." Immunity **30**(1): 108-119.

Iwakura, Y., S. Nakae, S. Saijo and H. Ishigame (2008). "The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens." Immunol Rev **226**: 57-79.

Jones, C. E. and K. Chan (2002). "Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **26**(6): 748-753.

Jones, T., J. J. Adamovicz, S. L. Cyr, C. R. Bolt, N. Bellerose, L. M. Pitt, G. H. Lowell and D. S. Burt (2006). "Intranasal Protollin/F1-V vaccine elicits respiratory and serum antibody responses and protects mice against lethal aerosolized plague infection." Vaccine **24**(10): 1625-1632.

Jones, T., F. Allard, S. L. Cyr, S. P. Tran, M. Plante, J. Gauthier, N. Bellerose, G. H. Lowell and D. S. Burt (2003). "A nasal Proteosome influenza vaccine containing baculovirus-derived hemagglutinin induces protective mucosal and systemic immunity." Vaccine **21**(25-26): 3706-3712.

Jones, T., S. Cyr, F. Allard, N. Bellerose, G. H. Lowell and D. S. Burt (2004). "Protollin: a novel adjuvant for intranasal vaccines." Vaccine **22**(27-28): 3691-3697.

Kao, C. Y., Y. Chen, P. Thai, S. Wachi, F. Huang, C. Kim, R. W. Harper and R. Wu (2004). "IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways." J Immunol **173**(5): 3482-3491.

Kawaguchi, M., F. Kokubu, H. Kuga, S. Matsukura, H. Hoshino, K. Ieki, T. Imai, M. Adachi and S. K. Huang (2001). "Modulation of bronchial epithelial cells by IL-17." J Allergy Clin Immunol **108**(5): 804-809.

Khader, S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, R. M. Locksley, L. Haynes, T. D. Randall and A. M. Cooper (2007). "IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge." Nat Immunol **8**(4): 369-377.

Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T. B. Strom, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2007). "IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells." Nature **448**(7152): 484-487.

Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.

Kumar, P., K. Chen and J. K. Kolls (2013). "Th17 cell based vaccines in mucosal immunity." Curr Opin Immunol **25**(3): 373-380.

Langley, J. M., S. A. Halperin, S. McNeil, B. Smith, T. Jones, D. Burt, C. P. Mallett, G. H. Lowell and L. Fries (2006). "Safety and immunogenicity of a Proteosome -trivalent inactivated influenza vaccine, given nasally to healthy adults." Vaccine **24**(10): 1601-1608.

Langrish, C. L., B. S. McKenzie, N. J. Wilson, R. de Waal Malefyt, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2004). "IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity." Immunol Rev **202**: 96-105.

Lankford, C. S. and D. M. Frucht (2003). "A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity." J Leukoc Biol **73**(1): 49-56.

Lee, J. B., J. E. Jang, M. K. Song and J. Chang (2009). "Intranasal delivery of cholera toxin induces th17-dominated T-cell response to bystander antigens." PLoS One **4**(4): e5190.

Lee, K. A., M. H. Kang, Y. S. Lee, Y. J. Kim, D. H. Kim, H. J. Ko and C. Y. Kang (2008). "A distinct subset of natural killer T cells produces IL-17, contributing to airway infiltration of neutrophils but not to airway hyperreactivity." Cell Immunol **251**(1): 50-55.

Lin, Y., S. R. Slight and S. A. Khader (2010). "Th17 cytokines and vaccine-induced immunity." Semin Immunopathol **32**(1): 79-90.

Lockhart, E., A. M. Green and J. L. Flynn (2006). "IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection." J Immunol **177**(7): 4662-4669.

Massari, P., P. Henneke, Y. Ho, E. Latz, D. T. Golenbock and L. M. Wetzler (2002). "Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent." J Immunol **168**(4): 1533-1537.

Massari, P., S. Ram, H. Macleod and L. M. Wetzler (2003). "The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity." Trends Microbiol **11**(2): 87-93.

McAleer, J. P. and J. K. Kolls (2011). "Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense." J Leukoc Biol **90**(2): 263-270.

McKinstry, K. K., T. M. Strutt, A. Buck, J. D. Curtis, J. P. Dibble, G. Huston, M. Tighe, H. Hamada, S. Sell, R. W. Dutton and S. L. Swain (2009). "IL-10 deficiency unleashes an influenza-specific Th17 response and enhances survival against high-dose challenge." J Immunol **182**(12): 7353-7363.

Miyamoto, M., O. Prause, M. Sjostrand, M. Laan, J. Lotvall and A. Linden (2003). "Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways." J Immunol **170**(9): 4665-4672.

Plante, M., T. Jones, F. Allard, K. Torossian, J. Gauthier, N. St-Felix, G. L. White, G. H. Lowell and D. S. Burt (2001). "Nasal immunization with subunit proteosome influenza vaccines induces serum HAI, mucosal IgA and protection against influenza challenge." Vaccine **20**(1-2): 218-225.

Prause, O., M. Laan, J. Lotvall and A. Linden (2003). "Pharmacological modulation of interleukin-17-induced GCP-2-, GRO-alpha- and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells." Eur J Pharmacol **462**(1-3): 193-198.

Re, F. and J. L. Strominger (2001). "Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells." J Biol Chem **276**(40): 37692-37699.

Rudner, X. L., K. I. Happel, E. A. Young and J. E. Shellito (2007). "Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection." Infect Immun **75**(6): 3055-3061.

Schumann, J., U. Muller and M. Blessing (2012). "TGF-beta signaling in T cells is not essential for Th17 cell development in the mouse." J Biol Regul Homeost Agents **26**(3): 357-366.

Singleton, T. E., P. Massari and L. M. Wetzler (2005). "Neisserial porin-induced dendritic cell activation is MyD88 and TLR2 dependent." J Immunol **174**(6): 3545-3550.

Smith, E., A. Zarbock, M. A. Stark, T. L. Burcin, A. C. Bruce, P. Foley and K. Ley (2007). "IL-23 is required for neutrophil homeostasis in normal and neutrophilic mice." J Immunol **179**(12): 8274-8279.

Stark, M. A., Y. Huo, T. L. Burcin, M. A. Morris, T. S. Olson and K. Ley (2005). "Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17." Immunity **22**(3): 285-294.

Stritesky, G. L., N. Yeh and M. H. Kaplan (2008). "IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage." J Immunol **181**(9): 5948-5955.

Toy, D., D. Kugler, M. Wolfson, T. Vanden Bos, J. Gurgel, J. Derry, J. Tocker and J. Peschon (2006). "Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex." J Immunol **177**(1): 36-39.

Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley and B. Stockinger (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity **24**(2): 179-189.

Waffarn, E. E. and N. Baumgarth (2011). "Protective B cell responses to flu--no fluke!" J Immunol **186**(7): 3823-3829.

Waibler, Z., U. Kalinke, J. Will, M. H. Juan, J. M. Pfeilschifter and H. H. Radeke (2007). "TLR-ligand stimulated interleukin-23 subunit expression and assembly is regulated differentially in murine plasmacytoid and myeloid dendritic cells." Mol Immunol **44**(7): 1483-1489.

Wu, Q., R. J. Martin, J. G. Rino, R. Breed, R. M. Torres and H. W. Chu (2007). "IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection." Microbes Infect **9**(1): 78-86.

Yao, Z., W. C. Fanslow, M. F. Seldin, A. M. Rousseau, S. L. Painter, M. R. Comeau, J. I. Cohen and M. K. Spriggs (1995). "Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor." Immunity **3**(6): 811-821.

Zheng, S. G. (2013). "Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive?" Am J Clin Exp Immunol **2**(1): 94-106.

Zygmunt, B. M., F. Rharbaoui, L. Groebe and C. A. Guzman (2009). "Intranasal immunization promotes th17 immune responses." J Immunol **183**(11): 6933-6938.

1.8. Figure Legends

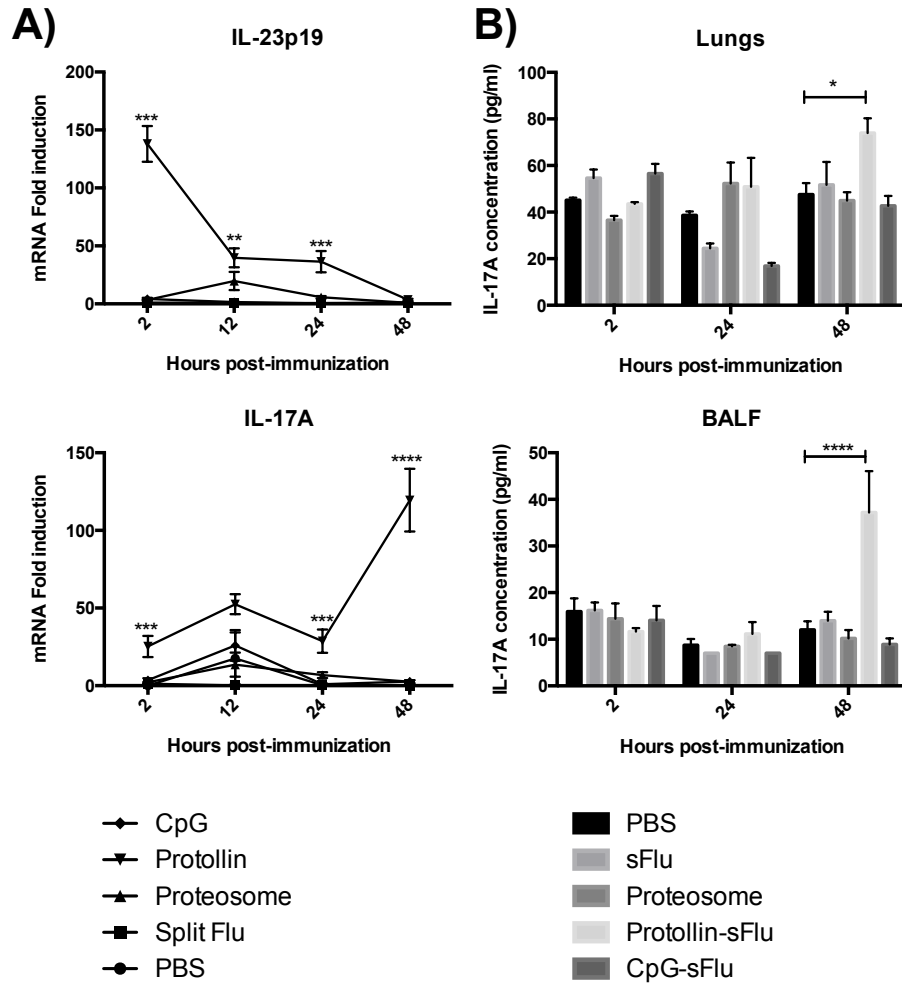


FIGURE 1. Increased IL-23p19 expression and IL-17A production in lungs and BALF from Protollin-immunized mice. BALB/c mice ($n=3/\text{group}/\text{time point}$) were immunized intranasally for 2, 12, 24 or 48 hours with either PBS, sFlu, Proteosome, Protollin-sFlu and CpG-sFlu. A, Perfused lungs were removed and total RNA was extracted and reverse transcribed. Quantitative RT-PCR was performed using primers specific for IL-23p19 and IL-17A. The fold-induction of these genes is relative to the expression in naïve mice and mRNA content of all samples is normalized to GAPDH. B, IL-17A content in lungs and BALF was assayed by ELISA. Statistical analyses were performed with a two-way ANOVA and Bonferroni correction (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

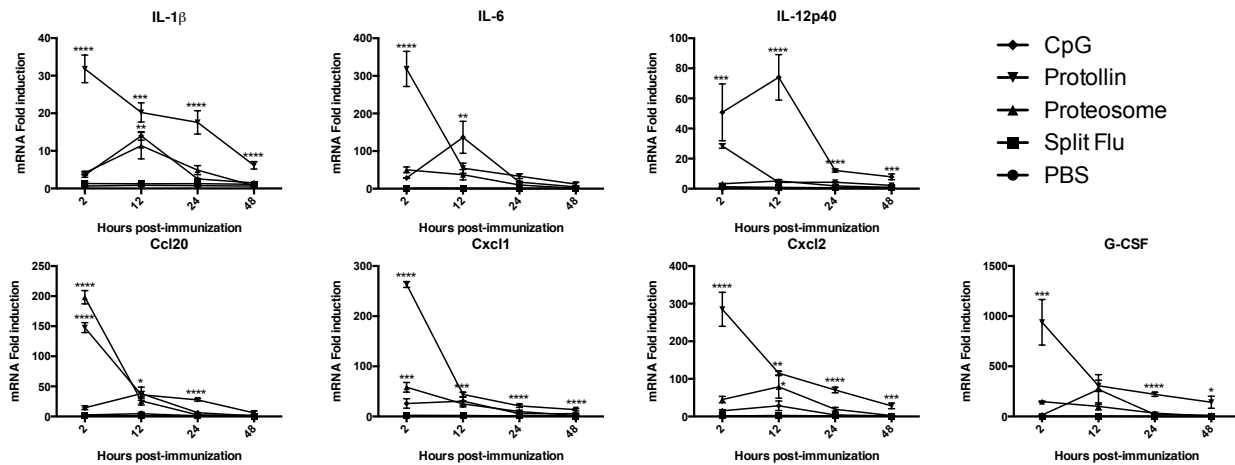


FIGURE 2. Proteosome-based adjuvants vaccination increases IL-1 β , IL-6, CXCL1, CXCL2, CCL20 and G-CSF expression. BALB/c mice (n=3/group/time point) were immunized for 2, 12, 24 or 48 hours with either PBS, sFlu, Proteosome, Protollin-sFlu and CpG-sFlu. IL-1 β , IL-6, IL-12p40, CXCL1, CXCL2, CCL20 and G-CSF expression was determined by real time-PCR. The fold-induction of these genes is relative to the expression in naïve mice and mRNA content of all samples is normalized to GAPDH. Statistical analyses were performed with a two-way ANOVA and Bonferroni correction (**p \leq 0.01, ***p \leq 0.001, ****p \leq 0.0001).

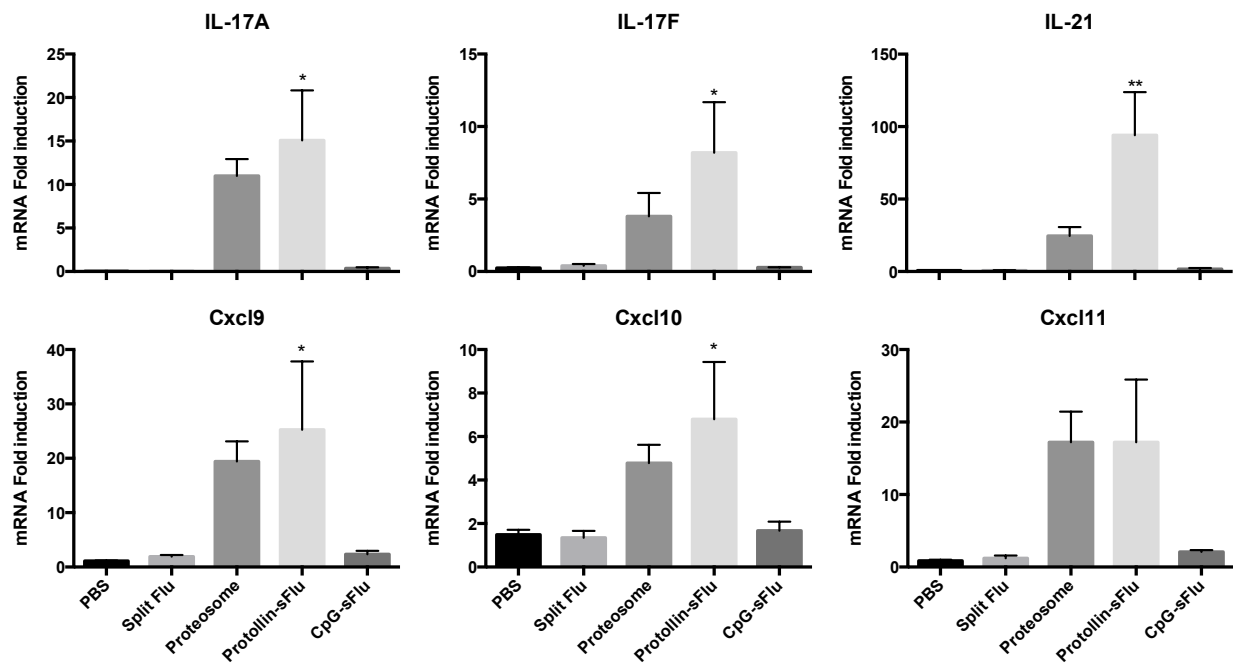


FIGURE 3. Proteosome-based adjuvants vaccination increases IL-17A, IL-17F, IL-21, CXCL9, CXCL10 and CXCL11 expression. BALB/c mice (n=4/group) were immunized at day 0 and boosted at day 14 with either PBS, sFlu, Proteosome, Protollin-sFlu and CpG-sFlu. Twenty-one day post-immunisation, perfused lungs were removed and total RNA was extracted and reverse transcribed. IL-17A, IL-17F, IL-21, CXCL9, CXCL10 and CXCL11 expression was determined by real time-PCR. The fold-induction of these genes is relative to the expression in naïve mice and mRNA content of all samples is normalized to GAPDH. Statistical analyses were performed with a two-way ANOVA and Bonferroni correction ($p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$).

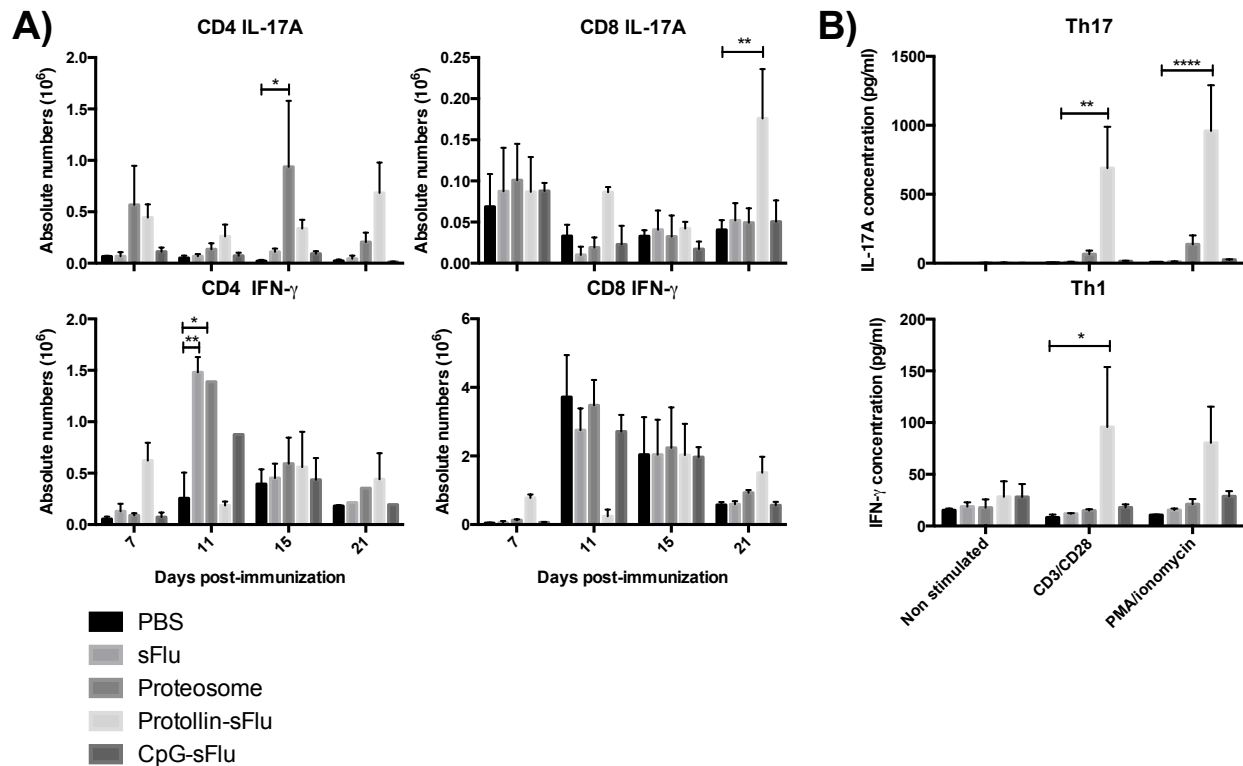


FIGURE 4. Proteosome-based adjuvants induce the differentiation of Th17 cells in lungs. BALB/c mice (n=4/group/time point) were immunized for 7, 11, 15 and 21 days with either PBS, sFlu, Proteosome, Protollin-sFlu and CpG-sFlu. Lungs were mechanically disrupted and total cell counts were performed. A) Cells were restimulated with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (500ng/ml), and monensin (1 μ M) for 5 hours. Fc-receptors were blocked with anti-mouse CD16/CD32 and cells were stained for both CD4 and CD8. Intracellular staining for IL-17A and IFN- γ was performed as Ebioscience procedure. B) After 21 days, cell stimulations were performed for 6 hours at 37 $^{\circ}$ C with PMA (50ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml). Otherwise, cells were stimulated with pre-coated anti-CD3 mAb (5 μ g/ml) and soluble anti-CD28 mAb (10 μ g/ml). Unstimulated lung cell cultures were included as controls. After incubation, supernatants were collected and assayed by ELISA. Statistical analyses were performed with a two-way ANOVA and Bonferroni correction (*p \leq 0.05, **p \leq 0.01).

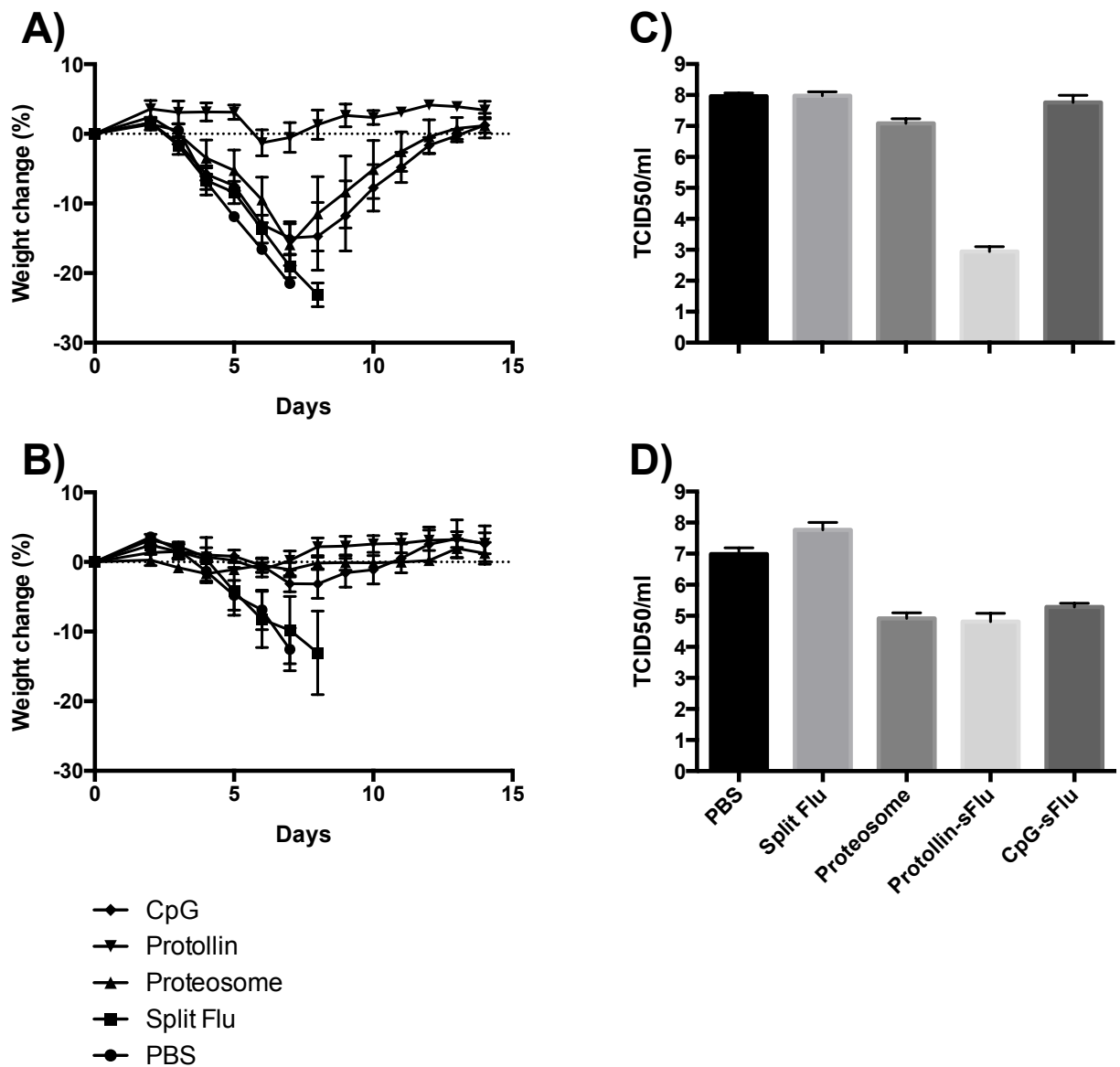


FIGURE 5. The protection induced by the Proteosome-based adjuvant is independent of IL-17A and IL-17F. BALB/c (A) and IL-17A/FKO (B) mice (n=8/group) were immunized at day 0 and 14 with either PBS, sFlu, Proteosome, Protollin-sFlu and CpG-sFlu. On day 28 p.i., these mice were infected with influenza and weighed daily to assess morbidity. The values displayed represent the daily weight relative to the weight on day of infection (i.e., starting weight). Pulmonary virus titers were assessed by determining TCID₅₀ in Madin-Darby canine kidney cell cultures (as described in the Materials and Methods).

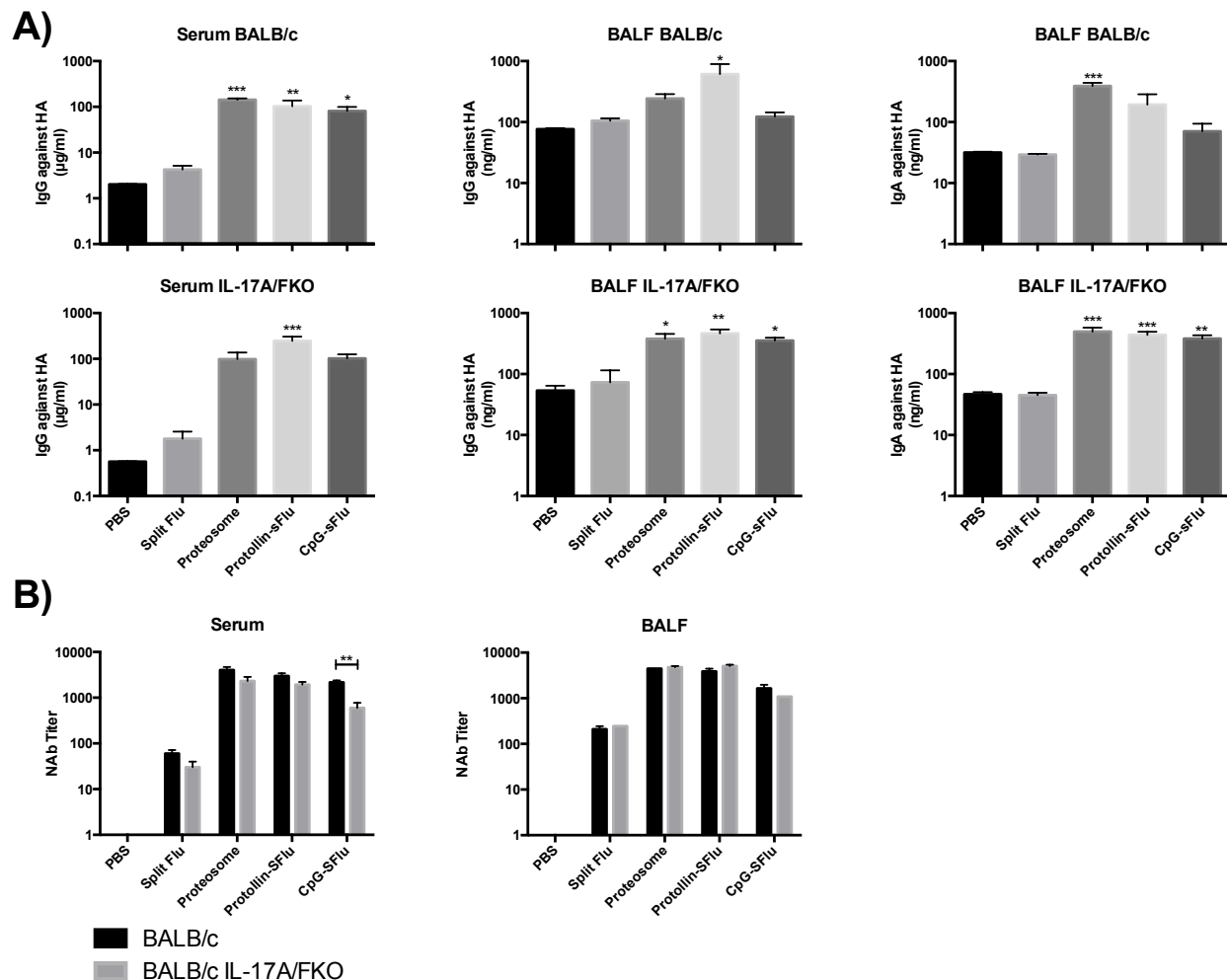


FIGURE 6. Systemic and mucosal anti-HA responses elicited by intranasal administration of Proteosome and Protollin are similar to those elicited by CpG vaccine. BALB/c and IL-17A/FKO mice (n=4/group) were immunized on day 0 and boost on day 14 with either PBS, sFlu, Proteosome, Protollin-sFlu and CpG-sFlu. After 21 days, serum and BALF were collected. Serum IgG and BALF IgG and IgA titers were measured by ELISA (A) and neutralization assay was performed (B). Mean concentration of each group is shown and expressed as $\mu\text{g/ml}$ for serum and ng/ml for BALF. Statistical analyses were performed with a two-way ANOVA and Bonferroni correction (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

1.9. Tables

TABLE I. Primers use for real time-PCR analyses

	GenBank Accession	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
GAPDH	NM_008084	CATGTTCCAGTATGACTCCACTC	GGCCTCACCCCATTTGATGT
IL-1 β	NM_008361	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-6	NM_031168	TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC	TTGGTCTTAGCCACTCCTTC
IL-12p40	NM_008352	AGACATGGAGTCATAGGCTCTG	CCATTTTCCTTCTTGTGGAGCA
IL-17A	NM_010552	TTTAACTCCCTTGGCGCAAAA	CTTTCCTCGCGATTGACAC
IL-17F	NM_145856	TGCTACTGTTGATGTTGGGAC	AATGCCCTGGTTTTGGTTGAA
IL-21	NM_021782	GGACCCTTGTCTGTCTGGTAG	TGTGGAGCTGATAGAAGTTCAGG
CCL20	NM_001159738	GCCTCTCGTACATACAGACGC	CCAGTTCTGCTTTGGATCAGC
CXCL1	NM_008176	CTGGGATTCACCTCAAGAACATC	CAGGGTCAAGGCAAGCCTC
CXCL2	NM_009140	CCAACCACCAGGCTACAGG	GCGTCACACTCAAGCTCTG
CXCL9	NM_008599	GGCACGATCCACTACAAATCC	GGTTTGATCTCCGTTCTTCAGT
CXCL10	NM_021274	CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC	GGCTCGCAGGGATGATTCAA
CXCL11	NM_019494	GGTCACAGCCATAGCCCTG	AGCCTTCATAGTAACAATCACTCAAC
G-CSF	NM_009971	ATGGCTCAACTTTCTGCCAG	CTGACAGTGACCAGGGGAAC

2. Publication No 2

Critical role of IL-17A and IL-17F in innate immune response during influenza infection

Running title:

Benoît Bélanger* and Claude Daniel*

* Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, CA

Correspondence should be addressed to Dr. Claude Daniel; Phone: (450) 687-5010; Fax: (450) 686-5301; Email: claudedaniel@iaf.inrs.ca

2.1. Résumé

Le virus de l'influenza est l'agent étiologique causant une maladie respiratoire aiguë hautement contagieuse qui provoque des épidémies et de la mortalité considérable chaque année. L'IL-17A est connu pour jouer un rôle critique dans la réponse immunitaire pulmonaire contre les bactéries extracellulaires et les champignons. Il y a de plus en plus d'évidence que l'IL-17 est impliqué dans la protection immunitaire contre le virus de l'influenza. Dans cette étude, nous avons montré que les souris déficientes en IL-17A et en IL-17F ont une plus faible morbidité ainsi qu'un taux de survie plus élevé que les souris BALB/c ou BALB/c IL-17AKO. De plus, les souris naïves IL-17A/FKO ont une augmentation de l'expression de l'IFN- α et de l'IFN- β . En accord avec cette observation, la fréquence des cellules NK et des lymphocytes T $\gamma\delta$ sont augmentées en chez les souris IL-17A/FKO en comparaison à des souris BALB/c. Tous ces résultats montrent que l'IL-17A et l'IL-17F ont un rôle néfaste dans la protection contre le virus de l'influenza.

2.2. Abstract

Influenza virus is the etiological agent of highly contagious acute respiratory disease that causes epidemics and considerable mortality annually. IL-17 plays a critical role in mediating the immune responses against extracellular bacteria and fungi in the lung, although there is increasing evidence that IL-17 is involved in protective immunity against influenza virus infection. In this study, we show that mice deficient in IL-17A and IL-17F (IL-17A/F^{-/-}) have less morbidity and a better survival rate than BALB/c and BALB/c IL-17A deficient mice. Furthermore, naïve IL-17A/F^{-/-} mice have an upregulation in type I interferons. Consistent with this observation, the frequencies of NK cells and $\gamma\delta$ T cells are increased in IL-17A/F^{-/-} in comparison to BALB/c. Taken together, these findings demonstrate a detrimental role of IL-17A and IL-17F in the protection against an influenza virus infection.

2.3. Introduction

Influenza infections cause acute, contagious respiratory diseases. Despite the availability of vaccines and antiviral therapies, influenza virus infections cause considerable morbidity and mortality each year. It is estimated that during seasonal epidemics 10% of the world population is infected, resulting in 2 to 3 million severe cases and up to 500,000 deaths (WHO, 2014). The virus has to bind and enter the cell, and then deliver as RNA. The viral RNA that is present within infected cells is recognized as foreign by various PRR, which leads to the secretion of type I interferon (IFNs), pro-inflammatory cytokines, eicosanoids, and chemokines (Iwasaki *et al.*, 2014). Type 1 interferon, mainly IFN- α and IFN- β , are produced following influenza virus infection form a feedback loop by signalling through the IFN- α/β receptor and act in concert with PRR signalling to promote sustained production of pro-inflammatory cytokines such as TNF, IL-1 β , and IL-6 from lung-resident innate immune cells (Chan *et al.*, 2005, Kohlmeier *et al.*, 2009). These pro-inflammatory cytokines and PRR-mediated signals also prompt alveolar macrophages, DC, and epithelial cells to initiate a coordinated program of chemokine production following virus infection (Kohlmeier *et al.*, 2009). During a primary respiratory tract infection, the innate immune cells recruited to the lungs are predominantly neutrophils and NK cells.

Interleukin-17 (IL-17), produced by cells of both adaptive and innate immune systems, functions as a potent pro-inflammatory cytokine and plays a role in both chronic autoimmune pathogenesis and host defenses against diverse pulmonary pathogens (O'Quinn *et al.*, 2008, X. Wang *et al.*, 2011). In the lungs, $\gamma\delta$ T cells have been demonstrated to be the major source of early IL-17A production in response to some infections (Okamoto Yoshida *et al.*, 2010, Price *et al.*, 2012). Previous studies have demonstrated that IL-17 plays a beneficial role in infections by various pathogens, including *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* and vaccine virus (Happel *et al.*, 2005, Khader *et al.*, 2007, Kohyama *et al.*, 2007). The involvement of IL-17 in protection against influenza virus infection has also been reported. Studies *in vivo* have demonstrated that IL-17A can protect mice against a lethal infection with both A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) and A/Alaska/6/77 (H3N2) influenza viruses, which are accompanied by enhanced early infiltration from neutrophils into the lungs (H. Hamada *et al.*, 2009). Other studies using IL-10 knockout mice have also demonstrated that IL-17A can protect naive mice against a lethal dose of A/Puerto Rico/8/34 via unique mechanisms other than Th1-mediated protection (McKinstry *et al.*, 2009). However, previous studies on IL-17A transgenic mice and IL-17 receptor KO mice also reported that IL-17A may act as a “double-edged sword” and

contributes to pulmonary immunopathology (Crowe *et al.*, 2009, Park *et al.*, 2005). Elevated IL-17A serum levels have also been found in patients with pandemic H1N1 severe influenza infections, which may potentiate lungs inflammation and its fatal consequence (Bermejo-Martin *et al.*, 2009). All of these studies highlight the need for further investigations to clarify the role of IL-17A and IL-17F during influenza virus infection.

2.4. Materials and Methods

Animals

6- to 8-week-old female BALB/c (H-2^d) mice were purchased from Charles River (St-Constant, QC, CA). Same aged BALB/c IL-17A^{-/-} and BALB/c IL-17A/F^{-/-} (H-2^d) mice were kindly provided by Dr Yoichiro Iwakura (Tokyo University, Tokyo, Japan) and used for infection procedure. Animals were kept in our own pathogen-free facilities and experiments were all performed according to Canadian Council on Animal Care guidelines after approval by institutional ethics committee.

Animal procedures and sample collection

Animals from each group were infected by i.n. instillation with five LD₅₀ of mouse-adapted influenza virus A/New Caledonia/20/99 (H1N1), (kindly provided by Dr Ioanna Skountzou, Emory University, Atlanta, USA) to assess protection. Mice were weighed before challenge, and every days after challenge. Mice losing ≥20% of their pre-challenge body weight or showing a smaller weight loss (≤20%) in conjunction with other clinical signs of distress and morbidity (e.g. pilo-erection, hunched posture, reduced mobility) were deemed to have met experimental endpoint criteria and were euthanized. At different times post-infection, mice were euthanized by exsanguination under ketamine/xylazine/acepromazine anesthesia. Lungs were recovered, submerged in DMEM 5% FBS and kept at -80°C until processed for viral titration.

Flow cytometry

Prior to retrieval, lungs were perfused through pulmonary artery with 1 ml PBS containing 5 mM EDTA. This procedure was repeated three- to four times until lungs turned completely white. Single cell suspensions were obtained from mechanical disruption and filtration through a 40µM mesh. Cells were treated with rat anti-mouse CD16/CD32 mAbs (93; eBioscience) in staining buffer (PBS containing 1% BSA and 0.02% sodium azide) to block FcR binding and then stained with APC rat anti-mouse CD4 (Gk1.5; eBioscience), PerCP rat anti-mouse CD8a (53-6.7, BD Pharmingen), APC rat anti-mouse γδ TCR (eBioGL3), PerCP-Cy5.5 rat anti-mouse CD11c (N418), FITC rat anti-mouse Ly6G (Gr-1) (RB6-8C5), PE rat anti-mouse CD11b (M1/70) APC rat anti-mouse CD19 (MB19-1) and FITC rat anti-mouse CD49b (DX5). The cells were analyzed on a Fortessa Flow cytometer (Becton Dickinson) and analysis was performed using FlowJo software (TreeStar).

Viral titration

Determination of influenza viral titers in viral stocks and in lungs homogenates was accomplished by the tissue culture infectious dose 50% assay (TCID₅₀) with titers expressed as the reciprocal of the dilution of the lungs extract or viral stock that corresponds to 50% virus growth in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, calculated by the Reed-Muench method (Cottey *et al.*, 2001).

RNA extraction, cDNA synthesis

RNA was extracted from lungs in Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and chloroform, followed by purification with the RNeasy kit (Qiagen, Mississauga, ON). For cDNA synthesis, DNases-digested RNA was primed with Hexanucleotides (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and reverse transcribed with SuperscriptIII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative PCR

qPCR was performed with a PerfeCTa™ SYBR Green Supermix, low ROX kit (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA) using the Mx3000P QPCR system (Stratagene, LaJolla CA, USA). Primers sequences were retrieved on PrimerBank and synthesized at Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA). The primers used in these experiments are listed in Table I. PCR conditions consisted of 40 cycles of denaturation at 95°C for 10s, annealing at 60°C for 15s, and elongation at 72°C for 20s. The relative induction of cytokines and chemokines mRNA expression was quantified using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and was normalized to GAPDH expression.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v6.0d with either a one-way ANOVA analysis and a Bonferroni post-test to respectively compare all pairs of columns or compare columns to control value. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

2.5. Results and discussion

Decreased morbidity and mortality among IL-17A/F^{-/-}

To examine the effect of IL-17A and IL-17F during influenza virus infection, we have challenged IL-17A^{-/-} and IL-17A/F^{-/-} mice and control mice (BALB/c) with 5 LD₅₀ of A/New Caledonia/20/99. Following viral challenge, we observed that IL-17A/FKO mice experienced a reduced weight loss throughout the course of infection (Figure 1A). This correlated well with higher survival rates among IL-17A/F knockout mice (Figure 1B). In contrast, weight loss and survival of IL-17A^{-/-} mice were similar to control, wild-type BALB/c mice (Figure 1A and B). In order to rule out the possibility that reduced viral replication was responsible for the lower morbidity and mortality observed in IL-17A/F^{-/-} mice, viral titers in lungs were evaluated at day 2 and 6 post-infection. Surprisingly, the IL-17A^{-/-} mice have a trend toward a lower viral burden at day 2 and 6 p.i. Nevertheless, the IL-17A/F^{-/-} mice have a viral burden similar to BALB/c mice, with a trend toward a decrease at day 6 p.i. (Figure 1C). Taken together, the data show that IL-17A/F^{-/-} mice are able to better tolerate an influenza virus challenge, because they ultimately recover from the challenge. This also suggests that these mice have decreased immunopathology that would correlate with the phenotype observed.

NK cells and $\gamma\delta$ T cells were increased in IL-17A/F^{-/-} mice following viral infection

IL-17A and IL-17F are responsible for the induction of several granulopoietic factors and chemokines that can result in an influx of neutrophils (Witowski *et al.*, 2000, Ye *et al.*, 2001b). Examination of the cells recovered from the lungs of IL-17A/F^{-/-} mice revealed an increase in the number of $\gamma\delta$ T cells and NK cells, at days 2 and 6 post-infection. In IL-17A^{-/-} mice, a significant increase in the number of $\gamma\delta$ T cells and NK cells was only observed at day 6 post-infection (Figure 2). This increase in $\gamma\delta$ T cell recruitment can be explained by the fact that IL-17A and IL-17F regulate the expression of certain cytokines/chemokines that could have an impact on $\gamma\delta$ T cell migration. It has been demonstrated that expression of CXCL1, CXCL2, IFN- γ , IL-1 β , IL-6 and TNF was increased in the colons of mice deficient in IL-17A and/or IL-17F infected with *Clostridium rodentium* (Glatzel *et al.*, 2002, Ishigame *et al.*, 2009). Through the direct killing of virus-infected cells and the production of antiviral cytokines, $\gamma\delta$ T cells can control infection by different strains of influenza virus, such as human seasonal H1N1, pandemic H1N1, and the avian H5N1 and H9N2 (Tu *et al.*, 2011, J. Zheng *et al.*, 2013). In addition to their cytotoxic capacities, $\gamma\delta$ T cells are able to secrete dozens of potent soluble pro-inflammatory molecules

and directly attack infectious pathogens (J. Zheng *et al.*, 2013). Moreover, a depletion of NK cells, in BALB/c and C57BL/6, or a deficiency in NCR-1 increase the morbidity and the mortality to influenza infection (McGill *et al.*, 2009). This augmentation in the number of $\gamma\delta$ T and NK cells may explain why IL-17A/F^{-/-} mice have better survival and less morbidity than wild-type mice. In contrast to other studies (Crowe *et al.*, 2009, Yu *et al.*, 2007) using IL-17A and IL-17RA deficient mice, we did not observe any decrease in neutrophils recruitment in the lungs (Figure 2). It has been shown that inhibition of neutrophil recruitment to the lung following influenza virus infection had no effect on the course of infection, suggesting that these cells do not play an essential role in virus clearance (Kohlmeier *et al.*, 2009). Moreover, no differences were observed in the number of CD4 and CD8 lymphocytes, nor macrophages in mice deficient in IL-17A or in IL-17A and IL-17F in comparison to intact BALB/c mice.

Mice deficient in IL-17A and IL-17F have a natural antiviral state

Given this better protection and decrease in morbidity, we sought to measure the expression of inflammatory cytokines in the lung. We compared the expression of pro-inflammatory cytokines (IFN- α 2, IFN- β 1, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-17F and TNF) in IL-17A- and IL-17A/F- deficient mice with wild-type mice (BALB/c). The main antiviral cytokines, IFN- α 2 and IFN- β 1, were drastically upregulated in naive IL-17A/FKO (Figure 3D). Studies conducted in mice clearly indicate that in the absence of type I IFNs, viral replication and severity of the disease are increased (Garcia-Sastre, 2011). Type I IFNs are critical for limiting viral replication and thereby ensuring the survival of the host (Hale *et al.*, 2010, Iwasaki *et al.*, 2014). Some studies have demonstrated that type I IFNs enhance the ability of NK cells to kill target cells (C. K. Lee *et al.*, 2000, Nguyen *et al.*, 2002). Moreover, type I IFNs promotes the accumulation and/or survival of proliferating NK cells (Nguyen *et al.*, 2002) and $\gamma\delta$ T cells (Watanabe *et al.*, 2006). This suggests that IL-17A/FKO mice have a better antiviral environment before the infection that allows mice to clear more easily the infection. This upregulation in type I IFNs could induce more pro-inflammatory cytokines such as TNF, IL-1 β , and IL-6 from lung-resident innate immune cells (Iwasaki *et al.*, 2014). Furthermore, TNF and IL-1 β , both of which can be produced by neutrophils and NK cells in influenza virus infection, trend toward an increase in IL-17A^{-/-} (Figure 3B) and IL-17A/F^{-/-} (Figure 3E) infected mice. One potential explanation for these higher levels of TNF is that NK cells, which number is increased in deficient mice, are one source of TNF (R. Wang *et al.*, 2012). Moreover, neutrophils also produce TNF and IL-1 β (Gatti *et al.*, 1993, Iwasaki *et al.*, 2014, Parsey *et al.*, 1998) and the fact that no difference was observed in the number of cells between wild-type and deficient mice could also explain the better expression of

these cytokines in deficient mice. However, IL-6 (Figure 3) was comparable in knockout mice and in wild-type mice, with or without influenza infection.

IL-17AKO mice showed an upregulation of IL-17F expression, at day 2 post-infection, which returned to levels comparable to infected BALB/c mice at day 6 p.i. (Figure 3B, C). A study has already demonstrated that a deficiency in IL-17A induces the production of IL-17F (von Vietinghoff *et al.*, 2009). This higher production of IL-17F has not been well-characterized. Further studies are necessary to elucidate the roles of IL-17F during influenza infection.

In conclusion, our *in vivo* studies in IL-17A/F deficient mice demonstrated that IL-17A and IL-17F have a detrimental role during influenza virus infection. Our data also show that naive IL-17A/FKO mice have an increase in the expression of type I IFN, which could potentially allow deficient mice to recruit more $\gamma\delta$ T cells and NK cells in the lung before and during influenza virus infection.

2.6. References

Bermejo-Martin, J. F., R. Ortiz de Lejarazu, T. Pumarola, J. Rello, R. Almansa, P. Ramirez, I. Martin-Loeches, D. Varillas, M. C. Gallegos, C. Seron, D. Micheloud, J. M. Gomez, A. Tenorio-Abreu, M. J. Ramos, M. L. Molina, S. Huidobro, E. Sanchez, M. Gordon, V. Fernandez, A. Del Castillo, M. A. Marcos, B. Villanueva, C. J. Lopez, M. Rodriguez-Dominguez, J. C. Galan, R. Canton, A. Lieter, S. Rojo, J. M. Eiros, C. Hinojosa, I. Gonzalez, N. Torner, D. Banner, A. Leon, P. Cuesta, T. Rowe and D. J. Kelvin (2009). "Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza." *Crit Care* **13**(6): R201.

Chan, M. C., C. Y. Cheung, W. H. Chui, S. W. Tsao, J. M. Nicholls, Y. O. Chan, R. W. Chan, H. T. Long, L. L. Poon, Y. Guan and J. S. Peiris (2005). "Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells." *Respir Res* **6**: 135.

Cotter, R., C. A. Rowe and B. S. Bender (2001). "Influenza virus." *Curr Protoc Immunol* **Chapter 19**: Unit 19 11.

Crowe, C. R., K. Chen, D. A. Pociask, J. F. Alcorn, C. Krivich, R. I. Enelow, T. M. Ross, J. L. Witztum and J. K. Kolls (2009). "Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection." *J Immunol* **183**(8): 5301-5310.

Garcia-Sastre, A. (2011). "Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses." *Virus Res* **162**(1-2): 12-18.

Gatti, S., R. Faggioni, B. Echtenacher and P. Ghezzi (1993). "Role of tumour necrosis factor and reactive oxygen intermediates in lipopolysaccharide-induced pulmonary oedema and lethality." *Clin Exp Immunol* **91**(3): 456-461.

Hale, B. G., R. A. Albrecht and A. Garcia-Sastre (2010). "Innate immune evasion strategies of influenza viruses." *Future Microbiol* **5**(1): 23-41.

Hamada, H., L. Garcia-Hernandez Mde, J. B. Reome, S. K. Misra, T. M. Strutt, K. K. McKinstry, A. M. Cooper, S. L. Swain and R. W. Dutton (2009). "Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge." *J Immunol* **182**(6): 3469-3481.

Happel, K. I., P. J. Dubin, M. Zheng, N. Ghilardi, C. Lockhart, L. J. Quinton, A. R. Odden, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson and J. K. Kolls (2005). "Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*." *J Exp Med* **202**(6): 761-769.

Iwasaki, A. and P. S. Pillai (2014). "Innate immunity to influenza virus infection." *Nat Rev Immunol* **14**(5): 315-328.

Khader, S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, R. M. Locksley, L. Haynes, T. D. Randall and A. M. Cooper (2007). "IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge." *Nat Immunol* **8**(4): 369-377.

Kohlmeier, J. E. and D. L. Woodland (2009). "Immunity to respiratory viruses." *Annu Rev Immunol* **27**: 61-82.

Kohyama, S., S. Ohno, A. Isoda, O. Moriya, M. L. Belladonna, H. Hayashi, Y. Iwakura, T. Yoshimoto, T. Akatsuka and M. Matsui (2007). "IL-23 enhances host defense against vaccinia virus infection via a mechanism partly involving IL-17." J Immunol **179**(6): 3917-3925.

Lee, C. K., D. T. Rao, R. Gertner, R. Gimeno, A. B. Frey and D. E. Levy (2000). "Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function." J Immunol **165**(7): 3571-3577.

McGill, J., J. W. Heusel and K. L. Legge (2009). "Innate immune control and regulation of influenza virus infections." J Leukoc Biol **86**(4): 803-812.

McKinstry, K. K., T. M. Strutt, A. Buck, J. D. Curtis, J. P. Dibble, G. Huston, M. Tighe, H. Hamada, S. Sell, R. W. Dutton and S. L. Swain (2009). "IL-10 deficiency unleashes an influenza-specific Th17 response and enhances survival against high-dose challenge." J Immunol **182**(12): 7353-7363.

Nguyen, K. B., T. P. Salazar-Mather, M. Y. Dalod, J. B. Van Deusen, X. Q. Wei, F. Y. Liew, M. A. Caligiuri, J. E. Durbin and C. A. Biron (2002). "Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection." J Immunol **169**(8): 4279-4287.

O'Quinn, D. B., M. T. Palmer, Y. K. Lee and C. T. Weaver (2008). "Emergence of the Th17 pathway and its role in host defense." Adv Immunol **99**: 115-163.

Okamoto Yoshida, Y., M. Umemura, A. Yahagi, R. L. O'Brien, K. Ikuta, K. Kishihara, H. Hara, S. Nakae, Y. Iwakura and G. Matsuzaki (2010). "Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung." J Immunol **184**(8): 4414-4422.

Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.

Parsey, M. V., R. M. Tuder and E. Abraham (1998). "Neutrophils are major contributors to intraparenchymal lung IL-1 beta expression after hemorrhage and endotoxemia." J Immunol **160**(2): 1007-1013.

Price, A. E., R. L. Reinhardt, H. E. Liang and R. M. Locksley (2012). "Marking and quantifying IL-17A-producing cells in vivo." PLoS One **7**(6): e39750.

Tu, W., J. Zheng, Y. Liu, S. F. Sia, M. Liu, G. Qin, I. H. Ng, Z. Xiang, K. T. Lam, J. S. Peiris and Y. L. Lau (2011). "The aminobisphosphonate pamidronate controls influenza pathogenesis by expanding a gammadelta T cell population in humanized mice." J Exp Med **208**(7): 1511-1522.

von Vietinghoff, S. and K. Ley (2009). "IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice." J Immunol **183**(2): 865-873.

Wang, R., J. J. Jaw, N. C. Stutzman, Z. Zou and P. D. Sun (2012). "Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1." J Leukoc Biol **91**(2): 299-309.

Wang, X., C. C. Chan, M. Yang, J. Deng, V. K. Poon, V. H. Leung, K. H. Ko, J. Zhou, K. Y. Yuen, B. J. Zheng and L. Lu (2011). "A critical role of IL-17 in modulating the B-cell response during H5N1 influenza virus infection." Cell Mol Immunol **8**(6): 462-468.

Watanabe, N., M. Narita, A. Yokoyama, A. Sekiguchi, A. Saito, N. Tochiki, T. Furukawa, K. Toba, Y. Aizawa and M. Takahashi (2006). "Type I IFN-mediated enhancement of anti-leukemic cytotoxicity of gammadelta T cells expanded from peripheral blood cells by stimulation with zoledronate." Cytotherapy **8**(2): 118-129.

WHO (2014). "Influenza (Seasonal) Fact sheet N°211."

Witowski, J., K. Pawlaczyk, A. Breborowicz, A. Scheuren, M. Kuzlan-Pawlaczyk, J. Wisniewska, A. Polubinska, H. Friess, G. M. Gahl, U. Frei and A. Jorres (2000). "IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells." J Immunol **165**(10): 5814-5821.

Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon and J. K. Kolls (2001). "Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense." J Exp Med **194**(4): 519-527.

Yu, J. J., M. J. Ruddy, G. C. Wong, C. Sfintescu, P. J. Baker, J. B. Smith, R. T. Evans and S. L. Gaffen (2007). "An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals." Blood **109**(9): 3794-3802.

Zheng, J., Y. Liu, Y. L. Lau and W. Tu (2013). "gammadelta-T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity." Cell Mol Immunol **10**(1): 50-57.

2.7. Figure Legends

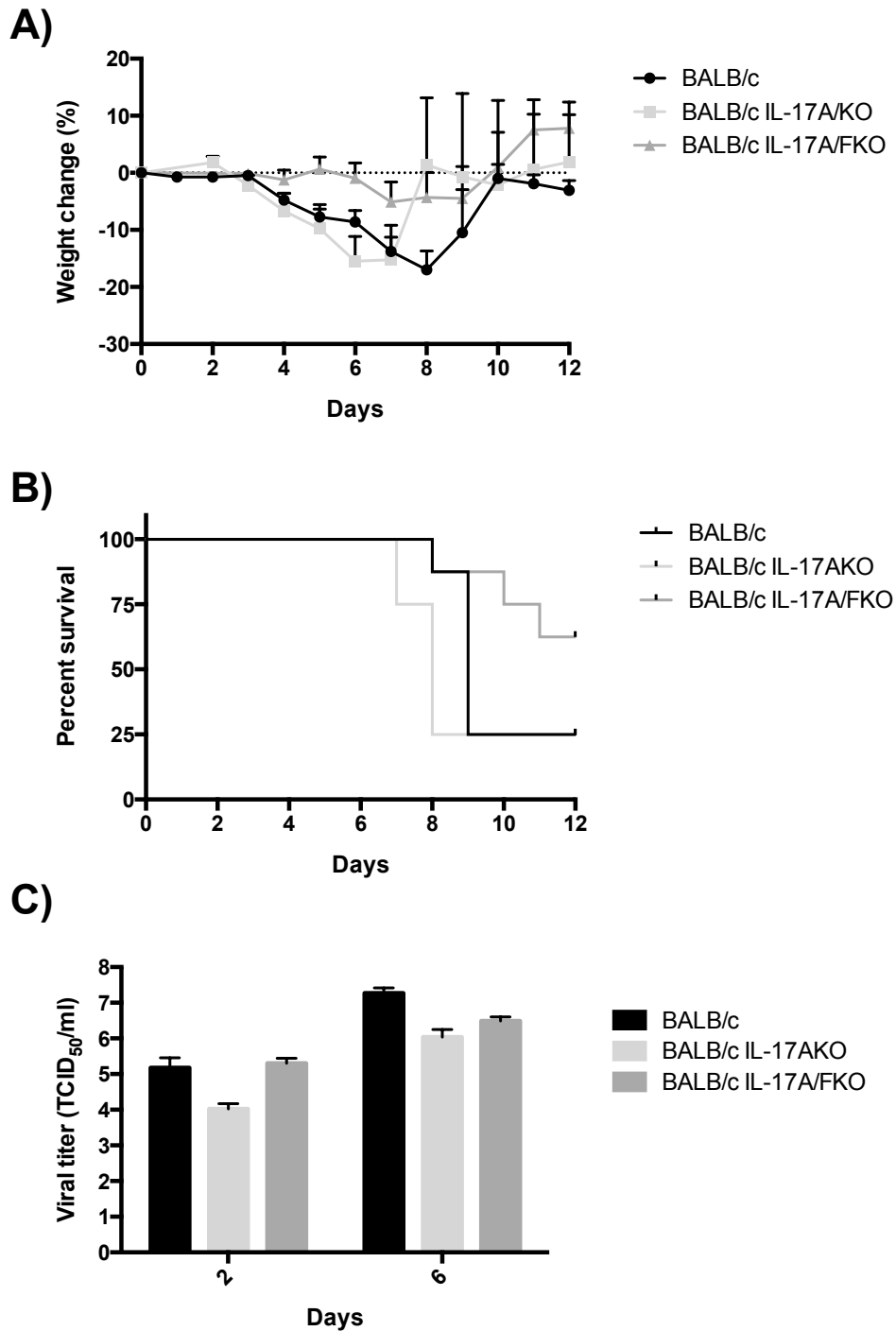


Figure 1: Weight loss and mortality following viral challenge with influenza A/New Caledonia/20/99. Weight loss (A) and mortality (B) were assessed daily following viral challenge (n=8/group). Viral burden was determined by viral titration in MCDK cells (C) (n=4/group/time point). Statistical analyses were performed with a two-way ANOVA and Bonferroni correction (*p≤0.05).

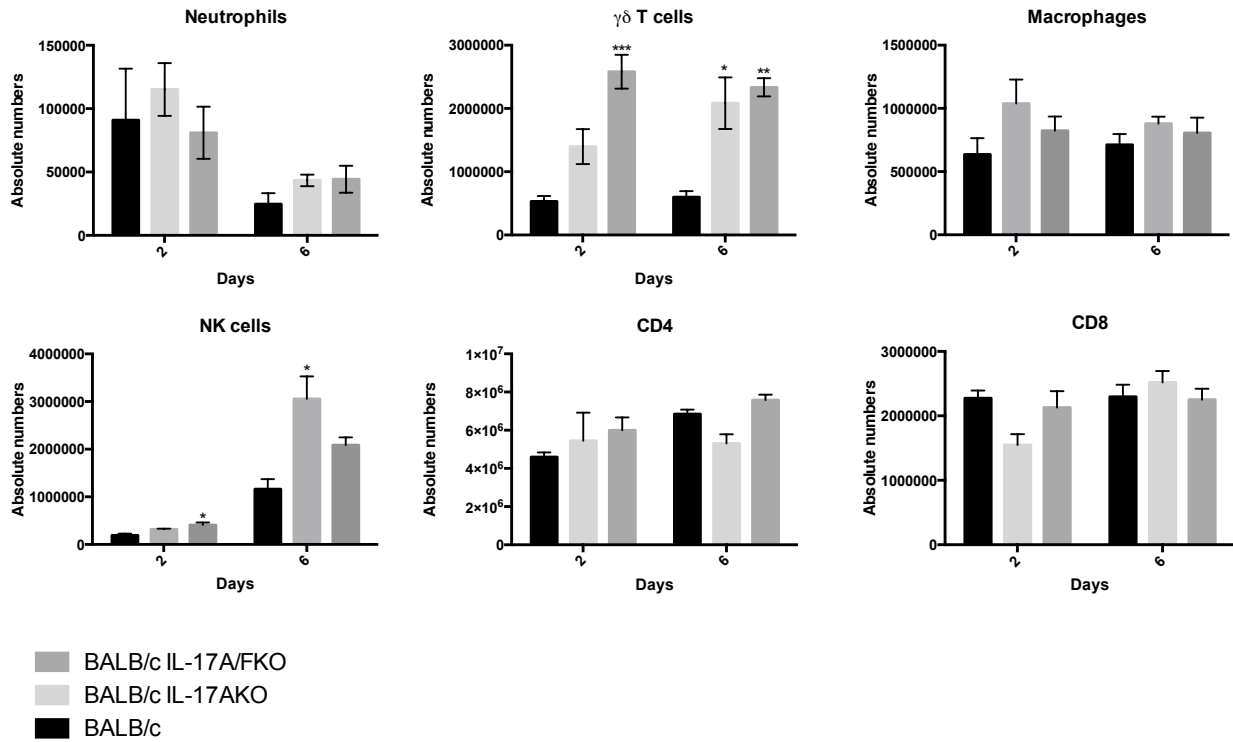


Figure 2: Differences in immune cells after a viral infection with influenza A/New Caledonia/20/99. IL-17A/F deficient mice show increases in the number of $\gamma\delta$ T cells and NK cells in lung homogenates compared to BALB/c controls, but no differences in neutrophils, macrophages or lymphocytes (n=4/group/time point). Statistical analyses were performed with a two-way ANOVA and Bonferroni correction (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

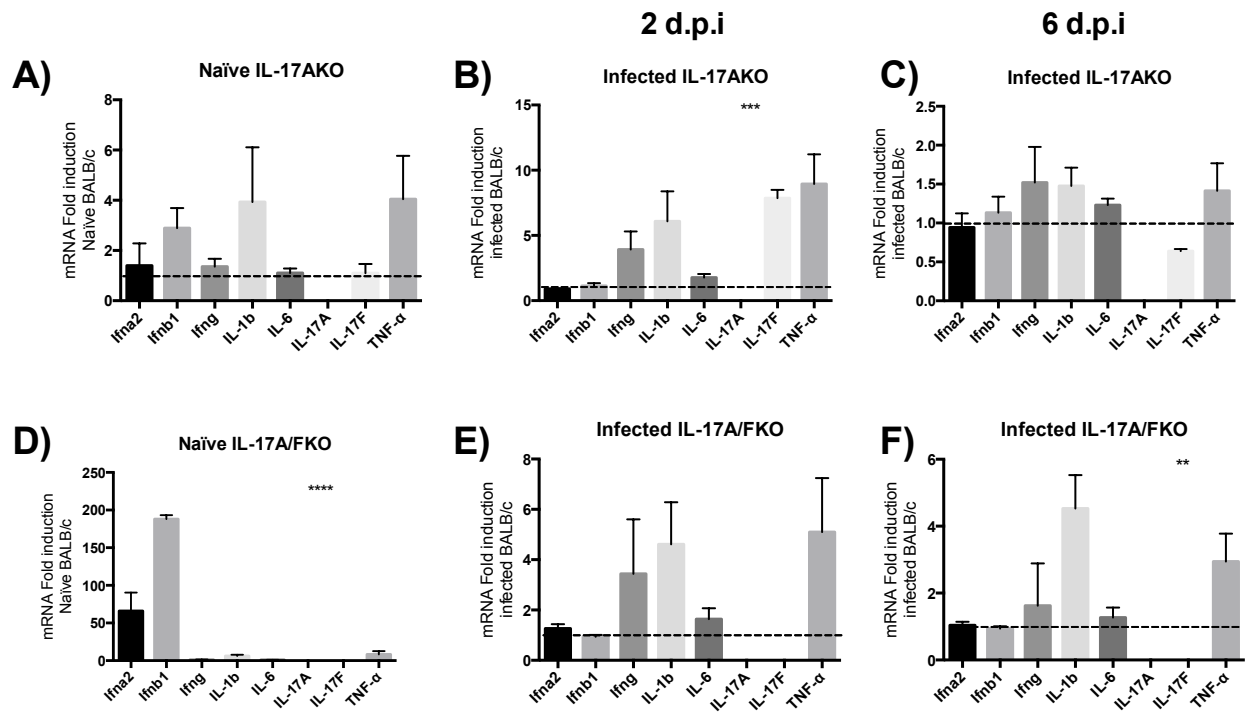


Figure 3: Cytokine response to influenza infection. The expression of cytokines mRNA was quantified at day 2 (B and E) and 6 (C and F) post-infection. We compared the expression of pro-inflammatory cytokines (IFN- α 2, IFN- β 1, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-17F and TNF) in IL-17A- and IL-17A/F- deficient mice with wild-type mice (BALB/c). Statistical analyses were performed with a two-way ANOVA and Bonferroni correction (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

2.8. Tables

Table I: Primers use for qPCR analyses

	GenBank Accession	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
GAPDH	NM_008084	CATGTTCCAGTATGACTCCACTC	GGCCTCACCCCATTTGATGT
IL-1 β	NM_008361	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-6	NM_031168	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
IL-17A	NM_010552	TTTAACTCCCTTGCGCAAAA	CTTCCCTCGCGATTGACAC
IL-17F	NM_145856	TGCTACTGTTGATGTTGGGAC	AATGCCCTGGTTTTGGTTGAA
IFN α 2	NM_010503	ATGAGGAGGCTCCCTTTCTCT	AGCCTTCTGGATCTGCTGGTT
IFN β 1	NM_010510	AGCTCCAAGAAAGGACGAACAG	CCCTGTAGGTGAGGTTGAT
IFN γ	NM_008337	ATGAAGGCTACACACTGCATC	CCATCCTTTTGCCAGTTCCTC
TNF- α	NM_013693	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
Influenza Matrix protein	CY125101	ATGCCCTTAATGGGAACGGG	ATGAGGCCCATACAACCTGGC

3. Résultats complémentaires

3.1. Introduction

Les premiers résultats présentés dans cette section font suite aux travaux sur le rôle de l'IL-17A et de l'IL-17F dans la protection induite par l'immunisation avec les adjuvants à base de Proteosome, c'est-à-dire le deuxième objectif de ma thèse. Les premiers travaux, faits avec les souris déficientes en IL-17A et en IL-17F, nous ont permis de démontrer que la protection est indépendante de ces deux cytokines. Ils ont aussi permis de montrer qu'une réponse en IgG et en IgA contre le HA est induite par les adjuvants à base de Proteosome. Puisque l'IL-17A et l'IL-17F sont connues pour avoir des rôles similaires dans la réponse immunitaire, nous avons voulu caractériser si l'absence d'une seule cytokine, soit IL-17A, avait aussi un impact sur la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome ainsi que sur la production d'anticorps. Nous avons quantifié l'expression de certaines cytokines et chimiokines, ayant un rôle dans l'action des cellules Th17, et ce, après l'immunisation avec les adjuvants à base de Proteosome chez les souris déficientes en IL-17A.

De plus, un autre de nos objectifs de recherche était de déterminer si une réponse de type Th17 était induite par les adjuvants à base de Proteosome. Nous avons démontré dans l'article « *Proteosome-adjuvanted intranasal influenza vaccines mediate Th17-independent protection against influenza* » que les adjuvants à base de Proteosome induisaient bien une réponse de type Th17. Pour y faire suite, nous avons donc voulu savoir si cette réponse était spécifique de l'antigène, soit l'hémagglutinine.

3.2. Matériel et méthodes

L'immunisation, l'infection ainsi que l'évaluation de la réponse en anticorps, de même que l'expression génique de certains gènes, chez les souris déficientes IL-17A, ont été effectuées de la même façon que celle décrite dans l'article précédent : « *Proteosome-adjuvanted intranasal influenza vaccines mediate Th17-independent protection against influenza* » .

3.2.1. Réponse humorale spécifique de l'antigène

Les souris ont été immunisées aux jours 0 et 14 avec PBS, Split Flu, Proteosome, Protollin-sFlu et CpG-sFlu. Au jour 21 post-immunisation, les poumons ont été perfusés, par l'artère pulmonaire, avec 1 ml de PBS contenant 5 mM d'EDTA. Une suspension cellulaire a été obtenue par broyage mécanique et par filtration sur filtres de 40 µm. Les cellules ont ensuite été lavées et mise en culture à une concentration de 1×10^6 cellules/ml dans du milieu complet (RPMI-1640, 10 % FCS, 1x glutamax, 50 g/ml gentamicine et 5×10^{-5} M 2-ME), en présence de cellules spléniques irradiées, préalablement chargées avec Proteosome (3 µg de HA) ou Split Flu et incubées durant 18 heures à 37 °C avec 5 % de CO₂. Après l'incubation, les surnageants ont été récoltés et le niveau de cytokines a été déterminé en utilisant les ensembles Ready-SET-Go ÉLISA pour l'IL-17A, pour l'IFN-γ et pour l'IL-4 (eBioscience, San Diego, CA, USA).

3.2.2 Cytométrie en flux

Les souris ont été immunisées aux jours 0 et 14 avec Proteosome. Au jour 21 post-immunisation, les poumons ont été perfusés, récoltés et une suspension cellulaire a été effectuée. Les cellules obtenues ont été traitées avec un anticorps monoclonal anti-CD16/CD32 de souris (clone 93, eBioscience) dans le tampon de marquage (PBS contenant 1 % de BSA et 0,02 % d'azide de sodium) afin de bloquer la liaison des récepteurs Fc. Ensuite, les cellules ont été marquées avec le tétramère HA 127-136 (SFERFEIFPKE) conjugué à APC ou avec un tétramère témoin (PVSKMRMATPLLMQA). Après un lavage, les cellules ont été mises en présence d'un anticorps monoclonal anti-CD3 (clone 145-2C11) de souris conjugué au FITC et d'un anticorps monoclonal anti-CD4 (clone GK1.5) conjugué au PE. La fluorescence a été détectée par un système BD LSR fortessa (Becton Dickinson, Oakville, Canada) et les données ont été analysées en utilisant FCS express 4 (DeNovo Software, Los Angeles, CA, USA).

3.3. Résultats

3.3.1. L'IL-17A n'a pas d'impact sur la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome ainsi que sur la production d'anticorps.

Afin d'observer si la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome était dépendante de l'IL-17A, nous avons infecté des souris déficientes en IL-17A (IL-17AKO) avec 5 LD₅₀ du virus de l'influenza A/New Caledonie/20/99 (H1N1) adapté à la souris. Les souris IL-17AKO immunisées avec les adjuvants à base de Proteosome ou CpG ont survécu l'infection expérimentale. De plus, une perte de poids plus faible a été observée chez les souris immunisées avec Proteosome, Protollin et CpG en comparaison aux souris témoins (Figure 7A). La protection observée chez les souris immunisées avec Proteosome et Protollin corrèle avec une diminution significative de la charge virale en comparaison aux souris témoins (Figure 7B). Nous avons aussi observé une faible diminution de la réplication virale chez les souris immunisées avec CpG, ce qui corrèle avec la diminution de perte de poids. Nos résultats nous permettent de conclure que la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome est indépendante de IL-17A.

Ensuite, nous avons voulu caractériser, par ÉLISA, la réponse en anticorps spécifique de HA induite 21 jours post-immunisation, dans le sérum et dans les lavages broncho-alvéolaires (BALF) de souris immunisées par les adjuvants à base de Proteosome. La figure 8A montre que les souris IL-17AKO immunisées avec Proteosome, Protollin ou CpG induisent la production d'une forte réponse humorale en comparaison aux souris immunisées avec Split Flu, et ce, autant dans les muqueuses qu'au niveau systémique. De plus, la production d'IgG sérique est similaire entre les trois adjuvants. Nous avons aussi retrouvé, une production significative d'anticorps neutralisants spécifiques au virus dans le sérum et les BALF provenant des souris immunisées avec les adjuvants à base de Proteosome (Figure 8B). Nous observons aussi une génération d'anticorps neutralisants chez les souris immunisées avec le CpG. La présence d'anticorps neutralisants corrèle avec la protection observée chez les souris IL-17AKO immunisées avec les adjuvants à base de Proteosome, mais pas pour les souris immunisées avec CpG.

3.3.2. L'adjuvant Proteosome induit la surexpression d'IL-17F.

Nous avons voulu déterminer si une déficience en IL-17A induisait une modulation de l'expression génique des cytokines et des chimiokines induites par les adjuvants à base de Proteosome. Pour ce faire, des souris déficientes en IL-17A ont été immunisées avec du PBS, Split Flu, Proteosome, Protollin-sFlu ou CpG-sFlu. Les poumons ont été récoltés 21 jours post-immunisation, l'ARN a été isolé, l'ADNc a été synthétisé et une qPCR a été effectuée. Nous avons obtenu une augmentation de l'expression d'IL-17F et d'IL-21 par les adjuvants à base de Proteosome et CpG-sFlu. De plus, nous n'avons pas observé de modulation dans l'expression d'IFN- γ (données non montrées), mais nous avons observé que l'expression des chimiokines chemoattractante des cellules T (CXCL9, CXCL10 et CXCL11) est augmentée après l'immunisation avec Protollin-sFlu et CpG-sFlu (Figure 9).

Ensuite, nous avons comparé l'expression des cytokines et des chimiokines (IL-17A, IL-17F, IL-21, CXCL9, CXCL10 et CXCL11) quantifiée chez les souris IL-17AKO sur celle des souris BALB/c. Nous avons aussi remarqué qu'une immunisation intranasale induit une surexpression d'IL-17F en comparaison aux souris BALB/c, mais c'est principalement avec l'adjuvant Proteosome que nous avons observée la plus grande surexpression (Figure 10). De plus, suite à l'immunisation avec l'adjuvant Protollin et CpG, mais pas avec l'adjuvant Proteosome, nous avons constaté que le CXCL9 et le CXCL11, deux protéines chimioattractantes des cellules T, sont régulées à la hausse chez les souris déficientes IL-17A en rapport aux souris BALB/c. Tous ces résultats pourraient expliquer pourquoi les souris déficientes en IL-17A ont une réplication virale plus faible que les souris BALB/c.

3.3.3. Les adjuvants à base de Proteosome induisent une persistance des anticorps contre l'hémagglutinine.

Nous avons voulu déterminer si la production d'anticorps induit par les adjuvants à base de Proteosome que nous avons observé à trois semaines post-immunisation persistait dans le temps. Pour ce faire, nous avons immunisé des souris avec PBS, Split Flu, Proteosome, Protollin-sFlu et CpG-sFlu et nous avons récolté le sang toutes les deux semaines afin de mesurer la production d'IgG sérique spécifique du HA. Nous avons observé que la production d'anticorps induite par les adjuvants à base de Proteosome et CpG persistait jusqu'à 38 semaines post-immunisation (Figure 11A).

De plus, nous avons aussi quantifié les différents isotypes d'IgG induits par les adjuvants à base de Proteosome. Nous avons constaté que Proteosome, Protollin et CpG induisent une production d'IgG2b, tandis que la production d'IgG1 est comparable chez toutes les souris, et ce, après trois semaines post-immunisation (Figure 11B). À 38 semaines post-immunisation, nous observons que les souris immunisées avec les adjuvants à base de Proteosome et CpG induisent principalement la production d'IgG2a, mais que les souris immunisées avec Split Flu produisent majoritairement des IgG1 (Figure 11B). Tous ces résultats nous démontrent que l'environnement inflammatoire induit par les adjuvants à base de Proteosome se modifie dans le temps.

3.3.4. Une réponse spécifique contre les particules de proteosome est induite, mais pas contre l'hémagglutinine.

Afin de confirmer si une réponse spécifique à l'hémagglutinine était produite par les adjuvants à base de Proteosome, nous avons chargé des splénocytes irradiés avec Proteosome et les avons mis en présence des cellules pulmonaires provenant des souris immunisées avec PBS, Split Flu, Proteosome, Protollin-sFlu et CpG-sFlu. Nous avons observé que seulement les souris immunisées avec Proteosome et Protollin-sFlu induisaient de l'IL-17A et de l'IFN- γ en réponse à la stimulation provenant des cellules présentatrice d'antigène (CPA) chargés avec Proteosome. Les souris immunisées avec Split Flu ou CpG-sFlu ne produisent pas d'IL-17A ou d'IFN- γ . De plus, l'adjuvant Protollin est un meilleur inducteur d'IFN- γ que Proteosome (Figure 12A). Aucune production d'IL-4 n'a été observée (données non montrées). De plus, lorsque nous avons chargé des splénocytes irradiés avec Split Flu mis en présence avec les suspensions pulmonaires, nous n'avons constaté aucune production d'IFN- γ et d'IL-17A (Figure 12B), ce qui confirme une réponse contre les particules de proteosome et pas contre le Split Flu. Tous ces résultats nous démontrent que nous avons une réponse spécifique contre les particules de Proteosome, mais pas contre l'hémagglutinine, et ce dans les poumons.

En utilisant un tétramère contre un peptide de l'hémagglutinine (HA 127-137, SFERFEIFPKE), nous avons voulu observer si nous pouvions détecter une réponse spécifique de l'hémagglutinine. Nous avons immunisé des souris avec Proteosome au jour 0 et au jour 14 et avons prélevé les poumons au jour 21 post-immunisation. Ensuite, un marquage avec des anticorps marqués contre le CD3 et contre le CD4 ainsi que contre le tétramère a été effectué. Nous avons observé que les souris immunisées avec Proteosome avaient un pourcentage (Figure 12E) et un nombre (Figure 12F) de cellules tétramères (HA, SFERFEIFPKE) positifs

inférieurs à celle obtenue par les souris naïves. De plus, le marquage d'un hybridome de cellule T anti-HA spécifique (HA 1-2; IYSTVASSL) ainsi que le marquage d'un hybridome de cellule T anti-HA non spécifique (HA 3-2; CPKYVRS AKLRM) avec le tétramère ont un pourcentage de cellules positives similaire (Figure 12C et Figure 12D). Cela confirme que le marquage avec ce tétramère ne fonctionne pas, puisqu'un hybridome non spécifique pour la séquence reconnu par le tétramère est aussi fortement marqué que celle spécifique de cette séquence. Tous ces résultats nous démontrent que nous avons une réponse spécifique contre les particules de Proteosome, mais que les résultats contre l'hémagglutinine sont sous la limite de détection de la technique utilisée.

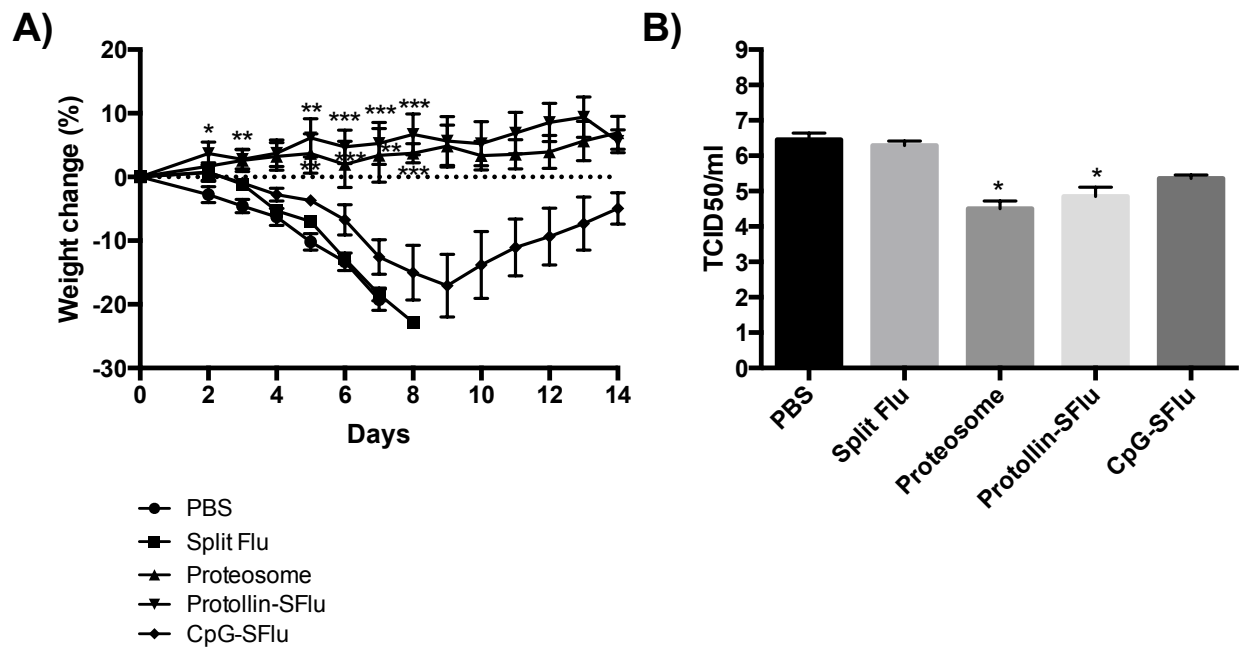


Figure 7 : L'absence d'IL-17A permet de réduire la morbidité observée chez les souris immunisées avec Proteosome. Des souris BALB/c IL-17AKO (n=8/groupe) ont été immunisées, au jour 0 et au jour 14, avec soit du PBS, Split Flu, Proteosome, Protollin ou du CpG. 28 jours post-immunisation, les souris ont été infectées avec 5 LD₅₀ du virus de l'influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) adapté à la souris. Elles ont été pesées chaque jour pour évaluer la morbidité (A). Les valeurs montrées représentent la perte de poids relative quotidienne par rapport au poids lors de l'infection. Les titres viraux pulmonaires ont été évalués en déterminant la TCID₅₀ dans la lignée cellulaire MDCK (B) (*p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001).

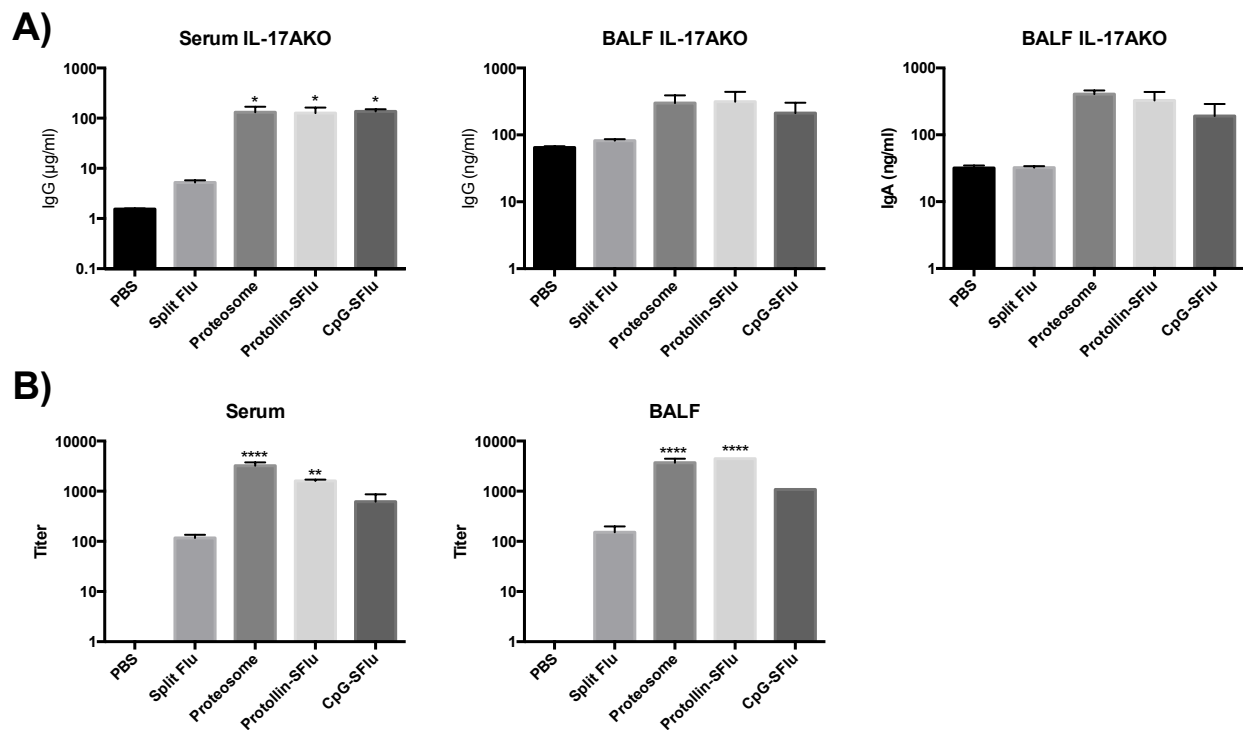


Figure 8 : Les adjuvants à base de Proteosome permettent une forte induction d'anticorps spécifiques du HA. Des souris BALB/c IL-17AKO ont été immunisées au jour 0 et au jour 14 avec du PBS, Split Flu, Proteosome, Protollin et CpG. Après 21 jours, le sérum et les BALF ont été récoltés. Le titre des IgG sériques, des IgG et des IgA des muqueuses (BALF) a été quantifié par ÉLISA (A) et un test de neutralisation a été effectué (B). La concentration moyenne de chaque groupe est montrée et exprimée en ng/ml pour le sérum et en µg/ml pour les BALF (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$)

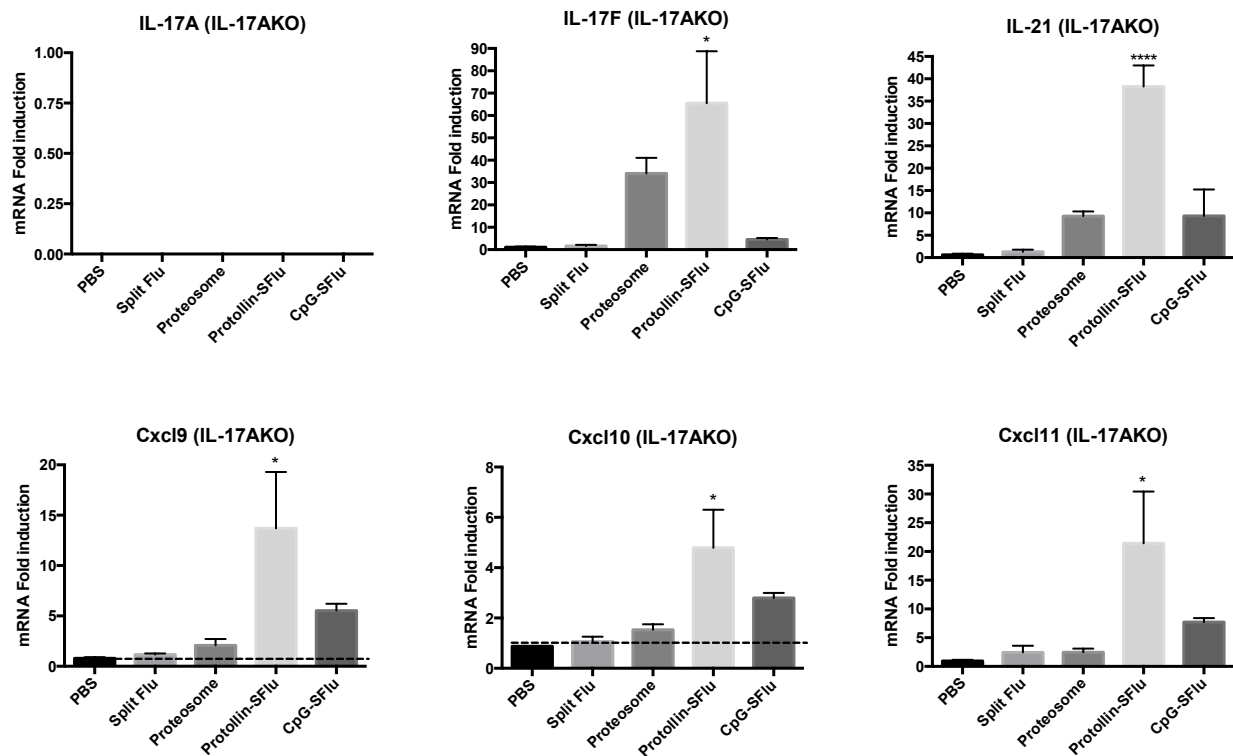


Figure 9 : Une déficience en IL-17A permet d'augmenter l'expression d'IL-17F, d'IL-21, de CXCL9, de CXCL10 et de CXCL11 par les adjuvants à base de Proteosome. Des souris BALB/c déficientes en IL-17A (n=4/groupe) ont été immunisées au jour 0 et au jour 14 avec PBS, Split Flu, Proteosome, Protollin-sFlu et CpG-sFlu. Vingt et un jour post-immunisation, les poumons ont été perfusés et récoltés et l'ARN a été extrait et ADNc synthétisé. L'expression d'IL-17A, d'IL-17F, d'IL-21, de CXCL9, de CXCL10 et de CXCL11 a été déterminée par PCR en temps réel. L'augmentation relative de ces gènes est relative à l'expression par les souris naïves et le contenu en ARNm de tous les échantillons est normalisé à Gapdh (*p≤0.05; ****p≤0.0001).

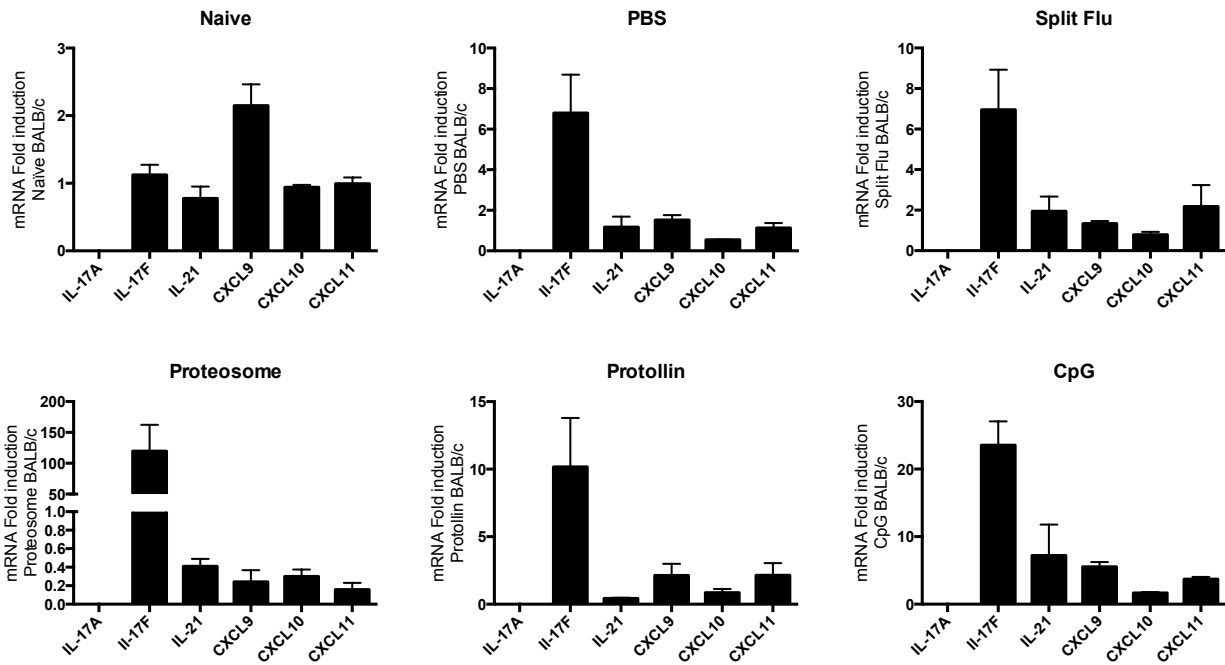
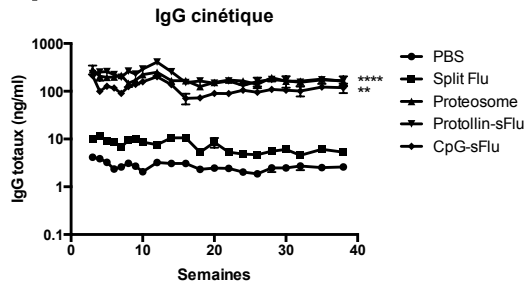


Figure 10 : Une immunisation intranasale, chez des souris déficientes en IL-17A, induit la surexpression de l'IL-17F par rapport au souris BALB/c. Des souris BALB/c (n=4) et BALB/c IL-17AKO (n=4/groupe) ont été immunisées aux jours 0 et 14 avec PBS, Split Flu, Proteosome, Protollin-sFlu et CpG-sFlu. Vingt et un jour post-immunisation, les poumons ont été perfusés et prélevés et l'ARN a été extrait et ADNc synthétisé. L'expression d'IL-17A, d'IL-17F, d'IL-21, de CXCL9, de CXCL10 et de CXCL11 a été déterminée par PCR en temps réel. L'augmentation relative de ces gènes, mesurée chez les souris BALB/c IL-17A^{-/-}, est relative à l'expression par les souris BALB/c immunisées avec le même adjuvant. De plus, le contenu en ARNm de tous les échantillons est normalisé à Gapdh.

A)



B)

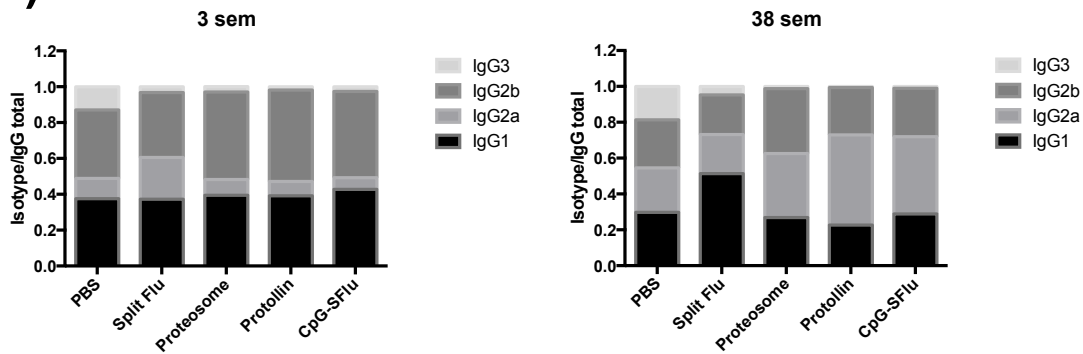


Figure 11 : Les anticorps induits par les adjuvants à base de Proteosome persistent jusqu'à 38 semaines post-immunisation. Des souris BALB/c (n=8/groupe) ont été immunisées au jour 0 et au jour 14 avec du PBS, Split Flu, Proteosome, Protollin et CpG. Après 21 jours, le sérum a été récolté toutes les deux semaines par la veine saphène. Le titre des IgG totaux (A) et le titre d'IgG1, d'IgG2a, d'IgG2b et d'IgG3 (B) ont été quantifiés par ÉLISA. La concentration moyenne de chaque groupe est montrée et exprimée en ng/ml pour le sérum (**p≤0.001; ****p≤0.0001).

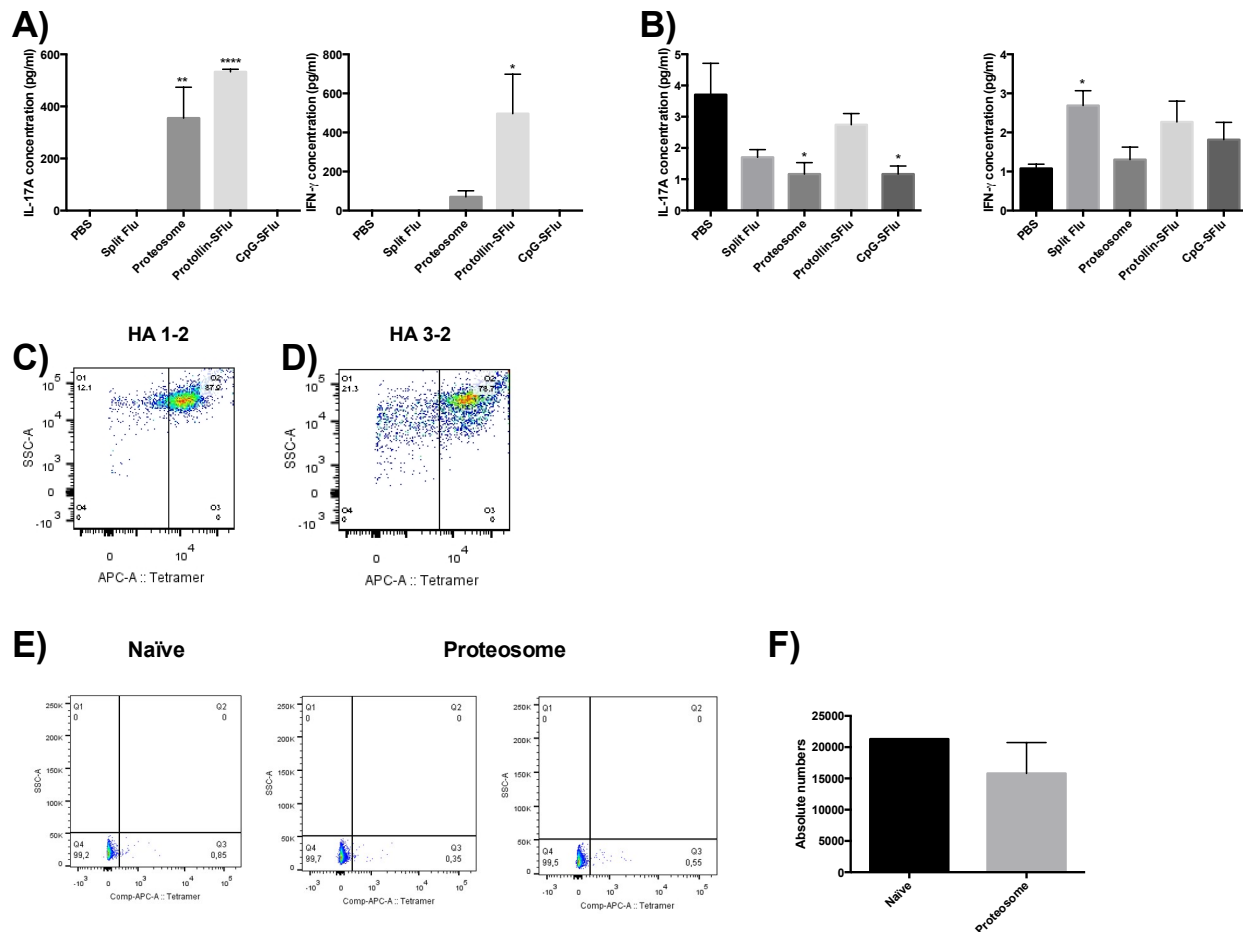


Figure 12 : Une réponse spécifique aux particules de proteosome, mais pas contre le HA, est générée suite à l'immunisation par les adjuvants à base de Proteosome. A) Des souris BALB/c (n=4/groupe) immunisées avec PBS, Split Flu, Proteosome, Protollin-sFlu et CpG-sFlu ont été immunisées aux jours 0 et 14. Au jour 21 post-immunisation, les poumons ont été perfusés et prélevés et une suspension cellulaire a été effectuée. Un million de cellules/ml a été mis en contact durant 18 heures, avec des APC préalablement chargés avec Proteosome (A) ou Split Flu (B), le surnageant a été récolté et un test ÉLISA contre IL-17A et IFN- γ a été effectué. Des hybridomes de cellules T spécifiques (HA 1-2) (C) et non spécifiques (HA 3-2) (D) ont été marqués avec le tétramère HA 127-137, (SFERFEIFPKE). E) et F) Des souris BALB/c (n=2/groupe) ont été immunisées avec Proteosome aux jours 0 et 14. À jour 21 post-immunisation, les poumons ont été perfusés et récoltés. Les cellules pulmonaires ont été marquées avec un tétramère contre HA 127-137, (SFERFEIFPKE) conjugué à l'APC. Ensuite, elles ont été marquées avec un anti-CD3-FITC et un anti-CD4-PE. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positive pour le tétramère (E) et en nombre absolu de cellules positive pour le tétramère (F). (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

CHAPITRE III

DISCUSSION

Depuis l'introduction de la vaccination dans la pratique médicale au 19^e siècle, la vaccination a été reconnue comme une des approches ayant le plus de succès pour prévenir les maladies infectieuses, en diminuant la mortalité et la morbidité. Les mécanismes de protection induits par ces vaccins sont bien souvent inconnus. L'amélioration ou le développement de nouveaux vaccins reposent sur la compréhension des mécanismes conduisant à l'induction et à la maintenance d'une immunité efficace et de longue durée contre les pathogènes. Il a été démontré que les protéines externes de *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*, plus spécifiquement les porines, pouvaient agir comme un agent mitogène sur les cellules B, induire la maturation des cellules dendritiques, et augmenter la réponse immune à des substances faiblement immunogéniques, tels les peptides synthétiques. Dues à leur nature hydrophobe, les OMP isolées par extraction au détergent s'assemblent spontanément en particules ressemblant à des vésicules, nommées Proteosome. Le système de libération/adjuvant à base de Proteosome est capable de faire des liaisons non covalentes avec des antigènes afin de former des vaccins, lesquels administrés par voie intranasale augmentent la réponse immunitaire systémique ainsi que celles des muqueuses.

Les infections par le virus de l'influenza causent une maladie peu ou moyennement sévère qui peut dégénérer en cas graves, voire mortels. Les épidémies saisonnières d'influenza sont responsables de trois à cinq millions de cas graves et de 250 000 à 500 000 décès annuellement (WHO, 2014). Malgré l'utilisation de traitement efficace et de vaccins pour prévenir les infections contre le virus de l'influenza, il est essentiel de bien comprendre la pathogenèse de ce virus pour induire les réponses immunitaires les plus efficaces.

Ce projet doctoral avait pour objectif de déterminer par quels types cellulaires ainsi que par quels mécanismes les adjuvants à base de Proteosome induisent une protection contre une infection par le virus de l'influenza. De plus, nous avons comme objectif de caractériser la réponse immunitaire, chez des souris déficiente en IL-17A et en IL-17A et IL-17F, en réponse à une infection par le virus de l'influenza.

1. Limitations des vaccins actuels contre le virus de l'influenza

La grande majorité des vaccins actuellement disponibles sont des formulations inactivées (VTI), comprenant principalement les glycoprotéines virales qui induisent une immunité humorale dirigée uniquement contre ces antigènes. Les vaccins de type vivant atténués (VVAI) développés plus récemment sont capables d'induire une réponse immunitaire systémique et des muqueuses, cellulaire et humorale, dirigée contre l'ensemble des protéines du virus. L'efficacité de ces vaccins (VVAI) est amoindrie chez les individus ayant déjà été vaccinés ou infectés par le virus dans le passé.

De plus, la production de ces vaccins est un processus long, pouvant prendre jusqu'à six mois après l'identification de la souche d'intérêt et ne peut être appliquée à toutes les souches de virus. La sélection des souches circulantes, la production d'une souche d'influenza réassortie exprimant les glycoprotéines de surface HA et NA choisies, la production massive puis l'accréditation prennent entre six et huit mois (Butler, 2012, Gerdil, 2003). De plus, certaines souches d'influenza sont difficilement compatibles avec une production massive de vaccins. Les virus d'influenza aviaire hautement pathogènes, tels que les virus H5N1, tuent les œufs qui sont utilisés pour la fabrication des vaccins, et des quantités d'antigènes élevées et répétées sont nécessaires pour induire une immunité protectrice (El Sahly *et al.*, 2008).

Également, comme cet argument a déjà été soulevé, nous ne pouvons pas exclure le risque d'un réassortiment antigénique entre les souches vaccinales VVAI et une souche circulante, lors d'une vaccination (Pfleiderer *et al.*, 2001). La possibilité d'un tel réassortiment a déjà été observée lors d'essais cliniques en co-infection entre le VVAI et la souche circulante (Youngner *et al.*, 1994). Le virus réassorti pourrait s'avérer virulent en combinant les protéines de l'enveloppe du VVAI et le complexe de réplication de la souche circulante et ainsi éventuellement donner naissance à une pandémie accidentelle. Pour cette raison, l'utilisation des vaccins VVAI est pour le moment restreinte aux souches circulantes et ne peut être appliquée aux souches non-humaines.

Malgré l'efficacité des VTI et des VVAI, les populations à risques ne sont toujours pas bien protégées contre une infection par le virus de l'influenza. Il est donc important de continuer à chercher de nouveaux adjuvants qui permettront une meilleure protection pour ces populations. Du fait que les personnes immunovulnérables ne peuvent pas être vaccinées avec les VVAI et que les VTI sont peu efficaces chez eux (Beyer *et al.*, 2002), il est important de trouver des adjuvants qui peuvent être utilisés avec des peptides synthétiques ou des protéines

recombinantes. De plus, les adjuvants nouvellement créés, ciblent pour la plupart les muqueuses, qui sont les principales voies d'infection des pathogènes, et peuvent produire une réponse immunitaire similaire à celle d'une infection par le pathogène.

2. Efficacité des adjuvants à base de Proteosome

Une des premières évidences que les particules de proteosome pouvaient être utilisées comme adjuvant provient d'une étude utilisant des peptides synthétiques contre l'hémagglutinine et la nucléoprotéine du virus de l'influenza. Ces différents peptides étaient capables d'induire une réponse immunitaire protectrice partielle chez la souris (Levi *et al.*, 1995). De plus, l'immunisation intranasale/intrapulmonaire de Split Flu avec les adjuvants à base de Proteosome protège complètement les souris contre une infection expérimentale (T. Jones *et al.*, 2003, Plante *et al.*, 2001). À une dose équivalente d'antigène (HA), une immunisation avec une formulation contenant l'adjuvant Protollin induit une meilleure protection que celle induite par la voie intramusculaire (T. Jones *et al.*, 2004). De plus, les vaccins à base de Proteosomes induisent des niveaux élevés d'anticorps HAI sériques spécifiques du virus qui sont comparables à ceux induits par les vaccins actuellement utilisés et administrés par la voie intramusculaire. En plus, seulement les adjuvants à base de Proteosome donnés par la voie intranasale induisent un niveau significatif d'IgA spécifiques de l'antigène dans les poumons ainsi que dans les lavages nasaux. Cette production d'anticorps ne nécessite pas seulement une instillation par la voie intranasale, mais aussi la présence des adjuvants à base de Proteosome, puisque le Split Flu instillé seul n'induit pas de production d'anticorps (T. Jones *et al.*, 2003, T. Jones *et al.*, 2004, Plante *et al.*, 2001). Ces vaccins protègent contre une souche de virus homologue, et ce au même niveau que la vaccination intramusculaire, actuellement utilisée (T. Jones *et al.*, 2003, T. Jones *et al.*, 2004, Plante *et al.*, 2001). Toutes ces données nous permettent de conclure que les adjuvants à base de Proteosome avec Split Flu induisent une réponse immunitaire protectrice contre le virus de l'influenza. De plus, nos résultats vont dans le même sens que ceux décrits dans la littérature et nous permettent de conclure que les adjuvants à base de Proteosome sont des adjuvants efficaces lors d'une vaccination contre l'influenza.

Les vaccins à base de Proteosome contre l'influenza, administrés par la voie intranasale, ont été testés pour évaluer leur sécurité, leur immunogénicité et leur efficacité dans plusieurs études cliniques de phase 1 et 2 impliquant plus de 1800 sujets en santé (Langley *et al.*, 2011, Langley *et al.*, 2006, J. Treanor *et al.*, 2006). Les vaccins à base de Proteosome contre l'influenza ont été bien tolérés dans toutes les études cliniques effectuées. Seulement de légers et de réversibles effets secondaires ont été observés chez 20 à 56 % des sujets, sans différence significative avec les sujets ayant reçu un placebo (Burt *et al.*, 2011). Chez l'humain, tout comme chez la souris, les vaccins à base de Proteosome contre l'influenza, administrés par la

voie intranasale, induisent une augmentation sérique des HAI spécifiques du virus, ainsi qu'une augmentation des SIgA. De plus, ils induisent aussi une réponse immune protectrice dans le sérum et dans les compartiments des muqueuses qui persistent aussi longtemps que la saison de l'influenza. En plus, aucune production d'anticorps contre les OMPs, constituant des proteosomes, n'a été observée (Burt *et al.*, 2011). Lors d'une infection expérimentale chez l'humain, il a été démontré que la réponse en anticorps sériques et des muqueuses contribue à la protection. La protection induite par ces vaccins semble être due à son habileté à induire un niveau significatif d'IgA dans les voies respiratoires (Burt *et al.*, 2011). La protection induite par les vaccins proteosomes dans les études cliniques est comparable ou supérieure à celle induite au vaccin commercial VVAI (Ambrose *et al.*, 2008).

En ce moment, seulement deux vaccins vivants atténués intranasaux sont approuvés (FluMist[®] et Nasovac[™]) pour être utilisés chez l'humain. L'un des avantages d'utiliser des vaccins non vivants ciblant les muqueuses, telles que le vaccin Proteosome contre l'influenza, est l'absence de transmission de virus vivants après la vaccination. Il a été démontré qu'une journée après la vaccination, le relargage de virus vaccinal suite à la vaccination par le VVAI est observé chez les jeunes enfants (Ambrose *et al.*, 2008), posant le risque d'un problème de réassortiment avec un virus sauvage ainsi que l'infection d'une personne immunovulnérable. Un autre des avantages des vaccins contre l'influenza non vivants est la tolérance à une plus grande variation de température d'entreposage. Par exemple, il a été démontré que le vaccin Proteosome contre l'influenza est stable à température ambiante durant un mois (Burt *et al.*, 2011), tandis que le vaccin vivant atténué requiert absolument une température de 2 à 8 °C pour son entreposage (Canada *et al.*, 2013).

Les adjuvants à base de Proteosome ont aussi plusieurs avantages en comparaison à l'adjuvant MF59 (Fluad[®]) qui est composé de squalène. La composition des adjuvants à base de Proteosome est complètement différente de celle de l'adjuvant MF59, puisque les proteosomes sont essentiellement composés de protéines de la membrane externe de bactérie et contiennent de faibles quantités de lipides bactériens tandis que le MF59, une émulsion de lipide, est composé de plusieurs lipides. Aucun de ces adjuvants ne contient de quantité substantielle de protéines. Un des avantages des adjuvants à base de Proteosome est sa voie d'administration, intranasale, qui permet une induction des réponses immunitaires systémiques et des muqueuses tandis que l'adjuvant MF59 est principalement administré par la voie intramusculaire, qui permet l'activation de l'immunité systémique. De plus, il a été démontré que l'adjuvant MF59 induisait des réactions locales (douleur, érythème et induration) plus fréquemment qu'un vaccin

sans adjuvant. Les réactions générales (myalgie, céphalées, fatigue et malaise) étaient similaires ou plus fréquentes avec Flud[®] comparativement aux vaccins sans adjuvant (Canada *et al.*, 2011). Pour ce qui est des adjuvants à base de Proteosome, lors des différentes études cliniques effectuées aucun effet secondaire diffère de ceux observés chez les sujets immunisés avec un vaccin sans adjuvant ou avec de la saline (Burt *et al.*, 2011). Ceci nous permet de dire que les vaccins contre l'influenza à base de Proteosome seraient efficaces et sécuritaires.

3. Les adjuvants à base de Proteosome et les cellules Th17

L'induction d'une immunité des muqueuses est une des premières lignes de défense contre les pathogènes, telle que le virus de l'influenza, puisque la surface du tractus respiratoire est la cible principale des infections virales respiratoires. En plus d'être une immunisation sans aiguille, l'immunisation intranasale permet l'induction d'une réponse immunitaire systémique et des muqueuses. Beaucoup de recherches s'effectuent pour découvrir de nouveaux adjuvants, efficaces et sécuritaires, qui faciliteraient la vaccination par les muqueuses.

Dans le cadre de mon doctorat, nous avons comparé deux adjuvants à base de Proteosome, Proteosome et Protollin, et ce pour la première fois, dans leur capacité à potentialiser la réponse adaptative dans un contexte de vaccination contre le virus de l'influenza, suite à une immunisation intranasale. Il a été démontré précédemment que les adjuvants à base de Proteosome polarisent une réponse de type Th1, lequel augmente la production d'IFN- γ et la production d'IgG2a de façon similaire à l'adjuvant CpG (T. Jones *et al.*, 2003, Plante *et al.*, 2001). De plus, il a été rapporté que l'induction d'une réponse Th17 est une particularité de l'immunisation intranasale, et ce peu importe l'adjuvant utilisé (Zygmunt *et al.*, 2009), ce qui est compatible avec nos résultats démontrant que les adjuvants à base de Proteosome induisent une différenciation des cellules Th17. À l'inverse de Zygmunt *et al.* (2009), nous n'avons cependant pas observé de différenciation en lymphocyte Th17 en réponse à l'immunisation avec CpG. Bien que nos résultats ne correspondent pas à la littérature en ce qui a trait à la différenciation en Th17 avec l'adjuvant CpG, nous avons remarqué que la quantité de CpG instillé est beaucoup plus grande que celle que nous avons utilisée (J. B. Lee *et al.*, 2009, Zygmunt *et al.*, 2009). Il est donc fort probable qu'en utilisant une plus grande quantité de CpG, avec notre protocole de vaccination, nous aurions pu obtenir une production de cellules Th17. Par contre, d'autres groupes n'ont pas observé de différenciation en Th17 après une immunisation avec CpG (Werninghaus *et al.*, 2009), ce qui corrobore nos résultats. Cette différence de réponse entre les adjuvants à base de Proteosome et CpG indique que les adjuvants à base de Proteosome ont une activité adjuvante qui diffère d'un agoniste classique du TLR9, tel que le CpG.

Les cellules Th17 sont connues pour induire la production de plusieurs cytokines (IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22) qui permettent de les différencier des autres types de lymphocytes T auxiliaires. Nous avons aussi observé une augmentation de l'expression de l'IL-17A, de l'IL-17F et de l'IL-21, lesquelles sont des cytokines produites principalement par les lymphocytes Th17, en

réponse à une immunisation avec les adjuvants à base de Proteosome, mais pas avec CpG. Par contre, nous n'avons pas observé de production d'IFN- γ par les souris immunisées avec CpG-sFlu (données non montrées) ce qui est à l'encontre de la littérature (Marshall *et al.*, 2006, Vollmer *et al.*, 2004). L'accumulation de cellules productrices d'IL-17 a été associée avec la production des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11, lesquelles sont connues pour augmenter la migration des cellules Th1 en se liant au récepteur CXCR3 (Groom *et al.*, 2012), lequel est aussi régulé à la hausse par les adjuvants à base de Proteosome (données non montrées). De plus, les gènes des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 ont dans leur promoteur des éléments de réponse à l'IL-17A suggérant que l'IL-17A induit directement ces chimiokines dans les poumons (Khader *et al.*, 2007, Lin *et al.*, 2010). Nous avons aussi démontré que les cellules CD4 et CD8 sécrétant de l'IL-17A peuvent être détectées dans les poumons de souris immunisées avec les adjuvants à base de Proteosome, et ce après restimulation.

Puisque nous avons démontré que les adjuvants à base de Proteosome induisent une différenciation et une production de lymphocytes Th17, nous avons voulu déterminer si cette réponse était spécifique de l'hémagglutinine, l'antigène utilisé dans notre étude. Nous avons observé que seulement les cellules pulmonaires prélevées chez des souris immunisées avec les adjuvants Proteosome et Protollin induisent une production d'IL-17A et d'IFN- γ en réponse à une stimulation avec des cellules présentatrices d'antigène préalablement chargées avec Proteosome. Par contre, lorsque les CPAs sont chargées avec HA, nous n'avons observé aucune production d'IL-17A et d'IFN- γ . Nos résultats démontrent que les adjuvants à base de Proteosome induisent une réponse, qui est majoritairement spécifique des particules de proteosome. Les adjuvants à base de Proteosome sont principalement composés de porines et celles-ci peuvent induire la sécrétion d'IL-17A et d'IFN- γ (Perez-Shibayama *et al.*, 2014), ce qui confirme nos résultats. Un vaccin sous-unitaire, comme le Split Flu, manque l'ARN dérivé du virus de l'influenza et ne peut pas induire une réponse immunitaire au niveau des lymphocytes T (Akira, 2011). Il est donc prévisible que nous n'ayons pas obtenu de production d'IL-17A et d'IFN- γ suite à l'immunisation avec Split Flu. Il a aussi été démontré que Split Flu en combinaison avec CpG permettait l'induction d'une réponse immunitaire innée et adaptative (Akira, 2011). Nous nous attendions donc à obtenir une réponse spécifique de l'hémagglutinine en réponse à l'immunisation avec CpG-sFlu, mais aucune production d'IL-17A ou d'IFN- γ n'a été mesurée chez des cellules provenant d'une suspension pulmonaire et mise en présence de CPA chargées avec HA ou Proteosome. Malgré l'utilisation de tétramères spécifiques contre le peptide (SFERFEIFPKE) du HA de l'influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1), nous n'avons

pas réussi à déterminer si une réponse spécifique de l'antigène était générée chez les lymphocytes T, mais puisque nous observons une induction d'une réponse humorale spécifique de HA, et comme le changement de classe des anticorps est dépendant des cellules T auxiliaires, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une réponse Th spécifique de HA est induite, mais que nous ne parvenons pas à la détecter.

3.1. Résumé

Tous ces résultats nous permettent de conclure que les adjuvants à base de Proteosome ont la capacité d'induire la production des cytokines produites par les lymphocytes Th17, tels que l'IL-17A, IL-17F et l'IL-21, et cette production semble être dépendante des particules de proteosomes. De plus, ils induisent la différenciation des lymphocytes Th17 et Tc17. Comme observé dans plusieurs vaccins muqueux, les adjuvants à base de Proteosome induisent une réponse de type Th17 et Tc17, suggérant que ces lymphocytes peuvent être importants à l'immunité induite par les vaccins. Plusieurs études ont démontré l'importance de l'IL-17 et des lymphocytes Th17 dans la protection contre des infections bactériennes dans les poumons (Chackerian *et al.*, 2006, Khader *et al.*, 2007, Khader *et al.*, 2005, Williman *et al.*, 2008). De plus, une vaccination induisant la cytokine IL-17 ou la différenciation en Th17 est bénéfique pour plusieurs microorganismes, tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus fumigatus* et le rotavirus (Lin *et al.*, 2010).

4. La protection induite par les adjuvants à base de Proteosome est indépendante de l'IL-17A et de l'IL-17F

Le but de la vaccination est la prévention des maladies infectieuses en induisant une réponse rapide et efficace, empêchant l'apparition de la maladie, lors d'une seconde rencontre avec le pathogène. Il a déjà été démontré que les vaccins Proteosome et Protollin ont la capacité d'induire une réponse immunitaire protectrice contre une infection expérimentale par le virus de l'influenza (T. Jones *et al.*, 2003, T. Jones *et al.*, 2004, Plante *et al.*, 2001).

Depuis la découverte des cellules Th17, celles-ci ont été impliquées dans la pathogenèse de certaines maladies auto-immunes, mais depuis peu on découvre qu'elles ont un rôle dans la protection contre certains pathogènes extracellulaire et intracellulaire. Le rôle de l'IL-17A durant les infections par le virus de l'influenza reste controversé, comme démontré dans la littérature avec un rôle protecteur ou délétère en fonction du modèle d'étude (Crowe *et al.*, 2009, H. Hamada *et al.*, 2009, McKinstry *et al.*, 2009). Sachant que les cellules Th17 peuvent être impliquées dans l'immunité vaccinale (Kumar *et al.*, 2013), nous avons voulu déterminer si la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome était dépendante des cytokines IL-17A et IL-17F (Dubin *et al.*, 2009). Nos résultats démontrent qu'une déficience en IL-17A ou en IL-17A et en IL-17F n'est pas critique pour la protection contre le virus de l'influenza. De plus, une perte de poids plus faible est observée chez les souris déficientes en IL-17A, lorsque ces souris sont immunisées avec les adjuvants à base de Proteosome, tandis que chez les souris déficientes en IL-17A et en IL-17F, nous remarquons cette diminution lorsqu'elles sont immunisées par Proteosome, Protollin ou CpG. Cela confirme le rôle nuisible de ces deux cytokines dans la pathologie d'une infection par le virus de l'influenza. Une autre étude, utilisant un adjuvant intranasal/intrapulmonaire, a démontré que l'IL-17A avait un rôle nuisible dans l'immunité contre une infection par le virus de l'influenza (Maroof *et al.*, 2014). Les souris immunisées avec Protollin sont toujours protégées contre une infection expérimentale par le virus de l'influenza, et ce peu importe si les souris sont déficientes en IL-17A et en IL-17F. Par contre, on observe une perte de poids plus faible chez les souris déficientes. Chez l'humain, lors des études cliniques, le diamètre moyen des particules était entre 40 et 50 μm , et moins de 10% des gouttelettes avaient un diamètre inférieur à 10 μm , s'assurant que le vaccin soit majoritairement distribué dans le pharynx nasal et que par le fait même, il n'atteigne pas les poumons. De plus, aucune exacerbation de la maladie n'a été observée chez les personnes vaccinées (Burt *et al.*, 2011).

Chez les souris déficientes en IL-17A, il semblerait que la signalisation de IL-17A n'est pas nécessaire pour l'élimination du virus, et ce, basé sur une charge virale plus faible chez ces souris que chez les souris BALB/c, qui ont pourtant été infectées avec la même quantité de virus. L'un des facteurs pouvant expliquer cette réplication plus faible est la surexpression d'IL-17F par les souris IL-17AKO (Haak *et al.*, 2009, von Vietinghoff *et al.*, 2009). Nous avons observé que les souris IL-17AKO surexpriment l'IL-17F dès qu'elles sont instillées, et ce peu importe le traitement effectué. Le fait que l'IL-17F se lie spécifiquement à l'IL-17RC, et que l'IL-17RC et l'IL-17RA ne soient pas exprimés par les mêmes tissus laisse supposer que les réponses de l'IL-17A et de l'IL-17F pourraient être spécifiques à certains tissus (Chang *et al.*, 2009). De plus, l'utilisation des souris IL-17A/FKO permet de confirmer cette hypothèse, puisque la charge virale, chez ces souris, est similaire à celle obtenue chez les souris BALB/c.

4.1. Résumé

Le fait d'avoir utilisé des souris déficientes en IL-17A ou en IL-17A et en IL-17F a éliminé toutes les sources d'IL-17A et d'IL-17F durant une infection chez des souris vaccinées. Nous pouvons donc conclure que chez les souris vaccinées et ensuite infectées avec un virus de l'influenza, la sécrétion d'IL-17A et d'IL-17F, par les cellules Th17 ou de sources différentes, ne joue pas un rôle important dans le contrôle du virus. Ces résultats mettent l'accent sur le fait que l'IL-17A et l'IL-17F servent à augmenter l'inflammation, sans contribution à la protection contre une infection par le virus de l'influenza.

5. L'absence d'IL-17A et d'IL-17F a peu d'impact sur la réponse humorale induite par les adjuvants à base de Proteosome

Les adjuvants ciblant les muqueuses sont connus pour induire une réponse immunitaire systémique et des muqueuses. La protection induite par la majorité des vaccins contre l'influenza est engendrée par la réponse en anticorps contre la protéine hémagglutinine (Waffarn *et al.*, 2011). Cependant, une élimination efficace du virus est dépendante des deux branches de l'immunité, cellulaire et humorale. Après avoir démontré que les cellules productrices d'IL-17 n'ont pas d'impact sur la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome, nous voulions donc déterminer si l'absence d'IL-17A ou d'IL-17A et d'IL-17F avaient une influence sur la production d'anticorps ainsi que sur la capacité neutralisante de ceux-ci. Il a été récemment démontré que l'IL-17A en collaboration avec BAFF, mais pas seulement IL-17A, peut augmenter la survie, la prolifération ainsi que la commutation de classe des immunoglobulines *in vitro* (Doreau *et al.*, 2009). De plus, il a été démontré que les souris déficientes en IL-17F, de façon similaire aux souris déficientes en IL-17A, ont une production réduite en immunoglobulines dans certaines réponses immunes (Ishigame *et al.*, 2009, Nakae *et al.*, 2002). Au contraire, nous avons observé que les souris déficientes en IL-17A et IL-17F ont une meilleure production d'anticorps muqueux chez les souris immunisées avec Proteosome et CpG, tandis que chez les souris déficientes en IL-17A une production d'anticorps sériques et des muqueuses était similaire à celle obtenue par les souris BALB/c. Par contre, nos résultats concordent avec les observations faites par Shubui *et al.*, (2012) qui ont démontré que ni l'IL-17A ou l'IL-17F ne peut induire la production anticorps par les cellules B, malgré que celles-ci expriment le récepteur pour l'IL-17. Ils ont aussi démontré qu'une déficience en IL-17A n'avait pas d'influence sur la production d'anticorps par les cellules B ainsi que sur la commutation de classe produite par l'IFN- γ , l'IL-4 et le TGF- β 1 (Shibui *et al.*, 2012). Cette augmentation d'anticorps muqueux pourrait expliquer pourquoi les souris IL-17A/FKO immunisées avec CpG sont protégées.

Une autre cytokine, l'IL-21, produite par les cellules Th17 ainsi que par les Tfh est importante pour la prolifération et la production des anticorps par les cellules B (Nurieva *et al.*, 2008). Chez des souris déficientes pour le récepteur de l'IL-21, on remarque une diminution de la production IgG1 (Shibui *et al.*, 2012). Autant chez les souris BALB/c que chez les souris déficientes en IL-17A, nous observons une forte production d'IL-21 chez les souris immunisées avec les adjuvants à base de Proteosome. Il se pourrait que la production d'IL-21 permette de maintenir ou d'améliorer la production d'anticorps chez ces souris. N'ayant pas quantifié cette cytokine chez les souris déficientes en IL-17A et en IL-17F, il est possible que le même

phénomène se produise ou bien que d'autres mécanismes soient impliqués pour expliquer la production d'anticorps.

L'utilisation de méthode sérologique telle que le test d'inhibition de l'hémagglutinine (HAI) ainsi que la capacité de neutralisation du virus sont des outils utiles et efficaces pour l'évaluation de l'immunogénicité d'un vaccin. Le test de neutralisation à plusieurs avantages pour la détection d'anticorps contre le virus de l'influenza. Comme le HAI, le test de neutralisation détecte les anticorps spécifiques de la protéine HA du virus de l'influenza (Rowe *et al.*, 1999). De plus, le test de neutralisation est plus sensible que le test d'inhibition de l'hémagglutinine (Grund *et al.*, 2011). Nous avons démontré que les adjuvants à base de Proteosome ont la capacité d'induire une production d'anticorps spécifiques à l'hémagglutinine, et ce chez les souris BALB/c ainsi que chez les souris déficientes en IL-17A ou en IL-17A et en IL-17F. De plus, il est important de déterminer si les anticorps produits ont la capacité de neutraliser le virus. La déficience en IL-17A ou en IL-17A et en IL-17F, chez les souris immunisées avec les adjuvants à base de Proteosome, n'a pas d'influence sur la capacité de neutralisation des immunoglobulines, et ce, autant dans le sérum et dans les BALF. Il semblerait que l'IL-17A et IL-17F aient une influence négative sur la réponse en anticorps lorsque les souris sont immunisées avec un adjuvant induisant une réponse de type Th1, comme CpG, mais n'ait pas d'effet sur la réponse en anticorps induite par les adjuvants à base de Proteosome. Nous pouvons conclure que les adjuvants à base de Proteosome ainsi que CpG ont la capacité d'induire des anticorps neutralisants. De plus, le pouvoir neutralisant des anticorps produits par les adjuvants à base de Proteosome n'est pas influencé par l'IL-17A, ni par l'IL-17F. Par contre, le pouvoir de neutralisation des anticorps produits par CpG est diminué en absence d'IL-17A et d'IL-17F.

5.1. Résumé

Les adjuvants à base de Proteosome ont démontré l'incapacité de Split Flu seul, administré par la voie intranasale, à induire une réponse immune humorale qui approche l'amplitude de celle obtenue par les adjuvants à base de Proteosome. L'absence d'IL-17A et/ou d'IL-17A et d'IL-17F a peu d'influence sur la production ainsi que sur le pouvoir neutralisant des anticorps production par les cellules B en réponse à une immunisation avec les adjuvants à base de Proteosome.

6. Les souris déficiente en IL-17A et en IL-17F ont un environnement inflammatoire favorisant la survie de l'hôte

Le rôle de l'IL-17A lors d'infection virale n'a pas été considérablement étudié, en dépit du fait que la cytokine ait été détectée (Kohyama *et al.*, 2007, Yue *et al.*, 2008). Lors d'une infection par le virus de l'influenza, le rôle de l'IL-17A reste controversé. Certaines études lui confèrent un rôle protecteur et d'autres néfastes (Crowe *et al.*, 2009, H. Hamada *et al.*, 2009, McKinstry *et al.*, 2009).

Après avoir démontré que la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome était indépendante de l'IL-17A et l'IL-17F, nous avons voulu caractériser la réponse antivirale chez les souris déficientes en IL-17A et en IL-17A et en IL-17F après une infection expérimentale par le virus de l'influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1). Tout comme Crowe *et al.*, (2009), nos résultats démontrent que les souris déficientes en IL-17A et d'IL-17F ont une morbidité (perte de poids plus faible) plus faible ainsi qu'une meilleure survie que les souris BALB/c ou déficiente en IL-17A.

Nous avons observé une diminution de la réplication virale chez les souris IL-17AKO en comparaison aux souris BALB/c et déficiente pour l'IL-17A et l'IL-17F qui est similaire à nos résultats pour la réplication virale chez les souris immunisées avec les adjuvants à base de Proteosome. Cette diminution de la réplication virale concorde avec une surexpression de l'IL-17F, chez les souris déficientes en IL-17A, comme observé par von Vietinghoff et Ley (von Vietinghoff *et al.*, 2009). Le fait que l'IL-17F se lie spécifiquement à l'IL-17RC, et que l'IL-17RC et l'IL-17RA ne sont pas exprimés par les mêmes types cellulaires (cellules non-hématopoïétiques) laisseraient supposer que la réponse de l'IL-17A et de l'IL-17F pourrait être spécifique à certains tissus (Chang *et al.*, 2009). Ce qui expliquerait la baisse de morbidité observée. L'utilisation des souris IL-17A/FKO a d'ailleurs permis de confirmer cette hypothèse, puisque la réplication virale chez ces souris est similaire à celle obtenue chez les souris BALB/c. Malgré le fait que les souris IL-17A/FKO ont une réplication virale similaire à celle des souris BALB/c, elles ont une plus forte capacité à tolérer une infection expérimentale avec le virus de l'influenza, puisque ultimement leur taux de survie est plus élevé.

Il a été démontré que les souris déficientes en IL-17RA sont plus susceptibles à certaines infections pulmonaires par des bactéries extracellulaires, mais le rôle des IL-17 dans la réponse de l'hôte à une infection primaire par l'influenza n'a pas été évalué. De plus, l'IL-17A et l'IL-17F sont responsables de l'induction de plusieurs facteurs granulopoïétiques et de plusieurs

chimiokines qui permettent le recrutement de neutrophiles (Witowski *et al.*, 2000, Ye *et al.*, 2001b). Lors d'une infection par le virus de l'influenza, plusieurs types de cellules immunitaires sont recrutés au site d'infection, bien que les neutrophiles et les cellules NK soient les types cellulaires principalement recrutés (Kohlmeier *et al.*, 2009). Malgré le rôle de l'IL-17A et de l'IL-17F dans le recrutement des neutrophiles (Korn *et al.*, 2009, Smith *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2007), ainsi que l'observation d'une réduction du nombre de neutrophiles chez les souris IL-17RAKO (Crowe *et al.*, 2009), nous n'observons aucune différence significative, entre les souris BALB/c et les souris déficientes en IL-17A et en IL-17F, dans le nombre de neutrophiles recrutés aux poumons. En plus des neutrophiles, les cellules NK ont aussi un rôle important dans la protection contre l'infection par le virus de l'influenza. En plus d'être un important producteur de TNF, d'IFN- γ et de MIP-1 α , les cellules NK sont connues pour avoir une puissante activité cytotoxique (Tay *et al.*, 1998). Il a été démontré qu'une déplétion des cellules NK, chez les souris BALB/c ou C57BL/6, ou bien une déficience en NCR-1 (*natural cytotoxicity receptor*) augmentait la morbidité et la mortalité en réponse à une infection par le virus de l'influenza (Guo *et al.*, 2011, McGill *et al.*, 2009). Un autre type cellulaire impliqué dans la protection lors d'une infection par le virus de l'influenza sont les lymphocytes T $\gamma\delta$. Par leur action de tuer directement les cellules infectées et par la production de cytokines antivirales, les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent contrôler l'infection de différentes souches de virus de l'influenza, telles que la souche humaine saisonnière H1N1, la souche pandémique H1N1 ainsi que les souches aviaires H5N1 et H9N2 (Tu *et al.*, 2011, J. Zheng *et al.*, 2013). En plus de leurs capacités cytotoxiques, les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont capable de sécréter un douzaine de molécules pro-inflammatoires (tel que le TNF, IL-6 et IFN- γ) et de directement attaquer les pathogènes (J. Zheng *et al.*, 2013). Une augmentation du nombre de cellules NK et des cellules T $\gamma\delta$, comme nous l'avons observé, après deux jours post-infection chez les souris déficientes en IL-17A et en IL-17F, pourrait être l'une des raisons expliquant la diminution de morbidité et de mortalité observée. Cette augmentation dans le recrutement de lymphocytes T $\gamma\delta$ peut être expliquée par le fait que l'IL-17A et l'IL-17F régulent l'expression de certaines chimiokines et cytokines qui pourraient avoir un impact sur la migration des lymphocytes T $\gamma\delta$. Il a été démontré que l'expression de CXCL1, de CXCL2, d'IFN- γ , d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF est augmentée dans le colon des souris déficientes en IL-17A et/ou en IL-17F infectés avec *C. rodentium*.

Du fait que les souris IL-17A/FKO aient un taux de survie plus élevé ainsi qu'une plus faible morbidité, nous avons voulu mesurer l'expression génique de certaines cytokines inflammatoires dans les poumons. Il existe trois types d'IFN qui ont tous un rôle différent dans la protection contre les infections. La réponse en IFN de type II (IFN- γ) contribue à l'établissement

de la réponse adaptative. La réponse de type III (IFN- λ) permet un contrôle de l'infection par le virus de l'influenza et la réponse en IFN de type I (principalement IFN- α et IFN- β) apparaît être critique pour limiter la réplication du virus de l'influenza donc d'assurer la survie de l'hôte (Hale *et al.*, 2010). Les principales cytokines antivirales, IFN- α 2 et IFN- β 1, sont fortement augmentées chez les souris naïves IL-17A/FKO. Cette forte expression d'IFN de type I permettrait un meilleur contrôle, à long terme, de la réplication virale. Des études, conduites chez les souris, ont clairement indiqué qu'en absence d'IFN de type I, la réplication virale et la sévérité de la maladie sont augmentées (Garcia-Sastre, 2011). Certaines études ont démontré que les IFNs de type I augmentent la capacité des cellules NK à tuer les cellules cibles (C. K. Lee *et al.*, 2000, Nguyen *et al.*, 2002). De plus, l'IFN- α et l'IFN- β promeuvent l'accumulation et/ou la survie des cellules NK (Nguyen *et al.*, 2002) et des lymphocytes T $\gamma\delta$ (Watanabe *et al.*, 2006) qui prolifèrent.

De plus, il est connu que les IFNs de type I agissent de concert avec les PRRs pour induire une forte production de cytokines pro-inflammatoires, tels que le TNF, l'IL-1 β et l'IL-6 (Chan *et al.*, 2005, Iwasaki *et al.*, 2014, Kohlmeier *et al.*, 2009). De plus, le TNF et l'IL-1 β peuvent être produits par les neutrophiles, les cellules NK et les lymphocytes T $\gamma\delta$ lors d'une infection par le virus de l'influenza, (Iwasaki *et al.*, 2014, McGill *et al.*, 2009). Le fait que les cellules NK et les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent produire du TNF et de l'IL-1 β , deux cytokines dont l'expression est augmentée chez les souris déficientes, et qu'un plus grand nombre de cellules NK et T $\gamma\delta$ soit recruté, pourrait être une autre des explications qui expliqueraient la diminution de morbidité et de mortalité chez les souris IL-17A/FKO.

6.1. Résumé

En conclusion, notre étude a démontré que l'IL-17A et l'IL-17F ont un rôle nuisible durant une infection par le virus de l'influenza chez la souris. Tous ces résultats nous permettent de conclure que les souris déficientes en IL-17A et en IL-17F auraient un environnement inflammatoire plus efficace pour l'élimination du virus de l'influenza.

CONCLUSION

Les adjuvants à base de Proteosome induisent la différenciation des lymphocytes de type Th17 ainsi que l'expression des cytokines qui lui sont associées (IL-17A, IL-17F et IL-21). Par contre, la protection engendrée par les adjuvants à base de Proteosome est indépendante de l'IL-17A et de l'IL-17F, puisque les souris déficientes en IL-17A ou en IL-17A et en IL-17F ont une morbidité plus faible en comparaison aux souris BALB/c, suite à une infection par le virus de l'influenza. De plus, une déficience en IL-17A et en IL-17F a peu d'influence sur la production d'anticorps aux niveaux systémiques et des muqueuses suite à l'immunisation par les adjuvants à base de Proteosome. Ces résultats démontrent que la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome est indépendante de l'IL-17A et de l'IL-17F.

Puisque l'utilisation des souris déficientes implique une absence d'expression et de production de ces cytokines par tous les types cellulaires les produisant, il serait intéressant d'utiliser la technologie des souris cre/lox pour inhiber seulement l'IL-17A et/ou l'IL-17F chez les lymphocytes T, ce qui permettrait de constater l'impact de l'IL-17, produite par les cellules de l'immunité innée, sur la protection induite par les adjuvants à base de Proteosome. De plus, il serait intéressant de caractériser la réponse mémoire induite par les adjuvants à base de Proteosome, afin de comprendre par quels mécanismes la protection est induite.

Comme pour les souris immunisées avec les adjuvants à base de Proteosome, les souris déficientes en IL-17A et en IL-17F ont une plus faible morbidité ainsi qu'un taux de survie plus élevé que les souris BALB/c sauvages ou les souris IL-17AKO en réponse à un défi par le virus de l'influenza. Cette protection semble être due à une augmentation du nombre de cellules NK et des lymphocytes T $\gamma\delta$, puisque ces deux types cellulaires jouent un rôle important dans la protection contre une infection par le virus de l'influenza. Un autre facteur permettant d'expliquer cette protection accrue est le fait que les souris IL-17A/FKO expriment fortement l'IFN- α et de l'IFN- β avant l'infection, créant ainsi un environnement antiviral pouvant limiter la réplication virale et induire une forte réponse immunitaire adaptative. Tous ces résultats nous permettent de conclure que l'IL-17A et l'IL-17F ne sont pas essentiels pour la protection contre une infection par le virus de l'influenza.

Pour poursuivre cette recherche, il serait intéressant d'observer si les souris déficiente en IL-17A et en IL-17F, une neutralisation ou une déficience en cellules NK ou en lymphocytes T $\gamma\delta$ aurait un impact sur la protection ainsi que sur le taux de survie suite à une infection par le virus de l'influenza. De plus, il serait intéressant de mettre en évidence si la protection que nous observons, serait observé suite à l'utilisation de souches d'influenza, soit d'autres H1N1 ou tous autres souches de la famille de l'influenza A.

BIBLIOGRAPHIE

- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ & Gurney AL (2003) Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278(3):1910-1914.
- Akira S (2011) Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1579):2748-2755.
- Ambrose CS, Levin MJ & Belshe RB (2011) The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults. *Influenza and other respiratory viruses* 5(2):67-75.
- Ambrose CS, Luke C & Coelingh K (2008) Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. *Influenza and other respiratory viruses* 2(6):193-202.
- Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P & Becker JC (2006) Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 126(1):32-41.
- Anjuere F & Czerkinsky C (2007) [Mucosal immunity and vaccine development]. *Med Sci (Paris)* 23(4):371-378.
- Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K, Husain S, Kreindler JL, Dubin PJ, Pilewski JM, Myerburg MM, Mason CA, Iwakura Y & Kolls JK (2008) IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14(3):275-281.
- Aujla SJ, Dubin PJ & Kolls JK (2007) Interleukin-17 in pulmonary host defense. *Experimental lung research* 33(10):507-518.
- Barackman JD, Ott G & O'Hagan DT (1999) Intranasal immunization of mice with influenza vaccine in combination with the adjuvant LT-R72 induces potent mucosal and serum immunity which is stronger than that with traditional intramuscular immunization. *Infect Immun* 67(8):4276-4279.
- Barr IG, McCauley J, Cox N, Daniels R, Engelhardt OG, Fukuda K, Grohmann G, Hay A, Kelso A, Klimov A, Odagiri T, Smith D, Russell C, Tashiro M, Webby R, Wood J, Ye Z & Zhang W (2010) Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 northern hemisphere season. *Vaccine* 28(5):1156-1167.
- Bastos KR, Marinho CR, Barboza R, Russo M, Alvarez JM & D'Imperio Lima MR (2004) What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6(6):630-636.
- Beby-Defaux A, Giraudeau G, Bouguermouh S & Agius G (2003) Influenza: virological aspects, epidemiology and virological diagnosis. *Medecine et Maladies Infectieuses* 33(3):134-142.
- Bedoya SK, Lam B, Lau K & Larkin J, 3rd (2013) Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clinical & developmental immunology* 2013:986789.

- Behrens G & Stoll M (2006) Pathogenesis and Immunology. *Influenza Report*, Flying Publisher. p 92-109.
- Belshe RB, Mendelman PM, Treanor J, King J, Gruber WC, Piedra P, Bernstein DI, Hayden FG, Kotloff K, Zangwill K, Iacuzio D & Wolff M (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenzavirus vaccine in children. *N Engl J Med* 338(20):1405-1412.
- Bendelac A & Medzhitov R (2002) Adjuvants of immunity: harnessing innate immunity to promote adaptive immunity. *J Exp Med* 195(5):F19-23.
- Bermejo-Martin JF, Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T, Rello J, Almansa R, Ramirez P, Martin-Loeches I, Varillas D, Gallegos MC, Seron C, Micheloud D, Gomez JM, Tenorio-Abreu A, Ramos MJ, Molina ML, Huidobro S, Sanchez E, Gordon M, Fernandez V, Del Castillo A, Marcos MA, Villanueva B, Lopez CJ, Rodriguez-Dominguez M, Galan JC, Canton R, Lieten A, Rojo S, Eiros JM, Hinojosa C, Gonzalez I, Torner N, Banner D, Leon A, Cuesta P, Rowe T & Kelvin DJ (2009) Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care* 13(6):R201.
- Bettelli E, Oukka M & Kuchroo VK (2007) T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8(4):345-350.
- Beyer WE, Palache AM, de Jong JC & Osterhaus AD (2002) Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: systemic vaccine reactions, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy. A meta-analysis. *Vaccine* 20(9-10):1340-1353.
- Bird L (2010) T cells: TLRs deliver a direct hit to TH17 cells. *Nat Rev Immunol* 10(6):384.
- Boon AC, de Mutsert G, Graus YM, Fouchier RA, Sintnicolaas K, Osterhaus AD & Rimmelzwaan GF (2002) The magnitude and specificity of influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in humans is related to HLA-A and -B phenotype. *J Virol* 76(2):582-590.
- Bouvier NM & Lowen AC (2010) Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses* 2(8):1530-1563.
- Bouvier NM & Palese P (2008) The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4:D49-53.
- Bridges CB, Katz JM, Levandowski RA & Cox NJ (2008) Inactivated influenza vaccines. *Vaccines*, Saunders/Elsevier, 5 Ed. p 259-290.
- Brokstad KA, Cox RJ, Olofsson J, Jonsson R & Haaheim LR (1995) Parenteral influenza vaccination induces a rapid systemic and local immune response. *J Infect Dis* 171(1):198-203.
- Brown DM, Roman E & Swain SL (2004) CD4 T cell responses to influenza infection. *Semin Immunol* 16(3):171-177.
- Burt D, Mallett C, Plante M, Zimmermann J, Torossian K & Fries L (2011) Proteosome-adjuvanted intranasal influenza vaccines: advantages, progress and future considerations. *Expert Rev Vaccines* 10(3):365-375.

- Butler D (2012) Lab flu may not aid vaccines. *Nature* 482(7384):142-143.
- Canada, Agence de la santé publique du Canada & Comité consultatif national de l'immunisation (2011) Recommandations relatives au vaccin antigrippal trivalent contenant l'adjuvant MF59 (Fluad®) : Déclaration supplémentaire sur le vaccin contre la grippe saisonnière de 2011-2012. in *Relevé des maladies transmissibles au Canada*, p 1-71.
- Canada, Agence de la santé publique du Canada & Comité consultatif national de l'immunisation (2013) Déclaration sur la vaccination antigrippale pour la saison 2013-2014. in *Relevé des maladies transmissibles au Canada*, p 1-42.
- Cannons JL, Lu KT & Schwartzberg PL (2013) T follicular helper cell diversity and plasticity. *Trends Immunol* 34(5):200-207.
- Carrat F & Flahault A (2007) Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* 25(39-40):6852-6862.
- Cha TA, Kao K, Zhao J, Fast PE, Mendelman PM & Arvin A (2000) Genotypic stability of cold-adapted influenza virus vaccine in an efficacy clinical trial. *J Clin Microbiol* 38(2):839-845.
- Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL & Miossec P (1998) Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 161(1):409-414.
- Chabot S, Brewer A, Lowell G, Plante M, Cyr S, Burt DS & Ward BJ (2005) A novel intranasal Protollin-based measles vaccine induces mucosal and systemic neutralizing antibody responses and cell-mediated immunity in mice. *Vaccine* 23(11):1374-1383.
- Chabot SM, Chernin TS, Shawi M, Wagner J, Farrant S, Burt DS, Cyr S & Neutra MR (2007) TLR2 activation by proteosomes promotes uptake of particulate vaccines at mucosal surfaces. *Vaccine* 25(29):5348-5358.
- Chackerian AA, Chen SJ, Brodie SJ, Mattson JD, McClanahan TK, Kastelein RA & Bowman EP (2006) Neutralization or absence of the interleukin-23 pathway does not compromise immunity to mycobacterial infection. *Infect Immun* 74(11):6092-6099.
- Chan MC, Cheung CY, Chui WH, Tsao SW, Nicholls JM, Chan YO, Chan RW, Long HT, Poon LL, Guan Y & Peiris JS (2005) Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir Res* 6:135.
- Chang SH & Dong C (2009) IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine* 46(1):7-11.
- Chen D, Luo X, Xie H, Gao Z, Fang H & Huang J (2013) Characteristics of IL-17 induction by *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mouse liver. *Immunology* 139(4):523-532.
- Chen Y, Thai P, Zhao YH, Ho YS, DeSouza MM & Wu R (2003) Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *The Journal of biological chemistry* 278(19):17036-17043.

- Cho JS, Pietras EM, Garcia NC, Ramos RI, Farzam DM, Monroe HR, Magorien JE, Blauvelt A, Kolls JK, Cheung AL, Cheng G, Modlin RL & Miller LS (2010) IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J Clin Invest* 120(5):1762-1773.
- Clements ML, Betts RF, Tierney EL & Murphy BR (1986) Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type virus. *J Clin Microbiol* 24(1):157-160.
- Collins BS (2011) Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. *Discov Med* 12(62):7-15.
- Conner ME & Estes MK (2004) Viruslike Particule (VLP) vaccines. *New Generation Vaccines*, Dekker M (Édit.) Marcel Dekker, Third Edition Ed. p 283-294.
- Cottey R, Rowe CA & Bender BS (2001) Influenza virus. *Curr Protoc Immunol* Chapter 19:Unit 19 11.
- Cox JC & Coulter AR (1997) Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15(3):248-256.
- Cox NJ & Subbarao K (1999) Influenza. *Lancet* 354(9186):1277-1282.
- Cox RJ, Brokstad KA & Ogra P (2004) Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol* 59(1):1-15.
- Cross KJ, Langley WA, Russell RJ, Skehel JJ & Steinhauer DA (2009) Composition and functions of the influenza fusion peptide. *Protein Pept Lett* 16(7):766-778.
- Crotty S (2011) Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29:621-663.
- Crowe CR, Chen K, Pociask DA, Alcorn JF, Krivich C, Enelow RI, Ross TM, Witztum JL & Kolls JK (2009) Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J Immunol* 183(8):5301-5310.
- Cua DJ & Tato CM (2010) Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 10(7):479-489.
- Curtis MM & Way SS (2009) Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126(2):177-185.
- Das J, Ren G, Zhang L, Roberts AI, Zhao X, Bothwell AL, Van Kaer L, Shi Y & Das G (2009) Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *J Exp Med* 206(11):2407-2416.
- Deenick EK & Tangye SG (2007) Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunol Cell Biol* 85(7):503-505.
- Dodon MD, Li Z, Hamaia S & Gazzolo L (2004) Tax protein of human T-cell leukaemia virus type 1 induces interleukin 17 gene expression in T cells. *J Gen Virol* 85(Pt 7):1921-1932.

- Dong C (2008) Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunol Rev* 226:80-86.
- Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, Fabien N, Cochat P, Pouteil-Noble C, Trolliet P, Durieu I, Tebib J, Kassai B, Ansieau S, Puisieux A, Eliaou JF & Bonnefoy-Berard N (2009) Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nature immunology* 10(7):778-785.
- Dormitzer PR, Galli G, Castellino F, Golding H, Khurana S, Del Giudice G & Rappuoli R (2011) Influenza vaccine immunology. *Immunol Rev* 239(1):167-177.
- Dubin PJ & Kolls JK (2009) Interleukin-17A and interleukin-17F: a tale of two cytokines. *Immunity* 30(1):9-11.
- Eccles R (2005) Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis* 5(11):718-725.
- El Sahly HM & Keitel WA (2008) Pandemic H5N1 influenza vaccine development: an update. *Expert review of vaccines* 7(2):241-247.
- el-Madhun AS, Cox RJ, Soreide A, Olofsson J & Haaheim LR (1998) Systemic and mucosal immune responses in young children and adults after parenteral influenza vaccination. *J Infect Dis* 178(4):933-939.
- Ellebedy AH & Webby RJ (2009) Influenza vaccines. *Vaccine* 27 Suppl 4:D65-68.
- Fleischer B, Becht H & Rott R (1985) Recognition of viral antigens by human influenza A virus-specific T lymphocyte clones. *J Immunol* 135(4):2800-2804.
- Fleming DM, Crovari P, Wahn U, Klemola T, Schlesinger Y, Langussis A, Oymar K, Garcia ML, Krygier A, Costa H, Heining U, Pregaldien JL, Cheng SM, Skinner J, Razmpour A, Saville M, Gruber WC & Forrest B (2006) Comparison of the efficacy and safety of live attenuated cold-adapted influenza vaccine, trivalent, with trivalent inactivated influenza virus vaccine in children and adolescents with asthma. *Pediatr Infect Dis J* 25(10):860-869.
- Forrest BD, Pride MW, Dunning AJ, Capeding MR, Chotpitayasunondh T, Tam JS, Rappaport R, Eldridge JH & Gruber WC (2008) Correlation of cellular immune responses with protection against culture-confirmed influenza virus in young children. *Clin Vaccine Immunol* 15(7):1042-1053.
- Freytag LC & Clements JD (2005) Mucosal adjuvants. *Vaccine* 23(15):1804-1813.
- Fu TM, Guan L, Friedman A, Schofield TL, Ulmer JB, Liu MA & Donnelly JJ (1999) Dose dependence of CTL precursor frequency induced by a DNA vaccine and correlation with protective immunity against influenza virus challenge. *J Immunol* 162(7):4163-4170.
- Fukuyama S & Kawaoka Y (2011) The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol* 23(4):481-486.

- Gaffen SL (2009) Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 9(8):556-567.
- Garcia-Sastre A (2004) Identification and characterization of viral antagonists of type I interferon in negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 283:249-280.
- Garcia-Sastre A (2011) Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses. *Virus Res* 162(1-2):12-18.
- Gasparini R, Amicizia D, Lai PL & Panatto D (2011) Live attenuated influenza vaccine--a review. *J Prev Med Hyg* 52(3):95-101.
- Gatti S, Faggioni R, Echtenacher B & Ghezzi P (1993) Role of tumour necrosis factor and reactive oxygen intermediates in lipopolysaccharide-induced pulmonary oedema and lethality. *Clin Exp Immunol* 91(3):456-461.
- Gerdil C (2003) The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 21(16):1776-1779.
- Gerhard W (2001) The role of the antibody response in influenza virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 260:171-190.
- Glaser L, Conenello G, Paulson J & Palese P (2007) Effective replication of human influenza viruses in mice lacking a major alpha2,6 sialyltransferase. *Virus Res* 126(1-2):9-18.
- Glatzel A, Wesch D, Schiemann F, Brandt E, Janssen O & Kabelitz D (2002) Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood gamma delta T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V delta 2/V gamma 9 gamma delta T cells. *J Immunol* 168(10):4920-4929.
- Groom JR, Richmond J, Murooka TT, Sorensen EW, Sung JH, Bankert K, von Andrian UH, Moon JJ, Mempel TR & Luster AD (2012) CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation. *Immunity* 37(6):1091-1103.
- Gross PA, Russo C, Dran S, Cataruozolo P, Munk G & Lancey SC (1997) Time to earliest peak serum antibody response to influenza vaccine in the elderly. *Clin Diagn Lab Immunol* 4(4):491-492.
- Grund S, Adams O, Wahlisch S & Schweiger B (2011) Comparison of hemagglutination inhibition assay, an ELISA-based micro-neutralization assay and colorimetric microneutralization assay to detect antibody responses to vaccination against influenza A H1N1 2009 virus. *J Virol Methods* 171(2):369-373.
- Guo H, Kumar P & Malarkannan S (2011) Evasion of natural killer cells by influenza virus. *J Leukoc Biol* 89(2):189-194.
- Haak S, Croxford AL, Kreymborg K, Heppner FL, Pouly S, Becher B & Waisman A (2009) IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest* 119(1):61-69.
- Hale BG, Albrecht RA & Garcia-Sastre A (2010) Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future Microbiol* 5(1):23-41.

- Haller O, Frese M & Kochs G (1998) Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech* 17(1):220-230.
- Hamada H, Garcia-Hernandez Mde L, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinstry KK, Cooper AM, Swain SL & Dutton RW (2009) Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol* 182(6):3469-3481.
- Hamada S, Umemura M, Shiono T, Tanaka K, Yahagi A, Begum MD, Oshiro K, Okamoto Y, Watanabe H, Kawakami K, Roark C, Born WK, O'Brien R, Ikuta K, Ishikawa H, Nakae S, Iwakura Y, Ohta T & Matsuzaki G (2008) IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver. *J Immunol* 181(5):3456-3463.
- Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, Odden AR, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S & Kolls JK (2005) Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* 202(6):761-769.
- Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, Shellito JE, Schurr JR, Bagby GJ, Nelson S & Kolls JK (2003) Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol* 170(9):4432-4436.
- Hayden FG & Palese P (2009) *Clinical Virology*. Amer Society for Microbiology, 3 Ed. p 943-976.
- Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC & Mills KH (2006) TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* 177(11):7980-7989.
- Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T, Ito H, Nakamura T, Sakaguchi N & Sakaguchi S (2007) Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *The Journal of experimental medicine* 204(12):2803-2812.
- Hou W, Kang HS & Kim BS (2009) Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection. *J Exp Med* 206(2):313-328.
- Ibricevic A, Pekosz A, Walter MJ, Newby C, Battaile JT, Brown EG, Holtzman MJ & Brody SL (2006) Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. *J Virol* 80(15):7469-7480.
- Intlekofer AM, Banerjee A, Takemoto N, Gordon SM, Dejong CS, Shin H, Hunter CA, Wherry EJ, Lindsten T & Reiner SL (2008) Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* 321(5887):408-411.
- Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H, Sudo K, Nakae S, Sasakawa C & Iwakura Y (2009) Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucosal bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 30(1):108-119.
- Ivashkiv LB & Donlin LT (2014) Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14(1):36-49.

- Iwakura Y, Nakae S, Saijo S & Ishigame H (2008) The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev* 226:57-79.
- Iwasaki A & Pillai PS (2014) Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol* 14(5):315-328.
- Jegaskanda S, Reading PC & Kent SJ (2014) Influenza-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity: Toward a Universal Influenza Vaccine. *The Journal of Immunology* 193(2):469-475.
- Jin W & Dong C (2013) IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect* 2:e60.
- Johnson PR, Feldman S, Thompson JM, Mahoney JD & Wright PF (1986) Immunity to influenza A virus infection in young children: a comparison of natural infection, live cold-adapted vaccine, and inactivated vaccine. *J Infect Dis* 154(1):121-127.
- Jones CE & Chan K (2002) Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 26(6):748-753.
- Jones T, Adamovicz JJ, Cyr SL, Bolt CR, Bellerose N, Pitt LM, Lowell GH & Burt DS (2006) Intranasal Protollin/F1-V vaccine elicits respiratory and serum antibody responses and protects mice against lethal aerosolized plague infection. *Vaccine* 24(10):1625-1632.
- Jones T, Allard F, Cyr SL, Tran SP, Plante M, Gauthier J, Bellerose N, Lowell GH & Burt DS (2003) A nasal Proteosome influenza vaccine containing baculovirus-derived hemagglutinin induces protective mucosal and systemic immunity. *Vaccine* 21(25-26):3706-3712.
- Jones T, Cyr S, Allard F, Bellerose N, Lowell GH & Burt DS (2004) Protollin: a novel adjuvant for intranasal vaccines. *Vaccine* 22(27-28):3691-3697.
- Kang HM, Choi JG, Kim KI, Kim BS, Batchuluun D, Erdene-Ochir TO, Kim MC, Kwon JH, Park CK & Lee YJ (2013) Pathogenicity in domestic ducks and mice of highly pathogenic H5N1 clade 2.3.2.1 influenza viruses recently circulating in Eastern Asia. *Vet Microbiol* 167(3-4):327-333.
- Kang SM, Kim MC & Compans RW (2012) Virus-like particles as universal influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 11(8):995-1007.
- Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, Harper RW & Wu R (2004) IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J Immunol* 173(5):3482-3491.
- Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM & Perez-Schael I (1996) Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis* 174 Suppl 1:S65-72.
- Kaplan MH (2013) Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev* 252(1):104-115.

- Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O & Akira S (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23(1):19-28.
- Kawaguchi M, Kokubu F, Kuga H, Matsukura S, Hoshino H, Ieki K, Imai T, Adachi M & Huang SK (2001) Modulation of bronchial epithelial cells by IL-17. *The Journal of allergy and clinical immunology* 108(5):804-809.
- Kersten GA & Jiskoot W (2011) C1 Vaccines. *Principles of Immunopharmacology*, Nijkamp FP & Parnham MJ (Édit.) Birkhäuser Basel, 10.1007/978-3-0346-0136-8_16. p 255-270.
- Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD & Cooper AM (2007) IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* 8(4):369-377.
- Khader SA, Gaffen SL & Kolls JK (2009) Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol* 2(5):403-411.
- Khader SA, Pearl JE, Sakamoto K, Gilmartin L, Bell GK, Jelley-Gibbs DM, Ghilardi N, deSaugave F & Cooper AM (2005) IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* 175(2):788-795.
- Kohlmeier JE & Woodland DL (2009) Immunity to respiratory viruses. *Annu Rev Immunol* 27:61-82.
- Kohyama S, Ohno S, Isoda A, Moriya O, Belladonna ML, Hayashi H, Iwakura Y, Yoshimoto T, Akatsuka T & Matsui M (2007) IL-23 enhances host defense against vaccinia virus infection via a mechanism partly involving IL-17. *J Immunol* 179(6):3917-3925.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M & Kuchroo VK (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448(7152):484-487.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M & Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
- Korsman S (2006) Vaccines. *Influenza Report*, Flying Publisher. p 127-149.
- Kreijtz JH, Fouchier RA & Rimmelzwaan GF (2011) Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res* 162(1-2):19-30.
- Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, Lum K, Harder B, Okada S, Ostrander CD, Kreindler JL, Auja SJ, Reardon B, Moore M, Shea P, Schreckhise R, Bukowski TR, Presnell S, Guerra-Lewis P, Parrish-Novak J, Ellsworth JL, Jaspers S, Lewis KE, Appleby M, Kolls JK, Rixon M, West JW, Gao Z & Levin SD (2007) Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J Immunol* 179(8):5462-5473.

- Kuiken T, Riteau B, Fouchier RA & Rimmelzwaan GF (2012) Pathogenesis of influenza virus infections: the good, the bad and the ugly. *Curr Opin Virol* 2(3):276-286.
- Kumagai Y, Takeuchi O & Akira S (2008) Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother* 14(2):86-92.
- Kumar P, Chen K & Kolls JK (2013) Th17 cell based vaccines in mucosal immunity. *Current opinion in immunology* 25(3):373-380.
- Kunzel W, Glathe H, Engelmann H & Van Hoecke C (1996) Kinetics of humoral antibody response to trivalent inactivated split influenza vaccine in subjects previously vaccinated or vaccinated for the first time. *Vaccine* 14(12):1108-1110.
- Kutzler MA & Weiner DB (2008) DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 9(10):776-788.
- Kwok SK, Cho ML, Her YM, Oh HJ, Park MK, Lee SY, Woo YJ, Ju JH, Park KS, Kim HY & Park SH (2012) TLR2 ligation induces the production of IL-23/IL-17 via IL-6, STAT3 and NF- κ B pathway in patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 14(2):R64.
- Laddy DJ, Yan J, Kutzler M, Kobasa D, Kobinger GP, Khan AS, Greenhouse J, Sardesai NY, Draghia-Akli R & Weiner DB (2008) Heterosubtypic protection against pathogenic human and avian influenza viruses via in vivo electroporation of synthetic consensus DNA antigens. *PLoS One* 3(6):e2517.
- Lalor PA, Webby RJ, Morrow J, Rusalov D, Kaslow DC, Rolland A & Smith LR (2008) Plasmid DNA-based vaccines protect mice and ferrets against lethal challenge with A/Vietnam/1203/04 (H5N1) influenza virus. *J Infect Dis* 197(12):1643-1652.
- Lamb JR, Woody JN, Hartzman RJ & Eckels DD (1982) In vitro influenza virus-specific antibody production in man: antigen-specific and HLA-restricted induction of helper activity mediated by cloned human T lymphocytes. *J Immunol* 129(4):1465-1470.
- Lambert LC & Fauci AS (2010) Influenza vaccines for the future. *N Engl J Med* 363(21):2036-2044.
- Lamm ME (1997) Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 51:311-340.
- Langley JM, Aoki F, Ward BJ, McGeer A, Angel JB, Stiver G, Gorfinkel I, Shu D, White L, Lasko B, Dzungowski P, Papp K, Alexander M, Boivin G & Fries L (2011) A nasally administered trivalent inactivated influenza vaccine is well tolerated, stimulates both mucosal and systemic immunity, and potentially protects against influenza illness. *Vaccine* 29(10):1921-1928.
- Langley JM, Halperin SA, McNeil S, Smith B, Jones T, Burt D, Mallett CP, Lowell GH & Fries L (2006) Safety and immunogenicity of a Proteosome -trivalent inactivated influenza vaccine, given nasally to healthy adults. *Vaccine* 24(10):1601-1608.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA & Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201(2):233-240.

- Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA & Cua DJ (2004) IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 202:96-105.
- Lankford CS & Frucht DM (2003) A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. *J Leukoc Biol* 73(1):49-56.
- Lee CK, Rao DT, Gertner R, Gimeno R, Frey AB & Levy DE (2000) Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *J Immunol* 165(7):3571-3577.
- Lee JB, Jang JE, Song MK & Chang J (2009) Intranasal delivery of cholera toxin induces th17-dominated T-cell response to bystander antigens. *PLoS One* 4(4):e5190.
- Lee KA, Kang MH, Lee YS, Kim YJ, Kim DH, Ko HJ & Kang CY (2008) A distinct subset of natural killer T cells produces IL-17, contributing to airway infiltration of neutrophils but not to airway hyperreactivity. *Cell Immunol* 251(1):50-55.
- Lee YT, Kim KH, Ko EJ, Lee YN, Kim MC, Kwon YM, Tang Y, Cho MK, Lee YJ & Kang SM (2014) New vaccines against influenza virus. *Clin Exp Vaccine Res* 3(1):12-28.
- Leon B & Lund FE (2013) IL-17-producing B cells combat parasites. *Nat Immunol* 14(5):419-421.
- Leppkes M, Becker C, Ivanov, II, Hirth S, Wirtz S, Neufert C, Pouly S, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Becher B, Littman DR & Neurath MF (2009) RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 136(1):257-267.
- Levi R, Aboud-Pirak E, Leclerc C, Lowell GH & Arnon R (1995) Intranasal immunization of mice against influenza with synthetic peptides anchored to proteosomes. *Vaccine* 13(14):1353-1359.
- Li Wan Po A, Rogers E, Shepphard M & Scott EM (1995) Delivery systems for non-parenteral vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 18(1):101-109.
- Lin Y, Slight SR & Khader SA (2010) Th17 cytokines and vaccine-induced immunity. *Semin Immunopathol* 32(1):79-90.
- Lockhart E, Green AM & Flynn JL (2006) IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 177(7):4662-4669.
- Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC & von Stebut E (2009) IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* 182(5):3039-3046.
- Lowell GH, Burt D, White GL & Fries L (2004) Proteosome™ Technology for Vaccines and Adjuvants. *New Generation Vaccines*, Dekker M (Édit.) Marcel Dekker, Third Edition Ed. p 271-282.
- Lowell GH, Smith LF, Seid RC & Zollinger WD (1988) Peptides bound to proteosomes via hydrophobic feet become highly immunogenic without adjuvants. *J Exp Med* 167(2):658-663.

- Lu YJ, Gross J, Bogaert D, Finn A, Bagrade L, Zhang Q, Kolls JK, Srivastava A, Lundgren A, Forte S, Thompson CM, Harney KF, Anderson PW, Lipsitch M & Malley R (2008) Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog* 4(9):e1000159.
- Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA & van den Berg WB (2004) Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 50(2):650-659.
- Lynch EC, Blake MS, Gotschlich EC & Mauro A (1984) Studies of Porins: Spontaneously Transferred from Whole Cells and Reconstituted from Purified Proteins of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Biophys J* 45(1):104-107.
- Ma CS, Deenick EK, Batten M & Tangye SG (2012) The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* 209(7):1241-1253.
- Maertzdorf J, Osterhaus AD & Verjans GM (2002) IL-17 expression in human herpetic stromal keratitis: modulatory effects on chemokine production by corneal fibroblasts. *J Immunol* 169(10):5897-5903.
- Mahmood K, Bright RA, Mytle N, Carter DM, Crevar CJ, Achenbach JE, Heaton PM, Tumpey TM & Ross TM (2008) H5N1 VLP vaccine induced protection in ferrets against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Vaccine* 26(42):5393-5399.
- Manicassamy B, Medina RA, Hai R, Tsibane T, Stertz S, Nistal-Villan E, Palese P, Basler CF & Garcia-Sastre A (2010) Protection of mice against lethal challenge with 2009 H1N1 influenza A virus by 1918-like and classical swine H1N1 based vaccines. *PLoS Pathog* 6(1):e1000745.
- Maroof A, Yorgensen YM, Li Y & Evans JT (2014) Intranasal vaccination promotes detrimental Th17-mediated immunity against influenza infection. *PLoS Pathog* 10(1):e1003875.
- Marshall JD, Heeke DS, Abbate C, Yee P & Van Nest G (2006) Induction of interferon-gamma from natural killer cells by immunostimulatory CpG DNA is mediated through plasmacytoid-dendritic-cell-produced interferon-alpha and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 117(1):38-46.
- Marwaha AK, Leung NJ, McMurchy AN & Levings MK (2012) TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Front Immunol* 3:129.
- Massari P, Henneke P, Ho Y, Latz E, Golenbock DT & Wetzler LM (2002) Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* 168(4):1533-1537.
- Massari P, Ram S, Macleod H & Wetzler LM (2003) The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. *Trends Microbiol* 11(2):87-93.
- McAleer JP & Kolls JK (2011) Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. *Journal of leukocyte biology* 90(2):263-270.

- McCullers JA (2014) The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat Rev Microbiol* 12(4):252-262.
- McGill J, Heusel JW & Legge KL (2009) Innate immune control and regulation of influenza virus infections. *J Leukoc Biol* 86(4):803-812.
- McKinstry KK, Strutt TM, Buck A, Curtis JD, Dibble JP, Huston G, Tighe M, Hamada H, Sell S, Dutton RW & Swain SL (2009) IL-10 deficiency unleashes an influenza-specific Th17 response and enhances survival against high-dose challenge. *J Immunol* 182(12):7353-7363.
- McLain L & Dimmock NJ (1991) An influenza haemagglutinin-specific IgG enhances class I MHC-restricted CTL killing in vitro. *Immunology* 73(1):12-18.
- McNamee LA & Harmsen AG (2006) Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 74(12):6707-6721.
- Medina RA, Manicassamy B, Stertz S, Seibert CW, Hai R, Belshe RB, Frey SE, Basler CF, Palese P & Garcia-Sastre A (2010) Pandemic 2009 H1N1 vaccine protects against 1918 Spanish influenza virus. *Nat Commun* 1:28.
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1(2):135-145.
- Meeks KD, Sieve AN, Kolls JK, Ghilardi N & Berg RE (2009) IL-23 is required for protection against systemic infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 183(12):8026-8034.
- Miyamoto M, Prause O, Sjostrand M, Laan M, Lotvall J & Linden A (2003) Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol* 170(9):4665-4672.
- Modlin JF (2004) Poliomyelitis in the United States: the final chapter? *JAMA* 292(14):1749-1751.
- Mohan T, Verma P & Rao DN (2013) Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *Indian J Med Res* 138(5):779-795.
- Molesworth-Kenyon SJ, Yin R, Oakes JE & Lausch RN (2008) IL-17 receptor signaling influences virus-induced corneal inflammation. *J Leukoc Biol* 83(2):401-408.
- Monto AS, Ohmit SE, Petrie JG, Johnson E, Truscon R, Teich E, Rotthoff J, Boulton M & Victor JC (2009) Comparative efficacy of inactivated and live attenuated influenza vaccines. *N Engl J Med* 361(13):1260-1267.
- Morens DM, Taubenberger JK & Fauci AS (2008) Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis* 198(7):962-970.
- Mori I, Komatsu T, Takeuchi K, Nakakuki K, Sudo M & Kimura Y (1995) In vivo induction of apoptosis by influenza virus. *J Gen Virol* 76 (Pt 11):2869-2873.
- Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L & Reddi AH (2003) Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(2):155-174.

- Moskophidis D & Kioussis D (1998) Contribution of virus-specific CD8+ cytotoxic T cells to virus clearance or pathologic manifestations of influenza virus infection in a T cell receptor transgenic mouse model. *J Exp Med* 188(2):223-232.
- Mount AM & Belz GT (2010) Mouse models of viral infection: influenza infection in the lung. *Methods Mol Biol* 595:299-318.
- Mozdzanowska K, Furchner M, Washko G, Mozdzanowski J & Gerhard W (1997) A pulmonary influenza virus infection in SCID mice can be cured by treatment with hemagglutinin-specific antibodies that display very low virus-neutralizing activity in vitro. *J Virol* 71(6):4347-4355.
- Munier S, Moisy D, Marc D & Naffakh N (2010) [Interspecies transmission, adaptation to humans and pathogenicity of animal influenza viruses]. *Pathol Biol (Paris)* 58(2):e59-68.
- Muranski P & Restifo NP (2013) Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* 121(13):2402-2414.
- Murphy BR & Clements ML (1989) The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 146:107-116.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD & Cua DJ (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198(12):1951-1957.
- Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M & Iwakura Y (2002) Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17(3):375-387.
- Nakae S, Nambu A, Sudo K & Iwakura Y (2003a) Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171(11):6173-6177.
- Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S & Iwakura Y (2003b) IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10):5986-5990.
- Neutra MR & Kozlowski PA (2006) Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 6(2):148-158.
- Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE & Biron CA (2002) Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* 169(8):4279-4287.
- Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q & Dong C (2008) Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29(1):138-149.
- O'Connor W, Jr., Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, Kolls JK & Flavell RA (2009) A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 10(6):603-609.

- O'Hagan DT & Rappuoli R (2004) Novel approaches to vaccine delivery. *Pharm Res* 21(9):1519-1530.
- O'Quinn DB, Palmer MT, Lee YK & Weaver CT (2008) Emergence of the Th17 pathway and its role in host defense. *Adv Immunol* 99:115-163.
- Ogawa A, Andoh A, Araki Y, Bamba T & Fujiyama Y (2004) Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol* 110(1):55-62.
- Ohmit SE, Victor JC, Teich ER, Truscon RK, Rotthoff JR, Newton DW, Campbell SA, Boulton ML & Monto AS (2008) Prevention of symptomatic seasonal influenza in 2005-2006 by inactivated and live attenuated vaccines. *J Infect Dis* 198(3):312-317.
- Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, Hara H, Nakae S, Iwakura Y & Matsuzaki G (2010) Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol* 184(8):4414-4422.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q & Dong C (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6(11):1133-1141.
- Parsey MV, Tuder RM & Abraham E (1998) Neutrophils are major contributors to intraparenchymal lung IL-1 beta expression after hemorrhage and endotoxemia. *J Immunol* 160(2):1007-1013.
- Perez O, Bracho G, Lastre M, Mora N, del Campo J, Gil D, Zayas C, Acevedo R, Gonzalez D, Lopez JA, Taboada C, Turtle C & Solis RL (2004) Novel adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure containing native lipopolysaccharide as a pathogen-associated molecular pattern. *Immunol Cell Biol* 82(6):603-610.
- Perez-Shibayama C, Gil-Cruz C & Ludewig B (2014) Plasticity and complexity of B cell responses against persisting pathogens. *Immunology letters* 10.1016/j.imlet.2014.07.003.
- Petrovsky N & Aguilar JC (2004) Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 82(5):488-496.
- Pfleiderer M, Lower J & Kurth R (2001) Cold-attenuated live influenza vaccines, a risk-benefit assessment. *Vaccine* 20(5-6):886-894.
- Pittet LA, Hall-Stoodley L, Rutkowski MR & Harmsen AG (2010) Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42(4):450-460.
- Plante M, Jones T, Allard F, Torossian K, Gauthier J, St-Felix N, White GL, Lowell GH & Burt DS (2001) Nasal immunization with subunit proteosome influenza vaccines induces serum HAI, mucosal IgA and protection against influenza challenge. *Vaccine* 20(1-2):218-225.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B & Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282(5396):2085-2088.

- Prause O, Laan M, Lotvall J & Linden A (2003) Pharmacological modulation of interleukin-17-induced GCP-2-, GRO-alpha- and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells. *European journal of pharmacology* 462(1-3):193-198.
- Price AE, Reinhardt RL, Liang HE & Locksley RM (2012) Marking and quantifying IL-17A-producing cells in vivo. *PLoS One* 7(6):e39750.
- Quan FS, Huang C, Compans RW & Kang SM (2007) Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. *J Virol* 81(7):3514-3524.
- Re F & Strominger JL (2001) Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* 276(40):37692-37699.
- Renegar KB & Small PA, Jr. (1991) Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. *J Immunol* 146(6):1972-1978.
- Renegar KB, Small PA, Jr., Boykins LG & Wright PF (2004) Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *J Immunol* 173(3):1978-1986.
- Rimmelzwaan GF & McElhaney JE (2008) Correlates of protection: novel generations of influenza vaccines. *Vaccine* 26 Suppl 4:D41-44.
- Rossman JS & Lamb RA (2011) Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411(2):229-236.
- Rowe T, Abernathy RA, Hu-Primmer J, Thompson WW, Lu X, Lim W, Fukuda K, Cox NJ & Katz JM (1999) Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol* 37(4):937-943.
- Rudner XL, Happel KI, Young EA & Shellito JE (2007) Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 75(6):3055-3061.
- Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A, Fujikado N, Kusaka T, Kubo S, Chung SH, Komatsu R, Miura N, Adachi Y, Ohno N, Shibuya K, Yamamoto N, Kawakami K, Yamasaki S, Saito T, Akira S & Iwakura Y (2010) Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity* 32(5):681-691.
- Scherle PA, Palladino G & Gerhard W (1992) Mice can recover from pulmonary influenza virus infection in the absence of class I-restricted cytotoxic T cells. *J Immunol* 148(1):212-217.
- Schumann J, Muller U & Blessing M (2012) TGF-beta signaling in T cells is not essential for Th17 cell development in the mouse. *J Biol Regul Homeost Agents* 26(3):357-366.
- Shibui A, Shimura E, Nambu A, Yamaguchi S, Leonard WJ, Okumura K, Sugano S, Sudo K & Nakae S (2012) Th17 cell-derived IL-17 is dispensable for B cell antibody production. *Cytokine* 59(1):108-114.
- Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N & Kawaoka Y (2006) Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440(7083):435-436.
- Siegrist CA (2008) Vaccine immunology. *Vaccines*, Saunders/Elsevier, 5 Ed. p 17-36.

- Singleton TE, Massari P & Wetzler LM (2005) Neisserial porin-induced dendritic cell activation is MyD88 and TLR2 dependent. *J Immunol* 174(6):3545-3550.
- Smith E, Zarbock A, Stark MA, Burcin TL, Bruce AC, Foley P & Ley K (2007) IL-23 is required for neutrophil homeostasis in normal and neutrophilic mice. *J Immunol* 179(12):8274-8279.
- Soghoian DZ & Streeck H (2010) Cytolytic CD4(+) T cells in viral immunity. *Expert Rev Vaccines* 9(12):1453-1463.
- Sonnenberg GF & Weiner DB (2009) Manipulation of T(H)17 responses in pulmonary immunity and disease through vaccination. *Hum Vaccin* 5(8):510-519.
- Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS & Ley K (2005) Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22(3):285-294.
- Stephenson I & Zambon M (2002) The epidemiology of influenza. *Occup Med (Lond)* 52(5):241-247.
- Stritesky GL, Yeh N & Kaplan MH (2008) IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol* 181(9):5948-5955.
- Suzuki Y (2005) Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* 28(3):399-408.
- Talbot TR, Crocker DD, Peters J, Doersam JK, Ikizler MR, Sannella E, Wright PE & Edwards KM (2005) Duration of virus shedding after trivalent intranasal live attenuated influenza vaccination in adults. *Infect Control Hosp Epidemiol* 26(5):494-500.
- Tamura S, Yamanaka A, Shimohara M, Tomita T, Komase K, Tsuda Y, Suzuki Y, Nagamine T, Kawahara K, Danbara H & et al. (1994) Synergistic action of cholera toxin B subunit (and Escherichia coli heat-labile toxin B subunit) and a trace amount of cholera whole toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 12(5):419-426.
- Tan C & Gery I (2012) The unique features of Th9 cells and their products. *Crit Rev Immunol* 32(1):1-10.
- Tay CH, Szomolanyi-Tsuda E & Welsh RM (1998) Control of infections by NK cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 230:193-220.
- Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE & Donis RO (2012) A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(11):4269-4274.
- Topham DJ, Tripp RA & Doherty PC (1997) CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *J Immunol* 159(11):5197-5200.
- Tosh PK, Boyce TG & Poland GA (2008) Flu myths: dispelling the myths associated with live attenuated influenza vaccine. *Mayo Clin Proc* 83(1):77-84.

- Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J, Tocker J & Peschon J (2006) Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol* 177(1):36-39.
- Treanor J, Nolan C, O'Brien D, Burt D, Lowell G, Linden J & Fries L (2006) Intranasal administration of a proteasome-influenza vaccine is well-tolerated and induces serum and nasal secretion influenza antibodies in healthy human subjects. *Vaccine* 24(3):254-262.
- Treanor JJ, Tierney EL, Zebedee SL, Lamb RA & Murphy BR (1990) Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *J Virol* 64(3):1375-1377.
- Tsai TF (2013) Fluad(R)-MF59(R)-Adjuvanted Influenza Vaccine in Older Adults. *Infect Chemother* 45(2):159-174.
- Tu W, Zheng J, Liu Y, Sia SF, Liu M, Qin G, Ng IH, Xiang Z, Lam KT, Peiris JS & Lau YL (2011) The aminobisphosphonate pamidronate controls influenza pathogenesis by expanding a gammadelta T cell population in humanized mice. *J Exp Med* 208(7):1511-1522.
- Tuma P & Hubbard AL (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* 83(3):871-932.
- van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, van der Meer JW, Joosten LA & Netea MG (2009) Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep* 42(12):776-787.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM & Stockinger B (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24(2):179-189.
- Vollmer J, Jurk M, Samulowitz U, Lipford G, Forsbach A, Wullner M, Tluk S, Hartmann H, Kritzler A, Muller C, Schetter C & Krieg AM (2004) CpG oligodeoxynucleotides stimulate IFN-gamma-inducible protein-10 production in human B cells. *Journal of endotoxin research* 10(6):431-438.
- von Vietinghoff S & Ley K (2009) IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J Immunol* 183(2):865-873.
- Waffarn EE & Baumgarth N (2011) Protective B cell responses to flu--no fluke! *J Immunol* 186(7):3823-3829.
- Waibler Z, Kalinke U, Will J, Juan MH, Pfeilschifter JM & Radeke HH (2007) TLR-ligand stimulated interleukin-23 subunit expression and assembly is regulated differentially in murine plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Molecular immunology* 44(7):1483-1489.
- Waite JC & Skokos D (2012) Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int J Inflam* 2012:819467.
- Wang M, Lamberth K, Harndahl M, Roder G, Stryhn A, Larsen MV, Nielsen M, Lundegaard C, Tang ST, Dziegiel MH, Rosenkvist J, Pedersen AE, Buus S, Claesson MH & Lund O

- (2007) CTL epitopes for influenza A including the H5N1 bird flu; genome-, pathogen-, and HLA-wide screening. *Vaccine* 25(15):2823-2831.
- Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z & Sun PD (2012) Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol* 91(2):299-309.
- Wang X, Chan CC, Yang M, Deng J, Poon VK, Leung VH, Ko KH, Zhou J, Yuen KY, Zheng BJ & Lu L (2011) A critical role of IL-17 in modulating the B-cell response during H5N1 influenza virus infection. *Cell Mol Immunol* 8(6):462-468.
- Watanabe N, Narita M, Yokoyama A, Sekiguchi A, Saito A, Tochiki N, Furukawa T, Toba K, Aizawa Y & Takahashi M (2006) Type I IFN-mediated enhancement of anti-leukemic cytotoxicity of gammadelta T cells expanded from peripheral blood cells by stimulation with zoledronate. *Cytotherapy* 8(2):118-129.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR & Harrington LE (2007) IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25:821-852.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM & Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56(1):152-179.
- Werninghaus K, Babiak A, Gross O, Holscher C, Dietrich H, Agger EM, Mages J, Mocsai A, Schoenen H, Finger K, Nimmerjahn F, Brown GD, Kirschning C, Heit A, Andersen P, Wagner H, Ruland J & Lang R (2009) Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit Mycobacterium tuberculosis vaccination requires FcRgamma-Syk-Card9-dependent innate immune activation. *The Journal of experimental medicine* 206(1):89-97.
- Wetzler LM (2010) Innate immune function of the neisserial porins and the relationship to vaccine adjuvant activity. *Future Microbiol* 5(5):749-758.
- Wetzler LM, Ho Y & Reiser H (1996) Neisserial porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate. *J Exp Med* 183(3):1151-1159.
- WHO (2014) Influenza (Seasonal) Fact sheet N°211.
- Wiehler S & Proud D (2007) Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293(2):L505-515.
- Wiley JA, Cerwenka A, Harkema JR, Dutton RW & Harmsen AG (2001) Production of interferon-gamma by influenza hemagglutinin-specific CD8 effector T cells influences the development of pulmonary immunopathology. *Am J Pathol* 158(1):119-130.
- Williman J, Young S, Buchan G, Slobbe L, Wilson M, Pang P, Austyn J, Preston S & Baird M (2008) DNA fusion vaccines incorporating IL-23 or RANTES for use in immunization against influenza. *Vaccine* 26(40):5153-5158.
- Witowski J, Pawlaczyk K, Breborowicz A, Scheuren A, Kuzlan-Pawlaczyk M, Wisniewska J, Polubinska A, Friess H, Gahl GM, Frei U & Jorres A (2000) IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. *J Immunol* 165(10):5814-5821.

- Wright PF, Neumann G & Kawaoka Y (2007) Orthomyxoviruses. *Fields Virology*, Lippincott-Raven Publishers, 5 Ed Vol 2. p 1691-1740.
- Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torres RM & Chu HW (2007) IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect* 9(1):78-86.
- Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI & Spriggs MK (1995) Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 3(6):811-821.
- Ye P, Garvey PB, Zhang P, Nelson S, Bagby G, Summer WR, Schwarzenberger P, Shellito JE & Kolls JK (2001a) Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(3):335-340.
- Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ & Kolls JK (2001b) Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXCL chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194(4):519-527.
- Yoshida H, Miyazaki Y, Wang S & Hamano S (2007) Regulation of defense responses against protozoan infection by interleukin-27 and related cytokines. *J Biomed Biotechnol* 2007(3):79401.
- Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Roopenian DC, Lencer WI & Blumberg RS (2004) Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* 20(6):769-783.
- Youngner JS, Treanor JJ, Betts RF & Whitaker-Dowling P (1994) Effect of simultaneous administration of cold-adapted and wild-type influenza A viruses on experimental wild-type influenza infection in humans. *Journal of clinical microbiology* 32(3):750-754.
- Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, Evans RT & Gaffen SL (2007) An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* 109(9):3794-3802.
- Yue FY, Merchant A, Kovacs CM, Loutfy M, Persad D & Ostrowski MA (2008) Virus-specific interleukin-17-producing CD4⁺ T cells are detectable in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 82(13):6767-6771.
- Zambon MC (1999) Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother* 44 Suppl B:3-9.
- Zambon MC (2001) The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol* 11(4):227-241.
- Zheng J, Liu Y, Lau YL & Tu W (2013) gammadelta-T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity. *Cell Mol Immunol* 10(1):50-57.

Zheng SG (2013) Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? *American journal of clinical and experimental immunology* 2(1):94-106.

Zygmunt BM, Rharbaoui F, Groebe L & Guzman CA (2009) Intranasal immunization promotes th17 immune responses. *J Immunol* 183(11):6933-6938.