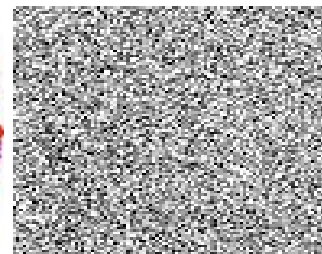
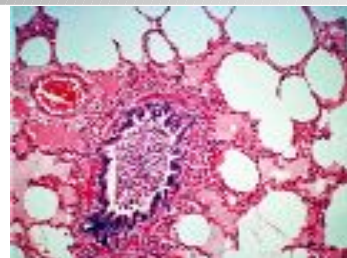


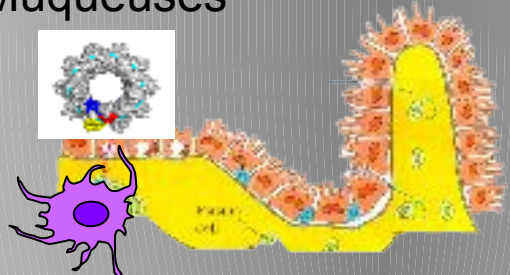
Des nanostructures protéiques en vaccinologie vétérinaire



Sabine Riffault, DR2 INRA
Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires (UR892)
Centre INRA de Jouy-en-Josas

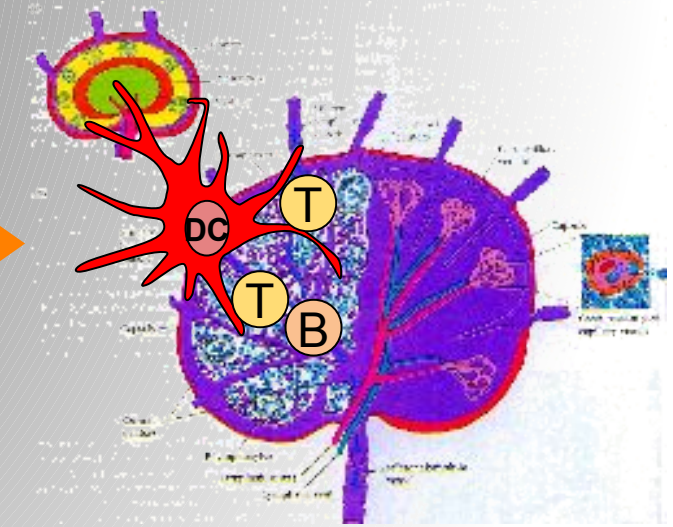
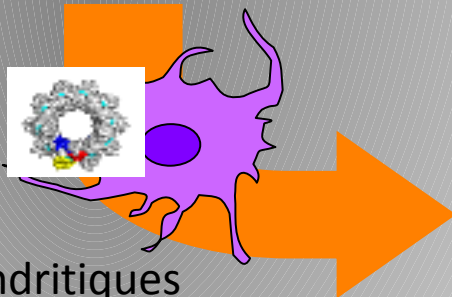
La taille et la géométrie sont des paramètres clés pour l'efficacité d'un vaccin de type sous-unitaire

Muqueuses



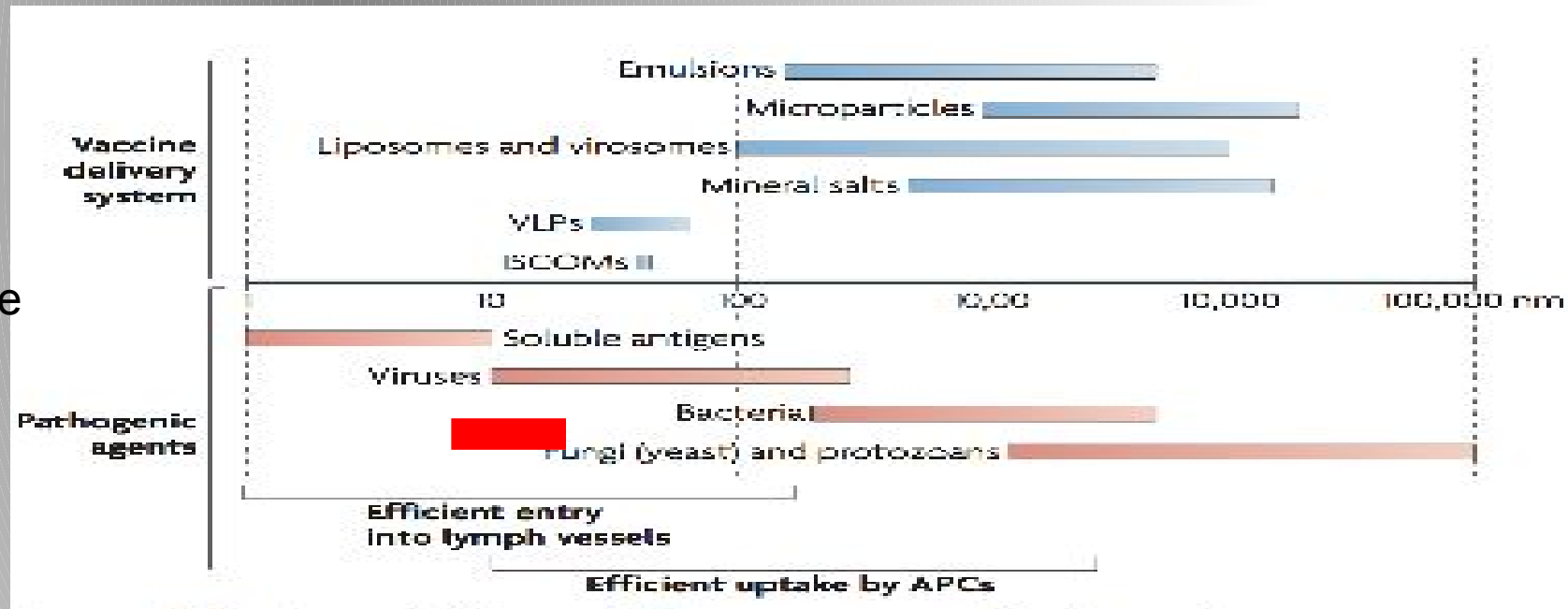
Interaction Antigène – cellule dendritique:
Capture dans les tissus, **transport lymphatique** des tissus vers les ganglions, lieu de la **présentation antigénique**

Cellules dendritiques



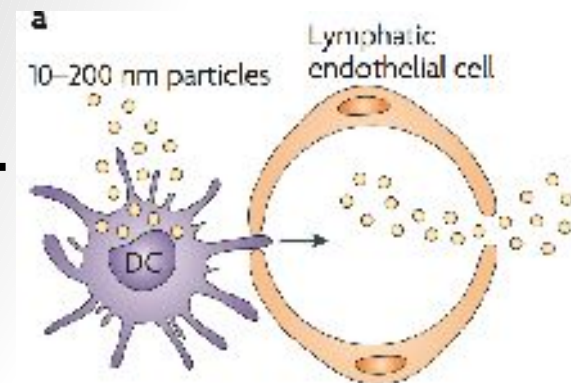
Ganglion lymphatique drainant

Deux modes de transport vers les ganglions pour les nanoparticules (NPs, VLPs)



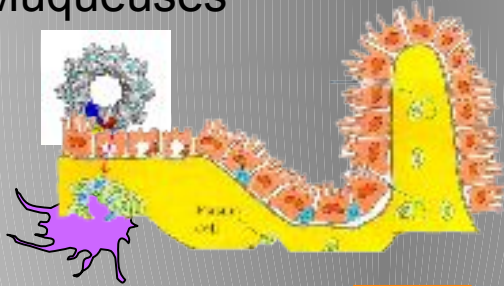
Entrée dans les vaisseaux lymphatiques

Prise en charge par les DCs



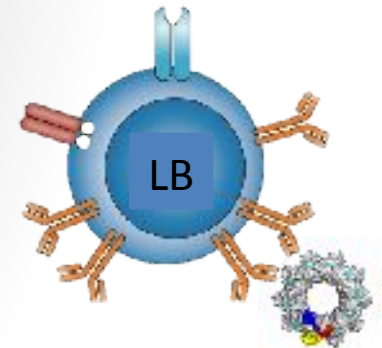
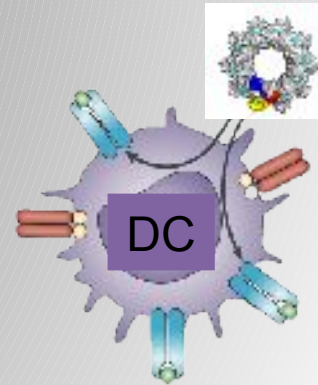
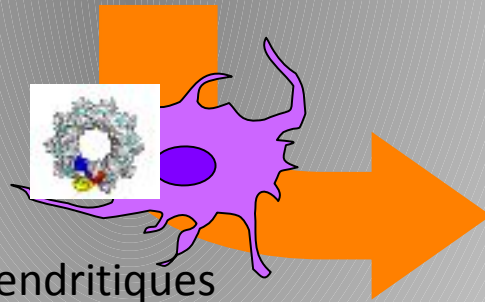
Deux modes de présentation dans les ganglions pour les nanoparticules (NPs, VLPs)

Muqueuses



Interaction Antigène – cellule dendritique:
Capture dans les tissus, **transport lymphatique**
des tissus vers les ganglions, lieu de la
présentation antigénique

Cellules dendritiques



Les nano-particules virales comme les « Virus like Particle » ont une conformation antigénique native (qui mime une partie du virus)

Motifs hautement répétés et taille nanométrique (20-200 nm)
« immunogénicité »

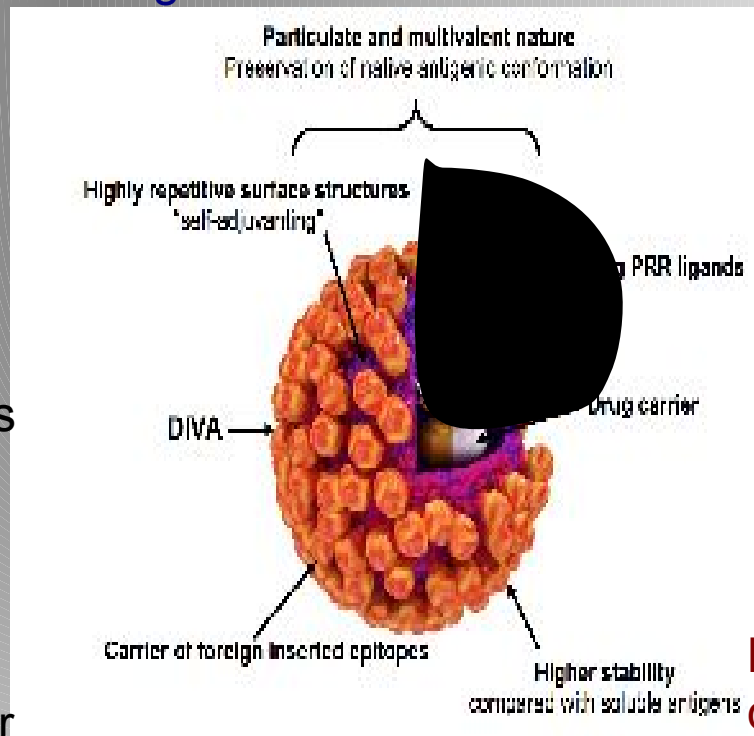
Motifs PAMPs (motifs microbiens)
Reconnus par les récepteurs innés (PRRs)

Particules non répliquatives
= Sûreté

Meilleure stabilité
que les antigènes solubles

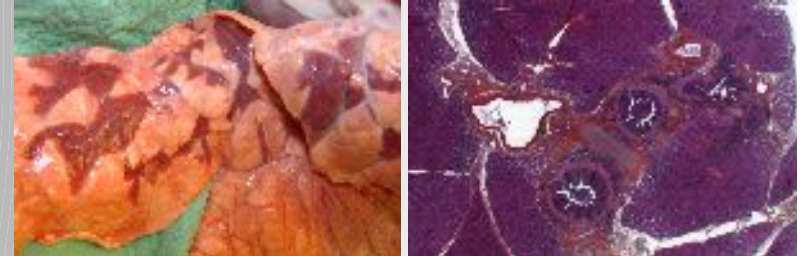
Propriété DIVA
(différence entre animaux vaccinés et infectés)

Possibilité d'insérer des épitopes hétérologues



Le virus respiratoire syncytial (VRS)

Agent pathogène du complexe respiratoire bovin



**Lésions
macroscopiques**

**Inflammation des
bronches**

*Infection expérimentale d'un veau avec du VRSb
S.Riffault et al., Vaccine 2010*

- Période néonatale et d'engraissement → stress
- Bronchopneumonie = 75-80% des maladies observées pendant cette période
- Signes cliniques : hyperthermie, perte de poids, écoulements nasaux et oculaires, toux, tachypnée...

- Impact bronchopneumonies dans les élevages (prévalence 70%, mortalité ≈ 3% mais jusqu'à 20%)



3 milliards \$



500 millions €

- Des vaccins vétérinaires contre le VRSb existent mais avec une efficacité limitée

Antigènes du VRS et protection immunitaire





Glycoprotéines d'enveloppe

-  G Attachment
-  F Fusion

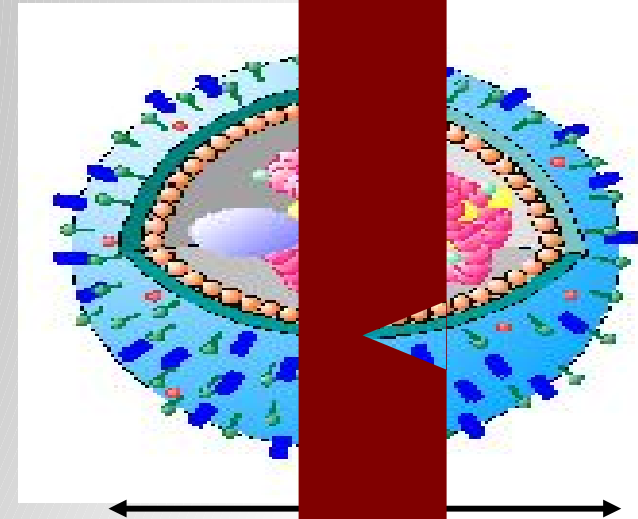
**Anticorps
neutralisants**

**Cibles vaccinales
(sous-unitaire / vectorisé)**

Nucléocapside

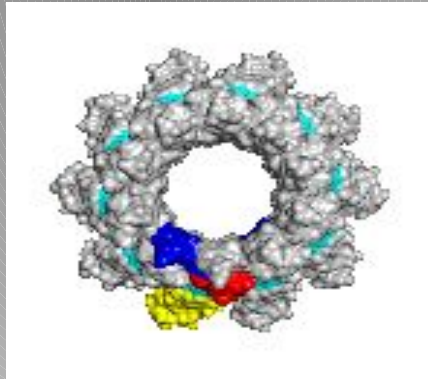
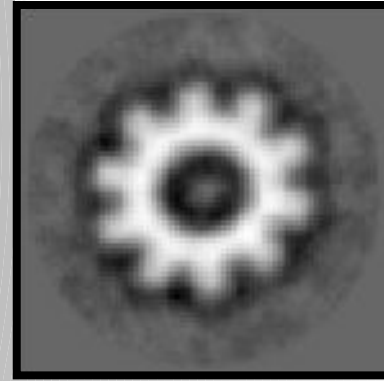
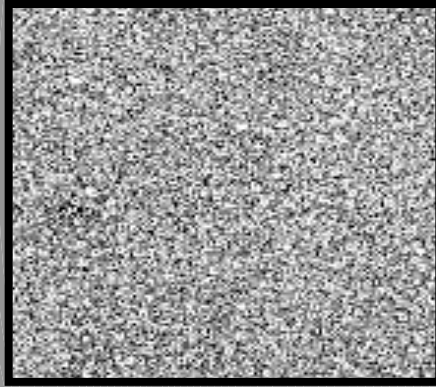
-  L Polymerase
-  ~~N Nucleocapsid protein~~
-  P Phosphoprotein
-  M2-1 transcription factor

Épitopes CTL



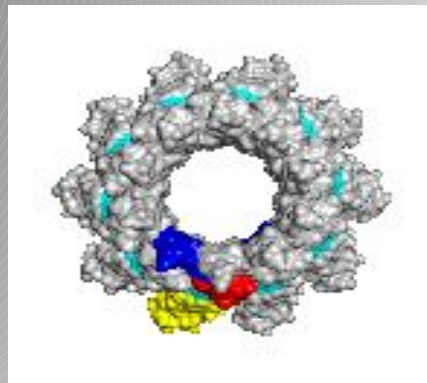
- ☑ Cible des réponses T CD8 antivirales (humain, bovins)
- ☑ Protéine virale la plus conservée (y compris entre VRSH et VRSB)

Obtention d'une nucléoprotéine recombinante sous forme de nanoparticules en anneaux (SRS)



Subnucleocapsid ring structures « SRS » (15 nm)
10-11 monomères de N et un ssRNA (70 bp)

- A) Propriétés des nanoparticules NSRS comme vaccin contre le VRS
- B) Propriétés immunostimulatrices des anneaux NSRS
- C) Propriétés de plateforme antigénique des anneaux NSRS

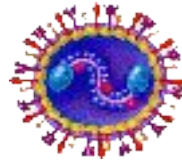


A) Les nanoparticules NSRS, un vaccin contre le VRS

Souris



Epreuve



VRS_h-A2
(souche de labo)

- réduction de la charge virale
- immunité Th1 (CD8, CD4/IFN-■)
- immunité mucoale (IgA, IFN-■)

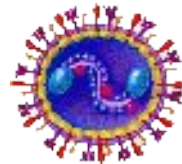
(Roux et al., PLoS ONE 2008)

Veau

(Prim'holsteins, 1 mois, sans colostrum)



Epreuve

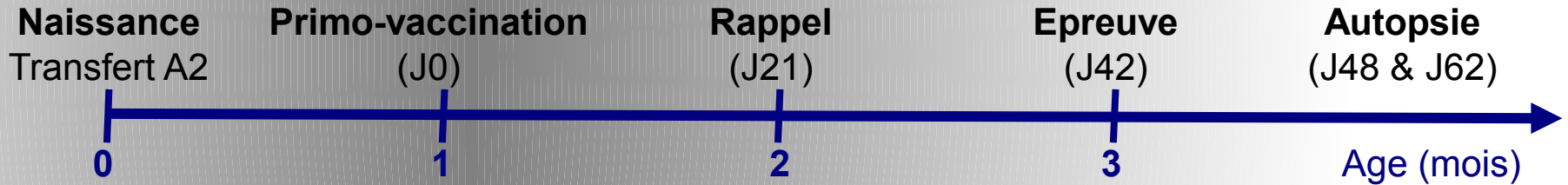


VRS_b 3761
(souche de terrain)

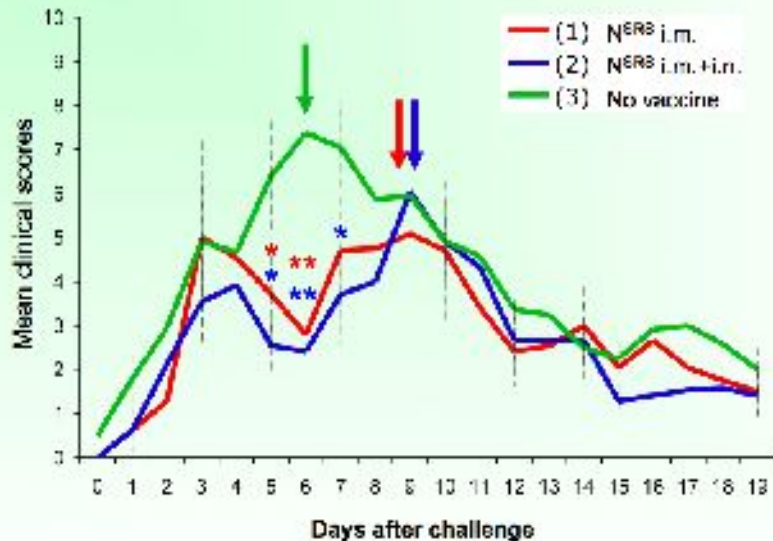
- Immunogénicité
- Protection virale partielle
- Protection clinique partielle

(Riffault et al., Vaccine 2010)

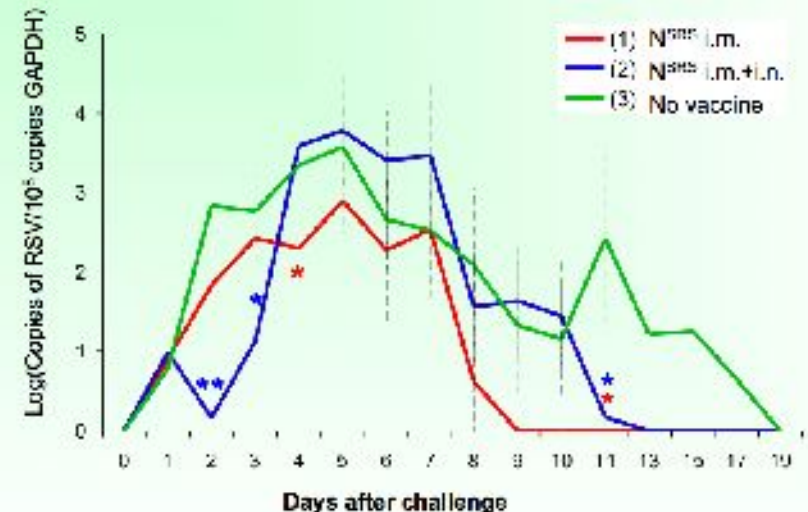
Essai de vaccination chez le veau pour évaluer l'efficacité des anneaux NSRS contre la bronchiolite



Baisse du score clinique chez les veaux vaccinés



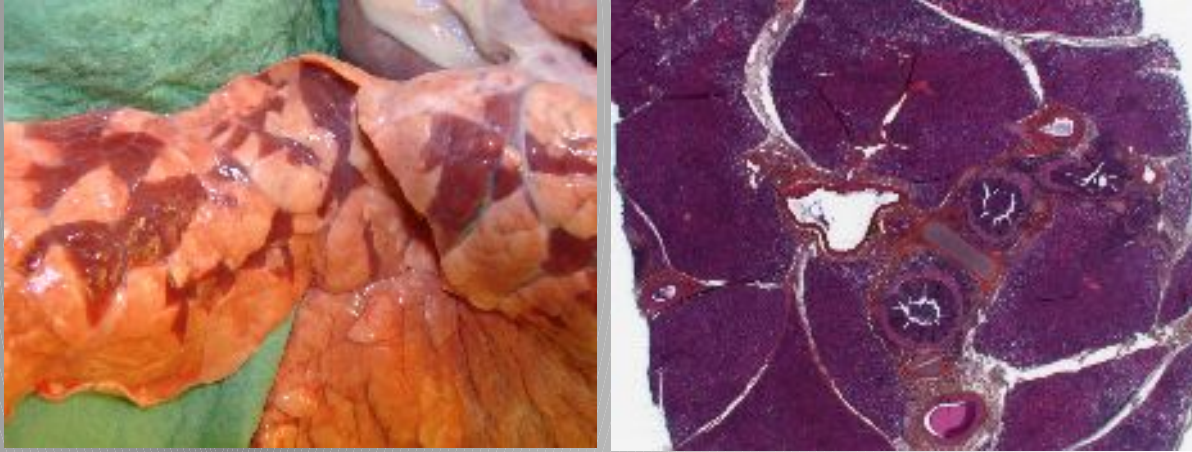
Réduction de la charge virale dans les sécrétions nasales des veaux vaccinés



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 6$, ANOVA

Les lésions tissulaires et l'inflammation pulmonaire sont réduites par la vaccination

Groupe non vacciné, 6 jours après épreuve

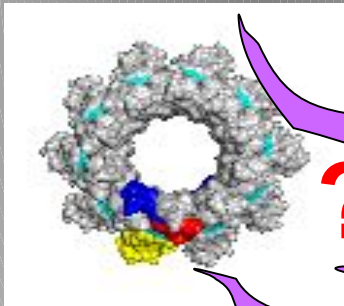


Groupe vacciné avec NSRS, 6 jours après épreuve



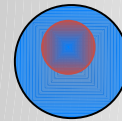
B) Les propriétés immunostimulatrices des nanoparticules NSRS

Immunité innée



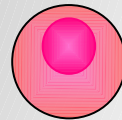
Cellule dendritique

Immunité adaptative



cytokines

Lymphocytes T



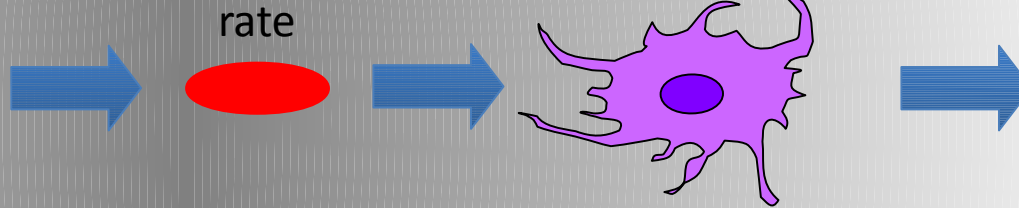
anticorps

Lymphocytes B

Seules les nanoparticules NSRS activent les cellules dendritiques



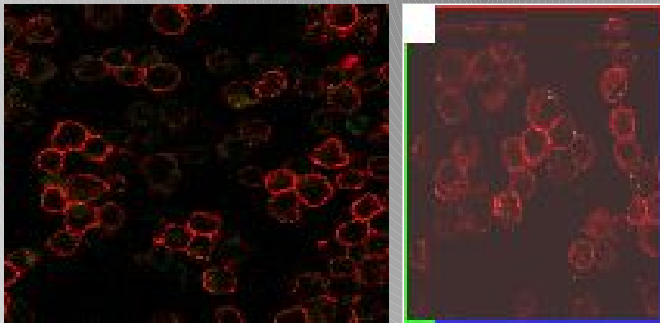
Souris C57Bl/6



24h co-culture DC avec:

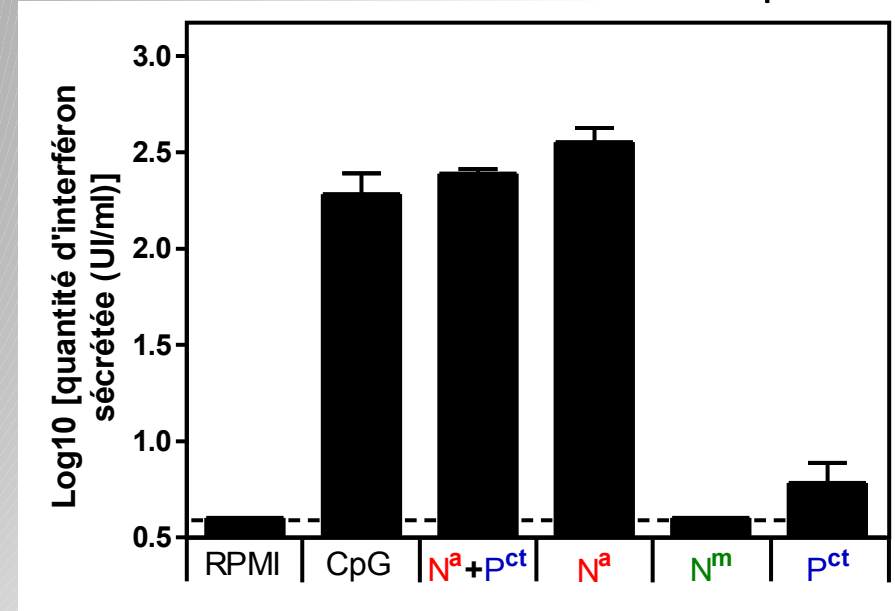
- **Na** forme anneaux
- **Nm** forme mutée monomérique
- **Pct** fragment C-ter P interaction avec N

Capture par les cellules dendritiques



N-GFPSRS (vert) capturés par des DC (rouge)

Activation des cellules dendritiques



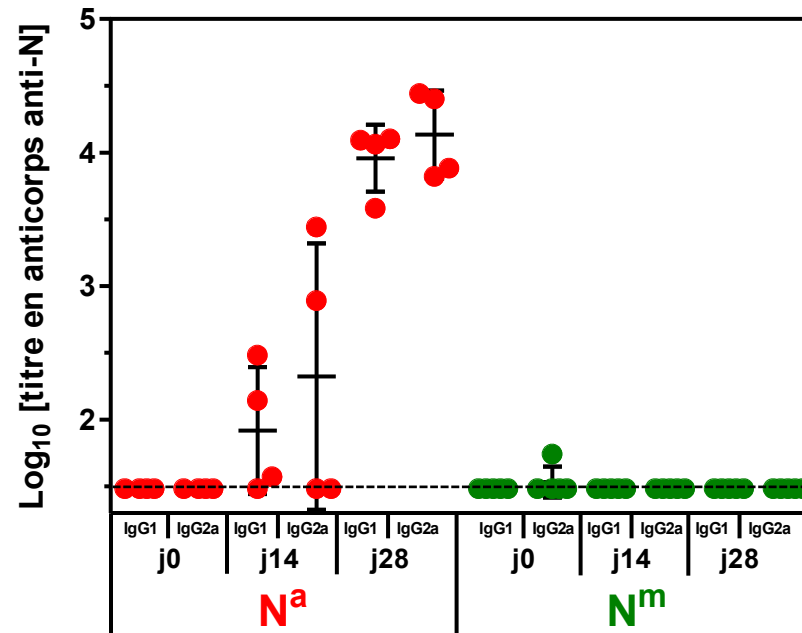
IFN- α/β sécrété dans le surnageant de culture

Seules les nanoparticules NSRS sont immunogènes en l'absence d'adjuvant et par voie nasale



Immunsation x2 à 2 semaines d'intervalle

- **Na** : 10 μg voie intranasale
- **Nm** : 10 μg voie intranasale

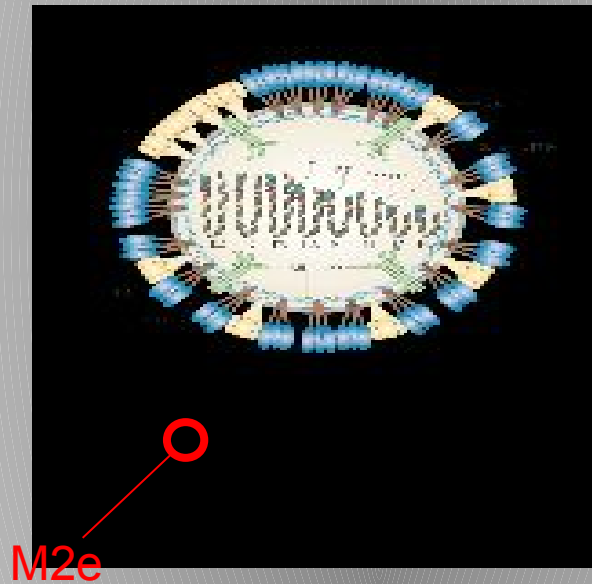


ELISA : anticorps sériques contre N, 2 semaines après la première immunisation ou le rappel

C) Les anneaux NSRS: une plateforme immunogénique pour la vaccination nasale ?

- 1) Obtenir la preuve de concept que les anneaux NSRS sont une **plateforme** pour y ancrer des antigènes hétérologues et renforcer ainsi leur immunogénicité.
- 2) Démontrer avec un autre virus respiratoire, **le virus grippal**, que des nanostructures NSRS chimériques administrés par voie nasale induisent une immunité locale protectrice contre une épreuve virale.

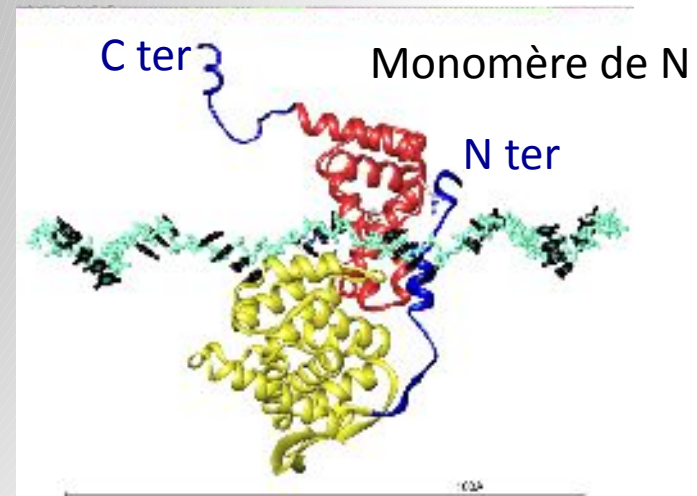
La protéine de matrice M2 du virus de la grippe



- ✓ Tétramère constitué d'un domaine transmembranaire et d'un ectodomaine M2e **très conservé** entre les souches virales humaines et aviaires
- ✓ La protéine M2 et son ectodomaine M2e sont **très peu immunogènes** sur le virion.

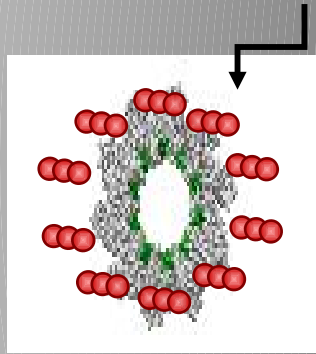
Table 1. Overview of M2-based vaccine studies.

Antigen	Vaccine type	Carrier	Type of antigen	Ref.
M2	Protein		Human	[42]
	DNA vaccine		Human, avian	[64,447]
	Adjuvant ester		Human, avian	[64]
M2e	Peptide			[77]
M2e	Virus-like particle	HBV PcMv HPV D5		[12,148,125] [59] [60] [48]
M2e	Protein	-AGST CTA1-DD K.H	Human Human Human, avian	[125] [60] [64]
M2e	Synthetic	K1-N1 Synthetic mutant carrier Liposome	Human Human Human, avian	[6] [3] [8]
M2e	DNA	NP	Human, avian	[74,75]

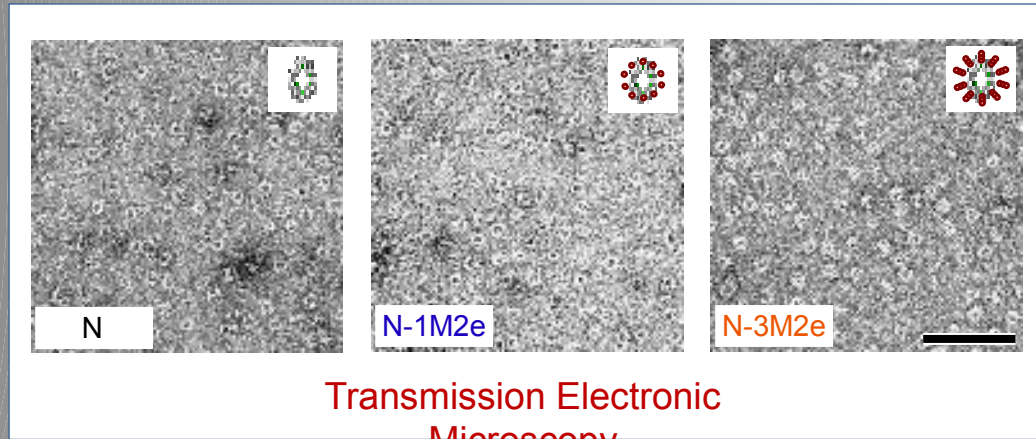


Caractérisation des nanoparticules chimériques N-M2e et N-3M2e

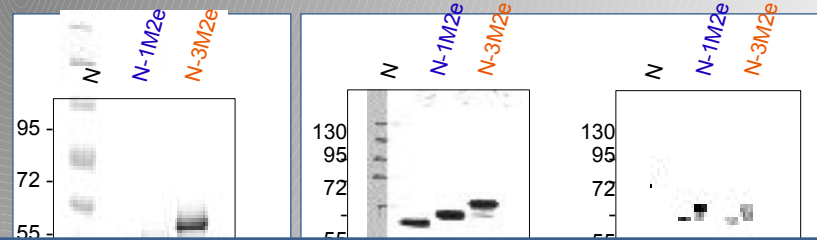
....pkdndvelmslltevetpirnewgsrsgssdgtlltevetpirnewgsrsgssdefsltevetpirnewgsrsgssd*



N-3M2e



Transmission Electronic
Microscopy



L'accrochage du peptide M2e (en 1 ou 3 copies) à N ne perturbe pas la formation des nanoparticules SRS

La vaccination nasale avec M2e ancré sur les nanoparticules NSRS protège contre une épreuve virale

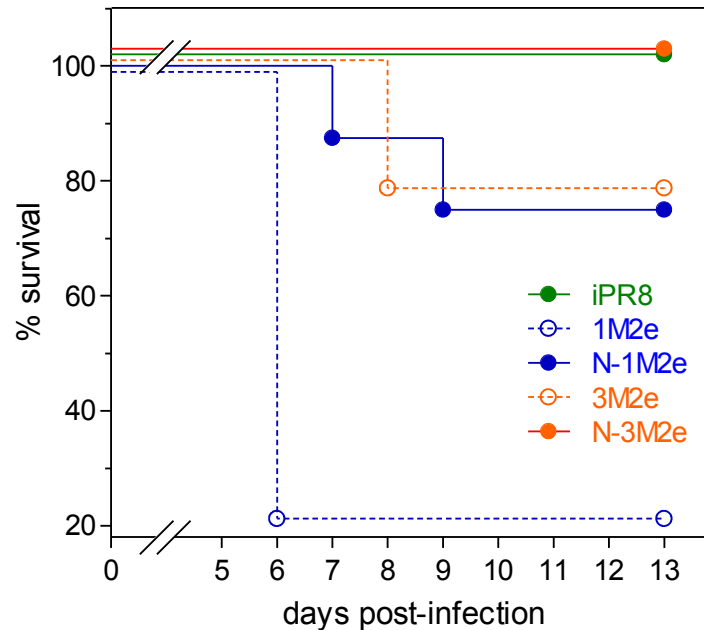


Souris Balb/c

Immunsation x2 à 2 semaines d'intervalle

- PR8 inactivé (iPR8)
- 1M2e
- N-1M2e
- 3M2e
- N-3M2e

+ 5% Montanide Gel



Courbes de survie des souris après épreuve virale : 10 LD50 de A/PR8/34

La vaccination nasale avec M2e ancré sur les nanoparticules NSRS réduit la charge virale et la perte de poids



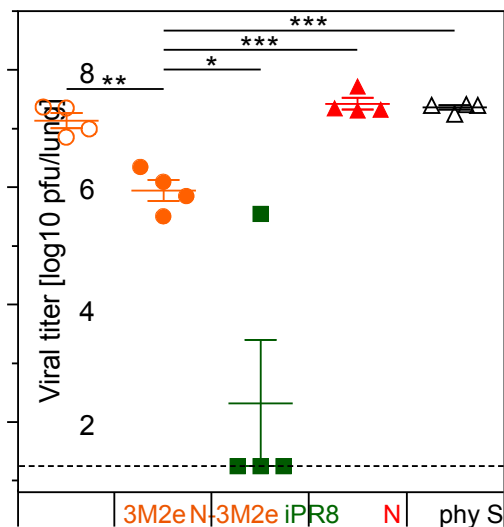
Souris Balb/c

Immunisation x2 à 2 semaines d'intervalle

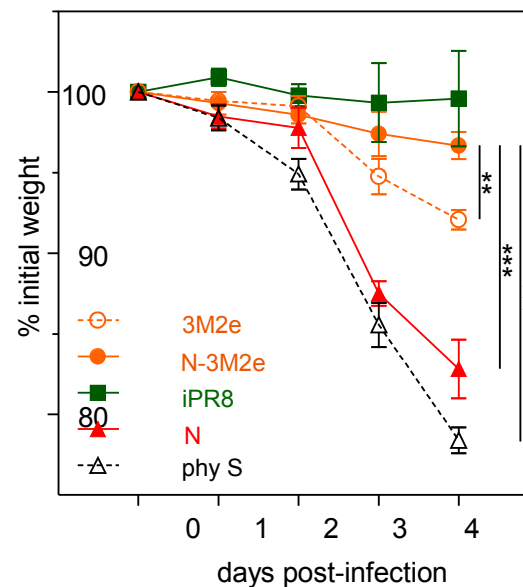
- Serum physiologique
- N
- PR8 inactivé (iPR8)
- 3M2e
- N-3M2e)

+ 5% Montanide Gel

dose 20 µg; 2 LD50 A/PR8/34



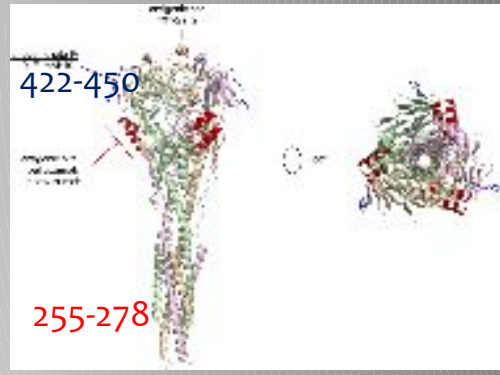
Charge virale des souris infectées
(poumon, 4 jours p.i.)



Courbe de poids des souris infectées

Amélioration des nanoparticules NSRS pour la vaccination contre le VRS bovin : efficacité en présence d'anticorps maternels (projet EMIDA BRSV-DIVA)

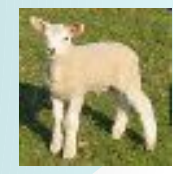
Protéine de Fusion



Test d'antigénicité et immunogénicité fonction des adjuvants



ISCOM (Abisco 300)
Emulsion (ISA71VG)



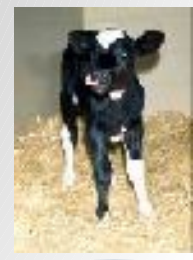
groupe de 5 veaux avec des anticorps maternels contre le VRSB



N-eF SRS+ ISA71



N-eF SRS+Absico300



Control

Conclusions

- Du fait leur structure nanoparticulaire, les assemblages NSRS sont immunogènes sans adjuvant, par voie nasale et en présence d'anticorps maternels.
- Les assemblages NSRS seuls ou modifiés par ajout d'antigène confèrent une protection vaccinale (VRS et grippe).

Brevets INRA

WO/2006/117456

WO/2007/119011

Publications:

Tran et al., J. Gen. Virol. (2007)

Roux et al., PLoS ONE (2008)

Tawar et al., Science (2009)

Riffault et al., Vaccine (2010)

Remot et al., PLoS ONE (2012)

Financements et partenariats:

ANR-EMBP Emergence et Maturation (2005-2007)

INRA-DGER (2007)

INRA Valorisation (2009)

ANR-EMIDA (2010-2013)

ANR-RPIB (2013-2015) avec DBV technologies

Remerciements

Equipe « Vaccination et Immunité Antivirale »

- Pierre-Louis Hervé
- Mariam Raliou
- Bernard Charley
- Catherine Dubuquoy
- Agnès Petit-Camurdan
- Nicolas Bertho



Equipes « Influenza » et « Paramyxovirus »

- Jean-François Eléouët
- Marie Galloux
- Christophe Chevalier
- Christiane Bourdieu
- Jenna Fix



PFIE (Nouzilly) et IERP(Jouy)

