

Des nanoparticules d'amidon mimant l'infection pour vacciner contre la toxoplasmose

Didier Betbeder est professeur à l'Université d'Artois. Il a effectué un début de carrière industrielle dans le domaine de la vaccination nasale, avant de diriger le groupe Nanomédecine au sein de l'UMR995 LIRIC, INSERM-Université de Lille-CHU Lille.

1 Nanovaccins : mimer un virus pour délivrer des antigènes

Ce travail a commencé il y a une vingtaine d'années pour répondre à ce qui peut sembler être un rêve : est-il potentiellement possible de mimer un virus capable d'infecter l'organisme sans en avoir la toxicité ?

En effet, les virus ont cette capacité d'infecter facilement nos cellules. En retour, notre

organisme, *via* le système immunitaire, se défend. Si l'on parvenait à mimer un virus transportant des antigènes de pathogènes sans son pouvoir infectieux, on pourrait créer un vaccin contre ces pathogènes.

1.1. Le concept des nanovaccins

Les virus étant de petites structures de quelques



Figure 1

Administration de nanoparticules par voie nasale.

dizaines de nanomètres, il fallait donc fabriquer des nanoparticules (NP) et, pour mimer un virus, y accrocher des antigènes¹. L'administration par voie nasale (**Figure 1**) est une voie intéressante puisque la majorité des pathogènes (virus, bactéries, parasites) pénètre dans notre organisme par les muqueuses nasales, où de nombreuses cellules immunitaires sont localisées. On peut donc induire à ce niveau une réponse protectrice qui permette d'empêcher l'entrée de ce pathogène dans l'organisme. Cette approche n'est pas reprise par les vaccins actuels, qui sont injectables et ne protègent donc pas les muqueuses.

Ainsi pour faire un vaccin, sans aiguille et sans adjuvant, il fallait que les nanoparticules puissent être administrées à l'aide d'un spray et capables de traverser le mucus nasal pour arriver au contact des cellules immunitaires et y délivrer les antigènes.

1. Antigène : macromolécule naturelle ou synthétique déclenchant une réponse immunitaire lorsqu'elle est reconnue par des anticorps (protéine complexe utilisée dans le système immunitaire pour détecter et neutraliser des agents infectieux).

Par ailleurs la toxicité devait être évaluée dès le début de ces travaux².

1.2. La fabrication des nanovaccins

Le cahier des charges de la fabrication des nanoparticules devait respecter les principes de la chimie verte et notamment l'absence de solvant organique dans la fabrication de ces objets réalisés à partir de matériaux biosourcés : de l'amidon de maïs et des lipides que l'on trouve dans toutes les membranes cellulaires.

Pour cela, nous avons utilisé la maltodextrine, un polymère de glucose, structure de base de l'amidon (**Figure 2**).

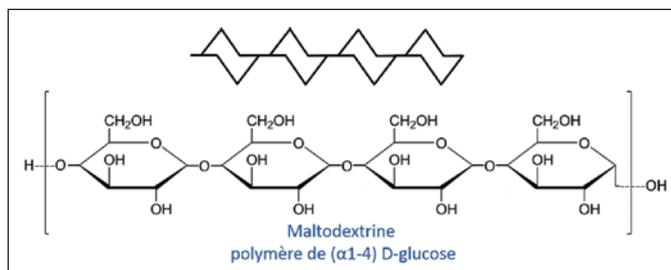
Pour obtenir des nanoparticules, nous avons réticulé cette maltodextrine avec des liaisons glycérol-diéther (**Figure 3**, en bleu) et donné à ces particules une charge positive, par le greffage de ligands cationiques (**Figure 3**, en orange), permettant l'obtention d'un gel tridimensionnel.

L'hydrogel d'amidon cationique obtenu est très loin de la taille nano. Pour préparer les nanoparticules, ce gel est broyé à haute pression et purifié par

2. Carpentier *et coll.* (2018). *Journal of Nanomaterials*.

Figure 2

Structure de la maltodextrine, matériel de base de la synthèse des nanoparticules. Il s'agit d'un polymère de glucose. En haut, représentation simplifiée de la structure chimique.



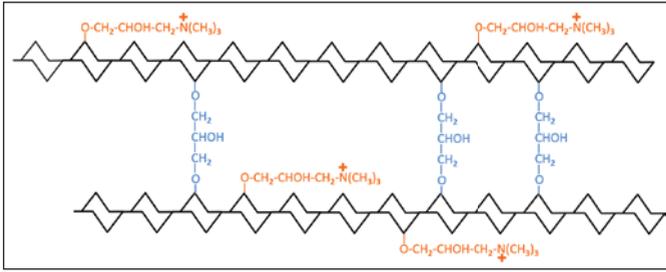


Figure 3

Réticulation et cationisation de la maltodextrine pour créer l'hydrogel qui servira à produire des nanoparticules. La maltodextrine est réticulée par des liaisons glycérol-diéther (en bleu) et chargée positivement par des ligands cationiques (en orange).

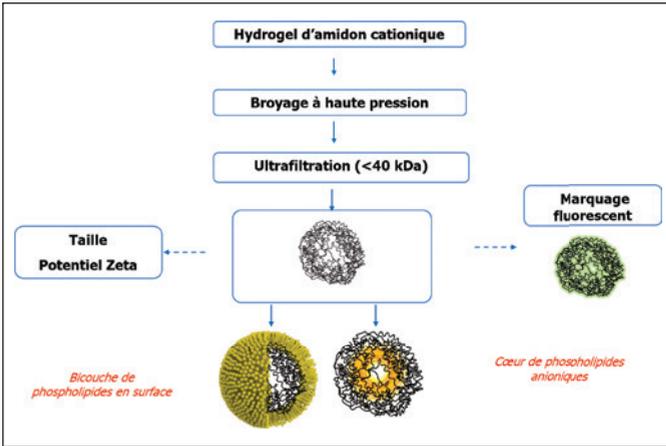


Figure 4

Schéma général de production des nanoparticules de maltodextrine.

ultrafiltration³, ce qui produit des nanoparticules pharmaceutiquement pures, caractérisées selon leur taille et leur charge de surface, et suivies par marquage à l'aide de molécules fluorescentes. Enfin, des phospholipides anioniques sont utilisés soit pour recouvrir, soit pour être incorporés dans la nanoparticule, la nanoparticule lipidique (NPL) correspondant à ce dernier cas (Figure 4).

1.3. Le devenir des nanoparticules après administration nasale

Des études précliniques ont été réalisées sur souris, en

3. Ultrafiltration : filtration à travers une membrane très fine, qui permet de retenir des particules microscopiques.

utilisant des particules marquées avec un marqueur fluorescent capable d'être détecté à travers les tissus vivants. Administrées par voie nasale, on observe les particules (Figure 5, en rouge) dans le nez de la souris dès 15 minutes, et, dans les 6 heures, les NP migrent vers l'estomac, puis l'intestin. 24 h après l'administration, aucune NP n'est décelable dans l'organisme. Ce résultat est important car si ces particules n'ont pas un long temps de résidence, elles n'auront potentiellement pas de toxicité.

1.4. La délivrance d'antigène par les nanoparticules

Nous avons choisi l'ovalbumine (OVA) comme modèle

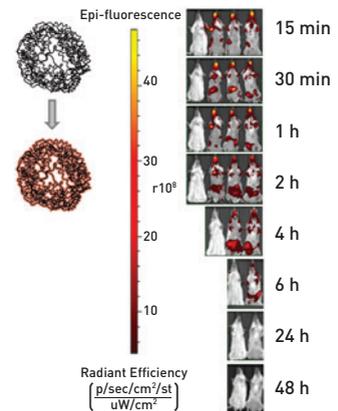


Figure 5

Biodistribution des nanoparticules après administration par voie nasale. Source : avec l'autorisation de Future Microbiology.

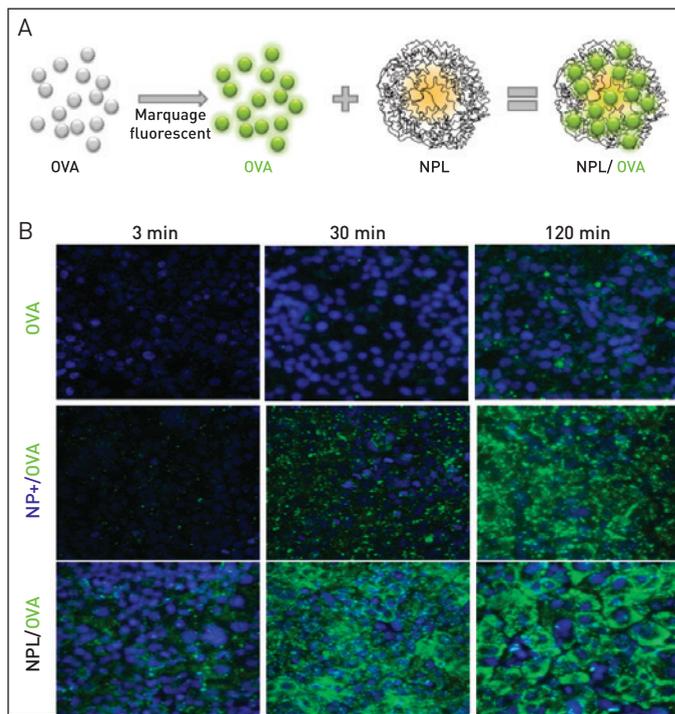


Figure 6

Délivrance de l'ovalbumine dans les cellules des muqueuses nasales *in vitro*. A) Schéma général de la formulation des NPL avec l'ovalbumine marquée par la fluorescéine ; B) image de microscopie confocale montrant la délivrance intracellulaire de l'ovalbumine (en vert) en quelques minutes grâce aux nanoparticules.

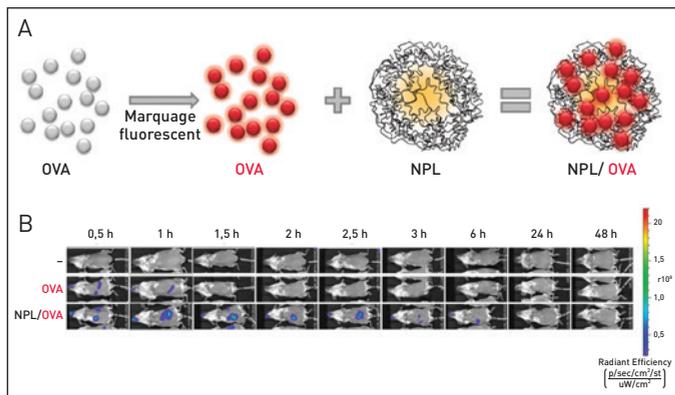


Figure 7

Délivrance de l'ovalbumine *in vivo*. A) Schéma général de la formulation des NPL avec l'ovalbumine marquée par le CF750 (en rouge) ; B) les nanoparticules permettent d'augmenter le temps de résidence nasal au niveau des muqueuses de l'ovalbumine après administration nasale.

d'antigène. Pour la suivre dans les cellules, elle a été préalablement marquée par la fluorescéine (Figure 6A). La délivrance *in vitro* de l'ovalbumine (Figure 6B, en vert) a été étudiée sur des cellules de la muqueuse nasale (repérée par leur noyau en bleu sur la Figure 6B). Seule, l'OVA pénètre faiblement dans les cellules au bout de 2h. Associée à des nanoparticules NP+ (sans lipide) ou NPL (avec un cœur lipidique), elle pénètre dans les cellules beaucoup plus rapidement, notamment en 3 minutes grâce aux NPL, qui seront donc les nanoparticules retenues pour les applications vaccinales⁴ (Figure 6B).

Il faut cependant confirmer ce résultat *in vivo*. Par une démarche similaire mais en utilisant un autre marqueur fluorescent, on observe que seule, l'OVA est totalement éliminée de l'organisme au bout d'une heure et demie, tandis que lorsqu'elle est associée aux NPL, elle demeure dans les muqueuses nasales pendant 6h (Figure 7).

Les nanoparticules permettent donc d'augmenter le temps de résidence nasal de l'ovalbumine et donc de pouvoir stimuler le système immunitaire⁵. Compte tenu de ces résultats très importants, nous avons évalué l'efficacité de ces particules dans le domaine du vaccin.

4. Dombu et coll. (2012). *Biomaterials*.

5. Bernocchi et coll. (2016). *Journal of Controlled Release*.

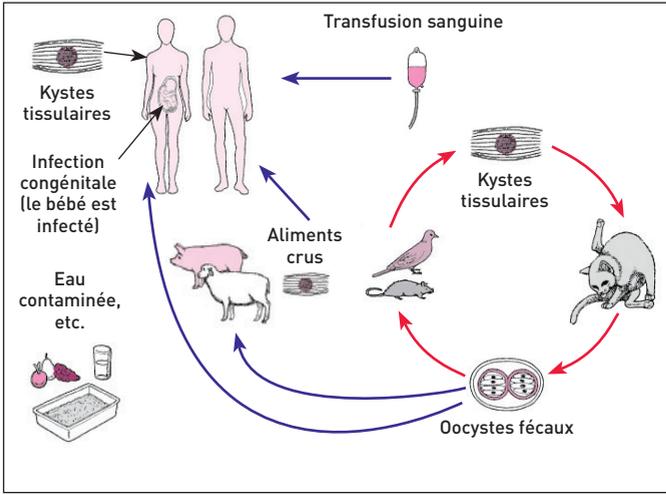


Figure 8

Cycle de vie du *Toxoplasma gondii* causant la toxoplasmose, une maladie ne possédant ni vaccin ni traitement préventif.

2 Application à la conception d'un vaccin contre la toxoplasmose

Les travaux présentés ci-après, réalisés en collaboration avec l'équipe du professeur Dimier-Poisson à la faculté de Pharmacie de Tours, ont pour objet une parasitose⁶ dont les hôtes définitifs sont les félins : la toxoplasmose.

Quand un chat est infecté, l'animal excrète dans l'environnement des oocystes⁷, qui contaminent les aliments, et tous les animaux à sang chaud qui consomment ces aliments peuvent être infectés. L'homme est très sensible car il peut être contaminé à la fois en mangeant des aliments souillés par des oocystes ou en mangeant de la viande d'animaux infectés (Figure 8).

6. Parasitose : ensemble des infections pouvant conduire à des maladies dues à des parasites.

7. Oocyste : œuf encapsulé chez des protozoaires (organismes unicellulaire eucaryotes, c'est-à-dire possédant un noyau structuré) dits sporozoaires.

Contre ces parasitoses intracellulaires, il n'existe aujourd'hui ni vaccin ni traitement préventif.

2.1. Qu'est-ce que la toxoplasmose ?

La toxoplasmose est très largement sous-estimée car elle touche 30 % de la population mondiale (jusqu'à 70 % des habitants de l'Europe de l'Ouest, consommateurs de viandes d'animaux infectés ou d'aliments souillés), ce qui correspond à environ 2 milliards de personnes infectées, c'est-à-dire 2 milliards de personnes qui ont des kystes dans le cerveau.

La toxoplasmose entraîne également des altérations de la cornée et de la rétine (Figure 9) : en France, 700 000 personnes sont affectées par la toxoplasmose oculaire pouvant entraîner une perte de la vue.

On connaît mieux les effets de la toxoplasmose pendant la grossesse qui peut entraîner soit des avortements, soit la



Figure 9

La toxoplasmose oculaire : aperçu des conséquences de cette maladie sur l'œil d'un enfant.

Source : with permission from Future Microbiology.

Figure 10

La toxoplasmose touche les zoos, provoquant la mort des primates (les lémuriens et les saïmiris par exemple) en France.



naissance d'enfant handicapé. Au niveau du cheptel européen, un million et demi de brebis avortent chaque année du fait de cette infection.

De plus, un lien direct chez l'homme entre cette infection et la dépression, la schizophrénie, un comportement suicidaire, et potentiellement le diabète de type 2, a été mis en évidence. Ce parasite fait non seulement des kystes dans tous les organes (cerveau, muscles, yeux, cœur), mais il est aussi susceptible d'induire de nombreuses pathologies.

2.2. Formulation d'un vaccin contre la toxoplasmose

Dans le cadre de l'élaboration de ce vaccin, nous avons récemment observé que la toxoplasmose était à l'origine d'une épizootie mortelle touchant de nombreux

primates, et pour laquelle il n'existe ni traitement ni vaccin (Figure 10).

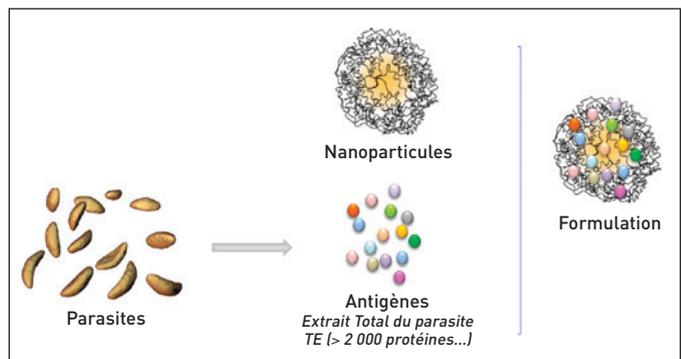
Dans une première étape, nous avons utilisé la propriété des nanoparticules à associer tous les antigènes d'un pathogène (parasite, virus ou bactérie) par un simple mélange dans l'eau (Figure 11).

Les antigènes (2 153 protéines différentes) sont extraits du parasite, formulés avec les nanoparticules à différents ratios, et analysés sur un gel d'électrophorèse⁸ (Figure 12). On observe 100 % d'association de ces protéines avec les nanoparticules, à partir d'un mélange 1 pour 1, c'est-à-dire

8. Gel d'électrophorèse : gel utilisé en biochimie et biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN ou des protéines en fonction de leur poids moléculaire par application d'un courant électrique au sein du gel.

Figure 11

Formulation d'un vaccin contre la toxoplasmose.



de 1 mg de protéines totales du parasite avec 1 mg de particules. La taille (70-80 nm) et le potentiel zêta⁹ (+38 mV) des nanoparticules est similaire à ceux du vaccin, prouvant que les antigènes ont pénétré dans les nanoparticules (**Tableau**).

2.3. Un vaccin contre la toxoplasmose aigüe et congénitale chez la souris

Nous avons donc testé notre vaccin dans un modèle de toxoplasmose chez la souris. Les jeunes souris sont vaccinées par voie nasale puis mises en contact avec le parasite par la voie orale, qui est la voie naturelle de l'infection.

On observe sur un challenge létal, c'est-à-dire qu'en

9. Potentiel zêta : Indicateur des interactions entre particules.

utilisant des doses mortelles de parasites, seuls les animaux vaccinés par voie nasale avec notre vaccin (TE-DGNP) ont été protégés de la mortalité (courbe rouge). Les antigènes seuls (TE) ou adjuvantés par la toxine colérique¹⁰ (TE-CT), le plus fort adjuvant mucosal, ne les protègent pas¹¹ (**Figure 13**).

Afin d'étudier la protection contre l'avortement dans le contexte de la toxoplasmose congénitale, des souris ont été vaccinées par voie nasale, puis mises en contact pendant leur gestation avec le parasite par voie orale. Seuls les fœtus provenant de mère vaccinées par notre vaccin (DGNP/TE) présentaient une réduction

10. Toxine colérique : facteur pathogène de la maladie du choléra.

11. Dimier-Poisson *et coll.* (2015). *Biomaterials*.

Tableau

Taille et potentiel zêta des nanoparticules, des antigènes et des vaccins combinant les deux composés.

NP : nanoparticules ; TE : antigènes.

	Taille (nm)	Potentiel zêta (mV)
NP	71,26 +/- 31,53	+ 38,3
TE	482,4 +/- 198,5	+ 33,5
NP/TE (3/1 wcv)	88,40 +/- 43,54	+ 37,4

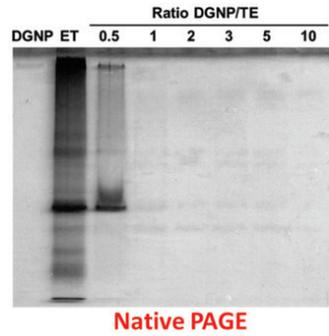
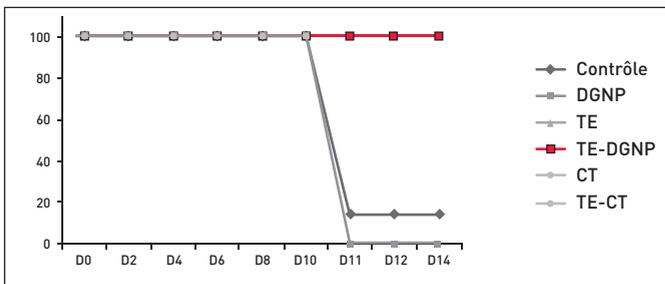


Figure 12

Gel d'électrophorèse en conditions non dénaturantes montrant que les antigènes de *Toxoplasma gondii* sont associés aux nanoparticules dès le ratio 1/1 (DGNP : nanoparticule, TE : antigènes).

Figure 13

Challenge létal versus *Toxoplasma gondii* : seules les souris vaccinées avec les vaccins TE-DGNP sont protégées.

TE : antigènes de *Toxoplasma gondii* ; DGNP : nanoparticules ; CT : toxine cholérique utilisée comme adjuvant.

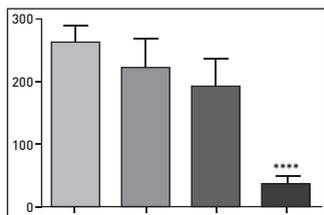


Figure 14

Évolution de la charge parasitaire dans les fœtus provenant de mères non-vaccinées (-), vaccinées avec les antigènes (TE), les nanoparticules (DGNP) ou notre vaccin (DGNP/TE) : la formulation des antigènes avec les nanoparticules réduit drastiquement la charge parasitaire des fœtus.

drastique de leur charge parasitaire¹² (Figure 14).

L'infection des fœtus conduit à une diminution de leur poids à la naissance. Nous avons donc étudié ce critère, et seuls les souriceaux provenant de mères vaccinées présentaient un poids normal¹² (Figure 15).

Enfin, la toxoplasmose oculaire est un enjeu sanitaire important malgré sa sous-estimation. L'effet de la vaccination sur les lésions oculaires a été étudié et les souriceaux provenant de mères vaccinées montraient une protection quasi-totale alors que des signes d'inflammation oculaires étaient observés dans les autres groupes¹² (Figure 16).

2.4. Un vaccin contre la toxoplasmose chronique de la brebis

La brebis est un animal de rente fortement touché par des avortements liés à la toxoplasmose. De plus, l'homme peut s'infecter en consommant de la viande mal cuite, saignante, de mouton, mais aussi de bovin, de porc, ou de tout autre type d'animaux infectés.

Un protocole identique a ainsi été utilisé pour tester l'efficacité du vaccin sur la toxoplasmose ovine : vaccination nasale puis challenge oral mimant l'infection naturelle. Nous avons observé que tous les animaux vaccinés par voie nasale sont protégés de l'infection et qu'aucun kyste n'est observé chez les brebis vaccinées (Figure 17).

Ce résultat est très intéressant parce qu'il permet potentiellement d'obtenir de la viande de mouton non infectieuse pour l'homme.

12. Ducournau et coll. (2017). *Future Microbiology*.

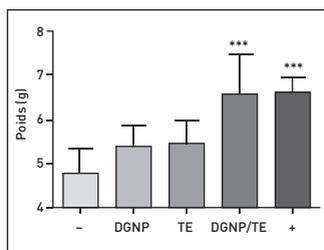


Figure 15

Évolution du poids des souriceaux provenant de mères non vaccinées (-), vaccinées avec les antigènes (TE), les nanoparticules (DGNP) ou notre vaccin (DGNP/TE), ou non infectées (+ : poids normal) : seuls les souriceaux vaccinés avec la formulation antigènes-nanoparticules ont un poids normal à la naissance.

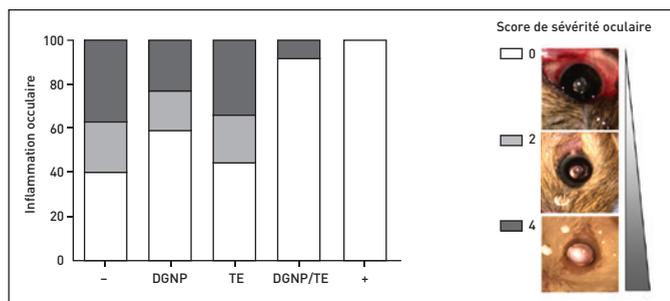


Figure 16

Évolution de l'inflammation oculaire des souriceaux provenant de mères non vaccinées (-), vaccinées avec les antigènes (TE), les nanoparticules (DGNP) ou notre vaccin (DGNP/TE), ou non infectées (+ : pas d'inflammation) : les souriceaux vaccinés avec la formulation antigènes-nanoparticules sont protégés des lésions oculaires causées par le parasite. 0 : pas d'inflammation, 2 : inflammation modérée, 4 : inflammation grave non réversible.

Source : avec l'autorisation de Future Microbiology.

