



Adjuvants et formulations de l'immunothérapie spécifique par voie sublinguale

Adjuvants and formulations for allergen-specific sublingual immunotherapy

L. Van Overtvelt, V. Lombardi, N. Saint-Lu, L. Mascarell, S. Tourdot, P. Moingeon *

Research & Development, Stallergènes SA, 6, rue Alexis-de-Tocqueville, 92183 Antony, France

Résumé

L'immunothérapie sublinguale (ITSL) constitue un traitement efficace des allergies respiratoires de type I. Pour identifier des adjuvants et des formulations susceptibles d'augmenter l'induction de tolérance par voie sublinguale, un premier criblage a été effectué sur des cocultures de cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes et des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Les molécules sélectionnées ont ensuite été testées dans un modèle murin d'ITSL chez des souris BALB/c sensibilisées à l'ovalbumine. Dans ce modèle, nous avons évalué l'impact de ces adjuvants et formulations sublinguales sur l'hyperréactivité bronchique (mesurée par plethysmographie) l'inflammation pulmonaire (évaluée par histologie) et les réponses immunitaires de type Th2 (suivies par Elispot et Elisa). Quatre catégories d'adjuvants, ayant la particularité d'induire la production d'IL-10 +/- IFN γ par les lymphocytes T CD4⁺ naïfs (réponse T Reg/Th1) sont capables d'augmenter l'efficacité de l'ITSL in vivo chez la souris. Ces adjuvants comprennent l'association vitamine D3/dexaméthasone, *Lactobacillus plantarum*, le ligand de TLR2 Pam3CSK4 et l'agoniste du récepteur TLR4 OM-294-BA-MP. Par ailleurs, une formulation mucoadhésive de l'antigène à base de maltodextrine de maïs augmente l'induction de tolérance par voie sublinguale, en favorisant le ciblage des cellules dendritiques et la stimulation des lymphocytes T au niveau des ganglions cervicaux/submaxillaires drainants. En conclusion, une meilleure compréhension des réponses immunitaires spécifiques de l'allergène au niveau de la muqueuse sublinguale permet d'envisager la conception de nouveaux vaccins sublinguales. Ces vaccins du futur incorporeront des adjuvants T Reg/Th1, ainsi que des formulations galéniques mucoadhésives pour faciliter le ciblage des cellules dendritiques au niveau de la muqueuse sublinguale.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Sublingual immunotherapy (SLIT) is a non-invasive and efficacious treatment for type I respiratory allergies. To identify candidate adjuvants and galenic formulations capable of inducing tolerance by the sublingual route, an initial screening was carried out using in vitro cocultures of human monocyte-derived dendritic cells and naïve CD4⁺ T cells. Selected molecules were subsequently tested in a murine asthma model of sublingual immunotherapy in BALB/c mice sensitized to ovalbumin. In this model, we evaluated bronchial hyperreactivity (measured by whole-body plethysmography), pulmonary inflammation (evaluated histologically), and type 2 humoral and cellular immune responses monitored by Elisa and Elispot techniques in mice sensitized with either soluble or with adjuvant-formulated ovalbumin. Four categories of adjuvant known to increase IL-10 +/- IFN γ production by naïve CD4⁺ T cells (Treg/Th1) were found to enhance SLIT efficacy in vivo in these mice. These adjuvants were: vitamin D3/dexamethasone, *Lactobacillus plantarum*, the TLR2 agonist Pam3CSK4, and the TLR4 synthetic ligand OM-294-BA-MP. In addition, sublingual administration of ovalbumin combined with mucoadhesive maize-derived maltodextrin increased sublingual tolerance induction by targeting oral dendritic cells and ovalbumin-specific T cells in cervical and submaxillary lymph nodes. In conclusion, better understanding of specific immune responses to allergen at the level of the sublingual mucosa may lead to the development of new sublingual vaccines. In the future, such vaccines would incorporate Th1/Treg adjuvants, as well as mucoadhesive galenic formulations that target dendritic cells in the sublingual mucosa.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Adjuvants ; Immunité muqueuse ; Induction de tolérance ; Voie sublinguale ; Vaccin

Keywords: Sublingual immunotherapy; Adjuvants; Tolerance induction; Vaccine

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : pmoingeon@stallergenes.fr (P. Moingeon).

1. Introduction

L'immunothérapie spécifique aux allergènes par voie sublinguale (ITSL) représente un traitement non invasif et efficace des allergies respiratoires de type I pour un certain nombre d'allergènes [1-3]. Cependant, de nombreux champs de recherche restent à explorer pour améliorer encore l'ITSL. Ainsi, l'utilisation des formulations galéniques ou d'adjuvants, permettant d'accroître l'efficacité des vaccins sublinguaux actuels, reste en grande partie inexplorée [4].

Alors que l'efficacité et la tolérance de l'ITSL sont aujourd'hui bien documentées, les mécanismes immunologiques qui les sous-tendent commencent seulement à être compris [4-6]. La muqueuse sublinguale est riche en cellules dendritiques de type cellules de Langerhans, exprimant de façon constitutionnelle un récepteur de haute affinité pour les immunoglobuline E (FcεRI) [7]. Au cours de la désensibilisation par voie sublinguale, ces cellules captent l'allergène et le transportent vers les ganglions lymphatiques cervicaux/sous-maxillaires pour induire une tolérance médiée par les lymphocytes T. Les cellules de Langerhans buccales activées produisent des cytokines tolérogènes, telles que l'interleukine-10 (IL-10) et le *transforming growth factor-β* (TGF-β) et expriment une activité indoleamine dioxygénase (Ido), conduisant à la diminution de la prolifération lymphocytaire T [6,7]. Les cellules dendritiques de la muqueuse sublinguale semblent donc aptes à induire des lymphocytes T régulateurs capables d'inhiber, par production de cytokines (IL-10 ou TGF-β) ou par contact cellulaire direct, le recrutement et l'activation des cellules pro-inflammatoires ainsi que la production d'immunoglobuline E spécifiques de l'allergène [4-6]. Dans ce contexte, l'identification d'adjuvants agissant sur ces cellules ou de formulations mucosales permettant de cibler l'allergène sur

ces cellules dendritiques tolérogènes, sont susceptibles d'augmenter l'efficacité de l'ITSL.

2. Matériel et méthodes

2.1. Études sur des cultures de cellules immunes humaines

Des cellules dendritiques générées à partir de monocytes du sang périphériques ont été traitées pendant 24 heures avec les candidats adjuvants. Les cellules ont ensuite été lavées et placées en culture pendant cinq jours avec des lymphocytes T CD4+ naïfs allogéniques. L'induction de gènes caractéristiques d'une différenciation Th 1 (T Bet, IFNγ), Th2 (Gata 3 IL-4), T Reg (Fox p 3, IL-10, TGFβ) a ensuite été analysée par PCR quantitative après extraction d'ARN. La sécrétion de cytokines a été mesurée dans les surnageants par Elisa ou technique CBA.

2.2. Modèle thérapeutique murin d'immunothérapie sublinguale (ITSL)

La sensibilisation de souris BALB/c a été réalisée au moyen de deux injections intrapéritonéales d'ovalbumine (Ova) adsorbée sur aluminium, suivie par une provocation à l'Ova en aérosol à l'aide d'un système de pulvérisation (Buxco Europe Ltd, Winchester, Royaume-Uni), selon le schéma expérimental indiqué dans la Fig. 1. Des animaux témoins ont été traités par *phosphate-buffered saline* (PBS) stérile, selon le même protocole. Pour l'induction de tolérance, les souris ont été traitées par voie sublinguale par une solution d'Ova (500 µg/dose) utilisé seul ou sous forme mucoadhésive ou en combinaison avec un adjuvant, deux fois par semaine pendant deux mois. Après traitement, les souris ont subi une provocation par aérosols d'Ova avant mesure des signes d'inflammation des voies respiratoires, ainsi que des réponses immunitaires

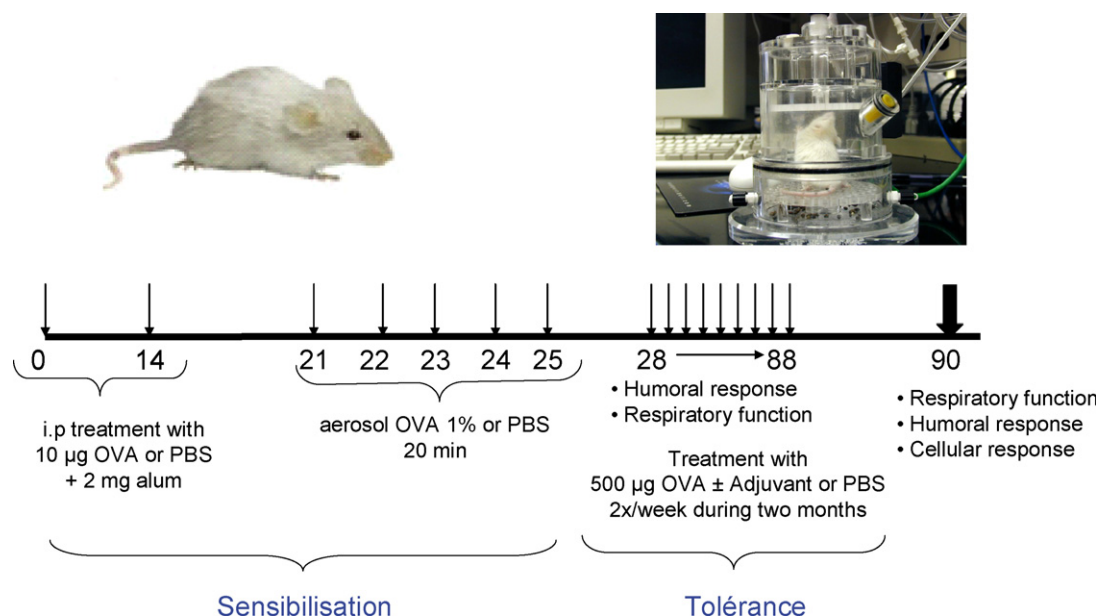


Fig. 1. Modèle murin d'ITSL chez la souris BALB/C sensibilisée à l'Ova.

Tableau 1
Adjuvants et formulation augmentant l'induction de tolérance par voie sublinguale

Adjuvants/formulation	Cible/mécanisme	AHR	Réponse Th2 à Ova	Inflammation pulmonaire	Impact sur les lymphocytes T
Vit D3 + dex	NFKB	↓	–	–	↗ IL-10
<i>Lactobacillus plantarum</i>	TLR2, 4 ; DC Sign3	↓	↓	–	↗ IFNγ ↗ IL-10
Pam3CSK4	TLR2	↓	↓	–	↗ IFNγ ↗ IL-10
OM-294-BA-MP	TLR4	↓	↓	↓	↗ IFNγ ↗ IL-10
PSC (maltodextrine polymérisée)	Mucoadhésive, particulaire	↓	↓	↓	↗ IFNγ ↗ IL-10

cellulaires et humorales (Fig. 1). Les animaux témoins ont été sensibilisés à l'Ova, puis ont subi un traitement sublingual fictif avec du PBS stérile, ou avec la formulation ou l'adjuvant seul. Dans ce modèle, les souris sensibilisées à l'Ova présentent une hyperréactivité des voies aériennes (AHR), associée à des valeurs de Penh élevées, détectables par pléthysmographie sur animal entier, ainsi qu'une inflammation pulmonaire sévère liée à une infiltration cellulaire et une hypersécrétion de mucus [8]. Un tel protocole de sensibilisation induit également des réponses Th2 immunes spécifiques de l'Ova, incluant des taux sériques élevés d'immunoglobuline G1 et d'immunoglobuline E, et la production d'IL-5 (interleukine-5) par les splénocytes [8].

3. Résultats

Des candidats adjuvants biologiques et synthétiques, ont été sélectionnés sur la base de leurs propriétés immunomodulatrices in vitro, puis ont été testés dans le modèle murin thérapeutique d'ITSL. Dans le modèle de coculture cellules dendritiques-lymphocytes T CD4+ naïfs, tous ces adjuvants ont pour propriété commune d'induire la production d'IL-10, et dans la plupart des cas d'IFNγ par les lymphocytes T (Tableau 1). L'administration thérapeutique sublinguale d'Ova associée à ces substances, qui comprennent une combinaison de vitamine D3/dexaméthasone, du *Lactobacillus plantarum*, un lipopeptide synthétique agoniste de TLR2 (Pam3CSK4) ou un analogue synthétique du lipide A (OM-294-BA-MP), induit une réduction de l'AHR plus importante que celle observée chez des souris traitées par l'Ova seule [9,10]. Certains de ces composés induisent également une baisse des réponses Th2 spécifiques de l'Ova, et plus rarement, une baisse de la l'inflammation pulmonaire (Tableau 1).

Le modèle thérapeutique murin d'ITSL a également été utilisé pour évaluer l'efficacité de formulations mucoadhésives de l'antigène. L'application sublinguale d'Ova formulé à l'aide de maltodextrines polymérisées, appelées *polysaccharidic formulated core* (PSC), entraîne une diminution majeure, tant de l'AHR, que de l'inflammation pulmonaire et de la production d'IL-5 splénocytaire [8]. De plus, cette formulation mucoadhésive induit la sécrétion d'immunoglobuline A au niveau de la muqueuse pulmonaire et la prolifération de lymphocytes T au niveau des ganglions cervicaux. Ces données démontrent que l'amélioration du contact des allergènes avec la muqueuse sublinguale renforce l'induction de tolérance, probablement en facilitant la capture des allergènes par les cellules dendritiques de type cellules de Langerhans.

4. Conclusions

L'identification d'adjuvants et de formulations galéniques, adaptées à l'administration sublinguale, devrait permettre d'améliorer l'efficacité de l'ITSL et de simplifier les schémas d'immunisation. Sur la base de modèles précliniques, nous avons identifiés plusieurs candidats adjuvants agissant par des mécanismes distincts, mais ayant tous en commun d'induire la production d'IL-10 par les lymphocytes CD4+ T naïfs. La plupart de ces adjuvants induisent également une forte production d'IFNγ. Outre l'intérêt d'adjuvants T Reg/Th1, nos résultats étayent la pertinence des formulations mucoadhésives pour améliorer l'efficacité de l'ITSL. Ces travaux confirment également les propriétés particulières du système immunitaire buccal, qui semble préprogrammé en vue de l'induction d'une tolérance spécifique de l'antigène.

Références

- [1] Bousquet J, Lockett R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. J Allergy Clin Immunol 1998;102(4 Pt1):558–62.
- [2] Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. Cochrane Database Syst Rev 2000;2 (CD001186).
- [3] Didier A, Malling HJ, Worm M, Horak F, Jäger S, Montagut A, et al. Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 2007;120(6):1338–45.
- [4] Akdis CA, Barlan IB, Bahceciler N, Akdis M. Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy. Allergy 2006;61(Suppl. 81):11–4.
- [5] Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, van Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. Allergy 2006;61(2):151–65.
- [6] Van Overtvelt L, Batard T, Fadel R, Moingeon P. Mécanismes immunologiques de l'immunothérapie sublinguale spécifique des allergènes. Rev Fr Allergol Immunol Clin 2006;46:713–20.
- [7] Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Berge S, Appel T, et al. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcεpsilonRI expression. J Allergy Clin Immunol 2003;112(1):141–8.
- [8] Razafindratsita A, Saint-Lu N, Mascarell L, Berjont N, Bardon T, Betbeder D, et al. Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. J Allergy Clin Immunol 2007;120(2):278–85.
- [9] Van Overtvelt L, Lombardi V, Razafindratsita A, Saint-Lu N, Horiot N, Moussu H, et al. IL-10 inducing adjuvants enhance sublingual immunotherapy efficacy in a murine asthma model. Int Arch Allergy Immunol 2008;145:152–62.
- [10] Mascarell L, Van Overtvelt L, Lombardi V, Razafindratsita A, Moussu H, Horiot S, et al. A synthetic triacylated pseudo-dipeptide molecule promotes Th1/Treg immune responses and enhances tolerance induction via the sublingual route. Vaccine 2007;26(1):108–18.