

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

Les chitosanes – nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux.

GOGEV, S. ¹, VERSALI, M.-F. ², THIRY, E. ¹

¹ Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, Secteur de Virologie - Epidémiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, B43b, 4000 Liège

² Groupe de recherche Chitine-Chitosane, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Biotechnologie Végétales, Département de Sciences de la Vie, Université de Liège, Boulevard de Colonster, B32, 4000 Liège.

Correspondance : Etienne THIRY,
Tél : 32(0)4/366.42.50 - Fax : 32(0)4/366.42.61
E-mail : etienne.thiry@ulg.ac.be

RESUME: L'avantage de la vaccination par voie muqueuse est l'induction d'une réponse immune à la porte d'entrée des agents pathogènes. Puisque les vaccins administrés seuls par voie muqueuse ont une faible biodisponibilité, ils doivent être co-administrés avec des substances qui favorisent leur pénétration ou avec des adjuvants. De nombreuses études ont démontré que les chitosanes et ses dérivés se sont avérés sûrs et efficaces pour améliorer l'absorption au niveau des muqueuses des macromolécules hydrophiles telles que des peptides et des protéines. Le chitosane est un polysaccharide cationique dérivé de la chitine présente dans l'exosquelette des arthropodes et dans la paroi cellulaire de nombreux champignons. L'association des vaccins aux chitosanes, à leurs dérivés ou à certains de leurs systèmes particuliers, tels que les nano- et les microparticules, s'est révélée également efficace pour améliorer la prise d'antigènes par le tissu lymphoïde associé aux muqueuses, induisant de ce fait une réponse immune à la fois au niveau des muqueuses et systémique. Le chitosane et ses dérivés représentent des adjuvants prometteurs pour des vaccins à administration par voie muqueuse chez les animaux.

INTRODUCTION

La plupart des agents pathogènes bactériens et viraux infectent leurs hôtes respectifs au travers de la barrière muqueuse des systèmes respiratoire, intestinal et génital. Ainsi, l'induction d'une forte réponse immune à la porte d'entrée à l'encontre de l'agent infectieux semble être la plus appropriée pour prévenir une infection. Par conséquent, la stratégie permettant d'induire une réponse immune protectrice au niveau de la muqueuse est un aspect critique du développement de nouveaux vaccins. Alors que la voie parentérale induit principalement une immunité cellulaire et humorale, et cela essentiellement au niveau systémique, la voie muqueuse est plus appropriée à stimuler une immunité mucosale efficace, et même accompa-

gnée d'une réponse immune systémique dans certains cas. Finalement, en évitant l'injection, la voie muqueuse est une méthode non invasive de choix pour la vaccination.

La conception d'un vaccin administré par voie muqueuse implique quelques exigences importantes, à savoir: a) l'antigène doit être protégé contre la digestion enzymatique ou l'hydrolyse acide; b) la prise d'antigène par les cellules M du dôme épithélial et les cellules épithéliales doit être augmentée; etc) le système immunitaire inné doit être stimulé pour assurer une réponse immune adaptative appropriée. Le développement de différents vaccins contre les pathogènes qui utilisent les muqueuses comme porte d'entrée est souvent orienté vers des formulations vaccinales visant à amé-

liorer et/ou à moduler la réponse immune locale au niveau des muqueuses et la réponse immune systémique induites à l'encontre d'antigènes administrés par voie muqueuse. Beaucoup de molécules, en particulier les molécules polaires, telles que des peptides et des protéines, ont des disponibilités biologiques inhérentes très faibles au niveau des muqueuses (Illum; 2000) et, par conséquent, elles sont généralement faiblement immunogènes. En tant que constituants d'un vaccin, ces antigènes doivent être co-administrés avec des substances qui favorisent leur pénétration afin d'améliorer leur immunogénicité. L'augmentation de la biodisponibilité des antigènes au niveau des muqueuses peut améliorer l'efficacité des vaccins de manière significative.

Différents types d'adjuvants, tels que la toxine de choléra (Tamura *et al.*, 1988), la toxine thermolabile d'*Escherichia coli* (Tamura *et al.*, 1994), la lysophosphatidylcholine (Westerink *et al.*, 2001), des séquences immunostimulatrices d'ADN (Horner *et al.*, 1998; McCluskie *et al.*, 2000) et beaucoup d'autres ont été étudiés afin d'améliorer la réponse immunitaire envers des antigènes administrés par voie muqueuse, mais avec une efficacité variable.

Le chitosane, un polymère polycationique et biodégradable connu pour son excellente biocompatibilité, a été employé pour préparer différents systèmes polymériques associés aux antigènes destinés à l'immunisation par voie muqueuse. Les raisons d'utilisation de ces polymères en tant qu'adjuvants vaccinaux par voie muqueuse sont décrites dans cet article de revue.

CARACTÉRISTIQUES DE LA CHITINE ET DES CHITOSANES

La chitine est largement distribuée dans le monde vivant. C'est un composant de la paroi cellulaire de nombreux champignons et de l'exosquelette des arthropodes (figure 1). C'est le biopolymère le plus abondant après la cellulose. La chitine est constituée d'une chaîne linéaire d'unités N-acétyl-glucosamine liées entre elles par des ponts β (1,4). Comme la chitine n'est pas soluble dans l'eau, ses applications sont limitées. Certains dérivés de la chitine peuvent être transformés



Figure 1: la chitine est le composant principal de l'exosquelette des arthropodes, en l'occurrence de la mouche domestique.

en produits solubles dans des solvants aqueux. L'un de ces dérivés, appelé chitosane, est obtenu par déacétylation de la chitine (figure 2). Cette transformation génère des groupes amines ($-NH_2$) chargés positivement et confère aux chitosanes une nature « cationique » particulièrement intéressante en milieu acide, d'autant plus que la plupart des polysaccharides du même type sont très souvent neutres ou chargés négativement. Ainsi, contrairement à la chitine qui est insoluble dans les solvants aqueux, le chitosane est soluble dans les acides faiblement dilués à des $pH < 6,0$ formant des sels. Un autre dérivé, tel que le carboxyméthyl chitosane, diffère de la chitine en raison du remplacement du groupe acétyle par le groupe carboxyméthyle ($-CH_2COOH$) résultant en $NHCH_2COOH$ et de l'addition des chaînes alkyles courtes ($-CH_3$) et, par conséquent, devient soluble même à des pH physiologiques et légèrement basiques (Thanou *et al.*, 2000 ; 2001). La nature « cationique » du chitosane permet la formation de complexes polyélectrolytiques avec des polymères anioniques naturels ou synthé-

tiques à usage potentiel très intéressant, ainsi que la formation de complexes protéines-polyélectrolytes (naturels ou synthétiques) (Chornet *et al.*, 1998). Certaines caractéristiques du polymère ont une influence déterminante sur le caractère de solubilité et la réactivité du chitosane. C'est le cas notamment de la masse moléculaire du polymère et du degré de déacétylation qui peuvent varier suivant les types et les conditions des procédés de dépolymérisation et de déacétylation.

MÉCANISMES D'ACTION DES CHITOSANES

Par rapport à la chitine, le chitosane présente des caractéristiques et des propriétés particulièrement intéressantes. Ainsi, ce polymère est biocompatible, biodégradable, non antigénique et non toxique. Il n'endommage pas les membranes nasales chez les rats et ralentit la clairance mucociliaire de manière réversible après l'application nasale quotidienne chez des volontaires humains et chez

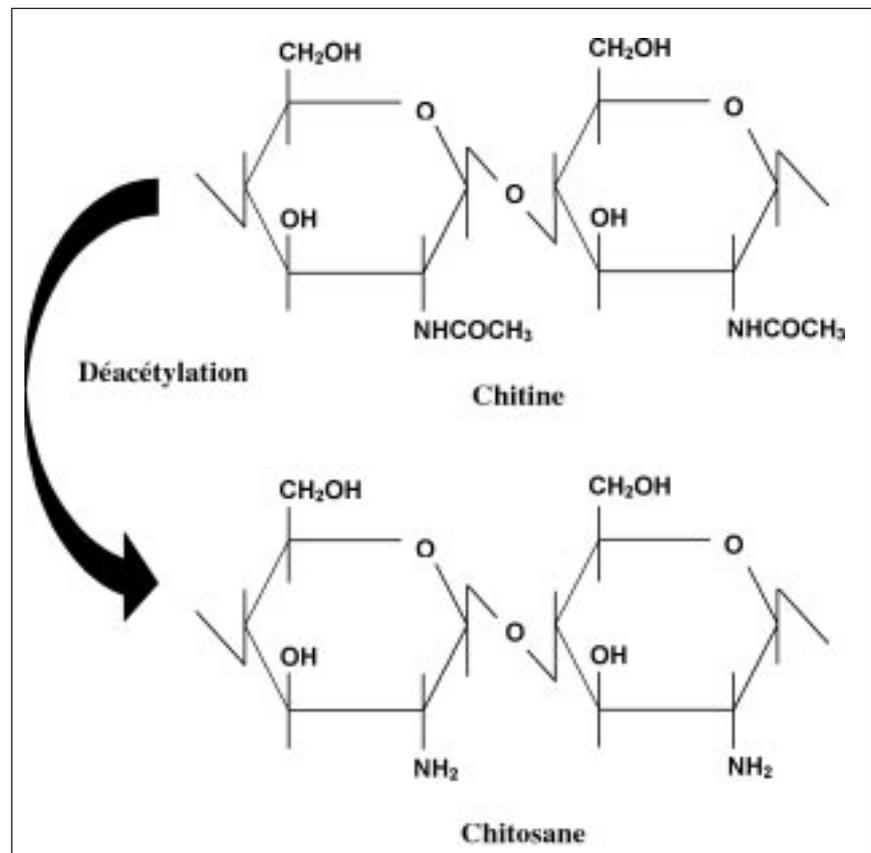


Figure 2: structures chimiques de la chitine et du chitosane. Ce dernier est obtenu par hydrolyse d'au moins 50% de groupes acétyles ($-CH_3-CO$). Cette opération, appelée déacétylation, permet de libérer les groupes amines (NH_2).

le cobaye (Aspden *et al.*, 1996; 1997a; 1997b; Tengamnuay *et al.*, 2000). Plusieurs études ont démontré que le chitosane et ses dérivés présentent des propriétés bioadhésives qui permettent d'augmenter le temps de contact et favorisent l'absorption des macromolécules à travers les muqueuses en augmentant la perméabilité de l'épithélium de manière réversible via l'ouverture des jonctions serrées permettant un passage paracellulaire aux composés hydrophiles (Hidalgo *et al.*, 1989; Illum *et al.*, 1994; Artursson *et al.*, 1994; Kotzé *et al.*, 1997; Dodane *et al.*, 1999; Tengamnuay *et al.*, 2000; Thanou *et al.*, 2001). Par suite de leur instillation à la surface de l'épithélium des muqueuses, les polymères mucoadhésifs gonflent en absorbant de l'eau au contact du mucus. Il en résulte un enchevêtrement physique entre les groupes amines des chaînes polymériques du chitosane, chargés positivement, et le groupe carboxyle de l'acide sialique et/ou les groupes carboxyles, ainsi que les groupes sulfates des glycosaminoglycanes (GAG), tel que l'héparane sulfate,

chargés négativement. Ces derniers et l'acide sialique (ou acide N-acétylneuraminique) sont présents abondamment dans la couche muqueuse couvrant l'épithélium des muqueuses (Lehr *et al.*, 1992), ainsi qu'à la surface des membranes cellulaires qui sont légèrement anioniques (Apple *et al.*, 1988). A cela succède l'établissement d'interactions chimiques d'ordre électrostatique formant des liaisons de type ionique (Greaves et Wilson 1993; Sabnis *et al.*, 1997) (figure 3). Outre les liaisons de type ionique, des interactions chimiques non ioniques, à savoir les ponts d'hydrogène, peuvent également être établies entre les différentes fonctions du chitosane (Sanzgiri *et al.*, 1990), par exemple les groupements hydroxyles ($-\text{CH}_2\text{OH}$), et les groupes carboxyles, hydroxyles et/ou sulfates des GAG, ainsi que de l'acide sialique, présents dans le mucus et sur la surface cellulaire (figure 3).

Les chitosanes, seuls ou en complexe avec un polymère anionique, sont un excellent support pour le transport et le relargage lent de principes actifs médicamenteux (Dutkiewicz et Tuora, 1992). Non digérés par les

enzymes digestives au niveau de l'estomac, ils retardent par exemple la délivrance de produits encapsulés qui doivent arriver sans transformation dans l'intestin (Bernkop-Schnurch et Pasta, 1998). Enfin, il a été démontré que le complexe composé du chitosane enrobant un plasmide peut faciliter le transport et l'expression d'un gène délivré via un plasmide dans l'intestin grêle et le côlon chez le lapin (MacLaughlin *et al.*, 1998).

Les chitosanes peuvent également déclencher la production du TNF- α (*tumor necrosis factor*) par les monocytes humains via les récepteurs lipopolysaccharidiques CD14 (Otterlei *et al.*, 1994). En outre, il a été démontré qu'un chitosane partiellement déacétylé augmente l'activité cytolytique des macrophages péritonéaux et la production du CSF (*colony-stimulating factor*) *in vitro* par des macrophages, des cellules de la rate et des cellules de la moelle osseuse. Enfin, il stimule également la production d'IL-1 (*interleukine-1*) par les macrophages péritonéaux chez la souris (Nishimura *et al.*, 1986). Shibata et collaborateurs (1997) ont démontré que seules les particules phagocytibles de chitine ou de chitosane sont en mesure d'induire la synthèse de l'interféron γ . Etant donné que le chitosane sous forme soluble et présentant un degré de déacétylation très élevé n'est pas phagocyté, l'effet « stimulateur » sur la réponse immune est dû plus à ses propriétés permettant d'augmenter le temps de contact et de favoriser l'absorption paracellulaire d'antigènes au niveau de l'épithélium, qu'à l'effet direct sur le système immunitaire (van der Lubben *et al.*, 2001a).

UTILISATION DES CHITOSANES EN VACCINATION PAR VOIE MUQUEUSE

L'efficacité du chitosane est maintenant établie, non seulement comme substance favorisant l'absorption des macromolécules à travers la surface des muqueuses, mais aussi comme adjuvant (substance qui, lorsqu'elle est administrée en même temps qu'un antigène, augmente la réponse immunitaire à cet antigène) en vaccination. L'effet « adjuvant » des chitosanes est dû, d'une part, à leur propriétés viscosifiantes et bioadhésives et, d'autre part, à l'ouverture transitoire des jonctions serrées de l'épithélium due à la

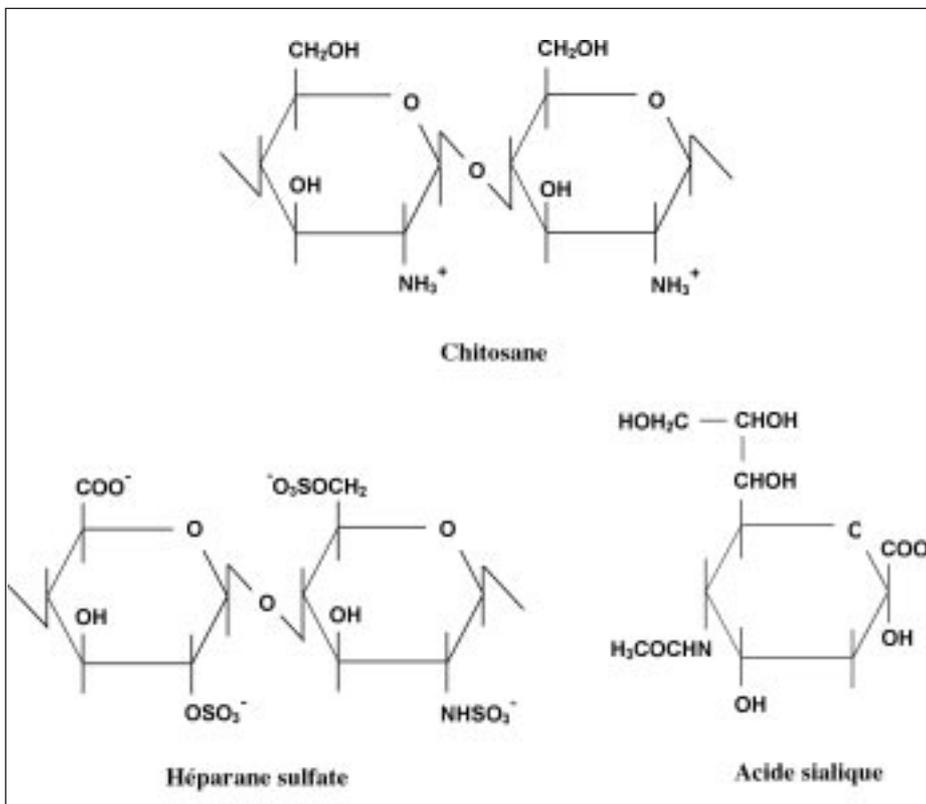


Figure 3: interactions chimiques formant des liaisons de type a) ionique entre les groupes amines ($-\text{NH}_3^+$) chargés positivement du chitosane et le groupe carboxyle ($-\text{COO}^-$) de l'acide sialique et/ou les groupes carboxyles, ainsi que les groupes sulfates ($-\text{SO}_3^-$) d'héparane chargés négativement, et b) non ionique (les ponts d'hydrogène) entre les groupements hydroxyles ($-\text{CH}_2\text{OH}$) du chitosane, et les groupes carboxyles, hydroxyles et/ou sulfates des GAG en l'occurrence de l'héparane sulfate, ainsi que de l'acide sialique.

Tableau 1. Schéma récapitulatif de la synthèse des chitosanes, du mode d'action à la suite de leur application au niveau des muqueuses lors qu'ils sont associés aux antigènes, et en conséquence, des effets « adjuvants » pouvant être induits.

Chitosanes	Obtention	Mécanismes d'action	Effets induits
Chitosane et ses dérivés (formes solubles)	Dépolymérisation et déacétylation de la chitine ; Substitution et greffage de nouveaux groupes sur les chaînes polymériques des chitosanes.	- établissement des liaisons de type ioniques et non ioniques : propriété mucoadhésive ; - interactions des groupes amines avec les jonctions serrées de l'épithélium.	- ralentissement de la clairance mucociliaire de la muqueuse respiratoire et du transit gastro-intestinal : augmentation du temps d'exposition de l'antigène à la muqueuse ; - ouverture transitoire des jonctions serrées de l'épithélium des muqueuses : passage paracellulaire des antigènes.
Nanoparticules et microparticules de chitosane	Précipitation, Coacervation des chitosanes.	- protection d'antigènes enrobés de chitosane de la dégradation (acide et enzymatique) lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal ; - propriété mucoadhésive ; - libération contrôlée et prolongée des antigènes enrobés de chitosane ; - augmentation de la prise d'antigènes par les cellules épithéliales (taille de la nanoparticule de chitosane < 200 nm) ou par les cellules M du dôme épithélial (taille de la microparticules de chitosane < 10 µm).	- antigènes intacts à l'arrivée au niveau des intestins ; - augmentation du temps d'exposition des antigènes à la muqueuse ; - passage transcellulaire des antigènes ; - transport des antigènes au MALT*.

*MALT-mucosa associated lymphoid tissue (tissu lymphoïde associé aux muqueuses).

diminution de la protéine transmembranaire occludine et la protéine ZO-1 (*zonula occludens 1*) à laquelle la première est associée (Schipper *et al.*, 1997) (tableau 1). La propriété mucoadhésive entraîne un meilleur contact avec la muqueuse et surtout un ralentissement de la clairance mucociliaire de la muqueuse respiratoire ou du transit gastro-intestinal et, en conséquence, une augmentation du temps d'exposition des antigènes à la muqueuse. L'effet bioadhésif s'additionnant à l'effet viscosifiant, pour des hydrogels de viscosité comparable, une formulation contenant un polymère bioadhésif permet d'obtenir un temps de rémanence supérieur à un simple agent viscosifiant (par exemple la carboxyméthylcellulose, ou le dextran) (Davies *et al.*, 1991). Enfin, la propriété mucoadhésive, ainsi que la capacité des chitosanes d'ouvrir les jonctions serrées, améliorent la biodisponibilité d'antigènes au niveau des muqueuses ce qui serait susceptible de stimuler davantage le système immunitaire.

En général, quelle que soit la voie d'administration considérée, le but commun à poursuivre est d'optimiser la biodisponibilité des vaccins au

niveau de leur site d'action et de réduire les effets indésirables accompagnant l'administration de certains constituants. La biodisponibilité inhérente des protéines au niveau des muqueuses est très faible en raison de leurs masses moléculaires élevées et leur charge ionique (molécules hydrophiles). De surcroît, elles sont facilement dégradables par des enzymes dans le tractus gastro-intestinal. Il en est de même pour les acides nucléiques du fait de leur faible diffusibilité à travers les membranes biologiques et de leur instabilité dans les milieux biologiques, car ils sont facilement dégradés par les nucléases *in vivo*. Cela empêche souvent leur administration au moyen de formulations conventionnelles, réduisant ainsi considérablement leur potentiel vaccinal ou thérapeutique. Afin d'augmenter leur biodisponibilité après administration par voie muqueuse, hormis l'utilisation des formulations solubles de chitosane, des systèmes particuliers (nanoparticules et microparticules) à base de chitosane ont été également conçus. Ces systèmes intègrent les protéines via les interactions électrostatiques entre les groupes carboxyles et amines, et l'ADN chargé négativement. Ceci

permet: 1) de protéger ces molécules de la dégradation et d'améliorer leur libération et leur absorption sous forme active. Ces aspects sont développés pour l'administration de peptides ou de protéines à visée immunologique ou thérapeutique (vaccins administrés par voie muqueuse) (Calvo *et al.*, 1997; Fernandez-Urrusuno *et al.*, 1999; van der Lubben *et al.*, 2001b) et pour l'administration d'acides nucléiques (Roy *et al.*, 1999); 2) de favoriser l'absorption de ces molécules en immobilisant, par le phénomène de bioadhésion, le système particulaire contenant l'antigène au niveau de la muqueuse; et 3) de libérer de façon contrôlée et prolongée des substances enrobées de chitosane, soit par une dégradation des particules de chitosane par les enzymes bactériennes (Lorenzo-Lamosa *et al.*, 1998), soit par une dégradation enzymatique après l'assimilation des particules par les cellules M et leur transport vers le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT-mucosal associated lymphoid tissue) (Muzzarelli *et al.*, 1997; van der Lubben *et al.*, 2001b).

A la différence des formulations solubles de sels et de dérivés de chito-

sane qui facilitent le transport paracellulaire de macromolécules hydrophiles via l'ouverture transitoire des jonctions serrées de l'épithélium, les systèmes particulaires biodégradables à base de chitosane, obtenus par précipitation ou coacervation (elle repose sur la réaction entre deux monomères chimiquement différents à l'interface de deux liquides non miscibles et le coacervat se forme après déshydratation ménagée) (Berthold *et al.*, 1996), favorisent l'endocytose des antigènes associés aux particules par les cellules M du dôme épithélial, qui les transportent au MALT (Kas *et al.*, 1997; Thanou *et al.*, 2001; van der Lubben *et al.*, 2001b). Les microparticules à base d'acide lactique de taille inférieure à 10 µm, administrées par voie orale chez la souris, sont endocytées par les cellules M et transportées aux plaques de Peyer du tissu lymphoïde associé aux intestins (GALT-*gut associated lymphoid tissue*) induisant une réponse immune locale en anticorps IgA, tandis que celles de taille inférieure à 5 µm sont transportées directement dans la rate et le tissu lymphoïde systémique stimulant la synthèse des anticorps IgM et IgG sériques (Tabata *et al.*, 1996). Il en est de même pour les microparticules à base de chitosane administrées par voie orale chez la souris, dont la présence dans les plaques de Peyer a été révélée à l'aide de microscopie confocale (van der Lubben *et al.*, 2001b). De plus, Roy et collaborateurs (1999) ont clairement démontré que les nanoparticules de chitosane chargées d'ADN plasmidique sont capables de véhiculer le gène qui code pour un allergène de la cacahuète, dans la muqueuse intestinale de la souris et, par conséquent, d'induire une réponse immune en IgA et IgG. Cela a permis de réduire l'anaphylaxie induite par cet allergène.

Contrairement à la vaccination par voie orale, où les antigènes doivent être protégés de la dégradation par leur incorporation dans un système particulaire (nano- ou microparticules), les vaccins intranasaux peuvent être également administrés sous une forme soluble. En effet, les antigènes peuvent être associés à une forme soluble de chitosane, de ses sels ou de ses dérivés, qui favorise en premier lieu le transport paracellulaire d'antigènes hydrophiles par l'ouverture des jonctions serrées (Artursson *et al.*, 1994; Schipper *et al.*, 1997;

Thanou *et al.*, 2000; 2001; van der Lubben *et al.*, 2001b). L'administration de sel de chitosane, tel que le glutamate de chitosane en association aux antigènes par voie intranasale chez la souris, s'est traduite par une réponse en anticorps IgG et IgA sérique et locale beaucoup plus élevée que celle induite sans les chitosanes (Jabbal-Gill *et al.*, 1998; Bacon *et al.*, 2000). McNeela et collaborateurs (2000) ont montré que la vaccination des souris et cobayes par voie intranasale à trois reprises avec une toxine de la diphtérie qui est faiblement immunogène par voie intranasale, associée au glutamate de chitosane, a induit une forte réponse en anticorps IgG et IgA et une réponse immune cellulaire essentiellement de type Th2. De plus, il a suffi d'un seul rappel par voie intranasale avec le complexe chitosane+toxine après la primo-vaccination par voie parentérale avec le vaccin classique contre la diphtérie, pour augmenter la réponse en anticorps neutralisant la toxine de la diphtérie. Récemment Gogev et collaborateurs (2003) ont démontré que l'administration conjointe de l'adénovirus humain de type 5 recombinant non réplicatif exprimant la glycoprotéine gD (HAdV-5gD) de l'herpèsvirus bovin 1 (BoHV-1) et de glycol-chitosane, chez les veaux par voie intranasale, s'est traduite par une réduction significative des titres d'excrétion du virus d'épreuve par rapport à une immunisation avec l'HAdV-5gD administré seul. La protection contre les signes cliniques de la maladie induite avec le virus d'épreuve était également meilleure.

Outre les formulations solubles de chitosane, de ses sels et dérivés, des nanoparticules et microparticules de chitosane ont été également administrés par voie intranasale (Soane *et al.*, 1999; 2001). Il a été démontré que des nanoparticules faites de chitosane étaient efficaces pour augmenter l'absorption nasale d'insuline chez le lapin, le rat et le mouton (Fernandez-Urrusuno *et al.*, 1999; Dyer *et al.*, 2002). De plus, l'administration par voie nasale de nanoparticules de chitosane chargé d'ADN plasmidique codant pour l'hémagglutinine ou la nucléoprotéine (NP) du virus influenza de type A, induit une réponse immunitaire systémique et locale chez la souris (Illum *et al.*, 2001).

Les microparticules sont endocytées

et transportées par les cellules M au tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale (NALT-*nasal associated lymphoid tissue*), tandis que celles de taille entre 1 et 2 µm sont transportées jusqu'aux ganglions lymphatiques et, par conséquent, peuvent aussi induire une réponse immune systémique envers l'antigène incorporé (Rebelatto *et al.*, 2001). Le transport des nanoparticules à travers la muqueuse nasale est dû au transport transcellulaire des cellules M et des cellules épithéliales, et au transport paracellulaire (Brooking *et al.*, 2001; van der Lubben *et al.*, 2001a).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La «richesse» chimique du chitosane et ses propriétés biologiques en font un polymère particulièrement intéressant pour être utilisé en tant qu'adjuvant par voie muqueuse. De ce fait, des modifications chimiques additionnelles de ces polymères pourraient être envisagées. Cela créerait des réactivités conduisant à l'amélioration des propriétés de ces polymères qui permettraient d'augmenter l'efficacité de vaccins administrés par voie muqueuse. Ainsi, les chitosanes pourraient être «habillés» chimiquement, afin de modifier certaines de leurs propriétés pour améliorer leur fonction d'adjuvant. Pour ce faire, des recherches, dans lesquelles le greffage d'un ou de plusieurs groupements ou la substitution des groupes amines par des chaînes hydrocarbonées au niveau des chaînes polymériques, viseraient à augmenter leur solubilité dans l'eau sans affecter leur caractère cationique à pH neutre (Kotzé *et al.*, 1998; Thanou *et al.*, 2000; 2001). De tels dérivés seraient alors susceptibles d'établir des interactions de type électrostatique à pH physiologique entre leurs groupes amines chargés positivement et ceux de l'acide sialique et/ou des GAG chargés négativement du mucus et les membranes cellulaires (Apple *et al.*, 1988; Lehr *et al.*, 1992). En outre, les groupes protonisés favoriseraient préférentiellement le transport paracellulaire d'antigènes par l'ouverture des jonctions serrées (Artursson *et al.*, 1994; Schipper *et al.*, 1997). Enfin, les modifications structurales des chitosanes pourraient être complétées par une hydrolyse enzymatique additionnelle des chaînes polymériques, soit par l'action d'une chitine déacétylase ce qui

entraîne une augmentation du degré de déacétylation, soit par l'action d'une endo-chitinase ou d'une chitosanase afin de réduire la masse moléculaire de la chaîne polymérique (Jaspar-Versali *et al.*, 1997; Gogev *et al.*, 2003). Cela permettrait d'augmenter le nombre de groupes amines libres en augmentant la degré de déacétylation, ainsi que leur accessibilité et, par conséquent, leur réactivité en diminuant la masse moléculaire (Sabnis *et al.*, 2000).

Le développement de nouvelles méthodes de modification de la structure moléculaire des chitosanes conduit à de nouvelles applications et à une nouvelle valorisation de ces polymères. L'effet adjuvant des chitosanes promet un large développement dans le domaine des vaccins animaux à administration par voie muqueuse contre tous les agents pathogènes utilisant les muqueuses comme porte d'entrée.

REMERCIEMENT

Ce travail a été rédigé dans le cadre d'une recherche subventionnée par les fonds spéciaux de l'Université de Liège.

Chitosans - novel mucosal adjuvants for vaccination in animals

SUMMARY

The advantage of mucosal vaccination is the induction of an immune response at entry sites of pathogens. Because vaccines alone are poorly bioavailable after mucosal administration, they need to be co-administered with penetration enhancers, or adjuvants. Numerous studies

have demonstrated that chitosans and their derivatives are safe and effective mucosal absorption enhancers of hydrophilic macromolecules such as peptides and proteins. Chitosan is a cationic polysaccharide derived from chitin present in the covering layer of arthropods and in the cell walls of many fungi. Association of vaccines to chitosans, their derivatives or some of their particulate systems, such as nano- and microparticles, has also shown to enhance antigen uptake by mucosal lymphoid tissues, thereby inducing mucosal and systemic immune responses against these antigens. Chitosan and its derivatives are promising adjuvants for mucosal vaccine delivery in animals.

BIBLIOGRAPHIE

- APPLE R.J., DOMEN P.L., MUCKERHEIDE A., MICHAEL J.G. Cationization of protein antigens. IV. Increased antigen uptake by antigen-presenting cells. *J. Immunol.*, 1988, **140**, 3290-3295.
- ARTURSSON P., LINDMARK T., DAVIS S.S., ILLUM L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.*, 1994, **11**, 1358-1361.
- ASPDEN T.J., ILLUM L., SKAUGRUD Ø. Chitosan as a nasal delivery system: evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1996, **4**, 23-31.
- ASPDEN T.J., ILLUM L., SKAUGRUD Ø. The effect of chronic nasal application of chitosan solutions on cilia beat frequency in guinea pigs. *Int. J. Pharm.*, 1997a, **153**, 137-146.
- ASPDEN T.J., MASON J.D., JONES N.S., LOWE J., SKAUGRUD O., ILLUM L. Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on in vitro and in vivo mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J. Pharm. Sci.*, 1997b, **86**, 509-513.
- BACON A., MAKIN J., SIZER P.J., JABBAL-GILL I., HINCHCLIFFE M., ILLUM L., CHATFIELD S., ROBERTS M. Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 5764-5770.
- BERNKOP-SCHNURCH A., PASTA M. Intestinal peptide and protein delivery: novel bioadhesive drug-carrier matrix shielding from enzymatic attack. *J. Pharm. Sci.*, 1998, **87**, 430-434.
- BERTHOLD A., CREMER K., KREUTER J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. *J. Control. Release*, 1996, **39**, 17-25.
- BROOKING J., DAVIS S.S., ILLUM L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. *J. Drug Target.*, 2001, **9**, 267-279.
- CALVO P., REMUNAN-LOPEZ C., VILA-JATO J.L., ALONSO M.J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.*, 1997, **14**, 1431-1436.
- CHORNET E., DUMITRIU S. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, **31**, 223-246.
- DAVIES N.M., FARR S.J., HADGRAFT J., KELLAWAY I.W. Evaluation of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. I. Viscous solutions. *Pharm. Res.*, 1991, **8**, 1039-1043.
- DODANE V., AMIN K.M., MERWIN J.R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int. J. Pharm.*, 1999, **182**, 21-32.
- DUTKIEWICZ J., TUORA M. New forms of chitosans polyelectrolyte complexes. In: Brine C.J., Standford P.A., Zikakis J.P. (Eds.), *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier : London, 1992, 496-505.
- DYER A.M., HINCHCLIFFE M., WATTS P., CASTILE J., JABBAL-GILL I., NANKERVIS R., SMITH A., ILLUM L. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: a comparative study in two animal

- models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.*, 2002, **19**, 998-1008.
- FERNANDEZ-URRUSUNO R., CALVO P., REMUNAN-LOPEZ C., VILA-JATO J.L., ALONSO M.J. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.*, 1999, **16**, 1576-1581.
- GOGEV S., VERSALI M.-F., GAUTIER S., THIRY E. Glycol Chitosan improves the efficacy of intranasally administered replication-defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus 1. *Vaccine*, 2003, accepté pour publication.
- GREAVES J.L., WILSON C.G. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1993, **11**, 349-383.
- HIDALGO I.J., RAUB T.J., BORCHARDT R.T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 1989, **96**, 736-749.
- HORNER A.A., RONAGHY A., CHENG P.M., NGUYEN M.D., CHO H.J., BROIDE D., RAZ E. Immunostimulatory DNA is a potent mucosal adjuvant. *Cell Immunol.*, 1998, **190**, 77-82.
- ILLUM L., FARRAJ N.F., DAVIS S.S. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm. Res.*, 1994, **11**, 1186-1189.
- ILLUM L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2000, **11**, 1-18.
- ILLUM L., JABBAL-GILL I., HINCHCLIFFE M., FISHER A.N., DAVIS S.S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2001, **51**, 81-96.
- JABBAL-GILL I., FISHER A.N., RAPPUOLI R., DAVIS S.S., ILLUM L. Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin and recombinant pertussis toxin after nasal administration with chitosan in mice. *Vaccine*, 1998, **16**, 2039-2046.
- JASPAR-VERSALI M.F., CLERISSE F. Expression and characterization of recombinant chitin deacetylase. In : Domard A., Roberts G.A.F., Varum K.M. (Eds.), *Advances in Chitin Sciences*. Jacques André Publisher : Lyon, 1997, 273-278.
- KAS H.S. Chitosan : properties, preparations and application to microparticulate systems. *J. Microencapsul.*, 1997, **14**, 689-711.
- KOTZE A.F., LUESSEN H.L., DE L.B., DE B.A., VERHOEF J.C., JUNGINGER H.E. Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). *J. Control. Release*, 1998, **51**, 35-46.
- LEHR C.M., BOUWSTRA J.A., SCHACHT E.H., JUNGINGER H.E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int. J. Pharm.*, 1992, **78**, 43-48.
- LORENZO-LAMOSA M.L., REMUNAN-LOPEZ C., VILA-JATO J.L., ALONSO M.J. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J. Control. Release*, 1998, **52**, 109-118.
- McLAUGHLIN F.C., MUMPER R.J., WANG J., TAGLIAFERRI J.M., GILL I., HINCHCLIFFE M., ROLLAND A.P. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J. Control. Release*, 1998, **56**, 259-272.
- McCLUSKIE M.J., WEERATNA R.D., DAVIS H.L. Intranasal immunization of mice with CpG DNA induces strong systemic and mucosal responses that are influenced by other mucosal adjuvants and antigen distribution. *Mol. Med.*, 2000, **6**, 867-877.
- McNEELA E.A., O'CONNOR D., JABBAL-GILL I., ILLUM L., DAVIS S.S., PIZZA M., PEPPOLONI S., RAPPUOLI R., MILLS K.H. A mucosal vaccine against diphtheria: formulation of cross reacting material (CRM(197)) of diphtheria toxin with chitosan enhances local and systemic antibody and Th2 responses following nasal delivery. *Vaccine*, 2000, **19**, 1188-1198.
- MUZZARELLI R.A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol. Life Sci.*, 1997, **53**, 131-140.
- NISHIMURA K., NISHIMURA S., SEO H., NISHI N., TOKURA S., AZUMA I. Macrophage activation with multi-porous beads prepared from partially deacetylated chitin. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1986, **20**, 1359-1372.
- OTTERLEI M., VARUM K.M., RYAN L., ESPEVIK T. Characterization of binding and TNF-alpha-inducing ability of chitosans on monocytes: the involvement of CD14. *Vaccine*, 1994, **12**, 825-832.
- REBELATTO M.C., GUIMOND P., BOWERSOCK T.L., HOGENESCH H. Induction of systemic and mucosal immune response in cattle by intranasal administration of pig serum albumin in alginate microparticles. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2001, **83**, 93-105.
- ROY K., MAO H.Q., HUANG S.K., LEONG K.W. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat. Med.*, 1999, **5**, 387-391.
- SABNIS S., REGE P., BLOCK L.H. Use of chitosan in compressed tablets of diclofenac sodium: inhibition of drug release in an acidic environment. *Pharm. Dev. Technol.*, 1997, **2**, 243-255.
- SABNIS S., BLOCK L.H. Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems. I. Molecular modifications. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2000, **27**, 181-186.
- SANZGIRI Y.D., BLANTON C.D.J., GALLO J.M. Synthesis, characterization, and in vitro stability of chitosan-methotrexate conjugates. *Pharm. Res.*, 1990, **7**, 418-421.
- SCHIPPER N.G., OLSSON S., HOOGSTRAATE J.A., DEBOER A.G., VARUM K.M., ARTURSSON P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharm. Res.*, 1997, **14**, 923-929.
- SHIBATA Y., FOSTER L.A., METZGER W.J., MYRVIK Q.N. Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of N-acetyl-D-glucosamine, in mice. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 1734-1741.
- SOANE R.J., FRIER M., PERKINS A.C., JONES N.S., DAVIS S.S., ILLUM L. Evaluation of the clearance char-

- acteristics of bioadhesive systems in humans. *Int. J. Pharm.*, 1999, **178**, 55-65.
- SOANE R.J., HINCHCLIFFE M., DAVIS S.S., ILLUM L. Clearance characteristics of chitosan based formulations in the sheep nasal cavity. *Int. J. Pharm.*, 2001, **217**, 183-191.
- TABATA Y., INOUE Y., IKADA Y. Size effect on systemic and mucosal immune responses induced by oral administration of biodegradable microspheres. *Vaccine*, 1996, **14**, 1677-1685.
- TAMURA S., SAMEGAI Y., KURATA H., NAGAMINE T., AIZAWA C., KURATA T. Protection against influenza virus infection by vaccine inoculated intranasally with cholera toxin B subunit. *Vaccine*, 1988, **6**, 409-413.
- TAMURA S., ASANUMA H., TOMITA T., KOMASE K., KAWAHARA K., DANBARA H., HATTORI N., WATANABE K., SUZUKI Y., NAGAMINE T. Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine*, 1994, **12**, 1083-1089.
- THANOU M.M., KOTZE A.F., SCHARRINGHAUSEN T., LUESSEN H.L., DE B.A., VERHOEF J.C., JUNGINGER H.E. Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal caco-2 cell monolayers. *J. Control. Release.*, 2000, **64**, 15-25.
- THANOU M., VERHOEF J.C., JUNGINGER H.E. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, **52**, 117-126.
- TENGAMNUAY P., SAHAMETHAPAT A., SAILASUTA A., MITRA A.K. Chitosans as nasal absorption enhancers of peptides: comparison between free amine chitosans and soluble salts. *Int. J. Pharm.*, 2000, **197**, 53-67.
- VAN DER LUBBEN I.M., VERHOEF J.C., BORCHARD G., JUNGINGER H.E. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2001a, **14**, 201-207.
- VAN DER LUBBEN I.M., KONINGS F.A., BORCHARD G., VERHOEF J.C., JUNGINGER H.E. In vivo uptake of chitosan microparticles by murine Peyer's patches: visualization studies using confocal laser scanning microscopy and immunohistochemistry. *J. Drug Target.*, 2001b, **9**, 39-47.
- WESTERINK M.A., SMITHSON S.L., SRIVASTAVA N., BLONDER J., COESHOTT C., ROSENTHAL G.J. ProJuvant (Pluronic F127/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid. *Vaccine*, 2001, **20**, 711-723.