

Prévention d'une réponse IgE spécifique de la β -lactoglobuline bovine chez la souris par immunisation génique

K. Adel-Patient, C. Creminon, J.M. Wal, J.M. Chatel

Laboratoire d'immunoallergie alimentaire INRA-CEA, DSV/DRM/service de pharmacologie et d'immunologie, CE de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

(Reçu le 12 juillet 1999 ; accepté le 2 décembre 1999)

Résumé

L'immunisation génique consiste en l'injection d'un vecteur d'expression bactérien contenant l'ADNc d'une protéine d'intérêt. Des études ont montré que l'injection d'un tel plasmide chez la souris entraîne une réponse immunitaire spécifique de type Th1 (IgG2a). Cette polarisation de la réponse immunitaire a été décrite dans le cas de pneumoallergènes (Der p5, Bet v1), empêchant toute réponse ultérieure de type Th2 (IgG1 et IgE). L'objectif de notre étude était d'étudier un tel effet préventif dans le cas d'un allergène alimentaire, la β -lactoglobuline bovine (β LG). Cette protéine est un allergène majeur du lait de vache, et la présence d'IgE anti- β LG est démontrée chez 60 % des patients allergiques au lait. Nous avons, dans un premier temps, développé un modèle expérimental d'induction d'allergie à la β LG sur des souris Balb/c. Des dosages quantitatifs des différents isotypes (IgE, IgG1 et IgG2a) ont été mis au point, permettant ainsi de suivre la réponse anticorps totale et anti- β LG chez ces souris. Nous avons ensuite construit un plasmide contenant l'ADNc de la β LG. Ce plasmide se révèle fonctionnel in vitro et, après injection dans le muscle du tibia de souris, il permet l'expression in situ de la β LG sous sa forme native. Par ailleurs, la réponse primaire induite par ce type d'immunisation est caractérisée par une réponse mixte IgG1/IgG2a, et une absence d'IgE anti- β LG. Sur des souris préimmunisées par injection du gène, une sensibilisation ultérieure par la protéine se traduit par une diminution persistante de plus de 95 % du taux d'IgE spécifiques, et par l'induction d'une forte réponse IgG2a anti- β LG (inexistante chez les souris témoins). L'utilisation de vecteurs non pathogènes et efficaces, administrables par voie digestive, pourrait permettre d'envisager une protection spécifique dans le cas des allergies alimentaires sévères. © 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

allergie alimentaire / IgE / immunisation génique / lait de vache / modèle animal

Summary – Prevention of a β -lactoglobulin specific IgE response in the mouse via gene immunisation.

Gene immunisation consists of injecting a vector of bacterial expression containing cDNA from a known protein. Some studies have shown that the injection of such a plasmid in the mouse results in a type Th1 (IgG2a) specific immune response. This polarisation of the immune response has been described in the case of respiratory allergens (Der p5, Bet v1), which prevent all subsequent type Th2 response (IgG1 and IgE). The aim of our study was to investigate such a preventive effect in the case of a food allergen, ie, bovine β -lactoglobulin (β LG). This protein is a major allergen in cow's milk, and the presence of anti- β LG IgE has been demonstrated in 60% of patients who are allergic to milk. In the present study, an experimental induction model was first set up for allergy to β LG in Balb/c mice.

Quantitative dosages of the various isotypes (IgE, IgG1, and IgG2a) were determined, thereby permitting the total antibody and anti- β LG reaction to be examined in this group of mice. A plasmid containing the β LG cDNA was then constructed. This plasmid was found to be functional in vitro, and following its injection into the mouse tibia muscle, it allowed the in situ expression of β LG in its native form. In addition, the primary response induced by this type of immunisation was characterised by a mixed IgG1/IgG2a response, and by an absence of anti- β LG IgE. In mice which had been preimmunised by gene vaccine, the resulting sensitivity induced by the protein could be observed in the persistent decrease of over 95% in the specific IgE rate, and by the induction of a marked anti- β LG IgG2a response (not present in the control mice). The use of efficient non pathogenic vectors which can be orally administered could provide a mean of specific protection in the case of severe food allergies. © 2000 Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS

food allergy / IgE / gene vaccine / cow's milk / animal model

L'immunisation génique consiste en l'injection chez l'animal d'un plasmide bactérien contenant l'ADNc (ADN complémentaire correspondant au brin codant) d'une protéine d'intérêt, ainsi que toutes les séquences nécessaires à son expression dans une cellule eucaryote. Un plasmide est en fait une petite molécule d'ADN double brin, présent naturellement dans les bactéries et les levures, se répliquant de façon autonome quand la cellule hôte prolifère, et possédant des séquences vitales telles que, par exemple, les gènes de résistance aux antibiotiques. Les premiers essais d'immunisation génique ont été réalisés chez la souris par Wolf et al. [40], démontrant une synthèse importante des protéines codées par le gène au site d'injection et leur persistance pendant plusieurs mois. Divers travaux ont démontré que la protéine produite in situ induit une réponse immunitaire spécifique [28, 35]. Le type de réponse induite est variable selon le mode d'immunisation. En effet, une injection intramusculaire ou intradermique permet l'induction d'une réponse immunitaire de type Th1, caractérisée par la production de cytokines telles que l'IFN γ et l'IL-2, et la production d'IgG2a chez la souris. À l'opposé, une administration par *gene gun* (introduction dans l'épiderme de billes d'or revêtues par de l'ADN, grâce à un accélérateur de particules ou de l'hélium comprimé) permet une réponse immunitaire de type Th2 très forte. Ce type de réponse est caractérisé par la synthèse d'autres cytokines telles que l'IL-4, IL-5, IL-10, et la production d'IgE et d'IgG1 chez la souris. Cette différence dans le type de réponse immunitaire induite pourrait résulter de la différence de quantité d'ADN

bactérien administrée, bien que cette quantité ne soit pas le seul facteur intervenant [8]. En effet, l'administration intramusculaire ou intradermique nécessite 10 à 100 μ g d'ADN, tandis que 1 μ g suffit par *gene gun*. Or, l'ADN bactérien agit lui-même comme un adjuvant du fait de la présence de séquences nucléotides particulières, dites séquences immunostimulatrices. Ces séquences immunostimulatrices correspondent à la succession, à partir de l'extrémité 5', de deux purines (guanine–adénine ou adénine–adénine), puis de la séquence cytosine–guanine non méthylée, puis de deux pyrimidines (thymine–cytosine ou thymine–thymine). Ces séquences permettent une production rapide et simultanée d'IL-6 et d'IL-12 par les cellules B, d'IL-6 et d'IFN γ par les cellules T CD4⁺ et d'IFN γ par les cellules NK [17]. Il en résulte une réponse de type Th1. Ces séquences sont rares (près de 20 fois moins fréquentes) et méthylées chez les vertébrés supérieurs, et leur présence constitue en quelque sorte un signal pour l'organisme lors d'une infection bactérienne.

Les applications de l'immunisation génique sont variées, allant de la vaccination contre des maladies infectieuses ou contre des infections chroniques (hépatite B et C, VIH, malaria par exemple), à l'immunothérapie contre le cancer. Des vaccinations géniques sont par ailleurs en phase de développement clinique aux États-Unis et en Suède. Ce type d'immunisation, qui ne nécessite pas de disposer de la protéine, peut également être appliqué chez l'animal pour la production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux spécifiques utilisables comme outils immunoanalytiques. Par ailleurs, l'orientation de la

réponse immunitaire vers une réponse de type Th1 semble très intéressante pour la prévention de l'allergie. Différents travaux ont en effet démontré que lorsque la protéine codée par le plasmide est un allergène, ce type d'immunisation permet l'induction d'une réponse Th1 qui persiste même lors d'une sensibilisation ultérieure par la protéine dans des conditions favorisant normalement une réponse IgE. Ces travaux ont essentiellement porté sur des pneumoallergènes comme Der p5 [12, 13], Bet v1 [10], et sur un allergène de la cacahuète (Ara h 2 [31]).

Notre laboratoire étudie les allergies alimentaires, notamment au lait de vache. Les allergènes du lait de vache sont multiples (β -lactoglobuline, caséines, α -lactalbumine, etc.), et la sensibilisation à la β -lactoglobuline a été démontrée chez 60 % des patients allergiques au lait de vache [37]. Nous avons récemment développé un modèle de souris produisant des quantités importantes d'IgE à la suite d'une immunisation par la β -lactoglobuline. Par ailleurs, de la β -lactoglobuline recombinante a été produite. Elle est exprimée chez *Escherichia coli* et présente une immunoréactivité semblable à celle de la protéine naturelle : elle a notamment la même capacité de liaison aux IgE spécifiques de patients allergiques [4]. Nous avons donc construit un plasmide contenant l'ADNc de la β -lactoglobuline, pour l'administrer à l'animal. Après avoir testé la fonctionnalité in vitro et in vivo de ce plasmide en contrôlant la production de β -lactoglobuline et la structure de la protéine exprimée [3], nous avons pu suivre la réponse immunitaire spécifique de souris immunisées génétiquement. La réponse immunitaire observée est de type Th1. Nous avons alors testé l'effet préventif d'une immunisation génique sur une sensibilisation ultérieure par la β -lactoglobuline ; nous avons constaté que ce type d'immunisation permet de diminuer significativement la production d'IgE spécifiques et d'augmenter parallèlement la production d'IgG2a spécifiques. Ces expériences montrent donc la possibilité d'une réorientation d'une réponse de type Th2 vers une réponse de type Th1 à la suite d'une immunisation génique, ce qui permet d'envisager le développement d'un mode de prévention de l'allergie alimentaire.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Construction du plasmide contenant l'ADNc de la β -lactoglobuline

Nous disposons de l'ADNc de la β -lactoglobuline dans un vecteur (pTTQ18) permettant sa production chez *E. coli* (ADNc cloné et fourni par Batt. [14]). L'amplification par PCR de l'ADNc de la β -lactoglobuline a permis d'introduire des sites de coupures spécifiques pour des enzymes de restriction (HindIII et XbaI), la séquence de Kozak et la séquence du peptide signal (cf. « Résultats » pour leurs rôles respectifs). Le produit de PCR purifié a alors été réintroduit dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA.3 (Invitrogen) digéré par ces mêmes enzymes [3]. L'absence de mutation dans la séquence codante de la β -lactoglobuline a été vérifiée par séquençage. La production de grandes quantités de ce plasmide est réalisée dans des bactéries *E. coli* DH5 α en milieu sélectif (résistance à l'ampicilline). La purification du plasmide est effectuée grâce au kit Mega-Prep Endotoxin Free (Qiagen) utilisant une résine échangeuse d'anions sous certaines conditions de force ionique et de pH. Ce protocole assure par ailleurs l'absence d'endotoxines bactériennes dans la solution de plasmide.

Développement de dosages quantitatifs des IgE, IgG1 et IgG2a sériques totales et spécifiques de la β -lactoglobuline

La quantification des différents isotypes totaux et spécifiques de la β -lactoglobuline est essentielle pour suivre la réponse humorale chez les souris immunisées. Elle est réalisée par dosages immunométriques à deux sites (dosages « sandwichs ») utilisant soit un anticorps de capture spécifique de l'isotype (dans le cas du dosage des immunoglobulines totales), soit la β -lactoglobuline (dans le cas du dosage des immunoglobulines spécifiques) immobilisés au fond des puits de plaque de microtitration. Après incubation des sérums à une dilution convenable, un lavage est effectué, puis un anticorps spécifique de l'isotype recherché et marqué par une enzyme (l'acétylcholine estérase [9]) est ajouté comme anticorps traceur. Après un nouveau lavage.

L'activité de l'enzyme est révélée par réaction colorimétrique avec le réactif d'Ellman [26]. La coloration obtenue est alors directement proportionnelle à la quantité d'anticorps sériques liés à la phase solide. Des gammes utilisant des standards d'isotypes purifiés commerciaux sont utilisées pour la quantification des immunoglobulines totales. Une quantification des anticorps anti- β -lactoglobuline sériques est obtenue grâce à l'utilisation comme standard d'anticorps monoclonaux anti- β -lactoglobuline purifiés de différents isotypes (IgG1, IgG2a et IgE). Les anticorps monoclonaux anti- β -lactoglobuline d'isotype IgG1 et IgG2a ont été préparés au laboratoire [25], tandis que les IgE monoclonales anti- β -lactoglobuline ont été préparées et fournies par Granato (CRN, Lausanne). Par ailleurs, le dosage des IgE spécifiques est précédé d'un épuisement des IgG sériques, permettant ainsi de s'affranchir d'un phénomène de compétition éventuel entre les IgE et IgG pour la liaison à la β -lactoglobuline immobilisée.

Expression de la β -lactoglobuline dans des cellules eucaryotes en culture

La fonctionnalité du plasmide contenant l'ADNc de la β -lactoglobuline a été testée dans un premier temps sur des cellules eucaryotes en culture (cellules COS : cellules de reins de singe transformées par le virus SV40). L'expression de la β -lactoglobuline a été réalisée par transfection des cellules par le plasmide, en utilisant la lipofectamine (LipofectAMINE PLUS™ Reagent, Life technologies). La lipofectamine est un mélange de liposomes permettant la complexation de l'ADN, et de lipides facilitant l'entrée de l'ADN complexé dans la cellule. Des cellules confluentes à 50–80 %, cultivées en milieu approprié, sont transfectées avec le plasmide préalablement couplé à la lipofectamine. Après un, deux ou trois jours de culture, le surnageant de culture est prélevé et les cellules sont centrifugées, comptées et lysées. Les protéines solubles sont contenues dans le surnageant obtenu après centrifugation des cellules lysées. Le culot cellulaire est ensuite incubé en milieu dénaturant (urée et β -mercaptoéthanol) permettant l'obtention, après une nouvelle centrifugation, de la fraction de protéines insolubles. Les quantités de β -lactoglobuline native et dénaturée

sont déterminées sur chacune de ces fractions. Cette quantification repose sur deux dosages Elisa développés au laboratoire [25]. Ils utilisent deux couples d'anticorps monoclonaux anti- β -lactoglobuline complémentaires. Le couple qui reconnaît la structure spatiale de la β -lactoglobuline, repliée et stabilisée par deux ponts disulfures, est spécifique d'épitopes dits conformationnels. Le couple reconnaissant la β -lactoglobuline dénaturée par réduction des ponts disulfures puis S-carboxyméthylation est spécifique d'épitopes dits « linéaires ». Les quantités de β -lactoglobuline produites sont alors rapportées au nombre de cellules.

Test de la fonctionnalité du plasmide in vivo chez la souris

Des souris femelles de souche Balb/c sont anesthésiées par injection par voie intrapéritonéale de pentobarbital sodique (75 mg/kg). Deux lots de souris sont alors immunisés par injection de 100 μ g de plasmide contenant ou non l'ADNc de la β -lactoglobuline (lot expérimental et lot témoin). Les immunisations se font dans le muscle antérieur du tibia. 30 minutes après injection d'une solution de sucrose 25 %. Le sucrose permet d'augmenter l'osmolarité des cellules, et donc facilite l'entrée de l'ADN dans les cellules. Des extraits musculaires sont réalisés à partir de souris sacrifiées à intervalle de temps régulier (trois à 49 jours après l'immunisation). La synthèse in situ de β -lactoglobuline sous forme native et dénaturée est quantifiée par les dosages Elisa mentionnés précédemment.

Immunisation par le gène et sensibilisation par la protéine

L'immunisation génique est réalisée selon le protocole précédemment décrit. Dans un premier temps, nous avons regardé quel type de réponse immunitaire est induit à la suite de l'injection du plasmide. Pour cela, des prélèvements sanguins sont réalisés à différents temps après l'immunisation génique, et les concentrations en IgE, IgG1 et IgG2a totales et anti- β -lactoglobuline sont déterminées.

Dans un second temps, les souris sont sensibilisées par voie intrapéritonéale avec 50 μ g de β -lacto-

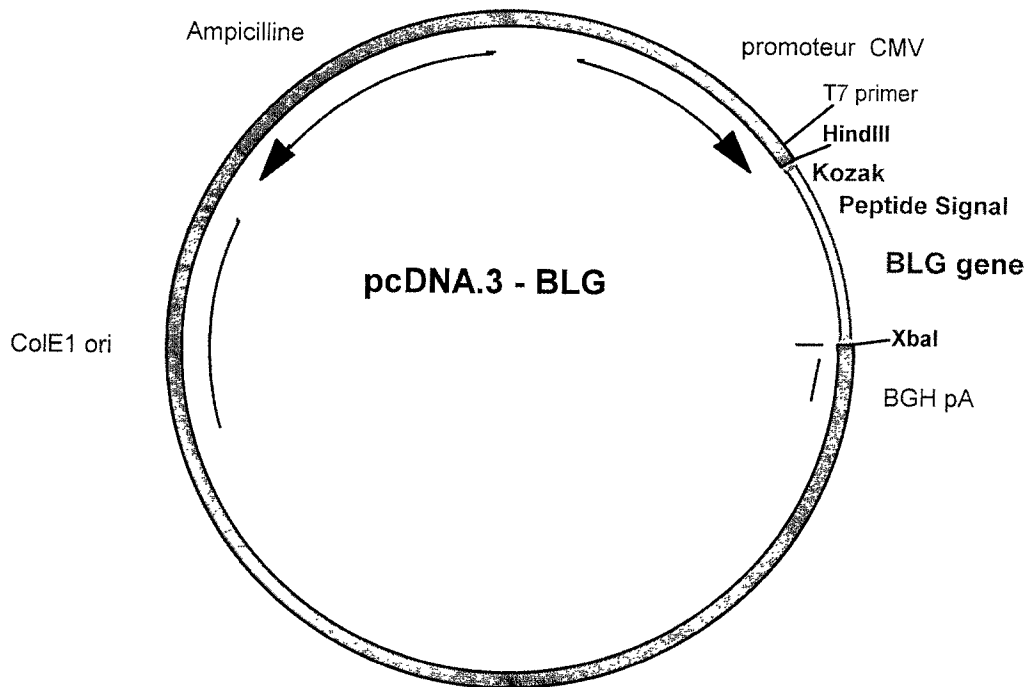


Figure 1. Schéma du plasmide contenant l'ADNc de la β -lactoglobuline (pcDNA.3-BLG). ColE1 ori : origine de répllication bactérienne ; ampicilline : gène de résistance à l'ampicilline ; BLG gene : séquence codant la protéine, précédée du peptide signal et de la séquence de Kozak ; promoteur CMV : promoteur du cytomégalovirus ; BGH pA : signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine ; HindIII, XbaI : sites de reconnaissance pour des enzymes de restriction, sites spécifiques et uniques.

globuline adsorbée sur de l'alum, à des temps variables après l'immunisation génique (trois, sept, 14 ou 21 jours). L'utilisation de l'alum comme adjuvant permet l'induction d'une forte réponse IgE et IgG1 anti- β -lactoglobuline. Des prélèvements sanguins sont également réalisés régulièrement afin d'analyser l'évolution de la réponse humorale des souris.

RÉSULTATS

Construction du vecteur d'expression eucaryote pcDNA.3-BLG

Le plasmide contenant l'ADNc de la β -lactoglobuline (pcDNA.3-BLG) est représenté sur la *figure 1*. Le plasmide utilisé comme témoin est pcDNA.3. Ce type de plasmide correspond à un plasmide bactérien dans lequel différentes séquences ont été ajoutées

afin de permettre la production de protéines dans une cellule eucaryote. On notera essentiellement des séquences propres aux cellules procaryotes avec une origine de répllication bactérienne (ColE1 ori), permettant l'amplification et donc la production de grandes quantités de plasmide dans des bactéries. De plus, la sélection des bactéries possédant le plasmide d'intérêt repose sur la présence d'un gène de résistance à un antibiotique, ici l'ampicilline. Au niveau eucaryote, la régulation de la transcription est permise par la séquence d'un promoteur viral (ici, le cytomégalovirus). La bonne terminaison des ARN messagers est sous la dépendance d'un signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (BGH pA). Au niveau des séquences que nous avons introduites, outre l'ADNc de la β -lactoglobuline, il faut noter l'importance de la séquence de Kozak, séquence consensus permettant la fixation des ribosomes et l'initiation de la transcription chez les euca-

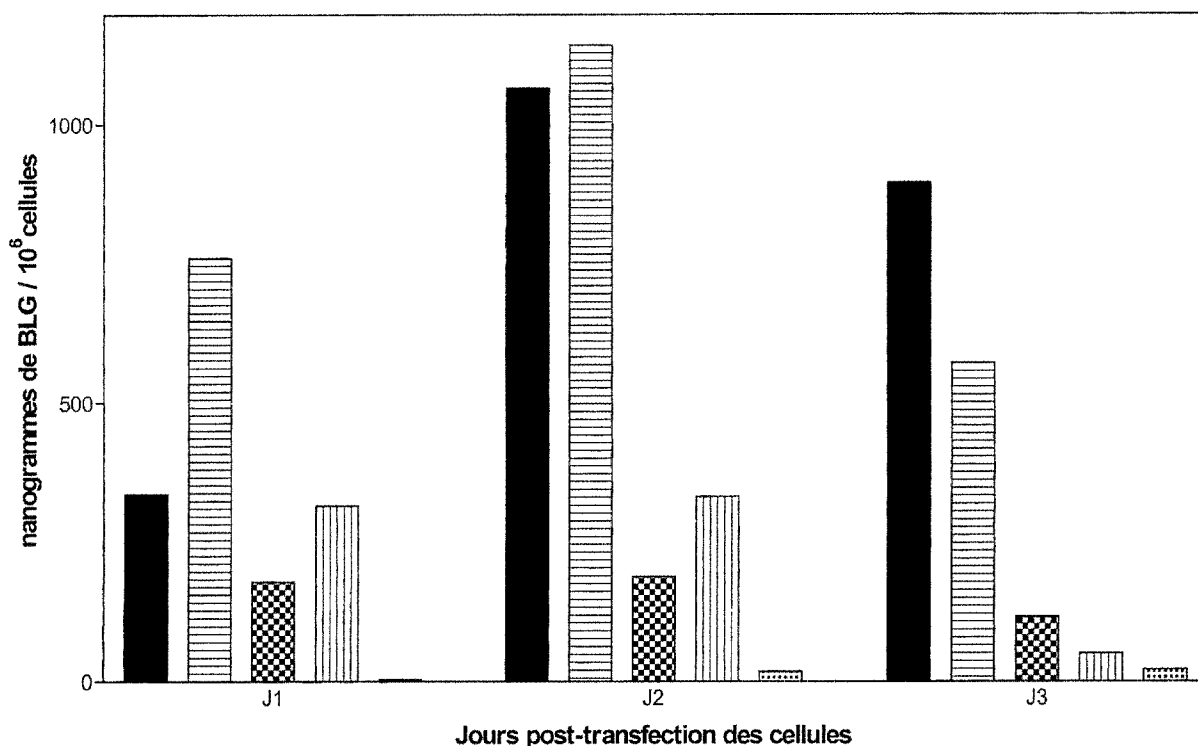


Figure 2. Expression de la β -lactoglobuline (BLG) in vitro par des cellules eucaryotes. Des cellules eucaryotes (cellules COS) sont transfectées par le plasmide pcDNA.3-BLG. Après un, deux ou trois jours de culture, les surnageants de culture sont prélevés, et des extraits cellulaires de protéines solubles et insolubles sont réalisés (cf. « Matériels et méthodes »). La β -lactoglobuline sous forme native et sous forme dénaturée est quantifiée par dosages Elisa. La quantité de β -lactoglobuline dans chaque fraction est rapportée au nombre de cellules. ■ β -lactoglobuline dosée sous forme d'agréats insolubles ; ▨ β -lactoglobuline intracellulaire native ; ▩ β -lactoglobuline intracellulaire dénaturée ; ▤ β -lactoglobuline native sécrétée dans le milieu de culture ; ▦ β -lactoglobuline dénaturée sécrétée dans le milieu de culture.

ryotes [18, 19]. Le peptide signal quant à lui permet l'adressage de la protéine dans le réticulum endoplasmique, permettant ensuite l'acquisition d'une conformation tridimensionnelle correcte par la protéine. Enfin, afin de pouvoir insérer notre ADNc dans le plasmide, des séquences reconnues par des enzymes de restriction spécifiques (XbaI et HindIII) ont été rajoutées à notre insert. Elles permettent d'intégrer l'insert par ligation après hydrolyse du plasmide et de l'insert à l'aide de ces enzymes de restriction.

Expression dans les cellules in vitro

Des dosages de β -lactoglobuline native et réduite ont été réalisés sur les surnageants de culture et sur les extraits protéiques de cellules transfectées par notre

plasmide. Les résultats de ces dosages sont représentés sur la *figure 2*. Les deux formes de β -lactoglobuline sont détectées et dosées, en proportion variable en fonction du temps après la transfection. Cette production est précoce (dès le premier jour suivant la transfection), et semble maximale au deuxième jour. Elle décroît ensuite, probablement à la suite de la mort progressive des cellules arrivées à confluence. Ces résultats permettent de confirmer la fonctionnalité du plasmide construit dans une cellule eucaryote. Une grande quantité de la β -lactoglobuline se retrouve dans le surnageant de culture dès le premier jour de culture, essentiellement sous sa forme native, laissant supposer qu'une partie de la β -lactoglobuline est excrétée par les cellules eucaryotes. Cependant, la β -lactoglobuline est également

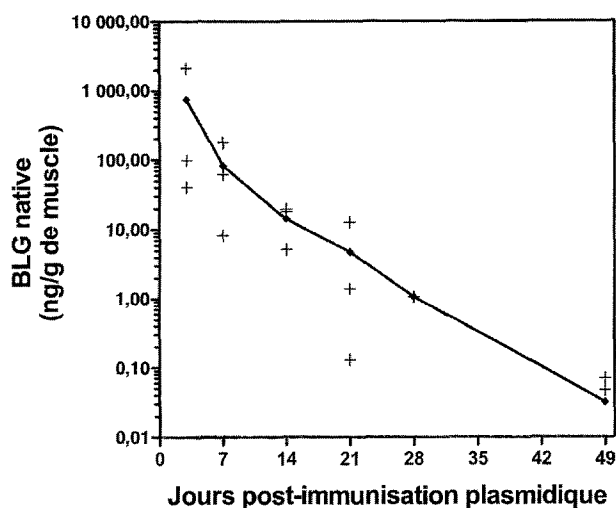


Figure 3. Expression de la β -lactoglobuline (BLG) sous sa forme native dans le muscle de souris. Des souris Balb/c femelles sont immunisées par 100 μ g de plasmide pcDNA.3-BLG dans le muscle antérieur du tibia, 30 minutes après l'injection de 50 μ L de sucrose 25 %. Des prélèvements sont effectués à des intervalles de temps réguliers sur trois souris (+), et les β -lactoglobulines native et dénaturée présentes dans des extraits musculaires sont dosées par dosages Elisa. La β -lactoglobuline dénaturée n'est détectable que chez une souris (non représenté), et aucune forme de β -lactoglobuline n'est détectable chez les souris immunisées par le plasmide témoin. La courbe est tracée à partir de la moyenne de trois souris.

retrouvée sous forme d'agrégats insolubles qui s'accumulent dans la cellule (fraction insoluble).

Fonctionnalité du vecteur d'expression in vivo

L'expression de la β -lactoglobuline a ensuite été testée in vivo, après injection du plasmide dans le muscle de souris. Les résultats, présentés sur la *figure 3*, font apparaître une production importante de β -lactoglobuline sous sa forme native. La β -lactoglobuline n'est pas détectable dans les extraits musculaires des souris immunisées par le plasmide témoin. Il est intéressant de noter que chez les souris immunisées par le plasmide contenant l'ADNc de la β -lactoglobuline, la β -lactoglobuline sous sa forme dénaturée n'est pas détectable, à l'exception d'une souris produisant les plus forts taux de β -lactoglobuline trois jours après l'immunisation (30 ng/g de muscle de β -lactoglobuline dénaturée, pour 2 μ g/g de muscle de β -lactoglobuline native). Seule la

β -lactoglobuline sous sa forme native est produite chez les autres souris. De plus, si tous les animaux immunisés produisent la protéine, une forte variabilité des niveaux d'expression est néanmoins observée. Le pic d'expression se situe dans la première semaine après l'immunisation génique, suivi par une décroissance exponentielle au cours du temps. Cependant, la β -lactoglobuline reste encore détectable dans le muscle sept semaines après immunisation. Ainsi, la β -lactoglobuline est bien produite in vivo, dans des quantités et pendant un temps suffisants pour permettre une présentation de la protéine au système immunitaire. Par ailleurs, il faut noter que chez la souris présentant le plus haut niveau d'expression à j3, la β -lactoglobuline a été détectée en quantité non négligeable dans le sang, uniquement sous la forme native. Cela conforte l'idée que la β -lactoglobuline produite par les cellules musculaires transfectées est en partie excrétée dans l'espace intercellulaire et peut passer dans la circulation générale, même si les concentrations sanguines sont parfois trop faibles pour être détectées chez toutes les souris. Enfin, in vitro, la production par les cellules eucaryotes de β -lactoglobuline sous forme dénaturée est certainement due à une saturation du système d'expression : la β -lactoglobuline s'accumule dans la cellule et sa prise de conformation tridimensionnelle devient alors impossible. Cette hypothèse semble confortée par la présence de β -lactoglobuline dénaturée chez une seule souris, présentant le niveau d'expression protéique très important.

Effet d'une immunisation génique

La protéine étant exprimée in vivo, nous avons cherché à identifier le type de réponse immunitaire (Th1/Th2) induit par une immunisation génique en comparaison avec une immunisation par administration de la protéine en présence d'alum comme adjuvant. Les résultats sont présentés sur la *figure 4*. Les souris immunisées par le plasmide témoin ne développent aucune réponse anticorps anti- β -lactoglobuline. En revanche, les souris immunisées par le plasmide pcDNA.3-BLG présentent une réponse IgE et IgG1 spécifique de la β -lactoglobuline très inférieure à celle induite par une sensibilisation classique à l'aide de la protéine. À l'opposé, la réponse IgG2a

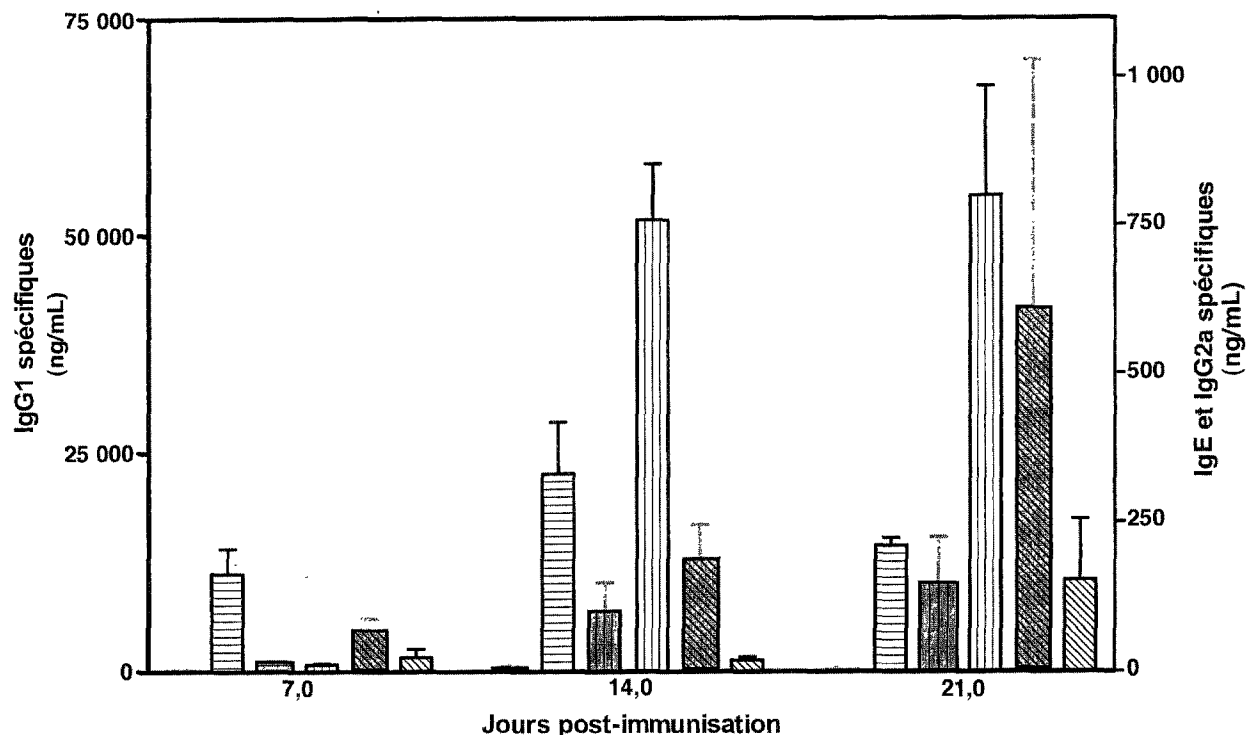


Figure 4. Réponse primaire à la suite d'une immunisation génique. Des souris Balb/c femelles sont immunisées par 100 µg de plasmide pcDNA.3-BLG ou par 50 µg de β -lactoglobuline adsorbé sur de l'alum. Chaque semaine, des prélèvements sanguins sont réalisés, et les anticorps anti- β -lactoglobuline sont dosés individuellement (cinq souris par lot, moyenne $\pm$ SEM). Les souris immunisées par le plasmide témoin pcDNA.3 ne produisent aucun anticorps anti-BLG. Immunisation génique : ■ IgE ; ▨ IgG1 ; ▤ IgG2a. Sensibilisation par la protéine : ▧ IgE ; ▩ IgG1 ; ▪ IgG2a.

anti- β -lactoglobuline est nettement supérieure chez les souris immunisées par le plasmide pcDNA.3-BLG. L'expression in situ de la protéine permet donc sa présentation au système immunitaire et l'induction d'une réponse anticorps spécifique. Cette réponse se traduit par la coexpression d'IgG2a et d'IgG1 anti- β -lactoglobuline, accompagnée d'une réponse IgE très faible : la réponse immunitaire est donc davantage de type Th1 que celle induite par l'immunisation par la protéine. Nous avons alors cherché à connaître la persistance de cette polarisation de type Th1, en particulier lors d'une sensibilisation ultérieure par la protéine.

Effet d'une préimmunisation génique sur une sensibilisation ultérieure par la protéine

Des souris ont été sensibilisées par la β -lactoglobuline adsorbée sur de l'alum (mode d'immunisation

induisant une forte réponse IgE et IgG1) après avoir été préalablement immunisées par le plasmide contenant l'ADNc de la β -lactoglobuline. Les souris témoins avaient reçu le plasmide pcDNA.3 ne contenant pas l'ADNc de la β -lactoglobuline. Des essais préliminaires de sensibilisations, réalisées à différents temps après l'immunisation génique (trois, sept, 14 ou 21 jours), avaient montré que l'effet maximal de la préimmunisation génique se situe lorsque l'administration est effectuée trois semaines avant l'administration de la protéine. Ce protocole a donc été choisi pour les expériences dont les résultats sont montrés sur la *figure 5*. L'immunisation génique induit une diminution très importante de la production des IgE spécifiques de la β -lactoglobuline. Les trois premières semaines après l'immunisation par la protéine, la quantité d'IgE anti- β -lactoglobuline diminue de plus de 95 % chez les souris préimmunisées par le plasmide contenant l'ADNc de la β -lac-

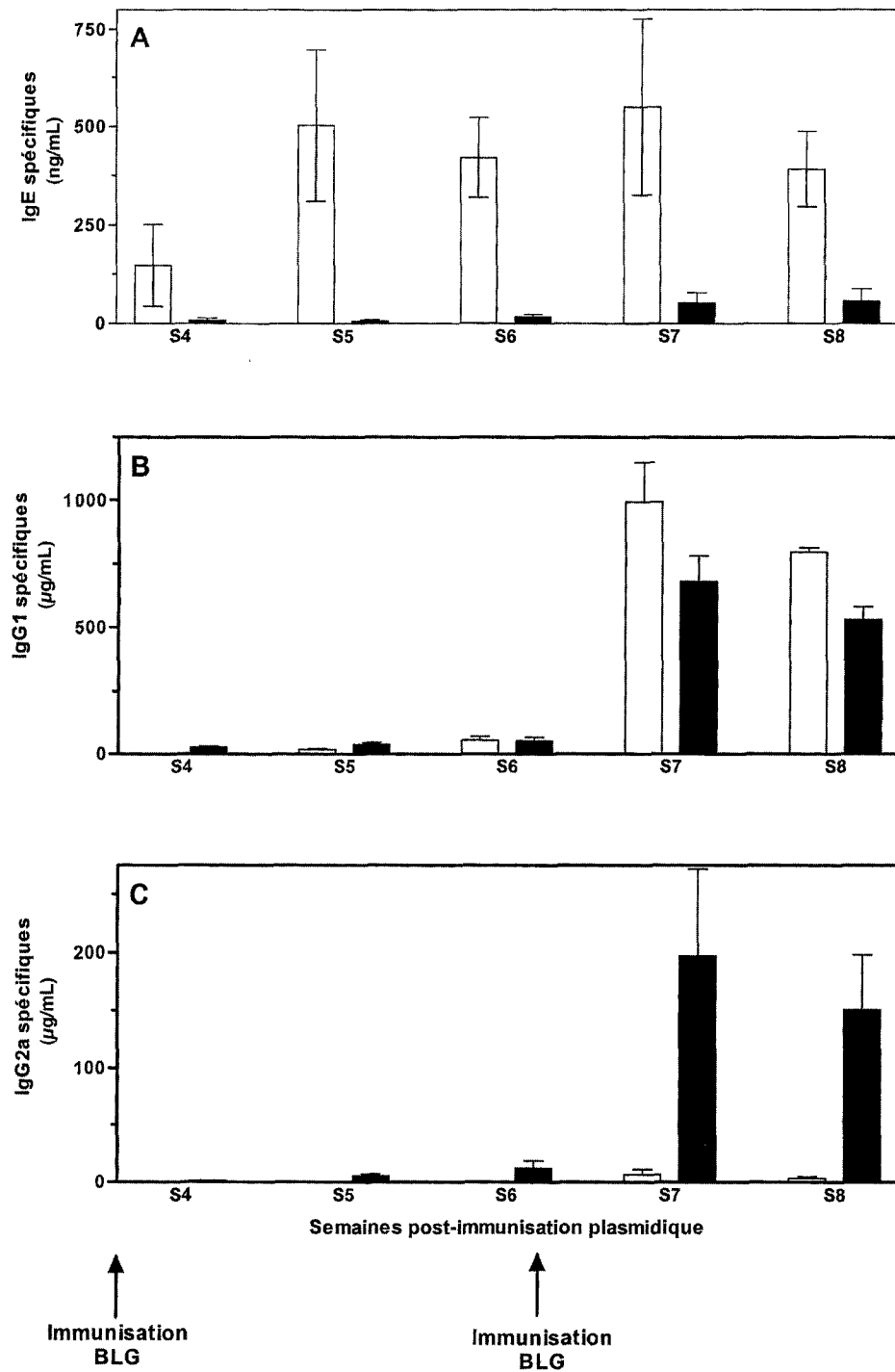


Figure 5. Effet d'une préimmunisation génique sur les réponses IgE (A), IgG1 (B) et IgG2a (C) spécifiques de la β -lactoglobuline. Des souris Balb/c femelles sont immunisées par 100 μ g de plasmide pcDNA.3 (□ souris témoins) ou pcDNA.3BLG (■). Trois et six semaines plus tard, les souris sont immunisées par injection intrapéritonéale de 50 μ g de β -lactoglobuline adsorbée sur de l'alum. Des saignées sont réalisées toutes les semaines, et des dosages d'isotypes sont réalisés individuellement pour chaque souris.

toglobuline par rapport aux souris témoins. La faible augmentation ultérieure des taux d'IgE anti- β -lactoglobuline à la suite d'une seconde immunisation par la β -lactoglobuline résulte en fait de l'influence d'une seule souris atypique présentant une forte concentration d'IgE spécifiques, les autres souris conservant toujours une diminution de 95 à 100 % de ces IgE. Parallèlement, on observe chez les souris préimmunisées par pcDNA.3-BLG une diminution d'environ 25 % des IgG1 spécifiques après la seconde immunisation par la protéine, corrélée à une très forte augmentation des IgG2a spécifiques. Cette réponse IgG2a spécifique est quasi inexistante chez les souris témoins.

Nous avons vérifié que cette orientation de la réponse immunitaire est spécifique de la protéine codée par le plasmide injecté en sensibilisant par de la sérum-albumine bovine adsorbée sur de l'alum des souris préimmunisées, soit par le plasmide témoin soit par le plasmide contenant l'ADNc de la β -lactoglobuline. Ces souris développent des réponses IgE, IgG1 et IgG2a anti-BSA identiques (résultats non montrés). L'effet préventif d'une immunisation génique sur la réponse IgE se révèle donc spécifique de l'allergène codé par le plasmide administré.

DISCUSSION

Ces travaux préliminaires permettent de démontrer que l'injection intramusculaire d'un plasmide d'expression eucaryote contenant l'ADNc de la β -lactoglobuline permet :

- la production in situ de la protéine sous sa forme native ;
- la présentation de la β -lactoglobuline au système immunitaire ;
- l'induction d'une réponse anticorps spécifique de la protéine codée.

La réponse immunitaire ainsi induite est de type Th1 (production d'IgG2a), et permet la suppression de la production d'IgE résultant d'une sensibilisation par la protéine dans des conditions induisant habituellement une forte réponse IgE. Cette inhibition est maintenue après une seconde immunisation par la β -lactoglobuline, et est spécifique de la protéine codée par le plasmide, comme le démontrent les

résultats obtenus à la suite d'une immunisation par la sérum-albumine bovine, un allergène non apparenté à la β -lactoglobuline.

Ces dernières années, l'immunisation génique a fait l'objet de nombreuses études (in [20]), aussi bien sur des modèles animaux d'infections virales (grippe [28], hépatite B [6], VIH [38], etc.) ou parasitaires (*Plasmodium falciparum* par exemple [11]), que sur des modèles animaux de maladies auto-immunes (encéphalomyélite auto-immune expérimentale chez la souris [27]). L'utilisation de l'immunisation génique en allergie a été appliquée à différents types d'allergènes. En 1996, Raz et al. ont démontré, en utilisant la β -galactosidase, que l'administration répétée d'un plasmide codant pour cette protéine, par injection intradermique ou administration transcutanée, permettait une réponse primaire de type Th1. Cette réponse Th1 était maintenue après une sensibilisation par la protéine, et permettait également de diminuer une réponse IgE spécifique préalablement induite par une immunisation protéique en alum [29]. À ces premiers résultats sur l'immunisation génique et la réponse IgE ont succédé des travaux sur différents allergènes tels que Der p5 [12, 13]. Bet v1 [10], Hev b5 [34] chez le rat et la souris. L'ensemble de ces travaux montre que l'injection intramusculaire ou intradermique de plasmide codant un allergène permet de diminuer les taux d'IgE circulantes, mais également la réactivité bronchique, la libération d'histamine et l'infiltration des éosinophiles dans les tissus. Ces effets régulateurs seraient médiés par les cellules CD4⁺ et CD8⁺ [12, 21]. Nos résultats sont en accord avec l'ensemble des travaux précités. Ils montrent en outre que la production in situ de l'allergène, et sa sécrétion dans le milieu extracellulaire, dans sa structure native, est certainement un des mécanismes indispensables à cette réponse. Des études sont en cours au laboratoire afin d'approfondir l'effet préventif de l'immunisation génique sur une réponse IgE, ainsi que pour évaluer le potentiel thérapeutique de l'immunisation génique (diminution d'une réponse IgE spécifique préexistante). Cependant, une étude récente utilisant un plasmide codant pour Ara h2 (un des allergènes majeurs de l'arachide) a démontré que des réactions d'anaphylaxie pouvaient être induites par immunisation génique (administration intramusculaire) de souris femelles

C3H [22]. Ces réactions surviennent à la suite d'administrations répétées du gène, et elles ne semblent pas médiées par les IgE, mais par les IgG1. Les souris C3H produisent pourtant des IgG2a en forte quantité, mais qui n'ont aucun effet protecteur. Il est donc important de connaître les mécanismes d'induction de la réponse immunitaire à la suite d'une immunisation génique ainsi que la spécificité et l'affinité des différents anticorps produits dans différentes conditions d'administration du plasmide (simple/répétée, voie et mode d'administration, quantité d'ADN administrée).

Il apparaît néanmoins que la réponse induite par une injection intramusculaire ou intradermique de plasmide conduit en général préférentiellement à une réponse immunitaire de type Th1. Nous avons par ailleurs observé que l'injection intramusculaire de la β -lactoglobuline sous forme protéique, dans des quantités équivalentes à celles produites lors d'une immunisation génique, induit une faible réponse IgE et IgG1 anti- β -lactoglobuline (résultats non montrés). L'induction d'une réponse Th1 ne résulte donc pas du mode d'administration (intramusculaire) de la protéine mais de sa production à partir d'ADN bactérien contenant des séquences immunostimulatrices. Ces séquences immunostimulatrices à elles seules permettent *in vitro* et *in vivo* la sécrétion d'IL-12 par les macrophages et les cellules B, d'IFN γ par les cellules T CD4⁺ et NK, et d'IL-6 par les cellules B et les cellules CD4⁺ [16, 17]. L'environnement Th1, dû à la présence d'IL-12 et d'IFN γ , doit permettre la commutation isotypique préférentielle vers les IgG2a, plutôt que vers les IgE et IgG1. En effet, l'IL-12 doit être présente au moment de la présentation de l'antigène pour permettre l'induction des clones Th1. En l'absence d'IL-12, et donc d'IFN γ , la réponse immunitaire sera de type Th2 [2]. Par ailleurs, les séquences immunostimulatrices bactériennes permettent *in vivo* d'augmenter l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, et des molécules costimulatrices B7 sur les cellules B. Elles permettent ainsi d'augmenter la capacité de présentation de l'antigène aux cellules T, et fournissent le co-signal nécessaire à la stimulation et l'induction d'une réponse immunitaire [7]. Ainsi, la présence des séquences immunostimulatrices dans un plasmide d'expression

eucaryote est nécessaire à l'induction d'une réponse Th1 *in vivo*, comme le démontrent les résultats obtenus lors du remplacement du gène de résistance à l'ampicilline (contenant deux fortes séquences immunostimulatrices) par le gène de résistance à la kanamicine (ne contenant pas de séquences immunostimulatrices) dans le squelette du plasmide [32]. La non méthylation de ces séquences (ce qui les différencie de l'ADN des vertébrés supérieurs) est également nécessaire pour la stimulation du système immunitaire [16]. Il est donc également possible d'induire une réponse Th1 par l'administration par voie systémique d'oligonucléotides contenant des séquences immunostimulatrices. L'administration seule et en grande quantité de ces oligonucléotides présente un potentiel limité, du fait de l'induction probable d'un choc avec hypotension dû à la stimulation de la production de TNF par ces séquences [2]. Pour éviter ce phénomène, deux solutions sont envisageables : soit l'intégration de ces séquences dans un plasmide d'expression eucaryote, comme nous l'avons décrit, soit l'administration simultanée et limitée de ces oligonucléotides avec l'allergène précipité. Ce dernier type d'expérience a été réalisé avec succès par plusieurs équipes [7, 23]. Néanmoins, l'administration sous forme de plasmide permet un meilleur contrôle de la production et de la présentation antigénique, avec notamment la possibilité d'utilisation d'un promoteur eucaryote spécifique d'un type cellulaire (limitant alors la synthèse en trop forte quantité et trop systémique de la protéine, et donc les risques éventuels d'anaphylaxie associée). Ce type d'expérience a été réalisé en associant le gène d'intérêt avec un promoteur spécifique du complexe majeur d'histocompatibilité classe II, limitant ainsi l'expression de la protéine étrangère aux seules cellules exprimant ces molécules du complexe majeur d'histocompatibilité [1].

Les mécanismes cellulaires induits par l'immunisation génique sont pour l'instant mal connus. En effet, l'ADN doit pénétrer dans la cellule, résister aux attaques enzymatiques lors de son trafic intracellulaire, pénétrer dans le noyau et y permettre une expression prolongée de la protéine. De plus, les cellules transfectées doivent pouvoir résister aux attaques des cellules cytotoxiques. L'entrée du plasmide dans la cellule pourrait s'effectuer par endo-

cytose passive ou par l'intermédiaire d'un récepteur tel que le *macrophage scavenger receptor* (MSR) dont les ligands connus sont des lipoprotéines de faibles densités, mais aussi des complexes tétramériques d'ADN – ou quadruplexes [39]. Par ailleurs, Yi et al. [41] ont démontré que l'entrée de l'ADN bactérien par endocytose passive se ferait dans un compartiment intracellulaire acidifié, l'acidification étant couplée à la production de formes réactives de l'oxygène, induisant la translocation du facteur NFκB dans le noyau. Ce dernier permet l'activation de proto-oncogènes et la transcription de cytokines. Ces deux mécanismes pourraient donc être simultanés, permettant à la fois l'entrée du plasmide intact dans la cellule par un récepteur extra-cellulaire et l'induction d'une activation des cellules par endocytose passive par les formes réactives de l'oxygène.

Le mécanisme d'induction d'une réponse immunitaire lors de l'administration intramusculaire de l'ADN reste encore mal expliqué. En effet, les cellules musculaires, qui sont les principales cellules transfectées et exprimant la protéine, ne possèdent pas de molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, et très peu de classe I. Il semble donc que la protéine soit libérée dans le milieu intercellulaire avant d'être présentée au système immunitaire, comme le suppose dans notre cas la sécrétion de la β-lactoglobuline observée *in vitro* et *in vivo*. Il faut néanmoins rappeler que l'environnement en cytokines induit par le squelette du plasmide est le facteur qui permet l'induction d'une réponse immunitaire de type Th1. Cela laisse supposer que la protéine est présentée sur son lieu de production (muscle) ou dans les organes lymphoïdes où la protéine et le plasmide sont présents. La présentation au niveau musculaire peut être le fait d'une migration de cellules présentatrices de l'antigène du fait de la légère inflammation provoquée par l'injection. Ces cellules présentatrices de l'antigène, ou des lymphocytes ayant rencontrés l'antigène, migrent alors vers les ganglions lymphatiques où les cellules T et B naïves se transforment alors en cellules effectrices et mémoires. La synthèse prolongée de la protéine au site d'injection permettrait le maintien de la réponse immunitaire [30, 36], amplifiant la réponse. Nous avons d'ailleurs détecté des quantités non négligeables de protéine dans le sang d'une souris qui

présentait un niveau très élevé de protéine dans le muscle, ce qui est en accord avec une exportation de la protéine vers les organes lymphoïdes permettant le maintien de la réponse anticorps. Cette hypothèse serait en accord avec les travaux de Mor [24] et Klinman [15].

Il est par ailleurs intéressant de noter que l'administration intramusculaire ou intradermique de plasmide ou de séquences immunostimulatrices avec un antigène ne semble pas permettre l'induction d'une immunité muqueuse (synthèse d'IgA sécrétoires). En revanche, l'administration par voie muqueuse (intranasale [23] ou intragastrique [31]) semble efficace pour permettre une capture et l'élimination de l'allergène au niveau des parois muqueuses (respiratoires ou intestinales). Un travail récent a permis en effet de démontrer que l'administration intragastrique de nanoparticules de chitosan (polysaccharide naturel de crustacés, déjà utilisé dans l'industrie pharmaceutique) enrobant un plasmide codant Ara h2, permet l'expression de la protéine au niveau de l'épithélium de l'estomac et de l'intestin. L'induction d'une réponse immunitaire de type Th1 est observable, ainsi que l'induction d'une réponse anticorps de type sécrétoire. Une diminution de l'intensité des réactions anaphylactiques et de la réponse IgE spécifique d'Ara h2 est observée lors de l'administration de ce plasmide avant la sensibilisation [31]. Ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'une administration orale de plasmides permettant une immunoprévention de l'allergie. De nombreuses études restent à mener afin de déterminer les meilleurs protocoles d'immunisation aboutissant à une protection, préventive ou thérapeutique. Différents modes d'immunisation utilisant des vecteurs probiotiques tels que des bactéries lactiques modifiées, permettant une administration du plasmide par voie orale, sont en cours d'étude. En effet, étant donné les observations récentes d'une corrélation négative entre un test positif à la tuberculine et la présence de réactions atopiques [33], et la prévalence de l'allergie uniquement dans les pays « propres » (c'est-à-dire où les infections bactériennes sont très limitées) [5], l'immunisation génique par voie orale utilisant des bactéries lactiques comme vecteurs pourrait être un moyen de lutte simple et efficace contre l'allergie.

La sûreté de l'immunisation génique est un facteur à prendre également en considération. Jusqu'à présent, aucune intégration de l'ADN dans les chromosomes n'a été observée, ni l'induction de maladies auto-immunes dues à la présence d'anticorps anti-ADN ou à la destruction des cellules produisant la protéine codée par le plasmide. Par ailleurs, l'utilisation du gène de résistance à l'ampicilline comme gène de sélection pose le problème de la transmission éventuelle de cette résistance à d'autres bactéries, notamment aux bactéries de la microflore intestinale, et de la dissémination de cette résistance. Cependant, le remplacement de ce gène par des séquences immunostimulatrices est tout à fait envisageable, ce qui éliminerait tout risque bactériologique, tout en conservant la capacité immunostimulatrice du plasmide.

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été présentés lors des Journées parisiennes d'allergie de janvier 1999 (prix du meilleur poster remis par la Société française d'allergologie et d'immunologie clinique) et ont reçu le prix de thèse 2000 des laboratoires Stallergènes, remis lors des Journées parisiennes d'allergie de janvier 2000.

RÉFÉRENCES

- Boyle JS, Silva A, Brady JL, Lew AM. DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 14626-31.
- Carson DA, Raz E. Oligonucleotide adjuvants for T helper 1 (Th1)-specific vaccination. *J Exp Med* 1997 ; 186 : 1621-2.
- Chatel JM, Adel-Patient K, Creminon C, Wal JM. Expression of a lipocalin in prokaryote and eukaryote cells: quantification and structural characterization of recombinant bovine β -lactoglobulin. *Protein Expr Purif* 1999 ; 16 : 70-5.
- Chatel JM, Bernard H, Clement G, Frobert Y, Batt CA, Gavalchin J, et al. Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant bovine β -lactoglobulin, a major cow milk allergen. *Mol Immunol* 1996 ; 33 : 1113-8.
- Cookson WO, Moffatt MF. Asthma: an epidemic in the absence of infection? *Science* 1997 ; 275 : 41-2.
- Davis HL, Brazolot Millan CL, Mancini M, McCluskie MJ, Hadchouel M, Comanita L, et al. DNA-based immunization against hepatitis B surface antigen (HBsAg) in normal and HBsAg-transgenic mice. *Vaccine* 1997 ; 15 : 849-52.
- Davis HL, Weeranta R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 1998 ; 160 : 870-6.
- Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J Immunol* 1997 ; 158 : 2278-84.
- Grassi J, Frobert Y, Pradelles P, Chercuitte F, Gruaz D, Dayer JM, et al. Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 α and -1 β . Development of two enzyme immuno-metric assays (EIA) using acetylcholinesterase and their application to biological media. *J Immunol Methods* 1989 ; 123 : 193-210.
- Hartl A, Kiesslich J, Weiss R, Bernhaupt A, Mostböck S, Scheiblhofer S, et al. Immune responses after immunization with plasmid DNA encoding Bet v 1, the major allergen of birch pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1999 ; 103 : 107-13.
- Hedstrom RC, Doolan DL, Wang R, Kumar A, Sacchi JB Jr, Gardner MJ, et al. In vitro expression and in vivo immunogenicity of *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic stage DNA vaccines. *Int J Mol Med* 1998 ; 2 : 29-38.
- Hsu CH, Chua KY, Tao MH, Huang SK, Hsieh KH. Inhibition of specific IgE response in vivo by allergen-gene transfer. *Int Immunol* 1996 ; 8 : 1405-11.
- Hsu CH, Chua KY, Tao MH, Lai YL, Wu HD, Huang SK, et al. Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nat Med* 1996 ; 2 : 540-4.
- Jamieson AC, Vandeyar MA, Kang YC, Kinsella JE, Batt CA. Cloning and nucleotide sequence of the bovine β -lactoglobulin gene. *Gene* 1987 ; 61 : 85-90.
- Klinman DM, Sechler JM, Conover J, Gu M, Rosenberg AS. Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J Immunol* 1998 ; 160 : 2388-92.
- Klinman DM, Yamshchikov G, Ishigatsubo Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J Immunol* 1997 ; 158 : 3635-9.
- Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 2879-83.
- Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 1984 ; 12 : 857-72.
- Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 1986 ; 44 : 283-92.
- Lai WC, Bennett M. DNA vaccines. *Crit Rev Immunol* 1998 ; 18 : 449-84.
- Lee DJ, Tighe H, Corr M, Roman M, Carson DA, Spiegelberg HL, et al. Inhibition of IgE antibody formation by plasmid DNA immunization is mediated by both CD4+ and CD8+ T cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1997 ; 113 : 227-30.
- Li X, Huang CK, Schofield BH, Burks AW, Bannon GA, Kim KH, et al. Strain-dependent induction of allergic sensitization caused by peanut allergen DNA immunization in mice. *J Immunol* 1999 ; 162 : 3045-52.
- McCluskie MJ, Davis HL. CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J Immunol* 1998 ; 161 : 4463-6.
- Mor G, Klinman DM, Shapiro S, Hagiwara E, Sedegah M, Norman JA, et al. Complexity of the cytokine and antibody response elicited by immunizing mice with *Plasmodium yoelii*

- circumsporozoite protein plasmid DNA. *J Immunol* 1995 ; 155 : 2039-46.
- 25 Negroni L, Bernard H, Clement G, Chatel JM, Brune P, Frobert Y, et al. Two-site enzyme immunometric assays for determination of native and denatured β -lactoglobulin. *J Immunol Methods* 1998 ; 220 : 25-37.
 - 26 Pradelles P, Grassi J, Maclouf J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem* 1985 ; 57 : 1170-3.
 - 27 Ramshaw IA, Fordham SA, Bernard CC, Maguire D, Cowden WB, Willenborg DO. DNA vaccines for the treatment of autoimmune disease. *Immunol Cell Biol* 1997 ; 75 : 409-13.
 - 28 Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, et al. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 9519-23.
 - 29 Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roman M, et al. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 5141-5.
 - 30 Robinson HL, Torres CA. DNA vaccines. *Semin Immunol* 1997 ; 9 : 271-83.
 - 31 Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med* 1999 ; 5 : 387-91.
 - 32 Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 1996 ; 273 : 352-4.
 - 33 Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997 ; 275 : 77-9.
 - 34 Slater JE, Zhang YJ, Arthur-Smith A, Colberg-Poley A. A DNA vaccine inhibits IgE response to the latex allergen Hev b5 in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1997 ; 99 : S504.
 - 35 Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992 ; 356 : 152-4.
 - 36 Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Fu TM, Donnelly JJ, Caulfield MJ, et al. Expression of a viral protein by muscle cells in vivo induces protective cell-mediated immunity. *Vaccine* 1997 ; 15 : 839-41.
 - 37 Wal JM, Bernard H, Creminon C, Hamberger C, David B, Peltre G. Cow's milk allergy: the humoral immune response to eight purified allergens. *Adv Exp Med Biol* 1995 ; 371B : 879-81.
 - 38 Wang B, Boyer JD, Ugen KE, Srikantan V, Ayyaroo V, Agadjanyan MG, et al. Nucleic acid-based immunization against HIV-I: induction of protective in vivo immune responses. *AIDS* 1995 ; 9 Suppl A : S159-70.
 - 39 Wloch MK, Pasquini S, Ertl HC, Pissetsky DS. The influence of DNA sequence on the immunostimulatory properties of plasmid DNA vectors. *Hum Gene Ther* 1998 ; 9 : 1439-47.
 - 40 Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Ascadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990 ; 247 : 1465-8.
 - 41 Yi AK, Tuetken R, Redford T, Waldschmidt M, Kirsch J, Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH- dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* 1998 ; 160 : 4755-61.