



Axes de recherche en allergologie alimentaire : hypoallergénicité et vaccins[☆]

Future trends of research in food allergy: Hypoallergenicity and vaccines

D.A. Moneret-Vautrin^{a,b,*}, G. Kanny^{a,b}

^a Service de médecine interne, immunologie clinique et allergologie, hôpital universitaire, 29,
avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 54035 Nancy cedex, France

^b Research Team 3399–Allergic diseases: diagnosis and therapeutics, Laboratory of Molecular Medicine and Therapeutics,
15, rue du Bois-de-la-Champelle, 54500 Vandœuvre-Les-Nancy, France

Résumé

La fréquence actuelle de l'allergie alimentaire en population pédiatrique, ainsi que l'inquiétante augmentation de prévalence de l'anaphylaxie sévère donnent un essor aux recherches sur les moyens de prévention comme sur des thérapeutiques, en raison de l'insuffisance des régimes d'éviction. Cette revue ne considère pas les traitements en cours de développement clinique (protocoles de tolérance orale et immunothérapie sublinguale), mais développe le concept d'hypoallergénicité, limité actuellement à la diminution de réactogénicité par moindre liaison des IgE spécifiques. Elle détaille les moyens d'une induction d'hypoallergénicité alimentaire, disponibles pour les patients allergiques, les industries alimentaires et l'agronomie. L'impact des traitements thermiques, de procédés enzymatiques et chimiques, de procédés physiques (ultrafiltration, texturisation), du screening des variétés agronomiques afin d'identifier les plus pauvres en allergènes majeurs, sont discutés. L'utilisation du génie génétique pour élaborer des plantes transgéniques en teneur réduite en allergènes majeurs, la possibilité de préparer des allergènes recombinants mutés sur sites d'épitopes B sont les axes futurs dont le premier pourrait être mis à profit par les développements agronomiques et les seconds utilisés pour des vaccins spécifiques d'allergènes. La revue considère successivement les formes moléculaires possibles des allergènes recombinants : dimérisation d'allergènes majeurs, allergènes mutés sur les épitopes B, molécules de fusion avec des protéines facilitant la prise en charge de l'allergène par les CPA, peptides longs. Les problèmes associés sont le choix des adjuvants renforçant une réponse de type Th1, et des vecteurs d'expression possibles (bactéries, probiotiques, plantes transgéniques). Des vaccins muqueux paraissent spécifiquement indiqués pour les allergènes alimentaires, afin d'associer à une réorientation de réponse Th1 la mise en jeu des processus physiologiques de tolérance au niveau de la muqueuse intestinale. Les vaccins plasmidiques à base de l'ADN nu sans vecteur viral, ainsi que le vaccin anti-IgE non spécifique d'allergènes sont cités. Les vaccins spécifiques d'allergènes modifiés devraient trouver une place thérapeutique, en substitution d'immunothérapies et de protocoles de tolérance orale aux aliments naturels. Ils pourraient concerner en premier lieu l'arachide et les panallergènes croissants des pollens, fruits et légumes. Un vaccin prophylactique pourrait être ultérieurement considéré chez le nourrisson. Les études permettant de déterminer la fenêtre d'opportunité physiologique d'établissement de la tolérance aux allergènes alimentaires, ses mécanismes, et les facteurs facilitant la tolérance orale doivent se poursuivre parallèlement.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

The frequency of food allergy in the pediatric population (8%), as well as the worrying increase of prevalence of severe anaphylaxis boost the research for means of prevention and for therapeutics alternative to the sole eviction of foods. Oral desensitization and sublingual immunotherapy, being the main part of the present clinical research are not in the scope of this review. Future trends of research focus on hypoallergenicity and vaccines. The definition of hypoallergenicity is limited to a lesser reactivity because of a lesser binding of specific IgE to modified food allergens, since the conditions of the immunogenicity leading to sensitization remain unknown. Different ways for patients, alimentary industry and agronomical research are detailed: heating and cooking, enzymatic and chemical treatment of natural foods, physical treatments (texturization,

[☆] Conférence donnée au deuxième congrès francophone d'allergologie.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : s.barrat@chu-nancy.fr (D.A. Moneret-Vautrin).

ultrafiltration...), screening of natural varieties in order to characterize some of them with a lower level or an absence of major allergens. Bioengineering of plants with a reduced level of major allergens, and site-directed mutagenesis on B epitopes could be helpful for a safer nutrition and vaccines. Possible molecular forms aimed at vaccines are considered: recombinant natural allergens, modified recombinant allergens by dimerisation, site-directed mutagenesis, fusion with other molecules, long peptides,... Associated considerations are the choice of adjuvants promoting a Th1 response, as well as vectors for the expression of recombinant food allergens: bacteria, probiotic ones, or poorly allergenic plants. Mucosal vaccines could be especially interesting for food allergens in order to add specific mechanisms of tolerance arising in the intestinal mucosa to the reorientation towards a Th1 and TREG response. Plasmidic DNA vaccines and anti-IgE vaccines are an object of research without any application in the near future. Therapeutic vaccines for food allergens might be substituted to oral desensitization and could be applied first to peanut allergy and to cross allergy between pollens and fruit or vegetable linked to panallergens. Prophylactic vaccines might be a second step for atopic infants, insofar as more knowledge could be obtained of mechanisms and enhancing factors of oral tolerance to food allergens and the "opportunity window" for the establishment of oral tolerance.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Allergie alimentaire ; Hypoallergénicité ; Tolérance orale ; Vaccins ; Vaccins muqueux ; Vaccins prophylactiques

Keywords: Food allergy; Hypoallergenicity; Oral tolerance; Vaccines; Mucosal vaccines; Prophylactic vaccines

1. Introduction

La prévalence croissante des allergies alimentaires fait l'objet d'un consensus. Chiffrée à 3,24 % dans la population française dans son ensemble, elle représente jusqu'à 8 % de la population pédiatrique [1,2]. La prévalence des hospitalisations pour allergie alimentaire au Royaume-Uni est passée entre 1990 et 2004 de 5 à 26 par million d'habitants, chez les adultes, et de 16 à 107 par million d'habitants chez les enfants [3]. On observe actuellement une inquiétante augmentation des cas d'anaphylaxie sévère : celle-ci avait été multipliée par cinq dans la population française entre 1980 et 1995 [4]. Elle a crû de 700 % entre 1990 et 2004 au Royaume-Uni [3]. Les statistiques françaises, fondées sur les hospitalisations bénéficiant du codage de la classification internationale des maladies (CIM10), montrent une augmentation plus modérée, atteignant néanmoins 22 % en trois ans (2003–2005). Les allergies alimentaires sont devenues désormais un problème aussi courant que l'asthme. Les recherches fondamentales et cliniques se sont intensifiées ces dernières années. Elles ont été boostées par la connaissance que l'allergie alimentaire est la première maladie atopique de la vie, et par les espoirs diagnostiques et thérapeutiques issus de la mise à disposition rapidement croissante des allergènes recombinants. Cette revue se limitera aux axes de recherche ayant trait directement à la prévention et aux futures thérapeutiques des allergies alimentaires. Celles-ci sont d'autant plus attendues que l'éviction, seule solution actuellement disponible n'est pas adaptée aux problèmes que posent les réactions croisées entre panallergènes végétaux, nécessitant l'exclusion d'une quantité considérable de fruits et légumes, à risque de carences nutritionnelles. En outre l'éviction, même si elle est facilitée par l'étiquetage obligatoire des 14 allergènes principaux, ne garantit pas une efficacité absolue en raison de la complexité des formulations des aliments industriels et du risque de contaminations. Cette revue développera donc le concept d'hypoallergénicité et ses applications potentielles, ainsi que les nombreux aspects en cours de développement de vaccins du futur, au-delà des essais actuels de protocoles de tolérance orale et d'immunothérapie conventionnelle, sublinguale.

2. Hypoallergénicité

Le concept d'hypoallergénicité, qui remonte historiquement aux années 1970, est apparu en cosmétologie. Il avait donc trait au risque allergisant de réactogènes chimiques, et à l'allergie de contact. La FDA devait assez rapidement réclamer des études fondant ce concept, faute desquelles, en 1977, le terme était invalidé par la cour d'appel du District de Columbia (1977). Le terme persista à titre publicitaire. D'abord appliqué à des produits industriels dont on éliminait ou on diminuait la teneur des réactogènes chimiques reconnus (cosmétiques, lessives, gants en caoutchouc pauvres en agents de vulcanisation etc.) il devait pénétrer dans le domaine des allergènes protéiques pour répondre à la problématique des allergies aux protéines de gants de latex, ainsi qu'à celui de l'allergie aux protéines de lait de vache (laits HA). Dans un cas comme dans l'autre l'hypoallergénicité concerne des produits allergéniques quantitativement modifiés (diminution des allergènes dans les produits).

L'hypoallergénicité est un concept applicable à l'examen des aliments naturels. Il ne fait pas de doute que l'allergénicité intrinsèque varie considérablement d'un aliment à l'autre. L'épinard est le prototype de l'aliment hypoallergénique sinon anallergique... Certaines caractéristiques sont fréquemment rencontrées à l'analyse des aliments les plus allergisants. Une forte teneur en protéines et en lipides caractérise dans une certaine mesure les aliments allergéniques : sur 23 aliments contenant plus de 20 % de protéines, 14 (61 %) sont des allergènes. Sur 15 aliments en contenant moins de 20 %, cinq seulement (33 %) sont des allergènes. Sur huit aliments allergéniques ayant moins de 30 % protéines, cinq ont une teneur en lipides de plus de 50 % [5].

De même la richesse en allergènes majeurs, puis dans chacun d'entre eux, la richesse en épitopes B, puis parmi eux la richesse en épitopes immunodominants, caractérisent les aliments les plus allergisants. On sait également que parmi 3849 familles de protéines végétales, 20 familles seulement englobent les allergènes alimentaires. Quatre d'entre elles, les prolamines, les homologues de Bet v 1, les cupines et les profilines représentent 65 % des séquences allergéniques [6].

Néanmoins, aucune règle applicable à l'ensemble des allergènes ne permet de prédire par l'étude de la structure moléculaire qu'une protéine sera ou ne sera pas allergénique [7,8]. Les connaissances ci-dessus rappelées sont donc du domaine du descriptif des allergènes connus et ne permettent pas directement d'élaborer des stratégies visant à l'hypoallergénicité. C'est pourquoi, en 2007, la définition de l'hypoallergénicité est fondée sur une constatation pratique : absence ou diminution de liaison des IgE spécifiques à des allergènes alimentaires modifiés.

Cette hypoallergénicité peut être le produit de différentes approches : soit que l'on vise une dénaturation globale des allergènes, soit que l'on diminue la quantité d'allergènes majeurs d'un aliment, soit que l'on sélectionne une variété agronomique contenant moins d'allergènes majeurs, soit que l'on obtienne des allergènes recombinants secondairement modifiés au niveau des épitopes B par génie génétique. Les connaissances des épitopes T étant actuellement des plus modestes, et ceux-ci variant dans une considérable mesure selon les génotypes HLA de classe 2, on ne peut actuellement aller dans le sens d'une moindre immunogénicité...

2.1. La dénaturation des protéines par le chauffage

La plus simple action sur l'allergénicité est la dénaturation des protéines par le chauffage. Le chauffage entre 55 et 70 °C provoque le dépliement des chaînes polypeptidiques. Entre 70 et 80 °C, on assiste au début de rupture des ponts disulfure, qui se désorganisent totalement entre 80 et 90 °C. Entre 90 et 100 °C, on obtient l'agrégation des protéines. Au-delà de 100 °C, les protéines engagent des liaisons covalentes avec les sucres réducteurs et leurs dérivés dicarbonyl, ainsi qu'avec les lipides oxydés [9,10]. Si le chauffage dès 55 °C et surtout à partir de 70 °C altère puis détruit les épitopes conformationnels, les effets de l'agrégation des protéines dépendent des aliments concernés : elle peut soit amoindrir l'allergénicité soit augmenter nettement la liaison aux IgE spécifiques, comme on le constate en particulier chez certains individus allergiques aux légumineuses. Un effet attendu des fortes températures serait l'altération des épitopes B linéaires : rien n'est moins certain. L'apparition de composés de Maillard (interaction avec les sucres réducteurs) paraît au contraire créer des composés fortement réactogènes. De plus, le mode de chauffage peut orienter la modification dans des sens opposés : ainsi le rôtissage à 170 °C de l'arachide multiplie son allergénicité d'un facteur 90, alors qu'inversement l'ébullition ou la simple friture la diminue [11,12]. La cuisson des viandes à la vapeur (110–120 °C) augmente la protéolyse consécutive par les enzymes digestifs et aurait donc un effet plus favorable sur l'allergénicité consécutive que la cuisson à 100 °C [13]. La cuisson par micro-ondes ne paraît pas avoir été étudiée.

De façon globale, la cuisson accentuée (prolongée), recommandée aux patients allergiques dénature l'allergénicité des viandes, de la plupart des fruits, de la pomme de terre dont les allergènes sont particulièrement labiles, des légumes verts (pas toujours du céleri...). Elle est sans effet sur les poissons,

les crustacés et l'arachide. Elle donne des résultats individuellement variables pour la farine de blé, les légumineuses. Cela dépend de la nature des allergènes en cause : les LTP sont thermostables, les homologues de Bet v 1 sont thermolabiles, les protéines de stockage donnent des agrégats qui tantôt préservent tantôt masquent les épitopes B...

2.2. La dénaturation globale par procédés enzymatiques

La dénaturation globale par procédés enzymatiques, au-delà des dénaturations des épitopes conformationnels engendrées par le chauffage, vise à l'altération des épitopes linéaires. La fermentation des protéines de soja annule la liaison aux IgE [14]. La fermentation de la farine de pois par trois bactéries lactiques obtient un résultat similaire [15]. Cette méthode a été appliquée à la farine de blé (traitement par bromélaïne, par actinase et par cellulase) [16,17]. Toutefois les propriétés rhéologiques sont altérées et il n'est pas certain que ce type de farine ait une percée dans la commercialisation. De même, une étude au Japon a montré que des hydrolysats de blé utilisés comme additifs alimentaires ont une allergénicité moindre par hydrolyse à pH acide, alors qu'elle ne serait pas modifiée par hydrolyse enzymatique [18]. Il n'est pas certain que l'on puisse en faire une règle générale, les conditions très variables des procédés technologiques de la fabrication des hydrolysats et isolats de blé selon les industries créant autant de cas d'espèce... La modification des gliadines et gluténines par la thioredoxine paraît diminuer la liaison des IgE spécifiques [19], mais l'identification récente de l'allergénicité de la thioredoxine, laisse-t-elle une place à ce procédé?... [20]. La teneur en allergène majeur de soja, Gly m Bd, est réduite par des enzymes *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, et *Aspergillus soyae* [21,22].

2.3. Les procédés physiques et chimiques

Parmi les procédés physiques et chimiques : l'ultrafiltration appliquée à un lait de soja infantile lui confère une hypoallergénicité [23]. La texturisation du soja modifie certes l'allergénicité, mais de façon variable selon le profil de sensibilisation au soja naturel [23]. Le traitement alcalinisant du riz [24] diminue notablement la teneur en allergènes hydrosolubles.

2.4. L'association de différents procédés

L'association de différents procédés : chauffage, traitement enzymatique, ultrafiltration est la base de la fabrication des laits infantiles hypoallergéniques [25]. L'allégation que les laits hypoallergéniques entraînent moins de réactions allergiques chez les sujets, sensibilisés aux protéines de lait de vache, que le produit naturel, est soutenue par le fait que la liaison des IgE spécifiques des protéines du lait est très diminuée [26,27]. On note cependant un risque de réaction assez élevé chez les enfants allergiques au lait, et ces laits ne sont pas recommandés pour le traitement de l'APLV [28]. Seuls les hydrolysats poussés de caséine justifient cette assertion [25].

2.5. Des procédures complexes

Des procédures complexes associant l'élimination des lipides, la réduction par sulfites, des modifications de pH et de force ionique, ont permis à certains auteurs d'élaborer des produits à base de soja privés de trois allergènes : Gly m Bd 30, Gly m Bd 60 et Gly m Bd 28. L'absence de réactions allergiques a été constatée chez 80 % des sujets allergiques au soja. . . [22]. Il n'est pas contestable que ce résultat est encore insuffisant.

2.6. La sélection de variants agronomiques avec un taux moindre ou une absence d'allergènes majeurs

La sélection de variants agronomiques ayant un taux moindre ou une absence d'allergènes majeurs pourrait aller dans le sens d'une commercialisation orientée vers de telles variétés « hypoallergéniques ».

L'examen de 324 variétés de blé a été réalisé vis-à-vis de sérums de patients allergiques, sélectionnés préalablement sur leur contenu en IgE spécifiques contre les gluténines, gliadines, et inhibiteur d'alpha amylase. Il a permis de confirmer une teneur allergénique différente selon les variétés [29]. Une sélection de variétés agronomiques serait indiquée dans les cas où un allergène majeur est clairement responsable d'un type d'allergie comme par exemple l'oméga gliadine rapide dans l'anaphylaxie au blé induite par l'effort [30]. Dans les cas plus courants caractérisés par la multiplicité des allergènes en cause, cela paraît plus aléatoire [31]. Cependant, les allergènes hydrosolubles (albumines et globulines) sont dénaturés par la cuisson du pain. C'est pourquoi les boulangers allergiques à ces allergènes de la farine de blé inhalés présentent très rarement une allergie alimentaire au pain. En revanche, la sensibilisation aux fractions du gluten gliadines et gluténines est un problème réel en raison de sa thermorésistance. Le teff (*Eragrostis teff*), variété de blé éthiopien dépourvu de gluten, pourrait donc avoir de l'intérêt, particulièrement dans l'allergie au blé du jeune enfant, majoritairement tributaire des albumines et globulines, comme dans la maladie cœliaque [32].

Il est a priori plus encourageant de rechercher des variétés hypoallergéniques quand l'allergénicité intrinsèque de l'aliment végétal comporte peu d'allergènes majeurs. La pomme, dont l'allergène majeur Mal d 1 paraît unique, est exemplaire : la variation en quantité peut varier d'un facteur six selon les variétés, quoique le taux puisse aussi différer d'une année à l'autre. Néanmoins, il n'a été constaté aucune différence au niveau des *prick-tests* comme de la réactivité clinique aux tests de provocation orale [33].

2.7. La génération de plantes transgéniques et hypoallergéniques

La génération de plantes transgéniques, hypoallergéniques prend son essor. La technique de *gene silencing*, par introduction de copies de RNA antisens, réprimant la synthèse de la protéine a été appliquée au riz : l'expression de l'allergène majeur de 16 kDa a été diminuée de 60 % [34]. Cette réduction est probablement insuffisante, car une seule publication a fait

état d'une amélioration de la dermatite atopique chez des sujets allergiques au riz [35]. Cette technique appliquée au soja a permis la suppression des peptides de l'allergène Gly Bd 30 [36] : bien que cette suppression n'ait pas entraîné de modification du profil du protéome et que les plantules se soient développées comme les naturelles, il n'y a pas eu d'application clinique publiée depuis quatre ans. . .

Une technique plus récente : répression post-transcriptionnelle par interférence de RNA a été appliquée à la pomme et à la tomate : les feuilles des plantules de pomme ont un taux de Mal d 1 plus bas que la variété naturelle et on observe chez des sujets allergiques à la pomme une diminution de la taille des *prick-tests*, ce qui laisse espérer aux auteurs que de telles plantules généreront des pommes hypoallergéniques ultérieurement [37]. Des constatations similaires ont été faites pour une tomate dont l'expression de profiline, Lyc e 1, est réduite [38]. La même équipe obtient également une réduction marquée, d'un facteur 20, en protéine de transfert lipidique non spécifique, nsLTP, Lyc e 3 [39]. Celle-ci est compatible avec une vitalité et une fructification analogues à celle de la variété naturelle. L'étude clinique sur des patients allergiques à la tomate et fortement sensibilisés à Lyc e 3, réalisée avec des tomates transgéniques de première, seconde et troisième génération confirme la forte réduction d'*histamine release* à partir des basophiles de ces patients et la réduction de taille des *prick-tests* [40]. Des résultats encourageants concernant une cacahuète à teneur basse en Ara h 2 ont paru [41]. Toutefois il serait nécessaire d'adjoindre une diminution des autres allergènes majeurs, Ara h 1 et Ara h 3 pour viser à l'hypoallergénicité. . .

2.8. Les allergènes mutés au niveau d'épitopes B immunodominants

Les approches précédentes sont applicables aux technologies des industries alimentaires, comme à la mise sur le marché de variétés naturelles ou transgéniques hypoallergéniques. Une approche différente a pour but de proposer des molécules aux futures immunothérapies spécifiques comme aux vaccins, en créant des allergènes mutés au niveau d'épitopes B immunodominants : mutagenèse dirigée sur site. D'abord recherchés pour l'arachide, ils s'étendent à l'allergène majeur de crustacés puis de Prunoidées.

L'identification d'épitopes B linéaires des allergènes majeurs d'arachide, qui sont des peptides de six à dix aminoacides, a conduit à la possibilité de diminuer la liaison des IgE par la substitution d'alanine à un acide aminé, généralement situé de façon médiane dans le peptide [42] : les variants hypoallergéniques d'Ara h 2 ont une liaison aux IgE spécifiques réduite de 75 %, mais l'activation cellulaire et la libération de médiateurs est encore observée à partir des basophiles [43]. Il en est de même pour Ara h 3 [44]. Des variants d'Ara h 2 et d'Ara h 1 ont bien conservé l'aptitude à la stimulation des lymphocytes T [44,45]. Des souris désensibilisées avec le variant d'Ara h 2 ont significativement moins de symptômes cliniques lors du test de provocation à l'arachide native [45].

Une forme hypoallergénique de l'allergène majeur de crevette, Pen a 1, a été également obtenue, par mutation dirigée

sur huit épitopes linéaires. La réduction de libération de médiateurs par activation des basophiles est réduite de 90 à 98 %, dans un modèle souris [46].

La première étude clinique confirmant l'hypoallergénicité d'un allergène muté, reposant sur des *prick-tests* puis des tests de provocation orale en double insu, a concerné Mal d 1, allergène majeur de la pomme muté en cinq sites [47,48].

De telles formes allergéniques pourraient donc être utilisées pour des immunothérapies spécifiques comme pour des vaccins. Elles concerneraient a priori les allergènes dont des épitopes B linéaires seraient cliniquement relevant de façon prédominante. Ce cas est probablement moins fréquent que celui des allergènes dont les épitopes B conformationnels sont cliniquement relevant. Ceux-ci sont encore peu identifiés.

3. Vaccins

L'efficacité des immunothérapies spécifiques (ITS) n'est plus à démontrer. Les modes d'action sont multiples : induction d'une anergie lymphocytaire partielle, réorientation d'une réponse de type Th2 vers une réponse de type Th1, activation de diverses populations T régulatrices produisant IL-10 et TGF bêta, *shifting* d'une réponse IgE vers une réponse IgG4 grâce en particulier à la production accrue d'IL-10 [49]. Toutefois l'ITS souffre de trois inconvénients majeurs : elle nécessite une longue durée de traitement, se chiffrant en années, elle présente le risque de réactions anaphylactiques par liaison de l'allergène injecté avec les IgE spécifiques du patient. Cet écueil a été partiellement résolu par la variante sublinguale de l'ITS. Enfin le taux d'efficacité quoique bon encourage à rechercher une amélioration. On sait que l'efficacité est liée à la dose cumulée atteinte. Lorsque l'allergène est puissant (cas du latex) le taux de réactions allergiques est élevé, en même temps que la dose maximale ne peut être importante. . . D'où l'espoir d'un vaccin qui permettrait d'augmenter les doses administrées, de réduire le nombre d'injections et partant la durée du traitement, et d'éradiquer le risque de réactions. De surcroît, deux situations se présentent, conduisant à deux formulations vaccinales différentes : soit un vaccin adapté à un individu non sensibilisé afin de créer une protection primaire, soit un vaccin remplaçant l'immunothérapie spécifique actuelle, par un minimum d'injections et de fortes doses d'allergène, nécessitant la modification d'allergènes recombinants dans le but d'annuler ou de sensiblement diminuer le risque de liaison aux IgE (voir supra dans le chapitre hypoallergénicité). Il est vraisemblable que les premières propositions thérapeutiques concerneront ce second cas.

L'élaboration d'un vaccin contre des allergènes alimentaires requiert l'analyse de la forme moléculaire adéquate de l'allergène, et la recherche de la meilleure présentation des allergènes aux cellules dendritiques, celle d'adjuvants non toxiques augmentant la réponse immunitaire de type Th1 et T régulateurs, la possibilité ultérieure de recours à des vaccins muqueux.

Différents types de molécules allergéniques recombinantes sont à l'étude : soit des allergènes naturels modifiés par dimérisation ou trimérisation, soit des allergènes recombinants

mutés au niveau des épitopes B, soit des peptides porteurs d'épitopes T issus de ces allergènes. Les premiers candidats pourraient être les allergènes recombinants modifiés des Prunoïdées (pomme) chez des sujets ayant un syndrome oral particulièrement sérieux et étendu à toutes les Prunoïdées, et non améliorés par une ITS aux pollens de Bétulacées [47].

L'utilisation de peptides longs d'allergènes recombinants, mutés sur les épitopes B linéaires, est une autre stratégie. En effet, la cartographie des épitopes T est complexe, dans la mesure où les épitopes T sont liés au génotype des allèles HLA de classe 2 et peuvent donc différer d'un sujet à l'autre. Il est donc moins facile de cibler des épitopes T immunodominants que des épitopes B. . . L'utilisation de longs peptides pourrait résoudre cette difficulté : tout en préservant les séquences porteuses d'épitopes T et les épitopes B linéaires modifiés, elle paraît obtenir la perte des épitopes conformationnels, comme il a été observé dans une modélisation de la phospholipase A2 de venin d'abeille [50].

La fusion d'allergènes majeurs pourrait tout en offrant une plus grande diversité d'épitopes T, contribuer à masquer des épitopes B. Cela a fait l'objet d'une démonstration à partir de deux allergènes majeurs de venin d'abeille (phospholipase A2 et hyaluronidase) : cet assemblage a montré un effet vaccinant chez la souris [51].

La technique de fusion est également proposée pour associer l'expression d'un allergène recombinant à une molécule favorisant son accumulation endosomique, ce qui facilite la voie de présentation des antigènes liée aux allèles HLA de classe 2, au niveau des cellules dendritiques. Cette optimisation de la présentation aux lymphocytes T obtient une plus grande prolifération lymphocytaire T, et une production accrue d'interféron gamma et d'IL-10 [52].

Une étude expérimentale chez la souris a concerné trois allergènes majeurs d'arachide mutés administrés par voie injectable sous forme d'un vecteur d'expression bactérien *Listeria monocytogenes* [53].

3.1. Les vaccins à base d'allergènes alimentaires et la voie orale

Les vaccins à base d'allergènes alimentaires pourraient très logiquement cibler la voie orale, afin de stimuler l'immunité muqueuse mettant en jeu la tolérance orale, faisant une large part à l'induction de l'anergie lymphocytaire et à celle de T régulateurs produisant en particulier du TGF bêta. Une approche intéressante a déjà été étudiée chez la souris avec trois allergènes majeurs d'arachide mutés, non extraits de leur système d'expression (*Escherichia coli* tué). Des résultats ont été obtenus en utilisant ce vaccin en thérapeutique chez des souris rendues allergiques à l'arachide, indiquant un *shifting* vers un profil de réponse Th1, en même temps que la production de TGF bêta liée à la mise en jeu d'une activation des T régulateurs. L'efficacité clinique était constatée [54]. Toutefois la voie d'administration a été rectale.

L'essentiel des processus de tolérance orale étant situé au niveau de l'intestin grêle, initiés au niveau des plaques de Peyer de l'iléon terminal, les vaccins du futur devront utiliser la voie

orale. L'administration per os devra résoudre le risque d'une dégradation des allergènes. La microencapsulation pourrait résoudre ce problème [55]. La délivrance d'allergènes intacts maintient leur immunogénicité et engage une réponse immunitaire de tolérance. Des résultats cliniques ont déjà été obtenus avec des pollens de phléole microencapsulés, administrés par voie orale [56]. Une alternative serait la présentation d'allergènes recombinants mutés dans un vecteur d'expression qui serait des bactéries probiotiques. Cela n'a pas encore été réalisé.

Une direction des plus intéressante serait l'inclusion de peptides de synthèse réunissant les épitopes T immunodominants de l'allergène considéré dans un aliment de base peu allergénique comme le riz. Les études d'un groupe japonais incluant des épitopes des allergènes majeurs de pollen de cèdre du Japon dans le riz et étudiant la réponse immunitaire dans un modèle de sensibilisation pollinique chez la souris sont extrêmement prometteurs [57]. Cet axe de recherche pourrait mériter l'application de cette stratégie aux allergènes majeurs de fruits croissant avec les pollens. En effet, ne pas avoir à extraire les allergènes recombinants (ou leurs dérivés) d'une plante consommée, obtenir ces produits thérapeutiques à grande échelle pour un minimum de coût, administrer une quantité notable du produit thérapeutique sous forme d'une ration alimentaire de la plante transgénique, pouvoir les proposer au nourrisson (le riz est un des premiers aliments après le lait), sont des éléments très en faveur de ce type de vaccins muqueux par des allergènes alimentaires—ou leurs dérivés.

L'orientation vers des vaccins plasmidiques (ADN) peut actuellement être considérée comme futuriste. Appliqué à un allergène alimentaire, un tel vaccin (ADN codant pour la betalactoglobuline) a été étudié chez la souris et son efficacité, démontrée [58]. Un vaccin ADN codant pour Bet v 1 a établi une réponse immunitaire de type Th1 avec un effet prophylactique aussi bien que thérapeutique chez des animaux sensibilisés [59]. En revanche, des travaux prometteurs ont été présentés chez l'homme (sujets porteurs de mélanosarcome), en s'abstenant de vecteur plasmidique issu d'un rétrovirus, par tir intraépidermique, par jet d'hélium, de particules d'or porteuses de l'ADN d'intérêt : la technique est sûre, l'expression du transgène, codant pour GM-CSF est démontrée [60]. Cette technique pourrait donc être envisagée pour des vaccins spécifiques d'allergènes universels, ou d'allergènes à risque léthal (arachide) ou surtout pour des vaccins non spécifiques d'allergènes, dans le but de stimuler une réponse immunitaire, en facilitant l'expression de cytokines Th1, par exemple.

Des problèmes généraux pour les vaccins concernent l'optimisation d'une réponse immunitaire Th1 et T régulatrice par l'utilisation d'adjuvants.

Plusieurs types d'adjuvants font l'objet d'études, à la suite de l'emploi déjà ancien de l'hydroxyde d'alumine. S'il est établi chez la souris sensibilisée le plus souvent par voie injectable que cet adjuvant promeut une réponse Th2, il faut constater que la situation est différente chez l'homme : les immunothérapies conventionnelles ont longtemps utilisé cet adjuvant avec de bons résultats. Et, de fait in vitro si l'on additionne l'alun à l'allergène dans une proportion comparable

à celle des extraits pour immunothérapie, on observe que les lymphocytes de sujets atopiques produisent moins d'IL-5 et d'IL-13 que par la stimulation par l'allergène isolé. Néanmoins cet adjuvant ne se révèle pas capable d'induire la production de cytokines Th1 ni d'IL-10 [55].

Les séquences immunostimulantes de l'ADN, représentées par les motifs cytosine guanine non méthylés (CpG) sont des agonistes des récepteurs *toll-like* TLR9. Elles activent les cellules dendritiques qui, par une forte production d'IL-12 stimulent une vigoureuse réponse Th1. Chez le sujet allergique au pollen d'Ambrosia, l'immunothérapie spécifique utilisant l'allergène majeur d'Ambrosia lié de façon covalente au CpG, obtient une réorientation Th1, la réduction de chimiokines associées aux Th2, la neutralisation de l'ascension des IgE spécifiques en fin de saison pollinique, et une réduction significative des symptômes, au prix d'un nombre réduit d'injections présaisonnières [61–63]. L'administration par voie orale d'un allergène lié à CpG, l'ovalbumine, dans un modèle de sensibilisation chez la souris, confirme l'orientation vers un profil de réponse Th1, au contraire de l'effet de l'ovalbumine seule. Les CpG seraient donc aussi un adjuvant potentiel de vaccins muqueux [64].

Le lipide A monophosphorylé (MPL) est un adjuvant soluble extrait des parois bactériennes de Gram négatifs (*Salmonella minnesota*) [54]. Il est dénué de toxicité et est déjà inclus dans un vaccin contre l'hépatite B [65]. Il agit par interaction avec les récepteurs *toll-like* TLR4. Les cellules mononuclées sanguines de sujets polliniques, cultivées en présence d'allergène de phléole et de MPL montrent une réorientation de réponse vers le profil Th1, IL-12 dépendante [66]. Associé à des allergoïdes de pollens, le MPL a obtenu une forte production d'IgG1 et IgG4 en même temps qu'un effet clinique, avec quatre injections seulement [67]. Un certain nombre de molécules de synthèse directement dérivées de la structure du MPL, les aminoalkyl glucosaminide phosphates, se révèlent de puissants agonistes de TLR4, et paraissent très adaptés à des vaccins par voie muqueuse [68].

Le chitosan est un produit naturel abondant issu de la déacétylation de la chitine des crustacés insectes et moisissures. C'est un polysaccharide linéaire, biodégradable et non-immunogénique. La première étude de son rôle dans un vaccin sous-cutané montre que son association à une dose vaccinnante de protéine augmente d'un facteur cinq à six la production d'anticorps ainsi que la prolifération lymphocytaire à l'antigène. Cet effet est lié à deux caractéristiques : d'une part il induit une prolifération cellulaire au niveau des ganglions de drainage et d'autre part, il permet une rétention durable de l'antigène au lieu de l'injection. Cela induit des signaux dangers qui mettent en jeu l'immunité innée qui est à son tour un puissant stimulant de l'immunité adaptative [69]. Comparativement à d'autres adjuvants, il se révèle équipotent de l'adjuvant complet de Freund. Il a été utilisé expérimentalement dans un vaccin plasmidique per os pour l'arachide [70]. Son inclusion dans un vaccin muqueux pour l'homme peut être considérée, sachant qu'il figure déjà dans l'alimentation humaine sous forme de compléments alimentaires amaigrissants. Le risque allergénique propre restera à préciser [71].

Des travaux se poursuivent vers des associations d'adjuvants, en particulier avec des dérivés d'huiles minérales biodégradables [72].

Dans le mouvement de recherche actuel sur les vaccins à base de protéines purifiées ou recombinantes, on ne saurait être complets sans citer les travaux sur un vaccin anti-IgE, en cours depuis plusieurs années [72]. Un vaccin contre une protéine du self rencontre a priori deux obstacles : d'une part les protéines engendrent une réponse immunitaire moindre que les virus inactivés ou les composants bactériens, d'autre part le vaccin doit surmonter le processus physiologique de tolérance. Dans un modèle expérimental chez le rat Wistar, il a été montré qu'un vaccin dirigé contre le domaine Cw3 des IgE autologues engendre 50 fois moins d'anticorps qu'un vaccin associant à ce domaine un carier hétérologue. En l'occurrence, la réponse immunitaire anticorps est majorée par l'emploi d'une molécule contenant le domaine Cw3 des IgE autologues, flanqué des domaines Cw2 et Cw4 d'IgE d'opossum. La répétitivité du déterminant antigénique utilisé (dimérisation de Cw3) obtient également une nette augmentation du taux d'anticorps, anti-Cw3. Les auteurs font remarquer que la mise au point d'un tel vaccin permettrait une importante économie de protéines recombinantes, la quantité estimée étant de 1000 à 22,000 fois moindre que celle de l'anti-IgE. Cependant, de nombreux obstacles devront être levés, dont le principal est l'incertitude sur les conséquences imprévisibles d'une réponse auto-immune induite contre les IgE...

4. Conclusions

Si l'on ignore encore ce qui dans une structure moléculaire permettrait de prédire l'allergénicité, c'est-à-dire la propension à induire des IgE spécifiques, on cerne de mieux en mieux des conditions générales d'hypoallergénicité dont certaines peuvent être mises à profit par l'agronomie. La poursuite des caractérisations comparées d'allergénicité de variétés agronomiques peut conduire à la mise sur le marché de variétés moins allergéniques, si toutefois les propriétés organoleptiques, saveur, goût et texture sont maintenues... De même, les industries alimentaires pourraient tenir compte des études réalisées pour le choix de technologies qui assureraient une moindre allergénicité des produits industriels. Toute nouvelle technologie devrait faire l'objet d'une évaluation des modifications d'allergénicité. Par ailleurs, l'exploration des modifications allergéniques par différents modes de cuisson, par des techniques physicochimiques nouvelles sont et seront à la base d'une industrie développant des aliments hypoallergéniques pouvant contribuer à l'alimentation des sujets allergiques alimentaires.

Bientôt un siècle se sera écoulé depuis les premières immunothérapies. L'ère des vaccins à but thérapeutique est ouverte [73] : conçus dans un premier temps comme une forme nouvelle de ces immunothérapies, en ce qui concerne les aéro-allergènes, les prochains vaccins requerront moins d'injections, en utilisant de plus fortes doses d'allergènes modifiés de façon à annuler le risque de réactions IgE-dépendantes, ce qui devrait augmenter les réponses immunes de type Th1 et T régulateurs.

Le génie génétique conduira à de telles améliorations. L'allergie alimentaire pourrait bénéficier de vaccins muqueux, la voie orale étant justifiée par la nécessité de mettre en jeu les processus physiologiques de tolérance de la muqueuse intestinale, mettant en jeu d'autres populations T régulatrices que les IT par voie injectable. La possibilité de créer des aliments transgéniques spontanément peu ou pas allergisants, exprimant les épitopes T d'allergènes majeurs alimentaires en quantités compatibles avec les apports physiologiques paraît une voie d'étude pour les allergènes des fruits et légumes croissant avec les allergènes polliniques, dans un premier temps. Pourra-t-on ultérieurement se diriger vers des vaccins muqueux prophylactiques, dès lors que l'efficacité de vaccins thérapeutiques aura été établie ? Cette éventualité nécessitera prioritairement l'approfondissement des connaissances sur les mécanismes de la tolérance orale chez l'homme, et tout particulièrement, l'exacte connaissance de la fenêtre d'opportunité de la création de la tolérance aux protéines alimentaires chez le nourrisson... [74,75].

Le futur de la prévention et de la thérapeutique des allergies alimentaires grâce aux potentialités du génie génétique sera peut-être un des moyens de modifier la perception craintive des plantes transgéniques, à moins qu'inversement le rejet irrationnel de toute transgénèse végétale n'appauvrisse toute recherche en ce sens, faute de possibilité de mise sur le marché de tels médicaments...

Références

- [1] Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Flabbee J, Beaudouin E, Morisset M, Thevenin F. Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:133–40.
- [2] Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:805–20.
- [3] Gupta R, Sheikh A, Strachan DP, Anderson HR. Time trends in allergic disorders in the UK. *Thorax* 2007;62:91–6.
- [4] Moneret-Vautrin DA, Kanny G. L'anaphylaxie alimentaire. Nouvelle enquête multicentrique française. *Bull Acad Natl Med* 1995;179:161–84.
- [5] Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Current understanding of food allergens. *Ann N Y Acad Sci* 2002;964:69–85.
- [6] Jenkins JA, Griffiths-Jones S, Shewry PR, Breiteneder H, Mills EN. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:163–70.
- [7] Huby RDJ, Dearman RJ, Kimber I. Why are some proteins allergens? *J Toxicol Sci* 2000;55:235–46.
- [8] Bannon GA. What makes a food protein an allergen? *Curr Allergy Asthma Rep* 2004;4:43–6.
- [9] Davis PJ, Smales CM, James DC. How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy* 2001;56:56–60.
- [10] Soler-Rivas C, Wichers HJ. Impact of biochemical and physical procedures on food allergen stability. *Allergy* 2001;56:52–5.
- [11] Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:763–8.
- [12] Beyer K, Morrow E, Li XM, Bardina L, Bannon GA, Burks AW, et al. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:1077–81.
- [13] Restani P, Fiocchi A, Restelli AR, Velona T, Beretta B, Giovannini M, et al. Effect of technological treatments on digestibility and allergenicity of meat-based baby foods. *J Am Coll Nutr* 1997;16:376–82.

- [14] Kobayashi M. Immunological functions of soy sauce: hypoallergenicity and antiallergic activity of soy sauce. *J Biosci Bioeng* 2005;100:144–51.
- [15] Barkholt V, Jorgensen PB, Sorensen D, Bahrensheer J, Haikara A, Lemola E, et al. Protein modification by fermentation: effect of fermentation on the potential allergenicity of pea. *Allergy* 1998;53:106–8.
- [16] Tanabe S, Arai S, Watanabe M. Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60:1269–72.
- [17] Watanabe J, Tanabe S, Watanabe M, Shinmoto H, Sonoyama K. The production of hypoallergenic wheat flour and the analysis of its allergy suppressive effects. *Biofactors* 2004;22:295–7.
- [18] Akiyama H, Sakata K, Yoshioka Y, Murata Y, Ishihara Y, Teshima R, et al. Profile analysis and immunoglobulin E reactivity of wheat protein hydrolysates. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;140:36–42.
- [19] Buchanan BB, Adamidi C, Lozano RM, Yee CB, Momma M, Kobrehel K, et al. Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:5372–7.
- [20] Weichel M, Vergoossen NJ, Bonomi S, Scibilia J, Ortolani C, Ballmer-Weber BK, et al. Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. *Allergy* 2006;61:128–35.
- [21] Yamanishi R, Tsuji H, Bando N, Yamada Y, Nadaoka Y, Huang T, et al. Reduction of the allergenicity of soybean by treatment with proteases. *J Nutr Sci Vitaminol* 1996;42:581–5.
- [22] Ogawa A, Samoto M, Takahashi K. Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *J Nutr Sci Vitaminol* 2000;46:271–9.
- [23] Franck P, Moneret-Vautrin DA, Dousset B, Kanny G, Nabet P, Guénard-Bilbaut L, et al. The allergenicity of soybean-based products is modified by food technologies. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:212–9.
- [24] Ikezawa Z, Tsubaki K, Osuna H, Shimada T, Moteki K, Sugiyama H, et al. Usefulness of hypoallergenic rice (AFT-R 1) and analysis of the insoluble rice allergen molecule. *Aerugi* 1999;48:40–9.
- [25] Moneret-Vautrin DA, Hatahet R, Kanny G. Protein hydrolysates: hypoallergenic milks and extensively hydrolyzed formulas. Immuno-allergic basis for their use in prevention and treatment of milk allergy. *Arch Pediatr* 2001;8:1348–57.
- [26] Dean TP, Adler BR, Ruge F, Warner JO. In vitro allergenicity of cows' milk substitutes. *Clin Exp Allergy* 1993;23:205–10.
- [27] Docena G, Rozenfeld P, Fernandez R, Fossati CA. Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy* 2002;57:83–91.
- [28] Ammar F, de Boissieu D, Dupont C. Allergy to protein hydrolysates. Report of 30 cases. *Arch Pediatr* 1999;6:837–43.
- [29] Nakamura A, Tanabe S, Watanabe J, Makino T. Primary screening of relatively less allergenic wheat varieties. *J Nutr Sci Vitaminol* 2005;51:204–6.
- [30] Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, Koivuluhta M, Mikkola J, Keskinen H, et al. A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:912–7.
- [31] Battais F, Pineau F, Popineau Y, Aparicio C, Kanny G, Guerin L, et al. Food allergy to wheat: identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clin Exp Allergy* 2003;33:962–70.
- [32] Spaenij-Dekking L, Kooy-Winkelaar Y, Koning F. The Ethiopian cereal tef in celiac disease. *N Engl J Med* 2005;353(16):1748–9.
- [33] Asero R, Marzban G, Martinelli A, Zaccarini M, Machado ML. Search for low allergenic apple cultivars for birch pollen-allergic patients: is there a correlation between in vitro assays and patient response? *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006;38:94–8.
- [34] Tada Y, Nakase M, Adachi T, Nakamura R, Shimada H, Takahashi M, et al. Reduction of 14–16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense genes. *FEBS Lett* 1996;3:341–5.
- [35] Nakamura R, Matsuda T. Rice allergenic protein and molecular-genetic approach for hypoallergenic rice. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60:1215–21.
- [36] Herman EM, Helm RM, Jung R, Kinney AJ. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *J Plant Physiol* 2003;132:36–43.
- [37] Gilissen LJ, Bolhaar ST, Matos CI, Rouwendal GJ, Boone MJ, Krens FA, et al. Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:364–9.
- [38] Le LQ, Mahler V, Lorenz Y, Scheurer S, Biemelt S, Vieths S, Sonnewald U. Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from Lyc e 1-silenced transgenic tomato plants. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1176–83.
- [39] Le LQ, Lorenz Y, Scheurer S. Design of tomato fruit with reduced allergenicity by dsRNA-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. *Plant Biotech J* 2006;4:231–42.
- [40] Lorenz Y, Enrique E, Lequynh L, Fotisch K, Retzek M, Biemelt S, et al. Skin prick tests reveal stable and heritable reduction of allergenic potency of gene-silenced tomato fruits. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:711–8.
- [41] Dodo H, Konan K, Viquez O. A genetic engineering strategy to eliminate peanut allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005;5:67–73.
- [42] Burks AW, King N, Bannon GA. Modification of a major peanut allergen leads to loss of IgE binding. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:313–4.
- [43] King N, Helm R, Stanley JS, Vieths S, Luttkopf D, Hatahet L, et al. Allergenic characteristics of a modified peanut allergen. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:963–71.
- [44] Rabjohn P, West CM, Connaughton C, Sampson HA, Helm RM, Burks AW, et al. Modification of peanut allergen Ara h 3: effects on IgE binding and T cell stimulation. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:15–23.
- [45] Bannon GA, Cockrell G, Connaughton C, West CM, Helm R, Stanley JS, et al. Engineering, characterization and in vitro efficacy of the major peanut allergens for use in immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;124:70–2.
- [46] Reese G, Viebranz J, Leong-Kee SM, Plante M, Lauer I, Randow S, et al. Reduced allergenic potency of VR9-1, a mutant of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *J Immunol* 2005;175:8354–64.
- [47] Ma Y, Gadermaier G, Bohle B, Bolhaar S, Knulst A, Markovic-Housley Z, et al. Mutational analysis of amino acid positions crucial for IgE-binding epitopes of the major apple (*Malus domestica*) allergen, Mal d 1. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;139:53–62.
- [48] Bolhaar ST, Zuidmeer L, Ma Y, Ferreira F, Bruijnzeel-Koomen CA, Hoffmann-Sommergruber K, et al. A mutant of the major apple allergen, Mal d 1, demonstrating hypoallergenicity in the target organ by double-blind placebo-controlled food challenge. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1638–44.
- [49] Larché M. Peptide immunotherapy for allergic diseases. *Allergy* 2007;62:325–31.
- [50] von Garnier C, Astori M, Kettner A, Dufour N, Heusser C, Corradin G, et al. Allergen-derived long peptide immunotherapy down-regulates specific IgE response and protects from anaphylaxis. *Eur J Immunol* 2000;30:1638–45.
- [51] Kussebi F, Karamloo F, Rhyner C, Schmid-Grendelmeier P, Salagianni M, Mannhart C, et al. A major allergen gene-fusion protein for potential usage in allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:323–9.
- [52] Cramer R, Fluckiger S, Daigle I, Kundig T, Rhyner C. Design, engineering and in vitro evaluation of MHC class-II targeting allergy vaccines. *Allergy* 2007;62:197–206.
- [53] Li XM, Srivastava K, Huleatt JW, Bottomly K, Burks AW, Sampson HA. Engineered recombinant peanut protein and heat-killed *Listeria monocytogenes* coadministration protects against peanut-induced anaphylaxis in a murine model. *J Immunol* 2003;171:3289–95.
- [54] Li XM, Srivastava K, Grishin A, Huang CK, Schofield B, Burks W, et al. Persistent protective effect of heat-killed *Escherichia coli* producing "engineered," recombinant peanut proteins in a murine model of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:159–67.
- [55] Francis JN, Durham SR. Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:543–8.
- [56] Te-PAS EC, Hoyte EG, McIntire JJ, Umetsu DT. Clinical efficacy of microencapsulated timothy grass pollen extract in grass-allergic individuals. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;92:25–31.
- [57] Takagi H, Saito S, Yang KL, Nagasaka S, Nishizawa N, Takaiwa F. Oral immunotherapy against a pollen allergy using a seed-based peptide vaccine. *Plant Biotechnol J* 2005;3:521–33.

- [58] Adel-Patient K, Creminon C, Wal JM, Chatel JM. Prévention d'une réponse IgE spécifique de la beta-lactoglobuline bovine chez la souris par immunisation génique. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2000;40:171–84.
- [59] Hartl A, Hochreiter R, Stepanoska T, Ferreira F, Thalhamer J. Characterization of the protective and therapeutic efficiency of a DNA vaccine encoding the major birch pollen allergen Bet v 1a. *Allergy* 2004;59:65–73.
- [60] Cassaday RD, Sondel PM, King DM, Macklin MD, Gan J, Warner TF, et al. A phase I study of immunization using particle-mediated epidermal delivery of genes for gp100 and GM-CSF into uninvolved skin of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:540–9.
- [61] Simons FE, Shikishima Y, Van Nest G, Eiden JJ, HayGlass KT, et al. Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1144–51.
- [62] Tulic MK, Fiset PO, Christodouloupoulos P, Vaillancourt P, Desrosiers M, Lavigne F, et al. Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammation response. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:235–41.
- [63] Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, et al. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med* 2006;355:1445–55.
- [64] Teshima R, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H, Maitani T, Sawada J. Effect of oral administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/Wv mice. *Allergol Int* 2006;55:43–8.
- [65] Baldrick P, Richardson D, Woroniecki SR, Lees B. Pollinex ((R)) Quattro Ragweed: safety evaluation of a new allergy vaccine adjuvanted with monophosphoryl lipid A (MPL((R))) for the treatment of ragweed pollen allergy. *J Appl Toxicol* 2004;24:261–8.
- [66] Puggioni F, Durham SR, Francis JN. Monophosphoryl lipid A (MPL) promotes allergen-induced immune deviation in favour of Th1 responses. *Allergy* 2005;60:678–84.
- [67] Mothes N, Heinzkill M, Drachenberg KJ, Sperr WR, Krauth MT, Majlesi Y. A specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted IgE production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1198–208.
- [68] Alderson MR, McGowan P, Baldrige JR, Probst P. TLR4 agonists as immunomodulatory agent. *J Endotoxin Res* 2006;12:313–9.
- [69] Zaharoff DA, Rogers CJ, Hance KW, Schlom J, Greiner JW. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine* 2007;25:2085–94.
- [70] Roy K, Mao HK, 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.
- [71] Kato Y, Yagami A, Matsunaga K. A case of anaphylaxis caused by the health food chitosan. *Arerugi* 2005;54:1427–9.
- [72] Johansson J, Hellman L. Modifications increasing the efficacy of recombinant vaccines; marked increase in antibody titers with moderately repetitive variants of a therapeutic allergy vaccine. *Vaccine* 2007;25:1676–82.
- [73] Sawyer RT, Gergen PJ, Minnicozzi M, Plaut M, Dong G, Schwaninger JM, et al. The future of immunotherapy. Report of a National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Division of Allergy, Immunology and Transplantation (DAIT) Workshop. *Allergy* 2006;61:1159–61.
- [74] Strobel S. Neonatal tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 1996;778:88–102.
- [75] Strobel S, Mowat AM. Oral tolerance and allergic responses to food proteins. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6:207–13.