

Université de Montréal

**L'immunothérapie orale pour le traitement des allergies
alimentaires multiples**

par
Philippe Bégin

Département de Médecine
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté Médecine
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en Science Biomédicale

Avril, 2015

© Philippe Bégin, 2015

Résumé

La prévalence des allergies alimentaires IgE-médiées aurait triplé au cours de la dernière décennie avec des études Nord-Américaines atteignant les 8% chez les enfants. Quoiqu'il n'y ait à ce jour aucun traitement curatif pour les allergies alimentaires, l'immunothérapie orale (OIT) constitue une nouvelle approche expérimentale prometteuse. Cette dernière consiste en l'administration de doses progressive d'allergènes par voie orale sur une période prolongée dans le but d'instaurer un état de désensibilisation et possiblement une tolérance orale soutenue. Cette approche a été démontrée sécuritaire et permettrait la désensibilisation à haute dose de plus de 80% des participants allergiques aux arachides, lait ou œufs.

Dans cette thèse, nous présentons 2 études de phase 1 portant sur des protocoles d'OIT, destinés à optimiser l'efficacité du traitement chez les sujets avec allergies alimentaires multiples. Près de 30% des enfants avec allergie alimentaire sont allergiques à plus d'un aliment, une proportion qui augmente à 70% lorsqu'on considère les cas les plus sévères. Ces enfants sont à risque augmenté de réactions accidentelles et souffrent d'un impact plus grand sur leur qualité de vie. Dans la première étude, en créant un mélange individualisé avec un ratio stochiométrique 1:1 entre les protéines des aliments allergiques de l'enfant, nous démontrons qu'il est possible de désensibiliser jusqu'à 5 aliments simultanément avec un profil d'innocuité similaire à une monothérapie.

Dans la seconde étude, nous utilisons un traitement à l'omalizumab, un anticorps monoclonal anti-IgE, pour permettre une désensibilisation orale multi-allergénique fortement accélérée.

Lorsque comparé à l'approche sans omalizumab, ce protocole s'associe à une nette diminution du temps requis pour atteindre les doses d'entretien, passant d'une médiane de 21 à 4 mois, sans affecter le profil d'innocuité.

Alors que ces études fournissent des approches cliniques raisonnables pour désensibiliser la population multi-allergique, plusieurs questions persistent, notamment en ce qui a trait à l'induction de tolérance permanente. Une barrière majeure à cet égard réside dans notre piètre compréhension des mécanismes sous-jacents à l'immunothérapie. Prenant avantage d'échantillons cliniques bien caractérisés provenant des essais cliniques ci-haut mentionnés, nous utilisons les nouvelles technologies de séquençage TCR pour suivre la distribution clonale des lymphocytes T spécifiques aux arachides durant une immunothérapie orale. Nous démontrons que l'OIT s'associe à des changements significatifs dans les fréquences des clones spécifiques, suggérant un processus d'épuisement clonal et de remplacement. Nous démontrons par ailleurs que le test de prolifération lymphocytaire, traditionnellement utilisé pour évaluer la réponse cellulaire allergique, est dominé par une distribution polyclonale hautement non-spécifique. Cette observation a des implications majeures considérant que la plupart de la littérature actuelle sur la réponse T se base sur cette technique.

En somme, cette thèse jette les bases pour des programmes de recherche translationnelle pour optimiser et personnaliser les protocoles cliniques actuels et développer de nouvelles avenues d'investigation et de traitement pour améliorer la prise en charge des sujets avec allergies alimentaires.

Mots-clés : Allergie alimentaire, tolérance soutenue, immunothérapie orale, allergie multiple, omalizumab, IgE, TCR, clone, épuisement clonal, test de prolifération

Abstract

The prevalence of IgE-mediated food allergies has tripled over the last decade with prospective studies indicating that up to 8% of children may be affected in North America. There is currently no cure for food allergy but oral immunotherapy (OIT) is an experimental approach to treat food allergies. It consists in the progressive administration from minute to large amounts of the allergenic food by the mouth over a prolonged period of time to induce a state of desensitization and possibly sustained tolerance. This approach has been shown to be safe and to allow desensitization to high doses in over 80% of participants allergic to peanuts, milk or egg.

In this thesis, we present two phase 1 trials on OIT protocols designed to efficiently treat multiple foods allergies. About 30% of children with food allergy are allergic to more than one food. This proportion increases to 70% when considering the most severe cases. Children with multiple food allergies are at higher risk of accidental reactions and suffer from greater impact on quality of life than those with single food allergies. By creating a customized treatment mix with a 1:1 stoichiometric ratio for the child's relevant food proteins, we were first able to safely desensitize up to 5 foods simultaneously with a safety profile similar to single allergen therapy and a minimal increase in time to maintenance.

Then, taking advantage of recent evidence showing that omalizumab, an anti-IgE receptor monoclonal antibody, can significantly raise reaction thresholds in food allergic subjects, we used short courses of omalizumab to allow very rapid oral desensitization to various foods in a

second phase 1 study. When compared to “standard” multi-OIT, the omalizumab-enabled rush protocol resulted in a decreased time to maintenance from a median of 21 to 4 months.

While these studies provide reasonable clinical approaches to this population, many questions remain, especially with regards to long term tolerance. A major limit to our progress in improving these protocols stems from our lack of understanding of the underlying immune mechanisms of oral immunotherapy. Taking advantage of well phenotyped samples from the afore-mentioned trials, we used next-generation high-throughput TCR sequencing to follow clonal distribution of peanut specific T cells during oral immunotherapy. We found that OIT is associated with significant changes in food-specific clonal frequencies, suggesting clonal exhaustion and replacement as an underlying mechanism of OIT. In addition, we show that the proliferation assay which is traditionally used to assess the cellular response is dominated by a highly non-specific polyclonal distribution. This observation has important implications considering most of the current literature on T cell response to immunotherapy is based on this assay. This highlights the need for the development of new tools to assess the cellular allergic response. Overall this thesis lays the ground for further comprehensive translational research programs on the treatment of food allergy.

Keywords : Food allergy, sustained tolerance, oral immunotherapy, multiple allergies, omalizumab, IgE, TCR, clone, clonal exhaustion, proliferation assay.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	vi
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xii
Liste des sigles	xiii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvi
Chapitre I : Introduction.....	1
Chapitre II : Revue de l’immunothérapie orale dans le traitement de l’allergie alimentaire.....	5
Historique de l’immunothérapie dans le traitement des allergies alimentaires	5
L’échec de l’immunothérapie sous-cutanée pour le traitement de l’allergie alimentaire...	6
Expérience récente en immunothérapie orale	7
Barrières d’implémentation cliniques à anticiper	9
Chapitre III: Safety and feasibility of oral immunotherapy to multiple food allergens.....	12
Abstract	13
Introduction.....	14
Methods.....	16
Results.....	19
Discussion	28
Supplemental methods	31
Participant selection:	31
Study medication	32
Study design.....	32
Chapitre IV: Phase 1 results of Safety and Tolerability in a Rush oral immunotherapy protocol to multiple foods using Omalizumab.....	37

Abstract.....	38
Introduction.....	40
Methods.....	42
Participant selection:.....	42
Study medications.....	43
Study design.....	44
Allergy testing.....	47
Statistical Analysis.....	47
Results.....	49
Overall:.....	49
Safety.....	50
Dose Progression.....	53
Allergy testing.....	53
Discussion.....	55
Chapitre V : Revue de l'évaluation de la tolérance immunitaire en immunothérapie orale.....	58
Tolérance orale soutenue et immunothérapie orale alimentaire.....	58
Mécanismes de tolérance orale.....	61
Changements immunologiques associés à l'immunothérapie allergène-spécifique.....	62
Chapitre VI: Changes in peanut-specific T-cell clonotype with oral immunotherapy.....	67
Supplemental methods.....	76
Clinical sample.....	76
Proliferation assay.....	77
High-throughput T-cell receptor sequencing.....	78
Definitions.....	79
Statistical analysis.....	80
Chapitre VII : Perspectives et conclusion.....	81
Limite des études preuve-de-concept.....	82
Bien-fondé de l'approche.....	84
Vers une approche translationnelle.....	86
Conclusion.....	90

Bibliographie..... xi

Liste des tableaux

Tableau II-I: Taux de désensibilisation “ <i>Intent-to-treat</i> ” lors des essais cliniques d’immunothérapie orale	8
Table III-I : Baseline characteristics	20
Table III-II : Baseline allergy tests to other foods in multi-allergic group	21
Table III-III: Reaction rates	24
Table III-IV: Predictors of reaction profile with multiple food OIT	25
Table III-V: Dose progression on double-blind placebo-controlled challenges	32
Table III-VI: Food combinations used in multi-allergic group	33
Table III-VII : Dose progression on initial day escalation	34
Table III-VIII: Dose progression with daily dosing	36
Table IV-I: Rush mOIT Initial Escalation Day Schedule	45
Table IV-II: Rush mOIT Dose Escalation Schedule	47
Table IV-III: Food combinations in rush mOIT group	48
Table IV-IV: Subjects Baseline Characteristics	49
Table IV-V: Reaction Rates With Rush mOIT	51
Table VI-I: Diversity and persistence of TCR β clones in unstimulated and antigen-stimulated T cells from peanut allergic subjects	70
Tableau VII-I: Questions sur l’immunothérapie orale pour l’allergie alimentaire	87

Liste des figures

Figure 3.1: OIT trial design	17
Figure 3.2. Reaction profile in multi-allergic participants.....	22
Figure 3.3 – Reaction profile in mono-allergic participants.....	23
Figure 3.4. Kaplan-Meier curves showing time to dose	26
Figure 3.5. Comparison of food-specific IgE and IgG4	27
Figure 4.1: Rush mOIT protocol timeline.....	44
Figure 4.2: Symptom occurrence during rush mOIT.....	52
Figure 4.3. Rush mOIT Kaplan-Meier curves showing time to dose	53
Figure 4.4. Changes in peanut allergy tests with rush mOIT.....	54
Figure 6.1: FACS gating strategy	68
Figure 6.2: TCR repertoire overlap on immediately repeated blood sample.....	71
Figure 6.3: Dot plot comparing the relative frequencies of TCR copies	72
Figure 6.4: Correlation coefficients between clonal frequencies.....	73
Figure 6.5: Changes in clone relative frequencies	74
Figure 7.1 Changement dans le score de qualité de vie liée à l’allergie alimentaire	86

Liste des sigles

Ara h:	<i>Arachis hypogaea</i>
CDR:	Complementary Determining Region
CFSE:	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMC:	Chemistry and Manufacturing Control
CTFU:	Clinical Trial Food Unit
DBPCFC:	Double-blind Placebo-controlled food challenge
EMA:	European Medicines Agency
FcεR1 :	Récepteur à haute affinité des IgE
FDA:	Food and Drug Administration
GMP:	Good Manufacturing Practice
IgE:	Immunoglobulin E / Immunoglobuline E
IL:	Interleukin / Interleukine
IND:	Investigational New Drug
IRB:	Institutional Review Board
LAL :	Limulus amoebocyte lysate
MALT:	Tissue lymphoïde associé aux muqueuses
MHC :	Major histocompatibility complex / Complexe d'histocompatibilité majeur
mOIT:	Multiple allergen oral immunotherapy
OIT:	Oral immunotherapy / Immunothérapie orale
PBMC:	Peripheral Blood Mononucleated Cell
PN-IgE:	Peanut specific Immunoglobulin E
PN-IgG4:	Peanut specific Immunoglobulin G4
SPT:	Skin prick test
Th:	T helper / T auxiliaire

Liste des abréviations

Et al. : Et alii (et autres)

À Emma et Ellie

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier tous les patients et leurs familles qui ont rendu ce travail possible. La Dr Kari Nadeau pour l'accueil chaleureux et la confiance qui m'a été manifestée à l'Université Stanford. Dr Rosa Bacchetta pour son amitié et sa sagesse. Les membres de l'équipe clinique de SAFAR pour leur travail acharné et leur dévouement à la cause. Madame Shu-Chen Liu et les autres membres du laboratoire pour leur aide constante et leur expertise incomparable. Le réseau des centres d'excellence AllerGEN pour m'avoir fourni les moyens financiers de réaliser ce projet. Enfin, Dr Élie Haddad, mon directeur de thèse pour son support indéfectible comme mentor.

Chapitre I : Introduction

La prévalence des allergies alimentaires IgE-médiées (anaphylactiques) a triplé au cours de la dernière décennie, affectant de nos jours jusqu'à 8% des enfants au Canada et en Amérique de Nord (1-6). Les allergies alimentaires sont la principale cause d'anaphylaxies vues à l'urgence, causant près du tiers des cas d'anaphylaxie. Aux États-Unis, on estime à environ 30,000 les cas d'anaphylaxies alimentaires dans les urgences, et environ 200 s'avèrent fatales (7).

Il n'y a actuellement aucun traitement disponible pour l'allergie alimentaire au Québec. Sa prise en charge consiste en l'évitement strict de l'allergène et l'utilisation d'auto-injecteurs d'adrénaline en cas de contact accidentel (8). Comme mentionné ci-haut, cette approche n'élimine pas le risque de réactions accidentelles et elle s'associe donc à un fardeau psychosocial substantiel pour les patients et leur famille, qui serait supérieur à celui du diabète de type I ou du lupus (9). À l'école, ces enfants sont à risque d'exclusion ou d'intimidation (10). Les enfants et leurs parents souffrent souvent d'un très haut niveau d'anxiété associé à la nourriture et plusieurs vont s'isoler et limiter leur participation à des activités sociales (11). Le coût annuel des allergies alimentaires est évalué à 20 milliards USD aux États-Unis, ou jusqu'à 10% des parents rapportent avoir donné l'école à la maison en raison de la crainte de réaction (12). Alors que certaines allergies alimentaires comme les œufs et le lait peuvent tendre à se résoudre avec le temps, d'autre, comme celle aux noix et aux arachides, tendent à persister dans plus de 75% des cas (13).

L'immunothérapie orale, également nommée désensibilisation alimentaire ou induction de tolérance, consiste en l'administration progressive, sous supervision médicale, de quantités minimales et mesurées de l'allergène sur une période prolongée jusqu'à ce que des portions complètes de l'aliment soient tolérées sans réaction. Il s'agit en quelque sorte d'une adaptation des protocoles de désensibilisation sous-cutanés (vaccins d'allergie) actuellement disponibles pour les allergies respiratoires (acariens, pollens).

Considérée une thérapie expérimentale, la quantité de publications sur l'immunothérapie orale et l'expérience clinique a culminé au cours des dernières années de façon à ce que plusieurs groupes, dans le monde et aux États-Unis offrent actuellement ce service aux patients souffrant d'allergie alimentaire. Aux États-Unis, c'est près de 2% des allergologues qui déclarent la pratiquer de façon courante (14). Lorsque réalisée dans une structure appropriée par une équipe expérimentée, cette approche a été démontrée comme sécuritaire, avec des taux de succès *intent-to-treat* dépassant les 80% (voir section suivante). Les patients désensibilisés dans le cadre d'études cliniques et leurs familles ont rapporté une très nette amélioration de leur qualité de vie, avec réintroduction des aliments allergiques dans la diète quotidienne et une réintroduction sociale (15).

Certaines barrières à l'implémentation clinique des protocoles de désensibilisation orale au Québec persistent toutefois. Notamment, les protocoles actuels demandent un investissement important de ressources et de temps de la part des patients, de leurs parents et des intervenants. De plus, ces protocoles ne sont pas sans risque, nécessitant un soutien constant de la part de l'équipe d'allergie. Dans un contexte de système de santé publique, il importe donc d'en

maximiser l'efficacité et l'efficience sans pour autant en compromettre l'innocuité. Ceci passe d'une part par le développement de protocoles personnalisés, et d'autre part par une meilleure connaissance des principes immunologiques qui en sous-tendent l'efficacité. En effet, malgré que la désensibilisation allergique aient été développé il y a plus d'un siècle, les mécanismes immunologiques sous-jacents demeurent à ce jours largement inconnus.

Les résultats présentés dans le cadre la présente thèse de doctorat sont le fruit d'un programme de recherche translationnelle en allergie alimentaire combinant des essais cliniques de phase 1 portant sur des approches d'immunothérapie orale novatrices et l'analyse des changements dans la réponse immunitaire associée à ces traitements.

Les objectifs spécifiques adressés sont les suivants :

- Évaluer la faisabilité et l'innocuité d'un protocole d'immunothérapie orale dirigée contre plusieurs allergènes simultanément chez des sujets souffrant d'allergies alimentaires multiples.
- Évaluer la faisabilité et l'innocuité d'un protocole d'immunothérapie orale accélérée combiné à un traitement anti-IgE chez des sujets souffrant d'allergies alimentaires multiples.
- Évaluer les changements clonaux associés à la réponse cellulaire aux arachides lors d'une telle immunothérapie orale accélérée.

Cette thèse contient 7 chapitres incluant celui-ci. Le chapitre II consiste en une revue de la littérature clinique portant sur l'immunothérapie orale dans le traitement de l'allergie alimentaire. Les chapitres III et IV incluent respectivement un manuscrit portant sur le développement d'un protocole de désensibilisation à multiples allergènes et un manuscrit portant sur le développement d'un protocole de désensibilisation alimentaire multiple accéléré en combinaison avec un traitement anti-IgE. Le chapitre V consiste en une revue de la littérature sur la tolérance orale et sur les mécanismes immunologiques de l'immunothérapie orale. Le chapitre VI inclue un manuscrit portant sur l'analyse des changements clonotypiques dans la réponse cellulaire aux arachides dans le cadre d'une immunothérapie orale accélérée. Enfin, le chapitre VII présente une discussion globale de ces études et les conclusions finales de la thèse.

Chapitre II : Revue de l'immunothérapie orale dans le traitement de l'allergie alimentaire

Historique de l'immunothérapie dans le traitement des allergies alimentaires

L'immunothérapie spécifique aux allergènes (également nommée désensibilisation) consiste en l'administration de quantités croissantes d'un allergène donné jusqu'à ce qu'un dosage d'entretien soit atteint et que le patient présente une résolution de ses symptômes allergiques (16). L'immunothérapie sous-cutanée, impliquant l'administration des allergènes sous forme d'extraits aqueux par injections sous-cutanées, a d'abord été décrite dans le traitement de la rhinite allergique saisonnière en 1911 par Leonhard Noon et John Freeman et les premiers véritables essais cliniques ont été réalisés dans les années 50' par William Frankland qui avait notamment démontré que l'injection de doses d'entretien élevées permettait d'induire des désensibilisations plus efficaces (17). Entre 1950 et 1980, la pratique de l'immunothérapie s'est répandue à travers le monde avec différentes variations dans les modalités de traitements ou les types d'extrait utilisés.

De façon très intéressante, le premier cas rapporté d'immunothérapie orale pour le traitement d'une allergie alimentaire antédaterait la naissance de l'immunothérapie sous-cutanée décrite ci-haut. Ce cas a été publié dans la revue Lancet en 1908 par le Dr Shofield qui a désensibilisé avec succès un garçon de 13 ans avec histoire d'anaphylaxie aux œufs (18). La dose initiale de désensibilisation correspondait à 1/10 000 œufs. La dose administrée a été augmentée progressivement sur une période de 6 mois, à la suite de laquelle l'enfant pouvait tolérer l'ingestion d'un œuf par jour. Malgré ce succès initial, la littérature sur l'immunothérapie orale alimentaire est demeurée quasi-

inexistante durant le 20^e siècle jusqu'à ce que la technique soit « redécouverte » avec l'épidémie d'allergie alimentaire dans les années 1980 (19).

Les premières études contrôlées (ouvertes et non randomisées) portant sur l'immunothérapie orale ont été réalisées en Italie par Dr Patriarca et collaborateurs. En utilisant un protocole standardisé pour traiter différents aliments, ils rapportaient des taux de désensibilisation de l'ordre de 83%. Les allergènes les plus fréquemment désensibilisés incluaient le lait, suivi par les œufs et le poisson. Ce protocole débutait avec une dose quotidienne, avec augmentation hebdomadaire jusqu'à la dose finale d'entretien. En comparaison avec les contrôles allergiques appariés pour l'âge, les sujets recevant l'immunothérapie oral démontraient une diminution significative des IgE et une augmentation des IgG4 spécifiques à leurs allergènes (20).

L'échec de l'immunothérapie sous-cutanée pour le traitement de l'allergie alimentaire

Le premier essai clinique randomisé d'immunothérapie alimentaire a été réalisé par la voie sous-cutanée par le Dr Nelson et collaborateurs. Leur protocole impliquait un horaire accéléré de désensibilisation sous-cutanée sur 5 jours pour atteindre une dose d'entretien de 0.5mL d'extrait d'arachide aqueux de 1:100 wt/vol, suivi d'injection hebdomadaire pour une durée d'un an (21). Tous les sujets ont montré une augmentation de leur seuil de réactivité aux arachides lors de provocations orales ainsi qu'une diminution de leurs tests cutanés, alors que les patients du groupe contrôle n'ont montré aucun changement. Cependant, en raison de taux de réactions systémiques et d'utilisation d'épinéphrine trop élevée, à la fois dans la période de désensibilisation accélérée et durant les entretiens hebdomadaires, la moitié des sujets ont dû réduire leurs doses d'entretien.

L'essai clinique a finalement été interrompu par la FDA (Food and Drug Administration) en raison d'un décès d'un patient du groupe placebo ayant accidentellement reçu une pleine dose d'extrait d'arachide. L'approche sous-cutanée a ainsi été complètement abandonnée en faveur de l'administration orale.

Expérience récente en immunothérapie orale

Le tableau 1 résume les principales études portant sur l'immunothérapie orale publiées au cours des dernières années. Quoiqu'il s'agisse de petites cohortes, pour la plupart non contrôlées, le taux de succès « intent-to-treat » rapportés sont comparables d'une étude à l'autre et ce indépendamment de l'aliment ou des différences de protocole.

Deux études randomisées contrôlées récentes méritent une mention particulière en raison de leur grand impact. D'abord, l'équipe américaine dirigée par le Dr Wesley Burks a publié son expérience avec l'allergie aux œufs dans le *New England Journal of Medicine* en 2012 (22). Dans cette étude multicentrique à double-aveugle, 55 participants âgés de 5 à 18 ans ont été randomisés à un traitement aux œufs (n=40) contre placebo (n=15). Les sujets devaient avoir présenté une histoire clinique d'allergie aux œufs et rencontrer les critères de positivité au dosage d'IgE spécifiques (>12 kU/mL si 5 ans; > 6kU/mL si > 6 ans). Le but était de désensibiliser les sujets jusqu'à 2g d'œuf en poudre (1.6g de protéine d'œuf). Dix-huit des 40 sujets dans le groupe traité ont atteint cette dose en 10 mois. À cette date, les doses médianes tolérées étaient de 5g contre 0.05g dans le groupe traitement et placebo, respectivement. À 22 mois, une provocation orale à 10 g était tolérée chez 30 sujets du groupe traitement (75%) et aucun sujet sous placebo.

Tableau II-I: Taux de désensibilisation “*Intent-to-treat*” lors des essais cliniques d’immunothérapie orale

	N	Taux de désensibilisation
Lait de vache		
Staden 2007(23)	14	64%
Skripac 2008 (24)	13	95%
Zapatero 2008 (25)	18	89%
Longo 2008 (26)	30	90%
Narisety 2009 (27)	15	87%
Pajno 2010 (28)	15	73%
Martorell 2011 (29)	30	90%
Keet 2011 (30)	20	70%
Salmivesi 2012 (31)	28	78%
Vasquez-Ortis 2013 (32)	81	86%
Salvilahti 2014 (33)	32	81%
Total	278	84% [80-88]
Oeuf		
Staden 2007(23)	11	64%
Buchanan 2007 (34)	7	57%
Itoh 2010 (35)	6	100%
Vickery 2010 (36)	8	75%
Garcia Rodriguez 2011 (37)	23	96%
Burks 2012 (22)	40	75%
Meglio 2013 (38)	10	90%
Dello Iacono 2013 (39)	10	90%
Vasquez-Ortis 2014 (40)	50	82%
Total	165	81% [75-87]
Arachides		
Clark 2009 (41)	4	100%
Jones 2009 (42)	39	74%
Blumchen 2010 (43)	23	78%
Varshney 2011 (44)	19	84%
Bégin 2014 (45)	40	85%
Wasserman 2014 (46)	352	85%
Anagnostou 2014 (47)	39	62%
Tang 2015 (48)	66	89%
Total	582	83% [80-86]

La seconde étude randomisée contrôlée parue dans la revue Lancet en 2014 examinait l'allergie aux arachides (47). Quatre-vingt-dix-neuf (99) sujets âgés de 7 à 16 ans furent recrutés à un site unique en Grande-Bretagne. Il s'agissait d'une étude de phase 2 ouverte de design cross-over à randomisation 1:1 comparant l'immunothérapie orale aux arachides (49 sujets) à la pratique d'évitement standard (50 sujets); les participants du groupe contrôle recevant le traitement lors de la seconde phase de l'étude. Le but était de désensibiliser les participants jusqu'à 800 mg de protéines d'arachides (3 arachides) en 9 escalades de doses espacées de 2 à 3 semaines, suivi d'un entretien à 800mg par jours jusqu'à la 26^e semaine de traitement. Dans le groupe traitement, des 39 sujets ayant atteint la dose de 800 mg d'arachides à la semaine 26, 24 ont toléré une provocation à 1400 mg de protéine d'arachide, comparativement à aucun dans le groupe contrôle. Le traitement était associé à une augmentation significative du score de qualité de vie, ainsi qu'à une légère réduction dans les tests cutanés et hausse des IgE spécifiques aux arachides.

Barrières d'implémentation cliniques à anticiper

Depuis la publication de ces études, certains groupes ont commencé à offrir l'immunothérapie orale en clinique en dehors de protocoles de recherche. Cette pratique demeure toutefois marginale. Dans un récent sondage, aux États-Unis, c'est 14% des répondants qui rapportaient offrir l'immunothérapie orale dans leur clinique (14), un pourcentage qui est fort probablement nettement surévalué par un biais de non-réponse considérable quand on considère le taux de réponse très bas à 10.1%. Du coup, le taux réel d'allergologues offrant l'immunothérapie orale se situe probablement près des 2%.

La réticence des allergologues à implémenter l'immunothérapie orale dans leur pratique malgré les études démontrant les hauts taux de succès en désensibilisation s'explique par plusieurs

facteurs. D'abord, contrairement aux extraits injectables ou aux comprimés sublinguales, il n'existe pas de forme standardisés d'aliments spécifiquement approuvée par la FDA ou Santé Canada et commercialisée pour la désensibilisation orale. La désensibilisation nécessite donc un investissement de ressources important pour la préparation de doses reproductibles. De plus, la désensibilisation s'associe invariablement avec un certain taux de réactions à domiciles dont il faut assurer la gestion.

Dans un contexte de système de santé privé comme aux États-Unis, principalement dicté par l'offre et la demande, la très forte demande des patients a fait que ces traitements sont couverts par la très grande majorité des régimes d'assurance. Au Canada et dans d'autres systèmes publics, la situation est tout autre, et toute ressource utilisée doit être justifiée et négociée avec les autorités locales et le ministère. Certains sujets peuvent prendre jusqu'à 3 ans pour atteindre leur doses d'entretien (46, 49). Durant ce temps, le suivi implique des visites régulières aux 2 semaines pour assurer la tolérance au traitement et augmenter les doses sous supervision médicale. Un système doit également être mis en place en dehors des heures d'ouverture pour supporter les patients avec les réactions pouvant survenir à domiciles avec la prise de dose quotidienne. Un laboratoire alimentaire doit être mis sur pied pour préparer et gérer les doses d'aliment dispensées aux patients. La période de désensibilisation, entre l'initiation de l'immunothérapie et l'atteinte des doses d'entretien est donc très couteuse à la fois pour le système et pour le patient et sa famille qui doivent s'absenter de l'école et/ou du travail pour les rendez-vous.

Chez les sujets avec allergies alimentaires multiples, qui nécessiteraient en théorie plusieurs traitements consécutifs, les ressources requises pourraient facilement doubler ou tripler selon le nombre d'aliments traités. En l'occurrence, c'est 30% des enfants avec allergie alimentaires qui

sont allergiques à plusieurs aliments (4, 50, 51). Cette proportion augmente à 70% quand on considère les cas les plus sévères (52). Les enfants avec allergies alimentaires multiples sont d'ailleurs à risque plus élevé de réactions accidentelles et/ou de déficits nutritifs (53). Ils souffrent également d'un impact plus important sur leur qualité de vie comparativement aux enfants mono-allergiques et présentent une propension plus faible à résoudre leurs allergies de façon spontanée (54, 55).

Au cours des deux prochains chapitres, nous présenterons des études publiées en 2014 dans le journal *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* visant à évaluer des approches d'immunothérapie orale modifiées pour augmenter l'efficacité du traitement chez les sujets avec allergies alimentaires multiples. Le chapitre III présente une première étude preuve-de-concept dans laquelle les sujets avec allergies alimentaires multiples suivent une immunothérapie orale à un mélange contenant jusqu'à 5 allergènes dans un ratio stochiométrique équivalent pour leur contenu protéique permettant leur désensibilisation simultanée. L'innocuité et l'efficacité de cette approche est comparée à une monodésensibilisation « standard » aux arachides. Le chapitre IV présente ensuite un protocole combinant cette approche à allergènes multiples à un traitement facilitateur d'omalizumab, un anticorps monoclonal anti-IgE approuvé dans le traitement de l'asthme allergique, permettant ainsi une augmentation drastique de la vitesse de désensibilisation dans cette population.

Chapitre III: Safety and feasibility of oral immunotherapy to multiple allergens for food allergy.

Philippe Bégin, Lisa C Winterroth, Tina Dominguez PA-C, Shruti P Wilson, Liane Bacal, Anjali Mehrotra, Bethany Kausch, Tony Trela, Elisabeth Hoyte, Gerri O’Riordan, Scott Seki, Alanna Blakemore, Margie Woch, Robert Hamilton, Kari C Nadeau.

Abstract

BACKGROUND: Thirty percent of children with food allergy are allergic to more than one food. Previous studies on oral immunotherapy (OIT) for food allergy have focused on the administration of a single allergen at the time. This study aimed at evaluating the safety of a modified OIT protocol using multiple foods at one time.

METHODS: Participants underwent double-blind placebo-controlled food challenges (DBPCFC) up to a cumulative dose of 182 mg of food protein to peanut followed by other nuts, sesame, dairy or egg. Those meeting inclusion criteria for peanut only were started on single-allergen OIT while those with additional allergies had up to 5 foods included in their OIT mix. Reactions during dose escalations and home dosing were recorded in a symptom diary.

RESULTS: Forty participants met inclusion criteria on peanut DBPCFC. Of these, 15 were mono-allergic to peanut and 25 had additional food allergies. Rates of reaction per dose did not differ significantly between the two groups (median of 3.3% and 3.7% in multi and single OIT group, respectively; $p = .31$). In both groups, most reactions were mild but two severe reactions requiring epinephrine occurred in each group. Dose escalations progressed similarly in both groups although, per protocol design, those on multiple food took longer to reach equivalent doses per food (median +4 mo.; $p < .0001$).

CONCLUSIONS: Preliminary data show oral immunotherapy using multiple food allergens simultaneously to be feasible and relatively safe when performed in a hospital setting with trained personnel. Additional, larger, randomized studies are required to continue to test safety and efficacy of multi-OIT.

TRIAL REGISTRATION: [Clinicaltrials.gov NCT01490177](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01490177).

Introduction

Food allergy is the leading cause of fatal and recurring anaphylaxis in children and teenagers in both Europe and the United States (56-58). The current standard of care is to practice strict avoidance of the food allergens and have injectable epinephrine readily available, in case of accidental exposure (56). Unfortunately, unintentional ingestion is a common occurrence (59).

Oral and sublingual allergen-specific immunotherapies have been proposed as possible methods of desensitization and, possibly, of induction of tolerance, with several prior studies having shown some success in using these approaches for single specific food allergens such as milk (23, 24, 26, 28, 60-62), egg (22, 23, 37, 39, 62), peanut (41-43, 63-65), and hazelnut (66). These monotherapies appeared relatively safe when conducted in a supervised and controlled setting, with severe reactions requiring epinephrine being rare.

Despite these promising results, there is lack of information regarding simultaneous administration of multiple foods within the same treatment. This is an important caveat considering that 30% of food allergic participants under 18 years old are estimated to be allergic to more than one food (4, 50, 51). This estimate has been reported to increase to 70% when considering highly atopic children (52). Compared to those with single food allergies, these participants experience a greater decrease in quality of life (55), are more likely to suffer from dietary deficiencies (53) and are less prone to spontaneously outgrowing their allergies (54).

Since OIT relies on allergen ingestion on a daily basis, mostly at home, the main concerns with simultaneous allergen administration are about safety. Previous studies using non-specific anti-IgE stimulation showed that binding of only 200 to 500 of the 250, 000 surface IgE molecules on a basophil are required to trigger degranulation (67). A concern is that administration of multiple allergens simultaneously would in theory result in an increased number of specific IgE molecules

being simultaneously bound and cross-linked on mast cells and basophils, increasing the risk of reaching this threshold. It is also unknown whether such an approach would affect treatment efficacy. One could hypothesize that immunologic responses and memory responses to each food would be allergen specific; however, synergic effects cannot be excluded.

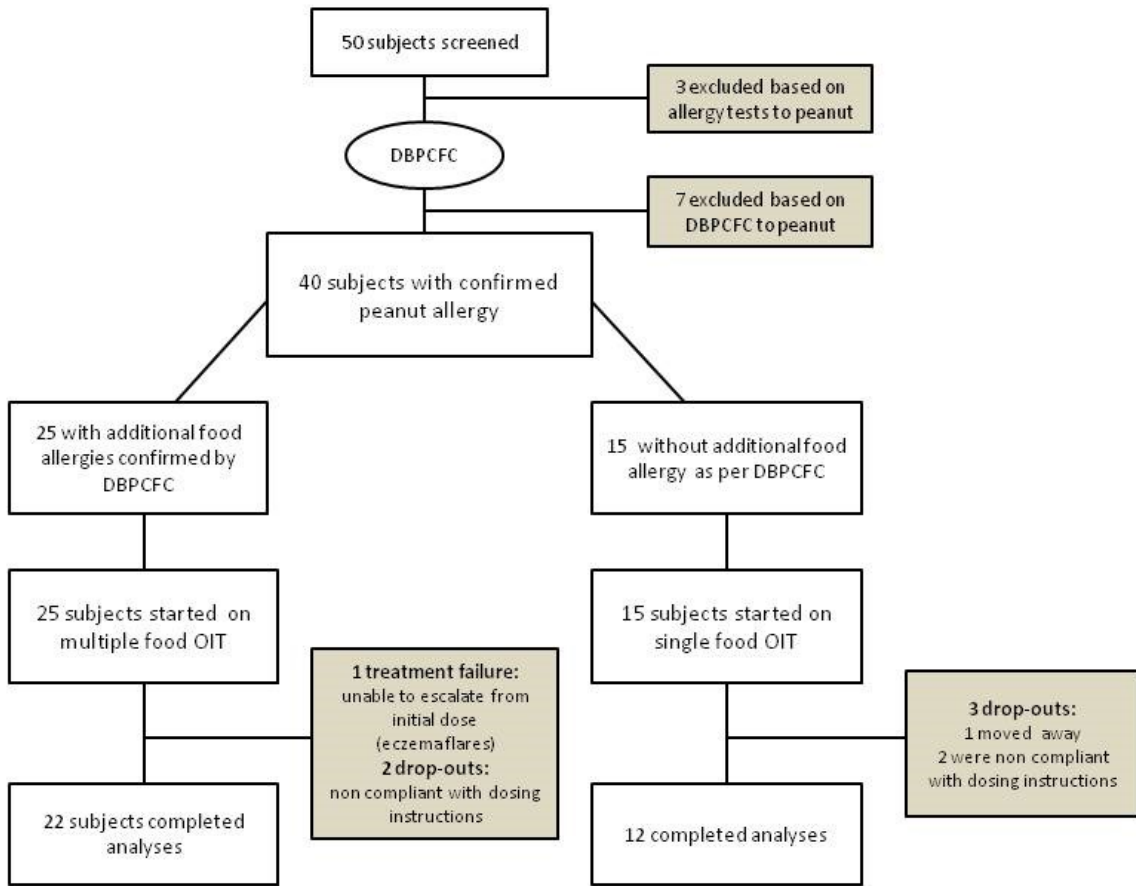
The primary endpoint (safety) of our investigation was the occurrence of allergic reactions throughout the course of the study, comparing food allergic participants with either peanut alone or multiple foods in their mix.

Methods

This phase 1 study was performed in a single center in a hospital setting with Institutional Review Board approval, under Investigational New Drug (IND) approval. Participant selection, study medication and design are described in the online supplement. Briefly, participants older than 4 years were eligible for inclusion if they had proven sensitivity to the food allergen documented by both a skin prick test greater than 7mm (wheal) and specific IgE greater than 2kU/L to peanut as well as positive allergic reaction in a double-blind placebo-controlled oral food challenge (DBPCFC) up to a cumulative dose of 182 mg as per Bock's criteria (68). Further DBPCFC were also performed following the same protocol to nuts, sesame seed, dairy or egg to document additional food allergies.

Participants who reacted only to peanut on their inclusion DBPCFC were assigned to the single OIT group while those who reacted to additional foods were assigned to multiple food therapy (Figure 3.1). The multi OIT regimen (up to five food allergens could be used) was customized to what the participant was found to be allergic to by DBPCFC. The OIT protocol for both groups (single OIT and multi OIT) consisted of three phases: (1) the initial escalation day (or modified rush day), (2) home dosing with biweekly visits for dose escalations and (3) the maintenance phase (Figure 3.2) which are detailed in the online supplement. Participants were instructed to take oral cetirizine (dosed as per each product insert) 1 hour before home doses. The primary goal of the OIT was to achieve a 10-fold increase from initial DBPCFC threshold. The dosing protocol was designed to continue dose increases up to a daily maintenance dose of 4000mg protein of each allergen (up to 20,000 mg cumulative dose for those on 5 allergens).

A



B

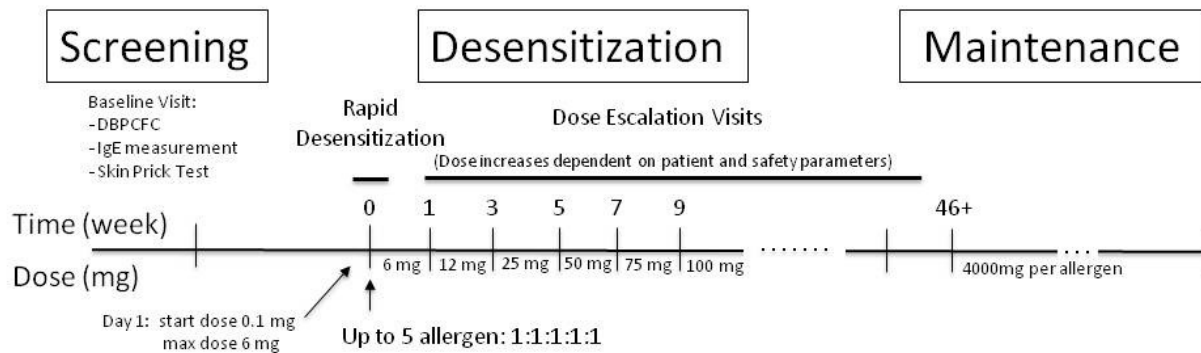


Figure 3.1: OIT trial design including (A) screening and trial flow chart and (B) immunotherapy protocol timeline. Amount of maintenance dose depends on number of allergen in mix (4000mg per allergen).

Serological analysis:

Sera at baseline and at 12 months were analyzed for food-specific IgE and IgG4 levels by immunoCAP FEIA (Thermofisher Scientific/Phadia, Kalamazoo, MI) when available. IgE antibody levels < 0.1 kU_A/L and IgG4 antibody levels < 0.01 kU_A/L were considered undetectable. IgE antibody levels between 0.1 and 0.35 kU_A/L currently have an undetermined clinical significance.

Statistical Analysis:

Clinical characteristics and safety data were compared between the groups using student T test for continuous and Pearson's chi-square for dichotomic variables. Dose progression was measured as time to reach 10-fold increase from initial cumulative dose eliciting a reaction on DBPCFC to peanut as well as doses of 300, 1000 and 4000 mg protein per food allergen. Groups were compared with Kaplan-Meier curves using the Breslow test. Changes in serologies were assessed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Results

A total of 40 participants ranging in age from 4 to 46 years met inclusion criteria on DBPCFC and were enrolled in an OIT protocol. Fifteen (15) with single peanut allergy documented by DBPCFC were assigned to peanut single OIT. The 25 remaining eligible participants received multi OIT for multiple allergens. Detailed allergen combinations in the multi group are available in the online supplement. Clinical characteristics of each group are compared in table 3.1. There were no statistically significant differences between the groups. Both groups were also comparable with regards to their peanut allergy SPT, specific IgE and DBPCFC results. Allergy evaluation results for other foods included in the multi group are shown in table 3.2.

There were no serious adverse events in the study. Over the study period, there were 5 drop outs for reasons which included non-compliance with study medication (n=4) and change of residence (n=1). One participant in the multi OIT group was unable to increase doses due to eczema flares that prevented initial escalation and was categorized a treatment failure (n=1). These participants were included in safety analyses but censored at the point where they were excluded. Overall, a total of 277 hospital escalation doses and 7,830 home doses were given in the peanut monotherapy group; while 603 hospital escalation doses and 12,030 doses were given to the participants receiving multi-allergen OIT. No more than 3 doses were missed consecutively by any one participant, based on dose diary review.

Most reactions to multiple food OIT doses were mild, with abdominal pain being the most frequently reported symptom, both in hospital setting and at home. Figure 3.2 and 3.3 presents symptom profiles per doses while Table 3.3 reports distribution of participants' individual reaction rates for each OIT phase, which did not differ significantly between both groups. Most participants

Table III-I : Baseline characteristics

	Multiple food allergy group	Single peanut allergy group
Number of participants	25	15
Median Age in yrs. (range)	8 (4- 25)	10 (5-46)
Male	14 (56%)	8 (53%)
Coexisting atopic disease		
Atopic Dermatitis	17 (68%)	8 (53%)
Allergic Rhinitis	13 (52%)	9 (60%)
Asthma	17 (68%)	10 (66%)
Baseline testing to peanut (median and range)		
SPT in mm	15 (5-25.5)	12 (7-22)
Specific IgE in kU _A /L	90.4 (2.43-100)	80 (3.66-100)
DBPCFC step eliciting symptoms (mg protein)	50 (0.1-100)	25 (1.6-100)
Symptoms upon peanut DBPCFC		
Skin	20 (80%)	12 (80%)
Upper airways	18 (72%)	12 (80%)
GI	17 (68%)	12 (80%)
Lower airways	6 (24%)	3 (20%)
Other food allergies meeting DBPCFC criteria for inclusion*		
Walnut	14 (56%)	N/A
Cashew	13 (52%)	N/A
Pecan	7 (28%)	N/A
Milk	7 (28%)	N/A
Egg	6 (24%)	N/A
Sesame	6 (24%)	N/A
Almond	5 (20%)	N/A
Hazelnut	3 (12%)	N/A
Number of food in mix		
2	6 (24%)	N/A
3	8 (32%)	N/A
4	5 (20%)	N/A
5	6 (24%)	N/A

Table III-II : Baseline allergy tests to other foods in multi-allergic group

Test	MEDIAN	RANGE
Walnut (n=14)		
SPT in mm	10	4-14.5
Specific IgE in ku/L	11.3	5.7-52.4
DBPCFC step eliciting symptoms (mg protein)	25	0.1-100
Cashew (n=13)		
SPT in mm	13	8.5-25.5
Specific IgE in ku/L	16.5	3.2-76.0
DBPCFC step eliciting symptoms (mg protein)	6	0.1-100
Pecan (n=7)		
SPT in mm	9	5.5-12.5
Specific IgE in ku/L	8.6	2.36-169.0
DBPCFC step eliciting symptoms (mg protein)	25	1.6-50
Milk (n=7)		
SPT in mm	18.5	5-20.5
Specific IgE in ku/L	11.3	3.6-39.1
DBPCFC step eliciting symptoms (mg protein)	50	25-100
Sesame (n=6)		
SPT in mm	12.5	10.5-37.5
Specific IgE in ku/L	23.8	7.1-65.6
DBPCFC step eliciting symptoms (mg protein)	50	6-100
Egg (n=6)		
SPT in mm	10.4	7.5-17
Specific IgE in ku/L	11.3	2.6-90.6
DBPCFC step eliciting symptoms (mg protein)	37.5	0.1-100
Almond (n=5)		
SPT in mm	5.5	3-12.5
Specific IgE in ku/L	2.45	1.1-3.7
DBPCFC step eliciting symptoms (mg protein)	25	6-100
Hazelnut (n=3)		
SPT in mm	18.5	14-21
Specific IgE in ku/L	26.1	13.4-39.1
DBPCFC step eliciting symptoms (mg protein)	25	25-100

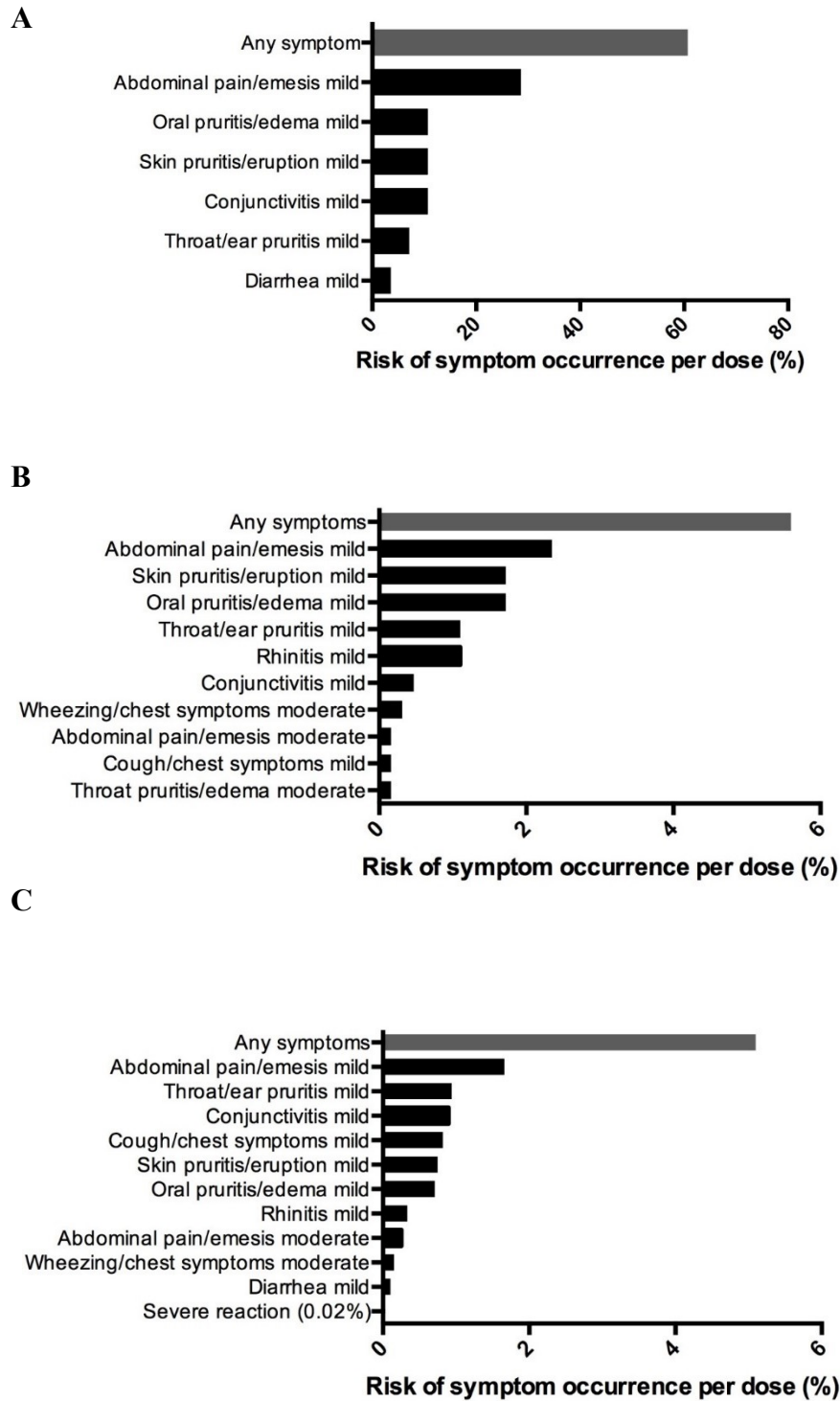
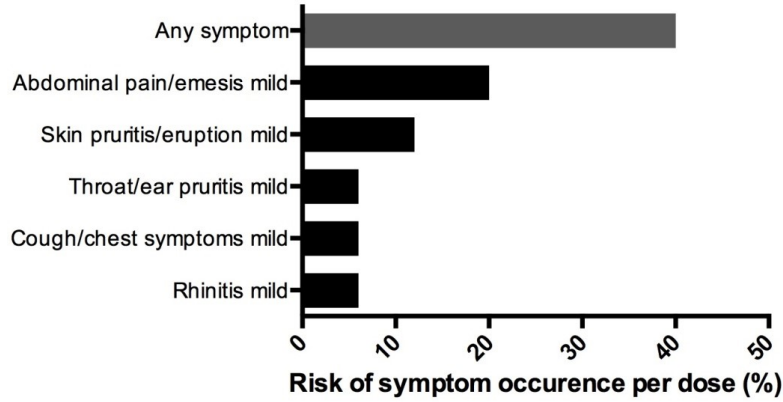
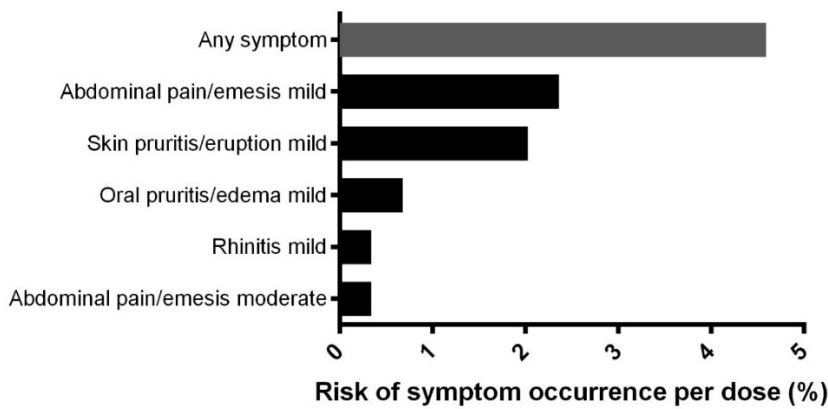


Figure 3.2. Reaction profile in multi-allergic participants. Symptom occurrence with (A) initial escalation day, (B) dose escalations and (C) home dosing during OIT to multiple foods.

A



B



C

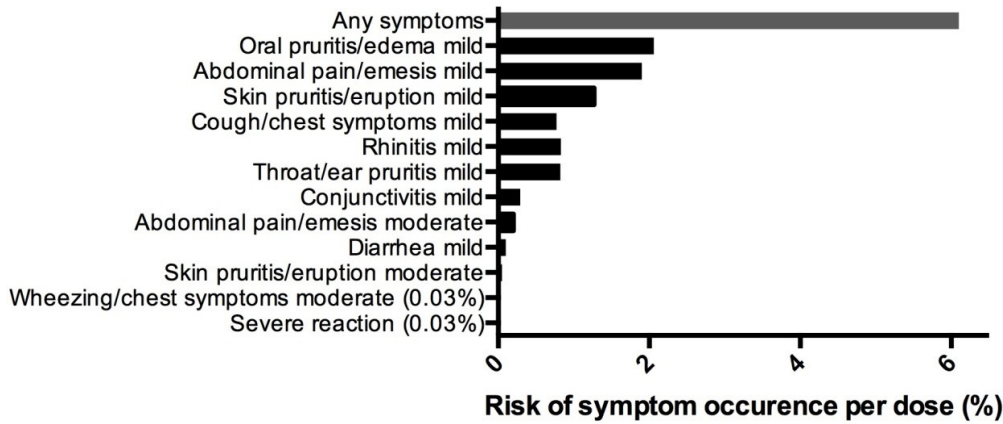


Figure 3.3 – Reaction profile in mono-allergic participants. Symptom occurrence with (A) initial escalation day, (B) dose escalations and (C) home dosing during OIT to multiple foods.

Table III-III: Reaction rates

	Multi (n=25)	Single (n=15)	p-value
Initial escalation day			
<i>Reactions (Reaction rate)</i>	15 (60%)	6 (40%)	.22
<i>Epinephrine use</i>	0	0	1.00
Dose escalations			
<i>Total doses</i>	603 doses	277 doses	
<i>Median reaction rate [range]</i>	3.4% [0-23.1]	3.7% [0-16.6]	.31
<i>Epinephrine use</i>	0	0	1.00
Home dosing			
<i>Total doses</i>	12030 doses	7830 doses	
<i>Median reaction rate [range]</i>	3.1% [0.6-29.2]	2.9% [0.1-59.0]	.65
<i>Epinephrine use (per dose)</i>	2 (0.02%)	2 (0.03%)	.67
<i>Epinephrine use (per participant)</i>	2 (8%)	2 (13%)	.62

experienced symptoms on the initial escalation day (60%) which were mild. Our data showed no statistical difference in adverse event rate or severity when comparing customized multi OIT regimens (i.e. there were not higher rates of allergic reactions with particular or with greater number of foods in mix). The only variable found to correlate with reaction rates and severity was to have had lower respiratory symptoms on inclusion DBPCFC ($p=0.017$). Interestingly, when looking at specific symptoms, while respiratory symptoms on DBPCFC were found to predict respiratory symptoms with dosing ($p=0.004$), such a correlation was not found for abdominal symptoms (table 3.4).

Of note, one patient in the single peanut OIT group reported frequent mild abdominal cramping with 369 of 630 home doses (59%) was not shown in figure 3. She was able to progress normally with dose escalations and these reactions eventually subsided while on maintenance.

Table III-IV: Predictors of reaction profile with multiple food OIT

	Overall reaction rate*		Lower respiratory symptoms		Gastro-intestinal symptoms		Moderate to severe symptoms	
	X ²	p	X ²	p	X ²	p	X ²	p
Reaction on screening DBPCFC								
Lower respiratory	5.62	.018	8.25	.004**	0.01	.91	5.7	.017
Gastro-intestinal	0.11	.75	.21	.65	0.11	.75	1.12	.29
Allergens								
Almond	1.44	.23	0.26	.61	1.44	.23	0.98	.32
Hazelnut	0.54	.46	3.47	.06	0.77	.38	2.41	.12
Pecan	2.28	.13	0.21	.65	4.20	.04	0.02	.90
Cashew	1.63	.20	2.40	.12	1.22	.27	0.19	.67
Walnut	0.17	.68	1.69	.19	3.38	.06	0.36	.55
Sesame	2.07	.15	0.26	.61	0.01	.91	0.98	.32
Milk	1.83	.18	0.92	.18	1.27	.26	0.28	.60
Egg	1.44	.23	2.33	.13	2.07	.15	0.98	.32
More than 3	0.83	.36	0.73	.39	1.72	.19	0.63	.43

*Reaction rate greater than 10%.

** significant when controlled for multiple analyses.

Two severe reactions requiring epinephrine occurred in each group. In the monotherapy group, one participant had abdominal pain and wheezing within 20 minutes of food allergen ingestion and was immediately treated with injectable epinephrine; symptoms resolved within 6 minutes of treatment. Another participant had urticaria and wheezing within 40 minutes of food allergen ingestion and was immediately treated with injectable epinephrine; symptoms resolved within 5 minutes of treatment. In the multi-allergen group, one participant had wheezing and angioedema around the eyes within 25 minutes of food allergen ingestion, and the reaction resolved within 3 minutes following administration of injectable epinephrine. The other participant on multi OIT with a severe reaction had abdominal pain, urticaria, and wheezing within 35 minutes of food allergen ingestion and was immediately treated with injectable epinephrine; symptoms resolved within 6 minutes of treatment.

Kaplan-Meier curves showing time to reach a 10-fold increase in threshold dose of food allergen protein, as well as time to reach a dose of 300 mg, 1000 mg and 4000 mg food allergen protein are presented in Figure 3.4. Participants undergoing monotherapy reached these 4 secondary endpoints significantly faster than those on multi-allergen OIT ($p=.004$, $p<.0001$, $p=.0007$, and $p=.005$, for respective outcomes) which was expected given each allergen represented only a fraction of the whole dose in the latter group. COX regression analysis showed no statistical difference in dose progression comparing number or combinations of foods in the OIT mix (data not shown).

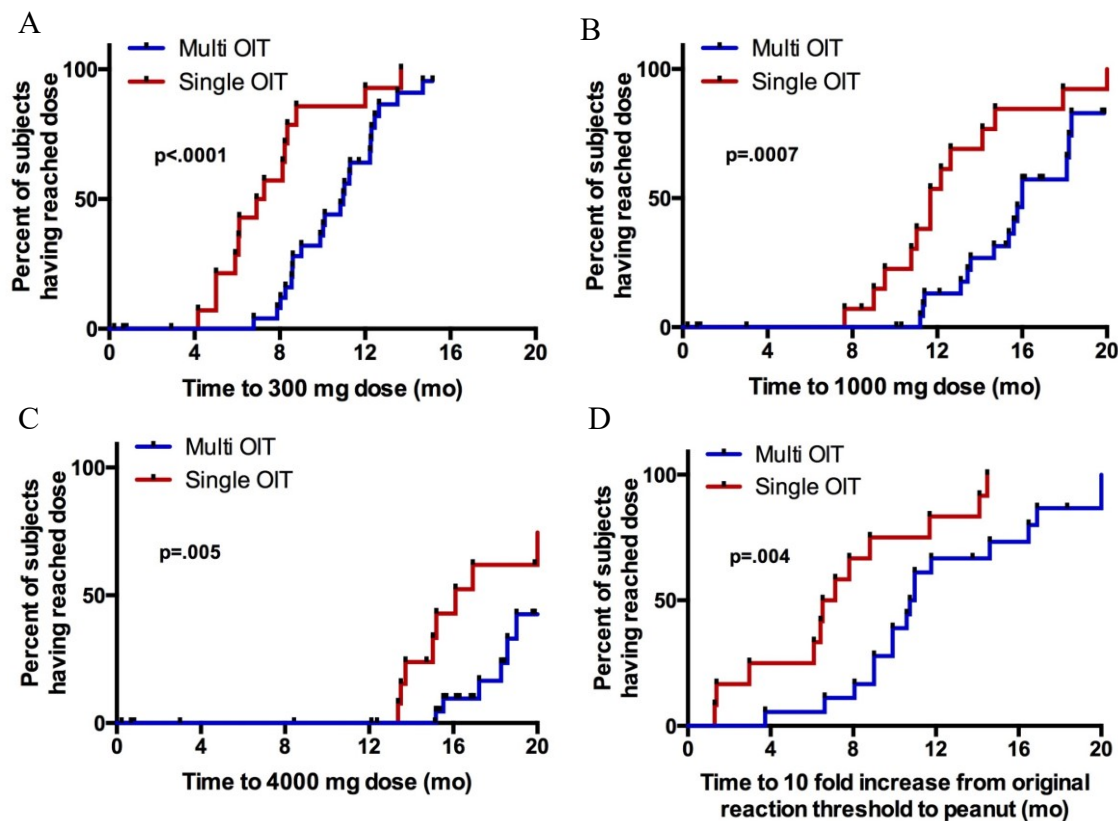


Figure 3.4. Kaplan-Meier curves showing time to dose of 300mg (A), 1000mg (B), and 4000mg (C) per allergen in mix. Panel D shows time to reach the dose corresponding to a 10 fold increase from the threshold at which the patient reacted to peanut on initial DBPCFC. P-values from χ^2 analysis were calculated using Breslow method.

One year into OIT, peanut-specific IgE remained unchanged in both groups while peanut specific IgG4 antibody increased significantly ($p=0.001$ and $p=0.008$ in multi and single OIT respectively) (Figure 3.5). Similar trends were found to other foods in the multi OIT group.

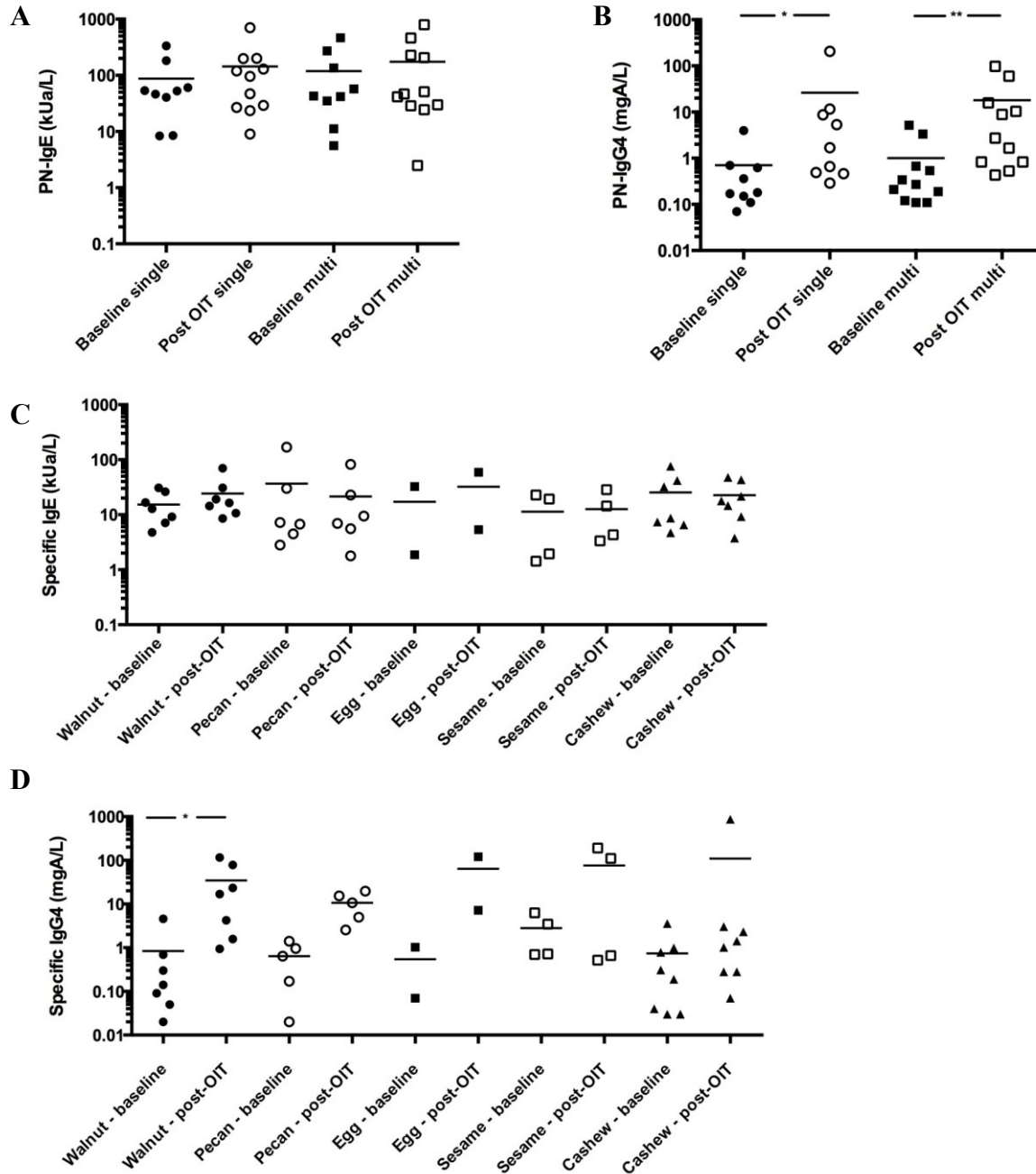


Figure 3.5. Comparison of food-specific IgE (A) and IgG4 (B) at baseline and after one year of OIT for peanut (panel A and B; $*p=0.001$; $**p=0.008$) and other foods (panel C and D; $*p=0.016$).

Discussion

In this phase 1 study, we have shown that participants allergic to multiple foods can be safely desensitized to up to five foods simultaneously using a modified OIT protocol. Despite the increasing interest in food OIT in recent years, the safety or efficacy of using multiple food flour/powder allergens in parallel has, to our knowledge, not been published. These findings are particularly relevant considering the already high and likely growing number of food allergic participants who are allergic to more than one food allergen (4, 50-52).

The multi OIT study was designed as a proof of concept, phase 1 study; therefore, safety measurements were the primary endpoint. The rate of reactions observed in the multi-allergen OIT group was within the acceptable range for an OIT study and was similar to a reference cohort of peanut mono-allergic participants undergoing the same protocol to peanut only. This supports the view that it is not the diversity or multiplicity of the food allergen binding surface IgE but rather the total dose of allergen administered that determines OIT reactions. However, this data should be viewed as proof of concept data until randomized, controlled, double-blinded phase 2 studies with larger sample sizes are performed.

In previous single OIT studies, overall reaction rates tended to vary, possibly due to differences in escalation protocols, allergens, selection of participants or use of anti-histamine pre-medication (22, 24, 26, 37, 61, 63, 64). However, severe reactions needing epinephrine injections have been consistently shown to be an occurrence, albeit rare, when performing OIT. In our study, 2 participants from each group required epinephrine during the study period. Although the number of allergens did not seem to increase the risk of severe reactions, this stresses that a state of continual vigilance is needed to perform OIT. As most reactions occurred at home (including those severe reactions requiring injectable epinephrine), participants and families should carry

reaction medications at all times and be educated on the proper use of injectable epinephrine and on the recognition of severe reactions that warrant its use. It is also important that the food doses be from a verifiable and reproducible source, that they be carefully measured and cross-checked by clinical staff and stored and dispensed from an appropriate facility.

Except for one participant who was excluded due to eczema flares and two drop-outs, all participants reached a 10 fold increase in their reaction threshold during the study period. The median time at which participants on single allergen OIT reached this dose was 14 weeks earlier than for those on the multi-allergen therapy. Participants undergoing multi-allergen OIT also took more time reaching the 300mg, 1000 mg and 4000 mg doses. This delay is to be expected since there were up to 5 food allergens given simultaneously and the dose for each individual food allergen was divided evenly. Importantly, this phase 1 study demonstrates that it is possible and feasible to test the effect of multi food allergen therapy simultaneously, rather than performing single immunotherapy in sequence for patients, a process that could take many years for patients who are multi-sensitized to food allergens.

Despite showing proper dose progression, our study did not prove treatment efficacy. To measure true clinical tolerance, participants would have to stop their maintenance dose and demonstrated sustained tolerance on a challenge after weeks to months of avoidance, which was beyond the scope of this study (69).

Serological analysis did show an increase in peanut-specific IgG4 similar to the monotherapy group. Peanut-specific IgE were stable after one year but this was not unexpected, as previous reports have shown that food specific IgE may start decreasing below baseline levels only after the first year of therapy (22, 24, 43, 44).

One limitation to this study was the absence of randomization. This said, this is not a requirement for phase 1 studies. The reference group used was included based on the same very strict inclusion criteria with regards to peanut allergy and had comparable clinical characteristics. We cannot rule out that their molecular sensitization profile could be different from multi-allergic participants that exhibit cross-reactivity with nuts as it was not tested. Regardless, these results show that OIT to multiple foods is at least as safe as peanut OIT in a single-allergic participants.

In conclusion, using a modified OIT protocol we have shown that simultaneous desensitization to multiple foods is feasible and worthy of further study. The reaction profile compared to that of peanut single-allergic participants undergoing monotherapy and participants showed comparable changes on serological examination. At this time, OIT should be considered an experimental treatment and should be conducted by trained research personnel in a hospital setting. Randomized, placebo-controlled phase 2 multicenter trials are needed to continue to determine safety and efficacy parameters of multi OIT in multi-allergic participants.

Supplemental methods

Participant selection:

This phase 1 study was performed in a single center in a hospital setting with Institutional Review Board (IRB) approval, under Investigational New Drug (IND) approval. Participants were recruited through advertisement at our institution's as well as local allergy clinics. They were screened for eligibility after signing informed consent at our research unit. They were eligible for inclusion if they: (1) were older than 4 years old; (2) had proven sensitivity to peanut documented by both a skin prick test (with neat extracts from Greer Laboratories, Lenoir, NC) greater than 7mm (wheal), PN-IgE greater than 2ku/L (ImmunoCAP) (70); and (3) had clinical reactivity proven by positive allergic reaction in a double-blind placebo-controlled oral food challenge (DBPCFC). Exclusion criteria included: (1) eosinophilic oesophagitis; (2) autoimmune or (3) severe cardiac diseases; chronic treatment with (4) beta-adrenergic antagonists or (5) steroids; (6) a history of severe anaphylaxis requiring admission to an ICU; (7) frequent allergic or non-allergic urticaria; and (8) poorly controlled asthma. DBPCFC was performed on separate days for each food and for the placebo. All participants performed spirometry as appropriate per age and had continuous pulse oximetry monitoring and vital signs checked, before and every 15 minutes after being given increasing doses of placebo (oat flour) or allergenic food protein. Doses were increased following the following scale over 4.5 hours up to a cumulative dose of 182 mg or until an objective reaction occurred. Reaction assessment was based on Bock's criteria and required skin or upper airway objective signs grade 2 or above; expiratory wheezing on auscultation or 15% decrease in FEV1; or at least one episode of emesis or diarrhea (68).

Table III-V: Dose progression on double-blind placebo-controlled challenges

Dose in mg of protein	Dosing interval in minutes
0.1	15
1.6	30
6	45
25	60
50	60
100	120

Study medication

This study used only food flours/powders permitted by *Food and Drug Administration* (FDA)-approved GMP guidelines in a phase 1 GMP facility for food allergens at Stanford University/Lucile Packard Children’s Hospital. A *Chemistry and Manufacturing Control* (CMC) section was written for each food allergen powder/flour to perform needed assessments for stability, identity, relative sterility, and purity of each of the food powder/flour. These food flours/powders include milk powder (Organic Valley, WI), egg powder (Deb El, NJ), peanut flour (Byrd Mill, VA), walnut flour (Carriere Family Farms, CA), cashew flour (Digestive Wellness, NY), almond flour (Just Almonds, NV), pecan flour (Green Valley, AZ), hazelnut flour (Holmquish Hazelnut Orchards, WA), wheat flour (Gold Medal, MN), soy flour (Honeyville Grain, Inc., UT), and sesame seed flour (Dispasa USA, Inc., TX). For each flour/powder, protein chemistry assays for stability and contamination testing were performed. Each dose was weighted out by a nutritionist on a professional-grade balance. Flour/powder protein content was calculated according to nutritional information provided by manufacturers.

Study design

Participants who reacted only to peanut on their inclusion DBPCFC were assigned to the single OIT group while those who reacted to multiple foods were assigned to multiple food therapy. The

multi OIT regimen (between two and five food allergens could be used) was customized to what the participant was found to be allergic to by DBPCFC. For example, if a participant had been through 6 DBPCFC's on separate days (a separate DBPCFC for cashew, sesame, soy, milk, wheat, and placebo; and was found to be allergic to cashew, sesame and soy by DBPCFC, then those three food flours were used in that participant's OIT regimen). Table 3.6 shows food combinations that were used in the multi-OIT group.

Table III-VI: Food combinations used in multi-allergic group

Number of foods in mix	Number of participants with mix	Food combination in mix
5	1	Peanut, Walnut, Cashew, Hazelnut, Sesame
5	1	Peanut, Walnut, Pecan, Sesame, Egg
5	1	Peanut, Walnut, Pecan, Cashew, Milk
5	1	Peanut, Walnut, Cashew, Sesame, Almond
5	1	Peanut, Walnut, Cashew, Hazelnut, Almond
5	1	Peanut, Walnut, Cashew, Pecan, Almond
4	1	Peanut, Walnut, Pecan, Hazelnut
4	1	Peanut, Walnut, Milk, Egg
4	1	Peanut, Walnut, Pecan, Cashew
4	1	Peanut, Walnut, Cashew, Sesame
4	1	Peanut, Sesame, Milk, Egg
3	3	Peanut, Milk, Egg
3	1	Peanut, Walnut, Pecan
3	1	Peanut, Walnut, Milk
3	1	Peanut, Pecan, Cashew
3	1	Peanut, Walnut, Sesame
3	1	Peanut, Walnut, Cashew
2	4	Peanut, Cashew
2	2	Peanut, Almond

The OIT protocol for both groups (single OIT and multi OIT) consisted of three phases: (1) the initial escalation day (or modified rush day), (2) home dosing with biweekly visits for dose escalations and (3) the maintenance phase. The primary goal of the OIT was to achieve a 10-fold increase from initial DBPCFC threshold. The dosing protocol was designed to continue dose

increases up to a daily maintenance dose of 4000mg protein of each allergen (up to 20,000 mg cumulative dose for those on 5 allergens).

Initial Escalation: On the initial escalation day, all participants were admitted to the Clinical Translational Food Unit (CTFU) where their doses were administered by trained clinical staff in a hospital setting, and antihistamines, inhaled beta-2 agonists, solu-medrol and epinephrine were all made readily available at the bedside. The initial dosing began at 0.1 mg protein of each of the offending food allergens (up to five) and doses were slowly increased until the participant reached a dose of 6mg protein (i.e. up to 1.2mg protein of each offending food allergen if the participant's regimen included 5 allergens, or 6 mg protein for a single allergen in monotherapy). Food allergens were given over a period of 3 hours. Participants were monitored every 15 minutes for vital signs and physical assessments throughout the dosing process and were observed for an additional 2 hours after receiving the final dose. The participant's starting daily dose was up to a total dose of 6 mg protein (divided evenly into each of the separate offending food allergen).

Table III-VII : Dose progression on initial day escalation

Dose in mg of protein	Dosing interval in minutes
0.1	30
0.2	30
0.4	30
0.8	30
1.5	30
3.0	30
6.0	120

Home dosing: Upon confirmation that the dose (up to 6 mg protein of total allergens) could be ingested safely without an allergic reaction, participants received their dose for the following two weeks to take home. Participants were told to ingest their dose after a full meal at approximately

the same time each day. Each food allergen was given simultaneously in applesauce or pudding (or another medium the participant had shown tolerance to during placebo challenge). They were instructed not to miss their daily dose. Participants were instructed to take oral cetirizine (dosed as per each product insert) 1 hour before home doses. Pre-dosing with loratadine was also recommended (as per each product insert) if patient reported abdominal symptoms. Participants and their families were given instructions on how to monitor for reactions at home and record any symptoms in their dosing diary. Research staff kept in close contact to proactively investigate any significant adverse events, and participants had 24-hour contact information for all study personnel in case of a significant reaction. All participants were provided with injectable epinephrine devices, oral antihistamines and a treatment plan for possible allergic reactions.

Dose Escalation: The participants returned to the CTFU every two weeks for a dose escalation visit with daily home diaries which detailed any symptoms that occurred and treatments given during the daily home dosing. Staff reviewed the dose diaries with the participants and their families at each visit. A physical examination was performed and asthma control was reassessed by spirometry. If home daily protein flour/powder doses had been well tolerated, the dose was increased in the hospital setting according to a standard scale (previously described in (22)).

Participants were monitored by trained clinicians in the CTFU for at least one hour following their new dose. If the new dose was tolerated, it became their daily dose for the following two weeks. Otherwise they continued on their previous dose. Thus, OIT did not advance according to a fixed calendar but rather was individualized according to participants' allergy safety outcomes. There was no limit to the number of attempts at a new dose. According to the investigators assessment, half increases (12.5%) were permitted, especially when external factors, such as environmental

allergies, affected the ability to perform a full up-dose. When a new regimen was not tolerated, it was decreased to the previously tolerated dose.

Table III-VIII: Dose progression with daily dosing

Dose in mg of protein	Interval in Weeks	% of Increase from previous
12 mg	2	100%
25 mg	2	108%
50 mg	2	100%
75 mg	2	50%
100 mg	2	33%
125 mg	2	25%
156 mg	2	25%
195 mg	2	25%
245 mg	2	25%
306 mg	2	25%
383 mg	2	25%
479 mg	2	25%
599 mg	2	25%
749 mg	2	25%
936 mg	2	25%
1,170mg	2	25%
1,463mg	2	25%
1,829 mg	2	25%
2,286 mg	2	25%
2,858 mg	2	25%
3,573 mg	2	25%
4,466 mg	2	25%
5,583 mg	2	25%
8,374 mg	2	25%
10,467 mg	2	25%
13,084 mg	2	25%
16,355 mg	2	25%
20,000 mg	2	22%

Chapitre IV: Phase 1 results of Safety and Tolerability in a Rush oral immunotherapy protocol to multiple foods using Omalizumab

Philippe Bégin, Tina Dominguez PA-C, Shruti P Wilson, Liane Bacal, Anjuli Mehrotra, Bethany Kausch, Antony Trela, Mory Tavassoli, Elisabeth Hoyte, Gerri O’Riordan, Alanna Blakemore, Scott Seki, Robert Hamilton, Kari C Nadeau

Abstract

Background: Up to 30% of patients with food allergies have clinical reactivity to more than one food allergen. Although there is currently no cure, oral immunotherapy (OIT) is under investigation. Pilot data have shown that omalizumab may hasten the ability to tolerate over 4g of food allergen protein.

Objective: To evaluate the safety and dose tolerability of a Phase 1 Single Site OIT protocol using omalizumab to allow for a faster and safe desensitization to multiple foods simultaneously.

Methods: Participants with multiple food allergies received OIT for up to 5 allergens simultaneously with omalizumab (rush mOIT). Omalizumab was administered for 8 weeks prior to and 8 weeks following the initiation of a rush mOIT schedule. Home reactions were recorded with diaries.

Results: Twenty-five (25) participants were enrolled in the protocol (median age 7 years). For each included food, participants had failed an initial double-blind placebo-controlled food challenge at a protein dose of 100 mg or less. After pre-treatment with omalizumab, 19 participants tolerated all 6 steps of the initial escalation day (up to 1250 mg of combined food proteins), requiring minimal or no rescue therapy. The remaining 6 were started on their highest tolerated dose as their initial daily home doses. Participants reported 401 reactions per 7,530 home doses (5.3%) with a median of 3.2 reactions per 100 doses. Ninety-four percent (94%) of reactions were mild. There was one severe reaction. Participants reached their maintenance dose of 4,000 mg protein per allergen at a median of 18 weeks.

Conclusion: These phase 1 data demonstrate that rush OIT to multiple foods with 16 weeks of treatment with omalizumab could allow for a fast desensitization in subjects with multiple food

allergies. Phase 2 randomized controlled trials are needed to better define safety and efficacy parameters of multi OIT experimental treatments with and without omalizumab.

Introduction

Up to 8% of the pediatric population suffers from food allergy and of those 30% have clinical reactivity to more than one food allergen (4, 71, 72). The estimated cost of food allergies in the U.S. every year is approximately 25 billion U.S. dollars, with most of the burden (~\$20 billion) borne by families themselves due to time lost from work, changing careers and emergency room visits (73). Compared to those with single food allergies, multi-sensitized subjects experience a greater decrease in quality of life (55), are more likely to suffer from dietary deficiencies (53) and are less prone to spontaneously outgrow their allergies (54).

Oral, sublingual, and epicutaneous allergen-specific immunotherapies have been proposed as possible methods of desensitization for foods. Several prior studies have shown some success in using these approaches for single specific food allergens such as milk (23, 24, 26, 28, 60-62, 74), egg (22, 23, 37, 39, 62), peanut (41-43, 63-65), and hazelnut (66). These current types of experimental treatments need to be tested for optimization in safety, efficacy, and length of time (75-83). Safety is of critical importance at all phases of any protocol (initial dose escalation day, dose escalation, and maintenance phases) and allergic reactions while on OIT remain to be an important feature in long-term follow-up studies and in determining the overall success of food allergen immunotherapy (30). However, one major limitation to the clinical application of current protocols is their use in participants with more than one food allergy, which would require multiple sequential rounds of immunotherapy over many years. We have recently reported that up to 5 allergens can be desensitized simultaneously without an increase in reaction rate when compared to single allergen desensitization (45). However this protocol remained time consuming with a median of 85 weeks to reach maintenance dose (range= 54-156).

The use of IgE immunomodulatory therapies, including monoclonal antibodies and small molecules, has been under investigation in food allergies and has been reviewed recently in the literature (84-92). Specifically, omalizumab has been shown to increase the threshold for adverse reactions on food challenge by up to 80 fold (88). After obtaining pharmacodynamic data using basophil assays and free IgE measurements in subjects with food allergies who received standard omalizumab dosing, we found that 8 weeks post standard omalizumab therapy is an optimal time to start oral immunotherapy (93, 94). This concept of rush immunotherapy with omalizumab was previously used in immunotherapy studies involving pollens, milk and peanut with promising results (77, 79, 95-99). Combined with food OIT, omalizumab is posited to increase dose tolerability, thus allowing for the possibility of a higher initial starting dose and faster treatment progression.

The objective of this trial was to study the safety and dose tolerability of a phase 1, open-label, rush OIT protocol, which included up to 5 foods simultaneously. The primary endpoint of our investigation was safety (i.e. the occurrence of allergic reactions throughout the course of the study). The secondary endpoints (i.e. tolerability) were i) the time to reach and maintain doses of 300mg, 1000mg and 4000mg per food allergen protein as well as ii) a 10 fold increase from the baseline reactivity threshold to each of the food allergen proteins.

Methods

This open-label, phase 1 study was performed in a single center hospital setting, with Institutional Review Board (IRB) and Investigational New Drug (IND) approvals.

Participant selection:

Participants were eligible for inclusion if they: (1) were older than or equal to 4 years old; had proven sensitivity to at least two food allergens documented by both (2) a skin prick test (with neat extracts from Greer Laboratories, Lenoir, NC) greater than 3mm (wheal), and (3) food-specific IgE greater than 0.35ku/L (ImmunoCAP); (4) had clinical reactivity to those food proven by positive allergic reaction in a double-blind placebo-controlled oral food challenge (DBPCFC) as described below; and (5) had signed informed consent. Specific food allergens that were eligible for inclusion in this trial included cow's milk, egg, peanut, nuts, grains and sesame seed. Exclusion criteria included: (1) eosinophilic esophagitis; (2) autoimmune disease; (3) severe cardiac disease; chronic treatment with (4) beta-adrenergic antagonists or (5) steroids; (6) a history of severe anaphylaxis requiring admission to an intensive care unit; (7) frequent allergic or non-allergic urticaria; and (8) poorly controlled asthma.

DBPCFCs were performed on different days and separated by 72 hours for each qualifying food allergen and for the placebo (oat). All participants performed spirometry, as appropriate per age, and had continuous pulse-oximetry and vital sign monitoring, every 15 minutes prior to and following increasing doses of placebo or allergenic food protein. DBPCFC doses were increased over 3.5 hours up to a cumulative dose of 182 mg food protein until an objective reaction occurred. Clinical reactivity was based on Bock's criteria (grade 1 or above) (68). The DBPCFC procedure was presented in the previous chapter (Table 3.5).

DBPCFCs and dose escalations occurred in a hospital with immediate access to a trained physician and study personnel. Frequent education and follow up processes were in place to discuss the use of reaction medications during allergic reactions with all participants and families/guardians as previously reported (45).

Study medications

Food flours/powders: This study used food flours/powders dispensed through a Food Flour/Powder GMP facility at Stanford (as per FDA guidelines (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070273.pdf>). A *Chemistry and Manufacturing Control (CMC)* section for each food allergen powder/flour included assessments for stability, identity, relative sterility, and purity of each of the food powders/flours. The food flours/powders we used include milk powder (Organic Valley, WI), egg powder (Deb El, NJ), peanut flour (Byrd Mill, VA), walnut flour (Carriere Family Farms, CA), cashew flour (Digestive Wellness, NY), almond flour (Just Almonds, NV), pecan flour (Green Valley, AZ), hazelnut flour (Holmquish Hazelnut Orchards, WA), wheat flour (Gold Medal, MN), soy flour (Honeyville Grain, Inc., UT), and sesame seed flour (Dispasa USA, Inc., TX). Each dose was weighed out by a trained professional on a professional-grade balance. Flour/powder protein content was calculated according to nutritional information provided by manufacturers and confirmed through protein assays run at Stanford laboratories.

Omalizumab: Omalizumab (Genentech, CA) was prepared and administered according to the product insert. Doses were determined based on weight and total IgE levels as per Omalizumab Global Dosing schedule as indicated in product insert.

Study design

Pre-treatment with omalizumab: After enrollment, participants (n=25) were pre-treated with omalizumab for 8 weeks according to the product insert dosing schedule to equilibrate with anti-IgE mAb (Figure 4.1). Omalizumab injections were administered at the hospital's Clinical Translational Food Unit (CTFU) under medical supervision and patients were observed for at least one hour after injection.

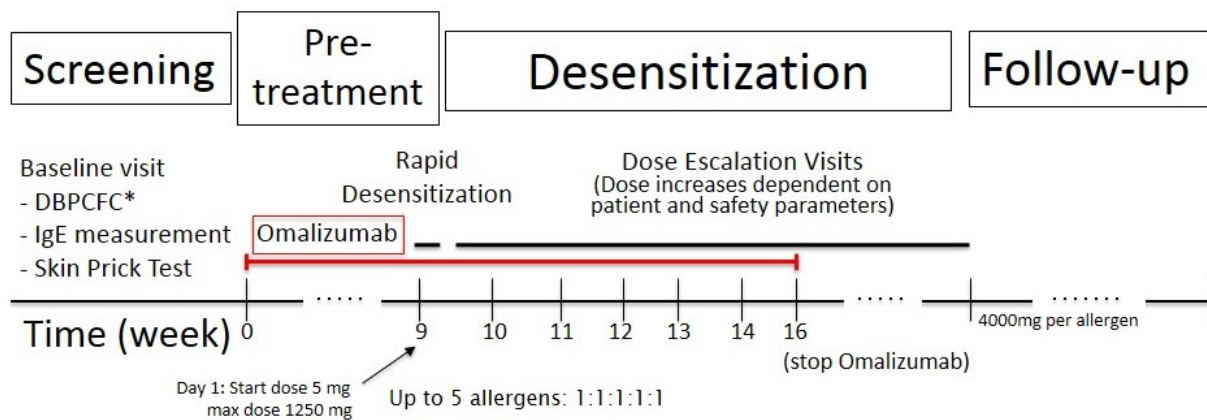


Figure 4.1: Rush mOIT protocol timeline. Amount of maintenance dose depends on number of allergens dosed (4000mg per allergen). *Double-blind, placebo-controlled food challenges (DBPCFCs).

Initial Escalation: On the 9th week after the 1st injection of omalizumab, the participants underwent rapid oral desensitization to up to five offending food allergens. The OIT regimen was customized to what the participant was found to be allergic to in their baseline DBPCFCs. As many as 5 allergens (in 1:1:1:1:1 proportions) could be included in an OIT treatment plan, provided all selected allergens met the inclusion criteria.

All participants were admitted to the CTFU (clinical trial food unit) and vital signs (heart rate, respiratory rate, temperature, blood pressure and pulse oximetry) were monitored every 15 minutes.

Trained clinical staff administered doses of food allergen. Antihistamines, inhaled beta-2 agonists, prednisolone, and injectable epinephrine were all readily available at the bedside.

On the initial escalation day, dosing began at 5 mg total food allergen protein divided equally between each of the offending food allergens (i.e. 1 mg protein of each allergen if 5 were given) and doses were slowly increased until the participant reached a final dose of 1250 mg protein (i.e. up to 250 mg protein of each offending food allergen if the participant's regimen included 5 allergens). Food allergens were given over a period of 2.5 hours as outlined in Table 4.1. Participants were monitored for vital signs and physical assessments throughout the dosing process and were observed for an additional 2 hours after receiving the final dose. The highest tolerated dose (i.e. with no clinical reactivity) determined the participant's starting daily home dose (up to a total dose of 1250 mg protein, divided evenly into each of the separate offending food allergens).

Table IV-I: Rush mOIT Initial Escalation Day Schedule

Dose in mg of protein	Dosing interval in minutes
5	30
50	30
150	30
300	30
625	30
1250	120

Home dosing: Individual doses were provided containing all of the participant's allergens. Participants were instructed to ingest their dose after a full meal at approximately the same time each day. Each food allergen was given simultaneously in applesauce or pudding (or another medium the participant had shown tolerance to during placebo challenge). They were instructed

not to miss their daily dose. Participants and their families were given instructions on how to monitor for reactions at home and record any symptoms in their dosing diary. Research staff kept in close contact with participants and families to investigate and document any adverse events. All families and participants had 24-hour contact information for study personnel in case of an allergic reaction and/or questions at any point during the study. All participants were provided with injectable epinephrine devices, oral antihistamines, and a treatment plan for possible allergic reactions. They were trained on the use of self-injectable epinephrine. Participants were instructed to avoid physical exertion 1 hour before and 2 hours after dosing and to contact the on-call service in the event of infection or environmental allergies. The goal of the OIT was to achieve a daily maintenance dose of 4000mg protein of each allergen (up to 20,000 mg protein cumulative dose for participants taking 5 allergens in their OIT).

Dose Escalation: The participants returned to the CTFU every two weeks for a dose escalation visit with daily home diaries, which detailed any symptoms that occurred and treatments given during the daily home dosing for the prior 2 weeks. Staff reviewed the dose diaries with the participants and their families at each visit. If home daily protein flour/powder doses had been well tolerated, the dose was increased in the hospital setting according to a predetermined scale as outlined in Table 4.2. Trained clinicians in the CTFU monitored participants for at least one hour following their new dose. If the new dose was tolerated, it subsequently became their daily dose for the following two weeks; otherwise they continued on their previous dose. Importantly, OIT protocols did not advance according to a fixed calendar, but, rather were individualized according to participants' allergic reactions and safety outcomes.

Table IV-II: Rush mOIT Dose Escalation Schedule

Dose of protein (mg)	Interval in Weeks	% of Increase from previous
2350 mg	2	88%
4000 mg	2	70%
5800 mg	2	45%
7600 mg	2	50%
9400 mg	2	30%
11200 mg	2	20%
14000 mg	2	25%
17500 mg	2	25%
20000 mg	2	14%

Omalizumab discontinuation: Omalizumab treatment was discontinued 8 weeks after the initial escalation day of food allergens, totaling 16 weeks total of omalizumab treatment.

Allergy testing

Peanut was the most frequent food allergen determined in the 25 participants (Table 4.3). Specific skin prick test (peanut extract from Greer Laboratories, Lenoir, NC) and serologies were compared at baseline and after a year of therapy. Sera were analyzed for peanut-specific IgE and IgG4 levels at John Hopkins Allergy and Clinical Immunology Reference Laboratory by immunoCAP FEIA (Thermofisher Scientific/Phadia, Kalmazoo, MI). IgE antibody levels < 0.1 kU_A/L and IgG4 antibody levels <0.01 kU_A/L were considered undetectable.

Statistical Analysis

Dose progression was measured as the time to reach: 1) a 10-fold increase from initial cumulative dose eliciting a reaction on DBPCFC to each food allergen; as well as doses of 2) 300mg; 3) 1000mg; and 4) 4000mg protein per food allergen. Food allergy testing results before and after

therapy were compared with the Wilcoxon paired T test. All analyses were performed using GraphPad PRISM software version 6.0b (GraphPad, LaJolla, CA).

Table IV-III: Food combinations in rush mOIT group

Number of foods dosed	Number of subjects	Food combination
5	1	Peanut, Egg, Pecan, Cashew, Almond
5	1	Peanut, Milk, Walnut, Pecan, Cashew
5	2	Peanut, Walnut, Pecan, Cashew, Hazelnut
5	1	Peanut, Milk, Egg, Cashew, Almond
5	1	Peanut, Milk, Egg, Walnut, Almond
5	1	Peanut, Milk, Egg, Pecan, Cashew
4	1	Peanut, Milk, Egg, Cashew
4	1	Peanut, Walnut, Pecan, Cashew
4	1	Peanut, Milk, Egg, Almond
4	1	Peanut, Milk, Walnut, Cashew
4	1	Peanut, Milk, Egg, Wheat
4	1	Wheat, Oat
4	1	Peanut, Milk, Egg, Almond
4	1	Peanut, Cashew, Walnut, Sesame seed
3	1	Peanut, Egg, Cashew
3	1	Walnut, Pecan, Hazelnut
3	1	Walnut, Pecan, Cashew
3	1	Walnut, Cashew, Almond
2	2	Milk, Egg
2	1	Egg, Wheat
2	2	Peanut, Cashew
2	1	Cashew, hazelnut

Results

Overall:

Of a total of 53 participants screened, 25 met inclusion criteria and were enrolled in the phase 1 protocol. Initial baseline clinical characteristics and number of allergens are presented in Table 4.4.

Table IV-IV: Subjects Baseline Characteristics

Number of Subjects	25
Median Age in yrs (range)	7.4 (4.5-15.4)
Male	19 (76%)
Clinical Reaction	
Respiratory	5 (20%)
Gastro-intestinal	13 (52%)
Epinephrine	1 (4%)
Number of Foods Dosed	
2	7 (28%)
3	4 (16%)
4	7 (28%)
5	7 (28%)
Peanut Baseline Allergy Test (if included in mix) (median and range)	
SPT in mm	13 (3.5-26)
Specific IgE in kUa/L	31 (1-192)
Lowest amount triggering reaction in DBPCFC in mg protein	15.5 (1.6-100)
Highest Baseline Allergy Test (median and range)	
SPT in mm	17 (6-29.5)
Specific IgE in kUa/L	66 (2-256)
Lowest amount triggering reaction in DBPCFC in mg protein	6 (0.1-100)

Over the study period, there were 3 withdrawals because of non-compliance with study medication. Overall, a total of 227 hospital-based dose escalation doses and 7,530 home doses

were given. Throughout the study, no participant missed more than 3 doses consecutively as recorded per their dose diaries.

Safety

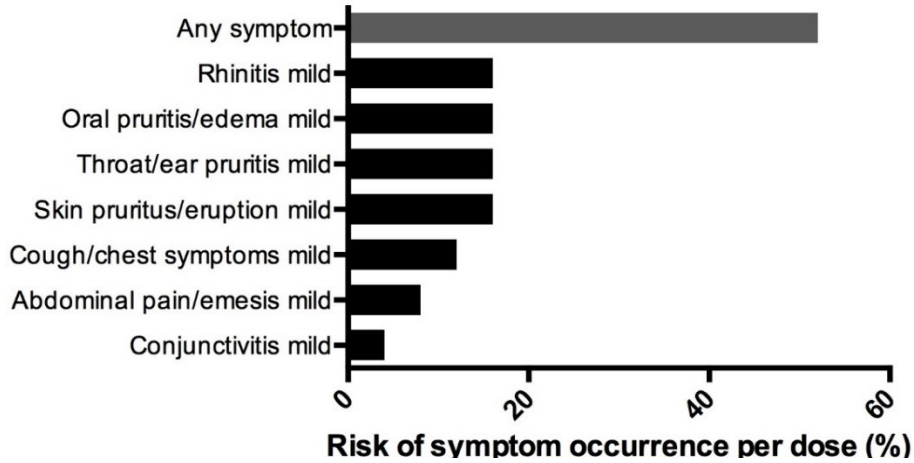
Rates and nature of dose reactions are depicted in Table 4.5 and Figure 4.2 for initial dose escalation day, dose escalations, and home dosing. Most (94%) allergic reactions were mild and included mainly abdominal pain, pruritus, and local ENT symptoms. Although 13 participants (52%) experienced some symptom on their initial dose escalation day, 19 (76%) were able to reach the full 1250 mg of food protein total. With home dosing, 401 of the 7530 doses (5.3%) triggered reactions with a median reaction rate of 3.2 per 100 doses [0.1-18.5]. Most home reactions occurred in the first months of therapy, with reaction rates dropping by 70% after 6 months of therapy, from 11 to 3 reactions per 100 doses ($p < 0.0001$).

Throughout the trial, there were no serious adverse events. One severe reaction occurred shortly after reaching maintenance phase (16,000 mg) in a participant desensitized to peanut, almond, milk and egg. He presented with wheezing, abdominal pain and throat tightness 30 minutes after his dose, which resolved 5 minutes after the self-injection of epinephrine. The family did not report any obvious triggers such as exercise or viral infection.

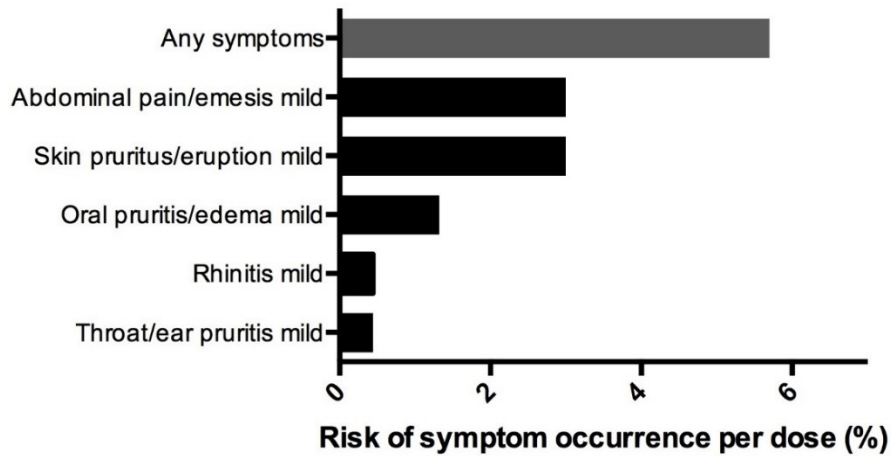
Table IV-V: Reaction Rates With Rush mOIT

Initial Escalation Day	
Escalations performed	25
Reactions	13 (52%)
Mild (Grade 1)	13 (52%)
Moderate (Grade 2)	0
Severe (Grade 3)	0
Epinephrine use	0
Dose Escalations	
Doses Administered	227
Reactions	13 (5.7%)
Mild (Grade 1)	13 (5.7%)
Moderate (Grade 2)	0
Severe (Grade 3)	0
Median reaction rate [range]	0% [0-25]
Epinephrine use	0
Home Dosing	
Doses Administered	7530
Reactions	401 (5.3%)
Mild (Grade 1)	385 (5.1%)
Moderate (Grade 2)	15 (0.2%)
Severe (Grade 3)	1 (0.01%)
Median reaction rate [range]	3.2% [0.1-18.5]
Epinephrine use	1 (0.01%)

A



B



C

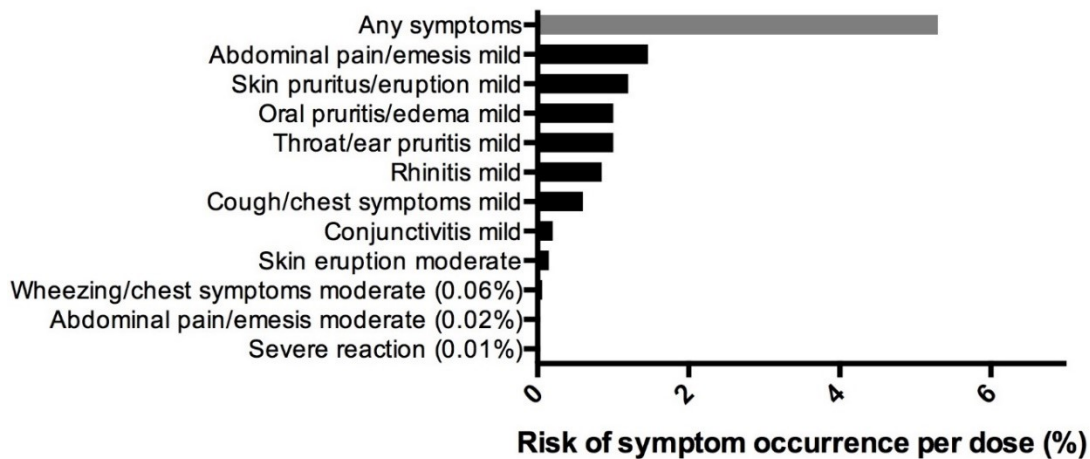


Figure 4.2: Symptom occurrence during rush mOIT with (A) initial escalation day, (B) dose escalations and (C) home dosing.

Dose Progression

As up-dosing was dependent on tolerance to the current dose, dose progression was treated as a marker of tolerability. Kaplan-Meier curves showing time to reach and maintain a 10-fold increase in threshold dose of index food allergen protein, as well as time to reach a dose of 300 mg, 1000 mg, and 4000 mg per food allergen protein are presented in Figure 4.3. The median time to reach maintenance dose (4000 mg per allergen) was 18 weeks [7-36 weeks] with all participants able to reach this dose by 9 months. All participants had reached a dose equivalent to a 10-fold increase of all their allergens by 2 months of therapy.

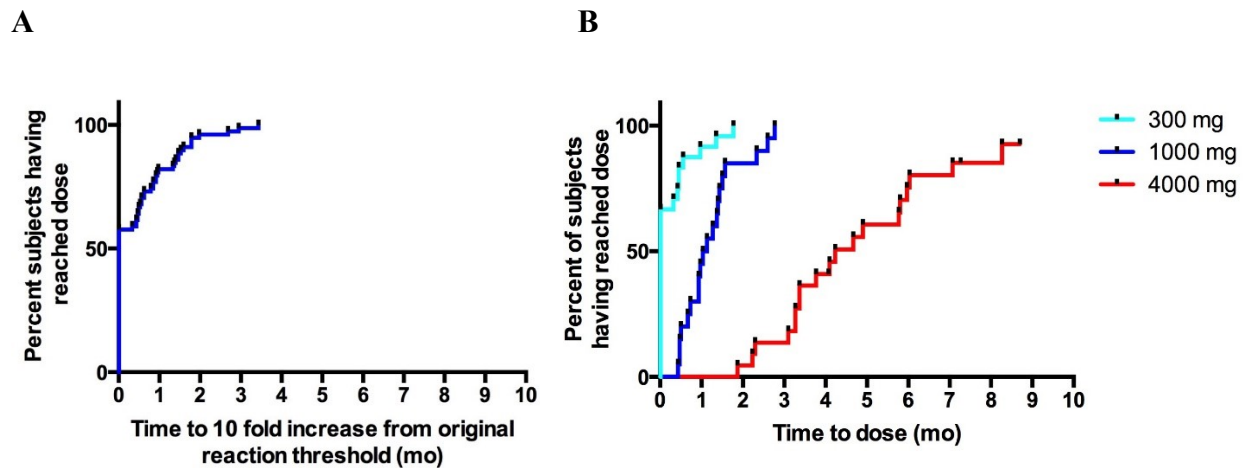


Figure 4.3. Rush mOIT Kaplan-Meier curves showing (A) time to reach the dose corresponding to a 10 fold increase from the threshold at which the patient reacted to index foods on initial DBPCFC (each food reported as a separate event) as well as (B) time to dose of 300mg, 1000mg, and 4000mg protein per each allergen.

Allergy testing

After 52 weeks of therapy, peanut-specific IgE (PN-IgE) did not change significantly (Figure 4.4). However, peanut-specific IgG4 (PN-IgG4) levels showed median increases of 8.23 mgA/L ($p < 0.0001$) while peanut SPT decreased by a median of 8 mm ($p < 0.0001$).

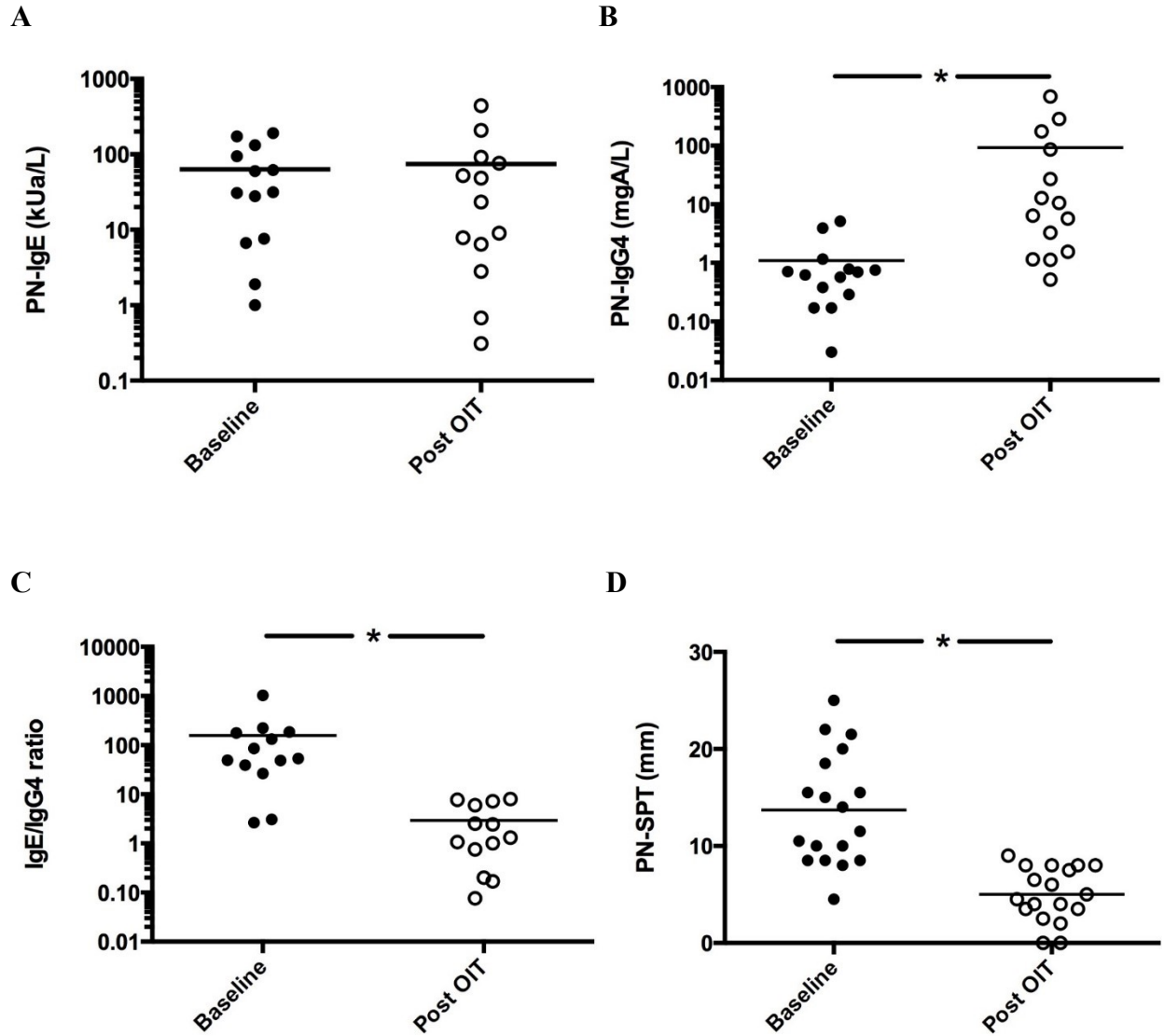


Figure 4.4. Changes in peanut allergy tests with rush mOIT. Peanut specific (A) IgE, (B) IgG4, (C) IgE/IgG4 ratio and (D) skin prick test results at baseline and after a year of therapy for participants with proven peanut allergy (* indicates $p < 0.0001$).

Discussion

In this phase 1 safety study, we have shown that participants allergic to multiple foods were safely and rapidly desensitized to up to five food allergens simultaneously, using a rush OIT protocol with concomitant treatment with omalizumab. To the best of our knowledge, this is the first study to use omalizumab with OIT to multiple allergens simultaneously. These findings are particularly relevant considering the already high (~30%) and likely growing number of food allergic participants who are sensitized to more than one food allergen (4, 50-52).

This study was designed as a proof of concept, open-label phase 1 study, with safety measurements as the primary endpoint. The rate of reactions observed in the rush mOIT group was similar to a group with the same eligibility and demographics undergoing mOIT in a previous study without omalizumab, despite the more rapid desensitization schedule (45). The goal of adding omalizumab in this phase 1 study was primarily to enable rapid desensitization rather than to suppress allergic symptoms during OIT.

As the half-life of omalizumab is 24 days, we further hypothesized that any protective safety effect might wane over time. Participants were observed closely for the development of symptoms, including hives, worsening of eczema, or wheezing after omalizumab discontinuation (at 8 weeks after initial dose escalation), and were instructed to keep a diary of food allergy symptoms throughout the study. Our data show that the home reaction rate actually went down after 24 weeks of therapy from 11 to 3 per 100 doses ($p < 0.0001$). This increase in safety could relate to the fact that participants were not up-dosing anymore at that point. However, the only use of epinephrine occurred shortly after the participant had reached the maintenance phase, thus vigilance should not be relaxed at any point. Rescue epinephrine was also required during the maintenance phase of

previous rush studies using omalizumab (2 of 2 and 1 of 4 in peanut and milk rush OIT respectively) (77, 99).

In addition to the safety data, this phase 1 study of rush mOIT provides initial preliminary evidence of increased dose tolerability. The median time at which participants on rush mOIT reached their maintenance dose (4000 mg per allergen) was 67 weeks earlier than that reported in a previous report on mOIT without omalizumab (45). This represents a difference of about 34 dose escalations and about 67 additional weeks of enrollment. This might be relevant from a pharmaco-economic perspective. Considering a cost per visit in 2013 of approximately \$160 [approximate cost of an office open food challenge per MediCare or public health insurance in Canada (RAMQ)], those 34 extra visits represent a minimal additional cost of approximately \$5,440 in 2013 (100)]. This could possibly offset the cost of omalizumab at the current time, which varies between \$2,164 and \$10,824 for 16 weeks, depending on the patient's weight and total IgE levels. Furthermore, these calculations do not take into account the additional cost and impact of absenteeism from school and work for the participant and his/her parents during these approximate 34 additional visits (73). However, one should be cautious when comparing these two phase 1 trials as the dose progression schedules were different. A phase 2 study comparing omalizumab to placebo in participants with a similar dosing schedule is needed to truly assess the efficacy gained from the addition of omalizumab to mOIT.

There are limitations to this study. Oral immunotherapy regimens were customized to the participant's food allergies. This has led to some diversity when comparing the composition of specific food allergies between subjects. However, no one food allergen was found to be associated with greater dose tolerability or safety. This is consistent with one of the key long term goals of the

study which was to begin to develop customized, patient-based, regimens for oral immunotherapy that could be tested for safety, and dose tolerability.

Serological analyses were performed for peanut to allow for consistent comparisons between participants, as this was the most frequent allergen. The serologic changes after 52 weeks of therapy were identical to those previously reported in subjects undergoing non-rush OIT (without omalizumab) (44, 45).

In conclusion, the data from a single site, phase 1 study, using omalizumab in a multi OIT regimen demonstrate that a rush OIT protocol to multiple food allergens using adjunct omalizumab can be performed safely in a hospital setting. The data show a possible advantage in time to maintenance over another phase 1 study performed by our site in participants with similar eligibility and demographic criteria in which mOIT was given without omalizumab. Although a phase 2 blinded, randomized study would be more optimal for comparison, the phase 1 studies and their data show preliminarily that rush mOIT can induce rapid desensitization (i.e. median of 18 weeks) as compared to mOIT without omalizumab (median of 85 weeks). At this time, rush mOIT is an experimental treatment and should be conducted by trained research personnel with immediate access to emergency equipment. Phase 2, blinded, multicenter trials are needed to continue to determine safety and efficacy parameters of rush mOIT in larger numbers of multi-sensitized participants.

Chapitre V : Revue de l'évaluation de la tolérance immunitaire en immunothérapie orale

Les études preuve-de-concept rapportées dans les chapitres III et IV s'intéressaient à l'innocuité de protocoles d'immunothérapie orale modifiées et à leur capacité à installer rapidement un état de **désensibilisation clinique** chez les sujets avec allergies multiples. Ces approches plus efficaces présentent un avantage, en particulier dans le contexte de soins de santé publics. Les taux de désensibilisation de 88% étaient comparables avec la littérature préalable. Cela dit, ces études ne mesuraient pas le taux d'induction de **tolérance orale soutenue**, qui constitue avec la question des ressources, une autre barrière importante à l'application clinique de l'immunothérapie orale.

Tolérance orale soutenue et immunothérapie orale alimentaire

La **désensibilisation clinique** consiste en l'état dans lequel le sujet allergique devient non-réactif à son allergène suite à une immunothérapie, tant et aussi longtemps qu'il poursuit l'exposition régulière aux doses d'entretien. Il s'agit d'un état considéré temporaire puisque si le sujet cesse son traitement d'entretien, la réactivité peut revenir. Tel que démontré dans le tableau 2.1, les taux de désensibilisations sont élevés avec l'immunothérapie orale.

La **tolérance orale soutenue** consiste en un état où le système immunitaire du patient a été modifié de façon permanente et dans lequel la réactivité à l'aliment ne revient pas avec l'arrêt du traitement. Cet état peut survenir après une exposition prolongée à de hautes doses de l'allergène. C'est ce qui se rapprocherait le plus à une guérison complète et permanente de l'allergie alimentaire. Seule une poignée d'essais cliniques rapportent les taux de tolérance soutenue obtenus avec l'immunothérapie orale. Ceci s'explique par le fait que pour évaluer celle-ci, les patients doivent

cesser leurs doses d'entretien et voir si la réactivité revient, et ainsi courir le risque de perdre de leur état de désensibilisation.

Les taux rapportés sont d'ailleurs très variables et dépendent probablement de plusieurs facteurs, comme l'aliment, la durée et la dose d'entretien et le temps d'évitement de l'allergène servant à déterminer la survenue de la tolérance. Dans l'étude de Staden et al, après 21 mois de désensibilisation suivi par 2 mois d'évitement, 36% étaient tolérant aux œufs et au lait, soit le même taux que le groupe contrôle (35%) (23). En contrepartie, l'étude de Burks et collègues, rapportait un taux de tolérance à 22 mois de traitement total de 28%, comparativement à 0% dans leur groupe placebo, suggérant une différence dans la sélection des sujets entre les 2 études (22). Keet et collègue ont comparé la tolérance soutenue suivant 3 bras de traitement au lait : traitement par gouttes sublinguales, immunothérapie orale à 1g de lait et à 2g de lait. Les taux de tolérance observés après 60 semaines de traitement et 6 semaines d'évitement étaient respectivement de 10%, 30% et 50% (30), ce qui supporte le concept que des doses d'entretien plus élevées peuvent induire de meilleurs taux de tolérance orale soutenue.

En ce qui a trait à l'induction de tolérance soutenue aux arachides, ici encore, les études montrent des résultats variables en fonction des protocoles. D'une part, Blumchen et al rapportaient un taux de tolérance soutenue d'à peine 13%, après un court traitement de 9 mois, avec une cible thérapeutique fixée à 500mg de protéine (environ 2 arachides) (43). À l'inverse, Vickery et al ont rapporté un taux de tolérance de 50% avec un traitement prolongé à haute dose (médiane de traitement de 5 ans avec une dose d'entretien de 4000mg de protéine d'arachide (101). Tang et collègue ont récemment rapporté un taux de tolérance soutenue de 82% avec un protocole

d'immunothérapie orale aux arachides combinés à la prise de probiotiques (48). Malheureusement, leur essai clinique n'incluait pas de bras d'immunothérapie sans probiotique et donc la contribution de cette intervention ne peut être établie. De plus, leur durée d'éviction de 2 semaines était relativement courte comparée aux autres études et pourrait avoir mené à une surestimation importante du taux de tolérance orale soutenue.

Enfin, ce qu'il faut également reconnaître, c'est que chez les sujets présentant un retour de réactivité après la période d'évitement, le seuil de réactivité à l'allergène est généralement tout de même plus élevé qu'au point de départ. Dans l'étude phare du NEJM de 2012 par Burks, on note qu'à 22 mois seulement 11 patients sur les 26 testés toléraient une provocation à 10g d'œuf après un arrêt strict du traitement pendant 4 à 6 semaines (22). Par contre, des 18 patients réagissant à la provocation post-éviction, 5 ont toléré une dose de 7.5g, 3 une dose de 3.5g, 5 une dose de 1.5g, 4 une dose de 0.5g et seul un patient a réagi à une dose de 0.1g, soit inférieure au critère d'inclusion dans l'essai clinique. Ces tolérances partielles pourraient s'expliquer par un état de désensibilisation résiduel (en quel cas en attendant plus longtemps on s'attendrait à voir ces niveaux chuter), par un fond de tolérance soutenue en processus d'acquisition, ou par un mélange des deux.

La principale limite à l'établissement de tolérance soutenue avec l'immunothérapie orale réside dans le fait que nos connaissances sur les mécanismes immunologiques soutenant son induction sont très incomplètes. Outre les études citées plus haut, la plupart des protocoles cliniques d'immunothérapie n'incluent pas systématiquement de test de tolérance en raison du risque de perte de désensibilisation jugé inacceptable pour le patient. Une meilleure connaissance des

mécanismes immunologiques sous-jacents pourrait permettre le développement de biomarqueurs identifiant les sujets tolérants de façon à ne pas avoir recours à la période d'évitement pur identifier les tolérants ou du moins à mieux cibler les candidats avant de l'offrir. Une meilleure connaissance de ces mécanismes permettrait également l'identification de cibles thérapeutiques pour des traitements adjuvants et possiblement une approche plus personnalisée à la réponse immunitaire du patient. De façon paradoxale, malgré que l'immunothérapie allergique ait été développée depuis plus de 100 ans, ces mécanismes sont toujours mal connus.

Mécanismes de tolérance orale

Le tractus digestif constitue la plus grosse interface du corps humain avec l'environnement extérieur (102). Chaque jour, il est exposé à des quantités très élevées d'antigènes. Dans la majorité des cas, ces antigènes sont inoffensifs (flore commensale ou antigènes alimentaires) et la réponse immunitaire résultante en est une de tolérance (103). À noter que la tolérance immunologique, n'est pas un processus passif, mais qui implique plutôt une suppression des réponses inflammatoires spécifiques aux antigènes. L'allergie alimentaire serait le résultat d'un défaut dans ce processus (102).

Après la digestion, les déterminants antigéniques persistants sur les protéines dénaturées, sont transférés de façon active au tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) par les cellules M ou drainés jusqu'aux ganglions lymphatiques mésentériques, où ils sont présentés par les cellules dendritiques résidentes aux lymphocytes T (102, 104). Le milieu digestif étant par défaut riche en TGF- β et en acide rétinoïque, principales cytokines inductrices de lymphocytes T régulateurs périphériques, la réponse normale aux antigènes alimentaires est l'induction de lymphocytes T régulateurs ayant un rôle de suppression immunitaire spécifique à leur allergène

(103, 105). L'exposition répétée à de très haute quantité d'un antigène peut également mener à l'anergie ou la délétion des lymphocytes T qui le reconnaissent (105).

L'allergie alimentaire serait le résultat soit d'une incapacité d'établir cette tolérance immunitaire au moment de l'exposition initiale ou d'une perte d'une tolérance préalablement établie. La réponse allergique se caractérise par l'établissement d'une réponse T auxiliaire de type 2 (Th2) avec la production des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13, qui induit à son tour une commutation isotopique des lymphocytes B spécifiques vers la production d'anticorps IgE spécifiques à l'allergène (106). Les IgE spécifiques ainsi produits sont distribués de façon systémique et se fixent à la surface des mastocytes des muqueuses et de la peau et des basophiles dans le sang. Lors des réexpositions subséquentes l'allergène, les basophiles et les mastocytes sont immédiatement activés, relâchant leurs granules d'histamine, responsable de la réactivité aiguë à l'allergène.

Changements immunologiques associés à l'immunothérapie allergène-spécifique

Changements effecteurs

Le premier effet immunologique noté avec une immunothérapie est une augmentation du seuil de réactivité des basophiles à l'allergène désensibilisé. Ce changement apparaît dans les premières heures et/ou journées de la désensibilisation et progresse avec l'augmentation des doses. Ce changement est un reflet direct de l'état de désensibilisation temporaire plutôt que d'une réelle tolérance orale. Ce phénomène peut d'ailleurs être reproduit ex vivo en exposant des basophiles ou des mastocytes à des doses progressive d'allergènes (107). L'administration initiale de doses minimales entraînerait une occupation insuffisante des IgE spécifiques par l'allergène pour induire

une dégranulation. Les IgE de surface spécifiques ainsi occupés seraient possiblement internalisés progressivement de façon à ce que la cellule ne réagisse plus lors d'une stimulation directe (107). Avec l'arrêt du traitement, les IgE internalisés seraient soit réexposés à la surface ou remplacés par de nouveaux IgE circulants, avec un retour de la réactivité. La mesure de la réactivité des basophiles sanguins, facilement accessibles comparativement aux mastocytes tissulaires, a montré une bonne corrélation avec le risque de réaction clinique, mais ne permet pas de différencier les sujets simplement désensibilisés de ceux réellement tolérants à leur allergène (108). Leur utilité se situerait donc plutôt comme indicateur de risque de réaction à domicile avec le traitement.

Changements humoraux

Les changements au niveau de la réponse adaptative humorale sont généralement apparents après 6 mois de traitement. À ce moment, on voit une augmentation paradoxale des IgE spécifiques à l'allergène, qui redescendent pour atteindre les taux de départ à un an, puis continueront à diminuer au cours des mois et années subséquentes (42).

Au même moment à 6 mois, on voit apparaître une population d'anticorps de type IgG4 spécifiques pour le même antigène, mais pas nécessairement les même épitopes, suggérant des clones B distincts. Ces IgG4 vont augmenter de façon continue avec le traitement. Notamment, dans l'étude phare parue dans le NEJM, à 10 mois, les taux d'IgG4 spécifiques corrélaient avec le niveau de désensibilisation et prédisaient celle de 22 mois et la tolérance soutenue à 24 mois (22).

L'importance de ces changements, surtout la hausse des IgG4, demeure inconnue. En fait, la question est à savoir si ces anticorps IgG4 ont un rôle direct dans la tolérance clinique ou s'il s'agirait plutôt d'un épiphénomène, reflétant un changement de la réponse cellulaire qui, elle, serait plus significative. Les IgG4 sont un isotype d'anticorps particulier, dénués de fonction

activatrice et qui pourraient jouer un rôle de blocage compétitif avec les IgE (109). En contrepartie, des études récentes chez les modèles murins montraient que le phénotype allergique n'était pas guéri par l'éradication des lymphocytes B ni transférable par les lymphocytes B (110). Le phénotype était en revanche transférable par les splénocytes suggérant que les lymphocytes T soit le véritable siège de la mémoire allergique.

Changements cellulaires

Le défi avec l'analyse de la réponse adaptative cellulaire réside dans la nature de l'interaction entre les récepteurs TCR et leur cible. Alors que les anticorps reconnaissent directement les déterminants antigéniques sur leur allergène-cible, les TCR ne peuvent reconnaître que les peptides présentés sur des complexes majeurs d'histocompatibilité. Ainsi, contrairement aux anticorps, on ne peut pas identifier les lymphocytes T spécifiques par leur simple affinité pour l'antigène seul. La technique indirecte qui a donc été développée pour mesurer la réponse cellulaire à un antigène spécifique est le test de prolifération lymphocytaire.

Le test de prolifération lymphocytaire consiste à mettre en culture les cellules mononucléées du sang périphériques du sujet en présence de l'antigène testé. L'antigène sera alors présenté aux lymphocytes T par les cellules dendritiques et monocytes en culture. À l'aide d'un marqueur de division cellulaire, les lymphocytes T ainsi activé et proliférant peuvent être identifiés et caractérisés par marquage de surface et intracytoplasmique en cytométrie de flux.

De façon plutôt consistante, le test de prolifération lymphocytaire montre une diminution de la prolifération cellulaire en réponse à l'allergène désensibilisé dans le cadre d'une immunothérapie orale. Également, mais de façon moins consistante, on observe une diminution de la proportion

de lymphocytes T CD4 exprimant les facteurs Th2 (IL-4, IL-13) et une augmentation de ceux exprimant les facteurs Th1/Tr1 (INF-g et/ou IL-10). Une augmentation, souvent transitoire, de la proportion de lymphocyte T exprimant le de transcription FOXP3, caractéristique des lymphocytes T régulateur est également parfois rapportée.

Ainsi, il est évident que l'immunothérapie induise des changements au niveau de la réponse adaptative cellulaire. Cependant l'interprétation des changements observés lors d'épreuves de prolifération lymphocytaire pourrait être biaisée par la nature même de ce test de laboratoire qui présente plusieurs limites qui peuvent en fausser l'interprétation.

D'abord, la prolifération des cellules elle-même peut induire des changements au phénotype qui en brouille l'interprétation. L'expression de FOXP3 en est un bon exemple. Ce facteur de transcription est caractéristique d'un phénotype régulateur, mais il est également exprimé à de haut niveau chez les cellules activées, tel dans une épreuve de prolifération (105).

Ensuite, le test de prolifération ne permet pas de suivre les clones à travers le temps puisqu'il s'agit toujours de changement observé sur une population hétérogène de lymphocytes T. Il est donc impossible de tirer des conclusions mécanistiques en ce qui a trait au devenir des populations Th2 qui diminuent. Sont-elles supprimées et remplacées par des lignées Th1/Tr1 distinctes ou persistent-elles après avoir été rééduquées pour exprimer un nouveau profil de cytokine? Cette question est primordiale pour le développement de traitements adjuvants ou de nouvelles thérapies cellulaires visant à favoriser l'induction d'un état de tolérance orale soutenue.

Enfin, des doutes ont été soulevés quant à la spécificité de la réponse identifiée grâce à l'épreuve de prolifération cellulaire. En effet, dans les études portant sur les sujets allergiques au pollen ont montré que les cellules identifiées par prolifération lymphocytaire aux allergènes de pollen étaient en très grande majorité des lymphocytes Th1, avec une minorité de Th2 (<5%), ce qui suggère que le test ne mette pas en évidence la population pathologique souhaitée. D'ailleurs le même groupe a utilisé la nouvelle technologie des tétramères MHC couplés aux peptides d'allergènes pour identifier les lymphocytes T réellement spécifiques à cet antigène. Ils ont montré que moins de 3% des lymphocytes T prolifératifs étaient spécifiques au pollen, suggérant une importante composante de prolifération non-spécifique qui contaminerait cette épreuve de laboratoire (111).

Le prochain chapitre a récemment été publié dans le *Journal of Allergy and Clinical Immunology* sous forme de communication courte. Dans cette étude, nous avons eu recours aux nouvelles technologies de séquençage des TCR à haut débit maintenant disponibles de façon commerciale pour analyser la clonalité de la fraction proliférative lors d'épreuve de prolifération lymphocytaire aux arachides chez des sujets ayant suivi une immunothérapie orale incluant cet aliment, dans le but d'investiguer, d'une part, la spécificité de cette approche pour évaluer la réponse cellulaire des patients aux arachides et, d'autre part, l'évolution des lignées clonales avec le traitement.

Chapitre VI: Changes in peanut-specific T-cell clonotype with oral immunotherapy.

Philippe Bégin and Kari C Nadeau

Allergen proliferation assays are widely used to determine allergen-specific changes in T cell phenotype during immunotherapy, generally showing skewing of the pathological Th2 response toward a normal Th1 or T regulatory response (112, 113). Concerns have been raised, however, about the actual specificity of this approach, which often leads to the identification of very high rates of Th1 cells (114). Another question that has yet to be elucidated is whether the observed changes result from a reprogramming of existing allergen-specific clones (reeducation hypothesis) or from their replacement by different clones to determine the dominant response (replacement hypothesis).

To address these questions, we undertook the next-generation sequencing of peanut-proliferative TCR β in subjects undergoing oral immunotherapy (OIT) for their peanut allergy (see online supplement for detailed methods). Briefly, blood was drawn from six subjects with DBPCFC-proven peanut allergy aged between 5 and 13 at the 0, 9, and 18 month time points. Three were on a strict avoidance diet while the three others underwent a combination omalizumab and OIT therapy protocol for their peanut allergy as previously described (96, 115). PBMCs were cultured for 7 days in presence or absence of endotoxin-free whole peanut extract (Figure 6.1).

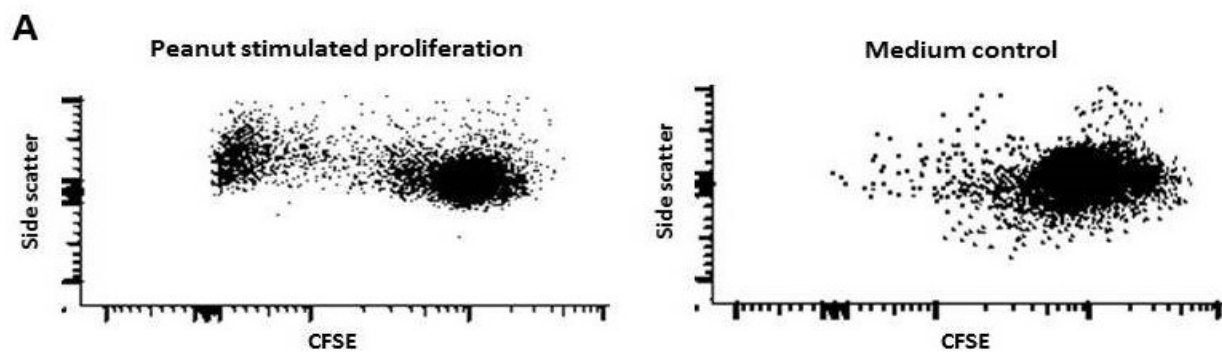


Figure 6.1: CD4⁺ T cell gate after staining with proliferation dye and 7 days of culture in the presence or absence of peanut extract. Peanut-proliferative T cells were identified as CFSE^{lo} and sorted for further analysis.

TCR β sequencing was then performed on CFSE^{lo} peanut proliferating CD4⁺ T cells using the ImmunoSeq platform (Adaptive Biotechnologies, Seattle, Wash) at the “survey” level of sequencing depth (116) and changes in clonal distribution were assessed and compared to the unstimulated whole T cell repertoire.

Peanut-responsive T cells were found to be extremely diversified, with a median of 7395 clones identified within the proliferating fraction of subjects’ baseline PBMC samples, for a median clonality of 0.10 (definition in supplemental methods) (Table 1). However, most of these clones were not consistent over time, as only 6% were still identified at the following time point, regardless of treatment group. This said, these intersecting clones had a relatively high representation within the proliferating fraction, making up for close to 20% of all proliferating T cells. Of this persistent T cell fraction, 88% was further identified at the third time point (range 85 to 92%) confirming that this co-occurrence was not simply due to a random overlap of sample repertoires.

While these persistent clones would appear to be the relevant population to test, it is intriguing that they represent such a small proportion of the whole allergen-proliferating fraction. Performing the assay with pure peanut peptides Ara h 2 or with tetanus toxoid resulted in a similarly low clonality (Table 1), suggesting antigen quality was not the issue. A similar concern was recently raised in a study comparing the allergen proliferation assay to a MHC-tetramer approach in the evaluation of mugwort allergy. The authors found that allergen-stimulated CFSE^{lo} CD4⁺ T cells contained only 0.3-10.7% of Art v1-tetramer⁺ T cells and very low proportions of Th2 cells suggesting an extremely high Th1 bystander proliferation (114).

Table VI-I: Diversity and persistence of TCR β clones in unstimulated and antigen-stimulated T cells from peanut allergic subjects

	Number of clones†		Clonality†		Persistent clones*	Persistent T cell fraction*
	Median	Range	Median	Range	Median (range)	Median (range)
Unstimulated T cells	101458	31,483-209,281	0.04	0.03-0.06	C : 6.0% (4.7-7.3) T : 7.8% (7.0-8.1)	C : 16.2% (16.0-16.5) T : 16.8 (15.2-16.9)
Peanut-proliferating T fraction	7395	1852-42,395	0.10	0.03-0.19	C : 6.7% (5.7-7.1) T : 5.5% (5.0-6.4)	C : 20.8% (8.8-35.0) T : 18.2% (16.8-19.7)
Tetanus-proliferating fraction	7775	6804-15,878	0.07	0.05-0.11	N/A	N/A
Ara h2 proliferating fraction	11,136	8832-15,227	0.06	0.04-0.08	N/A	N/A

†Number of clones and clonality from baseline samples; *Percent of individual clones or fraction of T cells from baseline which was consistently identified at the following time point (9 months). C: Control group on avoidance; T: Treatment group on OIT. Differences between the two groups are not significant.

One hypothesis to explain this bystander proliferation would be that the bystanders represent naïve T cells, which tend to proliferate despite low antigen affinity, as opposed to memory T cells which show robust response to high affinity antigens only (117). The naïve repertoire is much more diverse than its memory counterpart (up to 10^8 compared to 10^6 clones in healthy individuals) (118). When comparing immediately repeated blood draws at the “survey” level, concordance of naïve repertoire was very low (4.5% TCR overlap, $R=0.321$) compared to the memory compartment (47.5% TCR overlap, $R=0.861$) (Figure 6.2).

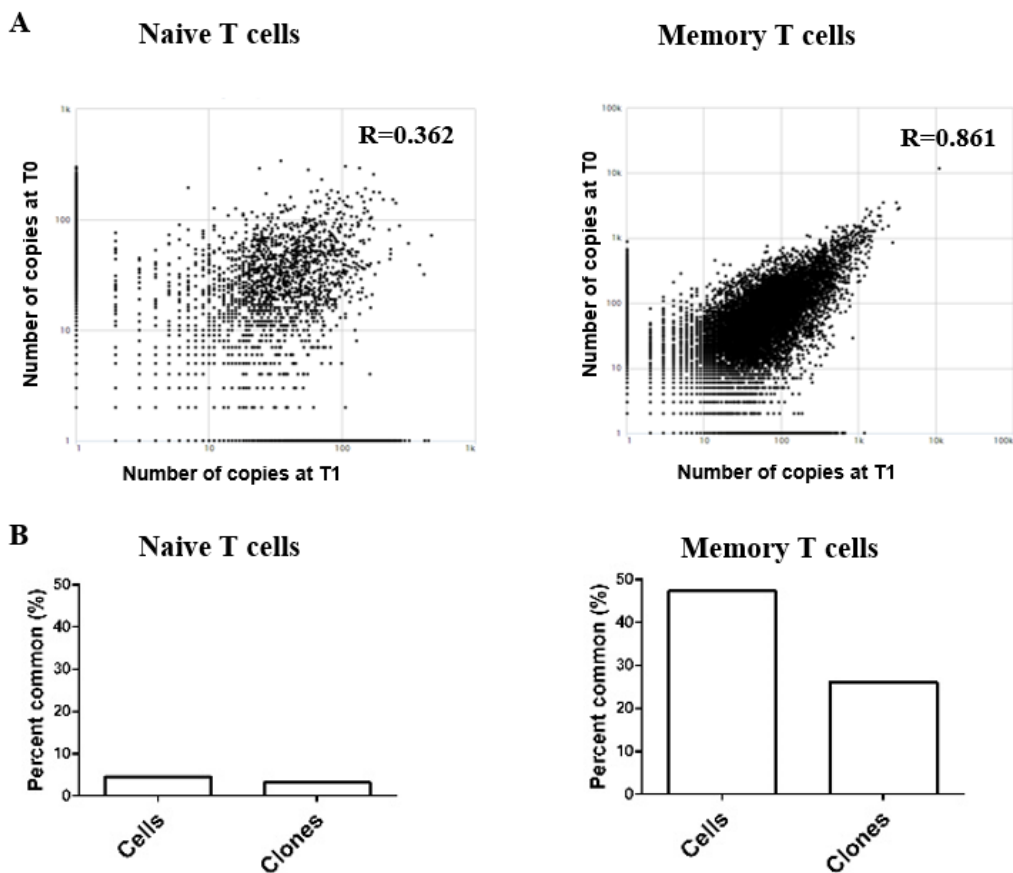


Figure 6.2: TCR repertoire overlap on immediately repeated blood sample. Panel A shows dot plots comparing TCR clone frequencies on two immediately subsequent blood draws within the naïve and memory compartments from unstimulated PBMCs. Panel B shows histograms with percentage of cells and corresponding clones that were common in repertoires from these subsequent blood draws.

Discrepant naïve compartments could explain the low overlap in repertoires from PBMCs before stimulation (Table 1), which could in turn have contributed to the poor clonal consistency of the proliferation assay itself. Our data demonstrate the importance of using additional methods to allergen-proliferation assays for the purpose of evaluating allergen-specific T cell phenotype.

Interestingly, when focusing specifically on the persistent peanut-proliferating clones, the relative frequency of each individual clone did not change over time, suggesting a relatively stable memory population. With rush oral immunotherapy however, correlation between clonal frequencies was lost ($p < 0.004$), indicating a change in clonal distribution (Figure 6.3). The most important change was found in the earlier part of the treatment, between baseline and 9 months.

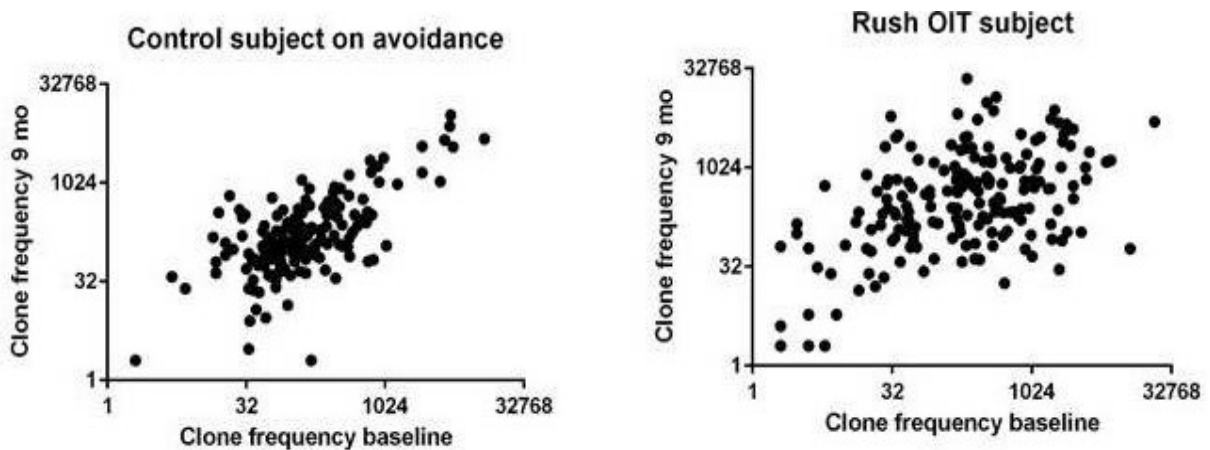


Figure 6.3: Dot plot comparing the relative frequencies of TCR copies at baseline and at 9 months in peanut-allergic subjects on strict peanut avoidance and those that underwent omalizumab-enable rush oral immunotherapy.

To evaluate whether this change in frequency was the consequence of T cell anergy versus deletion, we analyzed subjects' whole TCR repertoires using unstimulated PBMC from the same time points, which showed high clonal stability in both groups (Figure 6.4). We then specifically looked at previously identified peanut-specific TCR clones within this resting repertoire. While in untreated subjects, frequency of resting peanut-specific clones was very stable, with treatment, correlation over time was slightly lower, although not as low as that observed with peanut-proliferating T cells. This difference could suggest both deletion and anergy occur simultaneously.

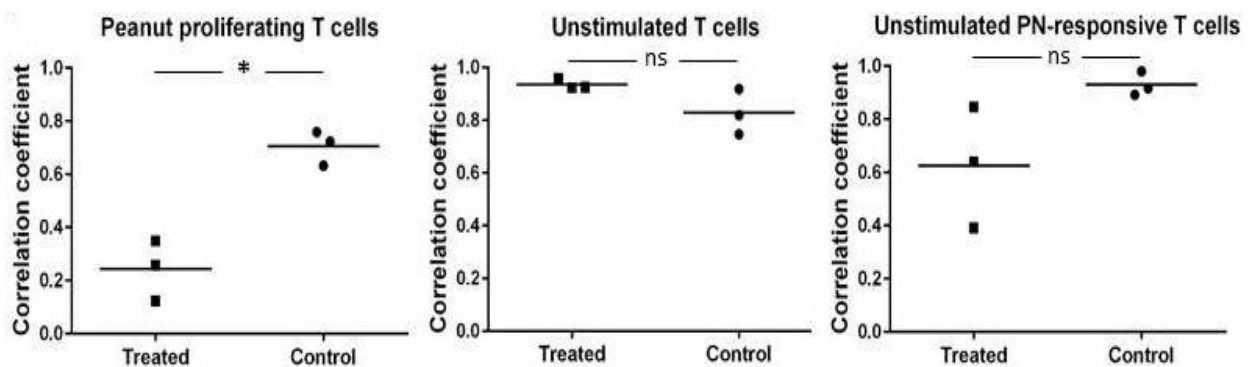


Figure 6.4: Correlation coefficients between clonal frequencies at baseline and 9 months in treated and control subjects when considering (A) the peanut proliferating T cell fraction, (B) whole unstimulated PBMCs and (C) peanut-responsive clones within unstimulated PBMCs. * $p < 0.004$; ns = not significant.

When looking at the dynamics of individual clones, 2 patterns of clonal fluctuation consistently stood out in all three subjects on oral immunotherapy (Figure 6.5). The first pattern (G) consisted of clones which first decrease in frequency, most of which (93%) will remain low at the 18 month time point. The second pattern (H) consisted of clones which initially increase in

frequency, most of which (83%) later decrease back down toward baseline levels. A first pattern consisted of clones with high relative frequency at baseline which decreased at 9 month. Most of these (93%) would then remain at 18 months. The second pattern consisted of clones with a lower frequency at baseline which transiently increased at 9 months, but of which 83% would then decreased back down toward baseline at 18 months. In average, 47% of persistent clones fell into pattern 1, 26% fell into pattern 2 and 27% fell into neither.

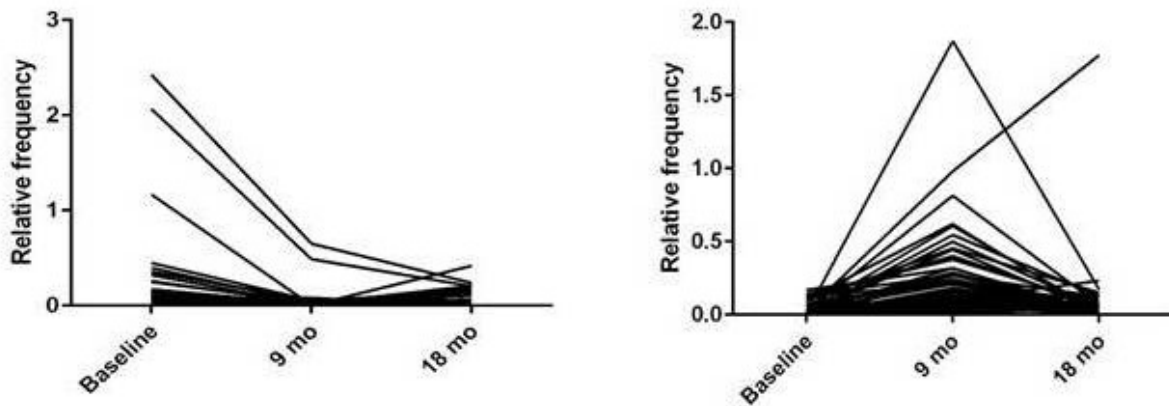


Figure 6.5: Changes in clone relative frequencies over time in the treatment group.

It is possible that the first pattern described above corresponds to the desensitized pathological population. The second pattern could correspond either to a transient effector regulatory T cell population or to another pathological population which was expanded before being depleted. However, further studies are necessary. This highlights a limitation of our approach which did not link clones to corresponding phenotypes. MHC-tetramer or -dextramer technology would distinguish peanut-specific T cells to test whether there is an association between certain TCR and phenotype data (119).

In conclusion, using next-generation TCR β sequencing we found that the peanut proliferation assay leads to an extremely diversified polyclonal response with a very small fraction of consistent clones over time. The clonal distribution of this consistent fraction changes with peanut oral immunotherapy, supporting the T cell 'replacement' hypothesis as a mechanism of food oral immunotherapy. Further studies using single-cell approaches will be needed to test the link between clonotypic and phenotypic data.

Supplemental methods

Clinical sample

Three peanut allergic subjects were recruited from a previous phase one proof of concept study on the combination of omalizumab and oral immunotherapy for the treatment of food allergy (115). Three other peanut allergic on strict avoidance were recruited as untreated controls. Both groups had undergone the same screening process, the latter being on a waiting list for future OIT trials. All subjects had positive skin tests and specific IgE to peanut and showed objectivity clinical reactivity on a double-blind placebo-controlled food challenge (DBPCFC).

DBPCFCs were performed on different days and separated by 72h for each qualifying food allergen and for the placebo (oat). All participants performed spirometry, as appropriate per age, and had continuous pulse-oximetry and vital sign monitoring, every 15 minutes prior to and following increasing doses of placebo or allergenic food protein. DBPCFC doses were increased over 3.5 hours up to a cumulative dose of 182 mg food protein until an objective reaction occurred. Clinical reactivity was based on Bock's criteria (grade 1 or above) (68).

The full omalizumab enable rush OIT protocol is described elsewhere. Briefly, after enrollment, the subjects received omalizumab for 8 weeks according to the product insert dosing schedule to equilibrate with anti-IgE mAb. On the 9th week after the 1st injection of omalizumab, the participants underwent rapid oral desensitization to up to 1250mg food protein. The highest tolerated dose (i.e. with no clinical reactivity) determined the participant's starting daily home dose. Individual doses were provided which participants were instructed to ingest after a full meal at approximately the same time each day. The participants returned every two weeks for dose escalations. If the new dose was tolerated, it subsequently became their daily dose for the

following two weeks; otherwise they continued on their previous dose. The goal of the OIT was to achieve a daily maintenance dose of 4000mg protein of peanut allergen (up to 20,000 mg protein cumulative dose for participants taking up to 4 other allergens in their OIT treatment). Omalizumab treatment was discontinued 8 weeks after the initial escalation day of food allergens, totaling 16 weeks total of omalizumab treatment.

Peripheral blood was drawn at baseline, 9 months and 18 months in all participants for the purpose of mechanistic assays. The three patients selected for this protocol were selected based on the availability and amount of frozen PBMCs at these predetermined time points, to maximise proliferation assay output. Three other patients which had undergone screening and qualified for but had not started peanut oral immunotherapy were drawn at the same time points to be used as control subjects on avoidance. The project was approved by our institutional review board.

Proliferation assay

PBMCs were isolated from peripheral whole blood using Ficoll-Paque® density gradient centrifugation and stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Life technologies®) and cultured at a concentration of 2×10^6 cells/well in a 48 well plate with 500 uL of AIM-V® medium (Life technologies®) in the presence or absence of 100 µg whole peanut extract (ara h2 = 15.2 ug; endotoxin (LAL) < 0.15ng). The medium was not supplemented with any other component. Cultures were also performed with same conditions using pure Ara h 2 peptide (10 µg per well) or tetanus toxoid (0.5 µg per well) as controls to stimulate proliferation. After 7 days, live CD4+CFSE^{lo} cells were isolated using a FACS Aria cell sorter, after staining with 5µL CD4 APC-cy7 (Biolegend®), and 2µL LIVE-DEAD fixable Aqua Dead Cell staining (Life Technologies®) in 100µL staining buffer for 20 minutes.

Two immediately subsequent tubes were also drawn from a healthy subjects. Naïve and memory T cells were isolated from PBMCs as CD45RA^{high} and CD45RA⁻, respectively, within the CD4⁺ lymphocyte gate using FACS Aria cell sorter. Staining was performed with 5µL CD4 APC and 5µL CD45 FITC antibodies (Biolegend®) in 100 µL staining buffer for 20 minutes.

DNA extraction was performed on the sorted cells and on unstimulated PBMCs using QIAmp DNA micro kit (QIAGEN®) for the purpose of T-cell receptor sequencing (from samples of 25,000 to 90,000 sorted T cells or 1 million unstimulated PBMCs, respectively).

High-throughput T-cell receptor sequencing

After DNA extraction, CDR3β regions were amplified and sequenced by Adaptive Biotechnologies Corp (Seattle, WA) using the ImmunoSEQ assay. Briefly, a multiplex PCR system was used to amplify CDR3β sequences from DNA samples. The immunoSEQ assay can amplify all 49 V segments in 32 gene segment families, 8 pseudogenes segments in 7 gene families, 10 orphon segments in 10 gene families, both D genes and the 13 functional J segments. This approach generates an 87 base-pair fragment capable of identifying the VDJ region spanning each unique CDR3β (116). Amplicons were sequenced using the Illumina HiSeq platform. Using a baseline developed from a suite of synthetic templates, primer concentrations and computational corrections are used to correct for the primer bias common to multiplex PCR reactions. Raw sequence data was filtered based on the TCRβ V, D and J gene definitions provided by the IMGT database (www.imgt.org) and binned using a modified nearest-neighbor algorithm to merging closely related sequences and remove both PCR and sequencing errors. Data was analyzed using the ImmunoSEQ analyzer toolset. Using the Survey level, this approach is capable of detecting one cell in 40,000 T cells (120).

Definitions

Persistent clones refer to individual TCR sequences which were identified at multiple time points. For example, if of 10,000 different TCR sequences identified in one sample, 200 are still identified in a subsequent sample, the fraction of persistent clones would be 2%.

Persistent T cells refer to the amount of TCR copies which were identified at multiple time points. For example, if each of the 10,000 different clones had an average of 100 copies (1,000,000 total copies in initial samples) but that within this repertoire, the 200 persistent clones had a much higher representation with an average of 750 copies per clone (150,000 copies from initial sample also present in subsequent sample) the fraction of persistent T cells between samples would be estimated at 15%. The fraction of persistent T cells is a better assessment of concordance between timepoints than persistent clones because it takes into account the frequency of individual clones, diminishing the weight of the many infrequent clones.

Clonality is a measure equal to the inverse of the normalized Shannon entropy (a statistic from information theory) of all productive clones in a sample. Values for clonality range from 0 to 1. Values near 1 represent samples with one or a few predominant clones (monoclonal or oligoclonal samples) dominating the observed repertoire. Clonality values near 0 represent more polyclonal samples. For the TCRB assay, the median clonality of an adult T-cell repertoire in blood is about 0.075. (from <http://www.adaptivebiotech.com/adaptive/glossary>, accessed Jan 6 2015)

Relative clone frequency refers to the percentage of copies of a single given clone within all the TCR copies of a given sample. It is opposed to absolute clone frequency which would refer to the actual number of circulating T cell copies of that clone in the blood. Relative clone

frequency is dependent on changes in the overall repertoire (i.e. variations in other clones) and may miss changes affecting all clones (ex.: general decrease in proliferation to allergen).

Statistical analysis

Descriptive analyses, including clone frequency, clonality and common sequence analysis, were performed with the ImmunoSEQ Analyser online tool (Adaptive™ biotechnologies). Relative clone frequencies at different time points were compared using Pearson's correlation coefficients. All reported coefficients were significantly greater than 0 ($p < 0.05$). Mean and variance of correlation coefficients were compared between groups using student's t-test. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc).

Chapitre VII : Perspectives et conclusion

Dans la première portion de cette thèse, nous avons montré qu'une désensibilisation orale simultanée à plusieurs allergènes alimentaires est possible et que le profil d'innocuité qui s'y associe est comparable à celui d'une monothérapie aux arachides. Ceci ne se fait au prix d'une légère augmentation du délai (environ 4 semaines) requis pour atteindre la dose d'entretien cible de 4000 mg d'allergène, soit en médiane 85 semaines. Nous avons ensuite montré que ce délai pouvait être grandement réduit à l'aide d'un protocole de désensibilisation rapide combiné à un traitement protecteur concomitant à l'omalizumab, un anticorps monoclonal actuellement approuvé dans l'asthme allergique réfractaire. En utilisant un tel protocole accéléré, le temps médian requis pour atteindre la dose d'entretien était de 18 semaines, et ce sans changement du profil d'innocuité. De plus, l'omalizumab pouvait être cessé 2 mois après l'initiation de l'immunothérapie orale sans augmentation des taux de réactions allergiques aux doses alimentaires.

Ces observations ont un potentiel d'impact clinique hautement significatif puisqu'elles offrent une option réaliste pour le traitement de sujets souffrant d'allergies alimentaires multiples. Dans un contexte de système public avec des ressources limitées, il importera de sélectionner les patients qui pourront bénéficier de ces traitements de façon juste et équitable. Cette décision devra se baser sur la sévérité des cas, le nombre d'allergies alimentaires, la perspective de résolution spontanée et l'ampleur du fardeau associé. Les candidats éventuellement prioritaires à la désensibilisation devraient donc vraisemblablement inclure une importante proportion de

sujets avec allergies alimentaires multiples, population pour laquelle nous pourrions avoir une approche réaliste et sécuritaire à proposer.

Limite des études preuve-de-concept

Les deux études présentées étant des études preuves-de-concept, elles présentent des limites qu'il importe de considérer. Dans la première étude, des sujets multi-sensibilisés étaient comparés à des patients avec allergie unique aux arachides. D'un point de vue immunologique, il n'y a pas lieu de croire que cette différence ait eu un impact significatif sur les résultats, mais il reste que dans un monde idéal la comparaison aurait été faite entre 2 groupes identiques et à double insu. Dans ce cas, on peut imaginer qu'il aurait fallu inclure deux groupes de sujets multi-sensibilisés et créer des mélanges à allergènes multiples et des mélanges avec arachide seul distribué de façon randomisée. Logistiquement, une telle étude aurait été extrêmement difficile à gérer, surtout considérant que le patient doit à un certain point intégrer l'aliment intact dans sa diète à domicile, et aurait pu s'associer à un risque d'erreur augmenté. De plus, considérant l'importance de l'investissement des patients et de leur famille dans ce traitement, et des risques qui y sont associés, volontairement omettre des aliments du protocole de désensibilisation aurait été discutable du point de vue éthique.

Dans le cas de la seconde étude, compte-tenu qu'il s'agissait d'une étude de phase 1, l'efficacité de l'omalizumab pour permettre le protocole accéléré n'a pas été démontrée hors de tout doute. On peut certes à titre indicatif utiliser le protocole multi-allergène standard comme comparatif, mais on ne peut prétendre hors de tout doute que les patients ont besoin de l'omalizumab pour

tolérer le protocole accéléré. Une étude de phase 2 comparant directement l'omalizumab à un placebo dans le contexte d'une immunothérapie accélérée sera donc nécessaire. Une telle étude serait également l'opportunité d'établir le dosage optimal de l'omalizumab pour cette indication. En effet, vu le coût élevé de ce médicament, il importe de savoir si des dosages moindres seraient suffisants pour permettre une désensibilisation sécuritaire.

Une telle étude de phase 2 serait également l'opportunité d'évaluer l'impact de l'omalizumab sur le développement de tolérance orale soutenue à plus long terme. Notamment, les études sur l'asthme ont montré que le traitement par omalizumab s'associe à des changements dans la réponse allergique cellulaire (diminution du profil Th2, des infiltrats lymphocytaires et éosinophiliques (121-124)). Nous avons par ailleurs récemment rapporté l'utilisation réussie d'omalizumab pour le traitement de certains cas de dermatite atopique pédiatrique sévère, une maladie principalement médiée par les lymphocytes T (125). Les propriétés immunomodulatrices de l'omalizumab pourraient impliquer des changements dans la densité des récepteurs à IgE (FcεR1) sur les cellules dendritiques et du coup sur la présentation des allergènes aux lymphocytes T (126, 127). Un effet similaire sur la densité FcεR1 a été observé sur les basophiles sanguins suite à un traitement à l'omalizumab, ces derniers ayant récemment été identifiés comme cofacteurs des cellules dendritiques dans l'induction de la réponse Th2 (128-130).

Le concept que l'omalizumab favoriserait l'établissement de tolérance soutenue est de plus supporté par un modèle murin d'allergie aux arachides (113). Le modèle de souris en question présente un récepteur IL-4 désinhibé, menant du coup à une sensibilisation aux arachides spontanée, sans la nécessité d'adjuvant. En croisant ces souris avec des lignées déficientes en

IgE, non seulement la dégranulation des mastocytes et l'anaphylaxie étaient-elle supprimée (tel qu'escompté), mais la génération même de réponse Th2 était réduite de façon dramatique. De façon concomitante, l'induction de Treg qui était déficiente dans la lignée allergique IL-4-déficiente, se corrigeait complètement en absence d'IgE. Par ailleurs, dans les souris sensibilisées aux arachides, une immunothérapie orale combinée à un traitement anti-IgE menait à une réduction des lymphocytes Th2 et à une expansion des Treg au niveau digestif, changements qui n'étaient pas observés avec l'immunothérapie orale seule.

Bien-fondé de l'approche

Bien que l'immunothérapie orale demeure dans son ensemble une approche considérée expérimentale et que des études de phase 3 soient nécessaire avant de l'inclure aux lignes directrices Nord-américaines ou internationale, il apparait déjà fort probable en raison de son efficacité à induire une désensibilisation qu'elle trouvera une place dans notre attirail thérapeutique dans un futur relativement rapproché, que ce soit sous sa forme actuelle ou une autre. La question des coûts et des ressources risque alors d'être au cœur du débat sur l'immunothérapie orale et constituera vraisemblablement la principale barrière à une éventuelle implémentation. Le gain de vitesse par l'omalizumab vient les faire baisser et rentabilise probablement son utilisation. Cependant, ce coût sera-t-il justifiable selon un point de vue de gestion de système? Si on ne se fie qu'aux coûts directs sur le système de santé il est possible que la réponse soit non. Cette approche serait par contre une erreur compte-tenu qu'il a été démontré que le fardeau économique de la maladie repose en très grand majorité sur les patients et leurs familles. Dans une récente étude américaine, le coût des allergies alimentaires était estimé à 24.5 milliards USD annuellement aux États-Unis) desquels 20.5 milliards incombaient

directement aux familles elle-même, en raison de la perte de productivité, de coûts additionnels (diètes spéciales, camps spéciaux, changement d'école) et d'opportunités manquées (le parent devant changer de travail ou démissionner) (12).

Qui plus est, il faut se rappeler que la motivation première à obtenir une désensibilisation pour les patients et leurs familles ne se base pas sur des questions d'ordre pécuniaire, mais plutôt de qualité de vie. Plusieurs études ont d'ailleurs montré un effet statistiquement et cliniquement significatif sur la qualité de vie avec l'immunothérapie orale en utilisant des questionnaires standardisés (131-133).

Les deux études présentées dans le cadre de ce projet de thèse ne font pas exception (15). L'impact positif sur la qualité de vie lié à l'alimentation tel que rapporté dans une étude subséquente était majeur, passant d'un score moyen de 3.9 à 1.7 sur 18 mois ($p < 0.0001$) (sur une échelle de 6) (Figure 7.1). Tous les paramètres du questionnaire montraient une amélioration, comparativement à un groupe contrôle évitant l'allergène ne montrant aucun changement dans le score. À noter que peu d'interventions ont démontré avoir un impact sur la qualité de vie en allergie alimentaire et aucune de cette amplitude (131, 132, 134).

Ainsi la justification d'offrir ou non l'immunothérapie orale chez les patients avec allergie alimentaire dans notre système public ne devrait pas reposer uniquement sur des désirs de rentabilité mais également sur un souci d'améliorer la qualité de vie de la population desservie. Dans ce contexte, les indicateurs de performance pour mesurer et suivre longitudinalement l'impact de l'implémentation d'une clinique de désensibilisation alimentaire restent à déterminer.

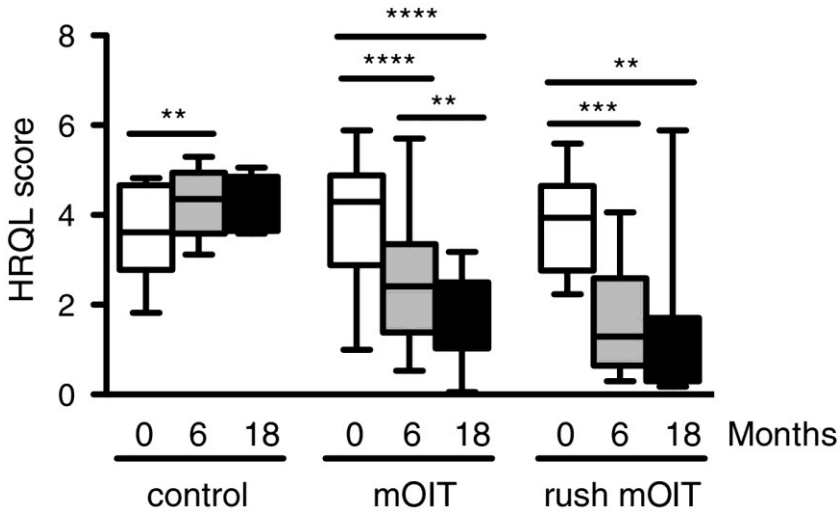


Figure 7.1 Changement dans le score de qualité de vie liée à l’allergie alimentaire chez les parents de sujets contrôles évitant l’allergène (control), des sujets suivant une immunothérapie orale à allergène multiple standard (mOIT) et des sujets suivant une immunothérapie orale à allergène multiple accéléré combinée à l’omalizumab (rush mOIT). ** $p < 0.01$, *** $p = 0.001$, **** $p < 0.0001$. Reproduit avec permission de *Otani IM, Bégin P et al. Allergy Asthma Clin Immunol 2014, 10:25.*

Vers une approche translationnelle

En plus de mettre en place des projets pilotes d’implantation clinique pour identifier les barrières structurelles éventuelles à l’immunothérapie orale, il importe de poursuivre le développement de la technique et l’élaboration d’approches innovatrices pour en améliorer l’innocuité, l’efficacité et l’effet à long terme. À la question de l’utilisation de l’omalizumab exposé ci-haut s’ajoute une kyrielle de questions cliniques pertinentes qui demeurent pour l’instant sans réponse, qui sont caractéristiques de toute nouvelle approche thérapeutique à ses débuts. Le tableau 7.1 en liste quelques-unes en exemple. Il est probable qu’il n’existe pas de réponse

unique pour chacune de ces questions et que l'approche se devra d'être individualisée à la réalité clinique, sociale et/ou immunitaire du patient.

La création de programmes de recherche translationnelle utilisant la recherche clinique et les projets pilotes d'implantation comme point d'arrimage pour la recherche fondamentale est une approche prometteuse pour générer l'innovation et produire des résultats avec un impact concret sur la prise en charge des patients avec allergies alimentaires. Dans cette optique, la création de

Tableau VII-I: Questions sur l'immunothérapie orale pour l'allergie alimentaire

Éligibilité	<p>Quel est le meilleur âge pour faire une immunothérapie orale?</p> <p>Est-ce que l'efficacité varie selon différents sous-groupes cliniques?</p> <p>Est-ce que l'innocuité varie selon différents sous-groupes cliniques?</p>
Dosage	<p>Quelle est la dose de départ optimale?</p> <p>Quelle est la dose d'entretien optimale?</p> <p>Quelle est la durée d'entretien optimal pour atteindre une tolérance soutenue?</p> <p>Quel est le nombre maximal d'aliments pouvant être désensibilisés simultanément?</p>
Innocuité	<p>Comment gérer les réactions à domicile?</p> <p>Quel est le risque réel d'œsophagite éosinophilique?</p> <p>Choix de médicament pour accélérer la vitesse de désensibilisation?</p>
Tolérance soutenue	<p>Quel est le taux de tolérance dans les différentes populations?</p> <p>Quand et comment la tolérance devrait-elle être testée?</p> <p>Quels sont les meilleurs marqueurs pour l'identifier?</p> <p>Quel est le but visé : désensibilisation vs tolérance?</p> <p>Est-ce que certaines approches pourraient favoriser la survenue de tolérance soutenue?</p>
Produit	<p>Le produit pourrait-il être modifié pour être plus tolérogénique?</p>

De nouvelles voies d'administrations pourraient-elles augmenter l'efficacité ou l'innocuité?
--

banques de tissu associées aux projets cliniques constitue un outil extrêmement utile permettant de générer des échantillons cliniques de qualité pour mieux comprendre les mécanismes de la désensibilisation et de l'induction de tolérance soutenue. Cela dit, tel que démontré dans le chapitre précédent, une limite majeure dans l'investigation des bases fondamentales de l'allergie alimentaire est que nos outils pour en évaluer la portion cellulaire font cruellement défaut. Le test de prolifération lymphocytaire, fer de lance de l'analyse des T spécifiques résulte en une réponse hautement polyclonale non spécifique et peu reproductible. À la lumière de ces résultats, il importe de revoir notre approche de la réponse cellulaire aux allergènes, soit en trouvant des façons de racheter la technique ou en explorant d'autres modes d'analyses.

Tel qu'illustré dans la figure 6.2, il est possible qu'une partie du problème relié au test de prolifération lymphocytaire s'explique par la fraction des T naïfs qui est a priori extrêmement diversifiée, qui représente la majorité des T circulants chez les enfants et donc de ceux mis en cultures pour le test et qui sont reconnus pour leur tendance à la prolifération suite à des stimulations de peu d'affinité. Il est possible qu'en retirant les T naïfs des PBMCs mis en culture (par bille ou triage cellulaire), il soit possible d'améliorer la spécificité de la réponse proliférative observée et ainsi réhabiliter ce test relativement accessible et peu coûteux. Une autre voie serait de délaisser ce test au profit des nouvelles technologies disponibles, notamment celle des dextramères CMH.

Le défi dans l'identification des lymphocytes T spécifiques à un allergène réside dans le fait que le récepteur du lymphocyte T ne reconnaisse pas simplement l'allergène mais bien un peptide présenté sur un complexe d'histocompatibilité majeur (CMH). La technologie des dextramères CMH consiste à fabriquer des billes de métal marquées recouvertes de CMH pré-chargés avec un peptide donnée pour directement identifier les lymphocytes T qui y sont spécifiques.

Cette technologie est extrêmement prometteuse et permet de mettre en lumière de façon hautement spécifiques des clones représentant une fraction pourtant minime des T circulants. En contrepartie, elle présente également certaines limites. Notamment, les CMH étant génétiquement distincts d'un sujet à l'autre, il faut qu'il y ait un « match » entre le dextramère utilisé et le typage HLA du patient. De la même façon le choix du peptide chargé dans le CMH va limiter les clones qui seront identifiés par cette méthode, alors que la réponse réelle à l'allergène est polyclonale, sinon au moins oligoclonale. Ainsi, cette approche se veut peut-être un complément plutôt qu'un remplacement du test de prolifération, l'une très spécifique et l'autre très sensible. Utilisées de concert, ces deux approches permettraient en quelque sorte de voir à la fois l'arbre et la forêt.

Outre la limite exposée ci-haut, l'étude par séquençage des TCR des lymphocytes T proliférant en réponse aux arachides nous a permis de mettre en évidence des changements dans la fréquence relatives des clones observé en lien avec le traitement par immunothérapie orale accéléré. Quoique l'approche soit loin d'être idéale en raison du manque de spécificité du test de prolifération, il demeure qu'il s'agit de la première étude abordant la question du devenir clonal en allergie, qui constitue du coup une avancée importante dans notre compréhension des

mécanismes immunologiques de l'immunothérapie. Nos observations supportent l'hypothèse du changement de garde selon laquelle les clones Th2 pathogéniques ne seraient pas réduqués, mais plutôt épuisés par exposition répétée à l'antigène à haute dose et éventuellement remplacés. Cette observation pourrait avoir des implications importantes dans le design de nouvelles approches thérapeutiques. Notamment, en sachant que le traitement passe par une déplétion des Th2, un traitement anti-CRTH2 (protéine de surface des Th2 et basophiles) pourrait être une avenue adjuvante intéressante (135). Aussi en sachant qu'une nouvelle réponse distincte doit être créée, cela ouvre la voie à des manipulations directes de la réponse à partir des lymphocytes naïfs, soit par immunothérapie intralymphatique (136) ou par thérapie cellulaire avec des cellules dendritiques tolérogéniques (137).

Conclusion

En résumé, dans le cadre de cette thèse, nous avons démontré la faisabilité et l'innocuité d'un protocole de d'immunothérapie orale à multiples allergènes alimentaires. Nous avons de plus démontré la faisabilité et l'innocuité d'une désensibilisation multi-allergènes accélérée grâce à un traitement simultané à l'omalizumab. Ces études preuves-de-concepts sont une étape importante dans la mise sur pied d'approches personnalisées pour les patients souffrant d'allergies alimentaires multiples. Malgré les limites de ces études et les questions qui restent pour le moment en suspens, il est clair que la désensibilisation est possible chez les sujets avec allergies alimentaires multiples et que, indépendamment de l'établissement de tolérance permanente, elle s'associe à un net bénéfice sur la qualité de vie. Ainsi, en parallèle aux études cliniques subséquentes, nous nous devons donc d'amorcer un travail d'identification d'éventuelles barrières implémentation au Québec dès maintenant avec des projets pilotes de

désensibilisation pour développer l'expertise et poursuivre la démonstration d'innocuité et d'efficacité clinique, tout en bâtissant le potentiel de recherche translationnelle.

D'ailleurs, une telle approche translationnelle nous a permis de mettre en évidence pour la première fois un changement dans la réponse clonale dans une immunothérapie spécifique à un allergène, en utilisant les nouvelles technologies de séquençage des TCR à haut débit. Nous avons par contre également mis en évidence une importante lacune du test de prolifération lymphocytaire en termes de spécificité, qui constitue pourtant dans la littérature actuelle le principal outil d'évaluation de la réponse cellulaire aux allergènes. Il importera donc de développer de nouveaux outils d'investigation, d'où l'importance de poursuivre et de renforcer notre approche translationnelle avec la création de banque de tissus et l'établissement de collaborations entre professionnels de recherche. Au total, ce sera les familles aux prises avec les allergies alimentaires qui bénéficieront de tous les efforts mis de l'avant.

Bibliographie

1. Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):594-602.
2. Bock SA, Sampson HA. Food allergy in infancy. *Pediatr Clin North Am.* 1994;41(5):1047-67.
3. Panel NI-SE, Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(6 Suppl):S1-58.
4. Gupta RS, Springston EE, Warrier MR, Smith B, Kumar R, Pongracic J, et al. The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics.* 2011;128(1):e9-17.
5. Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Godbold JH, Sampson HA. US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(6):1322-6.
6. Soller L, Ben-Shoshan M, Harrington DW, Knoll M, Fragapane J, Joseph L, et al. Prevalence and predictors of food allergy in Canada: a focus on vulnerable populations. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2015;3(1):42-9.
7. Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(4):1016-8.
8. Dominguez TL, Begin P, Nadeau KC. The use of epinephrine in acute allergic reaction to food. *Pediatr Ann.* 2013;42(7):293-5.
9. Primeau MN, Kagan R, Joseph L, Lim H, Dufresne C, Duffy C, et al. The psychological burden of peanut allergy as perceived by adults with peanut allergy and the parents of peanut-allergic children. *Clin Exp Allergy.* 2000;30(8):1135-43.
10. Muraro A, Polloni L, Lazzarotto F, Toniolo A, Baldi I, Bonaguro R, et al. Comparison of bullying of food-allergic versus healthy schoolchildren in Italy. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(3):749-51.
11. Bacal LR. The impact of food allergies on quality of life. *Pediatr Ann.* 2013;42(7):141-5.
12. Gupta R, Holdford D, Bilaver L, Dyer A, Holl JL, Meltzer D. The economic impact of childhood food allergy in the United States. *JAMA Pediatr.* 2013;167(11):1026-31.
13. Begin P, Paradis L, Paradis J, Picard M, Des Roches A. Natural resolution of peanut allergy: A 12-year longitudinal follow-up study. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2013;1(5):528-30 e4.
14. Greenhawt MJ, Vickery BP. Allergist-reported trends in the practice of food allergen oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2015;3(1):33-8.
15. Otani IM, Begin P, Kearney C, Dominguez TL, Mehrotra A, Bacal LR, et al. Multiple-allergen oral immunotherapy improves quality of life in caregivers of food-allergic pediatric subjects. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2014;10(1):25.

16. Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):761-71.
17. Ring J, Guterthum J. 100 years of hyposensitization: history of allergen-specific immunotherapy (ASIT). *Allergy*. 2011;66(6):713-24.
18. Schofield AT. A case of egg poisoning. *Lancet*. 1908;1:716.
19. Patriarca C, Romano A, Venuti A, Schiavino D, Di Rienzo V, Nucera E, et al. Oral specific hyposensitization in the management of patients allergic to food. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1984;12(4):275-81.
20. Patriarca G, Nucera E, Roncallo C, Pollastrini E, Bartolozzi F, De Pasquale T, et al. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17(3):459-65.
21. Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock A, Leung D. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99(6 Pt 1):744-51.
22. Burks AW, Jones SM, Wood RA, Fleischer DM, Sicherer SH, Lindblad RW, et al. Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children. *N Engl J Med*. 2012;367(3):233-43.
23. Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewe F, Wahn U, Niggemann B, Beyer K. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy*. 2007;62(11):1261-9.
24. Skripak JM, Nash SD, Rowley H, Brereton NH, Oh S, Hamilton RG, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(6):1154-60.
25. Zapatero L, Alonso E, Fuentes V, Martinez MI. Oral desensitization in children with cow's milk allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008;18(5):389-96.
26. Longo G, Barbi E, Berti I, Meneghetti R, Pittalis A, Ronfani L, et al. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(2):343-7.
27. Narisety SD, Skripak JM, Steele P, Hamilton RG, Matsui EC, Burks AW, et al. Open-label maintenance after milk oral immunotherapy for IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3):610-2.
28. Pajno GB, Caminiti L, Ruggeri P, De Luca R, Vita D, La Rosa M, et al. Oral immunotherapy for cow's milk allergy with a weekly up-dosing regimen: a randomized single-blind controlled study. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;105(5):376-81.
29. Martorell A, De la Hoz B, Ibanez MD, Bone J, Terrados MS, Michavila A, et al. Oral desensitization as a useful treatment in 2-year-old children with cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(9):1297-304.
30. Keet CA, Frischmeyer-Guerrero PA, Thyagarajan A, Schroeder JT, Hamilton RG, Boden S, et al. The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(2):448-55, 55 e1-5.
31. Salmivesi S, Korppi M, Makela MJ, Paasilta M. Milk oral immunotherapy is effective in school-aged children. *Acta Paediatr*. 2013;102(2):172-6.
32. Vazquez-Ortiz M, Alvaro-Lozano M, Alsina L, Garcia-Paba MB, Piquer-Gibert M, Giner-Munoz MT, et al. Safety and predictors of adverse events during oral immunotherapy for milk allergy: severity of reaction at oral challenge, specific IgE and prick test. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(1):92-102.

33. Savilahti EM, Kuitunen M, Valori M, Rantanen V, Bardina L, Gimenez G, et al. Changes in IgE and IgG4 epitope binding profiles associated with the outcome of oral immunotherapy in cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014.
34. Buchanan AD, Green TD, Jones SM, Scurlock AM, Christie L, Althage KA, et al. Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(1):199-205.
35. Itoh N, Itagaki Y, Kurihara K. Rush specific oral tolerance induction in school-age children with severe egg allergy: one year follow up. *Allergol Int*. 2010;59(1):43-51.
36. Vickery BP, Pons L, Kulis M, Steele P, Jones SM, Burks AW. Individualized IgE-based dosing of egg oral immunotherapy and the development of tolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;105(6):444-50.
37. Garcia Rodriguez R, Urrea JM, Feo-Brito F, Galindo PA, Borja J, Gomez E, et al. Oral rush desensitization to egg: efficacy and safety. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(9):1289-96.
38. Meglio P, Giampietro PG, Carello R, Gabriele I, Avitabile S, Galli E. Oral food desensitization in children with IgE-mediated hen's egg allergy: a new protocol with raw hen's egg. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24(1):75-83.
39. Dello Iacono I, Tripodi S, Calvani M, Panetta V, Verga MC, Miceli Sopo S. Specific oral tolerance induction with raw hen's egg in children with very severe egg allergy: a randomized controlled trial. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24(1):66-74.
40. Vazquez-Ortiz M, Alvaro M, Piquer M, Dominguez O, Machinena A, Martin-Mateos MA, et al. Baseline specific IgE levels are useful to predict safety of oral immunotherapy in egg-allergic children. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(1):130-41.
41. Clark AT, Islam S, King Y, Deighton J, Anagnostou K, Ewan PW. Successful oral tolerance induction in severe peanut allergy. *Allergy*. 2009;64(8):1218-20.
42. Jones SM, Pons L, Roberts JL, Scurlock AM, Perry TT, Kulis M, et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(2):292-300, e1-97.
43. Blumchen K, Ulbricht H, Staden U, Dobberstein K, Beschoner J, de Oliveira LC, et al. Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(1):83-91 e1.
44. Varshney P, Jones SM, Scurlock AM, Perry TT, Kemper A, Steele P, et al. A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: clinical desensitization and modulation of the allergic response. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):654-60.
45. Begin P, Winterroth LC, Dominguez T, Wilson SP, Bacal L, Mehrotra A, et al. Safety and feasibility of oral immunotherapy to multiple allergens for food allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2014;10(1):1.
46. Wasserman RL, Factor JM, Baker JW, Mansfield LE, Katz Y, Hague AR, et al. Oral immunotherapy for peanut allergy: multipractice experience with epinephrine-treated reactions. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2014;2(1):91-6.
47. Anagnostou K, Islam S, King Y, Foley L, Pasea L, Bond S, et al. Assessing the efficacy of oral immunotherapy for the desensitisation of peanut allergy in children (STOP II): a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2014;383(9925):1297-304.
48. Tang ML, Ponsonby AL, Orsini F, Tey D, Robinson M, Su EL, et al. Administration of a probiotic with peanut oral immunotherapy: A randomized trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(3):737-44 e8.

49. Katz Y, Appel MY, Goldberg MR, Elizur A, Nachshon L, Levy MB. Long Term Follow-up of Patients Successfully Completing Oral Immunotherapy for IgE-Mediated Cow's Milk Allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(2):AB27.
50. Wang J, Visness CM, Sampson HA. Food allergen sensitization in inner-city children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(5):1076-80.
51. Wang J. Management of the patient with multiple food allergies. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010;10(4):271-7.
52. Park JH, Ahn SS, Sicherer SH. Prevalence of allergy to multiple versus single foods in a pediatric food allergy referral practice. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:AB216.
53. Christie L, Hine RJ, Parker JG, Burks W. Food allergies in children affect nutrient intake and growth. *J Am Diet Assoc*. 2002;102(11):1648-51.
54. Savage JH, Matsui EC, Skripak JM, Wood RA. The natural history of egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(6):1413-7.
55. Sicherer SH, Noone SA, Munoz-Furlong A. The impact of childhood food allergy on quality of life. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;87(6):461-4.
56. Muraro A, Roberts G, Clark A, Eigenmann PA, Halken S, Lack G, et al. The management of anaphylaxis in childhood: position paper of the European academy of allergology and clinical immunology. *Allergy*. 2007;62(8):857-71.
57. Hompes S, Kohli A, Nemat K, Scherer K, Lange L, Rueff F, et al. Provoking allergens and treatment of anaphylaxis in children and adolescents--data from the anaphylaxis registry of German-speaking countries. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011;22(6):568-74.
58. Huang F, Chawla K, Jarvinen KM, Nowak-Wegrzyn A. Anaphylaxis in a New York City pediatric emergency department: triggers, treatments, and outcomes. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(1):162-8 e1-3.
59. Fleischer DM, Perry TT, Atkins D, Wood RA, Burks AW, Jones SM, et al. Allergic reactions to foods in preschool-aged children in a prospective observational food allergy study. *Pediatrics*. 2012;130(1):e25-32.
60. de Boissieu D, Dupont C. Sublingual immunotherapy for cow's milk protein allergy: a preliminary report. *Allergy*. 2006;61(10):1238-9.
61. Meglio P, Bartone E, Plantamura M, Arabito E, Giampietro PG. A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy*. 2004;59(9):980-7.
62. Fisher HR, du Toit G, Lack G. Specific oral tolerance induction in food allergic children: is oral desensitisation more effective than allergen avoidance?: a meta-analysis of published RCTs. *Arch Dis Child*. 2011;96(3):259-64.
63. Hofmann AM, Scurlock AM, Jones SM, Palmer KP, Lokhnygina Y, Steele PH, et al. Safety of a peanut oral immunotherapy protocol in children with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(2):286-91, 91 e1-6.
64. Yu GP, Weldon B, Neale-May S, Nadeau KC. The safety of peanut oral immunotherapy in peanut-allergic subjects in a single-center trial. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;159(2):179-82.
65. Fleischer DM, Burks AW, Vickery BP, Scurlock AM, Wood RA, Jones SM, et al. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(1):119-27 e1-7.
66. Enrique E, Pineda F, Malek T, Bartra J, Basagana M, Tella R, et al. Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-

- controlled study with a standardized hazelnut extract. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(5):1073-9.
67. MacGlashan DW, Jr. IgE-dependent signaling as a therapeutic target for allergies. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(9):502-9.
 68. Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, Zeiger RS, Lehrer S, Sachs M, et al. Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: a manual. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;82(6):986-97.
 69. Calderon MA, Gerth van Wijk R, Eichler I, Matricardi PM, Varga EM, Kopp MV, et al. Perspectives on allergen-specific immunotherapy in childhood: an EAACI position statement. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012;23(4):300-6.
 70. Johannsen H, Nolan R, Pascoe EM, Cuthbert P, Noble V, Corderoy T, et al. Skin prick testing and peanut-specific IgE can predict peanut challenge outcomes in preschoolchildren with peanut sensitization. *Clin Exp Allergy.* 2011;41(7):994-1000.
 71. McGowan EC, Keet CA. Prevalence of self-reported food allergy in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2010. *J Allergy Clin Immunol.* 2013.
 72. Soller L, Ben-Shoshan M, Harrington DW, Fragapane J, Joseph L, St Pierre Y, et al. Overall prevalence of self-reported food allergy in Canada. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(4):986-8.
 73. Gupta R, Holdford D, Bilaver L, Dyer A, Holl JL, Meltzer D. The Economic Impact of Childhood Food Allergy in the United States. *JAMA Pediatr.* 2013.
 74. Dupont C, Kalach N, Soulaines P, Legoue-Morillon S, Piloquet H, Benhamou PH. Cow's milk epicutaneous immunotherapy in children: a pilot trial of safety, acceptability, and impact on allergic reactivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(5):1165-7.
 75. Gomez E, Mayorga C, Gomez F, Blazquez AB, Diaz-Perales A, Blanca M, et al. Food allergy: management, diagnosis and treatment strategies. *Immunotherapy.* 2013;5(7):755-68.
 76. Sabato V, Faber M, Van Gasse A, Hagendorens MM, Leysen J, Bridts CH, et al. State of the art and perspectives in food allergy (part II): therapy. *Curr Pharm Des.* 2013.
 77. Nadeau KC, Kohli A, Iyengar S, DeKruyff RH, Umetsu DT. Oral immunotherapy and anti-IgE antibody-adjunctive treatment for food allergy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2012;32(1):111-33.
 78. Yang YH, Chiang BL. Novel Approaches to Food Allergy. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013.
 79. Khoriaty E, Umetsu DT. Oral immunotherapy for food allergy: towards a new horizon. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2013;5(1):3-15.
 80. Kim EH, Burks W. Managing food allergy in childhood. *Curr Opin Pediatr.* 2012;24(5):615-20.
 81. Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA. Future therapies for food allergies. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):558-73; quiz 74-5.
 82. Virkud YV, Vickery BP. Advances in immunotherapy for food allergy. *Discov Med.* 2012;14(76):159-65.
 83. Nurmatov U, Venderbosch I, Devereux G, Simons FE, Sheikh A. Allergen-specific oral immunotherapy for peanut allergy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;9:CD009014.

84. Leung DY, Sampson HA, Yunginger JW, Burks AW, Jr., Schneider LC, Wortel CH, et al. Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *N Engl J Med.* 2003;348(11):986-93.
85. Sampson HA, Leung DY, Burks AW, Lack G, Bahna SL, Jones SM, et al. A phase II, randomized, doubleblind, parallelgroup, placebocontrolled oral food challenge trial of Xolair (omalizumab) in peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(5):1309-10 e1.
86. Iyengar SR, Hoyte EG, Loza A, Bonaccorso S, Chiang D, Umetsu DT, et al. Immunologic effects of omalizumab in children with severe refractory atopic dermatitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;162:89-93.
87. Bedoret D, Singh AK, Shaw V, Hoyte EG, Hamilton R, DeKruyff RH, et al. Changes in antigen-specific T-cell number and function during oral desensitization in cow's milk allergy enabled with omalizumab. *Mucosal Immunol.* 2012;5(3):267-76.
88. Savage JH, Courneya JP, Sterba PM, Macglashan DW, Saini SS, Wood RA. Kinetics of mast cell, basophil, and oral food challenge responses in omalizumab-treated adults with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(5):1123-9 e2.
89. MacGlashan DW, Jr., Savage JH, Wood RA, Saini SS. Suppression of the basophil response to allergen during treatment with omalizumab is dependent on 2 competing factors. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(5):1130-5 e5.
90. Babu KS, Polosa R, Morjaria JB. Anti-IgE--emerging opportunities for Omalizumab. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(5):765-77.
91. Lieberman JA, Chehade M. Use of omalizumab in the treatment of food allergy and anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013;13(1):78-84.
92. Patil SP, Wang J, Song Y, Noone S, Yang N, Wallenstein S, et al. Clinical safety of Food Allergy Herbal Formula-2 (FAHF-2) and inhibitory effect on basophils from patients with food allergy: Extended phase I study. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(6):1259-65 e2.
93. Gernez Y, Tirouvanziam R, Yu G, Ghosn EE, Reshamwala N, Nguyen T, et al. Basophil CD203c levels are increased at baseline and can be used to monitor omalizumab treatment in subjects with nut allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;154(4):318-27.
94. Yu GP, Tuano KS, Hamilton RG, Nadeau KC. Omalizumab in peanut-allergic patients reduces free IgE anti-peanut and skin prick test to peanut. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Supp 1):AB22.
95. Casale TB, Busse WW, Kline JN, Ballas ZK, Moss MH, Townley RG, et al. Omalizumab pretreatment decreases acute reactions after rush immunotherapy for ragweed-induced seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(1):134-40.
96. Nadeau KC, Schneider LC, Hoyte L, Borrás I, Umetsu DT. Rapid oral desensitization in combination with omalizumab therapy in patients with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(6):1622-4.
97. Klunker S, Saggarr LR, Seyfert-Margolis V, Asare AL, Casale TB, Durham SR, et al. Combination treatment with omalizumab and rush immunotherapy for ragweed-induced allergic rhinitis: Inhibition of IgE-facilitated allergen binding. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(3):688-95.

98. Parks KW, Casale TB. Anti-immunoglobulin E monoclonal antibody administered with immunotherapy. *Allergy Asthma Proc.* 2006;27(2 Suppl 1):S33-6.
99. Schneider LC, Rachid R, LeBovidge J, Blood E, Mittal M, Umetsu DT. A pilot study of omalizumab to facilitate rapid oral desensitization in high-risk peanut-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(6):1368-74.
100. . Food Allergy in Children and Young People: Diagnosis and Assessment of Food Allergy in Children and Young People in Primary Care and Community Settings. London; 2011.
101. Vickery BP, Scurlock AM, Kulis M, Steele PH, Kamilaris J, Berglund JP, et al. Sustained unresponsiveness to peanut in subjects who have completed peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(2):468-75 e6.
102. Vickery BP, Scurlock AM, Jones SM, Burks AW. Mechanisms of immune tolerance relevant to food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):576-84; quiz 85-6.
103. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev.* 2005;206:232-59.
104. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(1):3-12; quiz 3.
105. Pellerin L, Jenks JA, Begin P, Bacchetta R, Nadeau KC. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy. *Immunol Res.* 2014;58(2-3):358-68.
106. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(4):331-41.
107. Oka T, Rios EJ, Tsai M, Kalesnikoff J, Galli SJ. Rapid desensitization induces internalization of antigen-specific IgE on mouse mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(4):922-32 e1-16.
108. Elizur A, Goldberg MR, Levy MB, Nachshon L, Appel M, Katz Y. Long Term Follow-up of Patients Requiring Injectable Epinephrine Following Completion of Oral Immunotherapy for IgE-Cow's Milk Allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(2):AB27.
109. Stone JH, Zen Y, Deshpande V. IgG4-related disease. *N Engl J Med.* 2012;366(6):539-51.
110. Moutsoglou D, Dreskin SC. Memory B Cells Are Necessary for the Adoptive Transfer of Murine Peanut Allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(2):AB28.
111. Van Hemelen D, Mahler V, Fischer G, Fae I, Reichl-Leb V, Pickl W, et al. HLA class II peptide tetramers vs allergen-induced proliferation for identification of allergen-specific CD4 T cells. *Allergy.* 2015;70(1):49-58.
112. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(3):621-31.
113. Burton OT, Noval Rivas M, Zhou JS, Logsdon SL, Darling AR, Koleoglou KJ, et al. Immunoglobulin E signal inhibition during allergen ingestion leads to reversal of established food allergy and induction of regulatory T cells. *Immunity.* 2014;41(1):141-51.
114. Van Hemelen D, Mahler V, Fischer G, Fae I, Reichl-Leb V, Pickl W, et al. HLA-class II peptide tetramers vs. allergen-induced proliferation for identification of allergen-specific CD4 T cells. *Allergy.* 2014.

115. Begin P, Dominguez T, Wilson SP, Bacal L, Mehrotra A, Kausch B, et al. Phase 1 results of safety and tolerability in a rush oral immunotherapy protocol to multiple foods using Omalizumab. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2014;10(1):7.
116. Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, Wacher A, Turtle CJ, Kahsai O, et al. Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood.* 2009;114(19):4099-107.
117. Geiger R, Duhon T, Lanzavecchia A, Sallusto F. Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. *J Exp Med.* 2009;206(7):1525-34.
118. Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee JY, et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(36):13139-44.
119. DeLong JH, Simpson KH, Wambre E, James EA, Robinson D, Kwok WW. Ara h 1-reactive T cells in individuals with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(5):1211-8 e3.
120. Robins H, Desmarais C, Matthis J, Livingston R, Andriesen J, Reijonen H, et al. Ultra-sensitive detection of rare T cell clones. *J Immunol Methods.* 2012;375(1-2):14-9.
121. van Rensen EL, Evertse CE, van Schadewijk WA, van Wijngaarden S, Ayre G, Mauad T, et al. Eosinophils in bronchial mucosa of asthmatics after allergen challenge: effect of anti-IgE treatment. *Allergy.* 2009;64(1):72-80.
122. Djukanovic R, Wilson SJ, Kraft M, Jarjour NN, Steel M, Chung KF, et al. Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(6):583-93.
123. Noga O, Hanf G, Brachmann I, Klucken AC, Kleine-Tebbe J, Rosseau S, et al. Effect of omalizumab treatment on peripheral eosinophil and T-lymphocyte function in patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(6):1493-9.
124. Shimizu Y, Dobashi K, Fueki N, Fueki M, Okada T, Tomioka S, et al. Changes of immunomodulatory cytokines associated with omalizumab therapy for severe persistent asthma. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2011;25(2):177-86.
125. Lacombe Barrios J, Begin P, Paradis L, Hatami A, Paradis J, Des Roches A. Anti-IgE therapy and severe atopic dermatitis: a pediatric perspective. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(5):832-4.
126. Prussin C, Griffith DT, Boesel KM, Lin H, Foster B, Casale TB. Omalizumab treatment downregulates dendritic cell FcepsilonRI expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(6):1147-54.
127. Holgate ST. New strategies with anti-IgE in allergic diseases. *World Allergy Organ J.* 2014;7(1):17.
128. Wakahara K, Van VQ, Baba N, Begin P, Rubio M, Delespesse G, et al. Basophils are recruited to inflamed lungs and exacerbate memory Th2 responses in mice and humans. *Allergy.* 2013;68(2):180-9.
129. Wakahara K, Baba N, Van VQ, Begin P, Rubio M, Ferraro P, et al. Human basophils interact with memory T cells to augment Th17 responses. *Blood.* 2012;120(24):4761-71.
130. MacGlashan DW, Jr., Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, McKenzie-White J, et al. Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils

- during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol.* 1997;158(3):1438-45.
131. Factor JM, Mendelson L, Lee J, Nouman G, Lester MR. Effect of oral immunotherapy to peanut on food-specific quality of life. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012;109(5):348-52 e2.
 132. Carraro S, Frigo AC, Perin M, Stefani S, Cardarelli C, Bozzetto S, et al. Impact of oral immunotherapy on quality of life in children with cow milk allergy: a pilot study. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012;25(3):793-8.
 133. Anagnostou K, Islam S, King Y, Foley L, Pasea L, Bond S, et al. Assessing the efficacy of oral immunotherapy for the desensitisation of peanut allergy in children (STOP II): a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet.* 2014.
 134. van der Velde JL, Flokstra-de Blok BM, de Groot H, Oude-Elberink JN, Kerkhof M, Duiverman EJ, et al. Food allergy-related quality of life after double-blind, placebo-controlled food challenges in adults, adolescents, and children. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(5):1136-43 e2.
 135. Bice JB, Leechawengwongs E, Montanaro A. Biologic targeted therapy in allergic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014;112(2):108-15.
 136. Senti G, Kundig TM. Intralymphatic immunotherapy. *World Allergy Organ J.* 2015;8(1):9.
 137. Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol.* 2014;5:7.