

# BIOLOGIE DE L'ALLERGIE

R. Pescarmona  
Laboratoire d'Immunologie  
Groupement Hospitalier Sud -Lyon

# Exploration biologique de l'Hypersensibilité de type I

1/ Tests sériques  
(nouveaux outils = allergènes moléculaires)

2/ Tests **cellulaires** : Test d'Activation des Basophiles

# Réactions d'hypersensibilité aux médicaments

## Réactions d'hypersensibilité aux médicaments

```
graph TD; A[Réactions d'hypersensibilité aux médicaments] --> B[Hypersensibilité Allergique (HSA)]; A --> C[Hypersensibilité Non-Allergique (HSNA)];
```

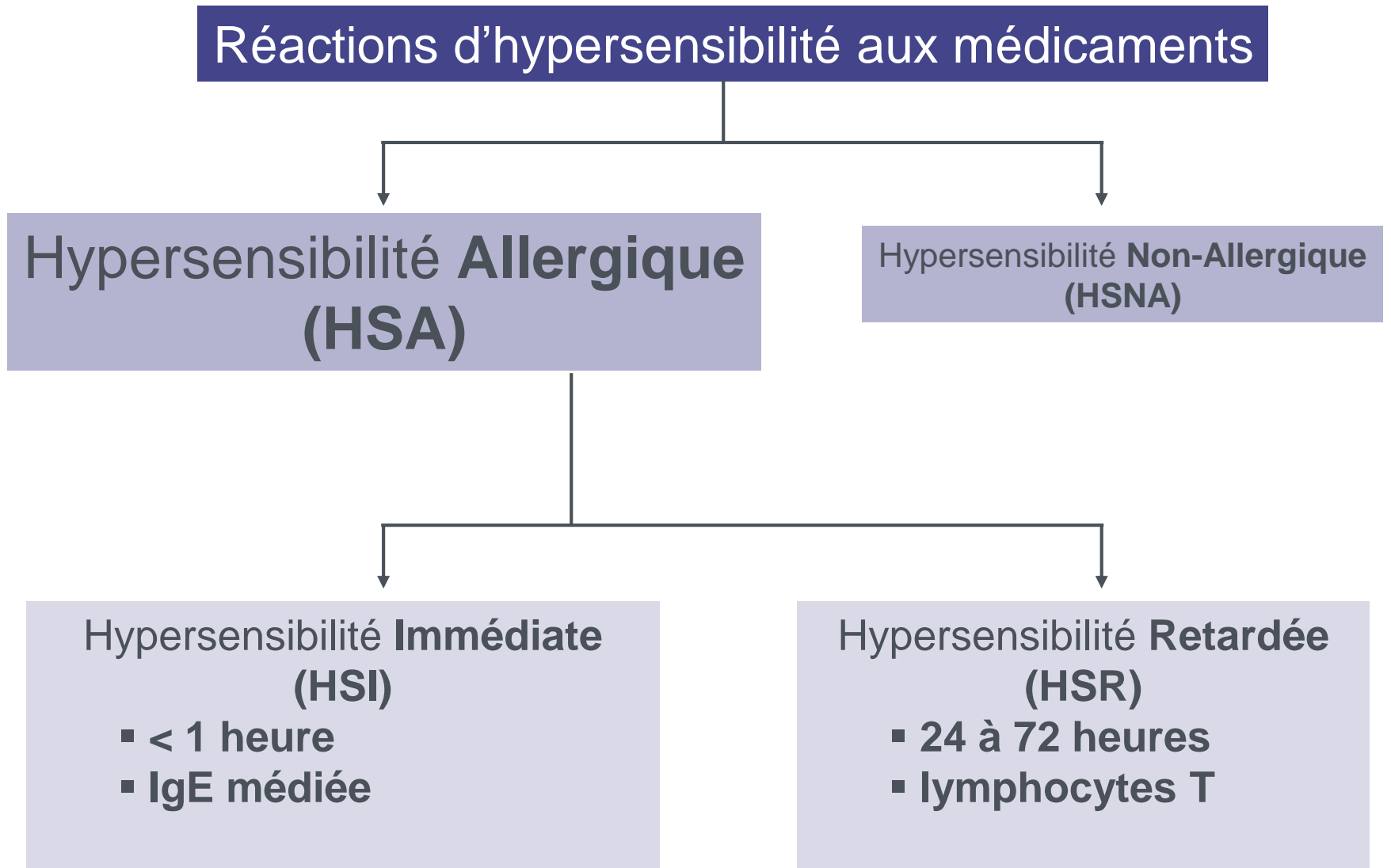
Hypersensibilité **Allergique**  
(HSA)

Hypersensibilité **Non-Allergique**  
(HSNA)

Rare  
Grave  
Mécanisme spécifique (IgE ou T  
spécifiques)  
Réintroduction impossible

Fréquence+++  
Faible gravité (urticaire isolé)  
Mécanisme non spécifique  
(contexte clinique particulier)  
Réintroduction possible

# Réactions d'hypersensibilité aux médicaments



# Limites du dosage des IgE spécifiques

1. Nombre limité de tests commerciaux disponibles pour certains antigènes (médicaments) pour des raisons :
  - Techniques : Difficulté de produire des réactifs pour doser des IgE spécifiques dirigées contre des haptènes
  - Commerciales : Fréquence faible des allergies médicamenteuses par rapport aux allergies aux antigènes protéiques (respiratoires, alimentaires et venins)
2. Le dosage des IgE spécifiques est un dosage **quantitatif**, qui ne prend pas en compte l'affinité de l'IgE vis-à-vis de l'Ag
  - Quantité d'IgE n'est pas forcément un signe de gravité de l'allergie
  - Certains individus ont des IgE spécifiques sans être allergique : sensibilisation biologique

# Limites du dosage des IgE spécifiques

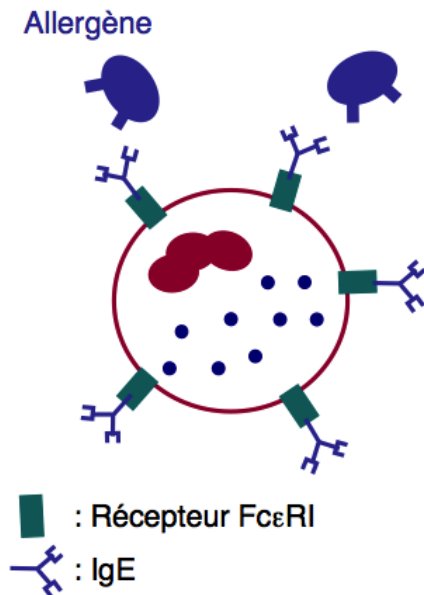
Nécessité de développer des tests « à la carte » permettant de tester n'importe quel allergène (ie : médicament qu'a reçu le patient lors de son accident)

= Test d'Activation des Basophiles

# Test d'Activation des Basophiles (TAB)

- Principe :
  - ▣ Reproduire *in vitro* les conditions ayant conduit aux phénomènes allergiques cliniques observés chez le patient :

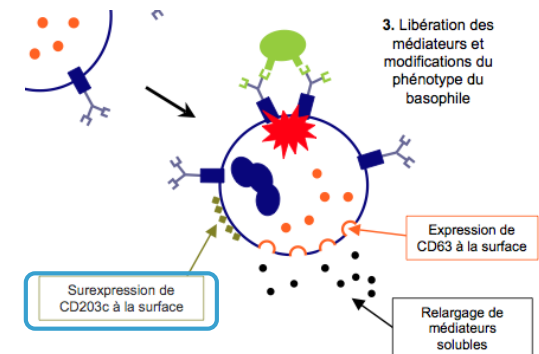
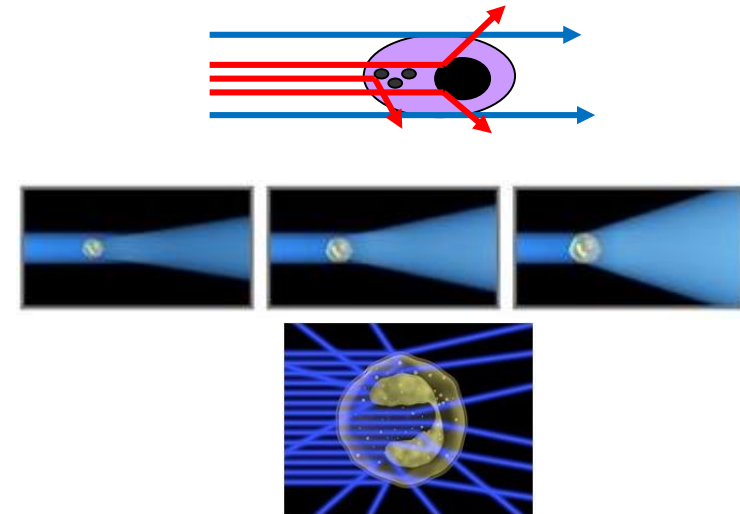
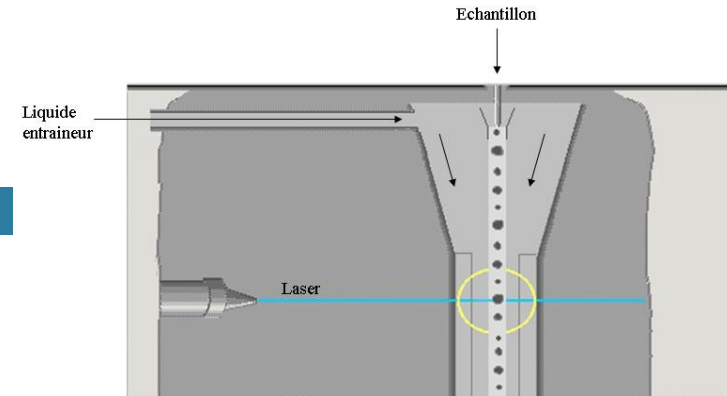
Incubation des basophiles sensibilisés avec l'allergène ayant provoqué la réaction



# Avec quel outil ?

## Cytométrie en Flux

- Technique d'analyse des cellules en suspension dans un liquide
- Passage des cellules devant une source laser
- Emission d'un signal de diffraction laser : renseignements sur la taille et la structure des cellules
- Emission d'un signal de fluorescence par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes fixés sur les cellules



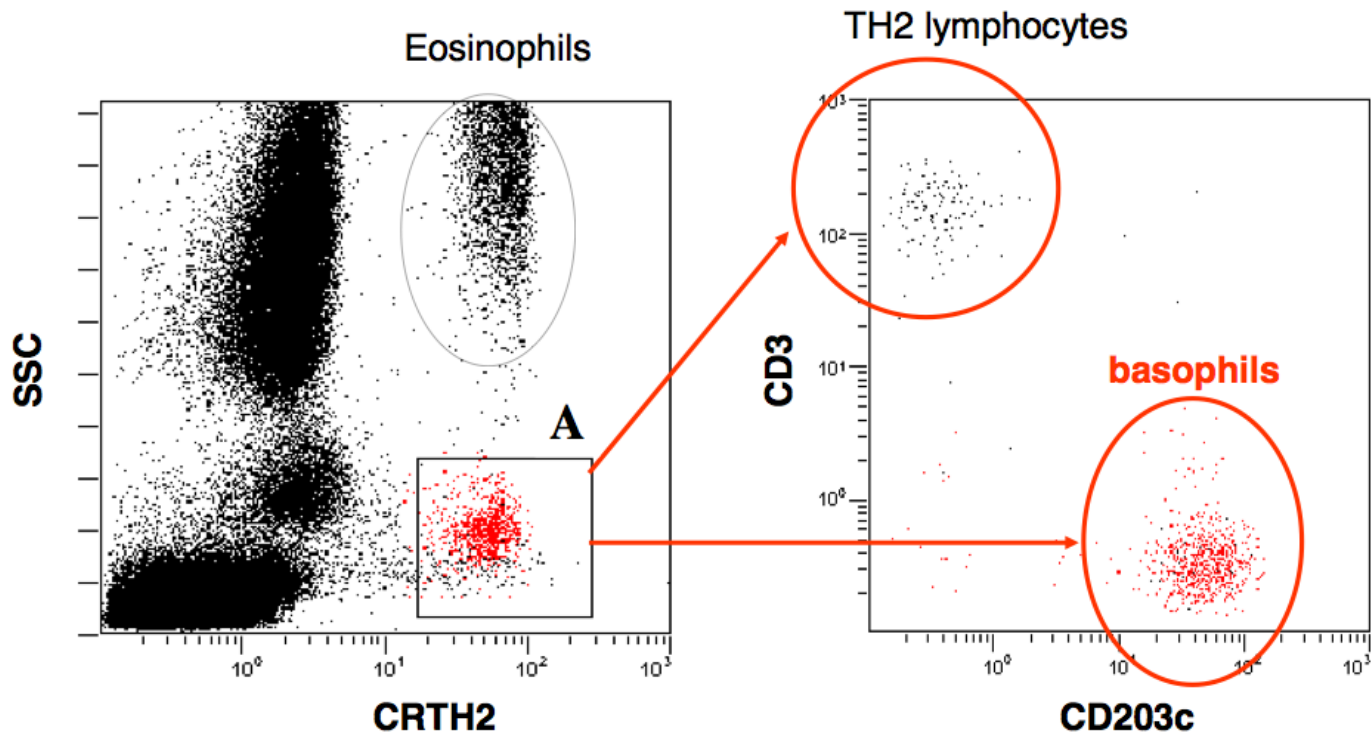


# Conditions à respecter:

- ✓ **Réalisation de contrôles:**
  - Contrôle **négatif**: en présence de tampon seul
  - Contrôle **positif** : stimulation par anti-IgE ou anti-récepteur FcεRI  
N.B. ≈ 10% de non répondeurs
  
- ✓ **Réalisation des dilutions de médicaments:**
  - Au moins 3 dilutions en se basant sur le Prick Test
  - Vérifier l'absence de toxicité pour les basophiles
  - Vérifier l'absence d'activation non spécifique
  
- ✓ **Critères d'interprétation des résultats:**
  - Expression en % de **basophiles activés** et/ou **index de stimulation**
  - Seuil de positivité: **10% voire 5%**, à définir pour chaque médicament
  - Activation beaucoup plus faible que pour les allergènes protéiques

# Test d'Activation des Basophiles (TAB)

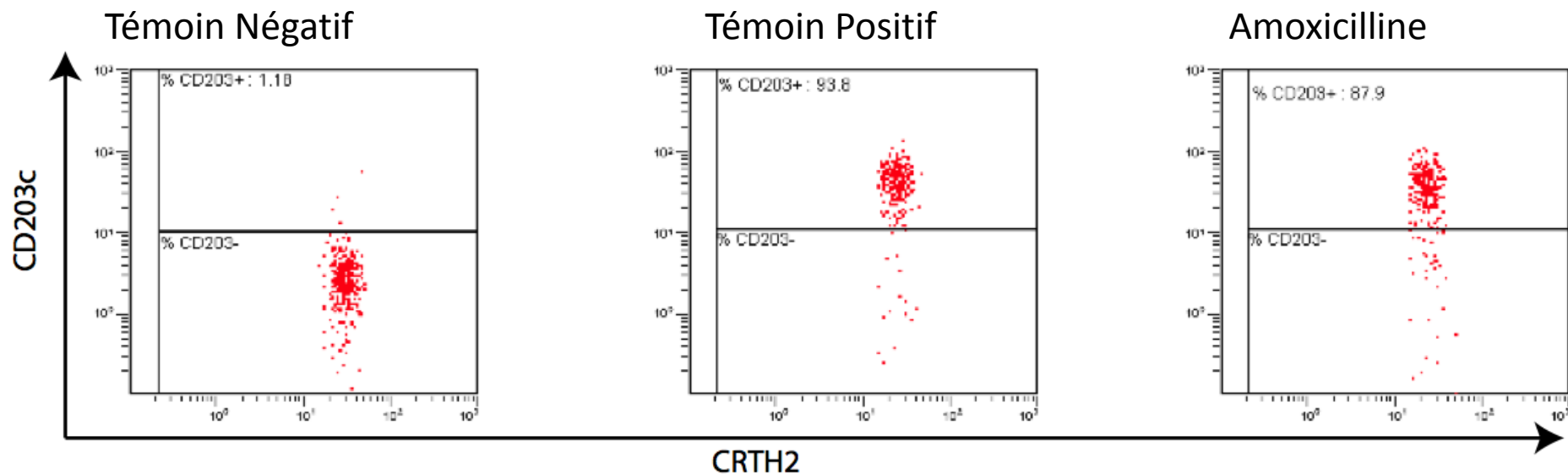
- Pas de consensus sur l'identification des basophiles
- Marquages les plus utilisés :
  - ▣ CD3-, CRTH2+
  - ▣ CCR3+, Faible SSC



# Principaux marqueurs d'activation utilisés:

	<b>CD203c</b>	<b>CD63</b>
Nom	Ectonucleotide Pyrophosphatase phospho- diesterase (E-NPP3)	Lysosomal Associated protein 3 (LAMP-3)
Exprimé par	Basophiles, mastocytes	Basophiles, mastocytes, monocytes, plaquettes
Expression sur les basophiles quiescents	Expression constitutive <b>faible</b>	<b>Non exprimé</b> à la surface Exprimé à la surface des granules de sécrétion
Expression sur les basophiles activés	<b>Sur-expression</b>	<b>Exposition</b> à la surface cellulaire
Cinétique	Rapide (5-15 min)	Plus lente (10-25 min)

# Exemple d'activation en présence d'Amoxicilline:

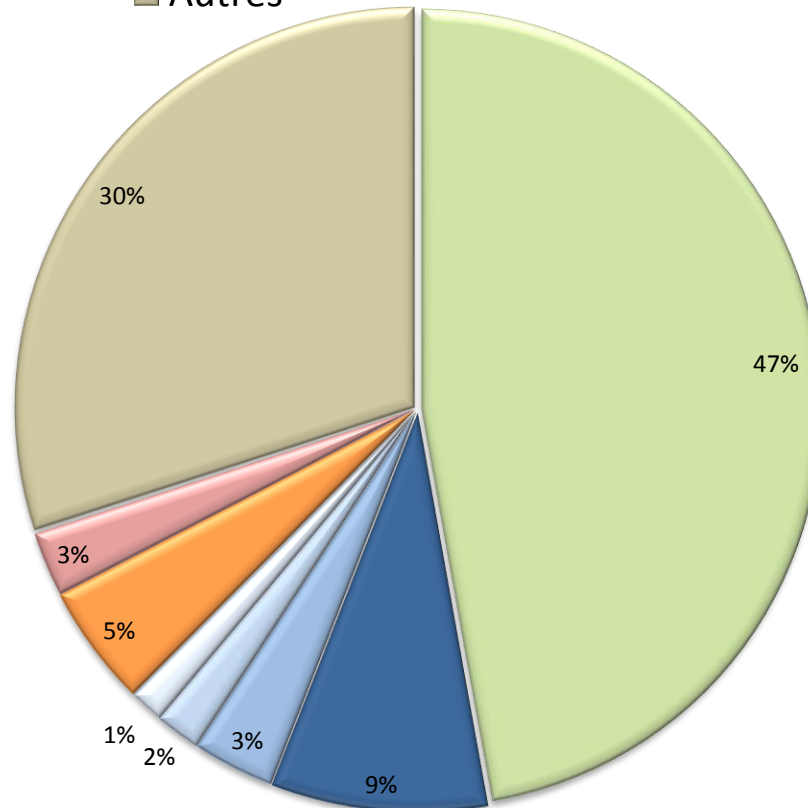


# Utilisation des TAB en routine : exploration des réactions d'HSI aux médicaments

- Curares
  
- Antibiotiques :
  - $\beta$ -lactamines
  - Fluoroquinolones
  - Pyostacine
  
- Produits de contraste (iodés/gadolinés)
  
- Bleu patente
  
- Produits de chimiothérapie (Platines, Taxol)

## Demande de TAB au laboratoire d'Immunologie du CHLS entre 2012 et 2013 (n=1840)

- Curares
- Augmentin
- Platines
- Clamoxyl
- Pyostacine
- Autres
- Rocephine
- Produits de Contraste



# b-lactamines :

Author (year)	Reference test	Activation marker	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Patients and controls (n)
Sanz <i>et al.</i> (2002)	H	CD63	50	93	88
Torres <i>et al.</i> (2004)	H ± ST ± IgE ± DPT	CD63	49	91	110
Abuaf <i>et al.</i> (2008)	H ± ST	CD203c CD63	52 22	100 79	41
Eberlein <i>et al.</i> (2010)	H ± ST ± IgE	CD63-CCR3 <sup>+</sup> CD63-IgE <sup>+</sup>	55 53	100	39
De Weck <i>et al.</i> (2009)	H	CD63	50	89–97	262

Ebo DG *et al.*, Expert Review, 2011

# Curares:

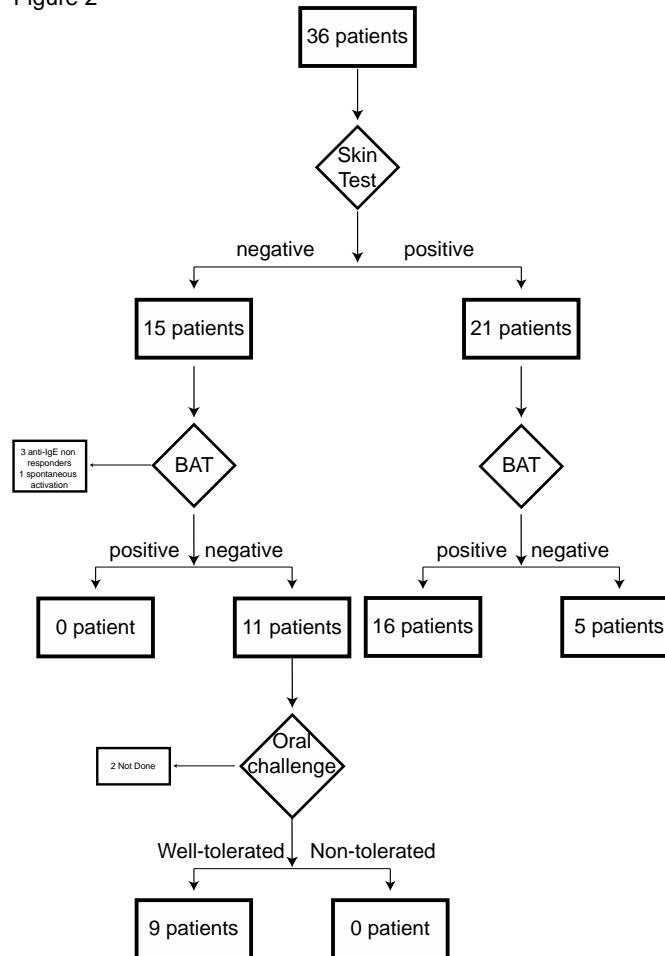
Study (year)	Stimulus	Reference test	Activation marker	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Patients and control individuals (n)
Abuaf <i>et al.</i> (1999)	NMBA	H	CD63 CD45	64 43	81 96	28
Monneret <i>et al.</i> (2002)	NMBA	H ± ST	CD63	54	100	56
Sudheer <i>et al.</i> (2005)	NMBA	H	CD63 CD203c	79 36	100 100	31
Kvedariene <i>et al.</i> (2006)	NMBA	H + ST	CD63	36–86 <sup>†</sup>	93	92
Ebo <i>et al.</i> (2006)	Rocuronium <sup>†</sup> nonresponders: 76	H + ST	CD63	92	100	22
Sainte-Laudy and Orsel (2008)	NMBA	H ± ST ± IgE	CD63	60	100	49

Ebo DG *et al.*, Expert Review, 2011



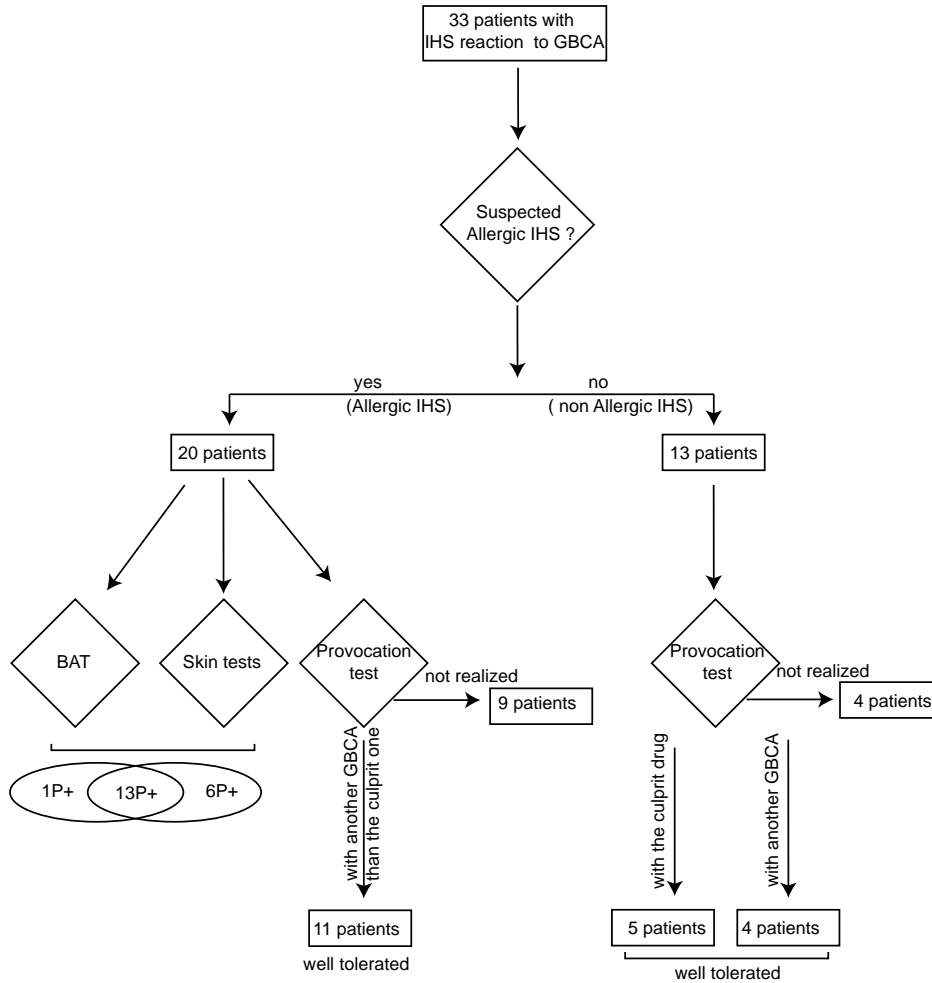
# Expérience à Lyon Sud : la pyostacine

Figure 2



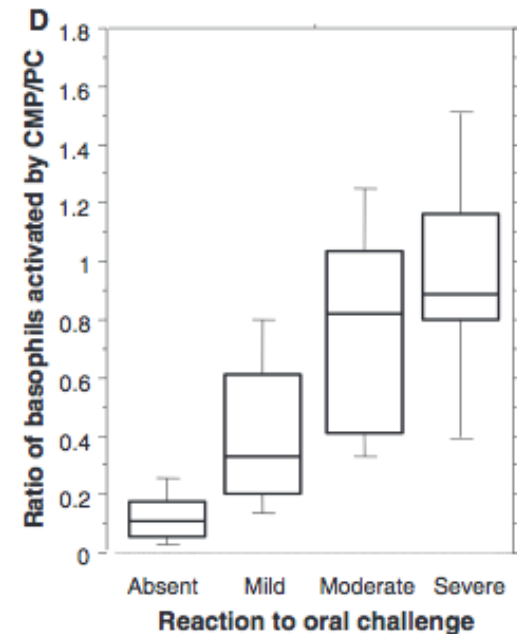
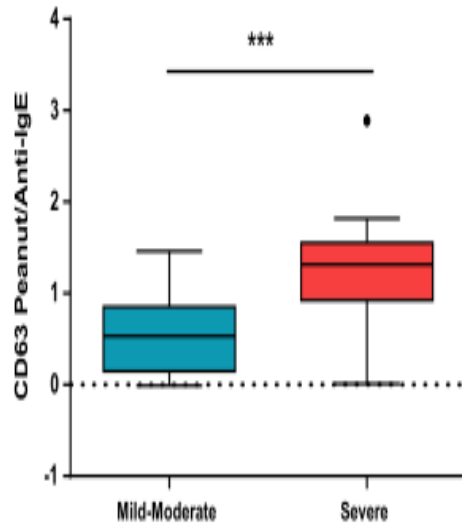
# Produits de contraste gadolinés:

C



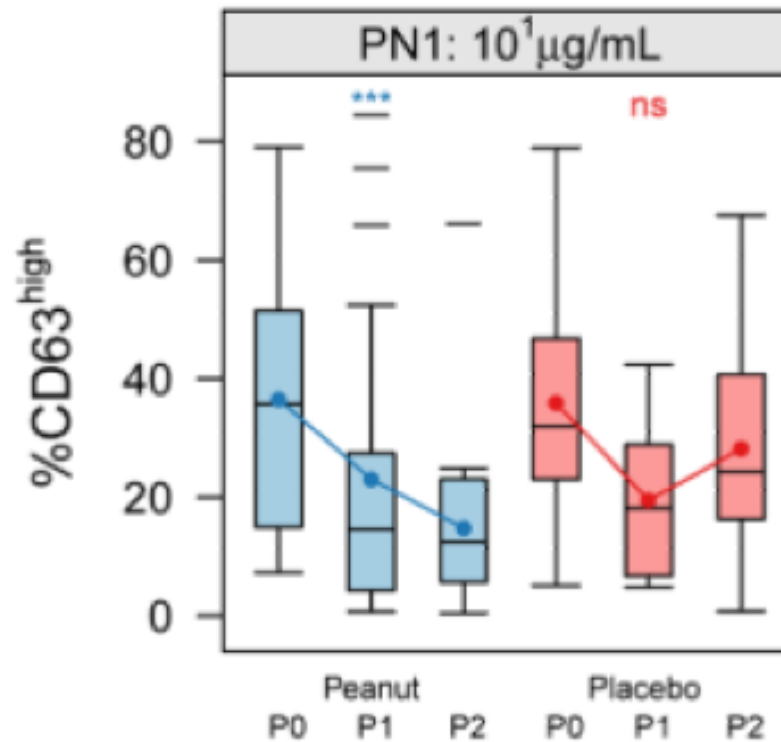
# Utilisation des TAB hors routine

- Evaluer la pertinence clinique d'une sensibilisation :
  - ▣ Ex IgE *Aspergillus fumigatus* chez les patients muco/asthmatiques : ABPA ?
- Marqueur de « gravité » de l'allergie :



# Utilisation des TAB hors routine

- Suivi des Immunothérapies spécifiques (ITS) :
  - ▣ Diminution de la réactivité des basophiles au cours de l'ITS

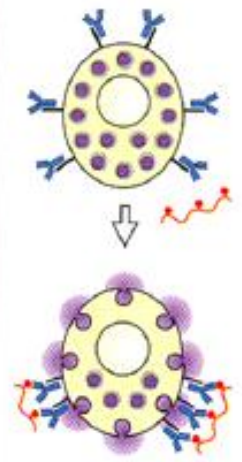
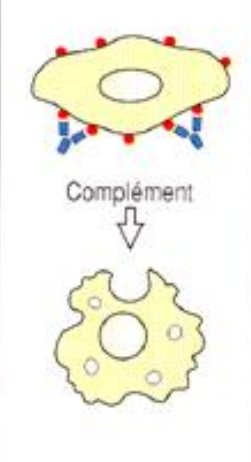
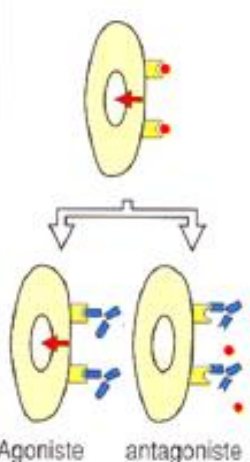
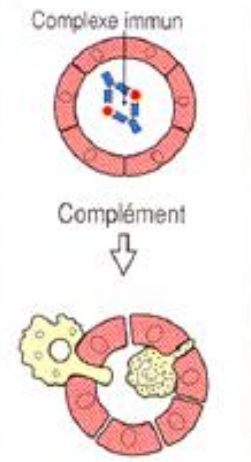
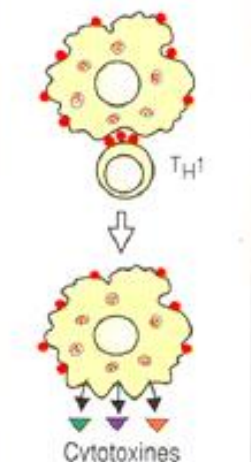
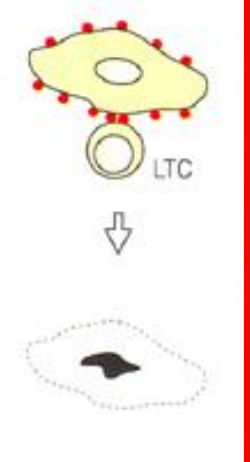


# En conclusion sur les TAB

- Test fonctionnel qui évalue la réactivité des basophiles vis-à-vis de l'allergène
- Très performant pour les allergènes protéiques
- Mais, application aux médicaments difficile :
  - médicaments = haptènes monovalents le plus souvent
- Très utile lorsque la détermination des IgE n'est pas possible (14 allergènes médicamenteux disponibles)
- Dans l'exploration des HSI médicamenteuses :
  - Sensibilité **faible**
  - Spécificité **excellente**

# Explorations biologiques des réactions de type IV

---

	Type I	Type II		Type III	Type IV	
Réactif immun	Anticorps IgE, Cellules T <sub>H2</sub>	Anticorps IgG		Anticorps IgG	Cellules T	
Antigène	Antigène soluble	Antigène associé aux cellules ou à la matrice	Récepteurs sur la surface cellulaire	Antigène soluble	Antigène soluble	Antigènes associé aux cellules
Mécanisme effecteur	Activation des mastocytes	Complément cellules Fc R <sup>+</sup> (phagocytes, cell. NK)	L'anticorps modifie le signal	Complément Phagocytes	Activation des macrophages	Cytotoxicité
						
Exemple de réaction d'hypersensibilité	Rhinite allergique, asthme, anaphylaxie systémique	Certaines allergies médicamenteuses (ex: pénicilline), réaction transfusion- nelle, anémie hémoly- tique auto-immune	Maladie de Graves (agoniste) Myasthénie (antagoniste)	Maladie sérique, Lupus érythéma- teux disséminé	Dermite de contact, Rejet de greffe, Arthrite rhumatoïde	Dermite de contact, Rejet de greffe, Diabète sucré

**Retardée** : 48 à 72 h délai nécessaire à la rencontre de l'Ag avec T spécifiques, leur prolifération et migration des mono/macrophages

# Hypersensibilité de type IV : Les Antigènes

- Antigènes protéiques :
  - Infections bactériennes, parasitaires, mycosiques et virales
  - Développement intracellulaire

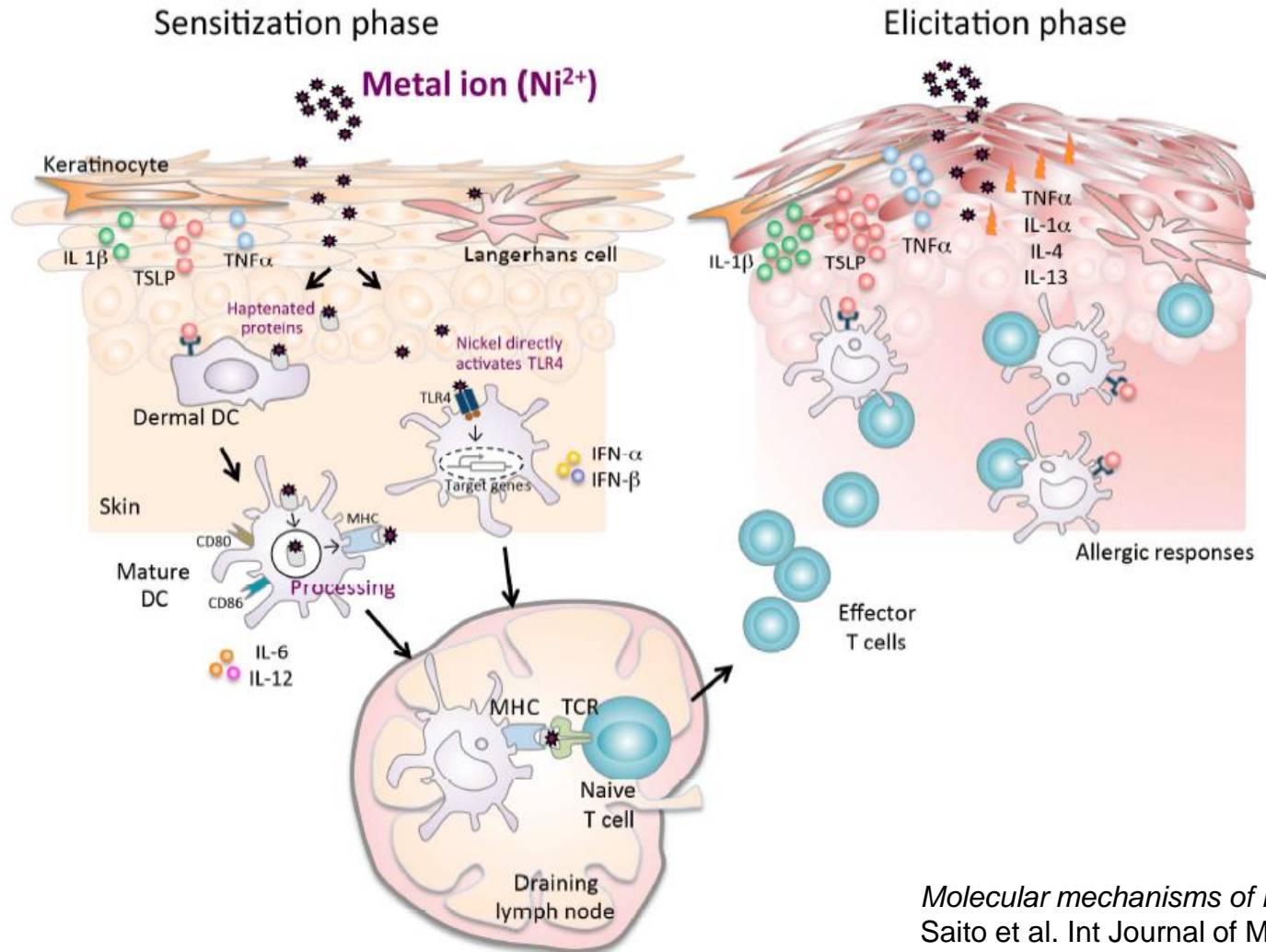
## Haptènes :

- Substances responsables d'eczéma de contact
  - Nickel
  - Cosmétiques, produits d'entretien, industrie, ..
  - Dinitrochlorozène DNCB
  - Dinitrofluorobenzène DNFB
- Médicaments impliqués dans les réactions d'HSR



# Hypersensibilité de type IV

## Mécanismes effecteurs : exemple du Nickel



# Hypersensibilité de type IV et Pathologie humaine

1. Défense anti-infectieuse
2. Eczéma de contact
3. Hypersensibilité médicamenteuse retardée

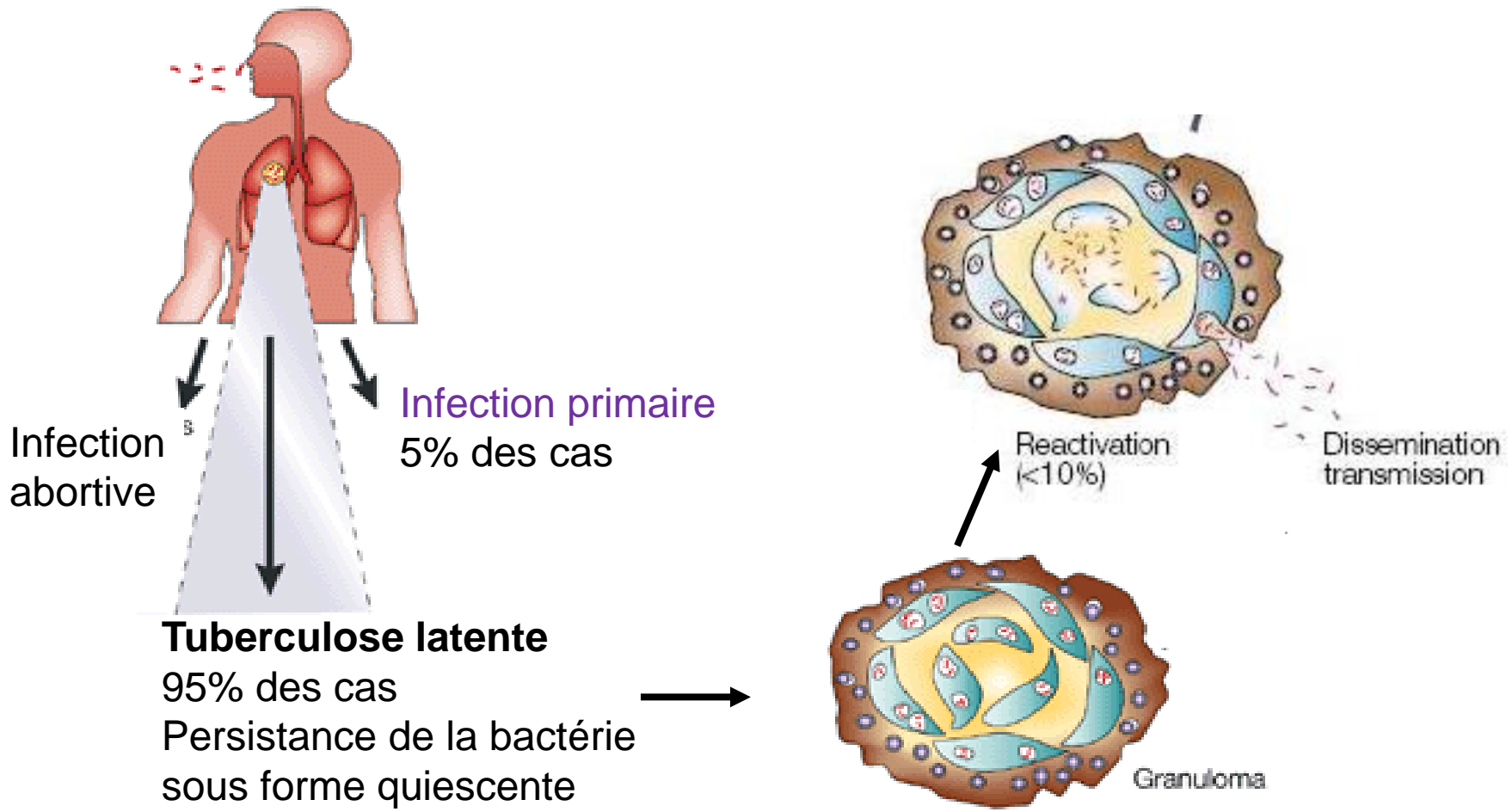
# 1. Défense anti-infectieuse

Infections bactériennes, parasitaires, mycosiques et virales :

- **Mycobacterium tuberculosis**, leprae
- Brucella
- Toxoplasma gondii
- Leishmania major
- Candida albicans
- CMV, herpes

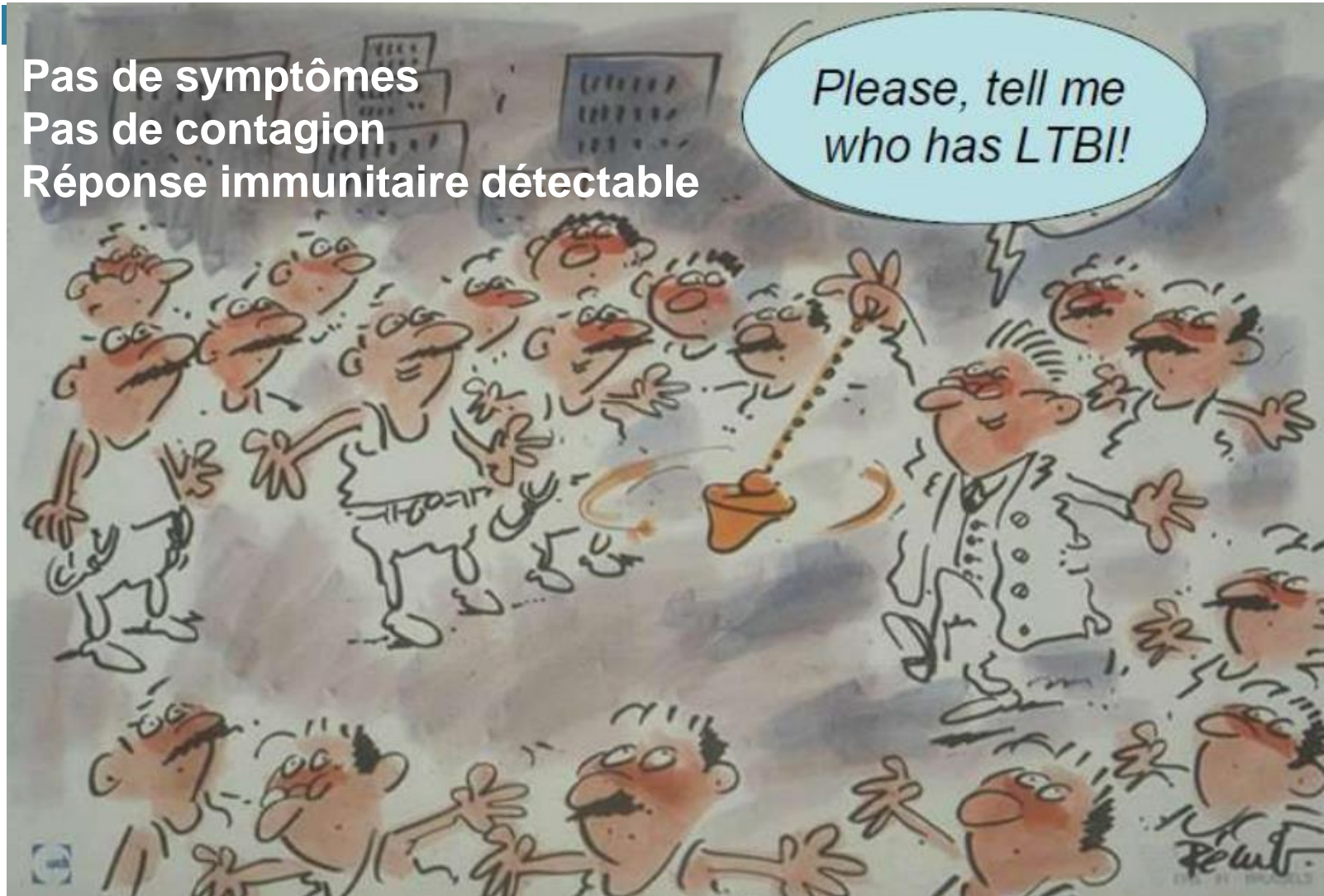
Exemple : exploration de l'immunité anti-tuberculeuse

# Contamination par *Mycobacterium tuberculosis*



# Détection de l'infection tuberculeuse latente

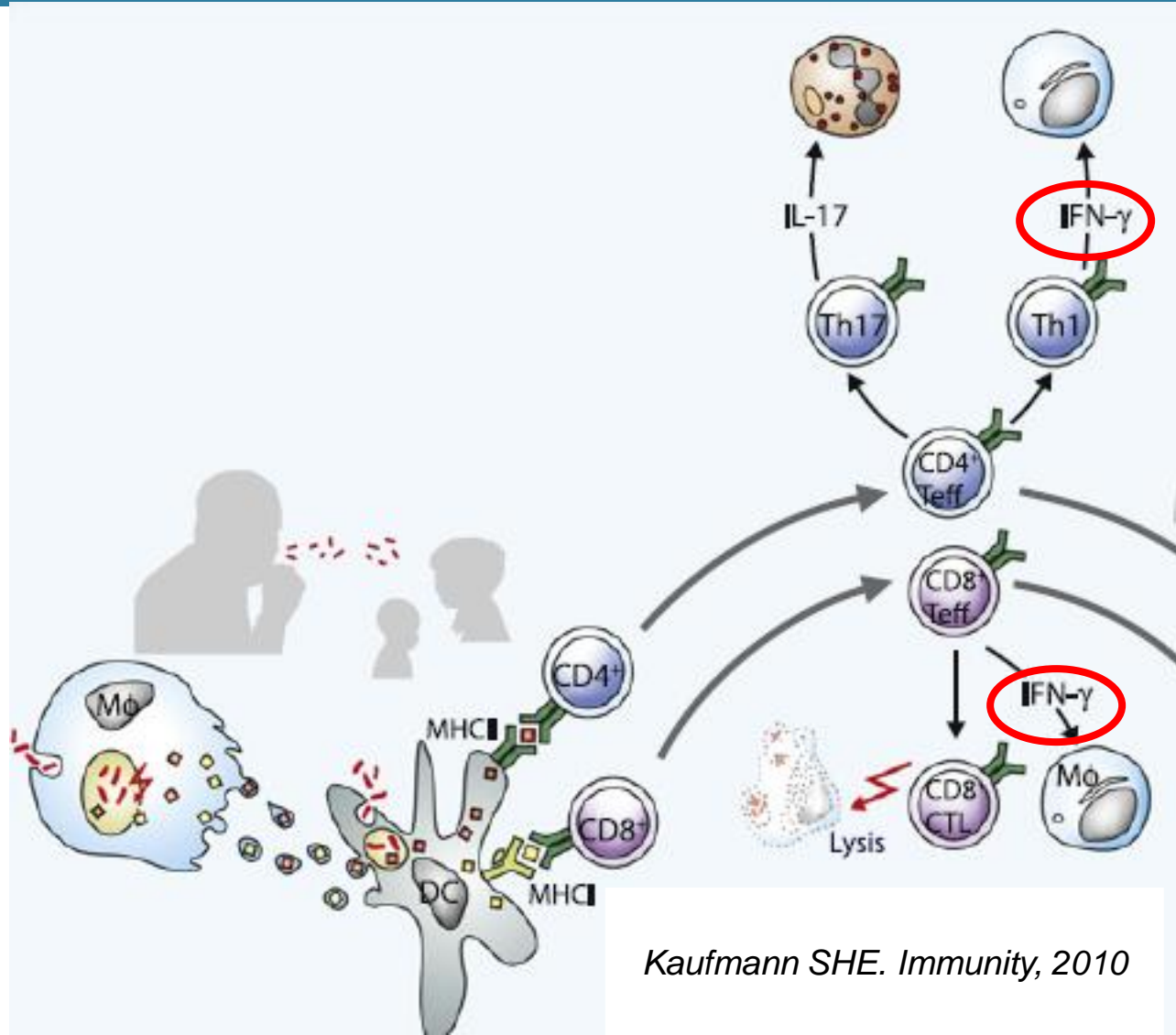
Pas de symptômes  
Pas de contagion  
Réponse immunitaire détectable



## 1. Défense anti-infectieuse

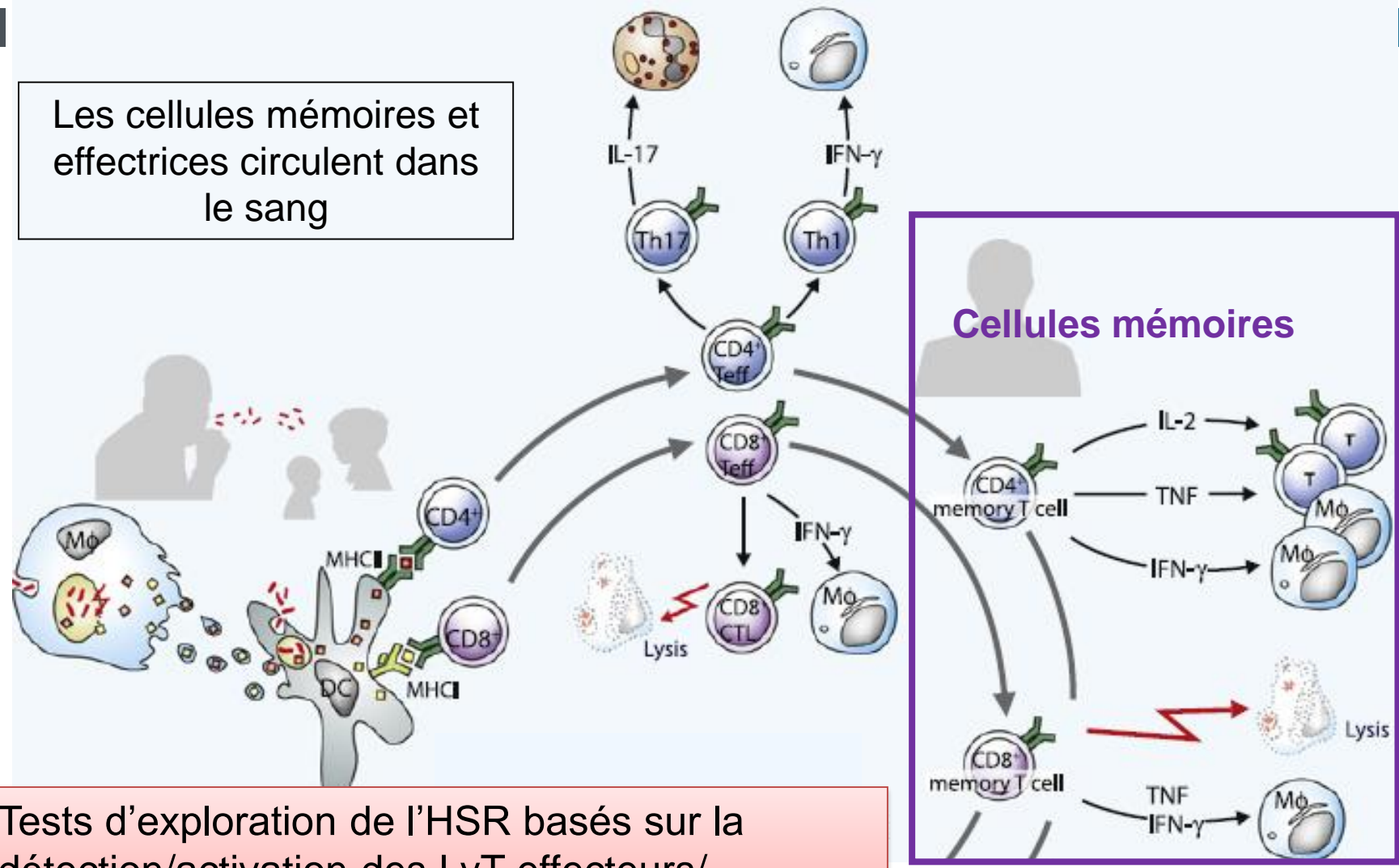
# Immunité anti-tuberculeuse : Réponse immunitaire adaptative

- Immunité anti-tuberculeuse protectrice : **type Th1**
- Antigènes de *M. tuberculosis* présentés par les cellules dendritiques aux Ly T naïfs
- Différenciation des Ly en Ly Th1 sous l'influence de l'Interleukine 12



# Immunité anti-tuberculeuse : Mémoire immunitaire

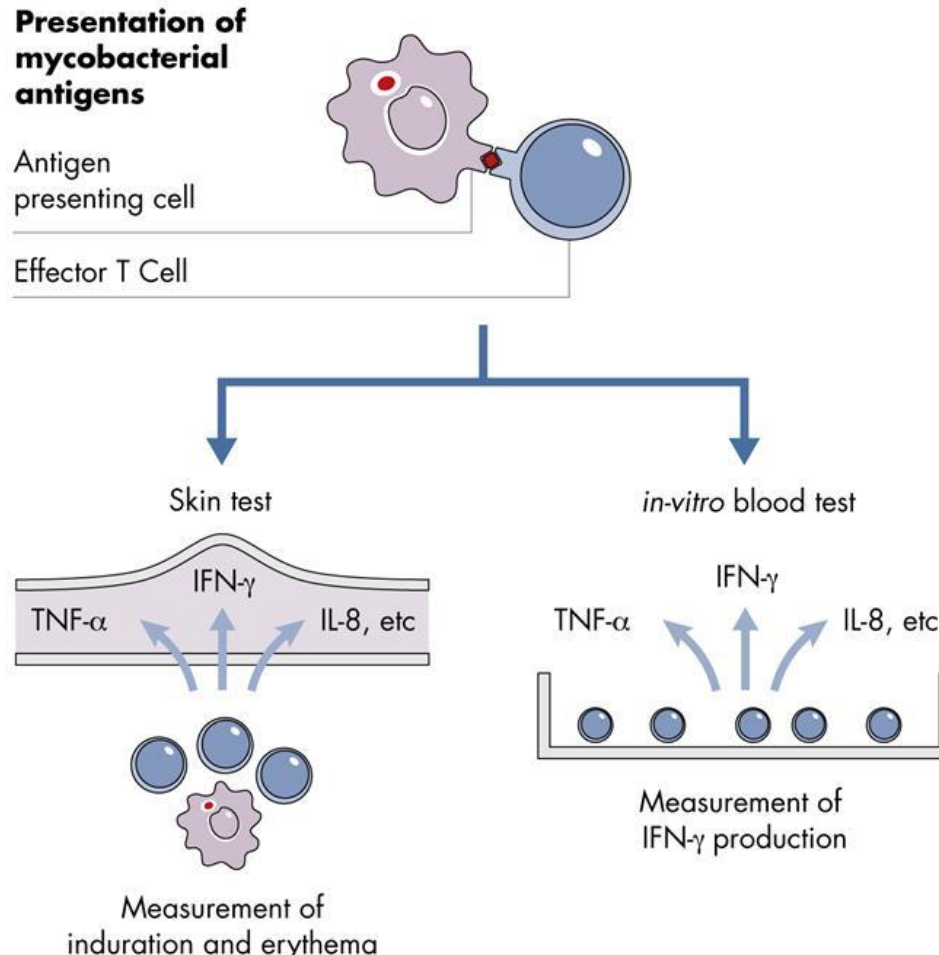
Les cellules mémoires et effectrices circulent dans le sang



Tests d'exploration de l'HSR basés sur la détection/activation des LyT effecteurs/mémoire

# Outils diagnostiques de l'infection tuberculeuse latente

- Test cutané : Intradermoreaction à la tuberculine (hypersensibilité type IV)
- Tests de détection de l'IFN- $\gamma$  (IGRAs Interferon-gamma-release Assays)





# Outils diagnostiques de l'Infection tuberculeuse latente

## Intradermoréaction (IDR) à la tuberculine

- Source antigénique : > 200 protéines de *M.tuberculosis*
- Lecture à 72h par mesure du diamètre d'induration en mm
- Seuil de positivité



### □ Limites :

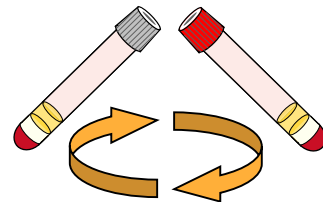
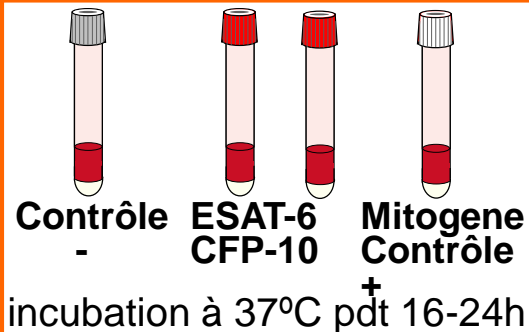
- Subjectivité
- **Sensibilité moyenne**
- Nécessité de 2 visites
- **Faible spécificité :**
  - Réaction croisée avec le vaccin BCG
  - Mycobactéries non tuberculeuses (NTM)



# QuantiFERON®-TB GOLD PLUS

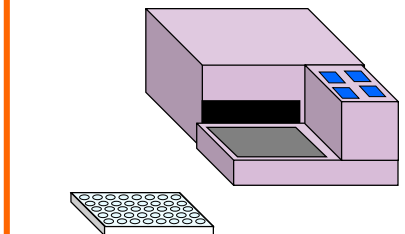
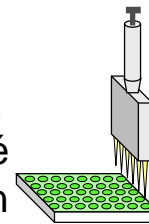


- **Test ELISA** (Enzyme linked Immunosorbent Assay)
- Incubation du sang total périphérique (anticoagulant héparine) avec les protéines mycobactériennes
- Dosage de l'IFN- $\gamma$  plasmatique par technique ELISA (UI/mL)
- B 150
- Sensibilité : 80-90%



2. Centrifugation

3. Plasma  
+conjugué  
Incubation  
2H



4. Lecture  
spectrophotométrique

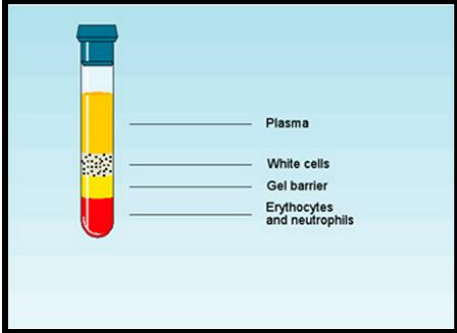
# Test IGRA : QuantiFERON : Interprétation

	<u>Nul</u> Témoin – Tube gris	<u>TB1 – Nul</u> Tube patient Tube vert	<u>TB2 – Nul</u> Tube patient Tube jaune	<u>Mit – Nul</u> Témoin + Tube violet	Résultat
IFN gamma (UI/mL)	$\leq 3$	$< 0.35$	$< 0.35$	$\geq 0.5$	<b>NEGATIF</b>
	$\leq 3$	0,35 – 0,6	0,35 – 0,6	$\geq 0.5$	<b>DOUTEUX</b>
	$\leq 3$	$\geq 0.6$ 0,35 – 0,6	0,35 – 0,6 $\geq 0.6$	$\geq 0.5$	<b>POSITIF</b>
	$\leq 3$			$\leq 0.5$	<b>ININTERPRETABLE</b> Abs ctrl positif
	$\geq 3$				<b>ININTERPRETABLE</b> Activation spontanée

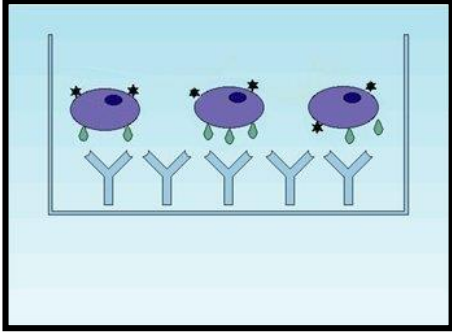
- Variabilités inter et intra individuelles importantes : **pas d'interprétation quantitative** des résultats
- **Zone grise:** 0,35 – 0,6 UI/mL-> résultat à contrôler

# Tests IGRA T-SPOT®TB : Technique ELISPOT

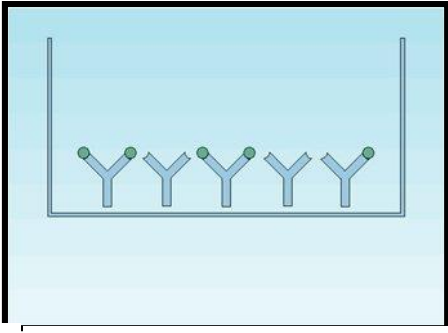
A partir de Cellules mononucléées  
Antigènes spécifiques (testés séparément) : ESAT, CFP-10



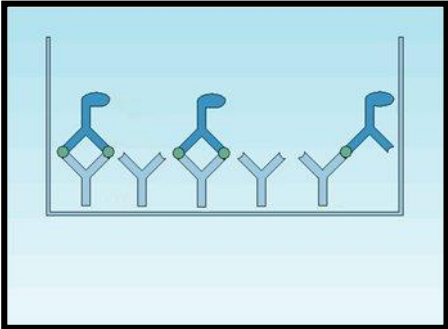
PBMC après extraction Ficoll ou tubes BD CPT



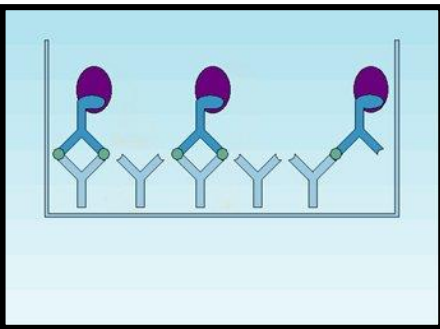
Ajout des PBMC et Ags TB. Les Ly T sécrètent l'IFN-g.



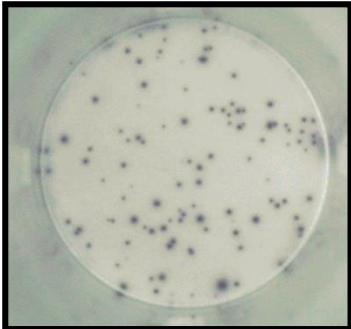
Capture de l'IFN-g par les anticorps. Incubation.



Lavages et ajout de l'Ac conjugué



Ajout du substrat



Apparition des spots en 7 minutes

**Chaque spot correspond à une cellule sécrétrice d'IFN- $\gamma$**

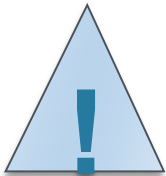
# Tests IGRA : sélection d'antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*

- Antigènes spécifiques
  - **ESAT-6**
  - **CFP-10**
- Codage par les gènes de la région RD1
- Absents de la plupart des mycobactéries atypiques
- Induisent la sécrétion d'IFN- $\gamma$

# Tests IGRA : Interprétation clinique et biologique

## □ TEST **POSITIF**

- fréquence élevée de Ly T (effecteurs/mémoires) spécifiques de *M. tuberculosis* : **rencontre de *M. tuberculosis***
- **faux positifs rares** (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M.szulgai* <200 cas / an en France)
- → Risque de **réactivation** *M. tuberculosis* si immunodépression (infection VIH, tt anti-TNF)



Les IGRA ne permettent pas de distinguer l'infection tuberculeuse latente de la tuberculose maladie

Il ne permettent pas non plus de définir l'**ancienneté** de l'infection, le **risque d'évoluer** vers une tuberculose maladie, ni le suivi d'une antibiothérapie anti-tuberculeuse

# Recommandations pour la prescription des tests IGRA : HAS 2006

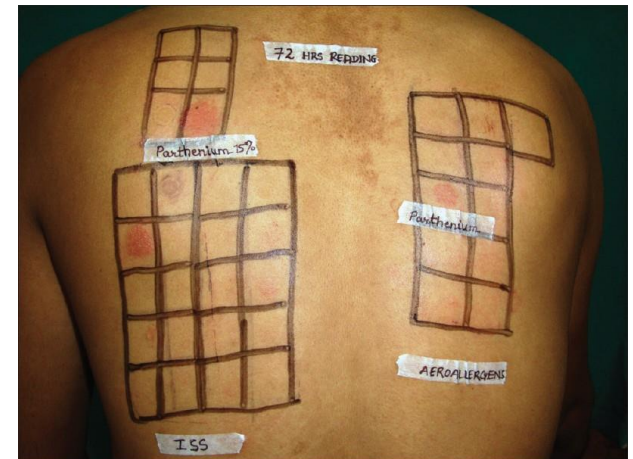
39

4 indications retenues des tests IGRA pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente en remplacement de l'IDR :

- Diagnostic de tuberculose-infection latente pour réaliser l'**enquête autour d'un cas** (sujet > 15 ans)
- Lors de l'**embauche**, pour les professionnels de santé et ceux qui travaillent dans un service à risque, c'est-à-dire dans les mêmes conditions que celles préconisées par les recommandations sur l'IDR
- Aide au **diagnostic des formes extra pulmonaires** de la tuberculose maladie
- Avant mise en route d'un **traitement par anti-TNF $\alpha$**

## 2. Dermite de contact

- 10% des motifs consultation en dermatologie
- Travailleurs de l'industrie, cosmétique, produits d'entretien, médicaments
- Haptènes en cause très variés
- Diagnostic : **Patch tests / IDR à lecture retardée**



Tests biologiques -> manque de sensibilité



### 3. Hypersensibilité médicamenteuse retardée

## Entités cliniques

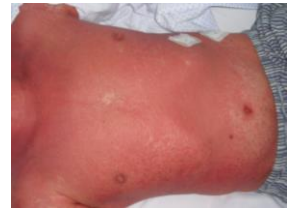
### Formes localisées

- Erythème Pigmenté Fixe
- Exanthème maculo-papuleux



### Formes systémiques

- Pustulose Exanthématique Aigue généralisée
- DRESS
- Syndrome de SJ
- Syndrome de Lyell



# Diagnostic

- En phase aigue : Examen clinique/paraclinique
  - Nature des lésions
  - Délai d'apparition des lésions
  - Imputabilité du médicament
  
- En phase chronique : mise en évidence de LT spécifiques
  - Outils cliniques (Patchs tests, IDR à lecture retardée)
    - Sensibilité # 70% (A Barbaud)
  - Outils biologiques (TTL, ELISPOT et ELISA Cytokine Release Assay)

# Les outils biologiques

## - Test de Transformation Lymphocytaire (référence)

Thymidine tritiée



Incubation 6j, 37°C

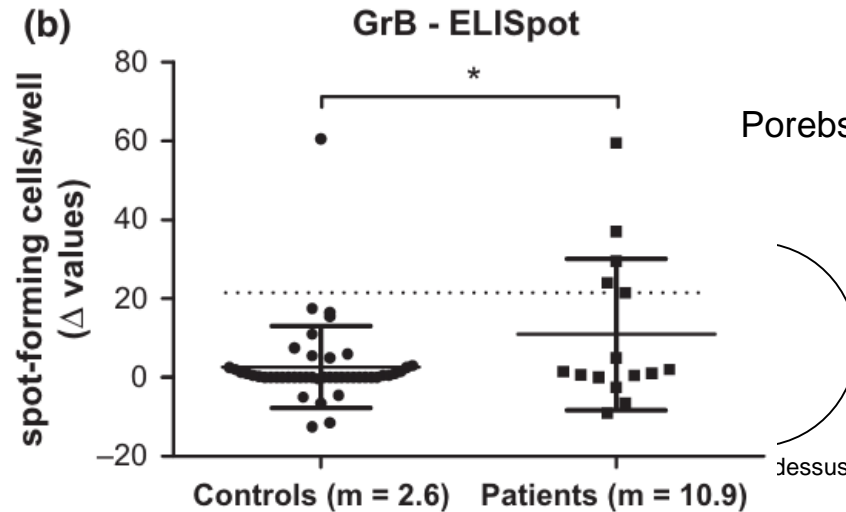
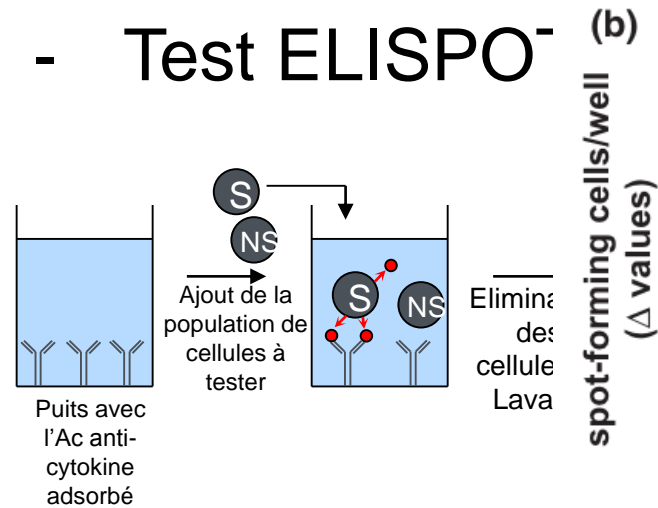
- Mesure de la prolifération lymphocytaire :
- Incorporation de thymidine tritiée
  - Marqueurs « froids » (CFSE, BrdU)
  - Témoin de la présence de LT spécifique

## - Limites :

- Liées à l'utilisation de la radioactivité
- Sensibilité faible (60%)
- Techniques longues (6-7j)

# Les outils biologiques

## - Test ELISPO<sup>-</sup>



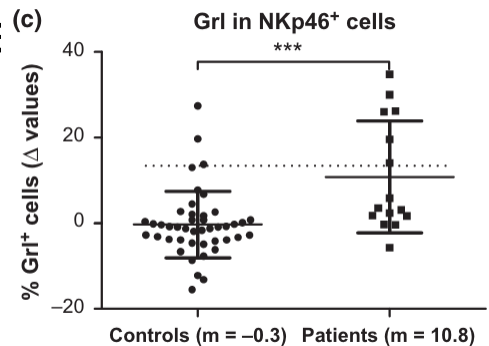
Porebski et al, Clin exp allergy, 2013

- Possibilité de détecter différents médiateurs (IL-4, IFN- $\gamma$ , Granzyme B)
- mais sensibilité à optimiser
- Et résultats difficiles à reproduire

# Les outils biologiques

- Test d'Activation cellulaire
  - Incubation des PBMCs/sang total avec l'allergène
  - Mesure par Cytométrie en Flux de l'expression de marqueurs d'activation lymphocytaire:
    - membranaires (CD69)
    - intracytoplasmiques (Granulysine, granzyme)
    - cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5)

Porebski et al, Clin exp allergy, 201



# Les outils biologiques

## *In vitro* drug causality assessment in **Stevens-Johnson syndrome**

### Alternatives for lymphocyte transformation test

*Porebski et al. , Clinical Exp Allergy, 2013*

- 15 patients avec syndrome de Steven Johnson ou Toxidermie nécrosante
  - TTL : positif chez 4/15 patients (Sensibilité : 27%)
  - ELISpot Granzyme B : positif chez 5/15 patients (Sensibilité : 33%)
  - Expression de granulysine par LyT CD4+ : positif chez 6/15 patients (Sensibilité : 40%)
  - Test de production d'IFN- $\gamma$  : positif chez 6/11 patients (Sensibilité : 55%)
- Conclusion : combinaison de plusieurs tests :
  - Expression de granulysine par LyT CD4+
  - Granzyme B ELISpot
  - Test de production d'IFN gamma- $\gamma$

Se : 80% et Sp : 95%
- **Combinaison des tests : limite pour une application en routine**

# Exploration de l'HSR

- Intérêt +++ dans le diagnostique de l'infection tuberculeuse latente.
- Peu d'autres applications *in vitro* du fait du manque de sensibilité notamment pour l'exploration des hypersensibilités médicamenteuses
- Nombreuses applications potentielles