



BIOLOGIE DE L'ALLERGIE

L. GARNIER/ S. VIEL
Laboratoire d'Immunologie
Groupement Hospitalier Sud -Lyon

DES/DESC
Séminaire Hypersensibilité
7 février 2019

Exploration biologique de l'Hypersensibilité de type I

1

1/ Tests sériques
(nouveaux outils = allergènes moléculaires)

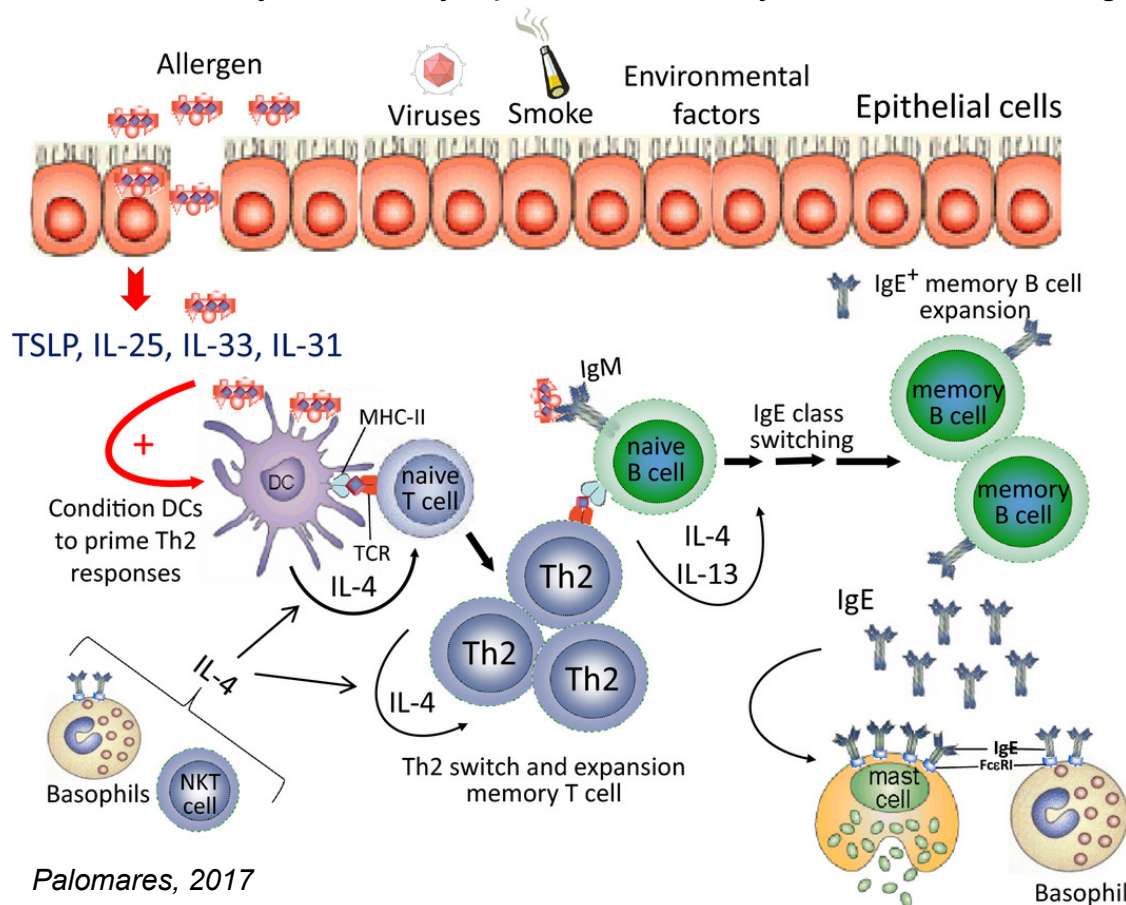
2/ Tests cellulaires : Test d'Activation des Basophiles

I. Physiopathologie de l'HSI de type I

La réaction immédiate

2

- 1^{ère} rencontre avec l'allergène
 - Mise en route des réponses immunologiques de mémorisation
 - Collaboration des LyT et des LyB pour induire la synthèse de l'immunoglobuline "E"



Récepteurs FcεRI (forte affinité)	Mastocytes tissulaires Basophiles sanguins
Récepteurs FcεRII (faible affinité)	Plaquettes Eosinophiles Cellules de Langerhans Macrophages Lymphocytes T

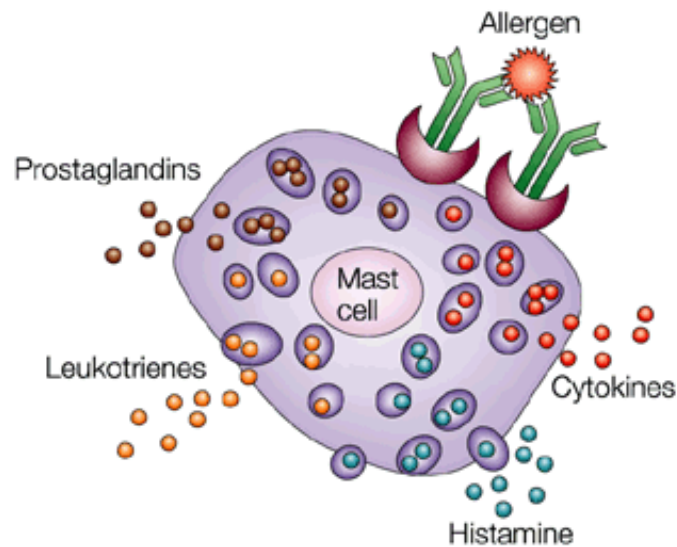
I. Physiopathologie de l'HSI de type I

La réaction immédiate

3

- Seconde rencontre
 - ▣ Allergène immédiatement reconnu
 - ▣ Réaction explosive
 - ▣ Libération de nombreux médiateurs de la réponse allergique

Pénétration de l'antigène
(2^{ème} ou n^{ième})



Activation du mastocyte
(+ autres cellules)

Libération des médiateurs :

- Histamine
- Leucotriènes
- Prostaglandines
- ...

II. Stratégies de prise en charge d'une hypersensibilité immédiate

4



Interrogatoire
+++

- Recherche des allergènes responsables des signes cliniques



Tests cutanés



Tests de provocation



Disparition des signes à l'éviction de l'allergène

+/- Biologie

+/- Biologie

5

- - :
 - ▣ Quand symptomatologie simple, facilement reliée à un allergène lors de l'interrogatoire
- + :
 - ▣ Quand patient vu par un **non spécialiste**
 - ▣ Quand **tests cutanés irréalisables** (eczéma, peau aréactive) ou interprétation difficile (dermographisme)
 - ▣ **Aide des nouveaux outils disponibles** au diagnostic et à la prise en charge (TPO, éviction, désensibilisation)

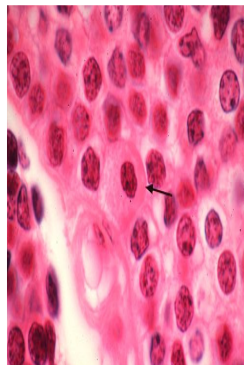
III. Exploration de l'HSI : Tests biologiques utilisés

6



Tests sériques :

- Apport des allergènes moléculaires



Tests cellulaires :

- Test d'activation des basophiles

➤ Marqueurs **sériques** pour l'exploration de l'HSI

7

Tests non spécifiques

- IgE totales (hyperéosinophilie)

Marqueurs solubles dégranulés

- Tryptase/Histamine (=>origine allergique d'une réaction ?)

Tests spécifiques

- Multiallergéniques (dépistage)
- Unitaire (identification)

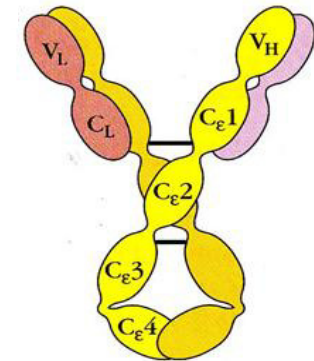
➤ IgE totales

8

- Ig la plus faiblement représentée dans le sérum (50-100 ng/L)
 - ▣ Exprimée en **UI** (1UI = 2,4 ng)

- Marqueur pas toujours spécifique/sensible :
 - ▣ 20% des sujets sains : concentration élevée
 - ▣ 20% des sujets allergiques : concentration normale

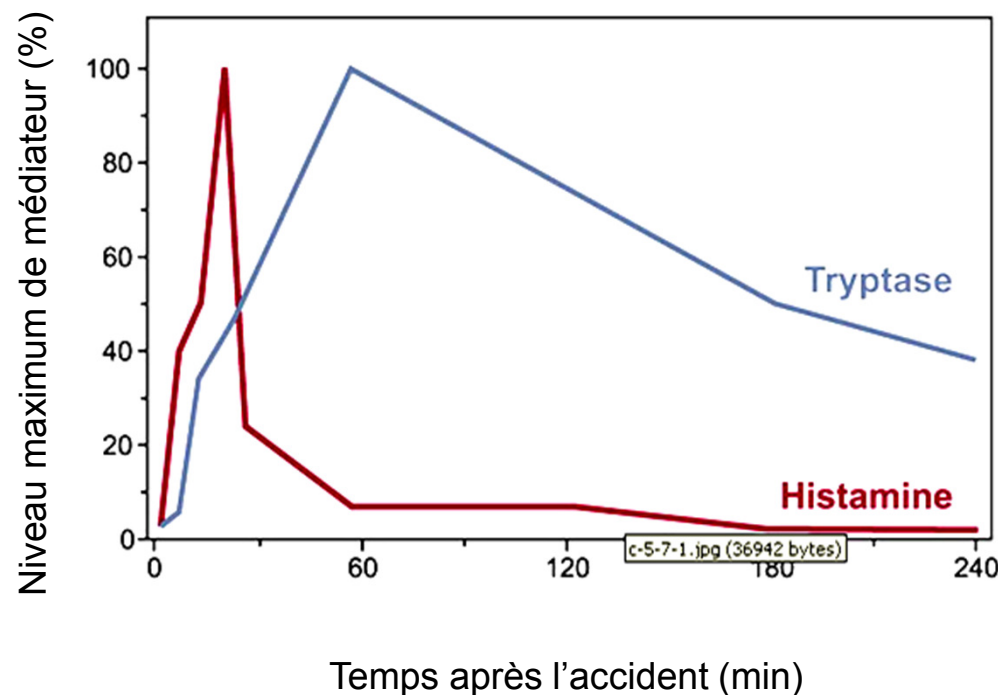
- Indications = confirmation du diagnostic ou suivi thérapeutique dans :
 - ▣ Dermatite atopique, urticaire chronique
 - ▣ Polysensibilisations
 - ▣ Aspergillose bronchopulmonaire allergique
 - ▣ Infections (parasitaires)
 - ▣ Déficiences immunitaires congénitales (Wiskott-Aldrich, Job-Buckley)
 - ▣ Maladies inflammatoires/dysimmunitaires



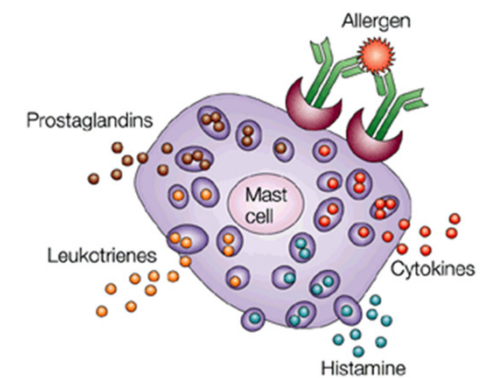
➤ Médiateurs dégranulés : Tryptase et Histamine plasmatiques

9

- Pour objectiver la dégranulation des mastocytes et des basophiles



- Mastocytes
- Marqueur stable
- Technique automatisée



Nature Reviews | Immunology

- Mastocytes + basophiles
- Phase pré analytique délicate
- Dosage plus difficile

➤ Médiateurs dégranulés : Tryptase et Histamine plasmatiques

10

Exemple de cinétique

	Temps 1	Temps 2	Temps 3
Délai après choc	10 minutes	1 à 2 heures	> 6 heures
Histamine (Val. réf. : < 10)	>100 nmol/L	20 nmol/L	
Tryptase (Val. réf. : < 11)	37.0 µg/L	24.3 µg/L	10.9 µg/L

Commentaire Tryptase : Ce résultat peut être en faveur d'un choc anaphylactique.

Variation significative de la tryptase quand :

$\text{Tryptasémie} > 1,2 \times [\text{Tryptasémie basale}] + 2 \mu\text{g/L}$

ou

$\text{Tryptasémie} > 135\% [\text{Tryptasémie basale}]$

- Tryptase et pathologie mastocytaire

11

- L'alpha-tryptase, secrétée continuellement par les mastocytes est responsable du **taux basal** de tryptase sérique de chaque individu.
- Son dosage sérique permet une estimation de la masse mastocytaire totale.

-> **Augmentation** de la tryptase dans la **mastocytose systémique**

Dosage de tryptase à réaliser :

- chez tout patient allergique aux **venins d'hyménoptères** ayant fait une réaction systémique
- en cas de réactions d'**hypersensibilité immédiate à répétition sans étiologie retrouvée**.

Tableau I. Critères majeurs et critères mineurs du diagnostic de MS*.

Critère majeur	Infiltrat dense multifocal de mastocytes dans la moelle osseuse ou dans un autre organe extracutané, avec plus de 15 mastocytes par agrégat
Critères mineurs	1. Morphologie anormale des mastocytes médullaires ou d'un autre organe extracutané
	2. Mutation de c-KIT au codon 816
	3. Immunophénotypage des mastocytes médullaires exprimant le CD2 et/ou le CD25
	4. Taux de tryptase sérique > 20 ng/ml

*Le diagnostic positif nécessite la présence d'un critère majeur et d'un critère mineur ou de 3 critères mineurs.

Le critère majeur est constitué par la présence d'agrégats de plus de 15 mastocytes anormaux au sein de la biopsie ostéo-médullaire ou de tout autre organe atteint en dehors de la peau.

Le taux de tryptase sérique doit être > 20 ng/ml en dehors d'une association à une autre hémopathie myéloïde. Un taux de tryptase sérique < 20 ng/ml est présent dans 20 à 30 % des cas de MS.

➤ Tests spécifiques

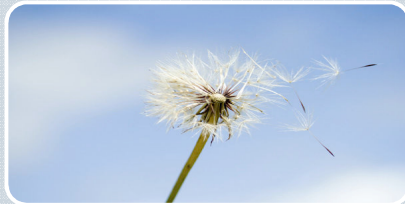
12

□ IgE spécifiques (~ 600 tests)

Tests
multiallergéniques

Tests unitaires

□ Différentes types d'allergènes



Allergènes inhalés
Pneumallergènes

- Pollens
- Animaux
- Acariens
- Arthropodes
- Moisissures



Allergènes ingérés
Trophallergènes



Allergènes injectés

- Médicaments
- Venins d'hyménoptères



Allergènes
professionnels

L'Allergie : un langage codé...

13

- 1 code pour chaque allergène :
 - ▣ 1 lettre pour la catégorie
 - ▣ 1 chiffre

Lettre	Catégorie	Exemple
c	Médicament	c1: pénicilline
d	Acariens	d1 : <i>D. pteronyssinus</i>
e	Animaux	e1 : le chat
f	Aliments	f13 : l'arachide
g	Graminées	g3 : dactyle
i	Insecte	i1 : abeille
k	Professionnel	k82 : latex
m	Moisissures	m3 : <i>Aspergillus</i>
o	Divers	o1 : coton
p	Parasite	p1 : ascaris
t	Arbres	t3 : boulot
w	Herbacées	w1 : ambroisie

➤ Les techniques utilisées

14



Techniques manuelles :
- Histamine



Techniques automatisées :

- IgE totales
- Phadiatop
- Trophatop
- IgE spécifiques
- Tryptase
- IgG: IgG4 spécifiques



CLA :
Mixte
Trophallergènes
Pneumallergènes

ISAC

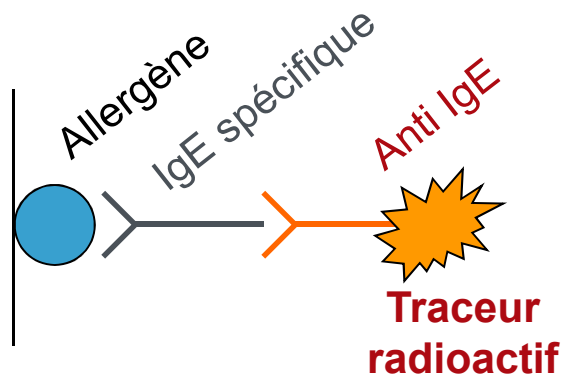


Techniques

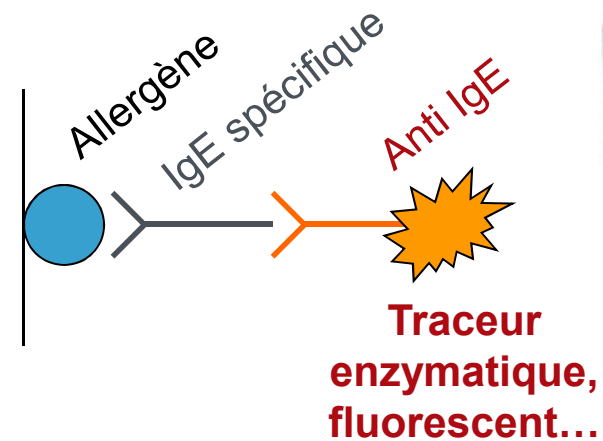
15

- Dérivent toutes du *RAST* (1974)

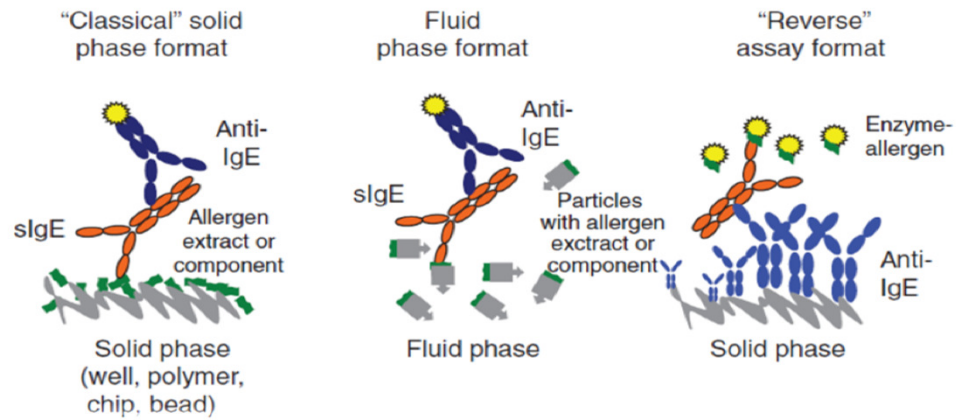
« RAST »



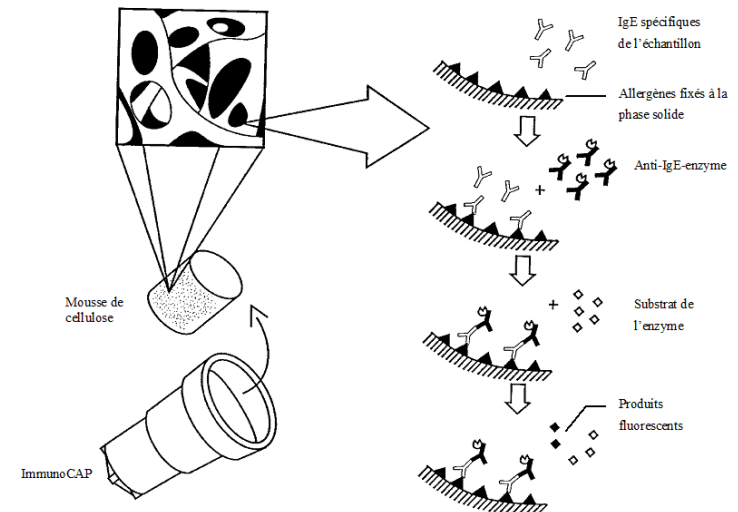
Tests FEIA, « ImmunoCAP »



Techniques



Kleine-Tebbe et al, 2016



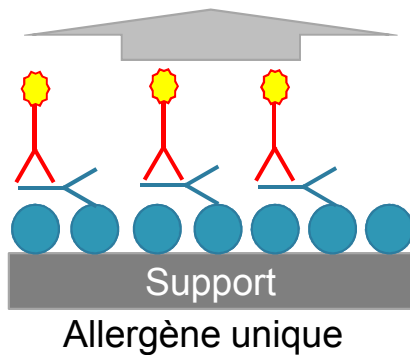
Pour les tests multiallergéniques et unitaires

Techniques

17

Test unitaire (identification)

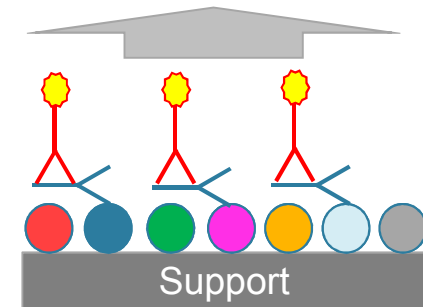
4) Détection marquage



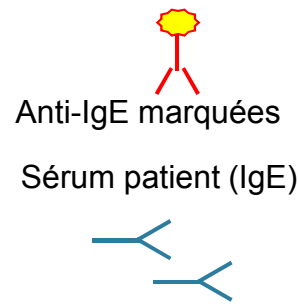
Allergène unique

Test multiallergénique (dépistage)

Détection marquage



Mélange d'allergènes



- Quantitatif (kU/L)
- Gamme de mesure : <math><0,10</math> à >100 kU/L

- Pneumallergènes : Phadiatop
- Mélanges alimentaires : fx (~40 mélanges)

Trophatop enfant

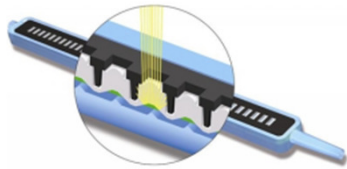
- Blanc d'œuf, lait de vache, arachide, moutarde
- Poisson, noisette, soja, blé
- Crevette, kiwi, bœuf, sésame

Trophatop adulte

- Blanc d'œuf, lait de vache, arachide, poisson, soja, blé
- Noisette, crevette, kiwi, banane
- Sésame, levure de bière, ail, céleri

Techniques : tests multiparamétriques sur un même support

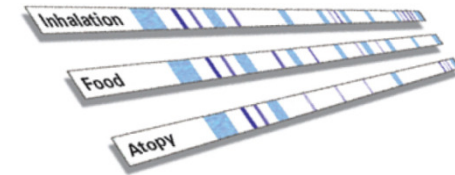
CLA
Eurobio/Ingen



TAP
Eurobio/Ingen



Euroline
Euroimmun



- 30 allergènes
 - ▣ Résultats semi-quantitatif
 - ▣ Principalement des extraits
 - ▣ Recherche des IgE anti-CCD (TAP et Euroline)
- Techniques manuelles pouvant être automatisée
- Performances analytiques < à celles des tests unitaires

Nomenclature : Arrêté du 28 novembre 2003

19

Tests de dépistage

(pas d'identification de l'allergène)

- Recherche d'IgE spécifiques vis-à-vis de **mélanges** d'allergènes
- Ordonnances indiquant au maximum :
 - 1 mélange de pneumallergène : **B51**
 - 3 mélanges alimentaires : **3 x B51**

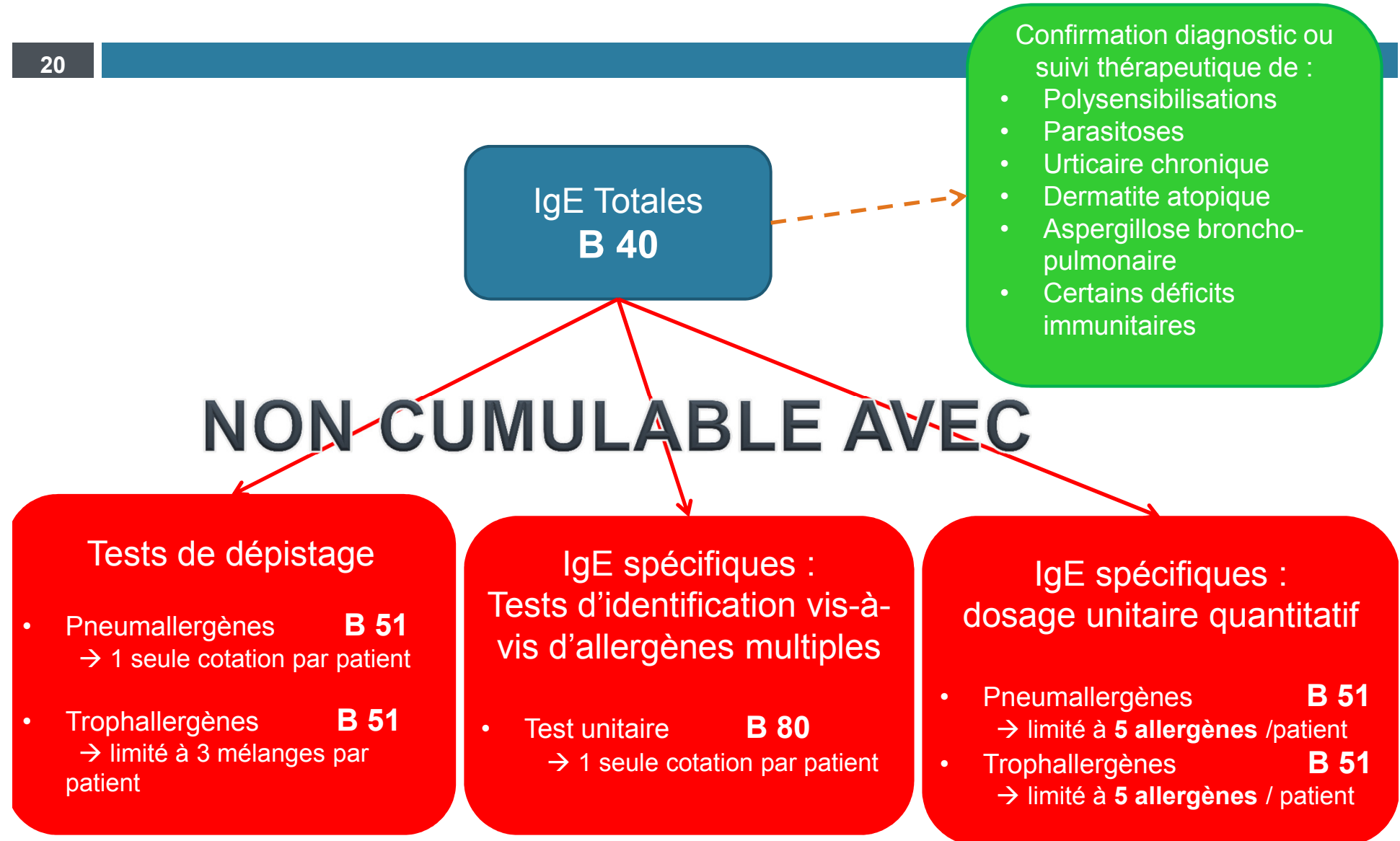
Tests d'identification

- Tests unitaires vis-à-vis d'allergènes multiples : **B80**
- Tests de quantification des IgE spécifiques vis-à-vis d'allergènes unitaires
- Ordonnances indiquant au maximum :
 - 5 aliments : **5 x B51**
 - 5 pneumallergènes : **5 x B51**
 - 5 venins : **5 x B51**
 - 5 médicaments : **5 x B51**
 - 1 test pour le latex : **B51**

- Mentionner la technique, ses limites, et interprétation des résultats

Nomenclature : Arrêté du 28 novembre 2003

20



Nomenclature : Arrêté du 28 novembre 2003

21

IgE Totales
B 40

N'est pas un test de dépistage de l'allergie

CUMULABLE AVEC

Confirmation diagnostic ou suivi thérapeutique de :

- Polysensibilisations
- Parasitoses
- Urticaire chronique
- Dermatite atopique
- Aspergillose broncho-pulmonaire
- Certains déficits immunitaires

Certaines IgE spécifiques

- Latex : 1 cotation/patient **B 51**
- Venins d'hyménoptères **B 51**
→ limité à 5 tests par patient
- Médicaments **B 51**
→ limité à 5 tests par patient

Autres actes utilisés en allergie

- Tryptase **B 80**
- ECP **B 100**
(Eosino Cationique Protéine)

Interprétation biologique d'un résultat positif d'IgE spécifiques

22

- Mise en évidence d'une sensibilisation biologique
Sensibilisation ≠ allergie



- Quantification des résultats
 - ▣ Pour affiner l'interprétation (suivi de la décroissance)
- Réactions croisées à prendre en compte
 - ▣ Pour les extraits allergéniques « classiques »

Les limites des extraits allergéniques naturels

23

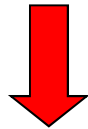
- Composition **non standardisée** (mélange de protéines allergéniques et non allergéniques)

- Variable
 - ▣ En fonction des **sources** : **sources allergéniques complexes**:
 - grains de pollens
 - squames et phanères d'animaux
 - cultures d'acariens ou de blattes.....
 - ▣ Des **procédés de préparation** :
 - extraction aqueuse
 - dégradation des allergènes fragiles lors de la préparation (chauffage)....
 - ▣ De **purification** et de **stockage** utilisés :
 - contaminations

Evolution de la biologie de l'allergie

24

- IgE totales
- Tests de screening :
 - ▣ Mélanges d'allergènes
 - ▣ CLA
- IgE spécifiques avec **extraits allergéniques naturels**



Manque de **spécificité et de sensibilité**

**UNE EVOLUTION DANS LE
DIAGNOSTIC IN VITRO:**

DES EXTRAITS ALLERGENIQUES

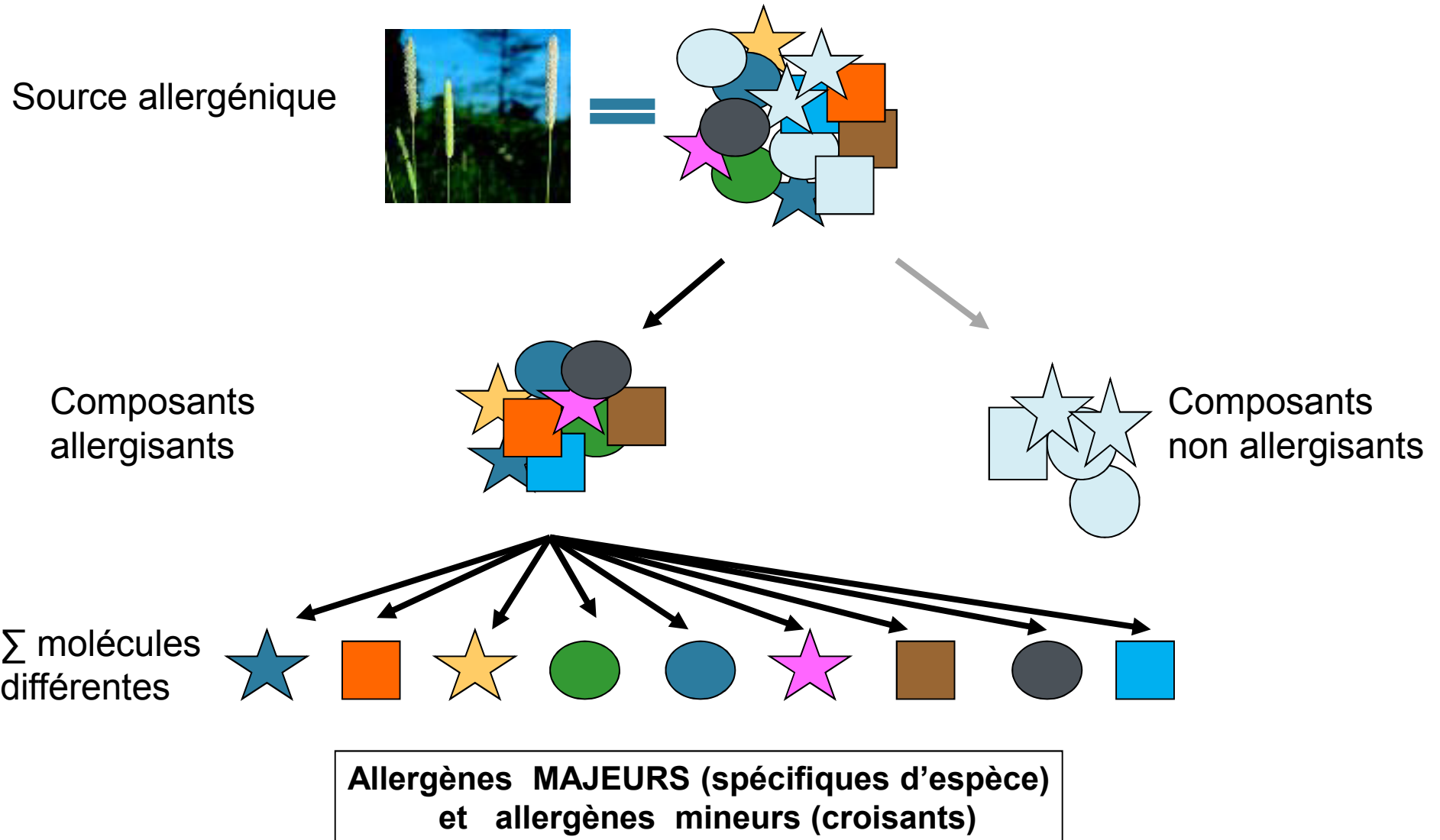
AUX ...

ALLERGENES MOLECULAIRES



La source allergénique

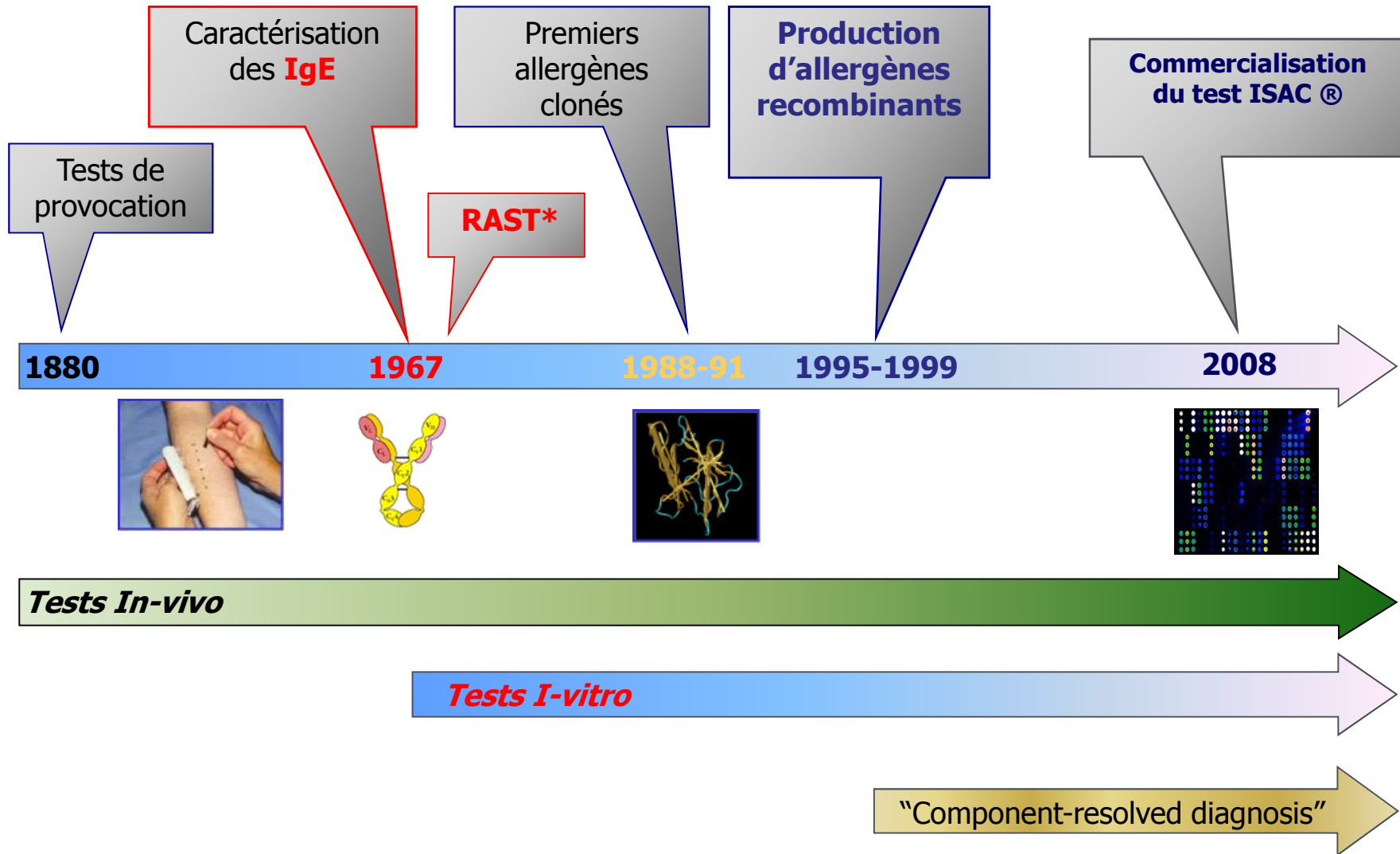
25



IV. Les allergènes moléculaires

Un peu d'histoire sur la biologie de l'allergie

26



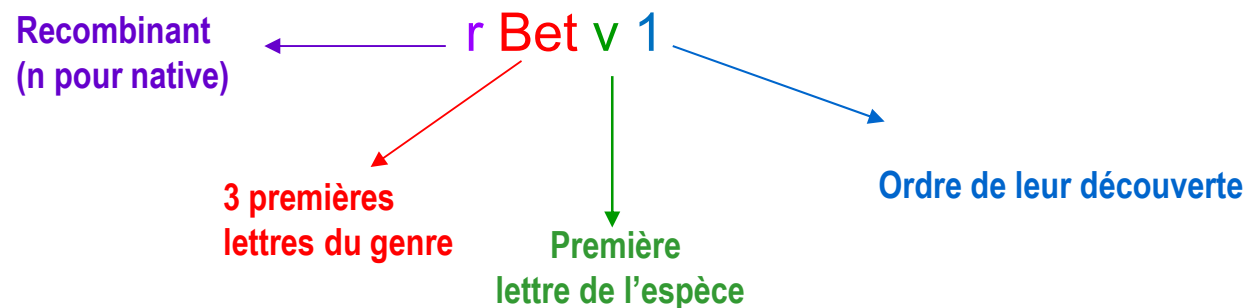
Rappels sur les allergènes moléculaires

27

- Les allergènes moléculaires
 - ▣ **Natifs** : purifiés à partir de sources allergéniques naturelles
 - ▣ **Recombinants** : synthétisés par génie génétique à partir de cellules procaryotes (E. coli ++)

- A ce jour, **+ de 1000 allergènes** (regroupés en 175 familles) ont été identifiés

- **Nomenclature** : exemple du bouleau *Betula verucosa*

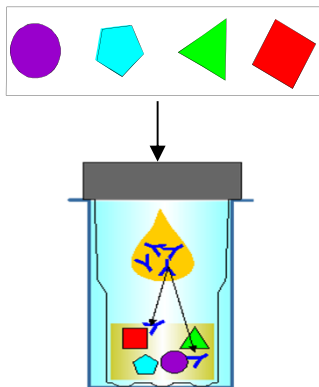


Avantages des allergènes recombinants

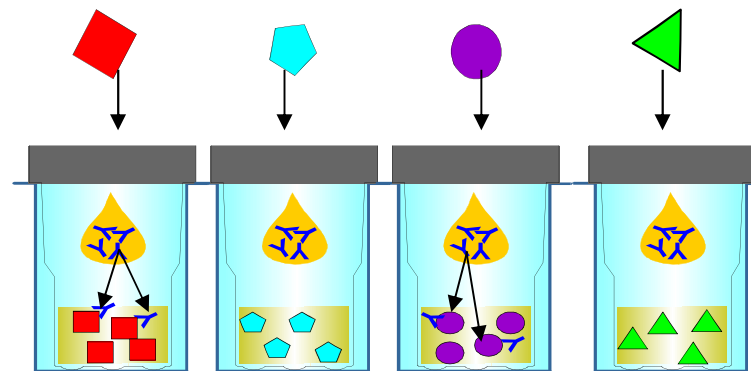
28

- Standardisation des réactifs
- Production à grande échelle
- Excellente reproductibilité des lots
- Pureté supérieure aux allergènes purifiés

Source allergénique



Composants allergéniques natifs ou recombinants



Dosage plus spécifique

Apport pratique des allergènes moléculaires

- 1) Outil de dépistage des **réactions croisées** sur des bases moléculaires et aide à l'interprétation des **polysensibilisations** cutanées
- 2) Outil pour **améliorer les tests biologiques classiques**
- 3) Outil pour contribuer à un **diagnostic plus spécifique**
- 4) Outil pour **améliorer/personnaliser la prise en charge du patient** (immunothérapie, établir un risque de réactions sévères, indication d'un TPO, éviction)

1) Outil de dépistage des réactions croisées et aide à l'interprétation

Dépistage des **réactions croisées** sur des bases moléculaires

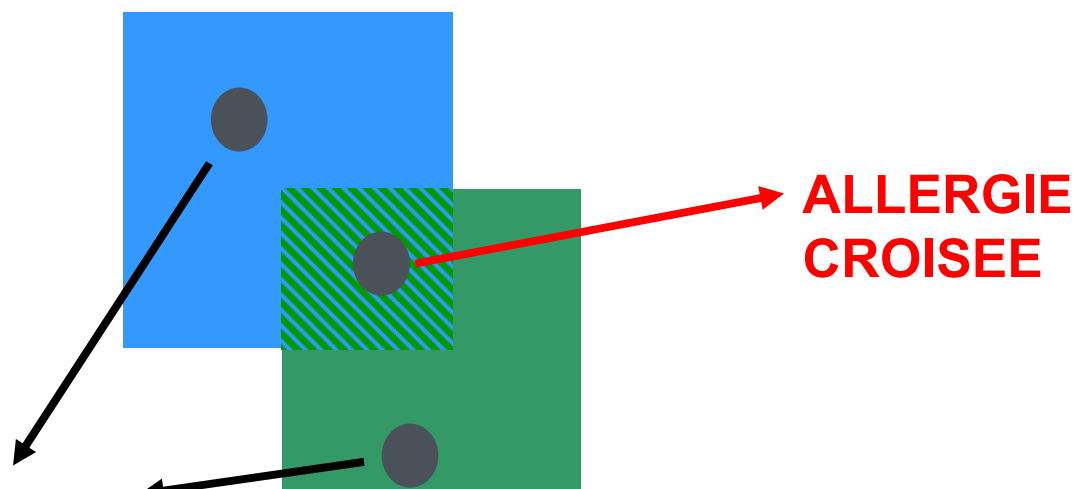
Aide à l'**interprétation des polysensibilisations** cutanées

Outils pour dépister les réactions croisées

31

● = épitope reconnu par l'IgE

Allergène 1



□ Une évolution fondamentale :
La définition des familles biochimiques
d'allergènes

Différents types de réactions croisées

32

Entre espèces taxonomiquement proches :

- Acariens (d1, d2)
- Graminées (dactyle, phléole)
- Frêne / olivier : famille des Oléacées

Entre espèces taxonomiquement éloignées :

- La relation botanique ne permet plus d'expliquer les réactions croisées
- Notion de **famille moléculaire** (protéines provenant de divers allergènes et ayant la même fonction physiologique)

Réactions croisées entre allergènes inhalés et aliments

33

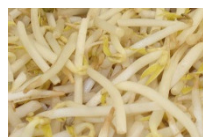
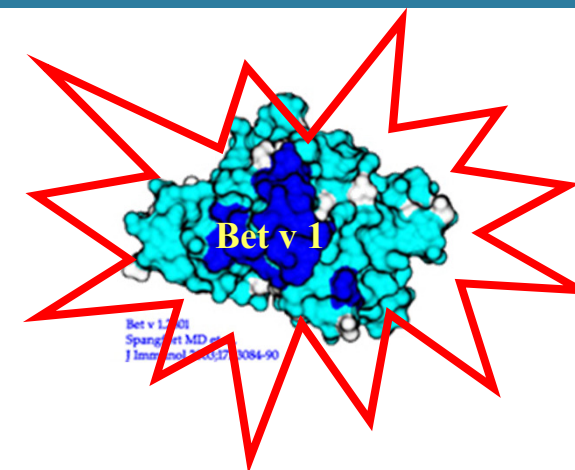
Allergènes inhalés	Aliments
<i>Pollens de Bouleau, Aulne, Noisetier</i>	<i>Noix/noisette, amande, pomme, poire, cerise, abricot, pêche, kiwi</i>
<i>Pollen d'Armoise</i>	<i>Céleri, carotte, fenouil, anis, aneth, paprika, Coriandre, camomille, cumin, tournesol</i>
<i>Pollen d'ambrosie</i>	<i>Melon, banane</i>
<i>Acariens de la poussière domestique</i>	<i>Crevette, homard, langouste, crabe escargot</i>
<i>Latex</i>	<i>Avocat, banane, marron, kiwi, figue, papaye, épinard, pomme de terre, tomate</i>
<i>Plumes d'oiseaux</i>	<i>Œuf de poule</i>
<i>Pollens (tous)</i>	<i>Miel</i>

d'après Helbling A, 1997

Famille des PR-10

34

- Allergies croisées pollens-aliments
- Syndrome « Pomme-Bouleau »
- Base moléculaire des RC bien décrite : les PR-10
- Allergènes sensibles :
 - ▣ À la **pepsine** : syndromes locaux (oraux ++)
 - ▣ À la **chaleur/cuisson** : aliment cuit, en général toléré
- Réactions allergiques aux fruits et légumes du **nord** de l'Europe



Gly m 4



Ara h 8



Dau c 1



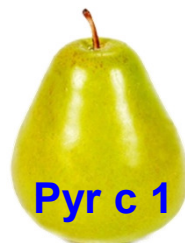
Pru ar 1



Cor a 1



Pru p 1



Pyr c 1



Mal d 1



Pru av 1

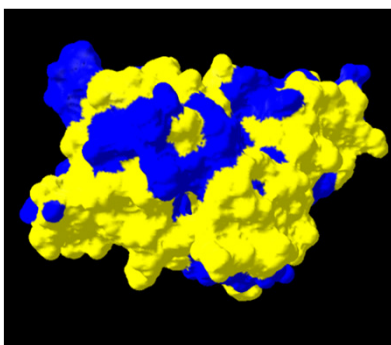


Api g 1

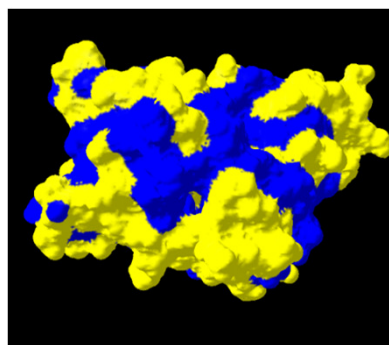
Expliquer des réactions croisées sur des bases moléculaires

35

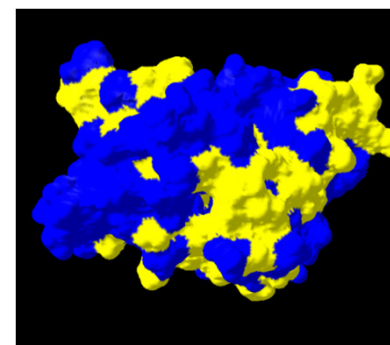
Identité / allergène	Bet v 1	Mal d 1	Gly m 4	Api g 1
% séquences	100	56	47	39
% surface	100	71	60	47



Bet v 1 vs. Mal d 1



Bet v 1 vs. Gly m 4



Bet v 1 vs. Api g 1

 Surface commune

Degré de similitude des épitopes conformationnels

D'après Radauer, Allergy School Bichenberg 2007

Quelques familles moléculaires

36

Allergènes d'origine végétale	
Protéines de stockage	Albumines 2S (Ara h 2, Ara h 6, Cor a 14, Ses i 1, Jug r 1, Ber e 1, Ana o 3) – Globulines 7S (Ara h 1, Gly m 5, Jug r 2) - Globulines 11S (Ara h 3, Cor a 9, Gly m 6, Ana o 2)
PR-10 ou Bet v 1-like (Pathogenesis related)	Bouleau (Bet v 1) , Noisette (Cor a 1), Arachide (Ara h 8), Soja (Gly m 4), Céleri (Api g 1), Pêche (Pru p 1), Kiwi (Act d8), Pomme (Mal d 1), cerise (Pru av 1)...
LTP (Lipid Transfer Proteins) (PR-14)	Pêche (Pru p 3) , Noisette (Cor a 8), Arachide (Ara h9), Armoise (Art v 3), pomme (Mal d 3) cerise (Pru av 3), Pariétaire (Par j 2)
Profilines	Bouleau (Bet v 2), Phléole (Phl p 12), Latex (Hev b 8), Pêche (Pru p4)
Polcalcines	Bouleau (Bet v 4), Phléole (Phl p 7)

Quelques familles moléculaires

37

Allergènes d'origine animale	
Tropomyosines	Crevettes (Pen a 1, etc..), homard, crabe, huître, Acariens (Der p 10), blatte, anisakis
Parvalbumines	Carpe (Cyp c 1), Morue (Gad c 1),
Albumines	Chat, Chien, Vache, Porc

Classification des familles d'allergènes végétaux

38

- (Hauser M. et al. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* 2010;6:1)

Classification	Famille d'allergènes	Distribution						
		Pollens			Aliments			
		Arbres	Graminées	Herbacées	Fruits	Légumes	Fruits Coques	Latex
Pan-allergènes (vrais pan-allergènes ubiquitaires)	Profilins	X	X	X	X	X	X	X
Eur-allergènes (distribution large)	Polcalcins	X	X	X				
	ns LTP	X		X	X	X	X	X
	PR-10	X			X	X	X	
	Hevein-like domain proteins	X			X	X	X	X
	β -1,3 glucanases	X			X	X		X
Sten-allergènes (distribution étroite)	Pectate lyases	X		X				
	Cyclophilines	X	X					
	Thaumatococin-like proteins	X			X	X		
	PR-1		X	X		X		X
	Patatines						X	X
	Cupines						X	
	Fe/Mn superoxide dismutases						X	X
Mon-allergènes (distribution limitée à 1 seule source)	Albumines 2S						X	
	Expansines		X					
	Oléosines						X	
	Facteurs d'élongation du caoutchouc							X
	α -amylases						X	

39

2) Outil pour améliorer les tests biologiques classiques

Information de Sécurité Importante ImmunoCAP

Allergène f14 (soja)

40

Analyse	Unité	Borne	23/06/15
IgE	kU/L	<150	532
Bouleau rBet v1	kU/L		73,70
Bouleau rBet v2	kU/L		<0.10
Soja (aliment)	kU/L		<0.10
rGly m4	kU/L		
Pomme	kU/L		12,70
Pomme rMal d 1 PR-10	kU/L		
Noisette	kU/L		24,10
rCor a 1	kU/L		
rCor a 8	kU/L		
noisette rCor a 14	kU/L		
noisette rCor a 9	kU/L		

Information de Sécurité Importante ImmunoCAP

Allergène f14 (soja)

41

Species	Allergen	Biochemical name	MW (SDS-PAGE)	Food Allergen	Entry Date
<i>Glycine max</i> (Soybean)					
	Gly m 1	Hydrophobic protein from soybean, LTP	7	No	2003-06-24
	Gly m 2	Défensine	8	No	2003-06-25
	Gly m 3	Profiline	14	Yes	2003-06-25
	Gly m 4	Pathogenesis-related protein, PR-10 , Bet v 1 family member	17	Yes	2006-11-03
	Gly m 5	Beta-conglycinine (viciline, globuline 7S)	see subunits	Yes	2008-08-19
	Gly m 6	Glycinin (légumine, globuline 11S)	see subunits	Yes	2008-08-19
	Gly m 7	Seed-specific biotinylated protein (SSBP)	76.2 kDa	Yes	2012-09-24
	Gly m 8	2S albumin		Yes	2014-01-07

<http://www.allergen.org/>

Information de Sécurité Importante ImmunoCAP

Allergène f14 (soja)

42

Analyse	Unité	Borne	23/06/15
IgE	kU/L	<150	532
Bouleau rBet v1	kU/L		73,70
Bouleau rBet v2	kU/L		<0.10
Soja (aliment)	kU/L		<0.10
rGly m4	kU/L		11,1
Pomme	kU/L		12,70
Pomme rMal d 1 PR-10	kU/L		33,6
Noisette	kU/L		24,10
rCor a 1	kU/L		49,3
rCor a 8	kU/L		<0.10
noisette rCor a 14	kU/L		<0.10
noisette rCor a 9	kU/L		<0.10

Information de Sécurité Importante ImmunoCAP Allergène f14 (soja)

43

- Présence en faible quantité du composant **Gly m4** dans l'extrait naturel utilisé pour le test f14 (IgE spécifiques graine de soja)
- Conseils sur les mesures à prendre par l'utilisateur



Il est recommandé de compléter le bilan biologique avec le test **rGly m4**

- Pour les patients sensibilisés au pollen de bouleau, chez lesquels est suspectée une allergie au soja
- Et/ou les patients avec une histoire convaincante d'allergie au soja, mais avec un **résultat négatif pour le test f14**

*Un résultat négatif pour f14 (graine de soja) et positif pour **rGly m 4 (PR-10)** est souvent associé à des **réactions locales**.*

*Cependant des **réactions systémiques** peuvent survenir, en particulier chez les patients allergiques au pollen d'arbres apparentés au bouleau lors de la consommation de **grandes quantités de soja peu transformé** (ex: lait de soja).*

Amélioration des tests biologiques, exemple de la noisette

44

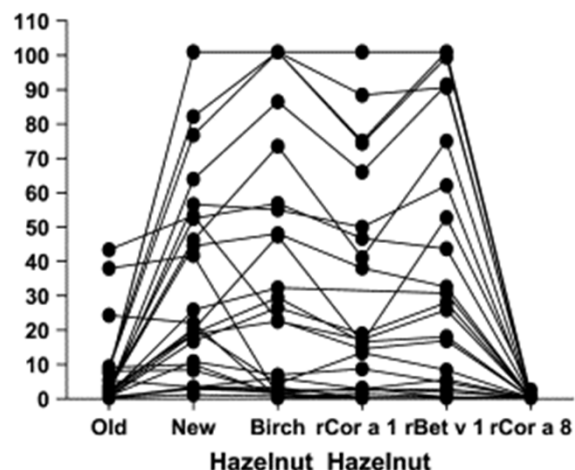


Noisette (f17)

- Cor a1 (PR-10, homologue de bet v1) détruite par le chauffage lors de la préparation de f17
- Enrichissement du test f17 en rCor a1

- ▣ **Caution:** The Phadia hazelnut ImmunoCAP (f17) has been supplemented with recombinant Cor a1 and now detects Bet v 1–specific IgE, which leads to elevated values for persons with birch pollen allergy

(Sicherer S. et al ,JACI, August 2008 413-415)

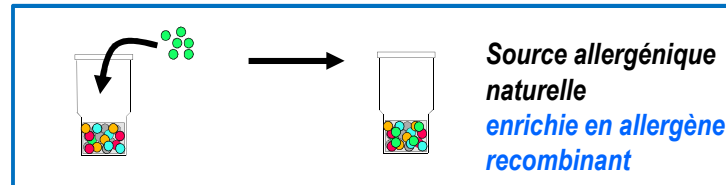


Moyenne IgE spécifiques $\times 14$
chez patients sensibilisés à Bet v 1

Depuis décembre 2013 : enrichissement en Cor a 8

Amélioration des tests biologiques

45



Latex (k82)

- Hev b5 : allergène majeur, en faible quantité dans les extraits de latex
- Enrichissement du test k82 en **rHev b5**
- Meilleure détection des patients monosensibilisé à Hev b5



Noix (f256)

- Amélioration du procédé d'extraction pour mieux extraire **Jug r1** (albumine 2s) jusqu'à la peu présent dans l'extrait classique
- Intérêt pour les patients monosensibilisé à Jug r1



Venin de guêpes

- Enrichissement des extraits de guêpe poliste et vespula en antigène 5 (**Pol d5 et Ves v5**)

46

4) Outil pour contribuer à un diagnostic plus spécifique

Allergènes moléculaires et diagnostic plus spécifique

Exemple du latex

47

□ Allergènes du latex

Allergènes	Familles moléculaires	Majeur (M) - mineur (m)
Hev b 1	Facteur d'élongation	m
Hev b 2	1,3 β -glucanase	M
Hev b 3	REF-like protéine	m
Hev b 4	Lécithinase	m
Hev b 5	Acidic protein	M
Hev b 6.01	Précurseur de lectine	M
Hev b 6.02	Lectine	M
Hev b 7	Patatin-like protéine	m
Hev b 8	Profiline	m
Hev b 9	Enolase	m
Hev b 10	Superoxyde-dismutase	m
Hev b 11	Chitinase	m
Hev b 12	LTP	m
Hev b 13	Nodulin-like protéine	M

Allergènes moléculaires et diagnostic plus spécifique

Exemple du latex

48

- Intérêt de rHev b5 dans le diagnostic d'allergie au latex
- Homme de 22 ans
- Etudiant en médecine
- Absence de terrain atopique
 - ▣ Pas de pollinose
 - ▣ Pas d'allergie alimentaire
- Rhinoconjonctivite à l'arrivée dans le service clinique
- Prick-tests latex
 - ▣ Allerbio : Négatif
 - ▣ Stallergènes : Négatif
- IgE spécifiques Latex (k82) : 4,39 KU/L

rHev b 1 <0,10 kU/L	rHev b 6.02 <0,10 kU/L
rHev b 2 <0,10 kU/L	rHev b 8 <0,10 kU/L
rHev b 3 <0,10 kU/L	rHev b 9 <0,10 kU/L
rHev b 5 = 1,84 kU/L	rHev b 11 <0,10 kU/L
rHev b 6.01 <0,10 kU/L	broméline <0,10 kU/L

→ **Allergie au latex** confirmée par la présence d'IgE dirigées contre **rHev b5**

Réaction croisée biologique : latex

49

- Biologie :
 - Latex : 36,1 kU/L
 - Hev b1 : < 0,10 kU/L
 - Hev b2 : < 0,10 kU/L
 - Hev b3 : < 0,10 kU/L
 - Hev b4 : < 0,10 kU/L
 - Hev b5 : < 0,10 kU/L
 - Hev b6.01: < 0,10 kU/L
 - Hev b6.02: < 0,10 kU/L
 - Hev b8 : > 100 kU/L
 - Hev b9 : < 0,10 kU/L
 - Hev b11 : < 0,10 kU/L
- TC négatifs
- Pas d'arguments en faveur d'une allergie au latex
- Mais très pollinique
- Hev b8 : **profiline**
- Réactions croisées avec de nombreux pollens et aliments d'origine végétale

Allergènes moléculaires et diagnostic plus spécifique

Exemple de l'arachide

50

- IgE spécifiques arachide (extrait total)

	sensibilité	spécificité
f13	100 %	42,5 %

→ Régime d'éviction non pertinent

Allergènes moléculaires et diagnostic plus spécifique

Exemple de l'arachide

Les allergènes de l'arachide

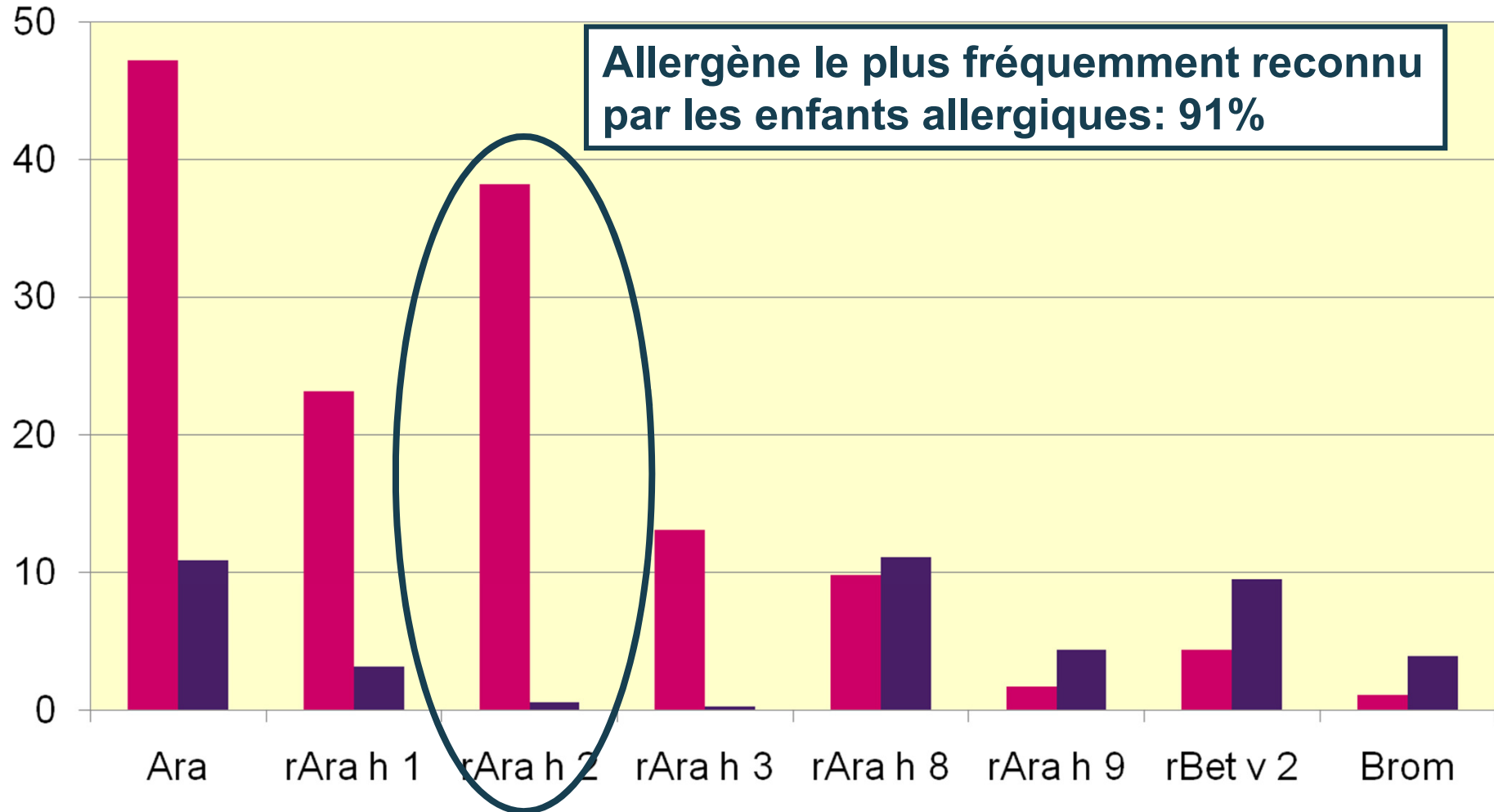
51

<u>Ara h 1</u>	<u>Ara h 2-6-7</u>	<u>Ara h 3-4</u>	<i>Ara h 5</i>	<u>Ara h 8</u>	<u>Ara h 9</u>
Viciline Globuline 7S	Conglutine Albumine 2S	Légumine Globuline 11S	Profiline	PR 10	LTP
Protéines de stockage <i>Stables chaleur et digestion</i>				<i>Thermosensible</i>	<i>Stable chaleur et digestion</i>
<i>Cor a 11</i> <i>Ses i 3</i> <i>Gly m 5</i> <i>Pis s 1</i>	<i>Cor a 14</i> <i>Ses i 1, 2</i>	<i>Cor a 9</i> <i>Ses i 6,7</i> <i>Gly m 6</i>	<u>Bet v 2</u> <i>Cor a 2</i> <i>Gly m 3</i>	<u>Bet v 1</u> <i>Cor a 1</i> <u>Glym 4</u>	<u>Cor a 8</u>
Allergènes majeurs Réactions sévères			Allergène mineur	Syndrome oral	Réactions parfois sévère

Résultats d'une étude lyonnaise sur 100 enfants

(thèse de G. Proton)

52



■ Moyenne enfants allergiques (kU/L)

■ Moyenne enfants tolérants (kU/L)

Vers un diagnostic biologique plus spécifique

53

□ Résultats de Nancy

	sensibilité	spécificité
f13	100 %	42,5 %
Ara h 2	98,9 %	97,5 %
Ara h 1	78,7 %	95 %
Ara h 3	66 %	92,5 %

Codreanu F, Collignon O, Roitel O, Thouvenot B, Sauvage C, Vilain AC, et al.
A novel immunoassay using recombinant allergens simplifies peanut allergy diagnosis.
Int Arch Allergy Immunol 2011; 154:216-26.

Cas clinique : aide au diagnostic

54

- Garçon de 7 ans
 - ▣ Atopie: AA
 - ▣ Pas d'allergie pollinique connue
 - ▣ Allergie au poisson et kiwi
 - Syndrome d'allergie orale et vomissements avec l'arachide
 - Test cutané
 - ▣ Arachide: positif (7 mm)
 - Bilan biologique
 - ▣ **f13: 1,82 kU/L**
 - ▣ rAra h1 : < 0,10 kU/L
 - ▣ **rAra h2 : 1,46 kU/L**
 - ▣ rAra h3 : < 0,10 kU/L
 - ▣ rAra h8 : < 0,10 kU/L
 - ▣ rAra h9 : < 0,10 kU/L
 - ▣ Broméline : < 0,10 kU/L
 - ▣ rBet v2 : < 0,10 kU/L
 - TPO : **Echec**
- Garçon de 10 ans
 - ▣ Atopie : AA, RA
 - ▣ Allergie pollinique : Graminées
 - ▣ Pas d'autre allergie alimentaire
 - Syndrome d'allergie orale avec l'arachide
 - Test cutané
 - ▣ Arachide: positif (5 mm)
 - Bilan biologique
 - ▣ **f13 : 1,98 kU/L**
 - ▣ rAra h1 : < 0,10 kU/L
 - ▣ **rAra h2 : 0,36 kU/L**
 - ▣ rAra h3 : < 0,10 kU/L
 - ▣ rAra h8 : < 0,10 kU/L
 - ▣ rAra h9 : < 0,10 kU/L
 - ▣ **Broméline : < 0,57 kU/L**
 - ▣ **rBet v2 : < 0,10 kU/L**
 - TPO : **Succès**

Cas clinique

55

- Garçon de 8 ans
 - ▣ Atopie : DA
 - ▣ Pas d'allergie pollinique connue
 - ▣ Allergies alimentaires : lentilles, petits pois, pois chiches (angioedème du visage et gêne respiratoire)
- Pas de réaction clinique connue à l'arachide
- Tests cutanés (témoin positif 5 mm)
 - ▣ Arachide (4 mm)
 - ▣ Lentilles (6 mm)
 - ▣ Petits pois (13mm)
- Bilan biologique :
 - ▣ f13 > 100 kU/L

Cet enfant est-il allergique à l'arachide?

« Courbe de risque » établie avec les extraits allergéniques

56

Allergen	Reactive if \geq (no challenge necessary)
Egg	7 kU/L
Milk	15 kU/L
Peanut	14 kU/L
Fish	20 kU/L
Soybean	30 kU/L
Wheat	80 kU/L



OUI ?

- Mais :
 - ▣ Valeurs très variables selon les études et populations étudiées
 - ▣ Possibilités d'interférences dans le dosage (notamment chez les polliniques)

Cas clinique

57

- Garçon de 8 ans
 - ▣ Atopie : DA
 - ▣ Pas d'allergie pollinique connue
 - ▣ Allergies alimentaires : lentilles, petits pois, pois chiches (angioedème du visage et gêne respiratoire)
- Pas de réaction clinique connue à l'arachide
- Tests cutanés (témoin positif 5 mm)
 - ▣ Arachide (4 mm)
 - ▣ Lentilles (6 mm)
 - ▣ Petits pois (13mm)
- Bilan biologique :
 - ▣ f13 > 100 kU/L
 - ▣ rAra h1 : > 100 kU/L
 - ▣ rAra h2 : 0,26 kU/L
 - ▣ rAra h3 : 0,75 kU/L
 - ▣ rAra h8 : 26,3 kU/L
 - ▣ rAra h9 : 29,1 kU/L
 - ▣ Broméline : 2,15 kU/L
 - ▣ rBet v2 : < 0,79 kU/L
- TPO : **Succès**

Allergie aux lentilles/petits pois/pois chiches due à la sensibilisation aux vicilines (rAra h1) responsable de la forte positivité du f13

4) Outil pour améliorer/personnaliser la prise en charge du patient

Immunothérapie

Risque de réactions sévères

Indication d'un TPO

Eviction

- Identification de **marqueurs de sévérité de l'allergie**
- Identification de **marqueurs de persistance de l'allergie**

Identification des marqueurs de sévérité

59

- Suivant la famille moléculaire impliquée :
 - ▣ Syndrome oral
 - ▣ Réaction systémique grave

PR-10

- **Sensible** à la pepsine, chaleur/cuisson
- Symptômes si aliments consommés crus
- Syndrome oral

LTP

- **Résistant** à la pepsine, chaleur/cuisson
- Structure préservée dans le tractus digestif
- Risque de **réactions systémiques**



Famille des LTP

60

- Protéines **stables à la chaleur** : réaction avec les aliments crus et cuits
- Protéines **stables à la digestion** : réactions souvent systémiques
- Allergies alimentaires aux fruits en l'absence d'allergie pollinique
- Réactions allergiques aux fruits et légumes du **sud** de l'Europe



Cor a 8



Pru p 3



Zea m 14



Pru av 3



Pru ar 3



Ara h 9



Mal d 3



Jug r 3

LTP

rPar j 2
nArt v 3
Ole e 7
Pla a3
nPru p 3
rCor a 8
Ara h 9
Mal d 3
Jug r 3
Tri a 14

Les protéines de stockage

Raisonnement par **source** allergénique ou par **familles** moléculaires

62



Prolamines

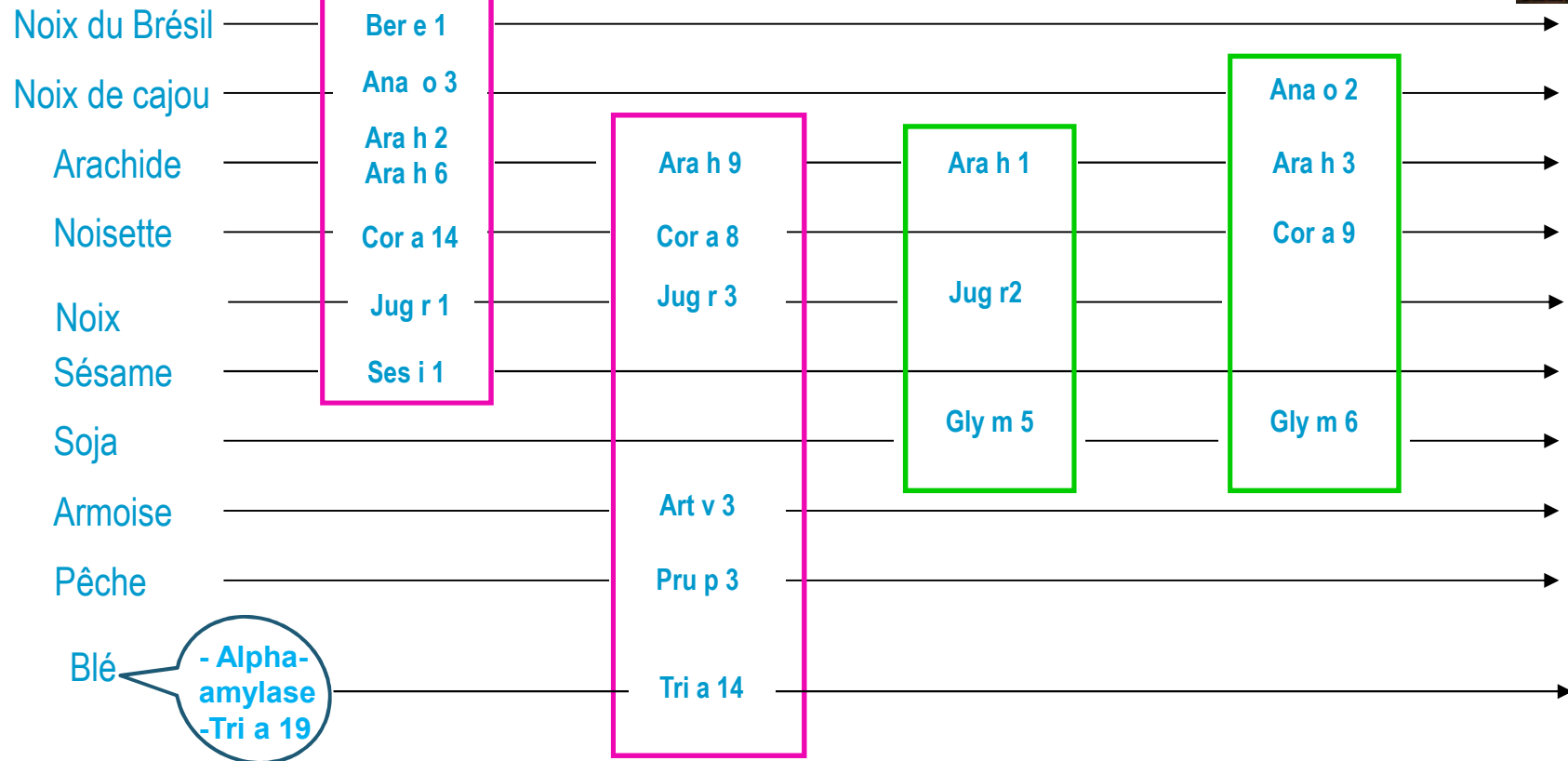
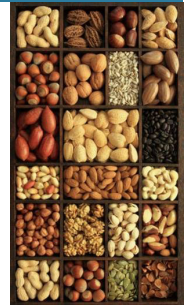
Cupines

Albumines 2S

LTP

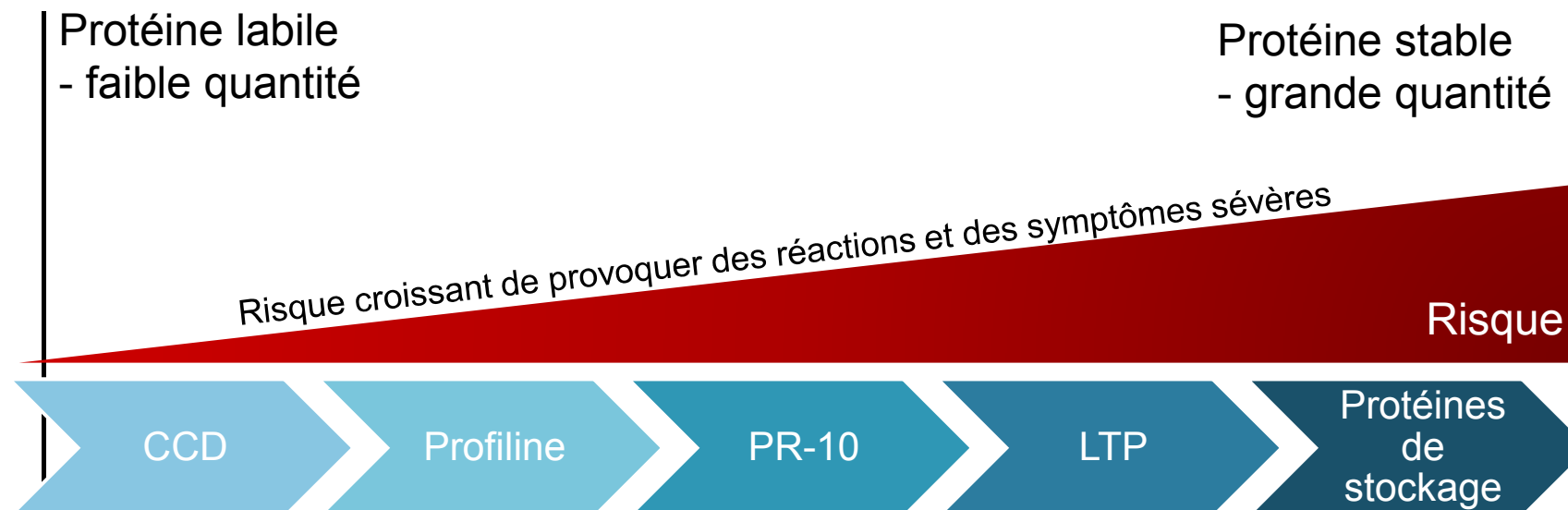
**Vicilines
Globulines 7S**

**Légumine
Globulines 11S**



Evaluation (simplifiée) du risque en fonction de la famille moléculaire

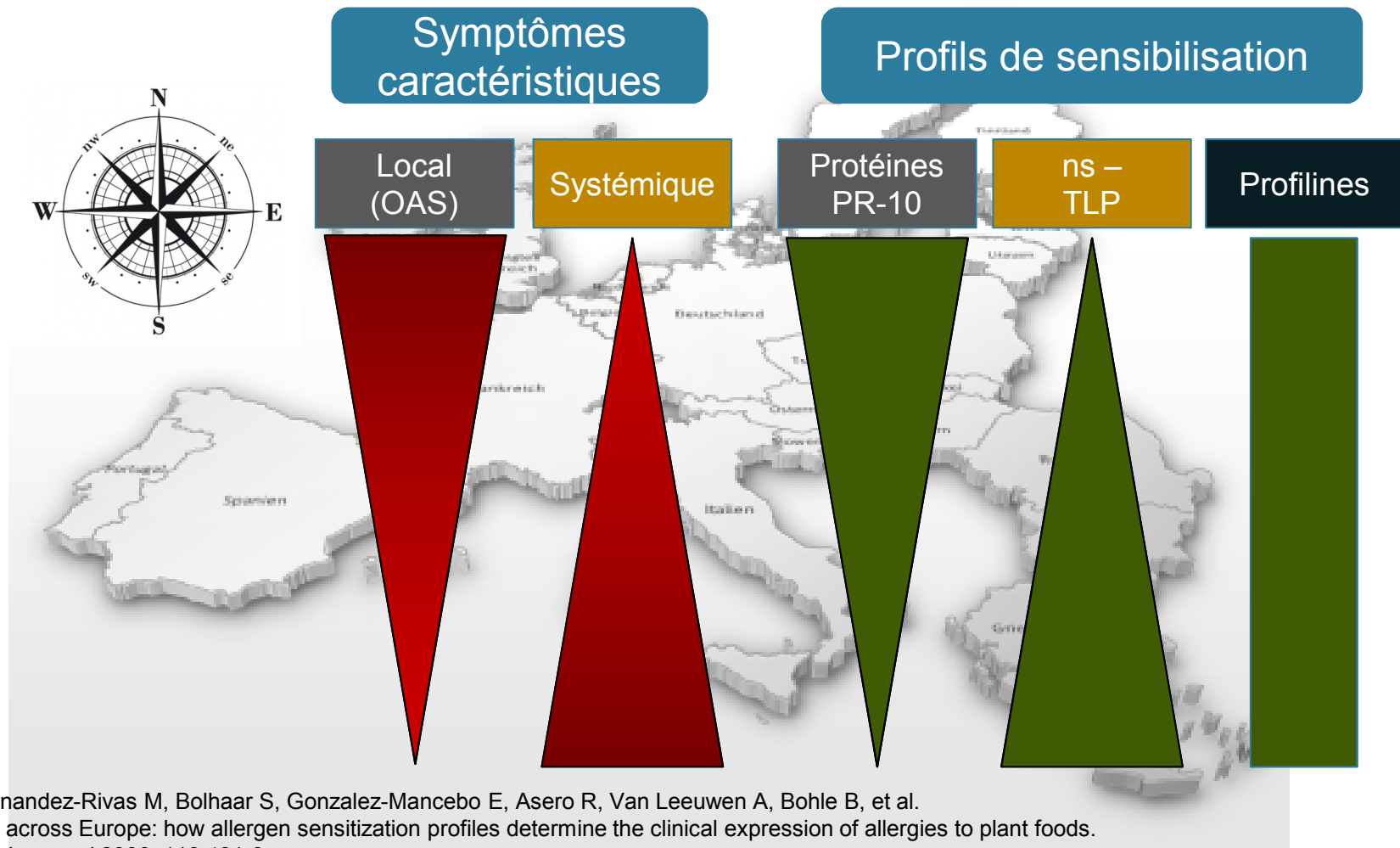
63



- ❑ Identification de **marqueurs de sévérité** de l'allergie
- ❑ Identification de **marqueurs de persistance** de l'allergie
- Basé sur les **propriétés physicochimiques** des protéines allergéniques

Répartition Nord-Sud des profils de sensibilisation

64



D'après : Fernandez-Rivas M, Bolhaar S, Gonzalez-Mancebo E, Asero R, Van Leeuwen A, Bohle B, et al.
Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods.
J Allergy Clin Immunol 2006; 118:481-8

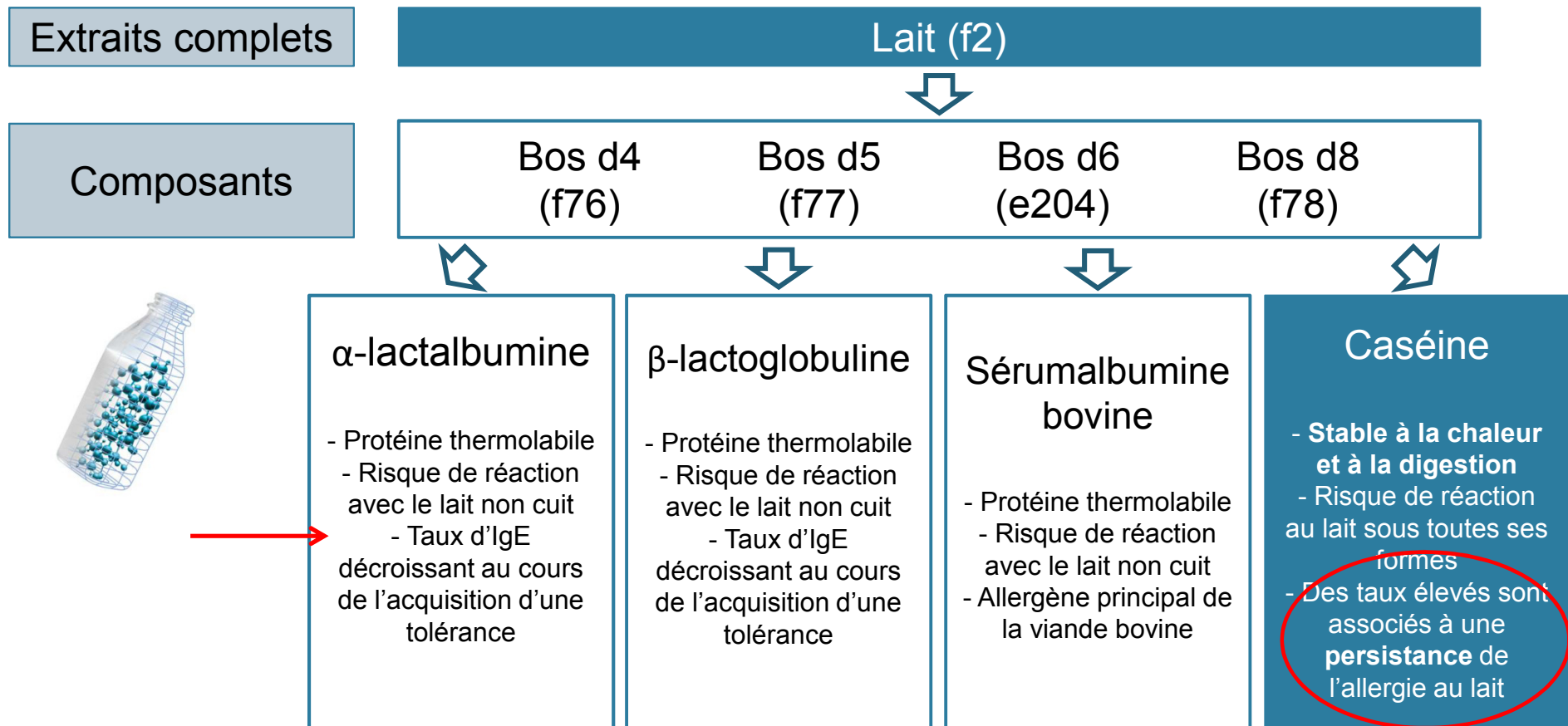
Identification de marqueurs de persistance d'allergie

Exemple : prise en charge de l'allergie au lait

65

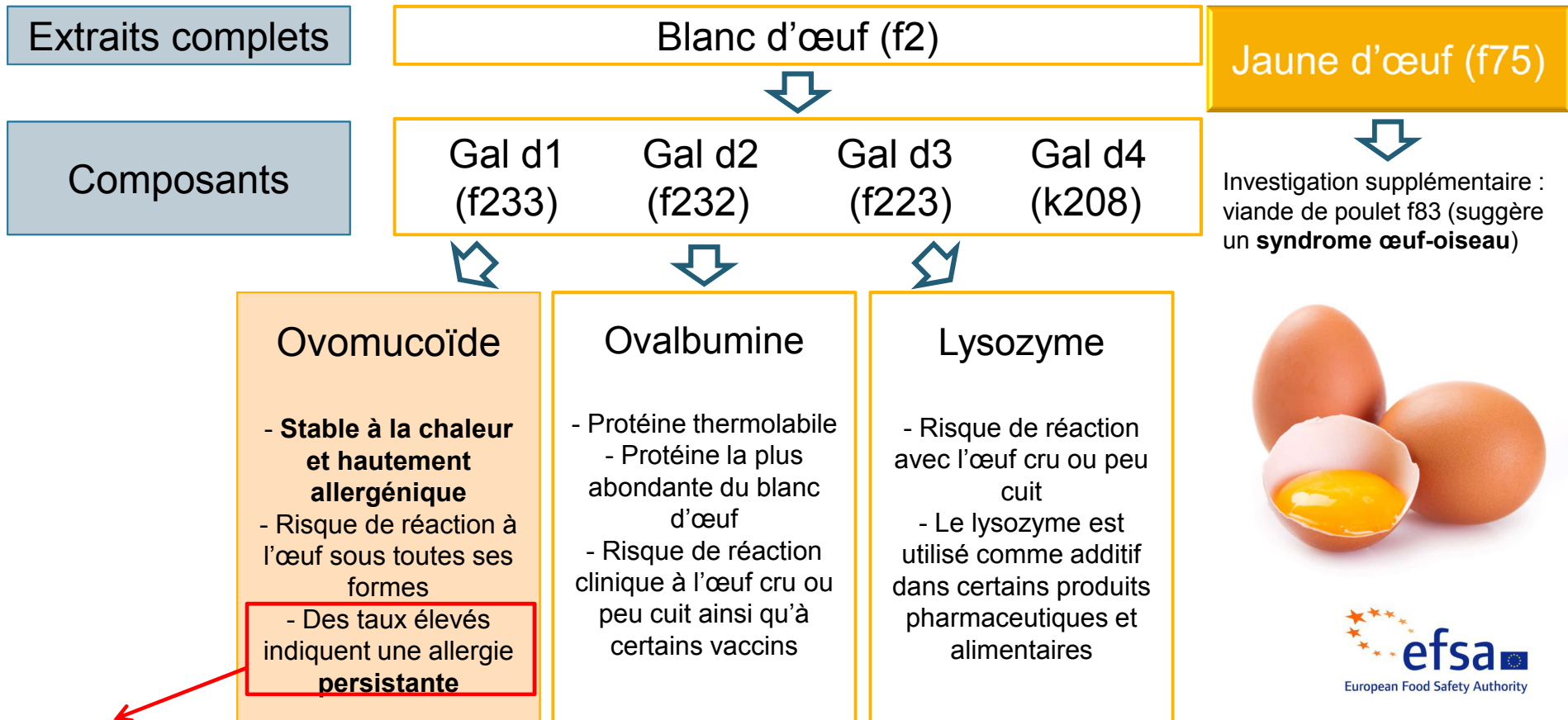
1. Confirmation de l'allergie IgE médiée

2. Aide à la prise en charge



Identification de marqueurs de persistance d'allergie

Exemple : prise en charge de l'allergie à l'oeuf



tolérance si < 1kU/L
réaction clinique / persistance si > 11 kU/L



Outils pour améliorer les indications de l'immunothérapie spécifique

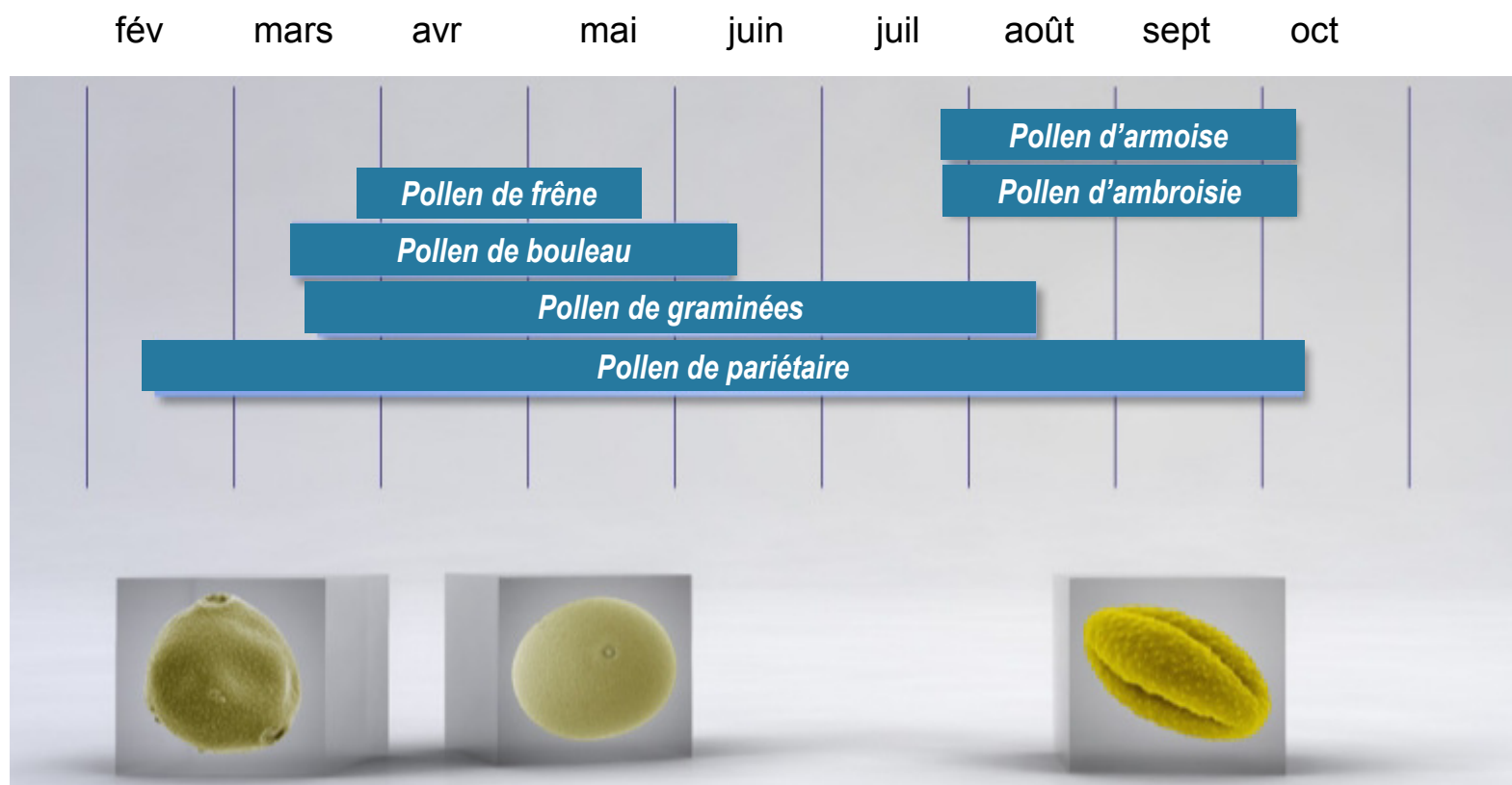
67

- Polysensibilisation à des pollens...



Les saisons polliniques se chevauchent

68



Outils pour améliorer les indications de l'immunothérapie spécifique

69

- Est-ce de vraies sensibilisations dues à des composants spécifiques ?



Outils pour améliorer les indications de l'immunothérapie spécifique

70

- ... ou une réactivité croisée due à des composants « croisants » ?



Outils pour améliorer les indications de l'immunothérapie spécifique

71

Composants allergéniques marqueurs d'une vraie sensibilisation

Composants allergéniques marqueurs de réactivité croisée*

Arbres

Bouleau rBet v 1

Profiline rBet v 2

Polcalcine

Cyprès nCup a 1

rOle e 9

Une immunothérapie a plus de chances de réussir chez les patients sensibilisés à des composants spécifiques du pollen

Graminées

Phléole rPhl p 1
rPhl p 5b
rPhl p 1+ 5b

Profiline rPhl p 7
Polcalcine rPhl p 12
rPhl p 7 + 12

Herbacées

Armoise nArt v 1
nArt v 3
Ambroisie nAmb a 1

Biopuces multiallergéniques

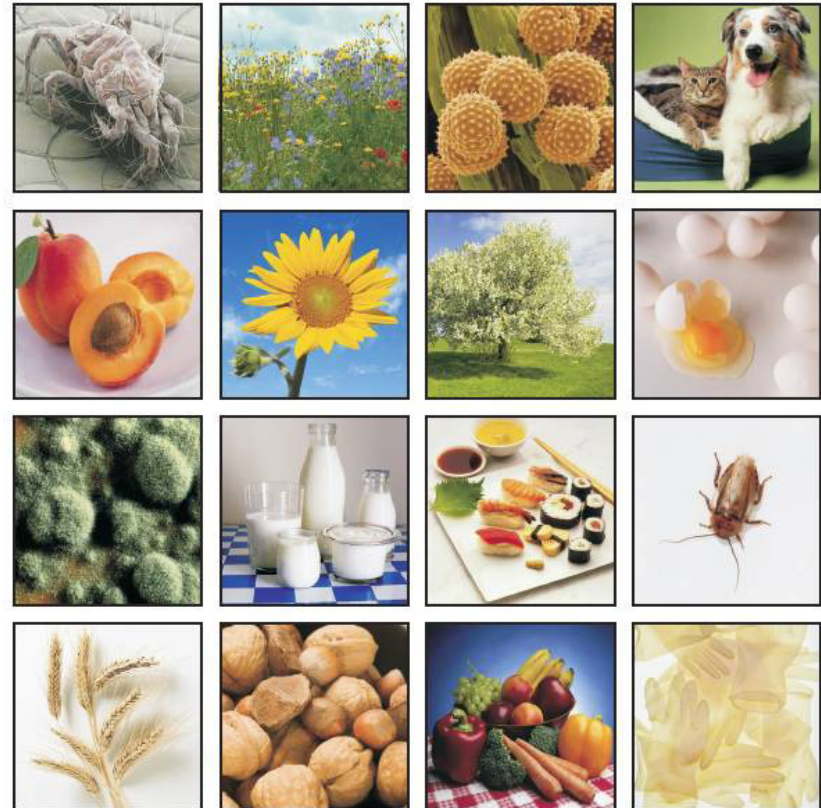
Faible quantité de sérum ($< 100\mu\text{L}$)

Fixation de différentes biomolécules sur un format microscopique

Détermination d'un profil de sensibilisation

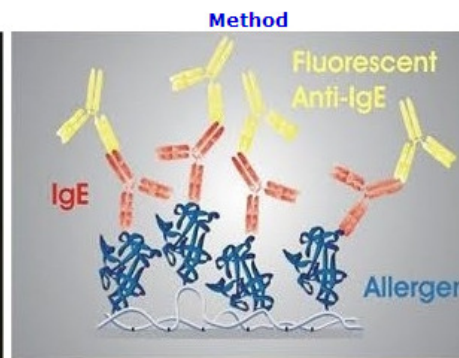
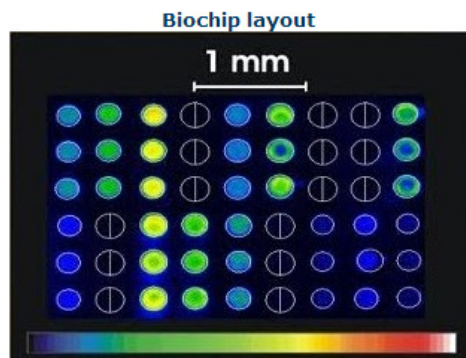
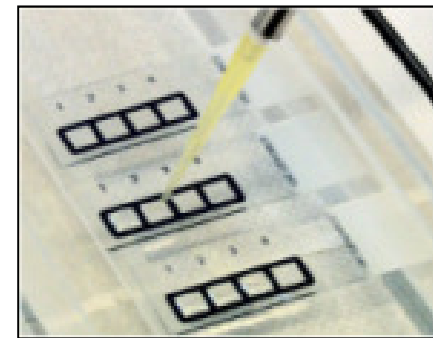
Obtention d'un grand nombre de résultats simultanément : « Vision élargie »

Possibilité d'explorations parallèles (ex : IgE/IgG)



Biopuces multiallergéniques : Test ISAC – Thermofisher Scientific

- ▣ 1^{ère} biopuce commercialisée en France
- ▣ **112 allergènes moléculaires (r ou n)** (provenant de **51** sources allergéniques)
- ▣ 30 µL de sérum
- ▣ Dosage semi-quantitatif
- ▣ Signal fluorescent
- ▣ Calibration à l'aide d'un échantillon standardisé

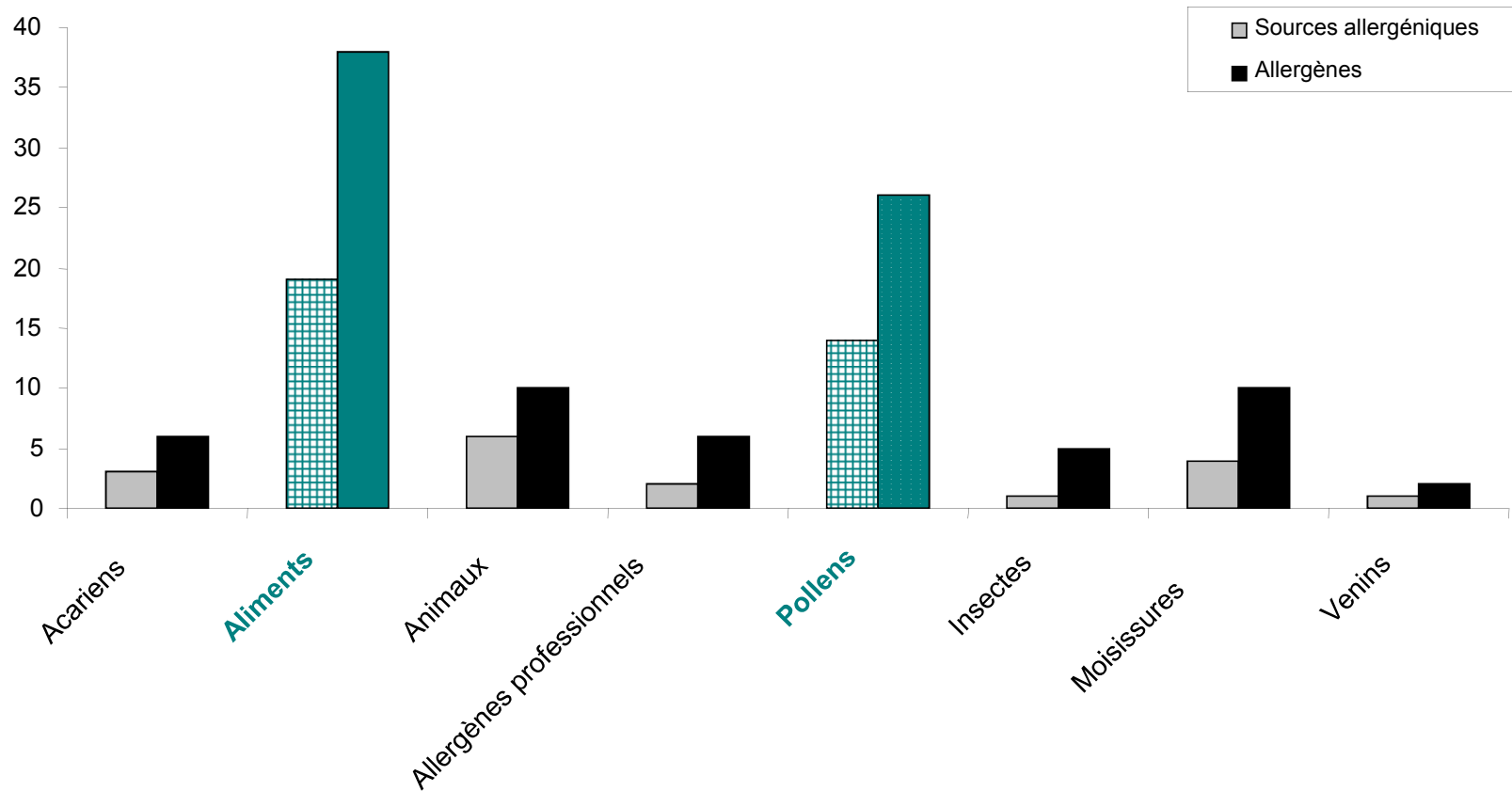


Result

Grass pollen			
Bermuda Grass	nCyn d 1	1 ISU	■
Timothy Grass	rPhl p 1	1,8 ISU	■
	rPhl p 5	1,1 ISU	■
	rPhl p 6	0,9 ISU	■
Tree pollen			
Birch	rBet v 1	27 ISU	■
Animals			
Cat	rFel d 1	5,5 ISU	■
	rFel d 4	1,5 ISU	■
Dog	rCan f 1	2 ISU	■

112 allergènes représentant 51 sources allergéniques

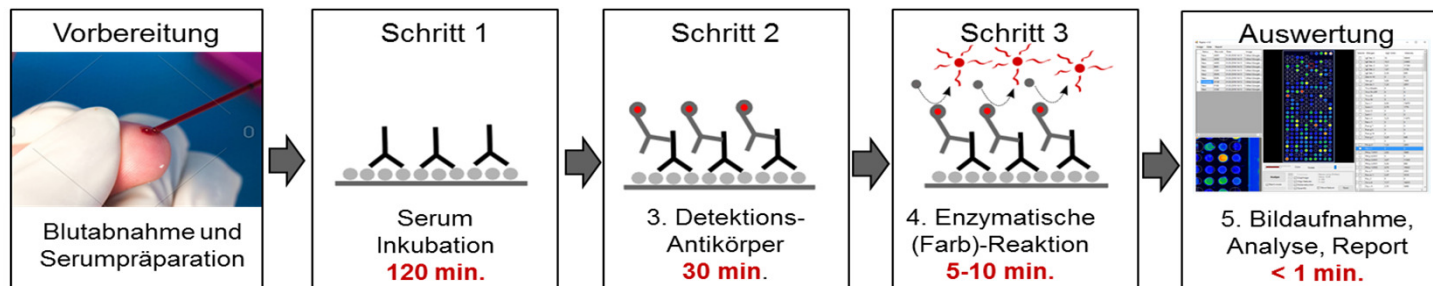
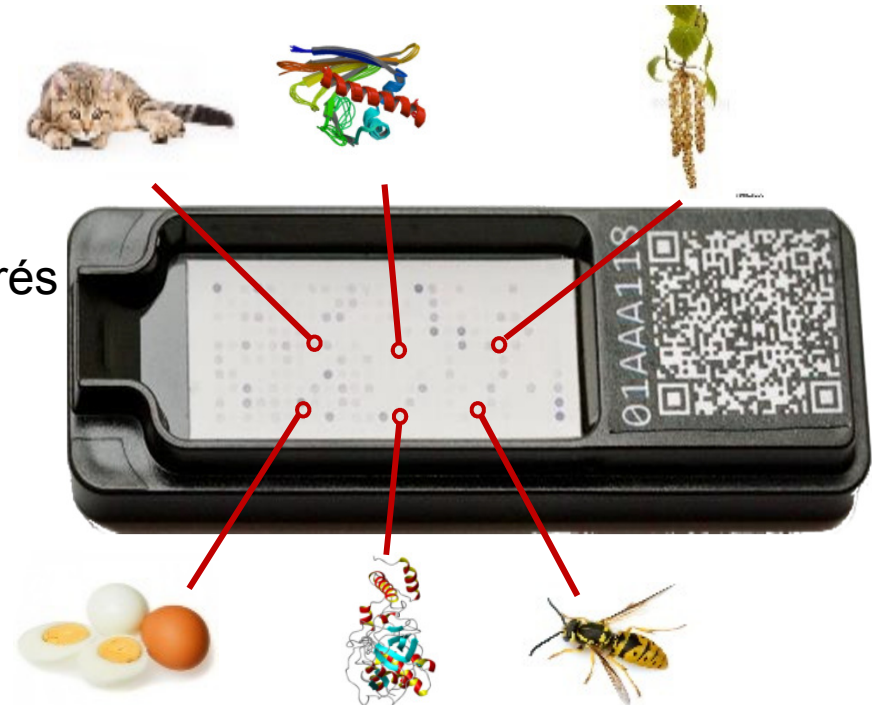
74



(/100 ImmunoCap)

Biopuces multiallergéniques : Test ALEX – Macroarray Diagnostics


- 282 allergènes fixés sur des microbilles
 - 156 extraits
 - 126 allergènes moléculaires
- Dosage semi-quantitatif : calibrateurs intégrés sur chaque biopuce
- Estimation du taux d'IgE totales
- Signal colorimétrique
- Commercialisé en France par Nephrotek



Exemple de résultat de Biopuce ISAC 112

Thermo

SCIENTIFIC



INFORMATION ECHANTILLON

ID Echantillon : 1121624_3
 Date échantillon : 16.12.2011
 Statut validation : Measured
 Date impression : 12.03.2012
 Courbe de calibration : KS14 23/11/2011 14:48:51

INFORMATION PATIENT

ID Patient : 1100564561
 Nom :
 Date de naissance : Age : 31
 ID/MR# : Sexe :

INFORMATION MEDECIN PRESCRIPTEUR

Médecin prescripteur : HJ ALLERGO
 Adresse : 36408 CHLS

1. Résumé des résultats des dosages d'IgE spécifiques positifs

Composants d'aéroallergènes principalement spécifiques d'espèces

Composant	rBet v 1	PR-10 protein	ISU-E	Barre
Pollens d'arbres			31 ISU-E	
Bouleau				

Composants marqueurs de réactivité croisée


Protéines PR-10	rBet v 1	PR-10 protein	ISU-E	Barre
Aulne	rAln g 1	PR-10 protein	46 ISU-E	
Pollen de noisetier	rCor a 1.0101	PR-10 protein	22 ISU-E	
Noisette	rCor a 1.0401	PR-10 protein	15 ISU-E	
Pomme	rMal d 1	PR-10 protein	20 ISU-E	
Pêche	rPru p 1	PR-10 protein	20 ISU-E	
Soja	rGly m 4	PR-10 protein	1.9 ISU-E	
Arachide	rAra h 8	PR-10 protein	16 ISU-E	
Kiwi	rAct d 8	PR-10 protein	1.8 ISU-E	
Céleri	rApi g 1	PR-10 protein	1.6 ISU-E	

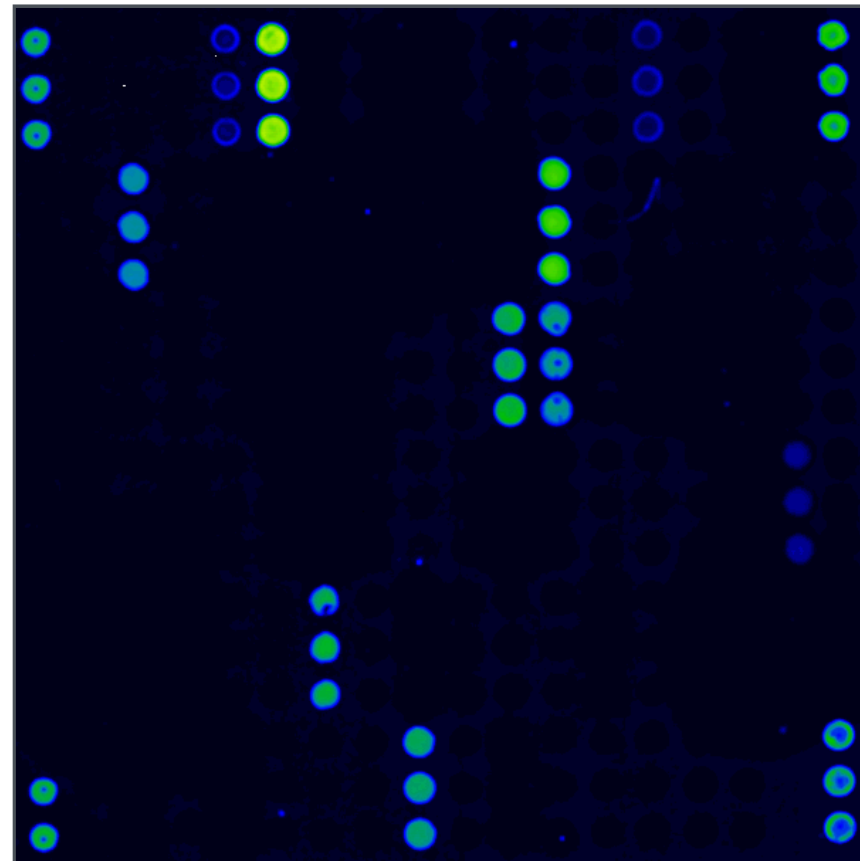
ISAC Standardized Units (ISU-E)

< 0.3
 0.3 - 0.9
 1 - 14.9
 ≥ 15

Niveau

Indétectable
 Faible
 Modéré / Elevé
 Très élevé





Biopuces multi-allergéniques: quelles indications?

77

- Pour quels patients ?
- Quelle aide supplémentaire ?

En élargissant, on affine....?

Biopuces multi-allergéniques: quelles indications?

78

Définition du profil de sensibilisation d'un polysensibilisé

- Asthme sévère
- Allergies alimentaires multiples et sévères
- Poser l'indication d'une immunothérapie spécifique chez un polysensibilisé

Histoire clinique mal ou non expliquée par les tests traditionnels

- Anaphylaxie avec enquête allergologique négative
 - Nouvel éclairage ?
 - Découverte de sensibilisations inattendues qui font avancer dans le diagnostic

Pathologies nécessitant un bilan allergologique étendu au diagnostic

Diagnostic d'élimination de l'allergie

Etudes épidémiologiques

Limites de ces tests :

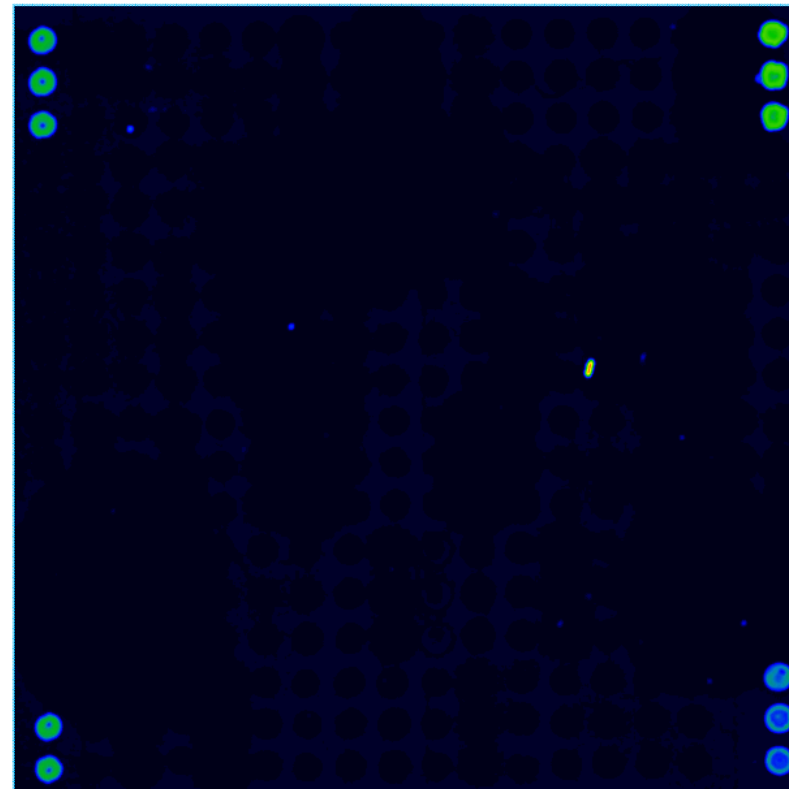
- Souvent moins sensible que les tests unitaires
- Il manquera toujours des allergènes

ISAC négatif : élimination de l'allergie ?

79

- A. Daniel né en 1943
- Histoires cliniques « bizarres » souvent après consommation d'abats (6 à 7 h après)

IgE alpha-gal = 7,98 kU/L



En résumé

80

- L'allergie moléculaire ne doit pas être un pur raisonnement/jeu intellectuel mais un outil efficace pour une meilleure prise en charge

- L'allergologue doit avoir un langage « moléculaire »
 - ▣ Maitrise de la somme d'informations fournies (ISAC)
 - ▣ Dialogue interactif clinico-biologique

- Les extraits sont encore bien utiles (puces à extraits)

- La suite de la révolution moléculaire
 - ▣ Immunothérapie à la carte en fonction du profil de sensibilisation ?

Le dernier mot doit rester à la clinique.

« *Bien comprendre, c'est bien soigner* »

Exploration de l'immunité humorale

Principe : dosage de marqueurs solubles dans le sang pour l'exploration de l'immunité innée (complément) et adaptative (immunoglobulines : Ig).

Examens biologiques	Intérêt clinique
Electrophorèse des protéines	Appréciation globale des Ig (hyper/hypogammaglobulinémie)
Dosage pondéral des Ig Dosage des sous-classe d'IgG	Evaluation quantitative de chaque Ig pouvant notamment orienter vers un déficit immunitaire
Sérologie des antigènes vaccinaux	Exploration des déficits immunitaires
Recherche d'auto-anticorps	Maladies auto-immunes
Recherche d'IgE spécifiques, Dosage de la tryptase et de l'histamine	Exploration des réactions d'hypersensibilité immédiate
Dosage du complément	Déficits immunitaires, Exploration de l'hypersensibilité de type III

Exploration de l'immunité cellulaire

Principe : évaluation quantitative et qualitative des principales populations leucocytaires.

Examens biologiques	Intérêt clinique
NFS	Appréciation globale quantitative des leucocytes
Immunophénotypage T, B, NK	Appréciation quantitative des lymphocytes. Déficits immunitaires
Réponse aux mitogènes et/ou à des antigènes spécifiques	Exploration des déficits immunitaires
Test IGRA (Quantiferon, Elispot)	Exploration des hypersensibilités retardées (type IV)