

# BIOLOGIE DE L'ALLERGIE

S. VIEL

Laboratoire d'Immunologie

Groupement Hospitalier Sud -Lyon

*DES Immunologie  
Allergologie  
7 février 2019*

# 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

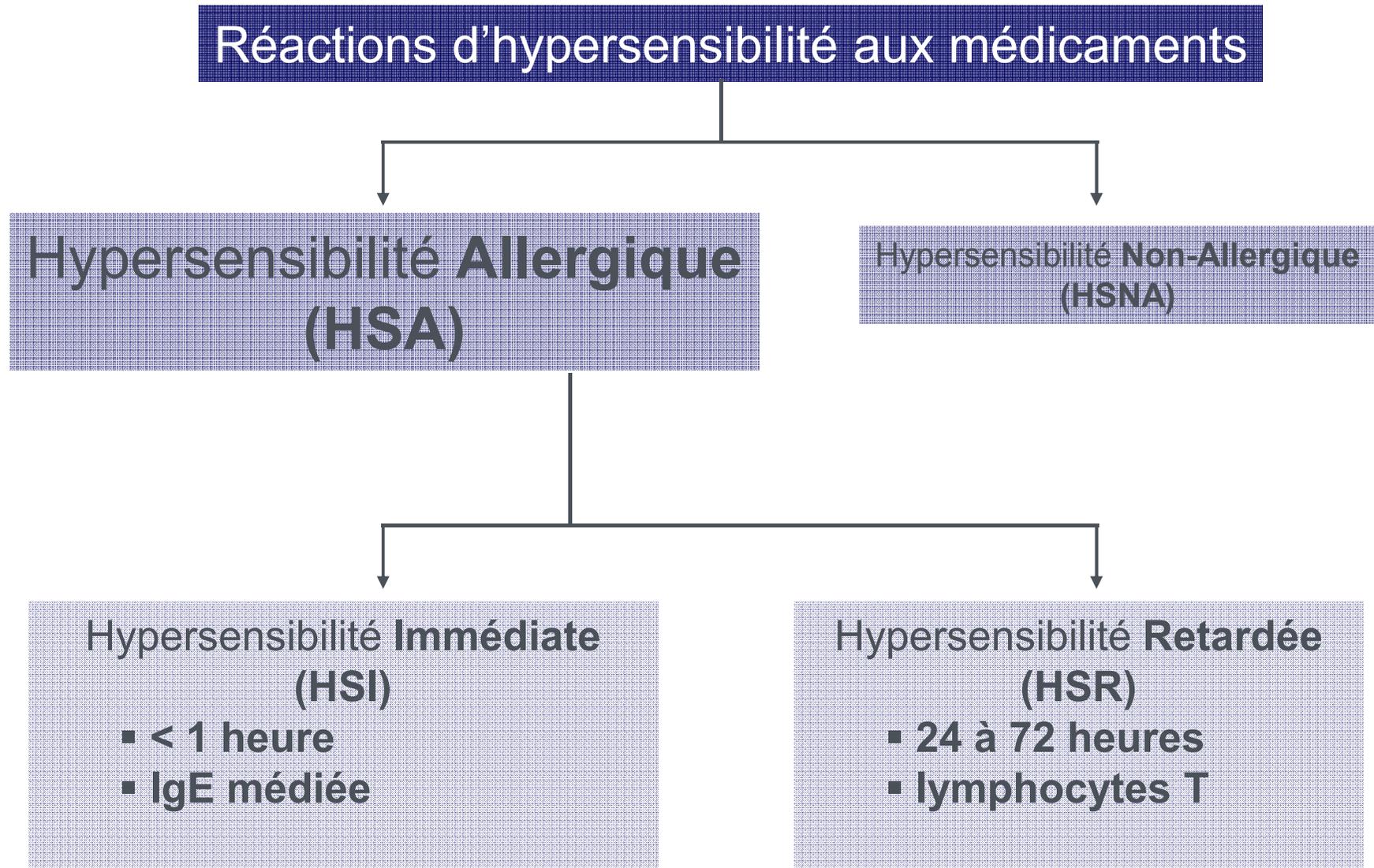
Hypersensibilité Allergique  
(HSA)

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



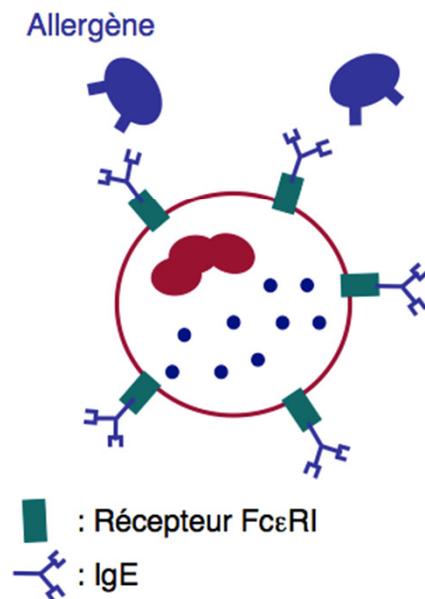
Nécessité de développer des tests « à la carte » permettant de tester n'importe quel allergène (ie : médicament qu'a reçu le patient lors de son accident)

= 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 :

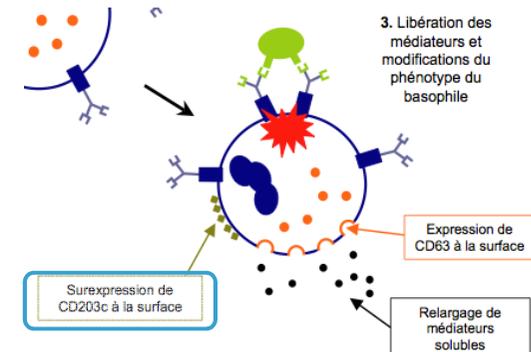
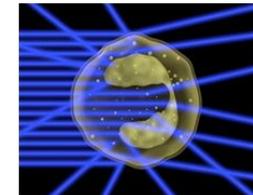
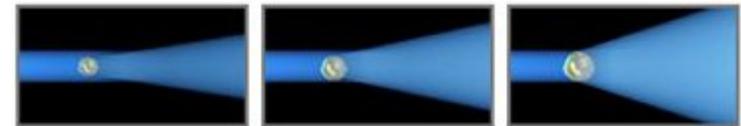
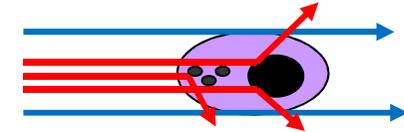
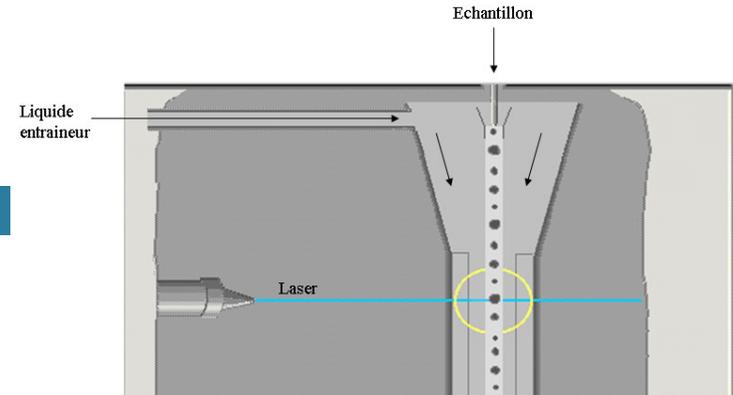
Incubation des basophiles sensibilisés avec l'allergène ayant provoqué la réaction



# 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

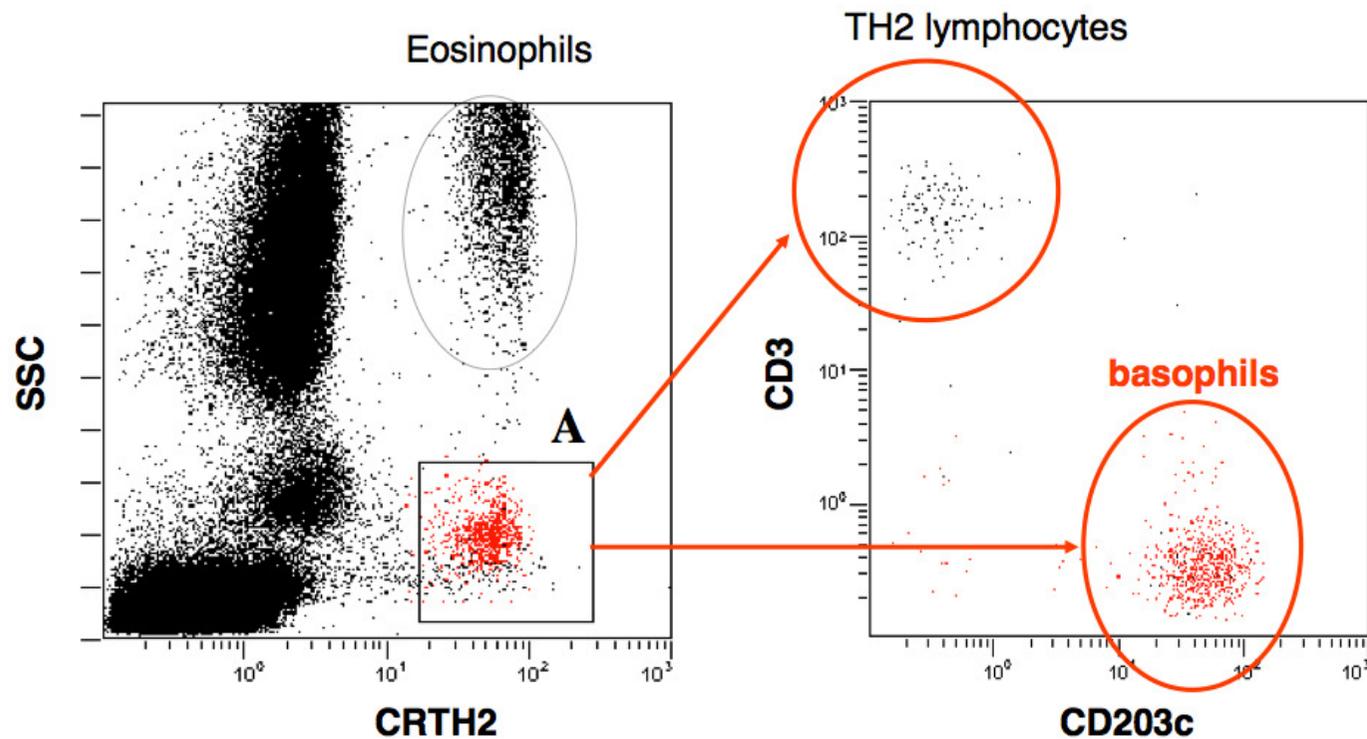
## Protocole

|                       | Témoin négatif | Témoin positif | Tubes tests |
|-----------------------|----------------|----------------|-------------|
| PBS                   | 20 $\mu$ L     |                |             |
| Anti-IgE              |                | 20 $\mu$ L     |             |
| Allergène dilué       |                |                | 20 $\mu$ L  |
| CRTH2-FITC            | 10 $\mu$ L     | 10 $\mu$ L     | 10 $\mu$ L  |
| CD203c-PE             | 10 $\mu$ L     | 10 $\mu$ L     | 10 $\mu$ L  |
| CD3-PC5               | 10 $\mu$ L     | 10 $\mu$ L     | 10 $\mu$ L  |
| Solution d'activation | 100 $\mu$ L    | 100 $\mu$ L    | 100 $\mu$ L |
| Sang (EDTA)           | 100 $\mu$ L    | 100 $\mu$ L    | 100 $\mu$ L |

- ✓ Vortexer et incubé 15 minutes à 37°C.
- ✓ Ajouter 2mL de solution de lyse
- ✓ Vortexer et incubé 10 minutes à température ambiante
- ✓ Centrifugation 5 minutes à 200g - Laver en PBS
- ✓ Reprendre avec du PBS / 0,1% PFA
- ✓ Vortexer 5 secondes et analyser au cytomètre

# Test d'Activation des Basophiles (TAB)

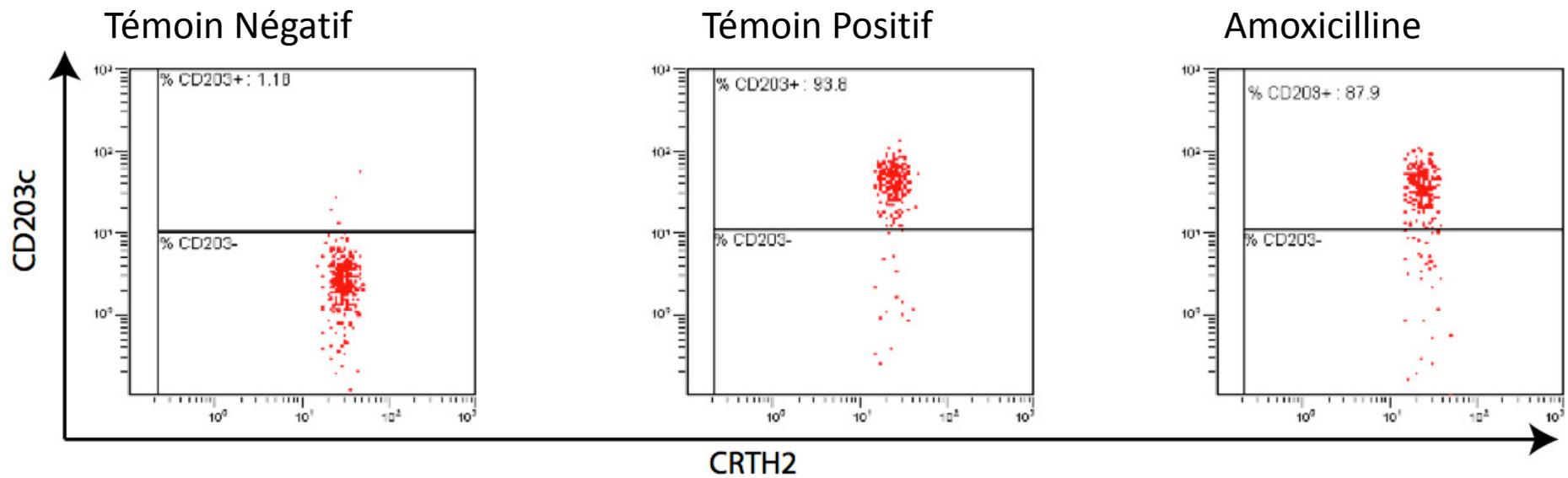
- Pas de consensus sur l'identification des basophiles
- Marquages les plus utilisés :
  - ▣ CD3-, CRTH2+
  - ▣ CCR3+, Faible SSC



## Principaux marqueurs d'activation utilisés:

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

# Exemple d'activation en présence d'Amoxicilline:

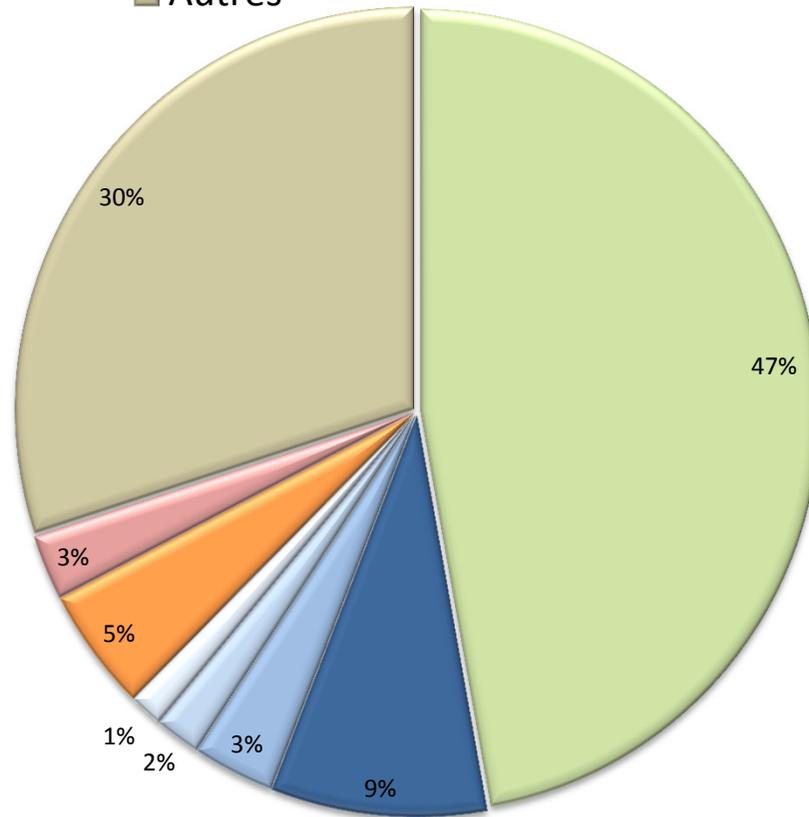


# Utilisation des TAB en routine : exploration des réactions d'HSI aux médicaments

- 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<br>CD63                                  | 52<br>22        | 100<br>79       | 41                        |
| Eberlein <i>et al.</i> (2010) | H ± ST ± IgE       | CD63-CCR3 <sup>+</sup><br>CD63-IgE <sup>+</sup> | 55<br>53        | 100             | 39                        |
| De Weck <i>et al.</i> (2009)  | H                  | CD63  | 50              | 89–97           | 262                       |

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

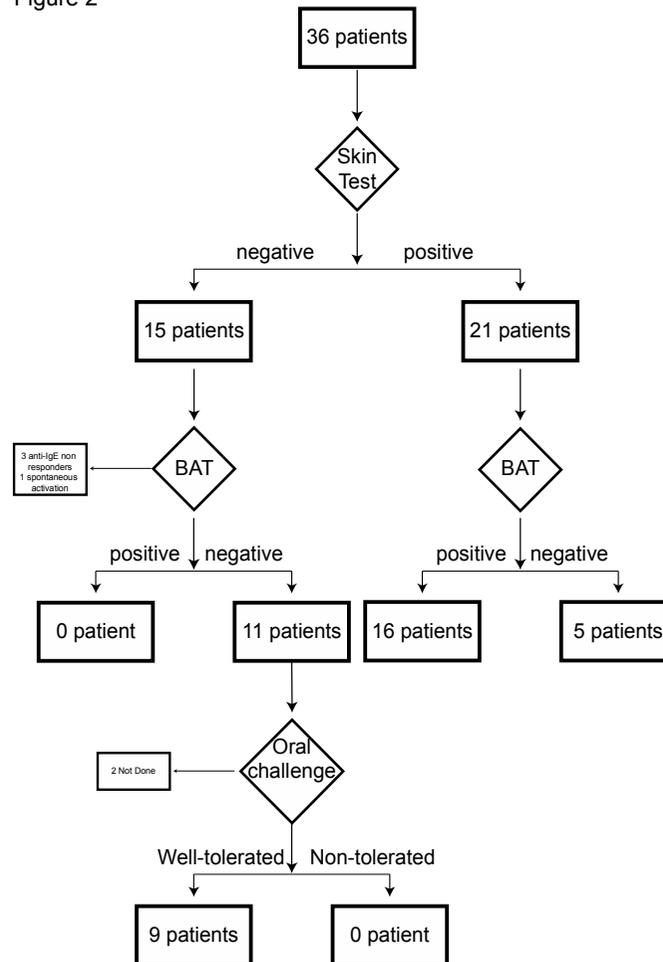
# Curares:

| Study (year)                    | Stimulus                                     | Reference test | Activation marker | Sensitivity (%)    | Specificity (%) | Patients and control individuals (n) |
|---------------------------------|--|----------------|-------------------|--------------------|-----------------|--------------------------------------|
| Abuaf <i>et al.</i> (1999)      | NMBA   | H              | CD63<br>CD45      | 64<br>43           | 81<br>96        | 28                                   |
| Monneret <i>et al.</i> (2002)   | NMBA   | H ± ST         | CD63              | 54                 | 100             | 56                                   |
| Sudheer <i>et al.</i> (2005)    | NMBA   | H              | CD63<br>CD203c    | 79<br>36           | 100<br>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<br><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

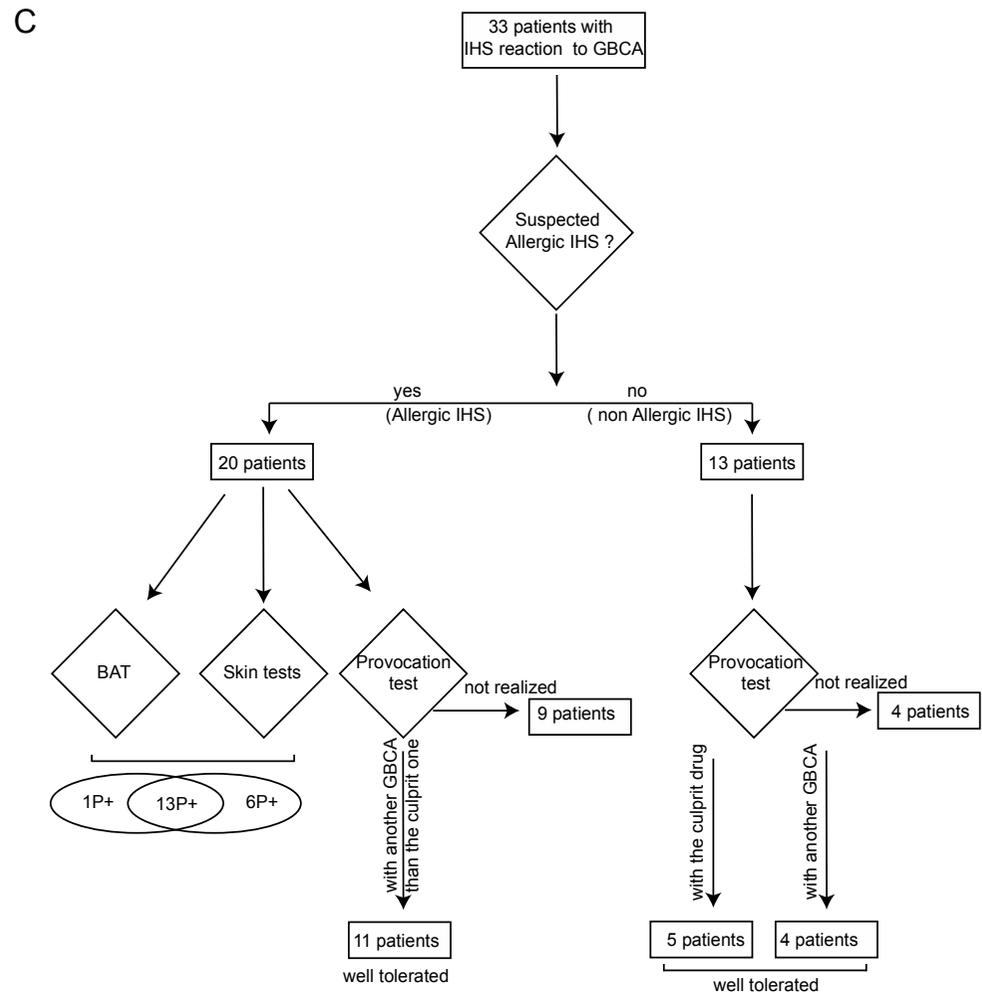
# Expérience à Lyon Sud : la pyostacine

Figure 2



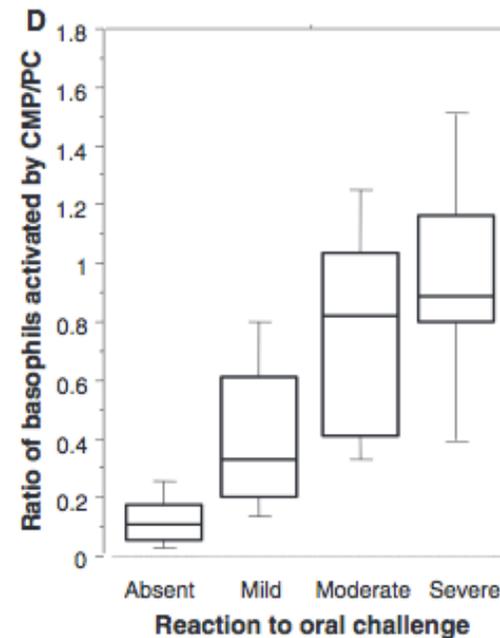
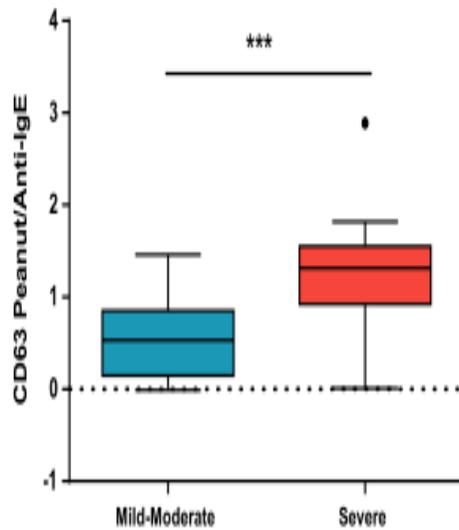
Viel et al.

# Produits de contraste gadolinés:



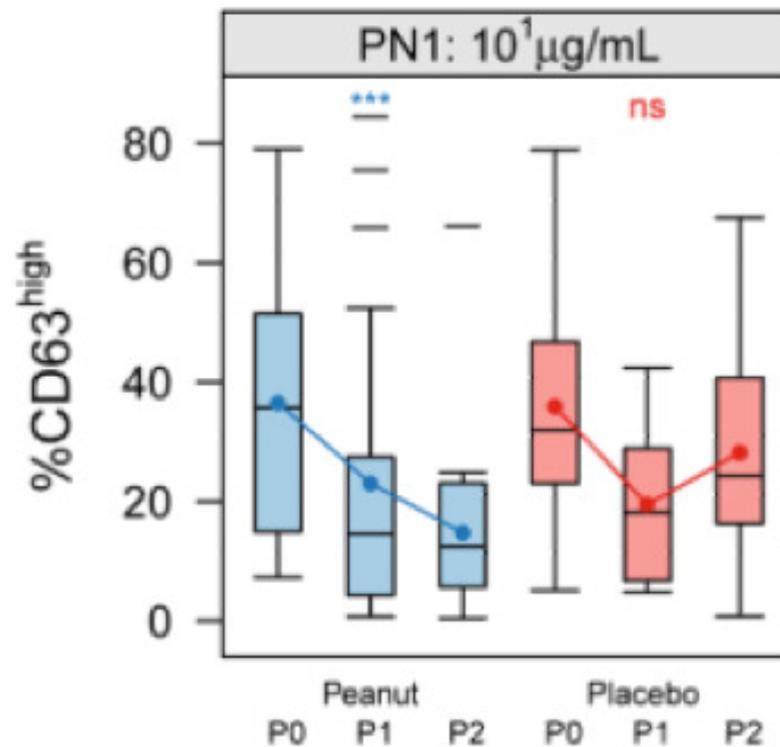
# Utilisation des TAB hors routine

- 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



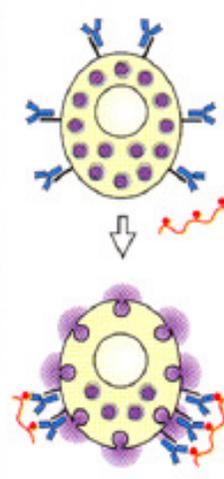
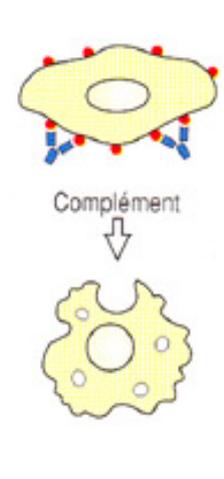
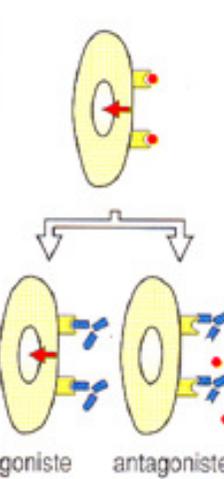
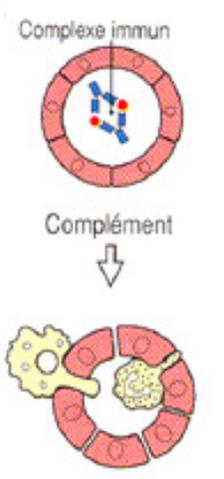
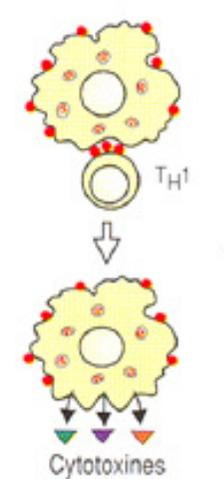
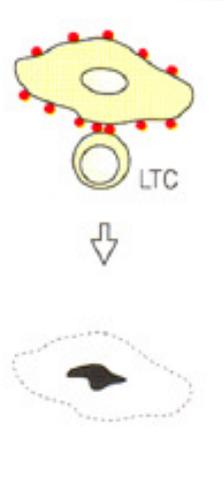
## En conclusion sur les TAB

---

- 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,<br>Cellules T <sub>H2</sub>   | Anticorps IgG  |   | Anticorps IgG  | Cellules T   |  |
| Antigène                               | Antigène soluble   | Antigène associé aux<br>cellules ou à la matrice   | Récepteurs<br>sur la surface cellulaire   | Antigène soluble   | Antigène soluble   | Antigènes associé<br>aux cellules  |
| Mécanisme effecteur                    | Activation<br>des mastocytes   | Complément<br>cellules Fc R <sup>+</sup><br>(phagocytes, cell. NK)   | L'anticorps<br>modifie le signal  | Complément<br>Phagocytes   | Activation<br>des macrophages  | Cytotoxicité   |
|  |  |    |  |  |  |  |
| Exemple de réaction d'hypersensibilité | Rhinite allergique,<br>asthme,<br>anaphylaxie systémique                           | Certaines allergies<br>médicamenteuses<br>(ex: pénicilline),<br>réaction transfusionnelle,<br>anémie hémolytique auto-immune | Maladie de Graves<br>(agoniste)<br>Myasthénie<br>(antagoniste)                      | Maladie sérique,<br>Lupus érythémateux disséminé                                     | Dermite de contact,<br>Rejet de greffe,<br>Arthrite rhumatoïde                       | Dermite de contact,<br>Rejet de greffe,<br>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

---

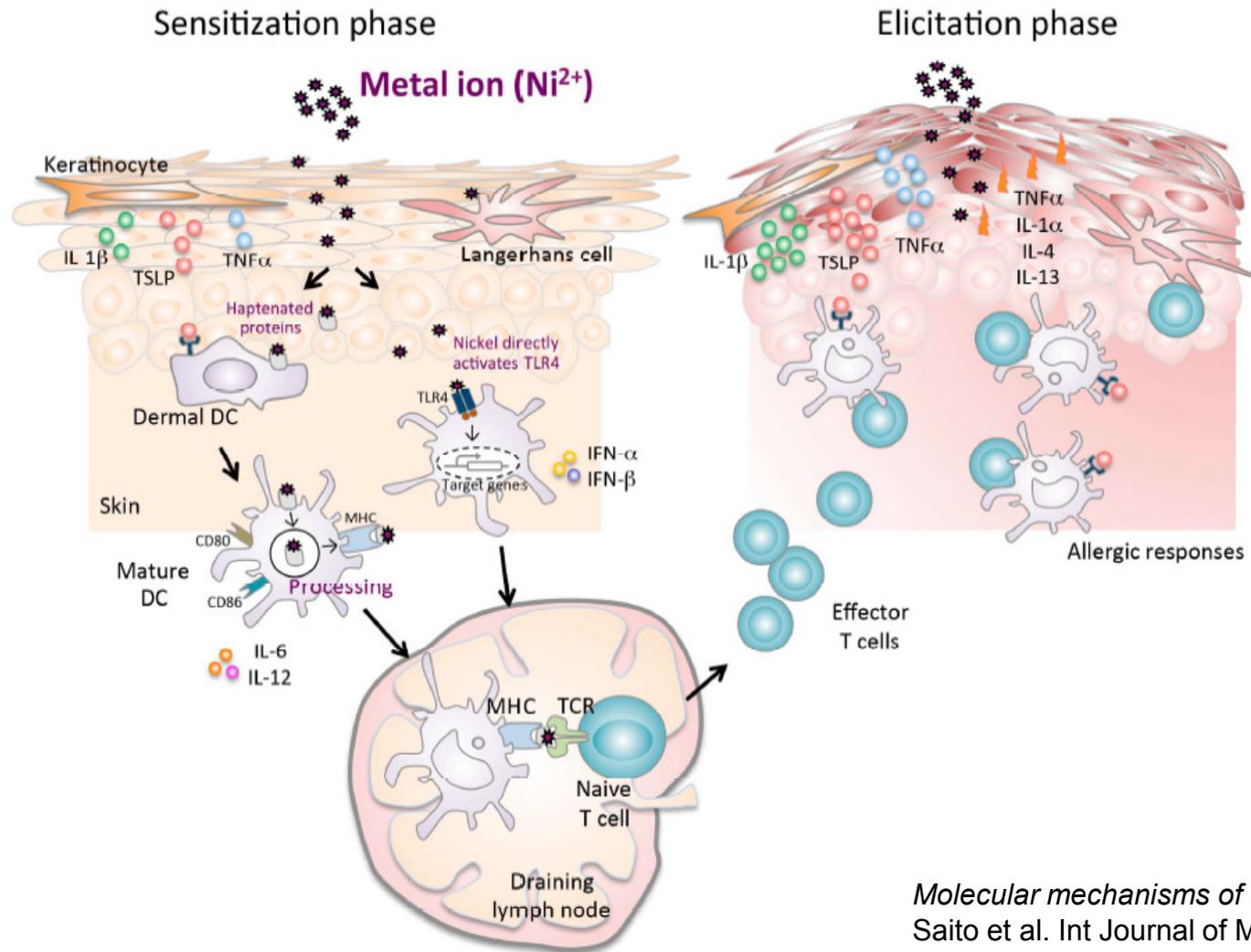
- Antigènes protéiques :
  - Infections bactériennes, parasitaires, mycosiques et virales
  - Développement intracellulaire

## Haptènes :

- Substances responsables d'eczema 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

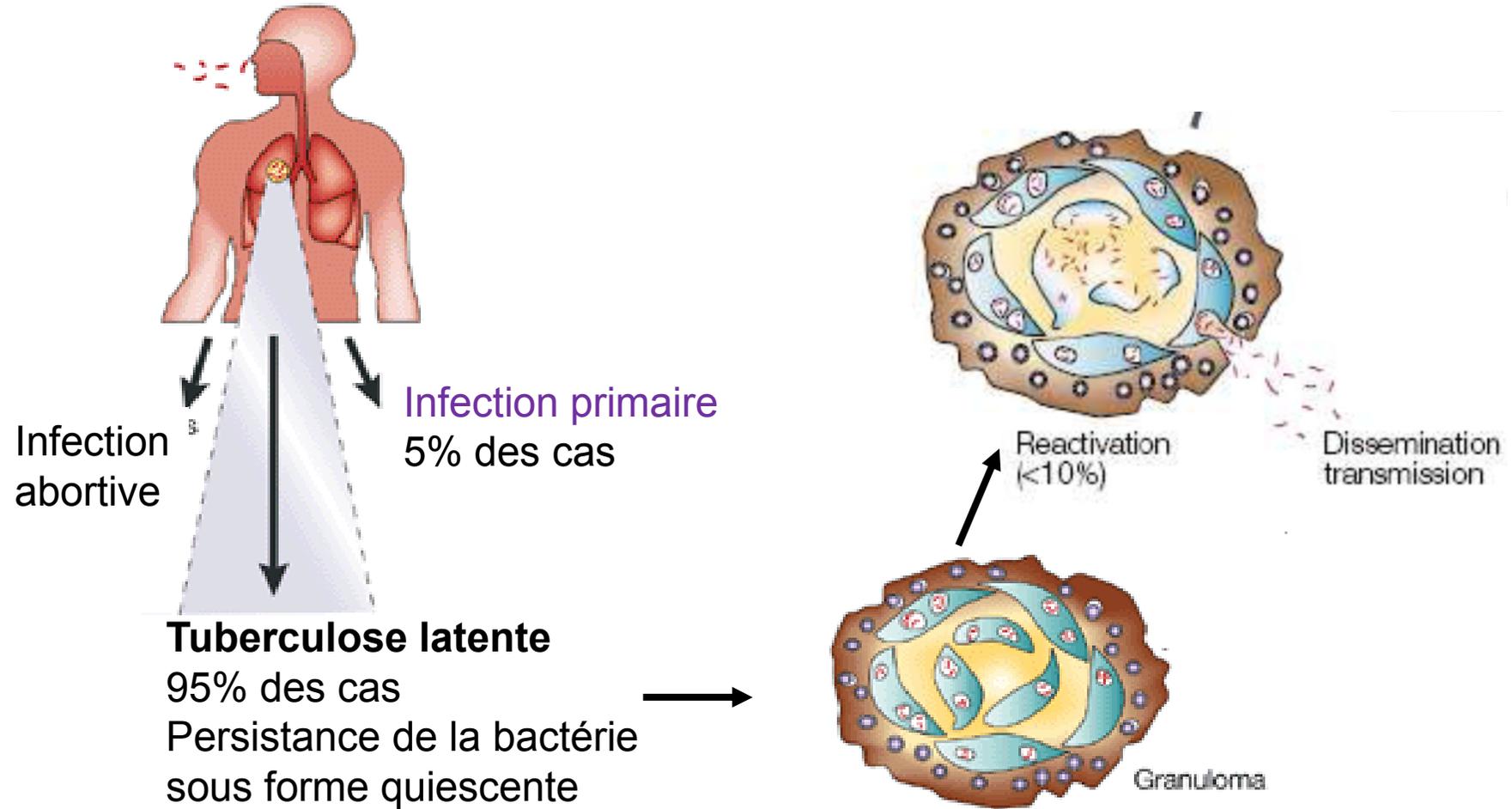
---

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

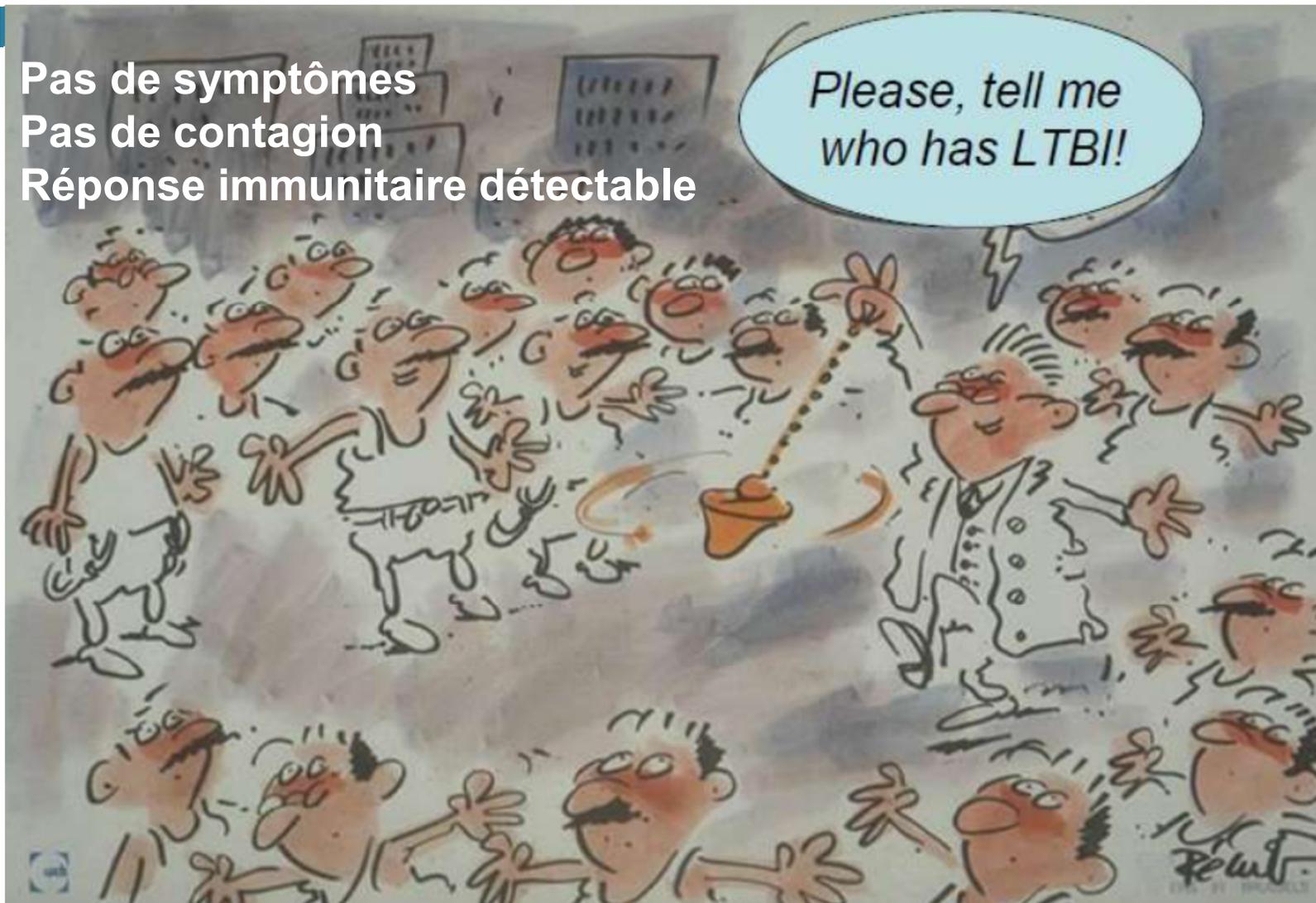
# Contamination par *Mycobacterium tuberculosis*



1. Défense anti-infectieuse

## Détection de l'infection tuberculeuse latente

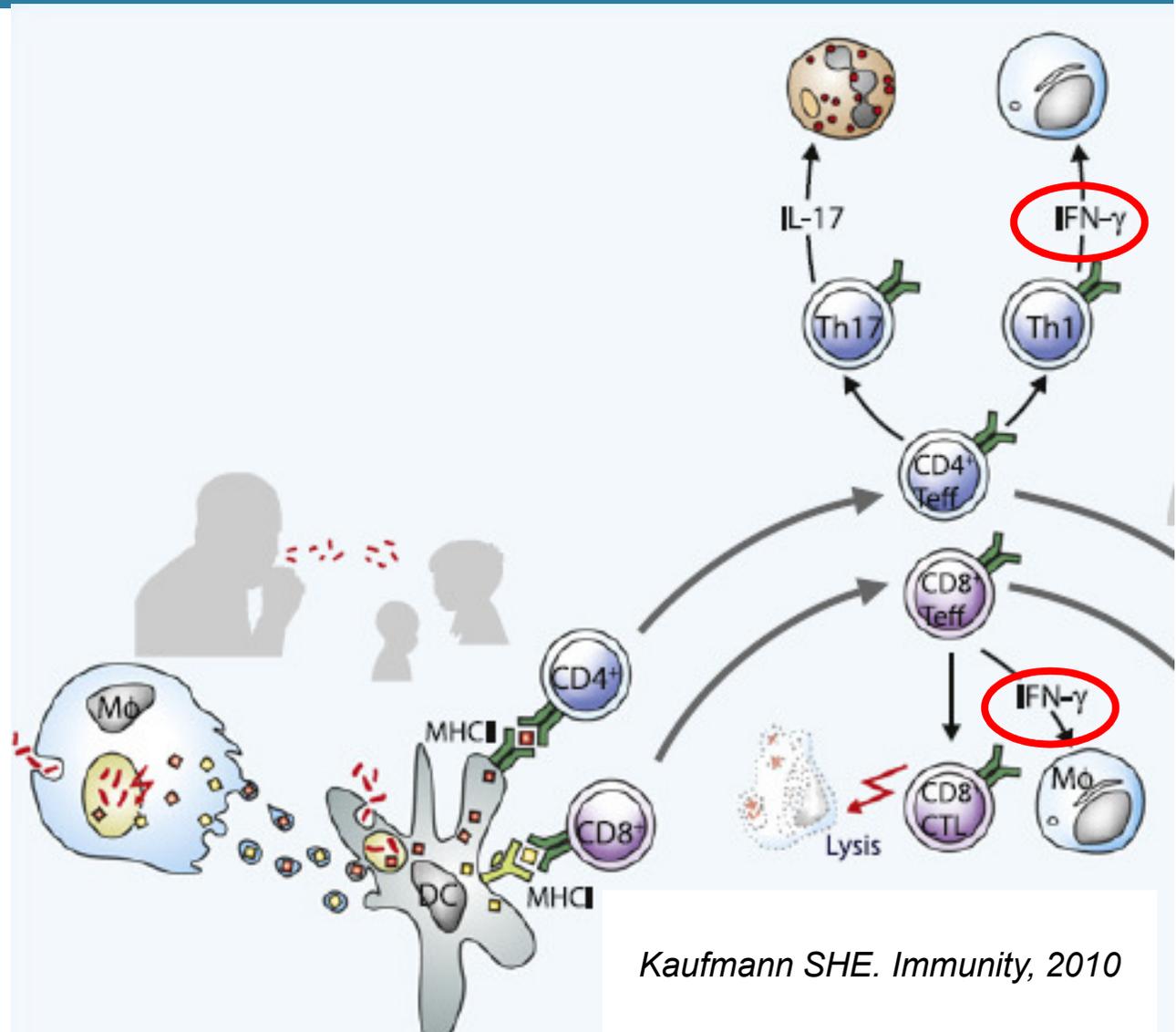
Pas de symptômes  
Pas de contagion  
Réponse immunitaire détectable



## 1. Défense anti-infectieuse

# Immunité anti-tuberculeuse : Réponse immunitaire adaptative

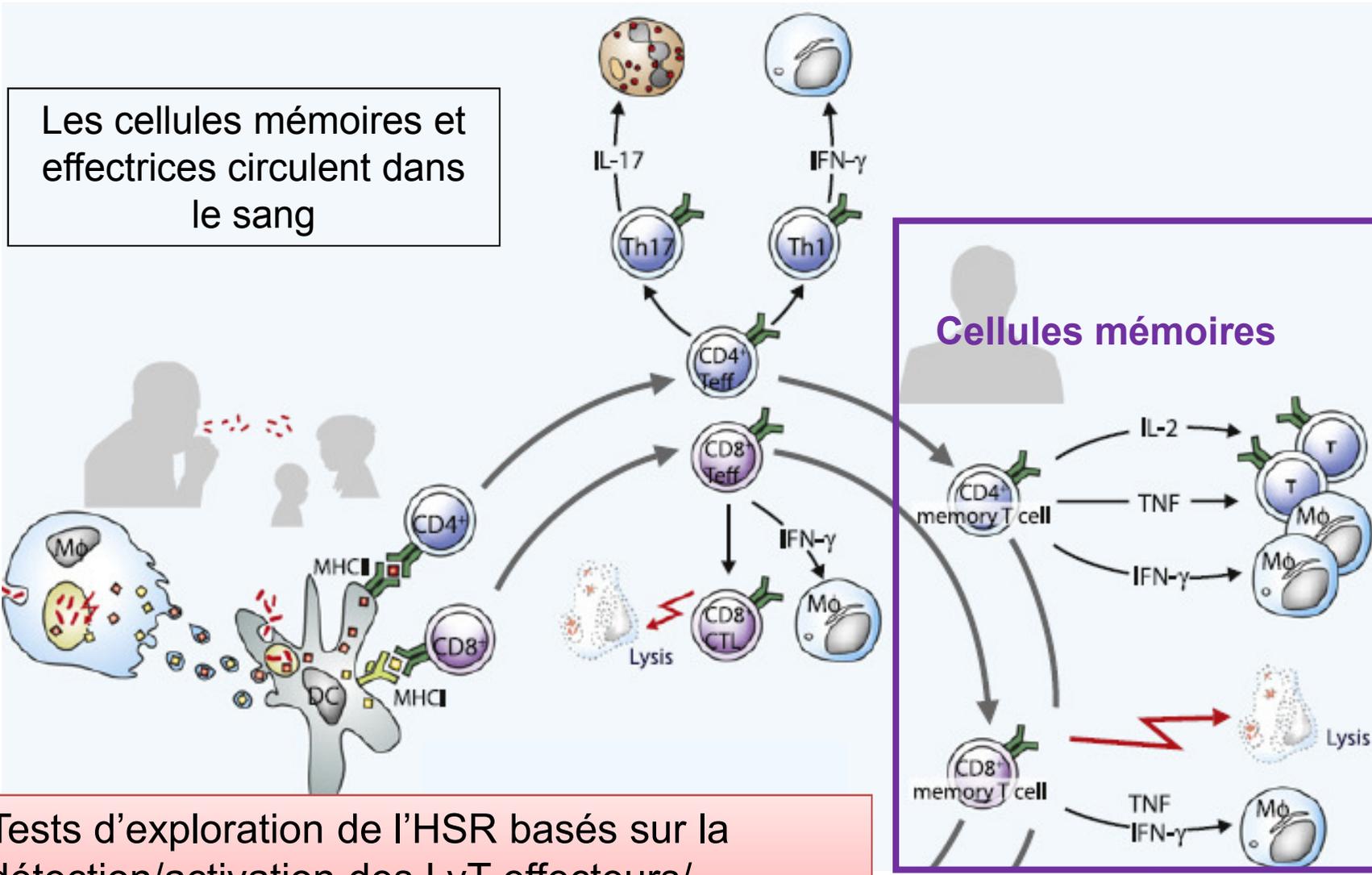
- Immunité anti-tuberculeuse protectrice : **type Th1**
- Antigènes de *M. tuberculosis* présentés par les cellules dendritiques aux Ly T naïfs
- Différenciation des Ly en Ly Th1 sous l'influence de l'Interleukine 12



Kaufmann SHE. Immunity, 2010

1. Défense anti-infectieuse

# Immunité anti-tuberculeuse : Mémoire immunitaire

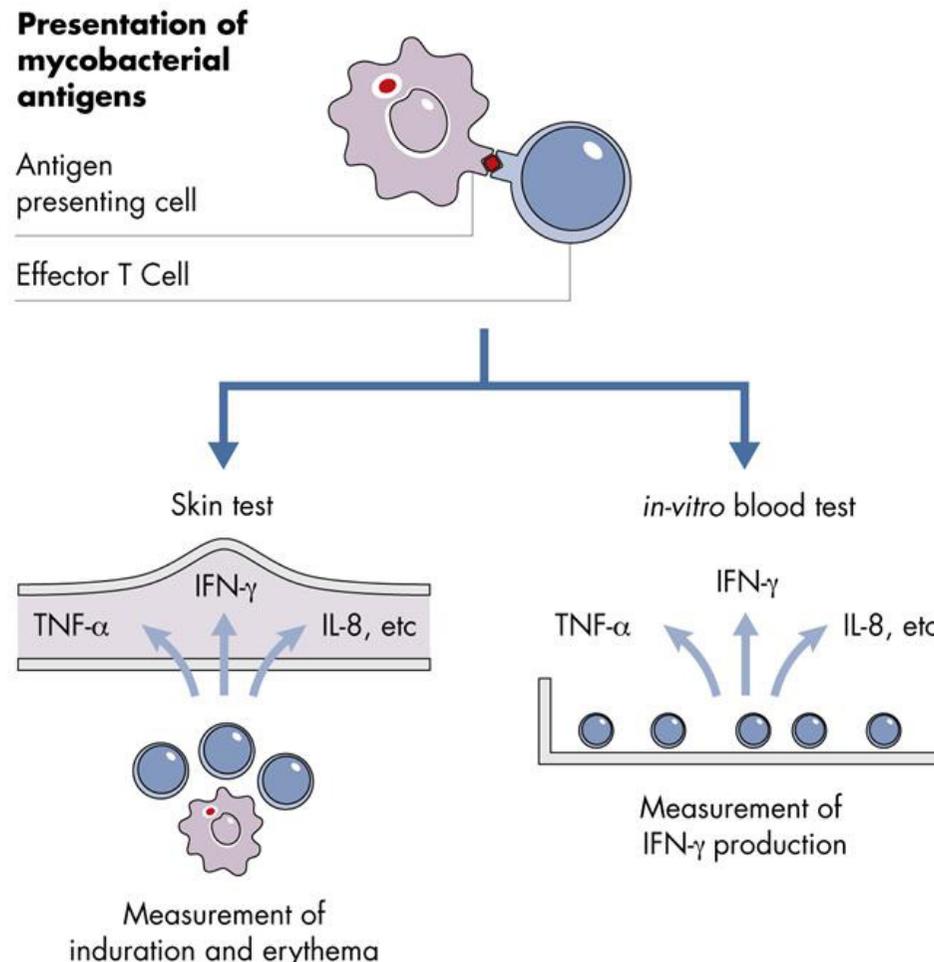


Tests d'exploration de l'HSR basés sur la détection/activation des LyT effecteurs/mémoire

## 1. Défense anti-infectieuse

# 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)



## 1. Défense anti-infectieuse

# 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 :

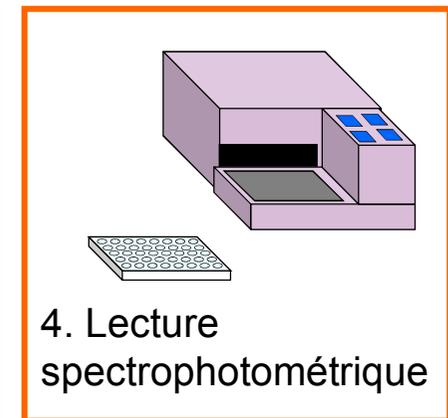
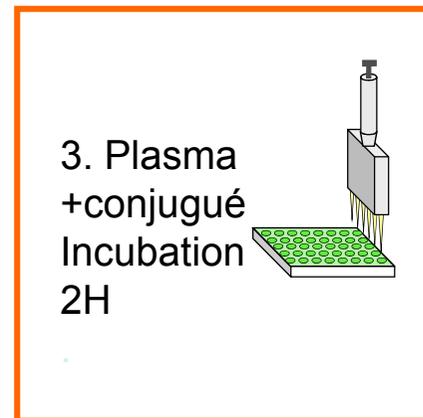
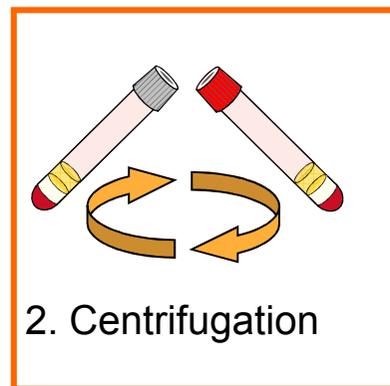
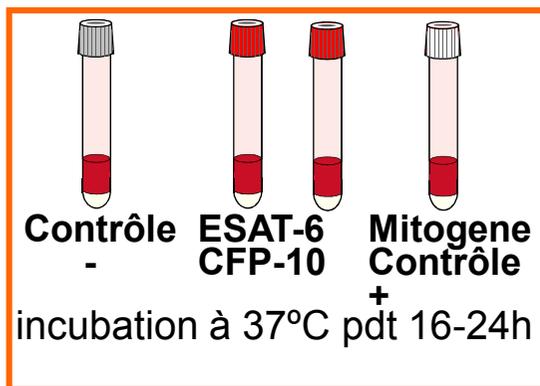
- Subjectivité
- **Sensibilité moyenne**
- Nécessité de 2 visites
- **Faible spécificité :**
  - Réaction croisée avec le vaccin BCG
  - Mycobactéries non tuberculeuses (NTM)



# 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%



## Test IGRA : QuantiFERON : Interprétation

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

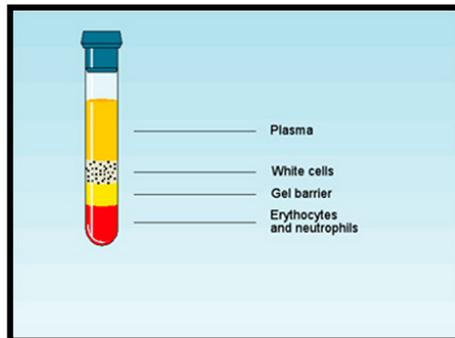
- Variabilités inter et intra individuelles importantes : **pas d'interprétation quantitative** des résultats
- **Zone grise:** 0,35 – 0,6 UI/mL-> résultat à contrôler

1. Défense anti-infectieuse

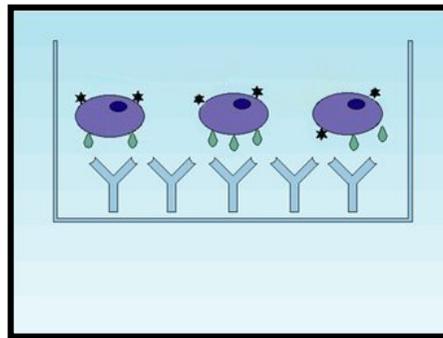
# Tests IGRA T-SPOT®TB : Technique ELISPOT

A partir de Cellules mononucléées

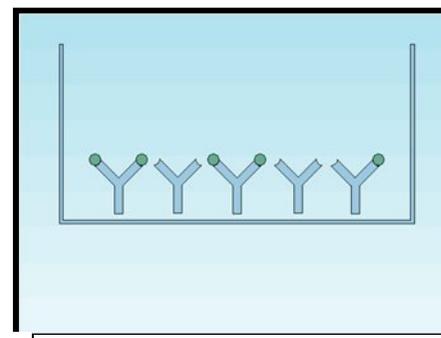
Antigènes spécifiques (testés séparément) : ESAT, CFP-10



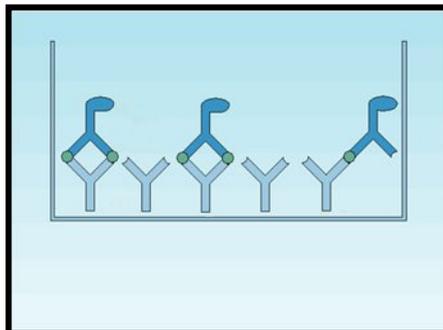
PBMC après extraction Ficoll ou tubes BD CPT



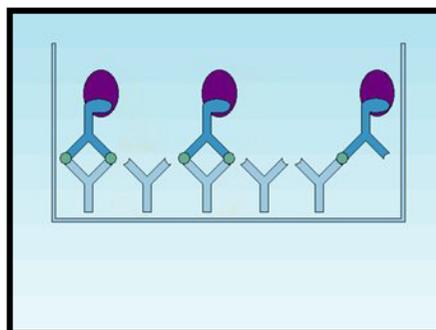
Ajout des PBMC et Ags TB. Les Ly T spé sécrètent l'IFN-g.



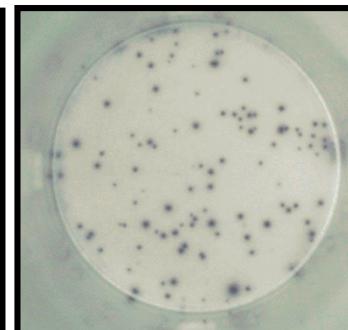
Capture de l'IFN-g par les anticorps. Incubation.



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- $\gamma$

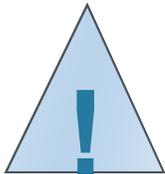
# Tests IGRA : sélection d'antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*

- 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

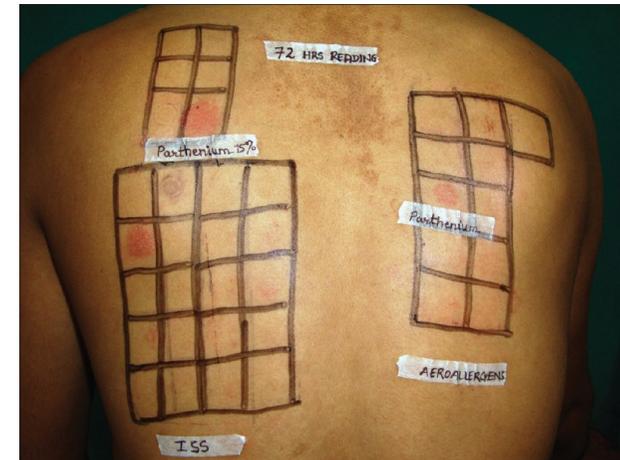
4 indications retenues des tests IGRA pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente en remplacement de l'IDR :

- 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 aiguë : 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 :

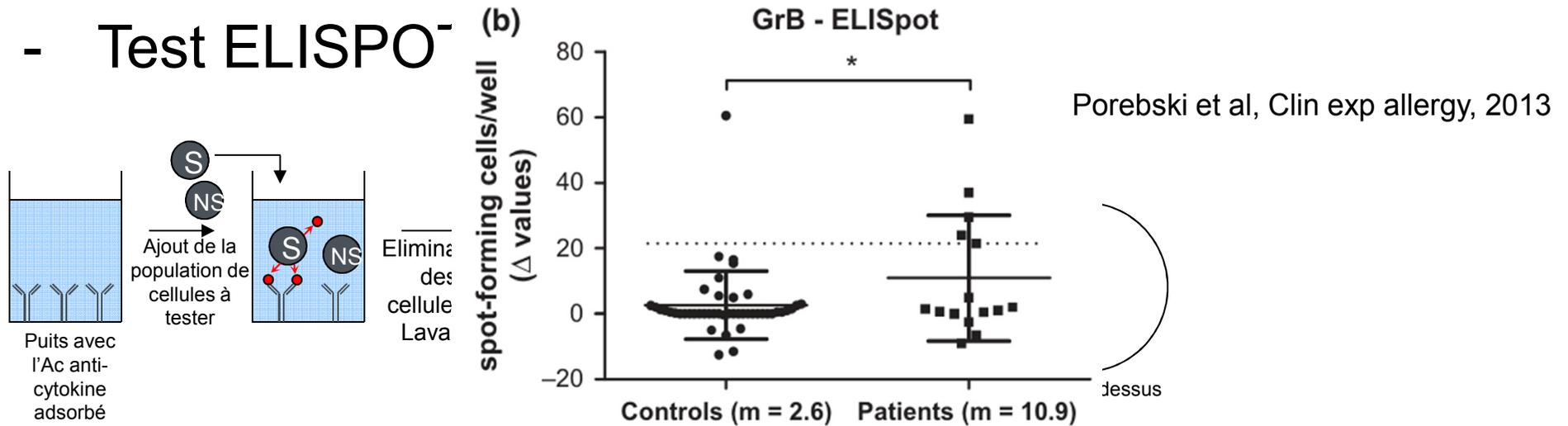
- Incorporation de thymidine tritiée
- Marqueurs « froids » (CFSE, BrdU)
- Témoin de la présence de LT spécifique

## - Limites :

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

# Les outils biologiques

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

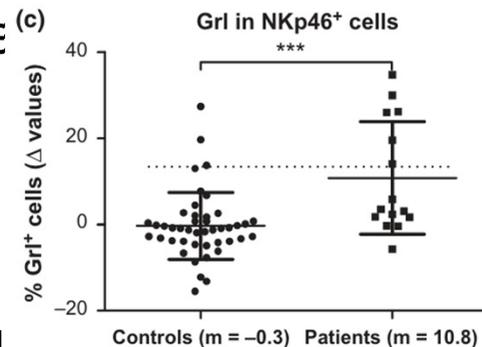


- Possibilité de détecter différents médiateurs (IL-4, IFN- $\gamma$ , Granzyme B)
- mais sensibilité à optimiser
- Et résultats difficiles à reproduire

# 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