

BIOLOGIE DE L'ALLERGIE

Master Class Allergologie et Immunologie

Module 1 Allergologie générale

13 janvier 2022

R. Pescarmona

Laboratoire d'Immunologie

Groupement Hospitalier Sud -Lyon

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

Réactions d'hypersensibilité aux médicaments

Hypersensibilité **Allergique** (HSA)

Hypersensibilité **Non-Allergique** (HSNA)

Hypersensibilité **Immédiate** (HSI)

- < 1 heure
- IgE médiée

Hypersensibilité **Retardée** (HSR)

- 24 à 72 heures
- lymphocytes T

Diagnostic d'une hypersensibilité immédiate (HSI)

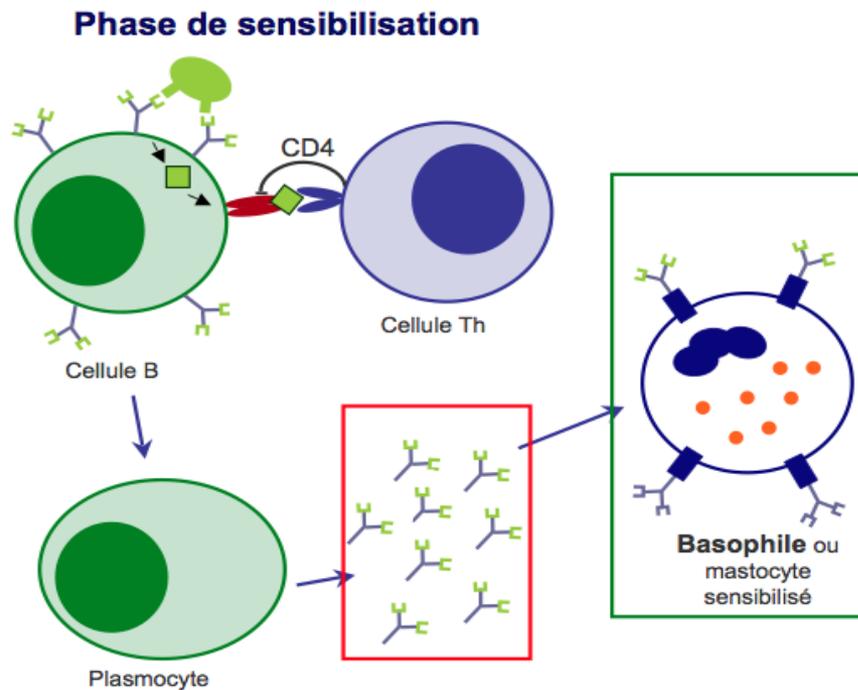
- Interrogatoire :
 - Recherche des allergènes responsables des signes cliniques
 - Disparition des signes à l'éviction de l'allergène
- Tests cutanés
- Tests de provocation

+/- Biologie

La réaction immédiate

- Première rencontre avec l'allergène = sensibilisation

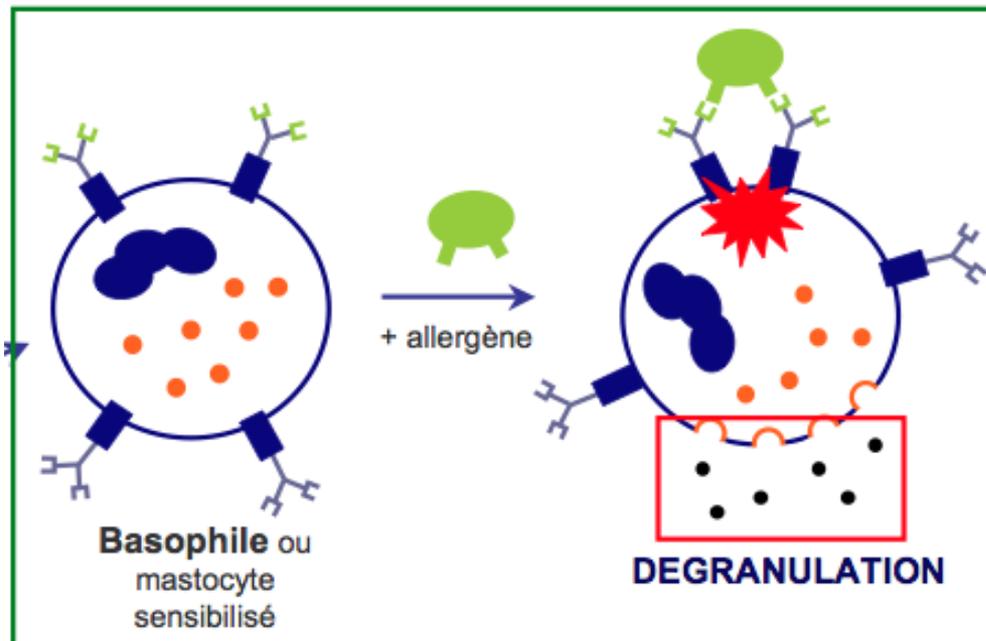
- Production d'Ac de type IgE spécifiques de l'allergène
- Phase asymptomatique



La réaction immédiate

- Seconde rencontre : Phase de déclenchement

- Pontage par l'allergène de 2 IgE fixées à la surface des basophiles/mastocytes
- Libération des médiateurs responsables des **signes cliniques**



Libération des médiateurs
Préformés : Histamine, Tryptase
Néoformés : Leucotriènes, Prostaglandines

Exploration biologique de l'Hypersensibilité de type I

1/ Tests sériques

(nouveaux outils = allergènes moléculaires)

2/ Tests cellulaires : Test d'Activation des Basophiles

1. Marqueurs **sériques** utilisés pour l'exploration de l'HSI

- *Tests non spécifiques* : IgE totales
- *Médiateurs solubles dégranulés* :
 - *Tryptase, Histamine* (origine allergique d'une réaction?)
- *Tests spécifiques* : IgE spécifiques :
 - Multiallergéniques (dépistage)
 - Unitaires (identification)

IgE Totales

- Faible concentration dans le sérum (ng/L)
- Mauvais test biologique dans l'exploration de l'HSI :
 - Peu spécifique (20% des sujets sains : concentration élevée)
 - Peu sensible (20% des sujets allergiques : concentration normale)
- Intérêt dans diagnostic/suivi de :
 - Dermatite atopique, urticaire chronique
 - Poly-sensibilisations
 - Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique (ABPA)
 - Infections parasitaires
 - Déficits immunitaires congénitaux

Médiateurs dégranulés : Histamine plasmatique

Effets:

- Sur le muscle lisse (contraction)

- Sur les cellules endothéliales (augmentation de la perméabilité vasculaire)

- Sur les terminaisons nerveuses

- Sur la production de mucus

Demi-vie:

- 1 minute dans le milieu extracellulaire

Dégradation enzymatique

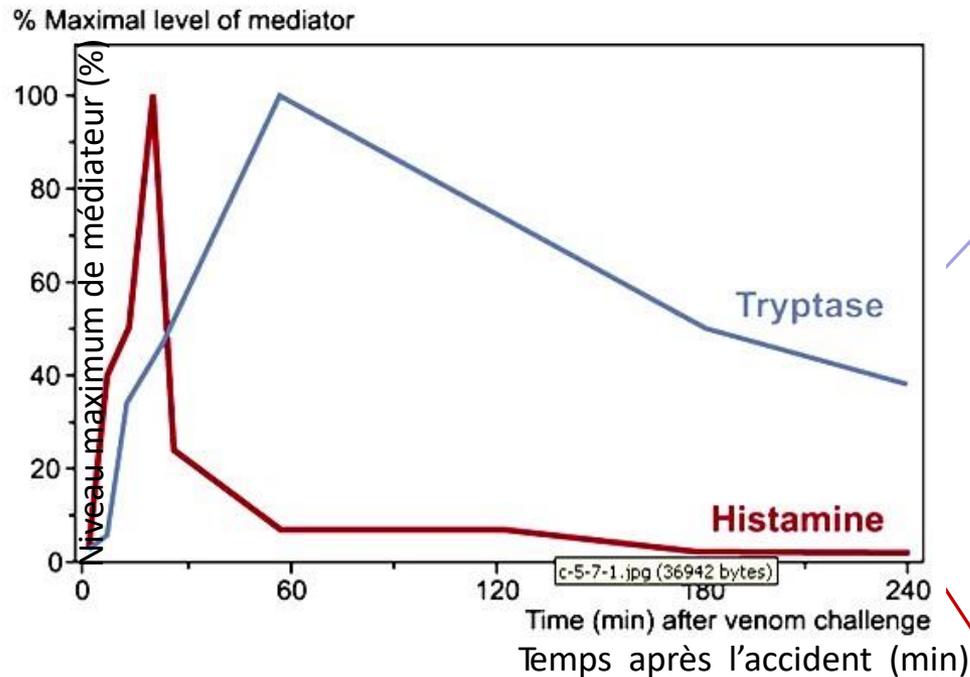
Difficile à doser dans le plasma (retour à son niveau de base 1h après l'accident)

Médiateurs dégranulés : Tryptase sérique

- Sérine protéase neutre
- Effets physiopathologiques :
 - Dégradation remodelage des matrices extracellulaires
 - Production de médiateurs pro-inflammatoire
 - Activation des monocytes et macrophages
 - Prolifération fibroblastique et synthèse de collagène
 - Corrélié à l'amplitude de la baisse de pression artérielle
- Elévation sérique mesurable entre 15 et 240 minutes après l'évènement
 - Pic en 1h : contact allergénique par voie intra-dermique
 - Pic en 15min: contact allergénique par voie intra-veineuse
 - $\frac{1}{2}$ vie d'élimination longue (90/120min) permet des prélèvements tardifs
- NB: élévation de la tryptase plus faible pour allergènes alimentaires

Médiateurs dégranulés : Tryptase et Histamine plasmatiques

Pour objectiver la dégranulation des basophiles et des mastocytes



- Mastocytes
- Marqueur stable
- Technique automatisée

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

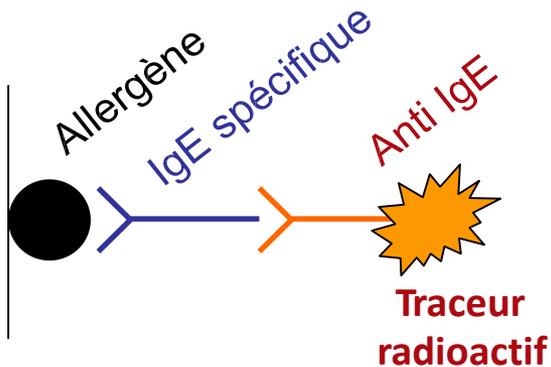
Tests spécifiques

- IgE spécifiques (~ **600 tests**)
- Tests *multiallergéniques* (mélanges/dépistage) ou *unitaires*
- *Différents types d'allergènes (essentiellement protéiques):*
 - *Allergènes inhalés : Pneumallergènes :*
Pollens, Animaux, Arthropodes/Acariens, Moisissures
 - *Allergènes ingérés : Trophallergènes*
 - *Allergènes injectés :*
 - Médicaments
 - Venins d'Hyménoptères
 - *Allergènes professionnels*

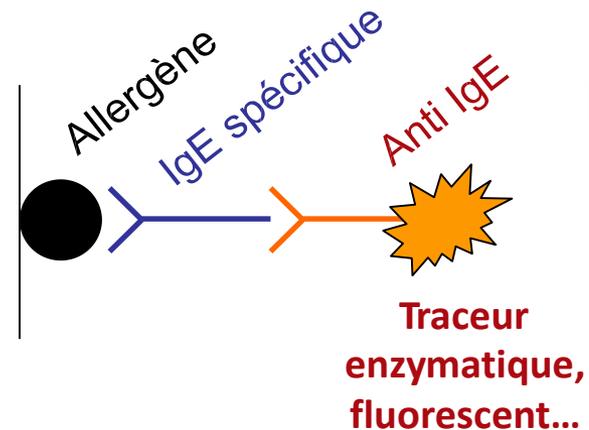
Technique de dosage des IgE spécifiques

- Dérivent toutes du RAST (Radioallergosorbant Test)
- Techniques actuelles :
 - Même principe
 - Détection enzymatique

« RAST »



Tests FEIA, « immunoCAP »



Interprétation biologique d'un résultat positif d'IgE spécifiques

- Mise en évidence d'une sensibilisation biologique :
sensibilisation : pas forcément allergie
- **Quantification** des résultats : affiner l'interprétation
- **Réactions croisées** entre allergènes à prendre en compte dans l'interprétation

Evolution de l'allergologie biologique

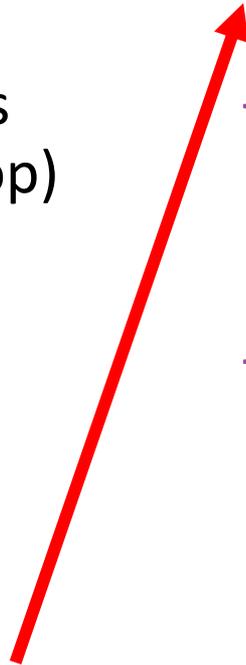
- IgE totales
- Tests de screening
 - Mélange d'allergènes (Phadiatop, Trophatop)
 - CLA
- IgE spécifiques avec extraits naturels



- Manque de spécificité

Approche moléculaire :

- Allergène majeur : pertinence clinique (Bet v 1, Ara h 2...)
- Panallergènes : mise en évidence de réactions croisées (profiline, IgE anticarbohydrates)

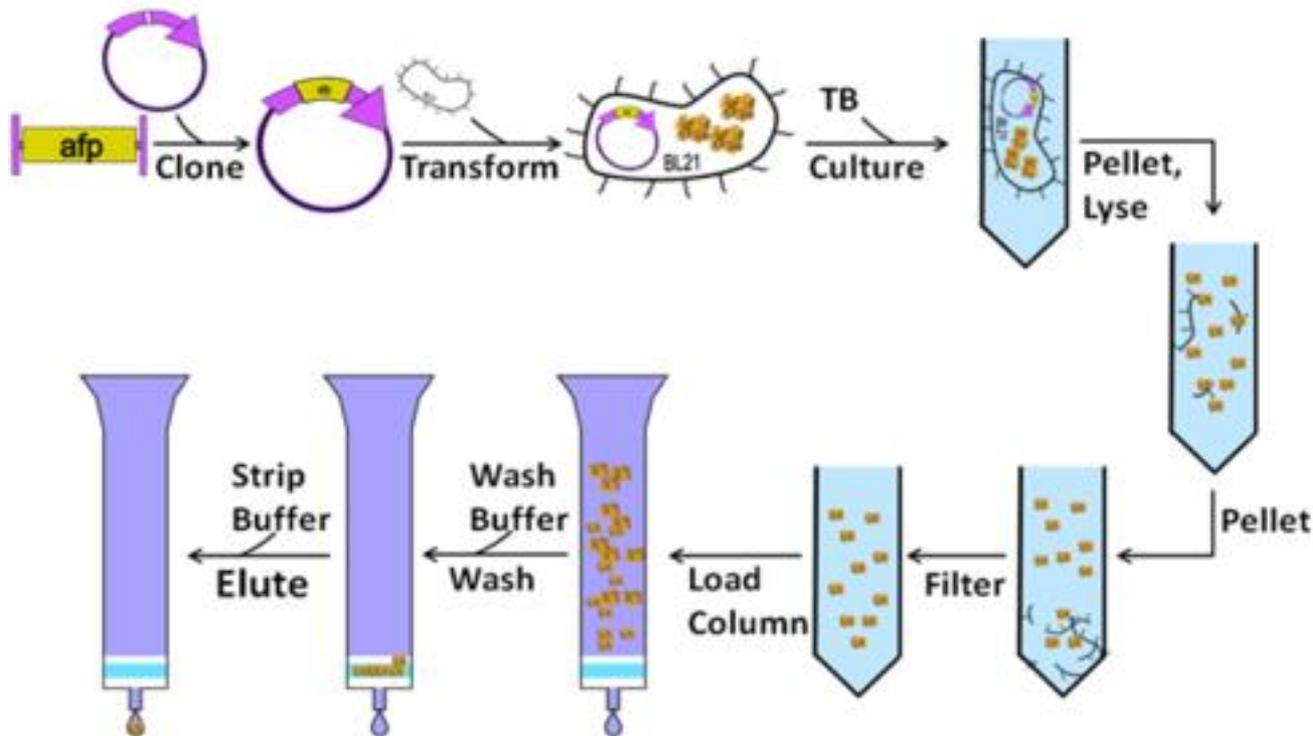


Limites des extraits allergéniques naturels ?

- Composition (mélange de protéines allergéniques et non allergéniques) **non standardisée**
- Variable:
 - en fonction des **sources** : obtenus à partir de **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)....
 - des procédés de **purification** et de **stockage** utilisés (contaminations)

Comment obtenir/isoler des allergènes moléculaires ?

- Approche génétique: allergènes recombinants
- De nombreux allergènes ont déjà été identifiés, séquencés et peuvent être produits par technique recombinante

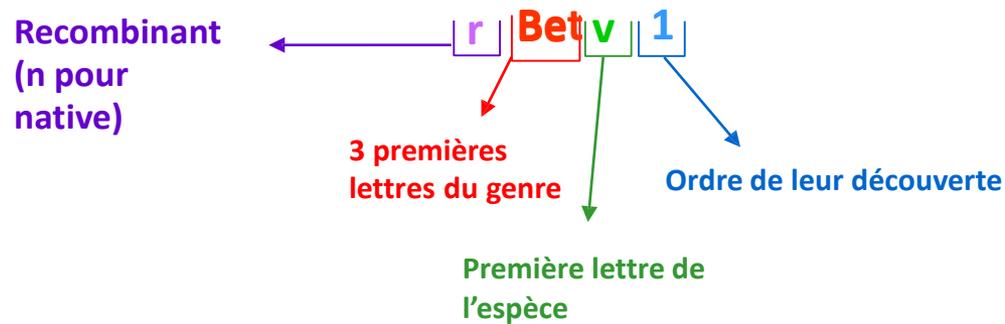


Comment obtenir/isoler des allergènes moléculaires ?

- Approche biochimique: allergènes « naturels »
- Séparation des protéines par Chromatographie (HPLC/affinité)
- Identité de la protéine vérifiée par spectrométrie de masse
- Immunogénicité vérifiée par fixation à des anticorps spécifiques (IgE)

Allergènes purifiés et recombinants

- Nomenclature officielle, précédée de
 - « n » pour l'allergène naturel purifié
 - « r » pour recombinant
- Exemple du bouleau, *Betula verucosa* :



Avantages des allergènes recombinants

- Une *standardisation* des réactifs
- Une production à grande échelle
- Une excellente reproductibilité lot-à-lot
- Une pureté supérieure aux allergènes purifiés

Dosage plus spécifique

Apport pratique des allergènes moléculaires

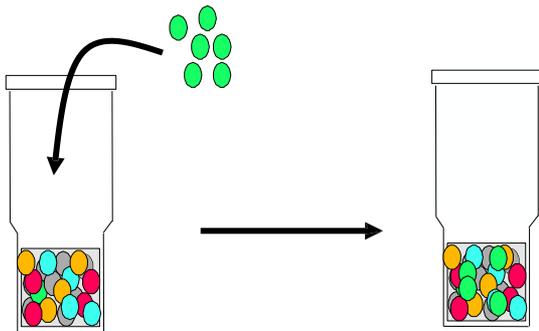
1. Outil pour améliorer les tests biologiques « classiques »
2. Outil « dépister » les réactions croisées sur des bases moléculaires et aider à l'interprétation des polysensibilisations cutanées
3. Outil pour évaluer la sévérité de l'allergie
4. Outil pour améliorer les indications de l'immunothérapie spécifique

1. Amélioration des tests biologiques

- **Latex (k82) :**

Hev b 5 : allergène majeur, **en faible quantité** dans les extraits de latex

- Enrichissement du test k82 en rHev b5
- **Meilleure détection des patients monosensibilisés à Hev b5**



*Source allergénique naturelle enrichie
en allergène recombinant*

Intérêt de **rHevb5** dans le diagnostic d'allergie au latex

- Homme de 22 ans
- **Etudiant en médecine**
- Pas de terrain atopique :
 - Pas de pollinose
 - Pas d'allergie alimentaire
- **Rhinoconjonctivite à l'arrivée dans le service clinique**

- Prick-tests latex : **négatif**

- **k82 : 4,39 kU/L**

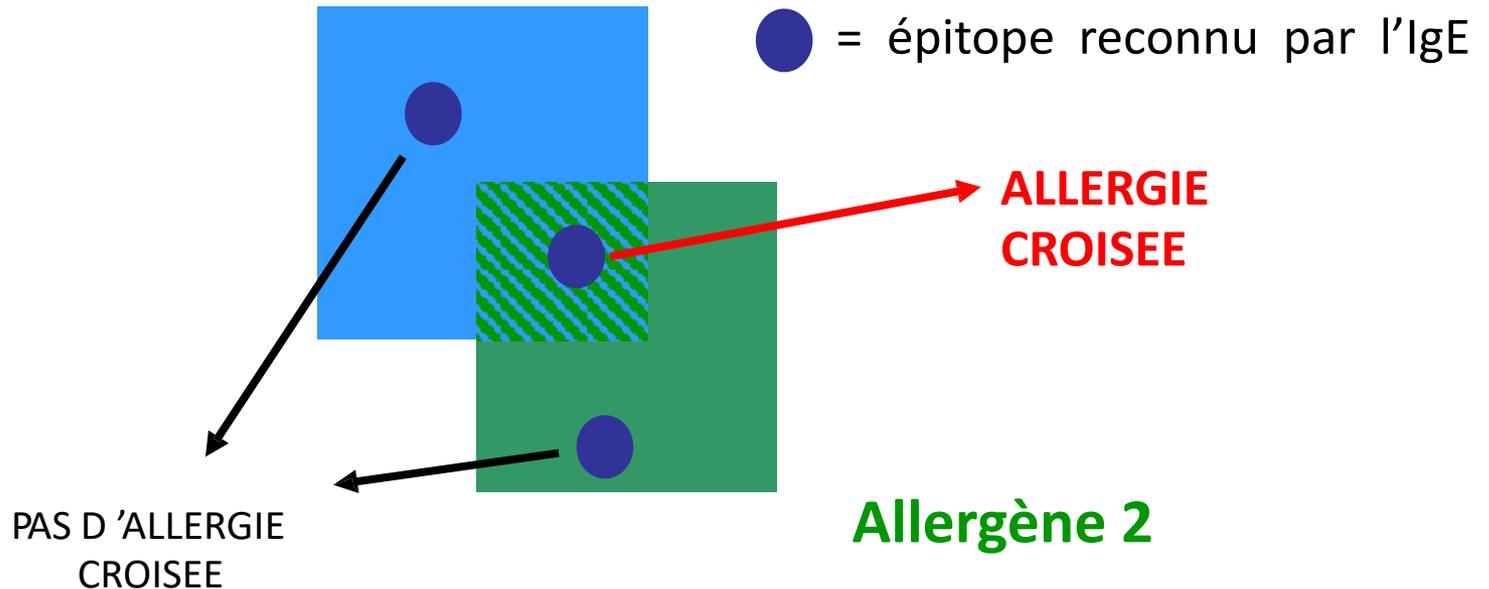
rHev b 1 <0,10 kU/L	rHev b 6.02 <0,10 kU/L
rHev b 2 <0,10 kU/L	rHev b 8 <0,10 kU/L
rHev b 3 <0,10 kU/L	rHev b 9 < 0,10 kU/L
rHev b 5 = 1,84 kU/L	rHev b 11 <0,10 kU/L
rHev b 6.01 <0,10 kU/L	broméline <0,10 kU/L

Allergie au latex

confirmée par la présence d'IgE dirigées contre **rHev b5**

2. Outils pour « dépister des réactions croisées » »

Allergène 1



Une même IgE peut reconnaître les deux allergènes si elle est spécifique d'un épitope commun à ces 2 allergènes

Différents types de réactions croisées

- entre **espèces *taxonomiquement proches*** :
 - Acariens (d1,d2)
 - Graminées (dactyle et phléole)
 - Frêne / olivier : famille des Oléacées

- entre **espèces *taxonomiquement éloignées*** :
 - La relation botanique ne permet plus d'expliquer les RC
 - **Notion de *famille moléculaire*** (protéines provenant de divers allergènes et ayant la même *fonction physiologique*)

Quelques familles moléculaires

Allergènes d'origine végétale	
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),
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

Expliquer des réactions croisées sur des bases moléculaires

Constatacion clinique **→** **Explication moléculaire**

- pomme / bouleau : allergie orale chez # 50%
des allergiques au pollen de bouleau (**PR10** : Betv1-Mald1)
- Graminées/latex : Ac anti-latex chez patients souffrant
de pollinose (**profiline** :Hevb8, Phlp12...)
- Acariens/blattes/crustacés/escargot : **tropomyosines**

Exemple d'allergie croisée

- Latex :36,1
- Hevb1:<0,35
- Hevb2:<0,35
- Hevb3:<0,35
- Hevb5:<0,35
- Hevb6.01 :<0,35
- Hevb6.02 :<0,35
- Hevb8 : >100
- Hevb9 :<0,35
- Hevb11 :<0,35
- TC négatifs
- Pas d'argument en faveur d'une allergie au latex mais « gros » pollinique
- Hev b8 : *profiline* responsable de réactions croisées avec des pollens et des aliments d'origine végétale

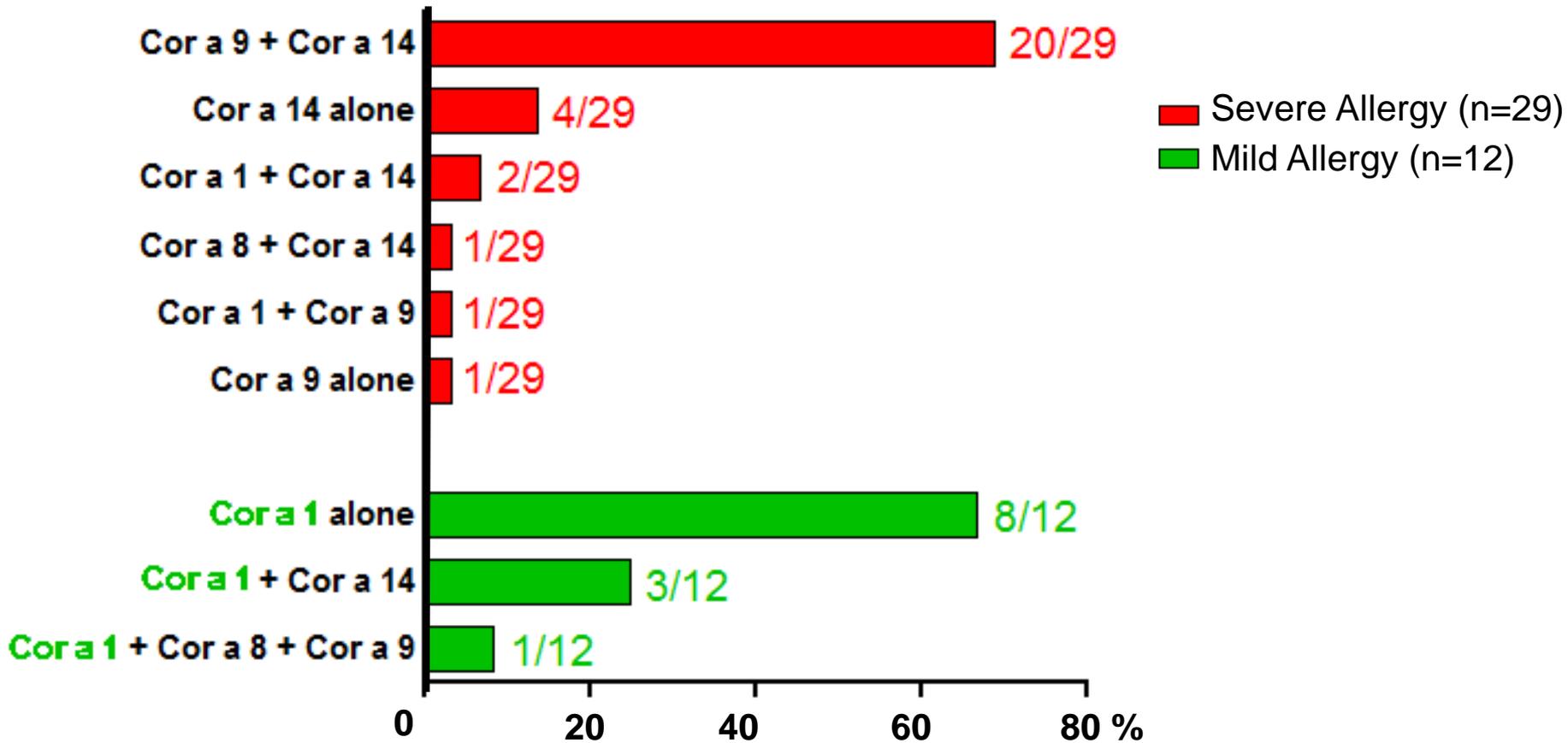
3. Identification de Marqueurs de sévérité

Suivant la famille moléculaire impliquée :

Expression clinique de l'allergie différente :
syndrome oral ou réaction systémique grave

- **PR-10** : Allergènes sensibles:
 - à la **pepsine**
 - à la **chaleur/cuisson** : Symptômes uniquement si les aliments sont consommés **crus** = **Syndrome oral**
- **LTP** : Allergènes **résistants** à
 - la pepsine et à la cuisson : structure préservée dans le tractus digestif : risque de **réactions systémiques**

3. Identification de marqueurs de sévérité : exemple de la noisette



4. Améliorer les indications de l'immunothérapie spécifique

X Allergie IgE-médiée confirmée à la source allergénique

BOULEAU

Y IgE spécifiques des allergènes recombinants

rBet v1

←..... Allergènes majeurs

rBet v2 + rBet v4

←..... Allergènes mineurs

$Z = X + Y$

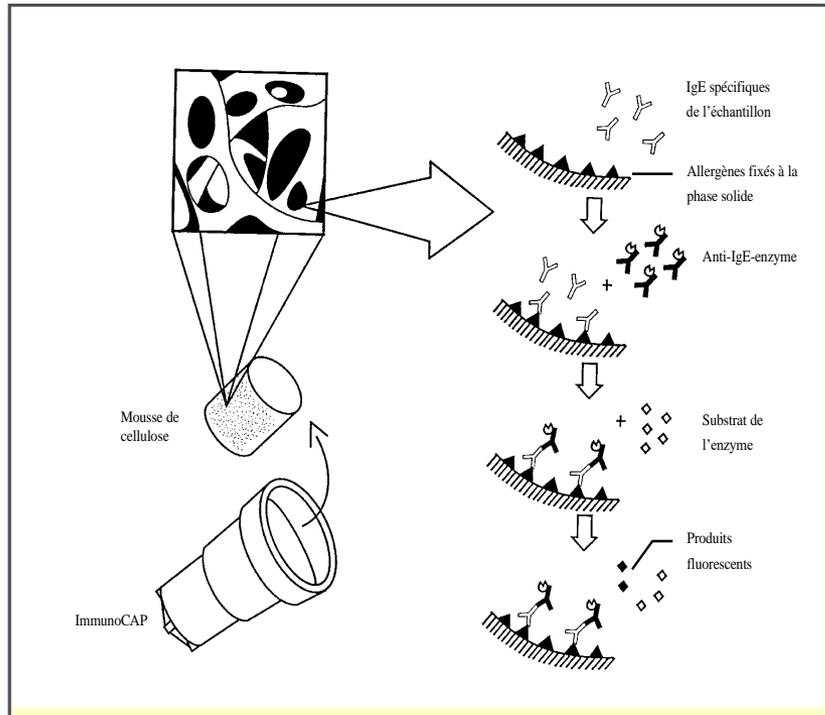
Indication de l'immunothérapie

Allergènes majeurs Bet v 1	Négatifs	Positifs	Positifs
Allergènes mineurs Bet v 2 + 4	Positifs / Négatifs	Positifs	Négatifs

Z : ↓ ↓ ↓
 Faible **Moyenne** **Forte**

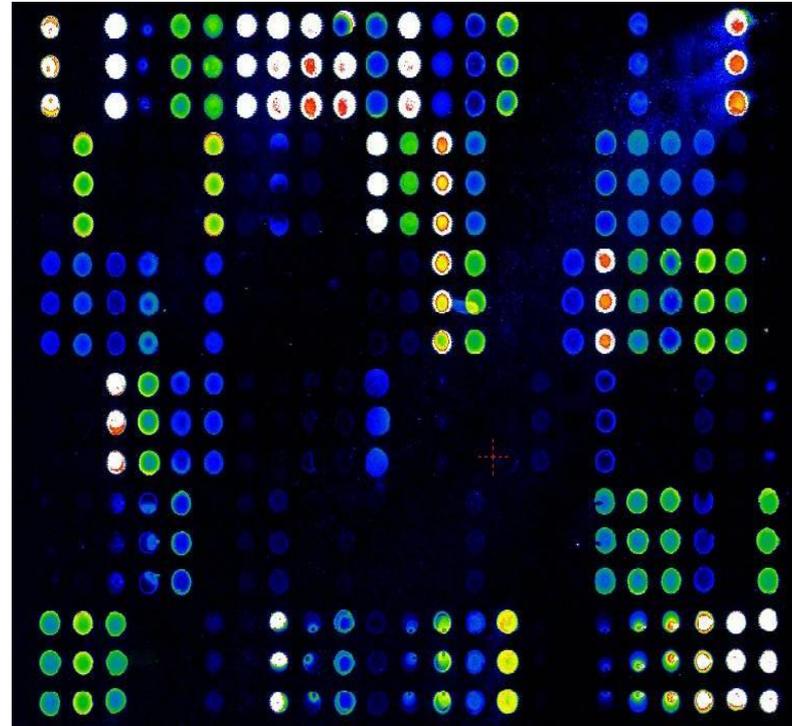
Les allergènes moléculaires en pratique : Test unitaire / Biopuce multiallergénique

ImmunoCAP® classique



**Un unique résultat pour
1 source allergénique ou
1 allergène moléculaire**

ImmunoCAP ISAC®



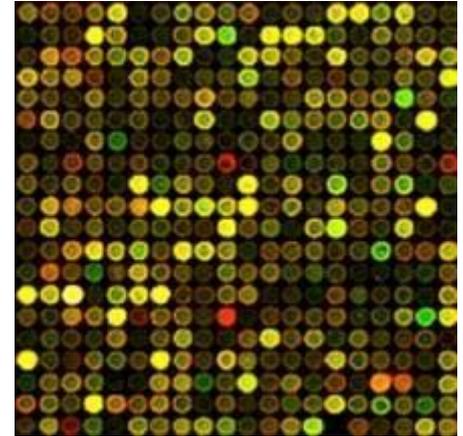
**De multiples résultats :
- 112 allergènes moléculaires (r ou n)
couvrant 51 sources allergéniques sur
30µL de serum**

Qu'est ce que la technologie Biopuce?

Fixation de différentes biomolécules (allergènes) sur un format microscopique

Obtention simultanée d'un très grand nombre de résultat

Nécessité d'infimes quantités de sérum (**30 μ L**) et de réactifs



Plateforme d'immunodosage miniaturisée qui combine la technologie Biopuce et le concept d'allergologie moléculaire

Exploration biologique de l'Hypersensibilité de type I

1/ Tests sériques
(nouveaux outils = allergènes moléculaires)

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

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

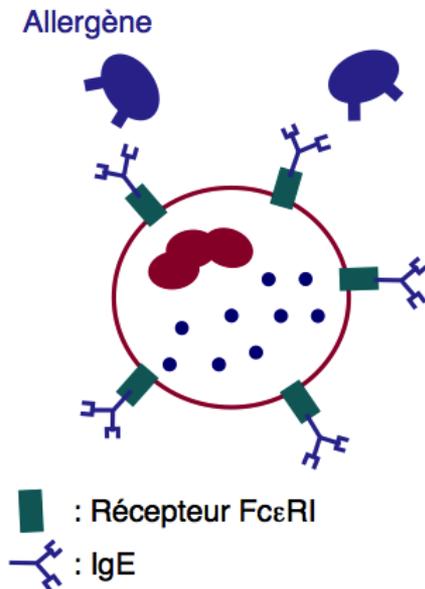
Nécessité de développer des tests « à la carte » permettant de tester n'importe quel allergène (ie : médicament qu'a reçu le patient lors de son accident)

= 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 :

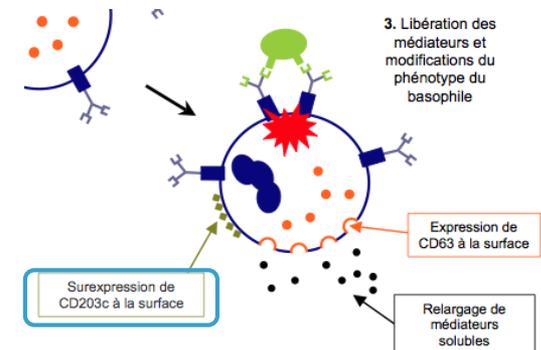
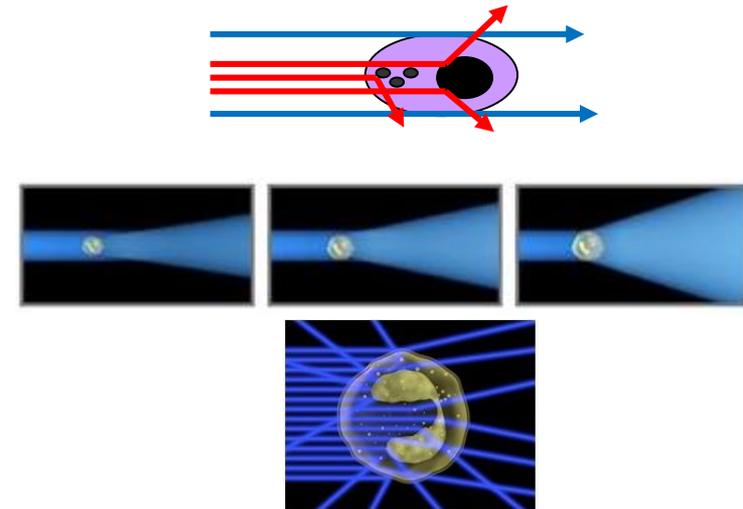
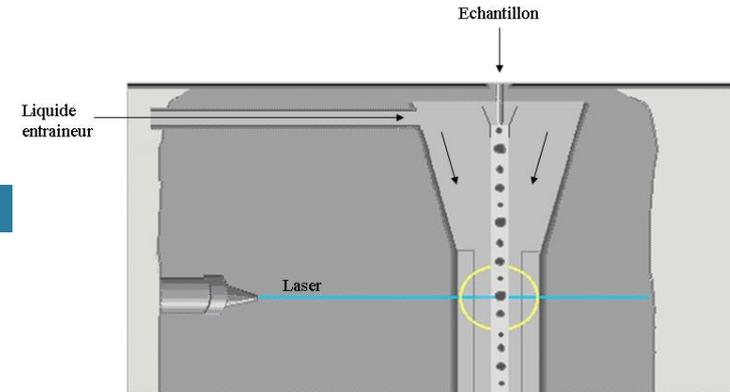
Incubation des basophiles sensibilisés avec l'allergène ayant provoqué la réaction



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:

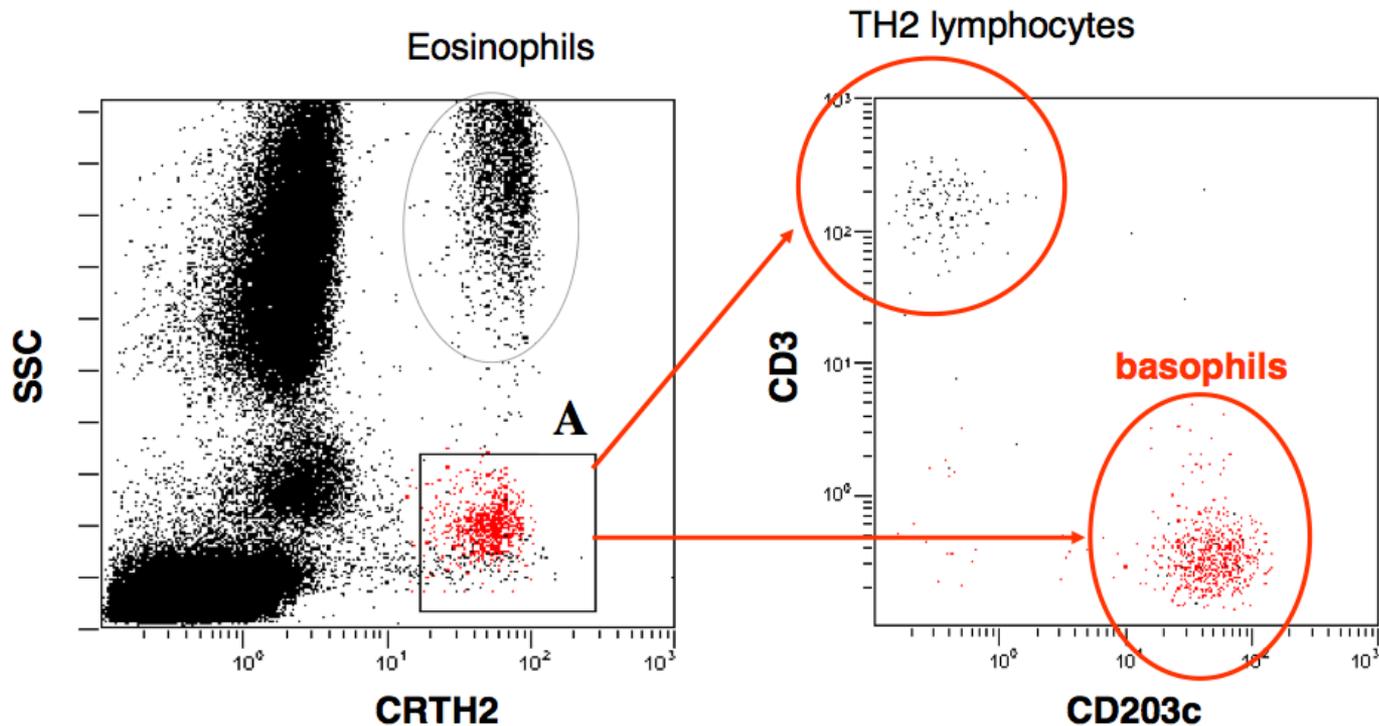
- ✓ **Réalisation de contrôles:**
 - Contrôle **négatif**: en présence de tampon seul
 - Contrôle **positif** : stimulation par anti-IgE ou anti-récepteur FcεRI
N.B. ≈ 10% de non répondeurs

- ✓ **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)

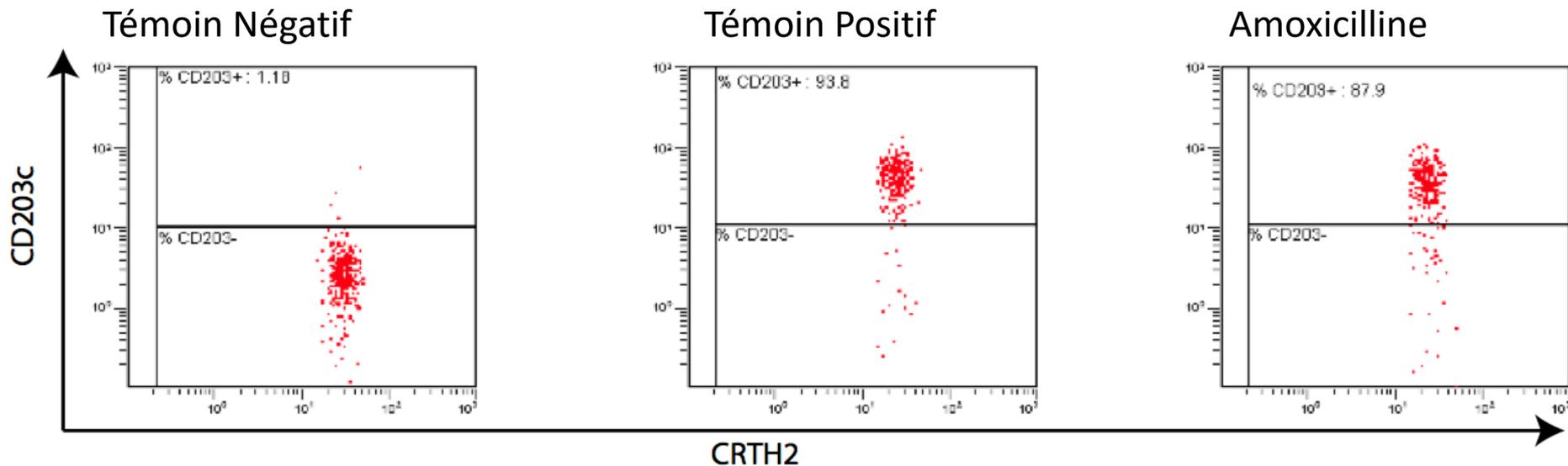
- Pas de consensus sur l'identification des basophiles
- Marquages les plus utilisés :
 - ▣ CD3-, CRTH2+
 - ▣ CCR3+, Faible SSC



Principaux marqueurs d'activation utilisés:

	CD203c	CD63
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 faible	Non exprimé à la surface Exprimé à la surface des granules de sécrétion
Expression sur les basophiles activés	Sur-expression	Exposition à la surface cellulaire
Cinétique	Rapide (5-15 min)	Plus lente (10-25 min)

Exemple d'activation en présence d'Amoxicilline

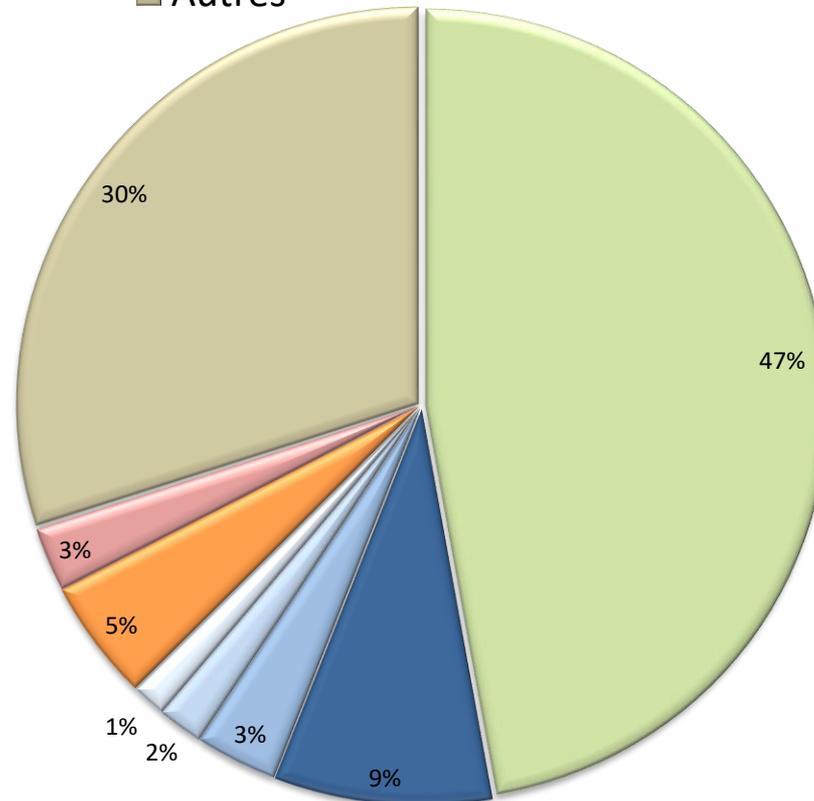


Utilisation des TAB en routine : exploration des réactions d'HSI aux médicaments

- Curares
- Antibiotiques :
 - β -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 ⁺ CD63-IgE ⁺	55 53	100	39
De Weck <i>et al.</i> (2009)	H	CD63	50	89–97	262

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

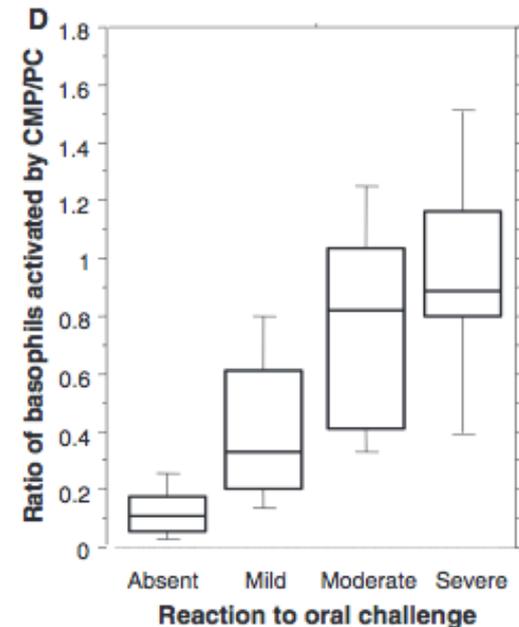
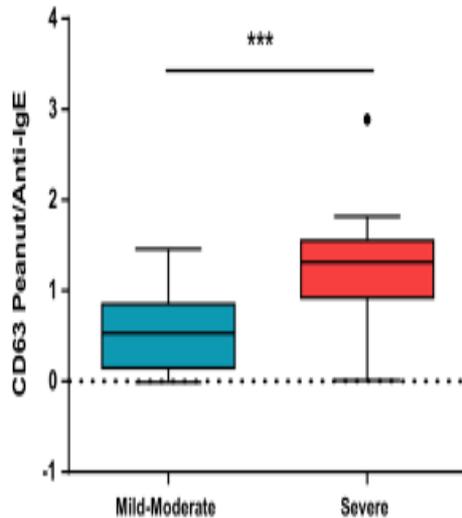
Curares:

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 [†]	93	92
Ebo <i>et al.</i> (2006)	Rocuronium [†] 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

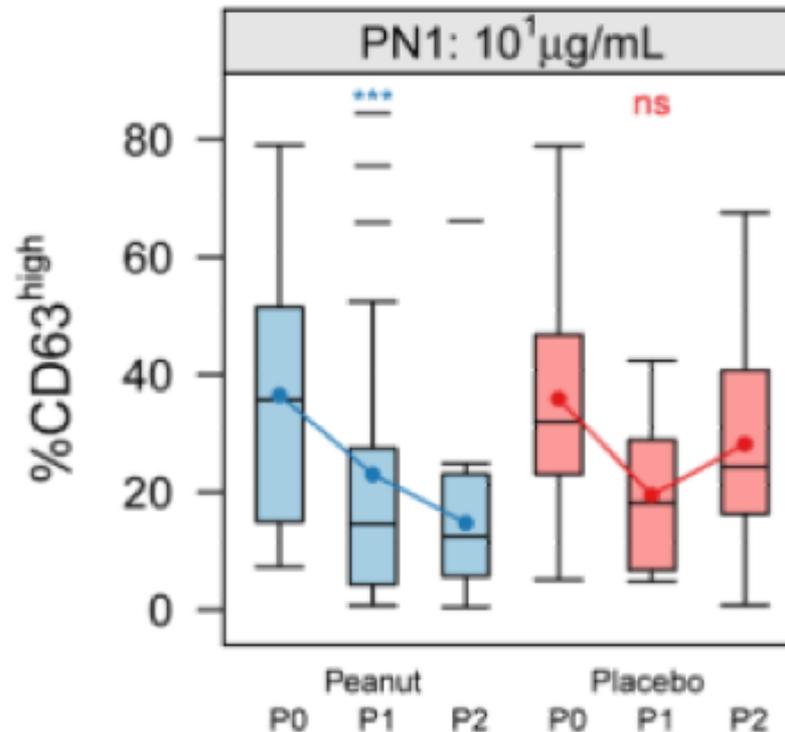
Utilisation des TAB hors routine

- 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

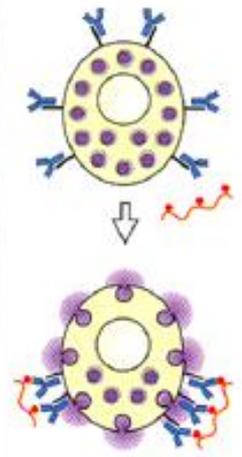
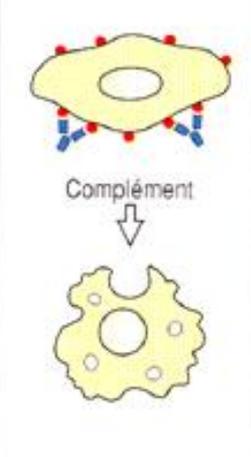
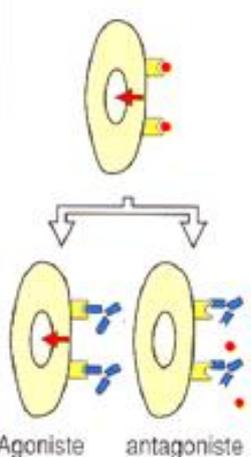
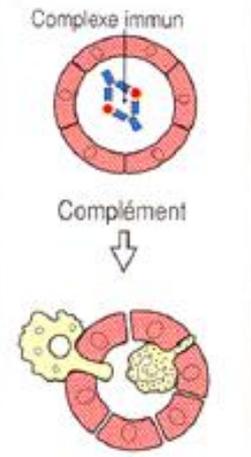
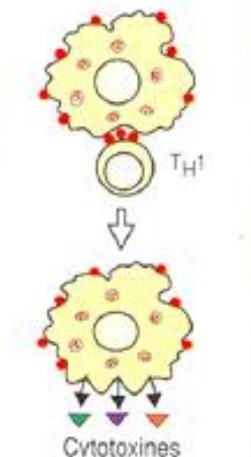
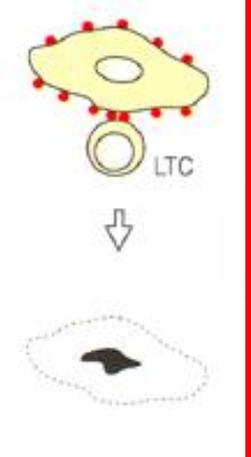
- Suivi des Immunothérapies spécifiques (ITS) :
 - ▣ Diminution de la réactivité des basophiles au cours de l'ITS



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 _{H2}	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 ⁺ (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 transfusionnelle, anémie hémolytique auto-immune	Maladie de Graves (agoniste) Myasthénie (antagoniste)	Maladie sérique, Lupus érythémateux 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

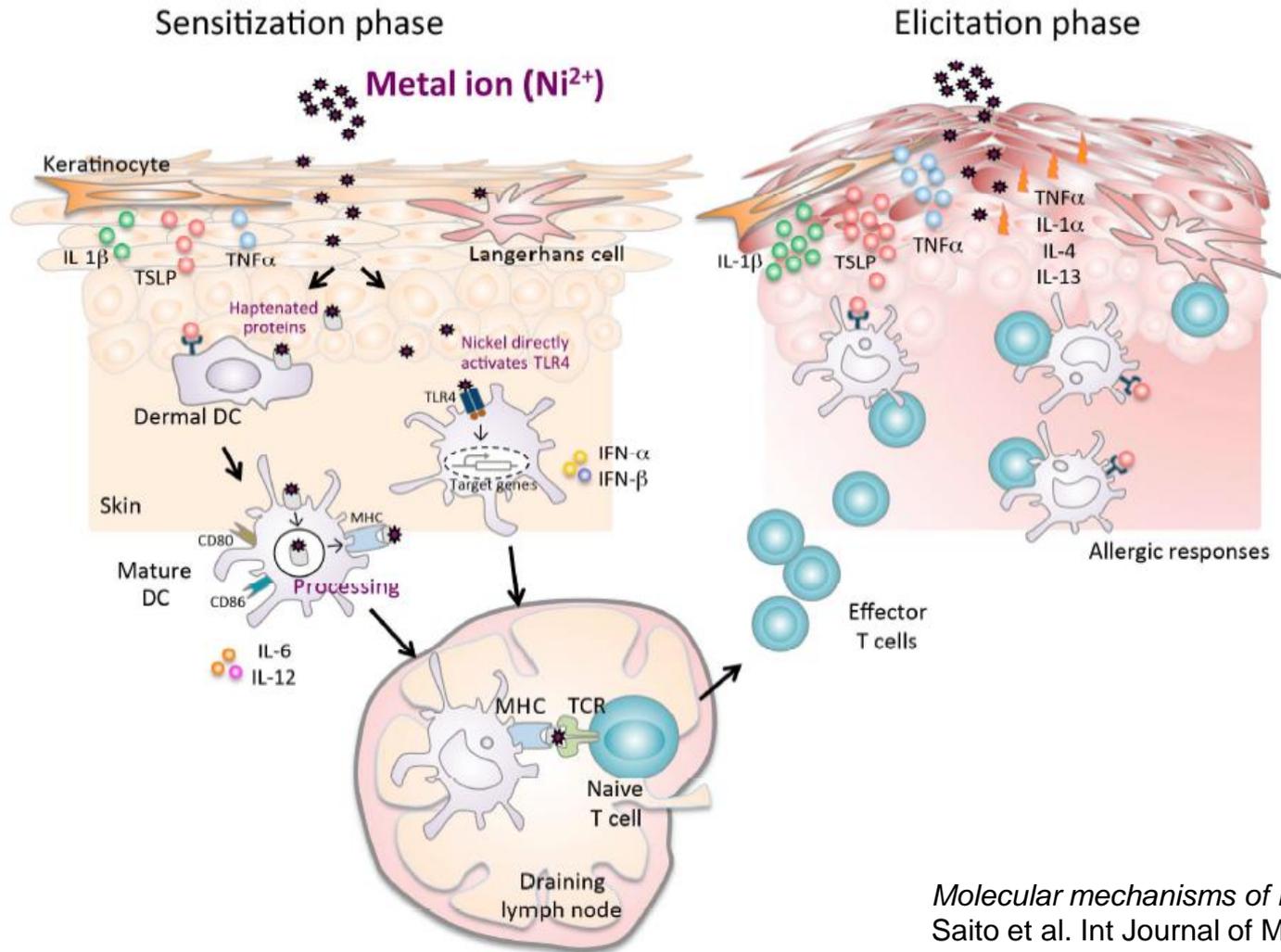
- Antigènes protéiques :
 - Infections bactériennes, parasitaires, mycosiques et virales
 - Développement intracellulaire

Haptènes :

- Substances responsables d'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

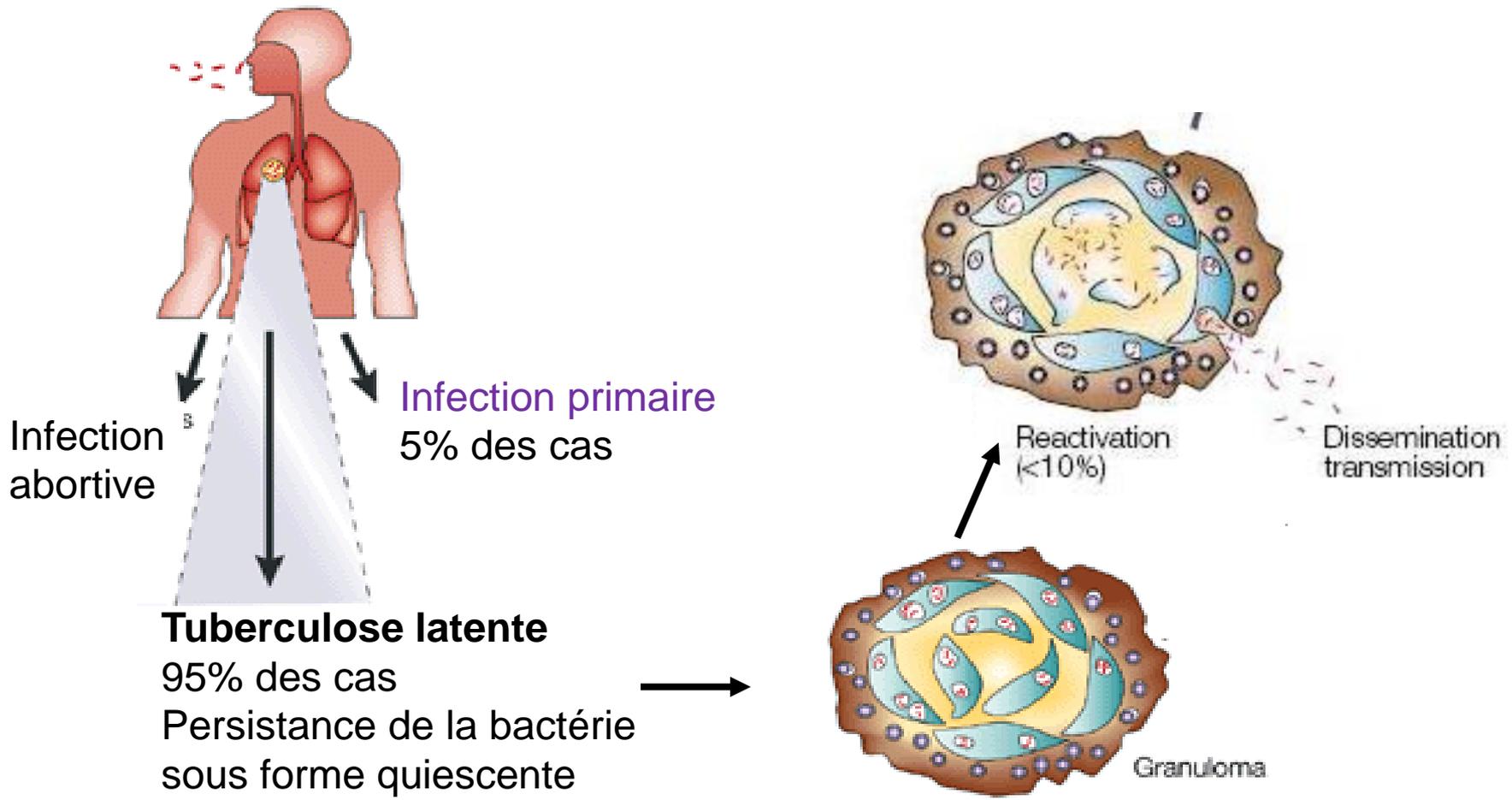
1. Défense anti-infectieuse

Infections bactériennes, parasitaires, mycosiques et virales :

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

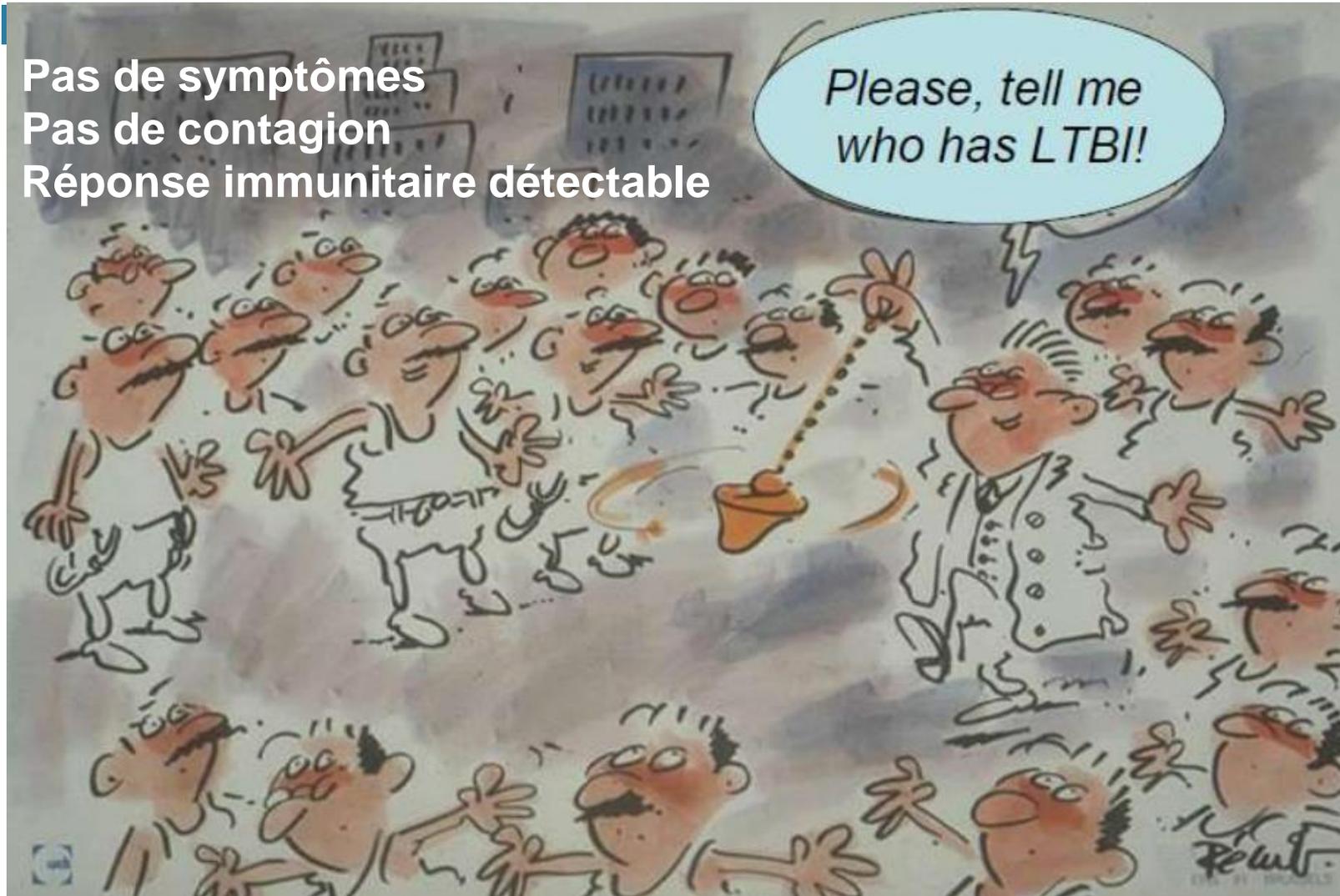
Exemple : exploration de l'immunité anti-tuberculeuse

Contamination par *Mycobacterium tuberculosis*



Détection de l'infection tuberculeuse latente

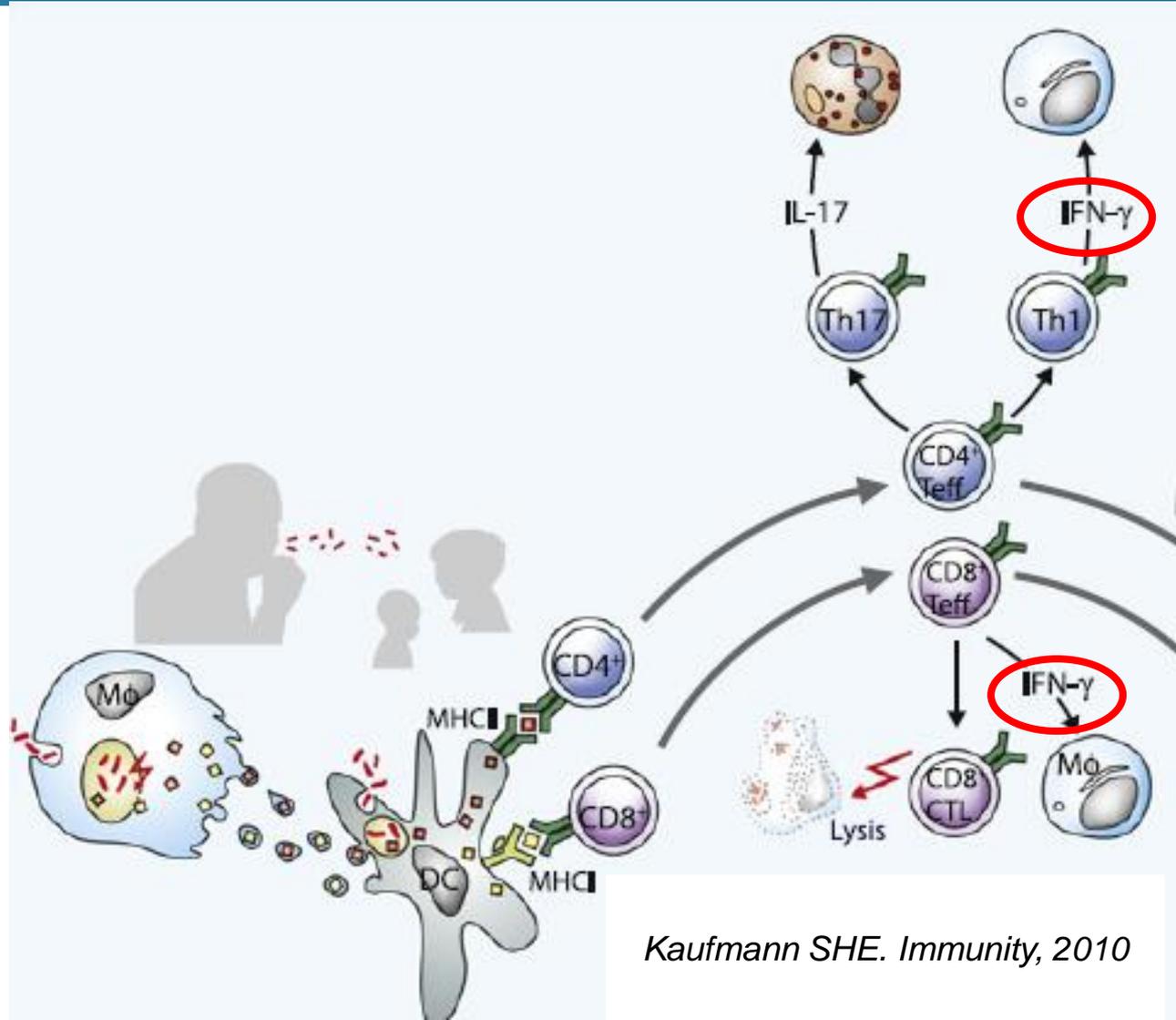
Pas de symptômes
Pas de contagion
Réponse immunitaire détectable



1. Défense anti-infectieuse

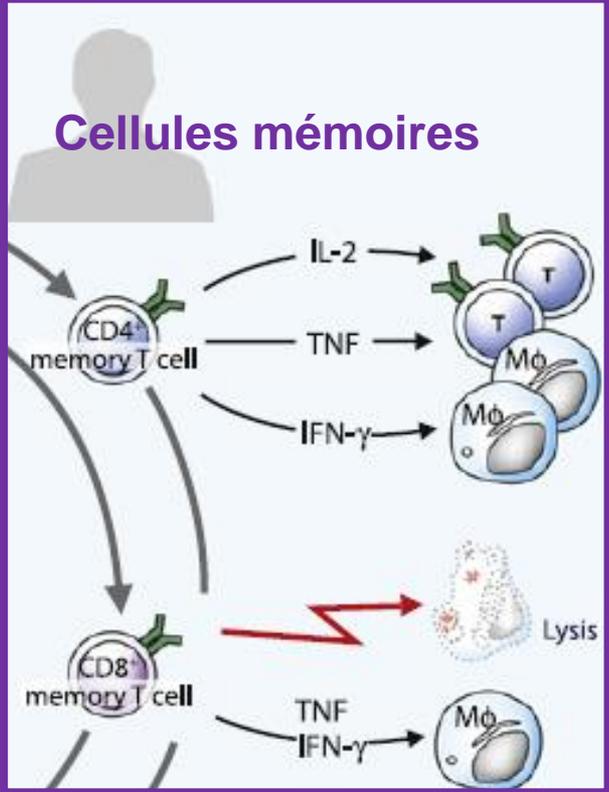
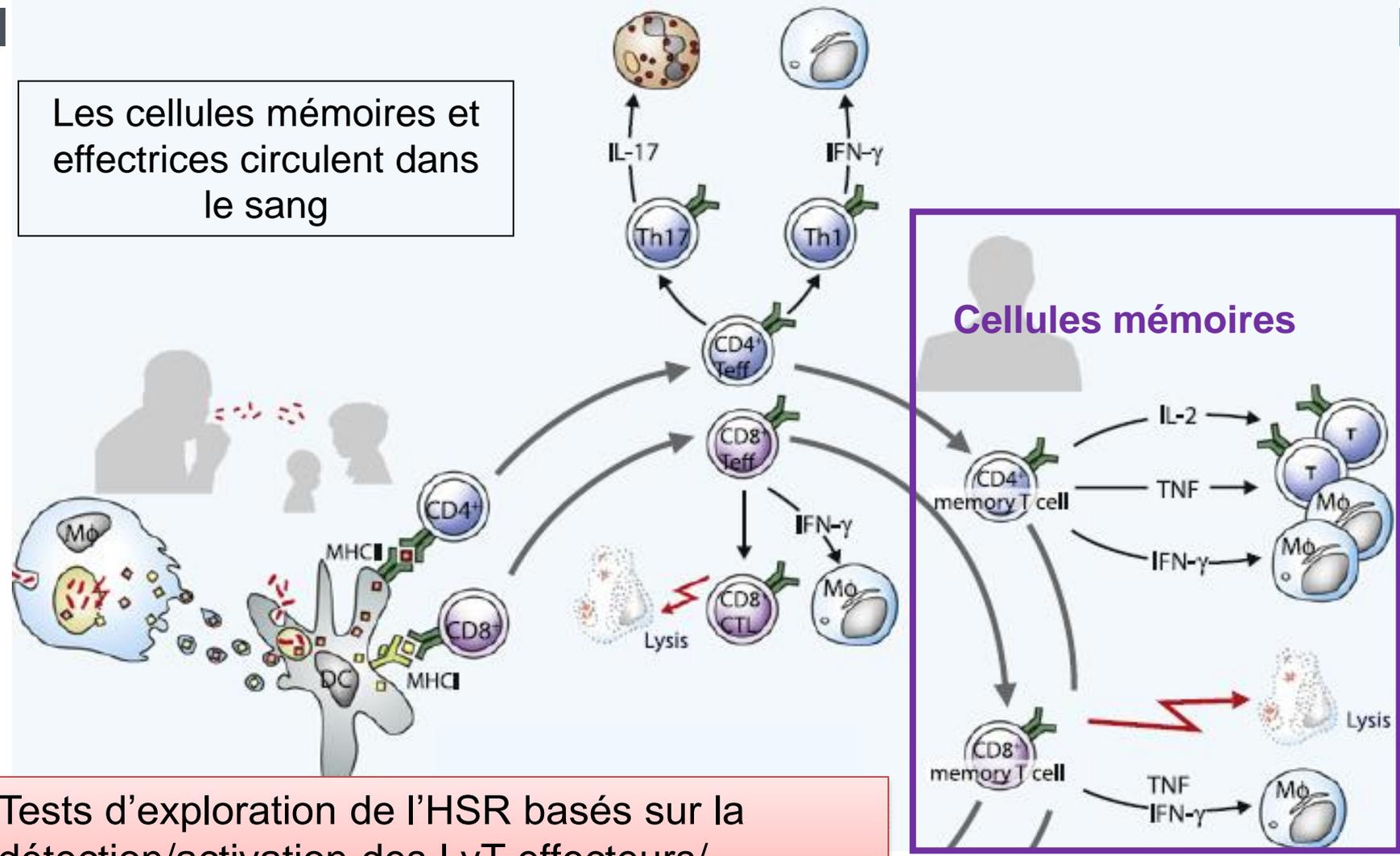
Immunité anti-tuberculeuse : Réponse immunitaire adaptative

- 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

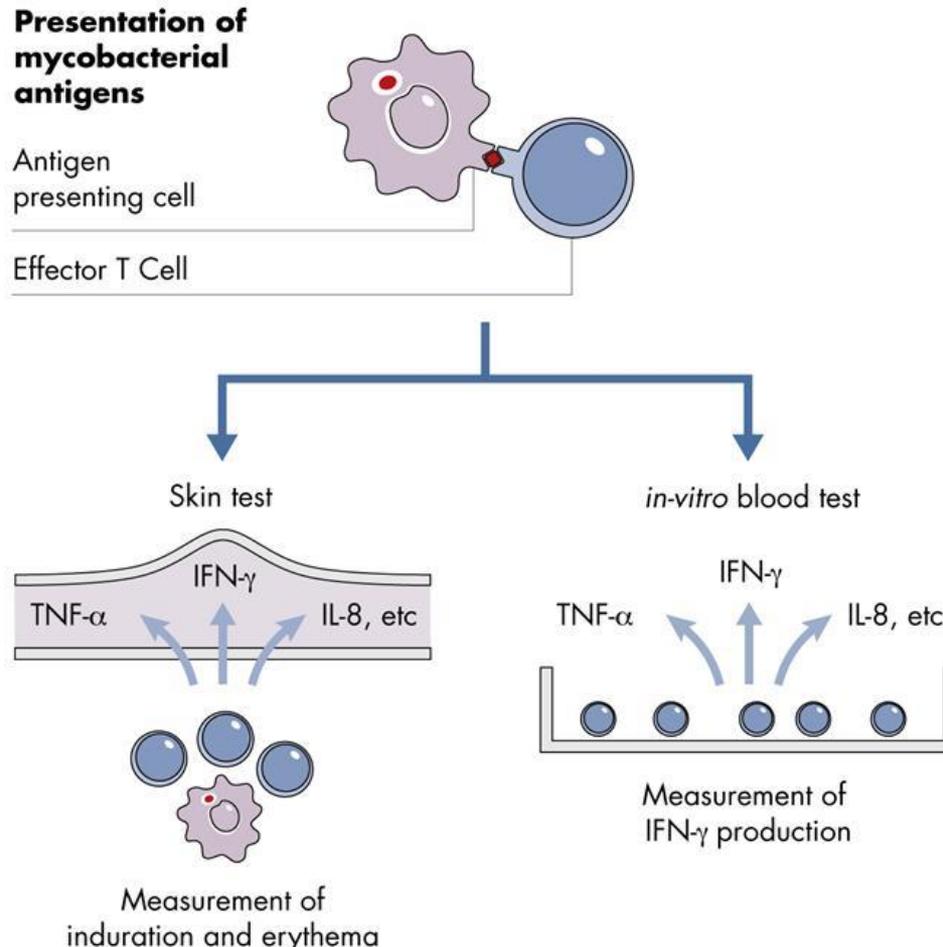
Les cellules mémoires et effectrices circulent dans le sang



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- γ (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 :

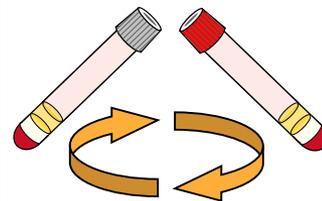
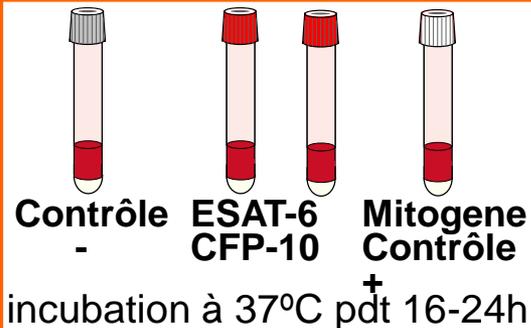
- Subjectivité
- **Sensibilité moyenne**
- Nécessité de 2 visites
- **Faible spécificité :**
 - Réaction croisée avec le vaccin BCG
 - Mycobactéries non tuberculeuses (NTM)



QuantiFERON®-TB GOLD PLUS

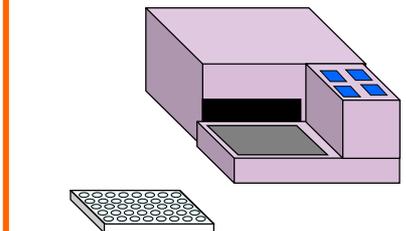
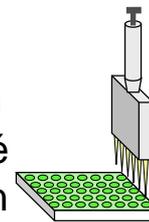


- **Test ELISA** (Enzyme linked Immunosorbent Assay)
- Incubation du sang total périphérique (anticoagulant héparine) avec les protéines mycobactériennes
- Dosage de l'IFN- γ plasmatique par technique ELISA (UI/mL)
- B 150
- Sensibilité : 80-90%



2. Centrifugation

3. Plasma
+conjugué
Incubation
2H



4. Lecture
spectrophotométrique

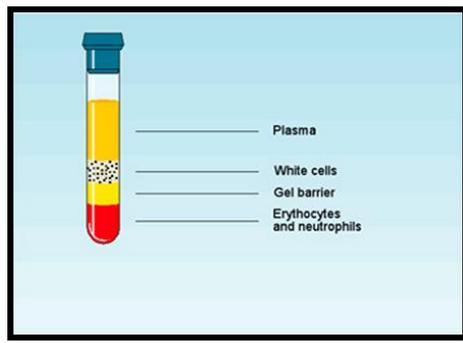
Test IGRA : QuantiFERON : Interprétation

	<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)	≤ 3	< 0.35	< 0.35	≥ 0.5	NEGATIF
	≤ 3	0,35 – 0,6	0,35 – 0,6	≥ 0.5	DOUTEUX
	≤ 3	≥ 0.6 0,35 – 0,6	0,35 – 0,6 ≥ 0.6	≥ 0.5	POSITIF
	≤ 3			≤ 0.5	ININTERPRETABLE Abs ctrl positif
	≥ 3				ININTERPRETABLE Activation spontanée

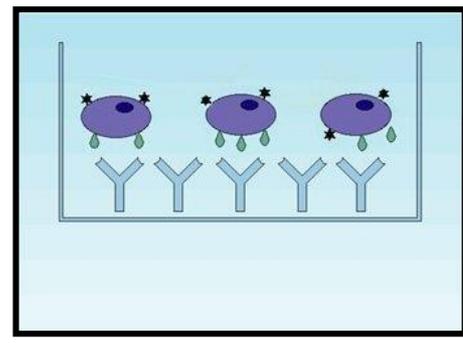
- Variabilités inter et intra individuelles importantes : **pas d'interprétation quantitative** des résultats
- **Zone grise:** 0,35 – 0,6 UI/mL-> résultat à contrôler

Tests IGRA T-SPOT®TB : Technique ELISPOT

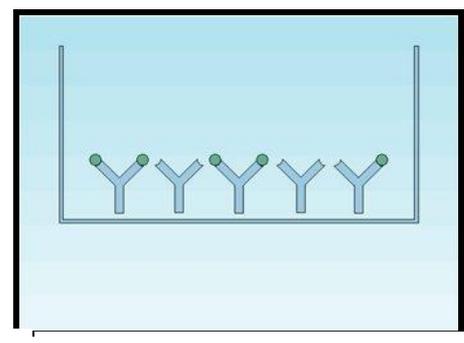
A partir de Cellules mononucléées
Antigènes spécifiques (testés séparément) : ESAT, CFP-10



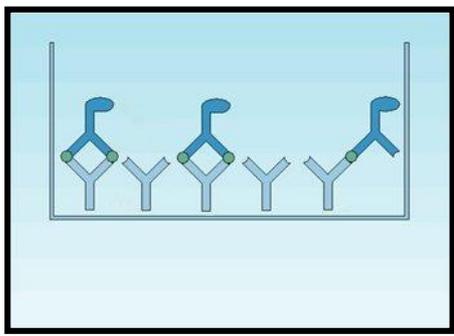
PBMC après extraction Ficoll ou tubes BD CPT



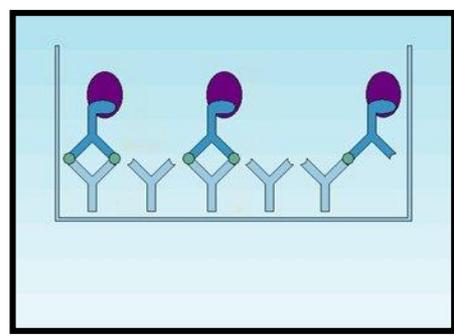
Ajout des PBMC et Ags TB. Les Ly T sécrètent l'IFN-g.



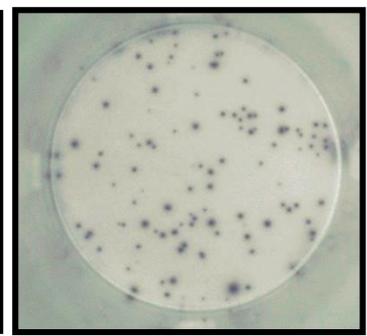
Capture de l'IFN-g par les anticorps. Incubation.



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- γ

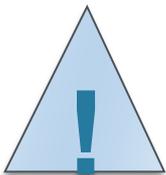
Tests IGRA : sélection d'antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*

- 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- γ

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

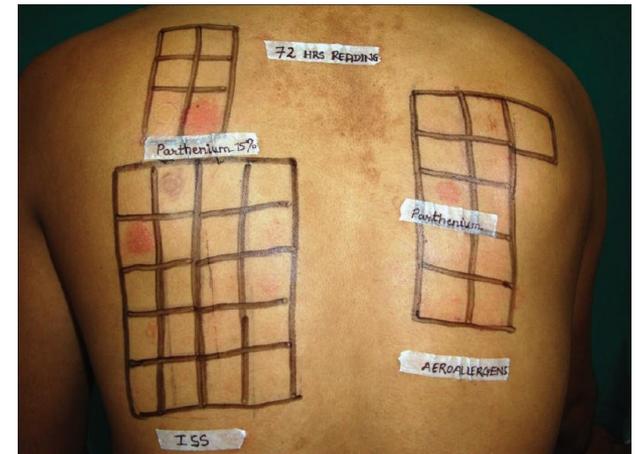
67

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 α**

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 :

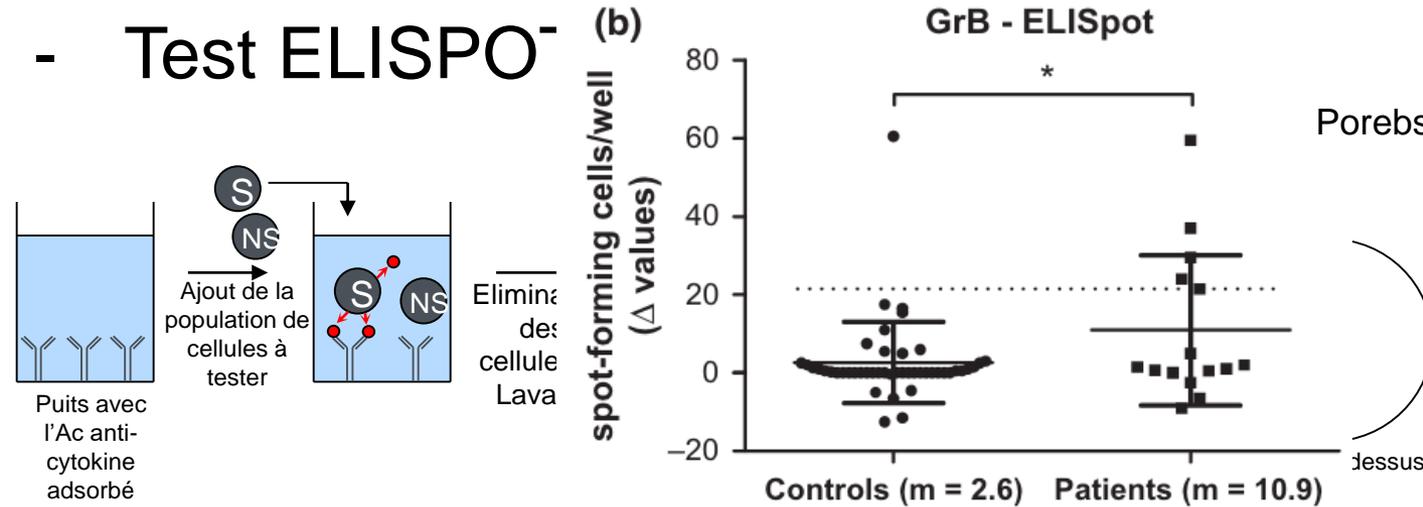
- Incorporation de thymidine tritiée
- Marqueurs « froids » (CFSE, BrdU)
- Témoin de la présence de LT spécifique

- Limites :

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

Les outils biologiques

- Test ELISPO⁻

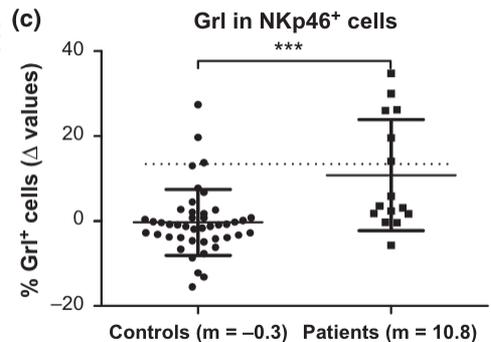


- Possibilité de détecter différents médiateurs (IL-4, IFN- γ , Granzyme B)
- mais sensibilité à optimiser
- Et résultats difficiles à reproduire

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- γ , 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- γ : 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- γ

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