MODULE 5 MEDICAMENT - ENSEIGNEMENT ALLERGOLOGIE AURA

Hypersensibilité retardée: Focus sur les tests biologiques

Dr. Marine-Alexia LEFEVRE

Service de Dermatologie et Allergologie – CHU de St Etienne

Centre International de Recherche en Infectiologie – INSERM U1111 – Lyon

marine-alexia.lefevre@inserm.fr

Take-home messages

- **Les tests immunobiologiques sont basés sur la compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans les réactions d'hypersensibilité retardée.**

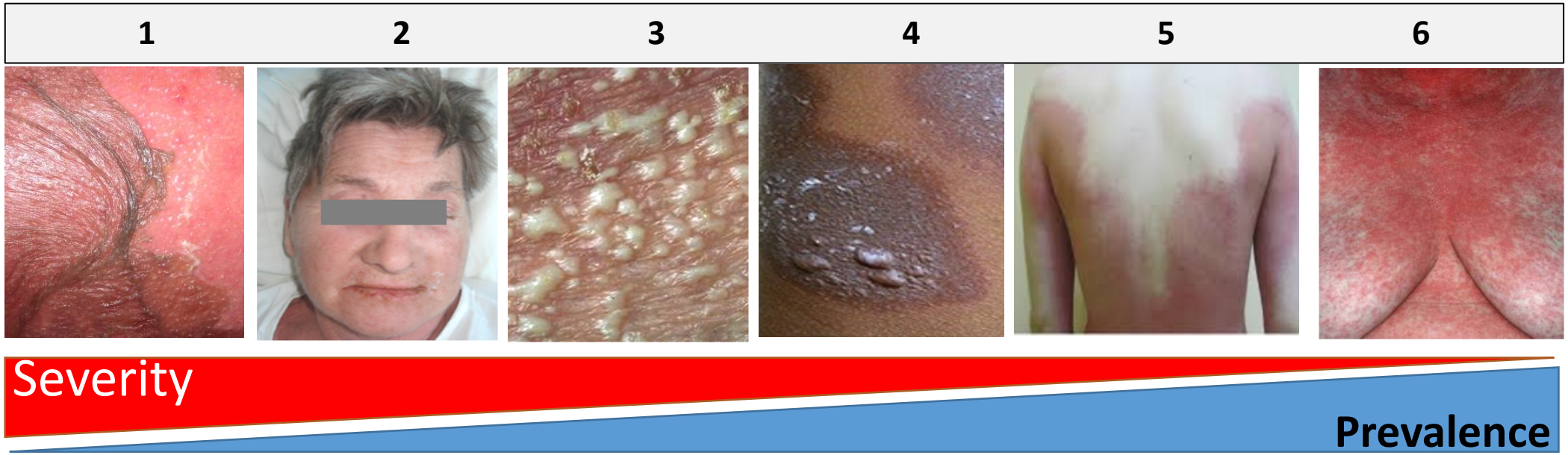
- **Méthodes non invasives, sans risque pour la patient et permettant de tester plusieurs médicaments à la fois.**

- **Sensibilité et spécificité variables dépendant: (i) de la sévérité de la réaction, (ii) de la molécule impliquée, (iii) du timing de la réalisation**

- **Sécurisation des réintroductions d'alternatives médicamenteuses.**

- **La combinaison des tests *in vitro* et *in vivo* augmente la sensibilité de diagnostic**

Clinique des hypersensibilités retardées médicamenteuses



1 – NET: nécrolyse épidermique toxique

2 – DRESS: Drug Rash with Eosinophilia &Systemic symptoms

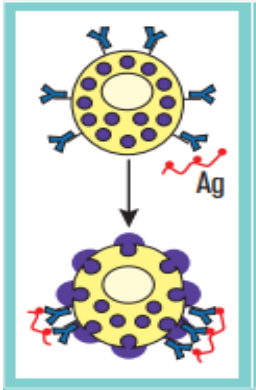
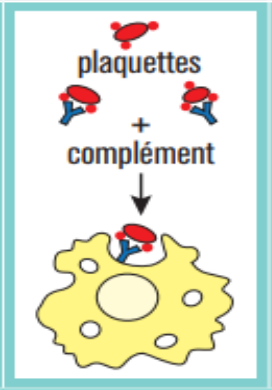
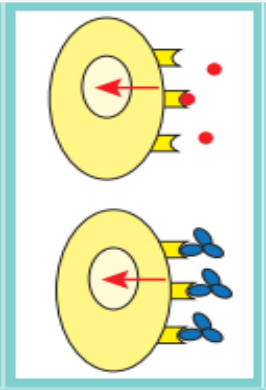
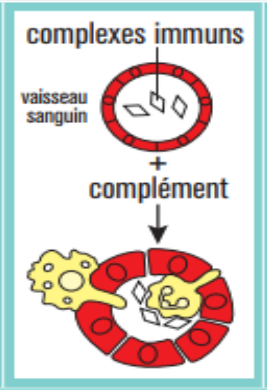
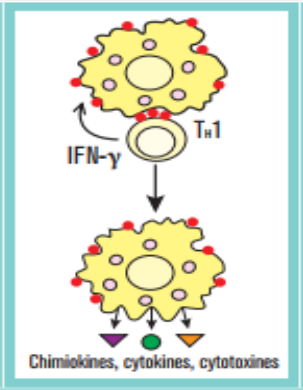
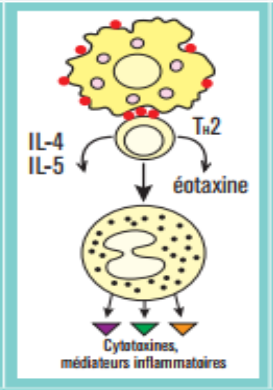
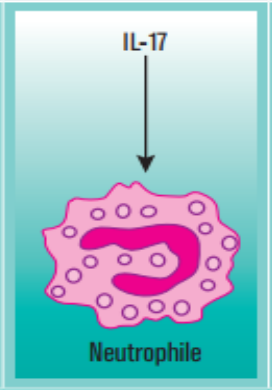
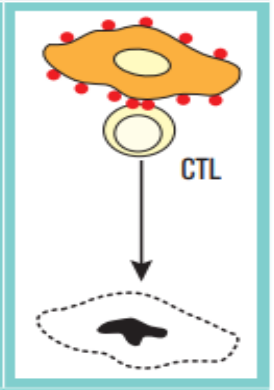
3 – PEAG: pustulose exanthématique aigue généralisée

4 – EPF: érythème pigmenté fixe

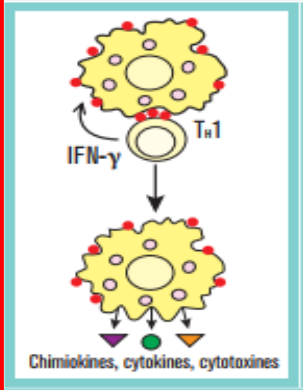
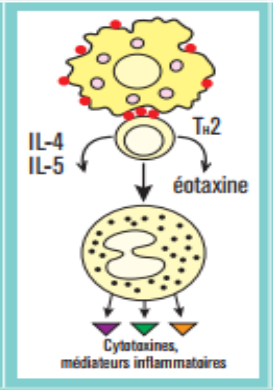
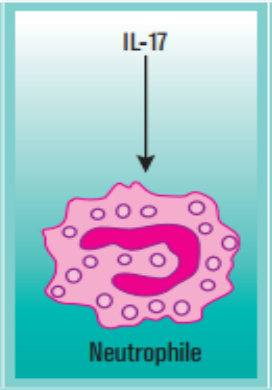
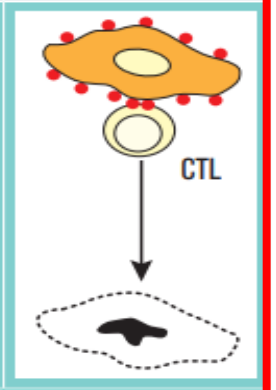
5 –SDRIFE: Symmetrical Drug-Related Intertriginous and Flexural Exanthema

6– EMP: exanthème maculopapuleux

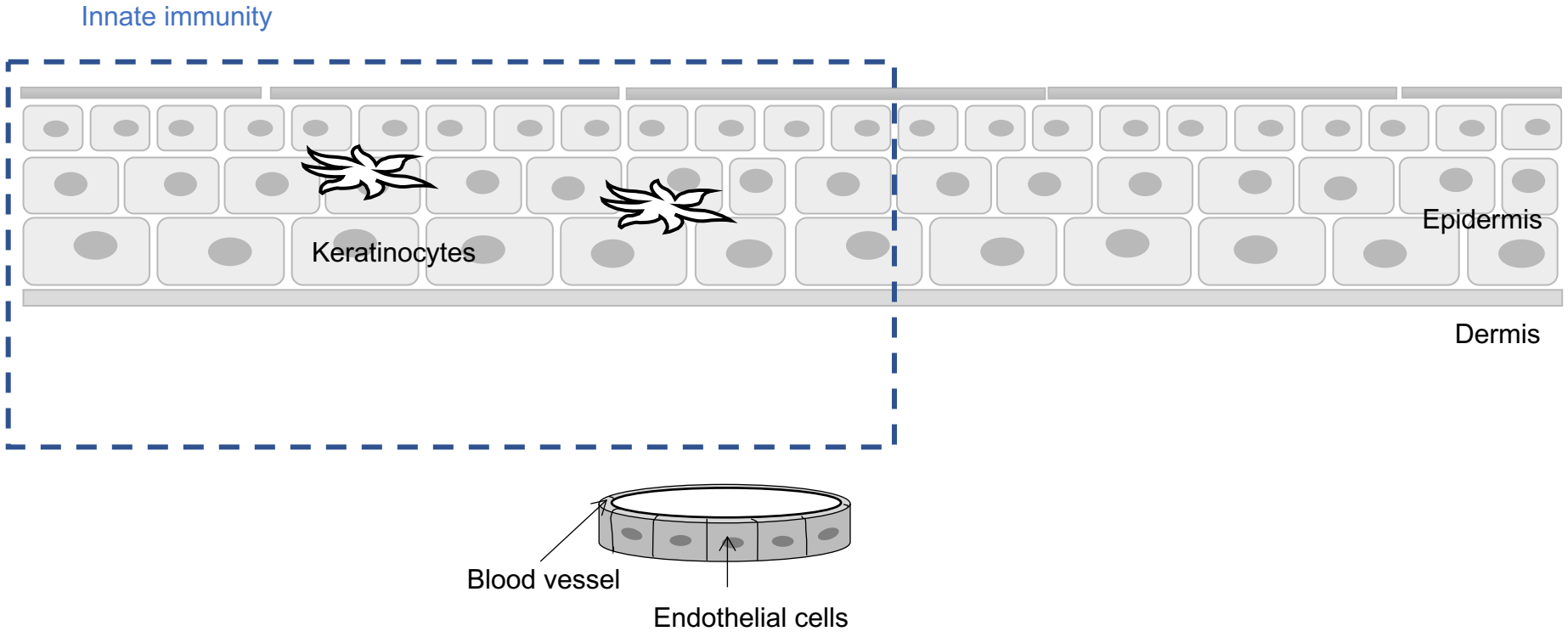
Physiopathologie

CLASSIFICATION DES MALADIES ALLERGIQUES (ET AUTO-IMMUNES) SELON GELL & COOMBS							
TYPE I	TYPE II		TYPE III	TYPE IV			
IgE	IgG		IgG	CD4 Th1	CD4 Th2	CD4 Th17	CD8 cytotoxique
Ag solubles	Ag cellulaires ou matriciels	Récepteurs cellulaires	Ag solubles	Ag solubles	Ag solubles		Ag cellulaires
Mastocyte	Complément, phagocytes, NK	Ac altèrant la signalisation	Complément, phagocytes	Macrophages	Éosinophiles	Neutrophiles	Cytotoxicité
							
EXEMPLES DE MALADIES							
Rhinite, asthme, anaphylaxie	Réaction transfusionnelle, anémie hémolytique	Thyroïdite, myasthénie	Lupus érythémateux, maladie sérique	Rejet de greffes, arthrite, diabète psoriasis (intradermoréaction à la tuberculine)	Asthme chronique, rhinite chronique, eczéma atopique	Psoriasis, polyarthrite, sclérose en plaques, maladie de Crohn	Rejet de greffes, diabète de type I, eczéma de contact, vitiligo, pelade
ALLERGIES AUX MÉDICAMENTS							
Choc anaphylactique	Cytopénie médicamenteuse		Vascularite immuno-allergique, pseudo-maladie sérique	Exanthème, DRESS	DRESS	Pustulose exanthématique	Nécrolyse épidermique, Syndrome de Lyell/syndrome de Stevens-Johnson

Physiopathologie

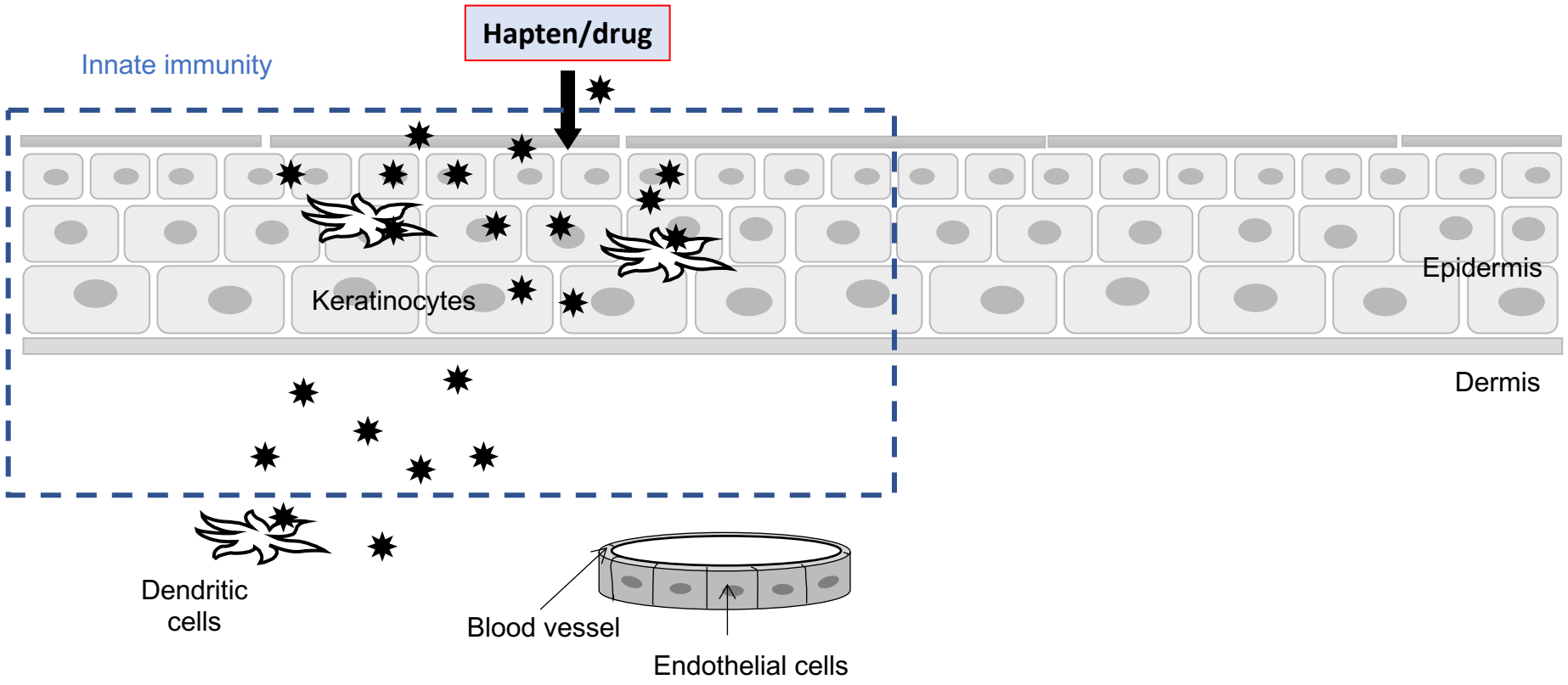
CLASSIFICATION DES MALADIES ALLERGIQUES (ET AUTO-IMMUNES) SELON GELL & COOMBS							
TYPE I	TYPE II		TYPE III	TYPE IV			
IgE	IgG		IgG	CD4 Th1	CD4 Th2	CD4 Th17	CD8 cytotoxique
Ag solubles	Ag cellulaires ou matriciels	Récepteurs cellulaires	Ag solubles	Ag solubles	Ag solubles		Ag cellulaires
Mastocyte	Complément, phagocytes, NK	Ac altèrant la signalisation	Complément, phagocytes	Macrophages	Éosinophiles	Neutrophiles	Cytotoxicité
							
EXEMPLES DE MALADIES							
Rhinite, asthme, anaphylaxie	Réaction transfusionnelle, anémie hémolytique	Thyroïdite, myasthénie	Lupus érythémateux, maladie sérique	Rejet de greffes, arthrite, diabète psoriasis (intradermoréaction à la tuberculine)	Asthme chronique, rhinite chronique, eczéma atopique	Psoriasis, polyarthrite, sclérose en plaques, maladie de Crohn	Rejet de greffes, diabète de type I, eczéma de contact, vitiligo, pelade
ALLERGIES AUX MÉDICAMENTS							
Choc anaphylactique	Cytopénie médicamenteuse		Vascularite immuno-allergique, pseudo-maladie sérique	Exanthème, DRESS	DRESS	Pustulose exanthématique	Nécrolyse épidermique, Syndrome de Lyell/syndrome de Stevens-Johnson

Physiopathologie



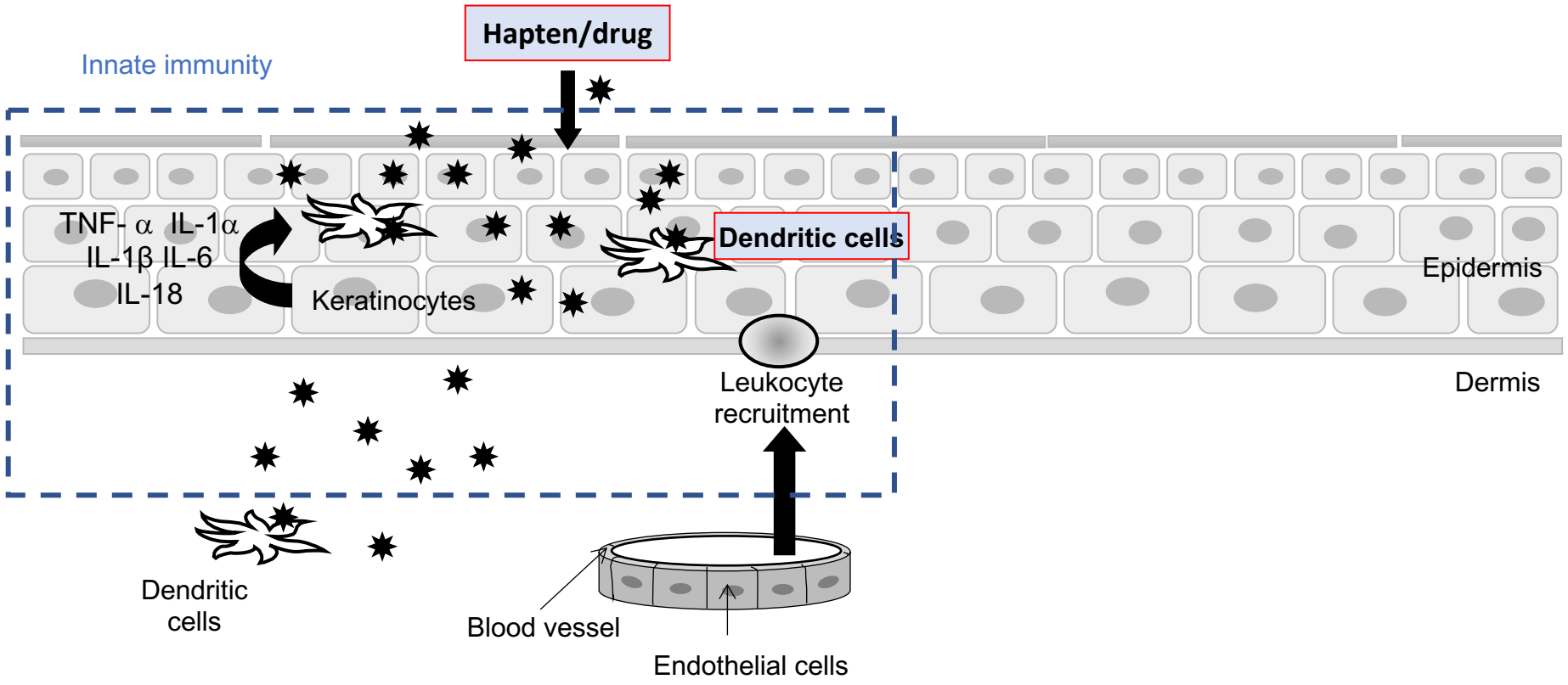
D'après Nosbaum et al. Eur J Dermatol 2011

Physiopathologie



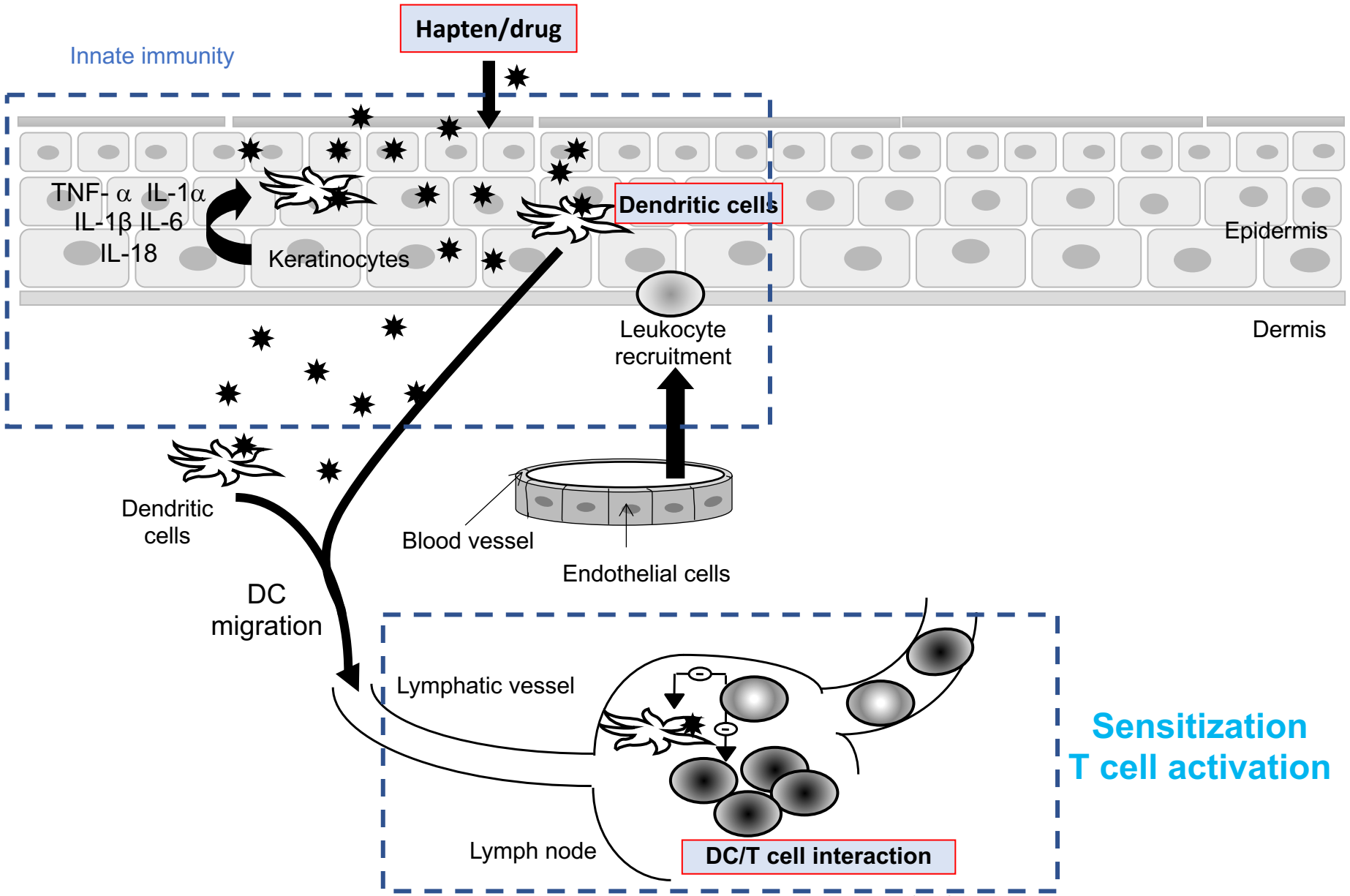
D'après Nosbaum et al. Eur J Dermatol 2011

Physiopathologie



D'après Nosbaum et al. Eur J Dermatol 2011

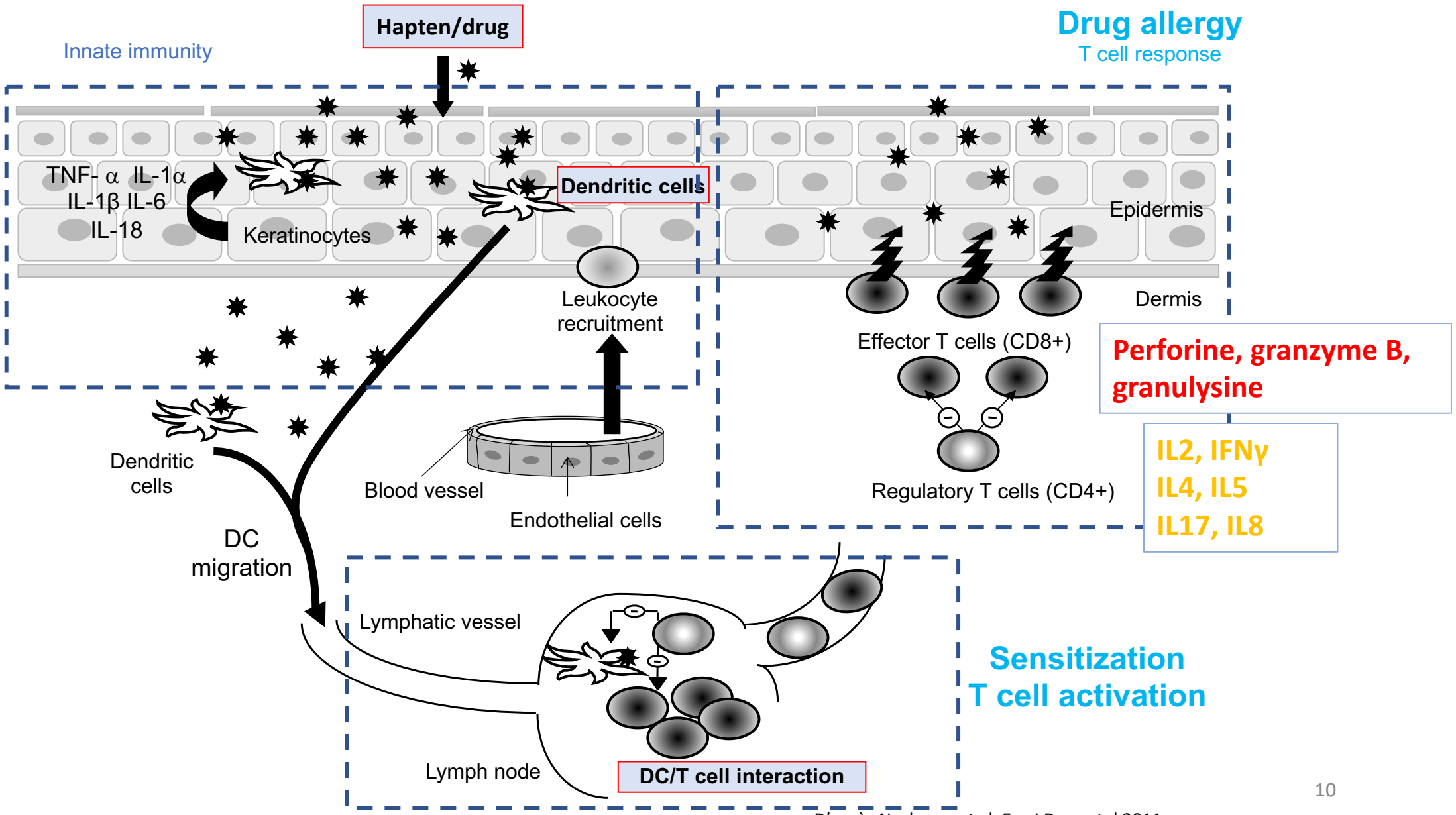
Physiopathologie



Sensitization
T cell activation

D'après Nosbaum et al. Eur J Dermatol 2011

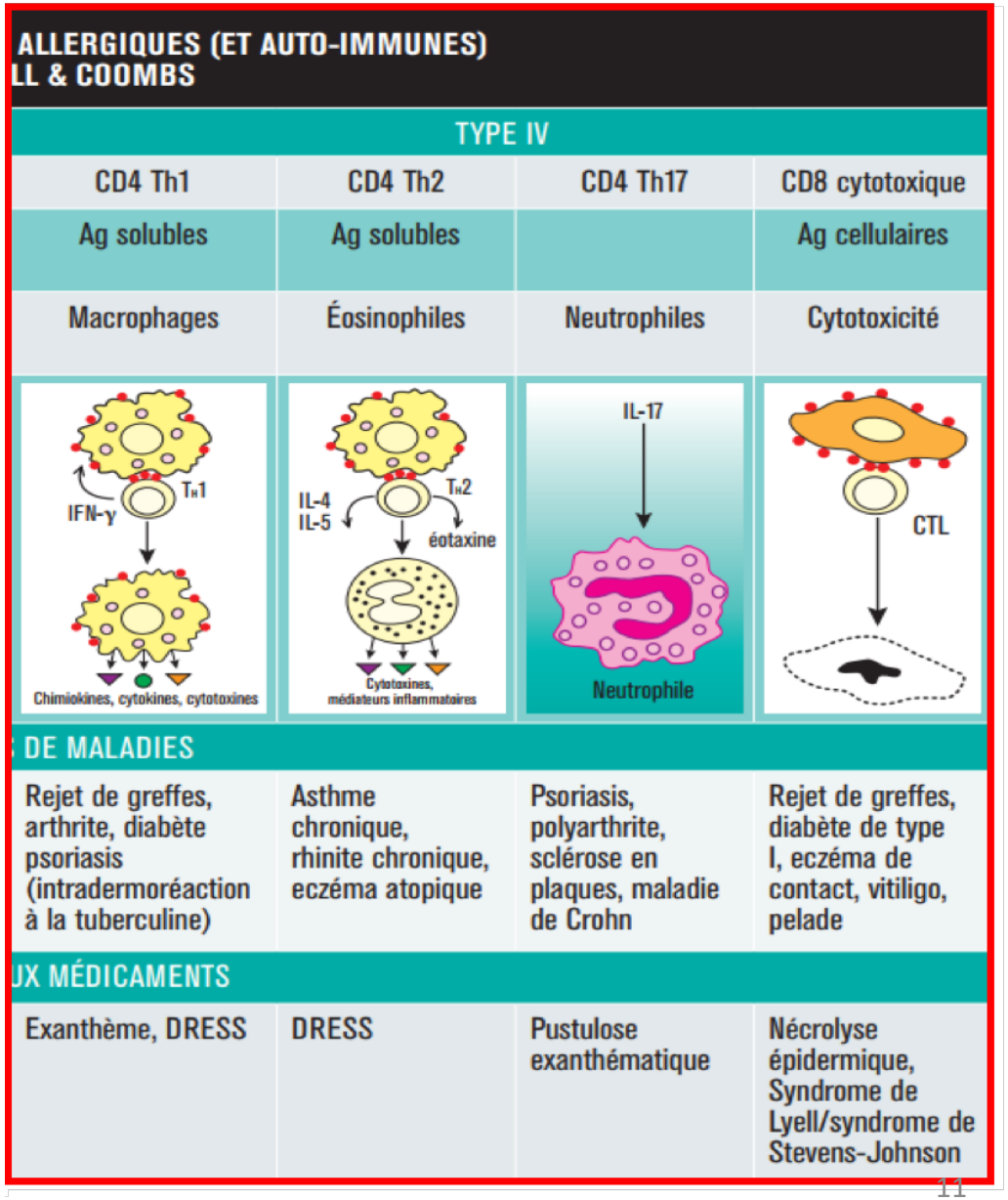
Physiopathologie



D'après Nosbaum et al. Eur J Dermatol 2011

Physiopathologie

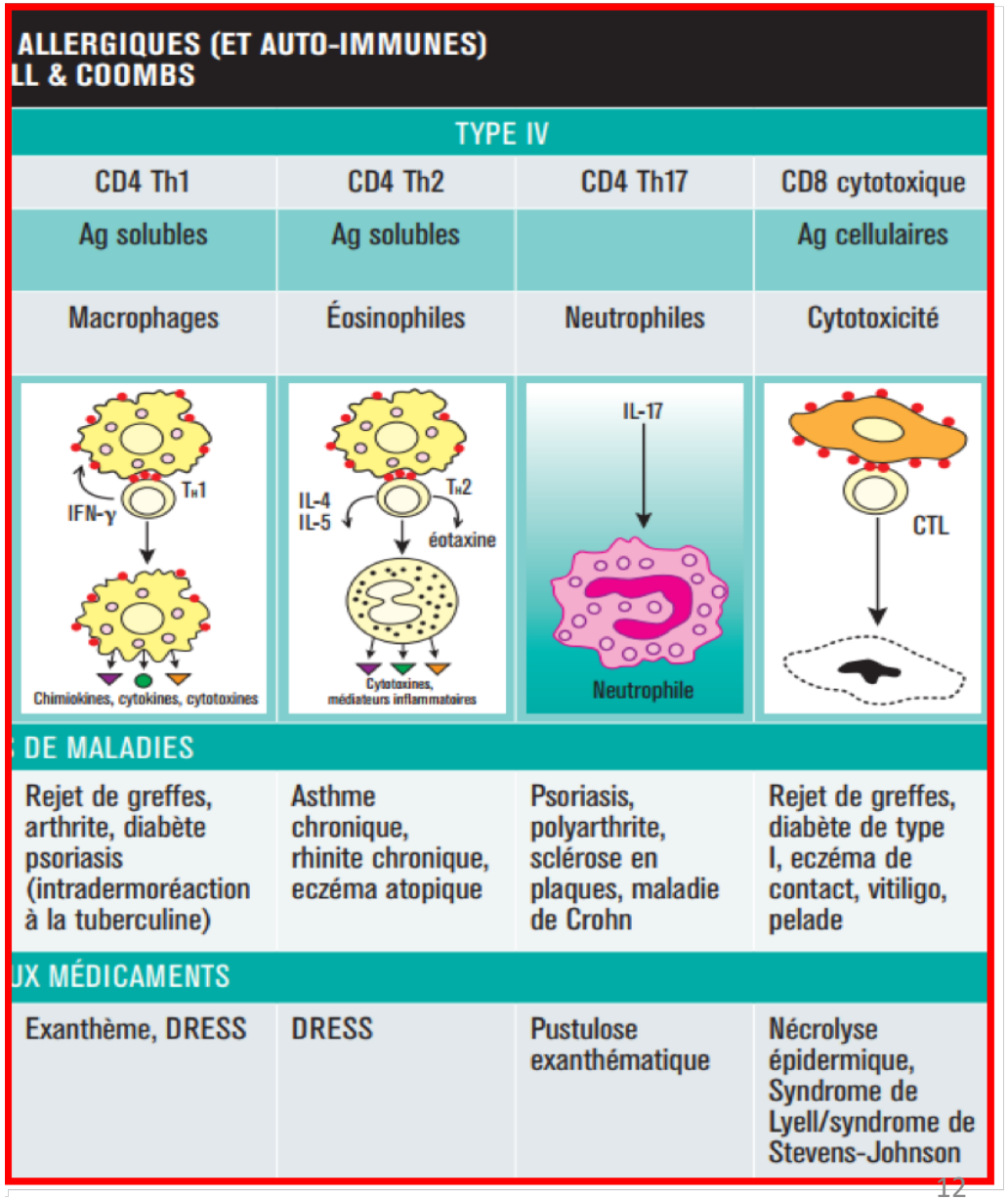
- IVa: Lymphocytes Th1, IFNγ, macrophages
  →**EMP**
- IVb: Lymphocytes Th2, IL5, polynucléaires éosinophiles
  →**DRESS**
- IVc: Lymphocytes TCD8+ cytotoxiques, granzyme B, perforine, granulysine
  →**SJS/NET**
- IVd: Lymphocytes Th17, IL17, IL8, polynucléaires neutrophiles
  →**PEAG**



Schrijvers R et Al. Clinical and Translational Allergy. 2015.

Physiopathologie

- IVa: **Lymphocytes Th1, IFNγ**, macrophages
  →EMP
- IVb: **Lymphocytes Th2, IL5**, polynucléaires éosinophiles
  →DRESS
- IVc: **Lymphocytes TCD8+ cytotoxiques, granzyme B, perforine, granulysine**
  →SJS/NET
- IVd: **Lymphocytes Th17, IL17, IL8**, polynucléaires neutrophiles
  →PEAG



Schrijvers R et Al. Clinical and Translational Allergy. 2015.

Diagnostic des hypersensibilités retardées

- Histoire clinique : historique des médicaments introduits avant la réaction, chronologie médicamenteuse, sémiologie et chronologie des manifestations cliniques et biologiques, scores cliniques (RegiSCAR, EuroSCAR, SCORTEN...)

- Algorithmes d'imputabilité médicamenteuses (Naranjo, OMS, Begaud, ALDEN...)

- Tests cutanés : Patch test +/- IDR à lecture retardée

- Tests de provocation : contre-indiqués en cas de réaction sévère

+/-Biologie

Principe et apport des tests immuno-biologiques

- Mettre en évidence la présence de lymphocytes T spécifiques d'allergène (médicament) dans le sang (ou la peau) du patient.
  - Prolifération lymphocytaire
  - Production de cytokines
  - Réponse cytotoxique
  - Activation

- Pour:
  - Renforcer le diagnostic clinique
  - Sécuriser les réintroductions médicamenteuses

Les tests immuno-biologiques dans les hypersensibilités retardées

- Test de transformation lymphocytaire
- ELISpot
- ...

= méthodes non invasives (sans risque pour le patient) qui permettent de tester plusieurs molécules à la fois

MAIS:

- Sensibilité et spécificité variables
- Pas de standardisation
- Domaine de la recherche

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

- Mesure de la prolifération lymphocytaire

- Incorporation de thymidine tritiée
- Marqueurs « froids » (CFSE, BrdU)

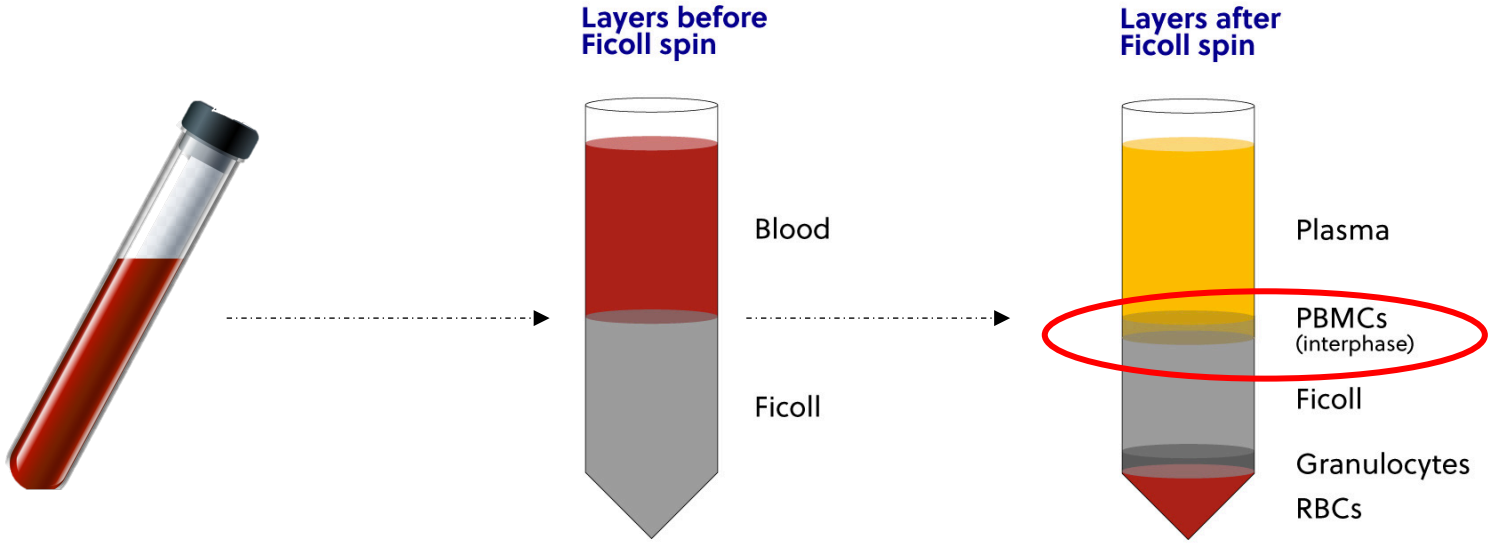
→ Témoigne de la présence de LT spécifique

Limites :
- Liées à l'utilisation de la radioactivité
- Sensibilité variable
- Techniques longues (6-7j)

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

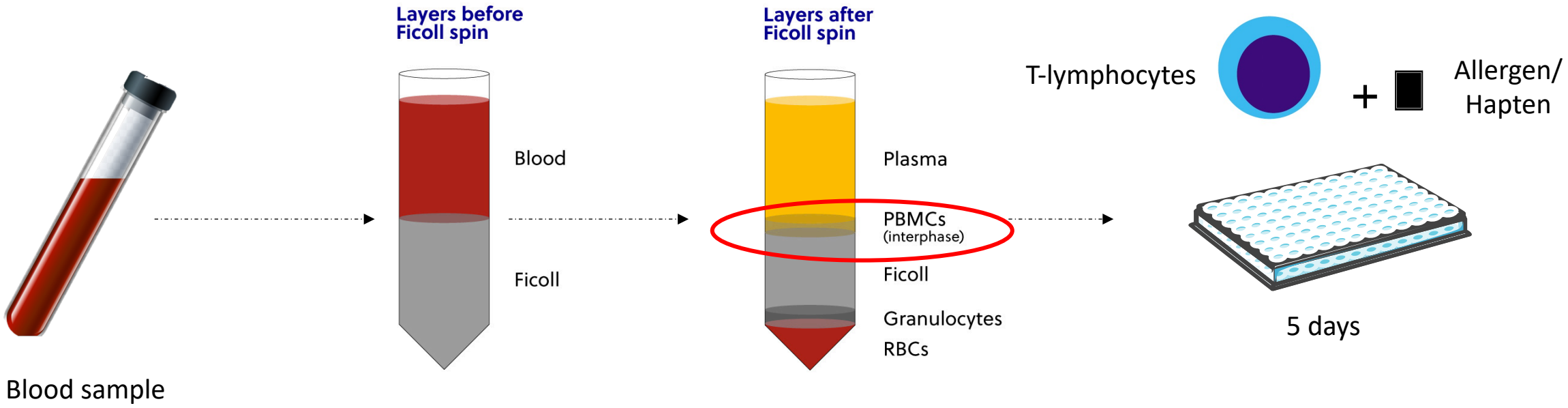
Blood sample

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

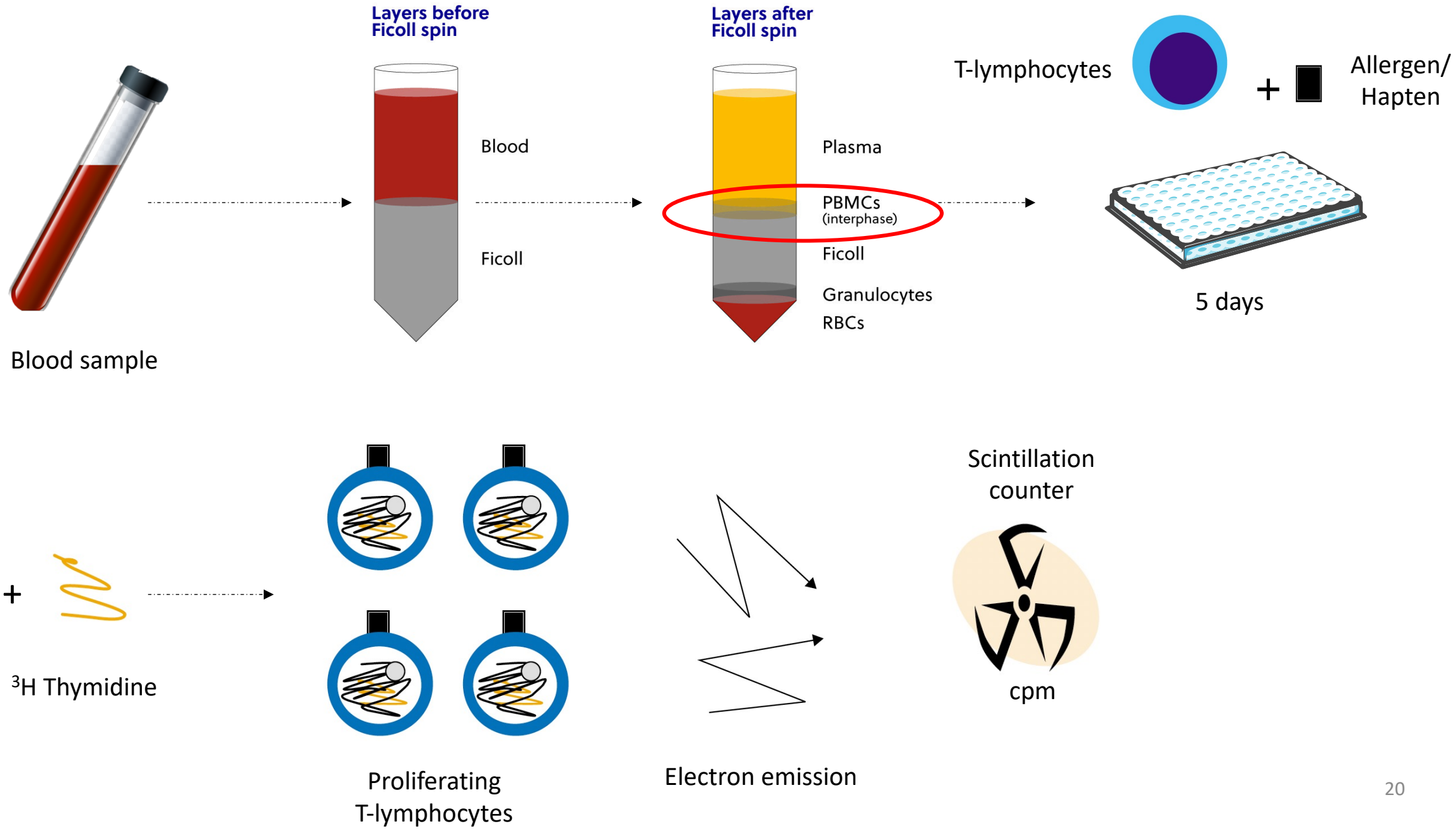


Blood sample

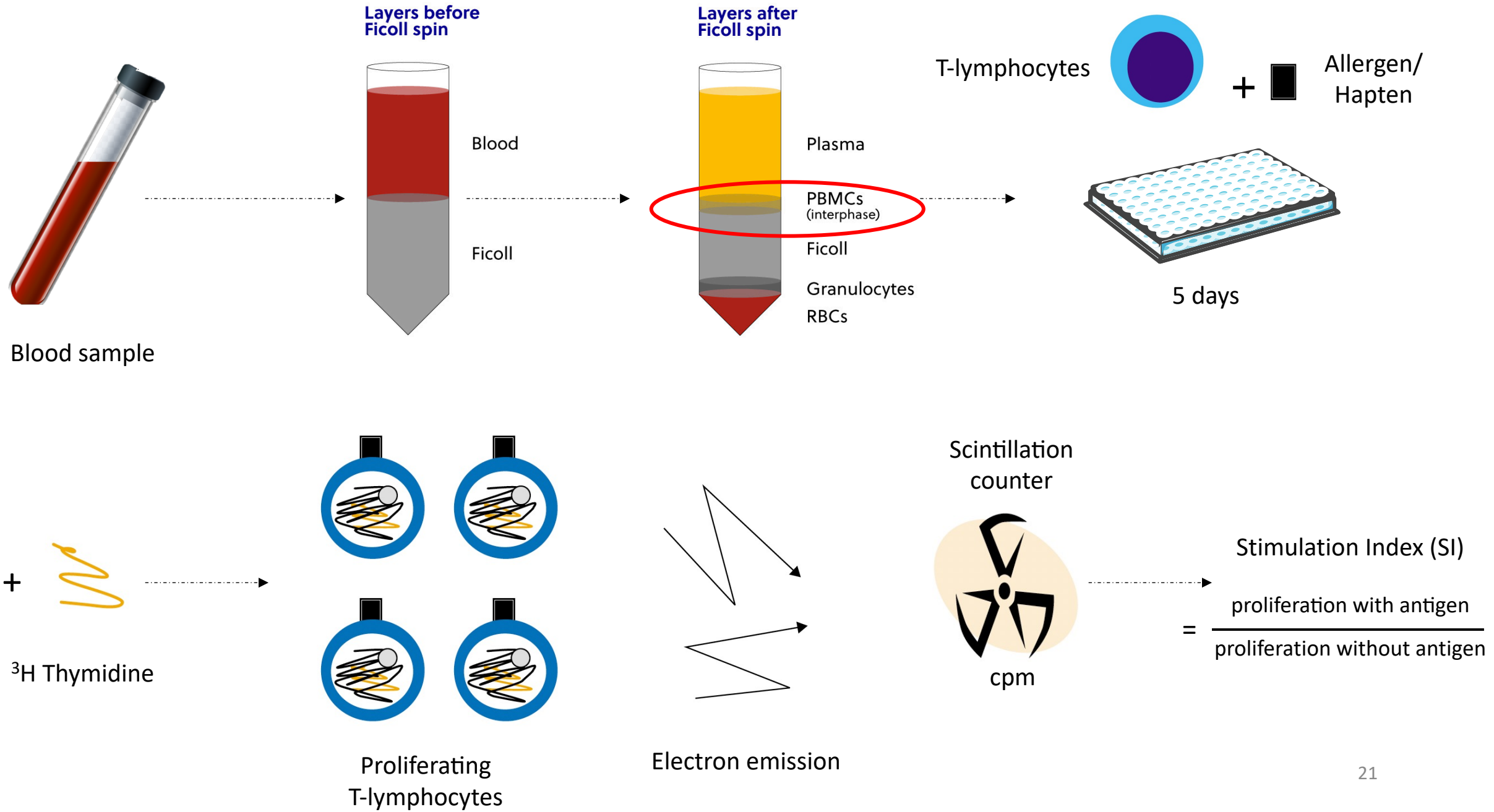
Le test de transformation lymphocytaire (TTL)



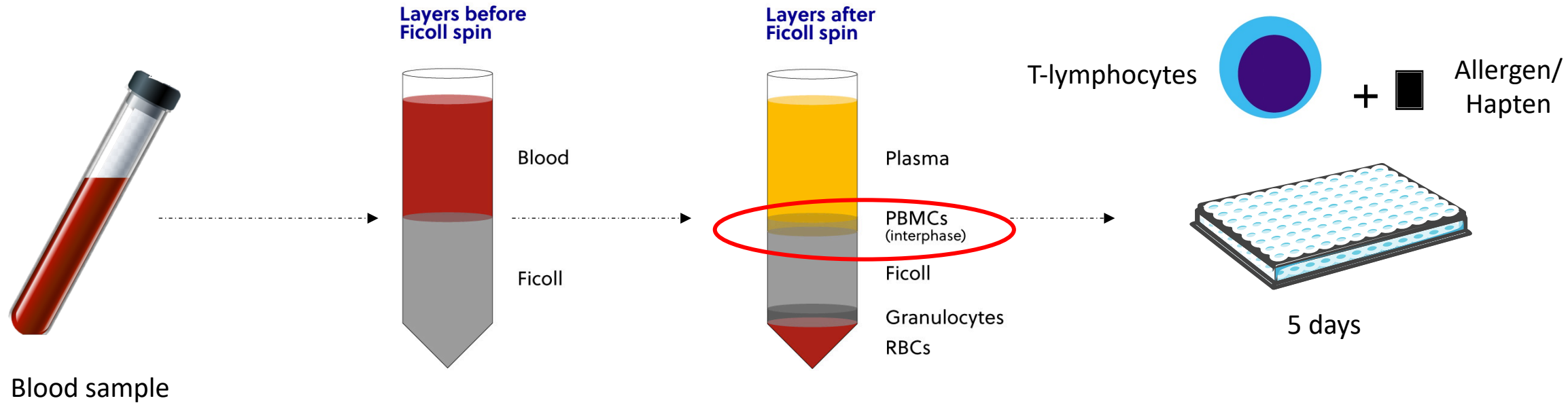
Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

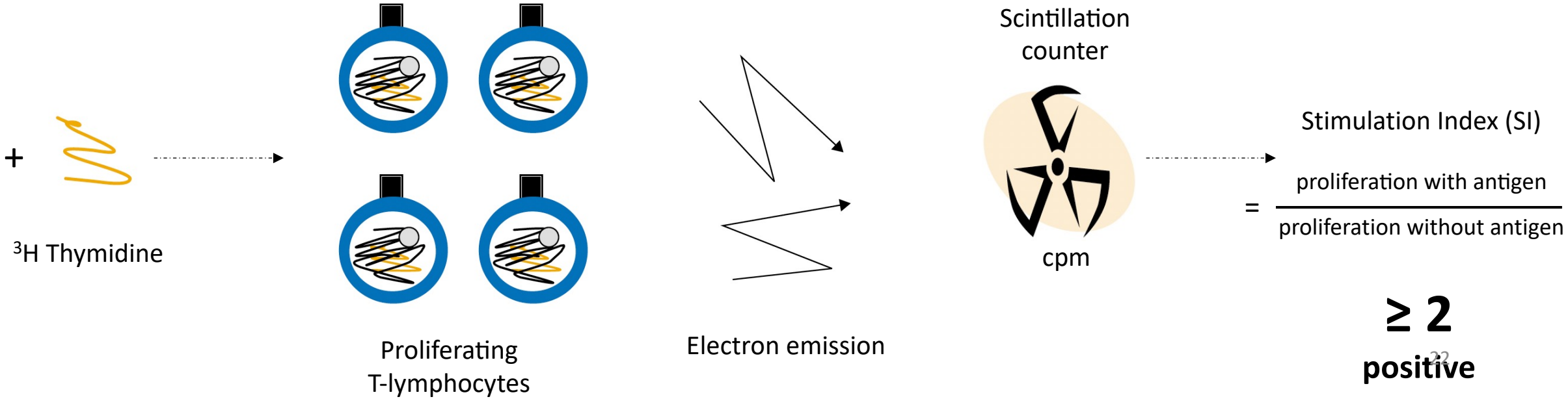


Le test de transformation lymphocytaire (TTL)



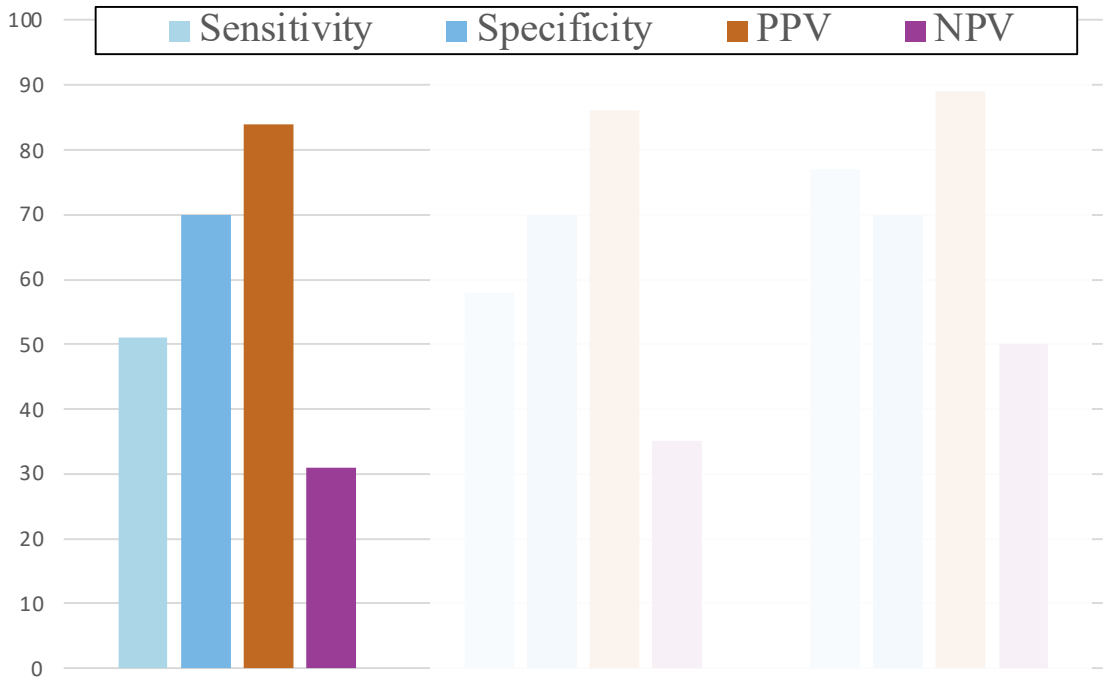
Le test de transformation lymphocytaire (TTL)





Le test de transformation lymphocytaire (TTL)
Sensibilité et spécificité

Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive value of LTT as a diagnostic tool in DHR



	LTT +	LTT + and/or ELISPOT +	LTT + and/or ELISPOT + and/or ST +
Sensitivity (%)	**52**	58	77
Specificity (%)	**70**	70	70
PPV (%)	84	86	89
NPV (%)	32	35	50

Egeley C. et al. Thèse de docteur en médecine. 2021.

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)
Outils diagnostic fiable dans les DRESS et les réactions aux bêtalactamines

	N	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Reaction Type					
DRESS	20	60	80	90	40
MPE	15	50	60	71	37
Molecule					
Beta lactams	15	67	100	100	43
Other molecules (exept BL)	23	44	57	73	57

Summary of sensitivity, specificity, PPV and NPV of LTT according to clinical presentations or drug therapeutic groups.

Egeley C. et al. Thèse de docteur en médecine. 2021.

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)
Outils diagnostic fiable dans les DRESS et les réactions aux bêtalactamines

	N	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Reaction Type					
DRESS	20	**60**	**80**	**90**	**40**
MPE	15	**50**	**60**	**71**	**37**
Molecule					
Beta lactams	15	67	100	100	43
Other molecules (exept BL)	23	44	57	73	57

Summary of sensitivity, specificity, PPV and NPV of LTT according to clinical presentations or drug therapeutic groups.

Egeley C. et al. Thèse de docteur en médecine. 2021.

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)
Outils diagnostic fiable dans les DRESS et les réactions aux bêtalactamines

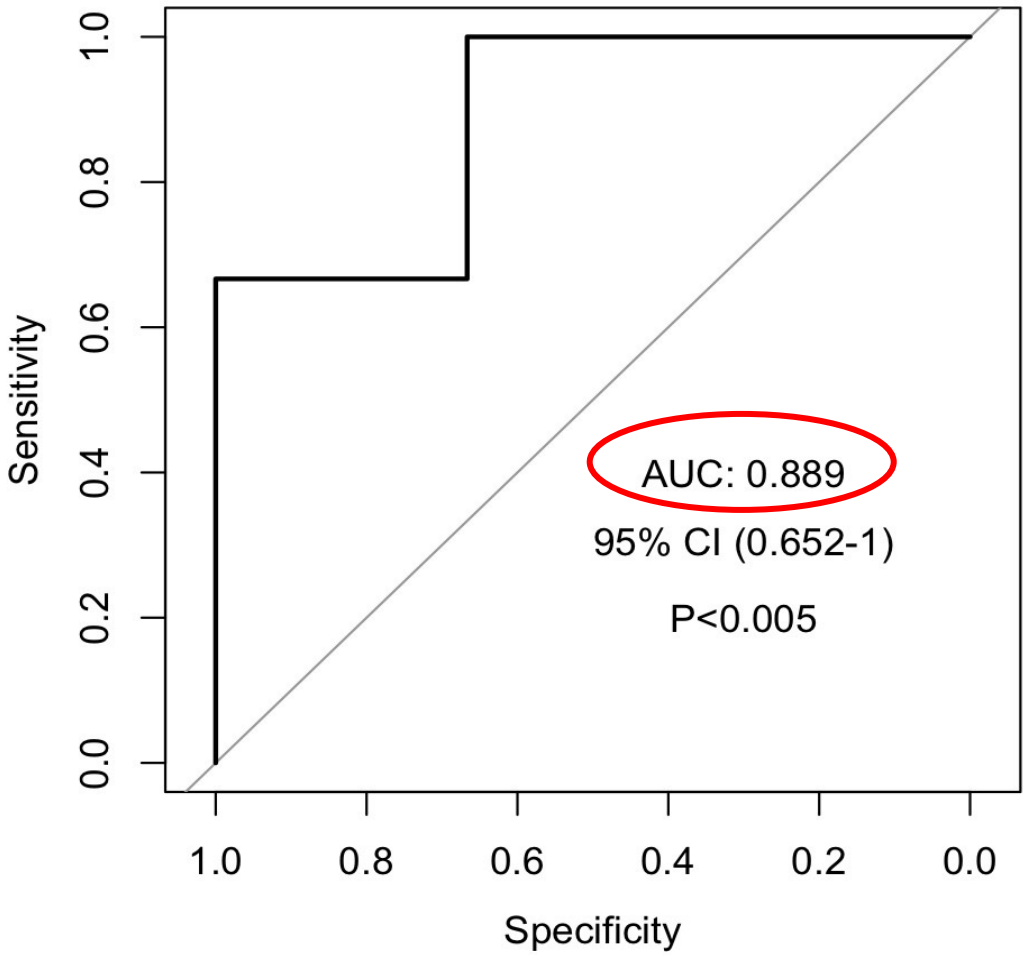
	N	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Reaction Type					
DRESS	20	60	80	90	40
MPE	15	50	60	71	37
Molecule					
Beta lactams	15	**67**	**100**	**100**	**43**
Other molecules (exept BL)	23	**44**	**57**	**73**	**57**

Summary of sensitivity, specificity, PPV and NPV of LTT according to clinical presentations or drug therapeutic groups.

Egeley C. et al. Thèse de docteur en médecine. 2021.

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)
Outils diagnostic fiable dans les DRESS et les réactions aux bêtalactamines

ROC curve analysing TTL in delayed beta-lactam hypersensitivity for all reaction types.



Egeley C. et al. Thèse de docteur en médecine. 2021.

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)
cut off optimal de 2 pour toutes les molécules et de 3 pour la famille des bêtalactamines

Drugs	AUC (95% CI)	P-value	Cut-off (SI)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
All drugs	0.677 (0.493-0.861)	0.058	1.52	54.84	50
			2.20	51.61	70
			3.10	38.71	80
Betalactams	0.889 (0.652-1)	<0.005	1.52	75.00	66.67
			2.02	66.67	66.67
			3.00	66.67	100.0

Summary of data obtained from ROC curves built with results of LTT performed for all drugs or only beta-lactams. The Youden index was calculated to estimate the SI cut-off points with best specificity and sensitivity.

Egeley C. et al. Thèse de docteur en médecine. 2021.

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)
permet de sécuriser les tests de provocation pour les alternatives médicamenteuses

	In vivo drug challenge		
	Bad tolerance	**Good tolerance**	**Sum**
LTT positive	1	0	1
LTT Negative	1	17	18
Sum	2	17	19

Sensitivity: 50%
Specificity 100%
PPV= 100%
NPV= 94%

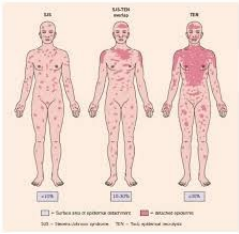
Contingency table: Sensitivity, specificity, PPV and NPV of LTT of LTT for alternative drugs using drug provocation tests as gold standard

Egeley C. et al. Thèse de docteur en médecine. 2021.

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)
sensibilité et spécificité variable

Se: 27% à 88.8%;

Sp: 63% à 100%



Sévérité de la réaction

- Outils diagnostique performant dans les EMP, EPF, PEAG, DRESS
- Peu informatif dans les NET et SJS

Molécule impliquée

- Très bonne sensibilité pour les bêtalactimes, anti-épileptiques, allopurinol, Bactrim (sulfamethoxazole)

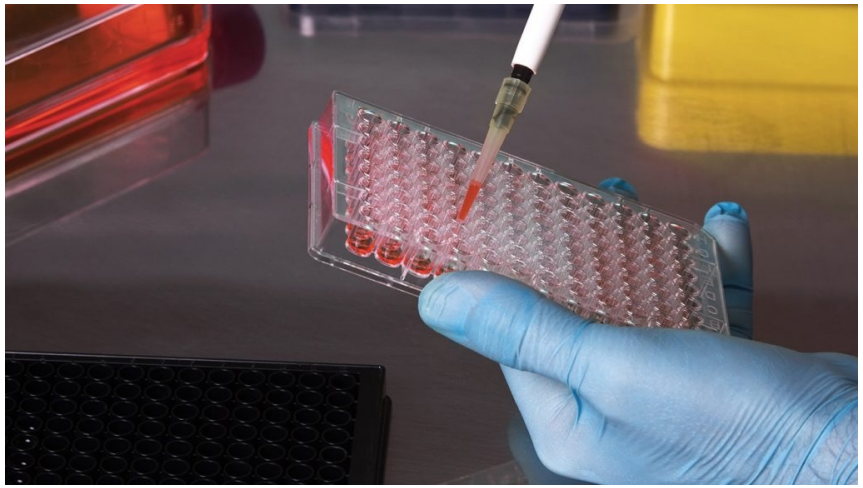
Timing de réalisation

- Phase aigue pour les EMP et NET/SJS
- Phase tardive dans les DRESS

Srinoulprasert et al, Asia Pacific Allergy. 2020, Mayorga et aL. International Journal of Molecular Sciences. 2017, Nyfeler, B. et al. Clinical & Experimental Allergy 1997, Kano et al. Allergy. 2007.

ELISpot (enzyme-linked immunospot)

- Evaluer l'activation fonctionnelle = déterminer le nombre de lymphocytes T effecteurs produisant une cytokine ou des médiateurs de cytotoxicité en réponse à la stimulation par un antigène



- Possibilité de détecter différents médiateurs : **IFNg**, IL-5, **Granzyme B**, Perforine

Limites :
- Sensibilité variable (meilleure sensibilité pour les réactions bulleuses)
- Résultats pas toujours reproductibles

ELISpot (enzyme-linked immunospot)

Anticoprs de capture anti-IFNg

Cellule stimulée

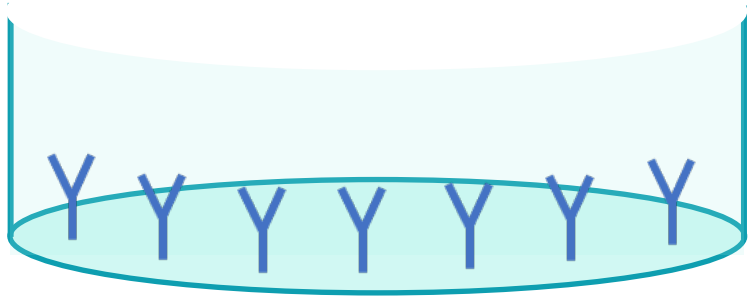
Cellule non stimulée

Cytokine (IFNg)

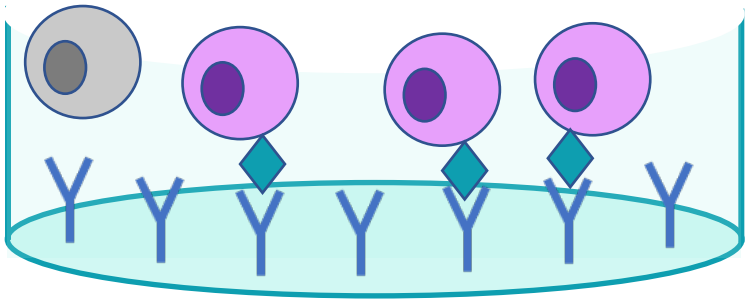
Anticoprs de détection anti-IFNg + enzyme

Substrat: spot coloré

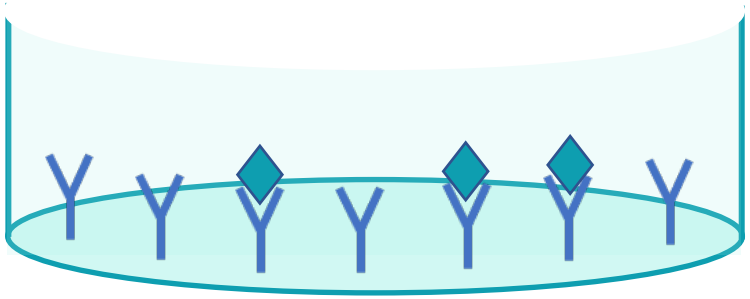
1



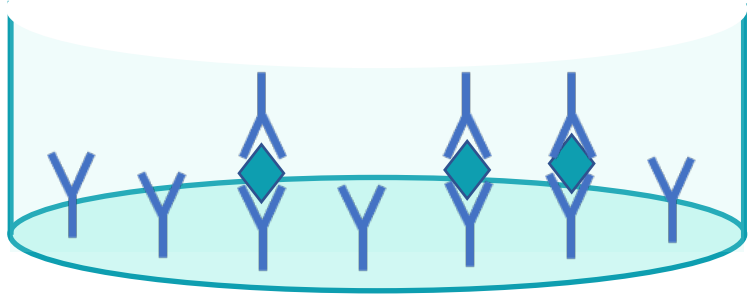
2



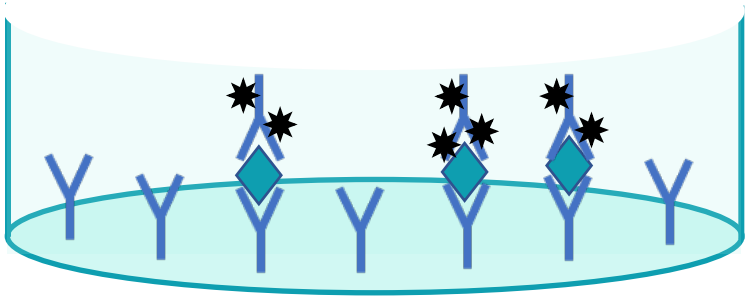
3



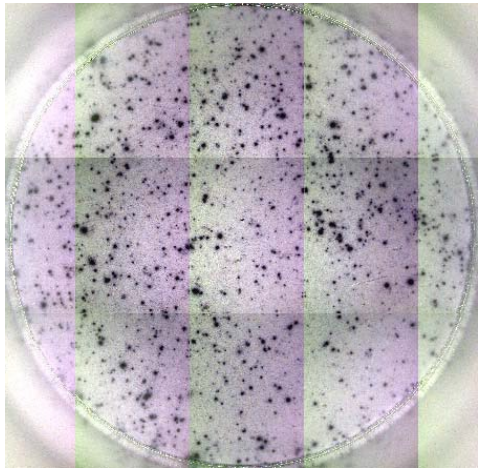
4



5

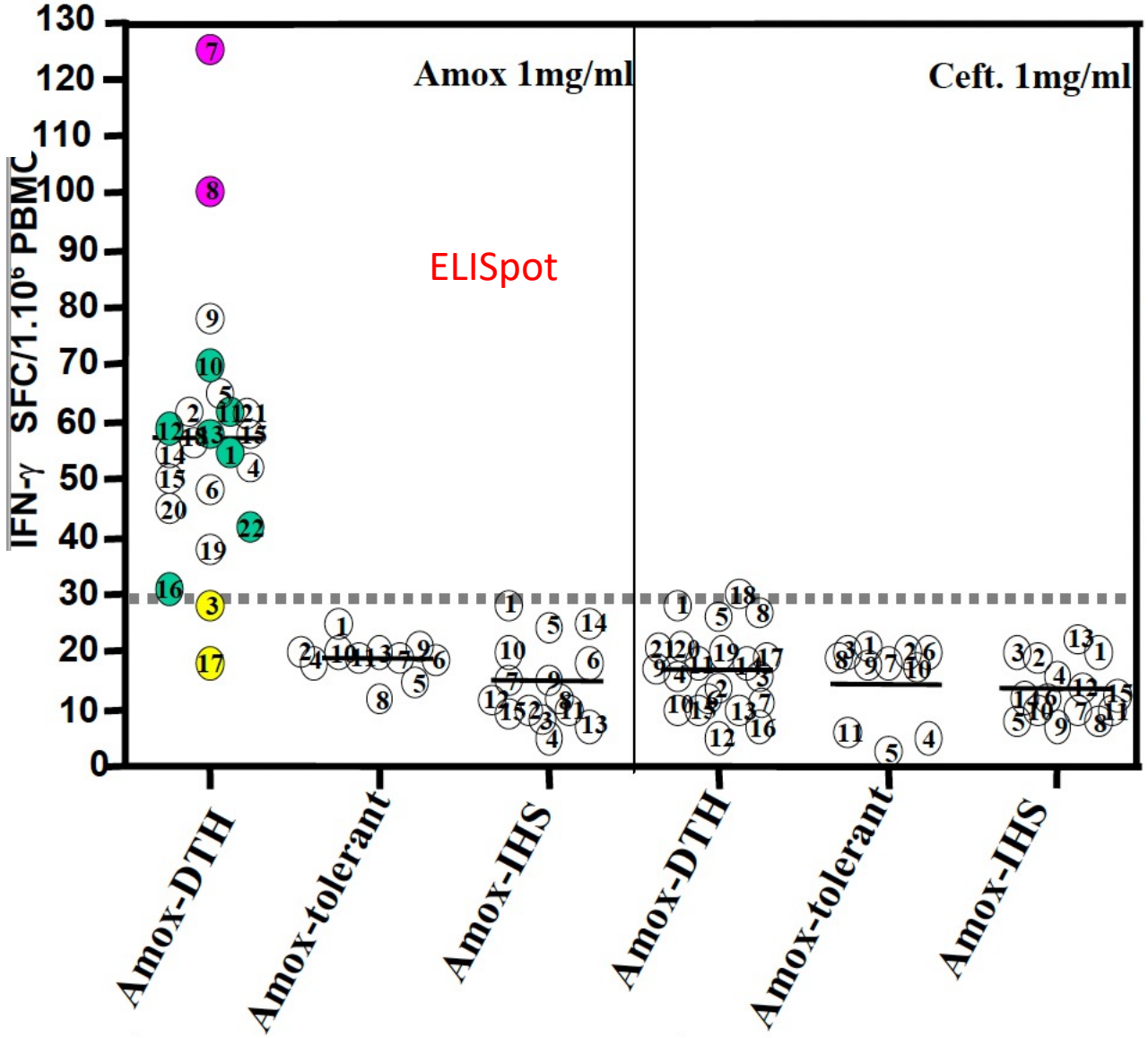


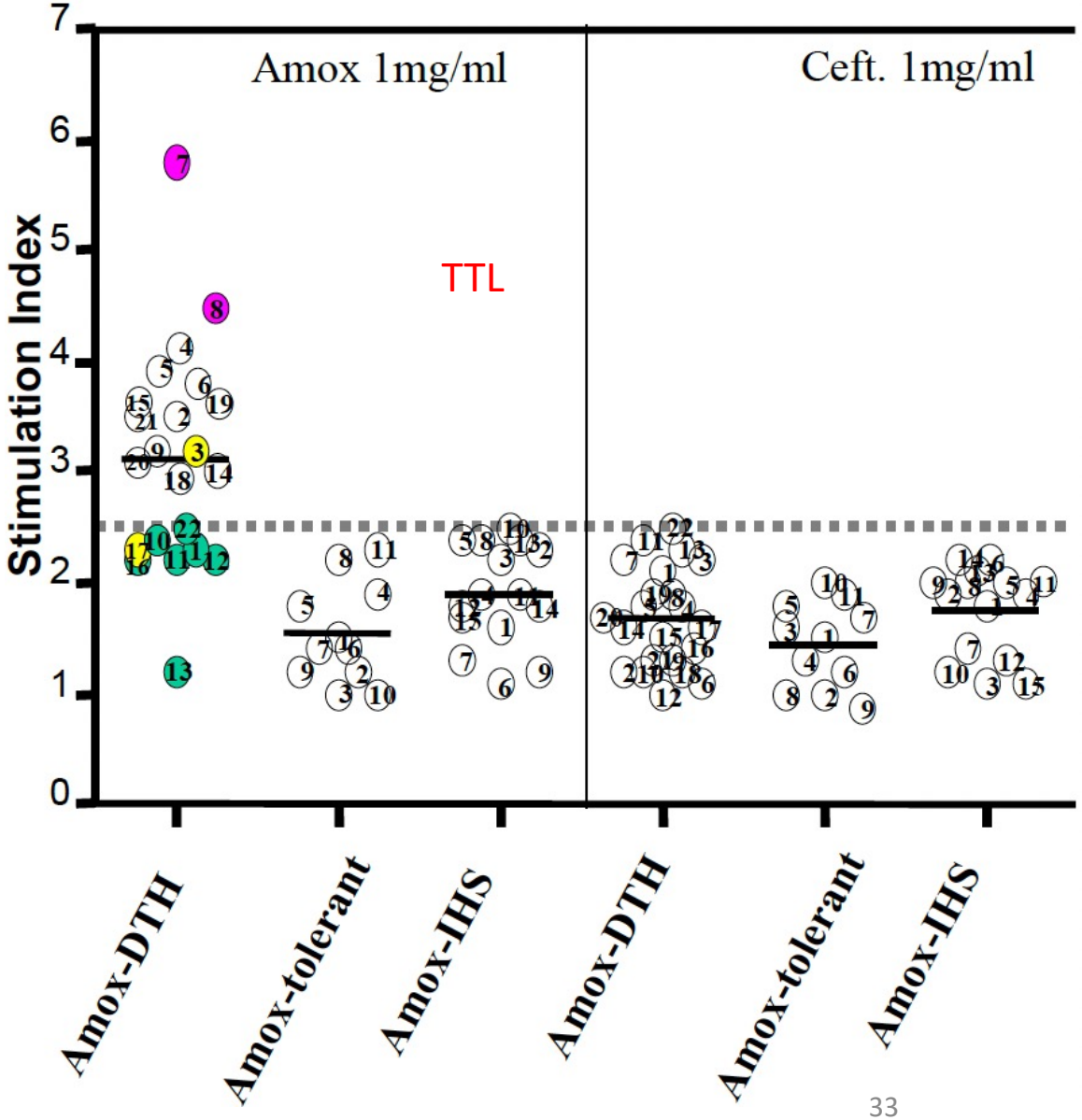
6



ELISpot (enzyme-linked immunospot)

meilleure sensibilité de détection que le TTL dans les réactions aux bêtalactamines

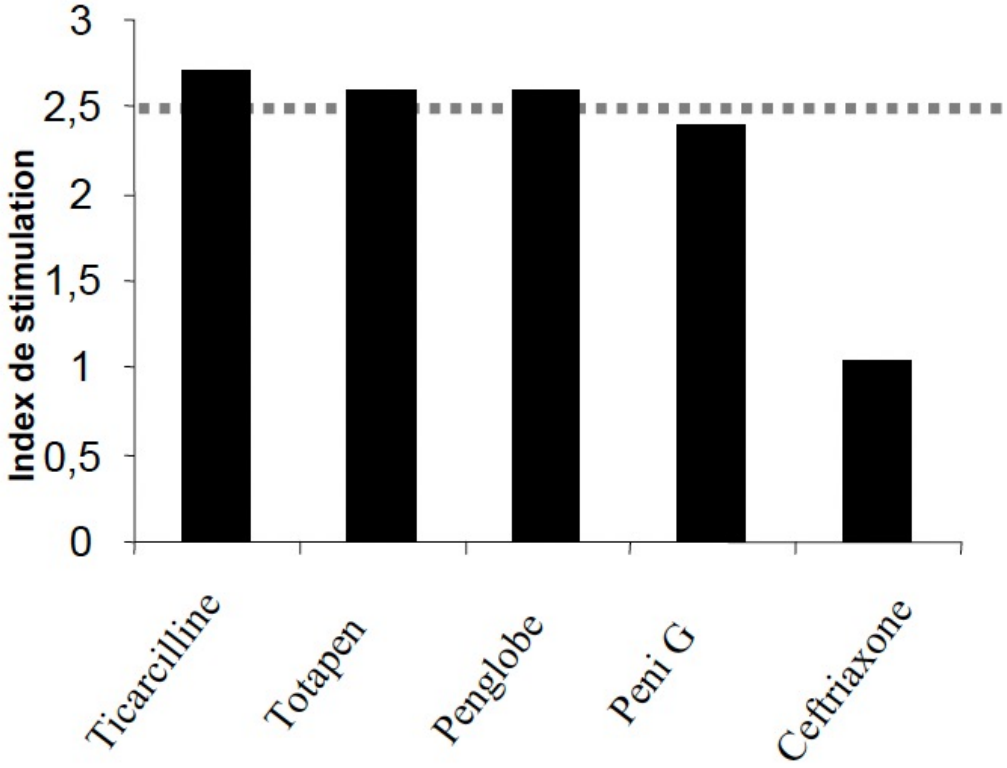




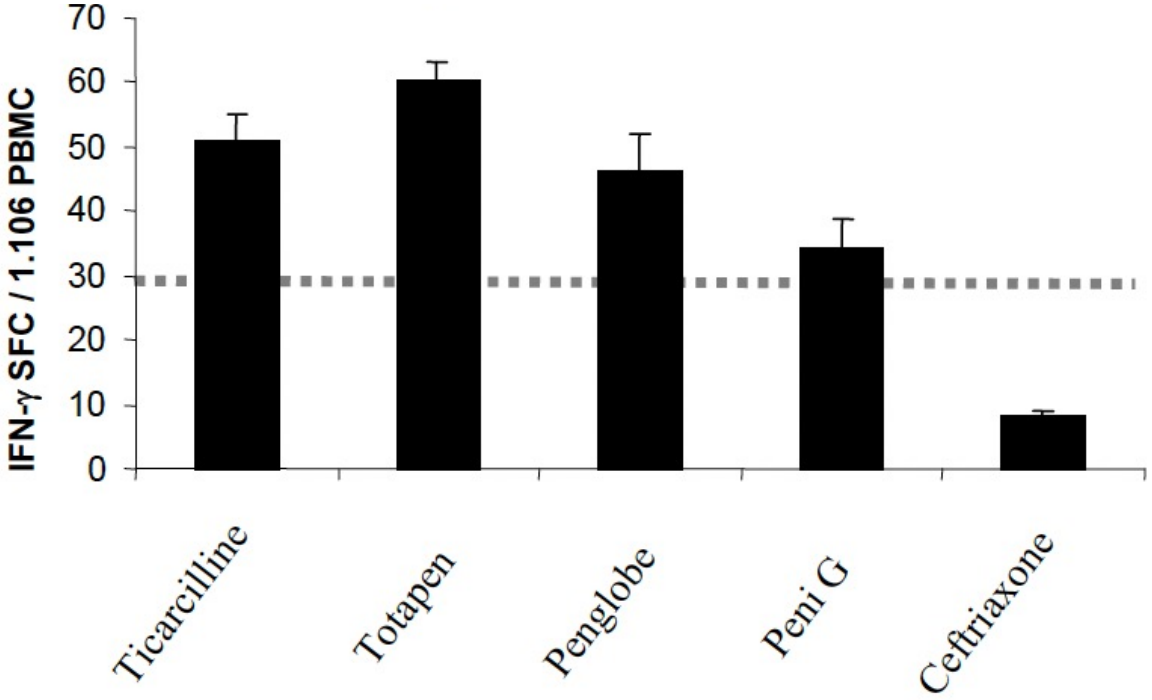
Rozières A. et al. Allergy. 2009.

ELISpot (enzyme-linked immunospot)
intérêt dans la détection des sensibilisations croisées

TTL

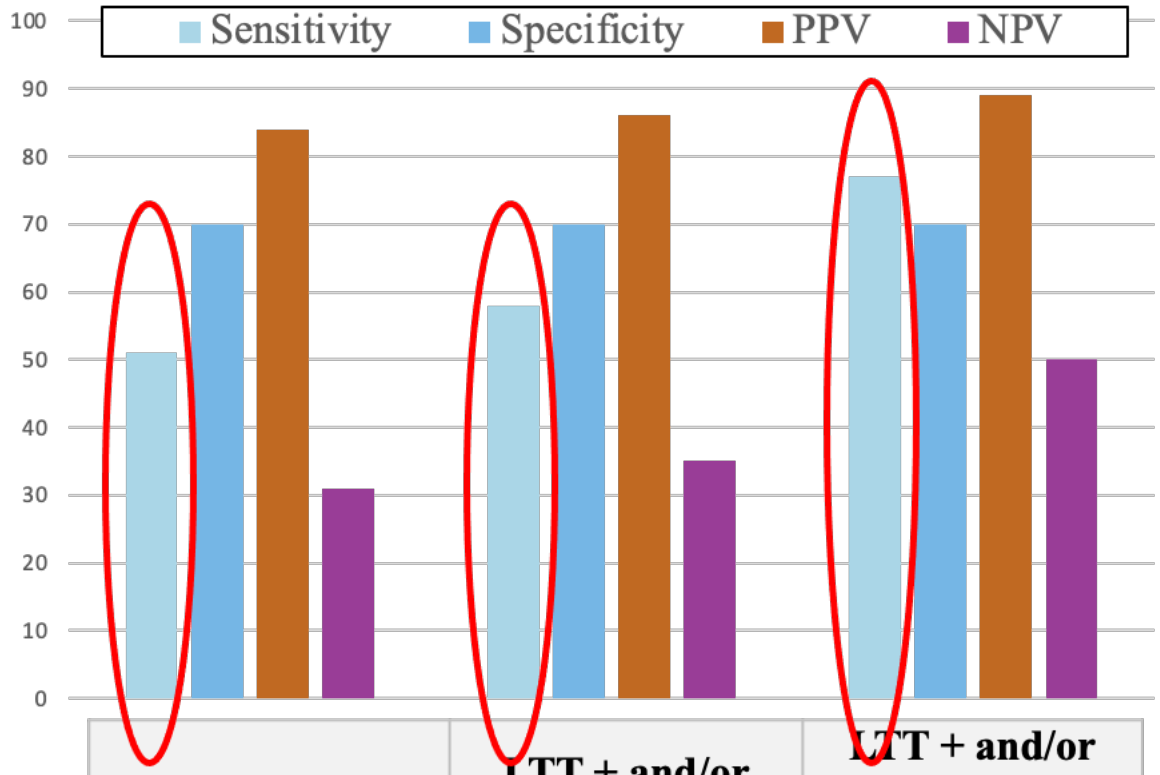


ELISpot



Rozières A. et al. Allergy. 2009.

La combinaison des test *in vitro* et *in vivo* augmente la sensibilité du diagnostic



	LTT +	LTT + and/or ELISPOT +	LTT + and/or ELISPOT + and/or ST +
Sensitivity (%)	**52**	**58**	**77**
Specificity (%)	**70**	**70**	**70**
PPV (%)	84	86	89
NPV (%)	32	35	50

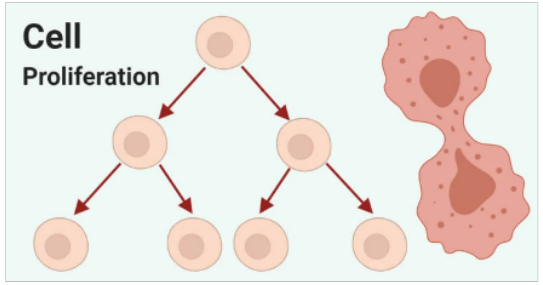
Egeley C. et al. Thèse de docteur en médecine. 2021.

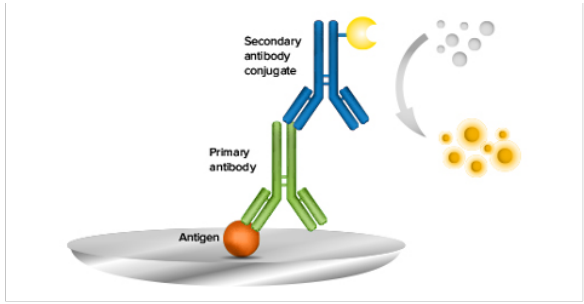
Autres techniques immuno-biologiques

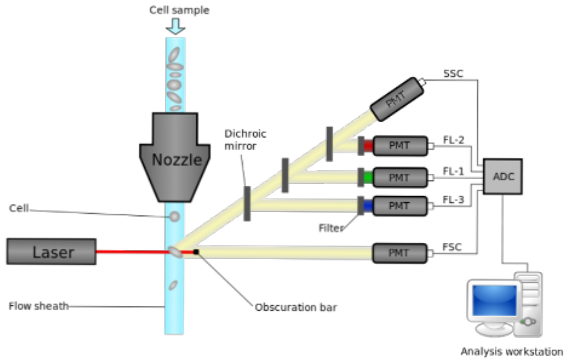
- **Test ELISA** (Enzyme linked Immunosorbent Assay)
  - Mesure des cytokines dans le surnageant

- **Cytométrie en flux** :
  - Expression de marqueurs d'activation lymphocytaire membranaire (CD69)
  - Réponse cytotoxique (Granzyme B, Granulysine)
  - Cytokines (IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-8)

Autres techniques immuno-biologiques







Combiner les techniques

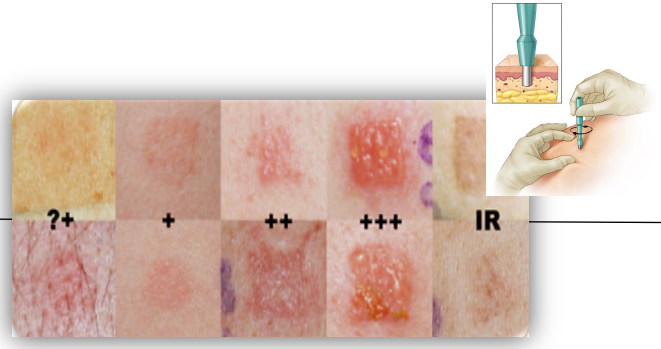
Nouvelles techniques
in vitro

Cyto-LTT: combine la mesure de l'activation lymphocytaire avec la production de cytokines et la mesure de la réponse cytotoxique

Martin et al. Allergy. 2010, Mayorga et al. JACI. 2019.

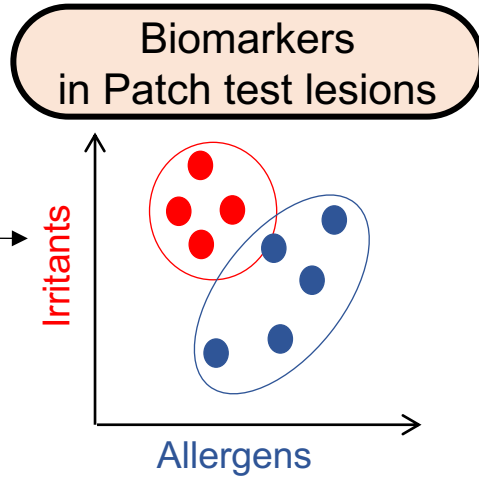
L'analyse moléculaire pour discriminer un patch test « vrai positif » d'un « faux positif »

Patch-tests



- **Patch-tests scoring**
- **Skin biopsies (3mm)**
  - Lesional PT reactions
  - Vehicle-treated area

qRT-PCR based on contact allergy specific biomarkers



ACD biomarkers = CD8, GZMB, GNLY, CD69, IFNG, CXCL10, CD4, PLEK, HLA-DRA, IL15, GPR183

ICD biomarker = IGFL3

Lefevre et al. Allergy. 2021.

Conclusions

- **Les tests immunobiologiques sont basés sur la compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans les réactions.**
- **Méthodes non invasives, sans risque pour la patient et permettant de tester plusieurs médicaments à la fois.**
- **Sensibilité et spécificité variables dépendant: (i) de la sévérité de la réaction, (ii) de la molécule impliquée, (iii) du timing de la réalisation.**
- **Sécurisation des réintroductions d'alternatives médicamenteuses.**
- **La combinaison des tests *in vitro* et *in vivo* augmente la sensibilité de diagnostic**

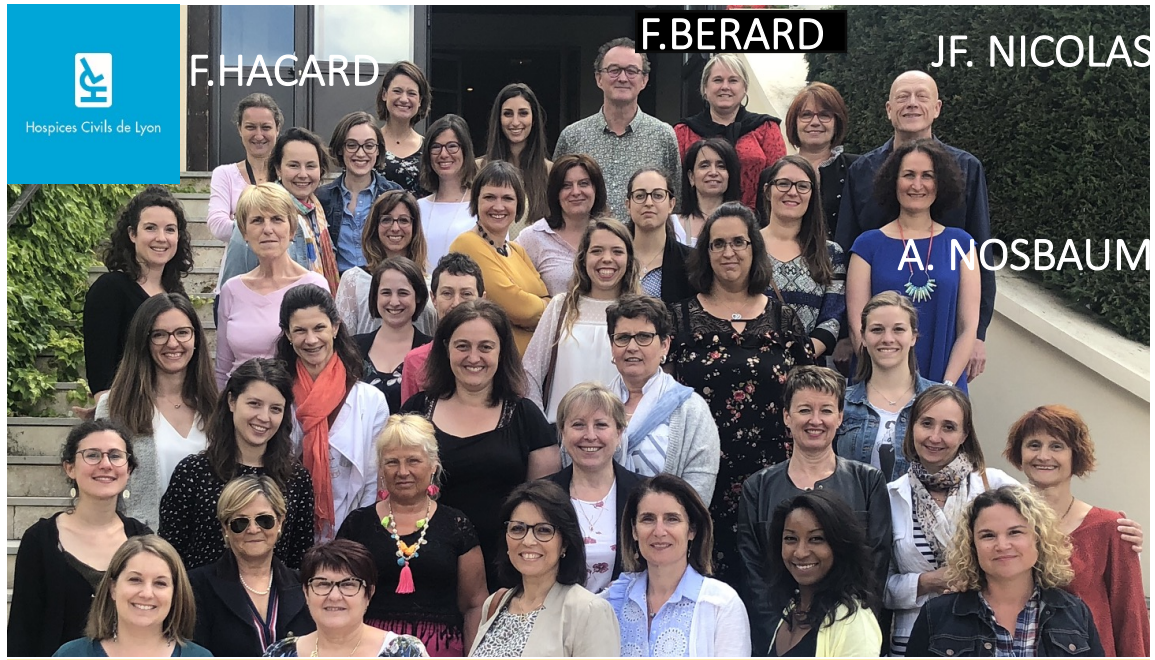
Perspectives

- **Etudes de cohortes plus larges, multicentriques afin de valider les résultats actuels**

- **Standardisation, harmonisation et validation des méthodes et des pratiques**

- **Mise en œuvre en pratique clinique courante → développement de nouveaux outils diagnostiques**

Merci pour votre attention



Allergology & Clinical Immunology department, Lyon-sud hospital

Team 20 / CIRI-INSERM U1111

St Etienne University Hospital Dermatology and Allergology Department