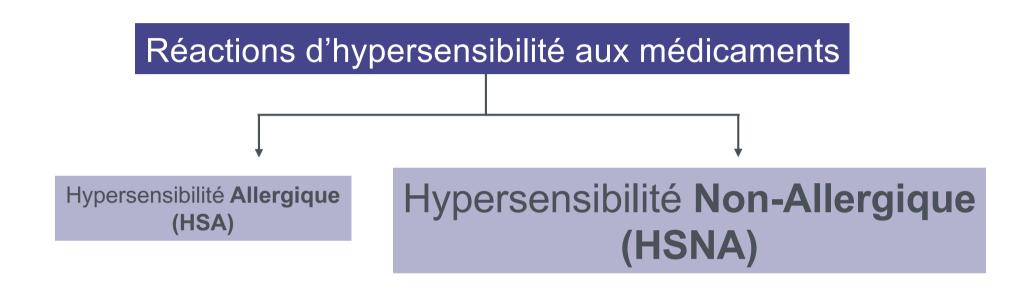
## BIOLOGIE DE L'ALLERGIE

Allergologie AURA 2022/2023 Module 1 Allergologie générale 12 janvier 2023

S. VielLaboratoire d'ImmunologieGroupement Hospitalier Sud -Lyon

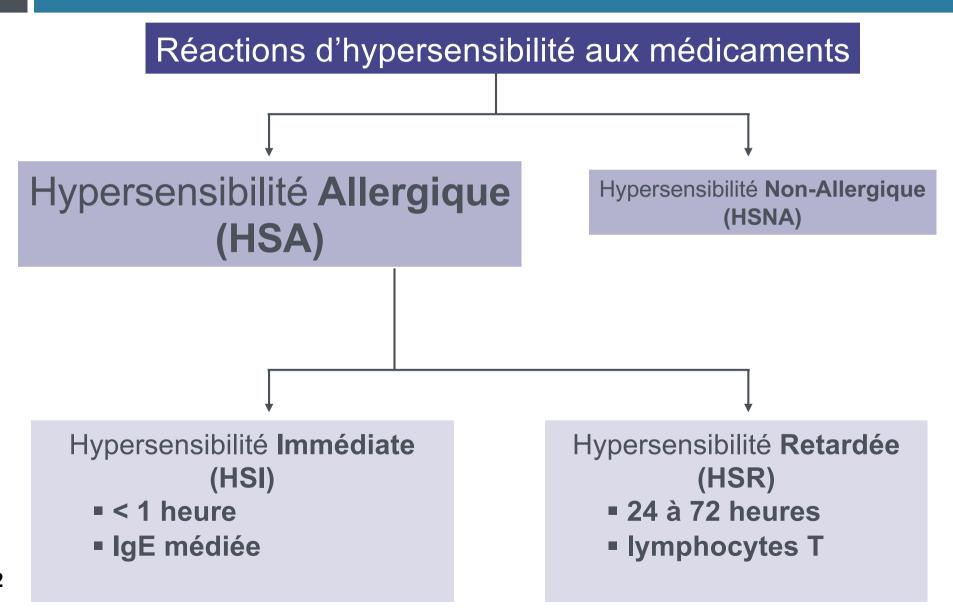
#### Réactions d'hypersensibilité aux médicaments



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



## Diagnostic d'une hypersensibilité immédiate (HSI)

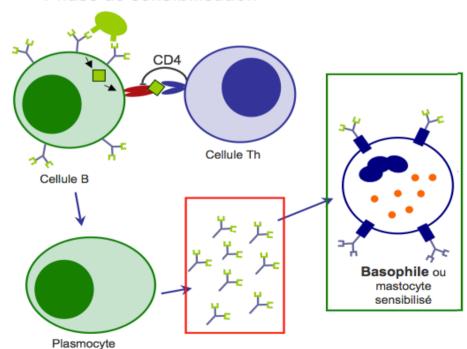
- Interrogatoire :
  - Recherche des allergènes responsables des signes cliniques
  - Disparition des signes à l'éviction de l'allergène
- Tests cutanés
- Tests de provocation

+/- Biologie

#### La réaction immédiate

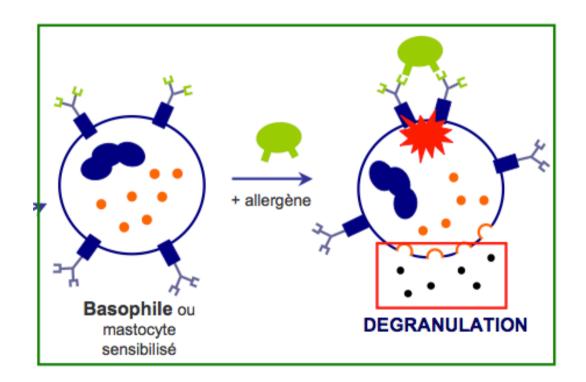
- Première rencontre avec l'allergène = sensibilisation
  - Production d'Ac de type IgE spécifiques de l'allergène
  - Phase asymptomatique

#### Phase de sensibilisation



#### 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 l

```
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 : lgE 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

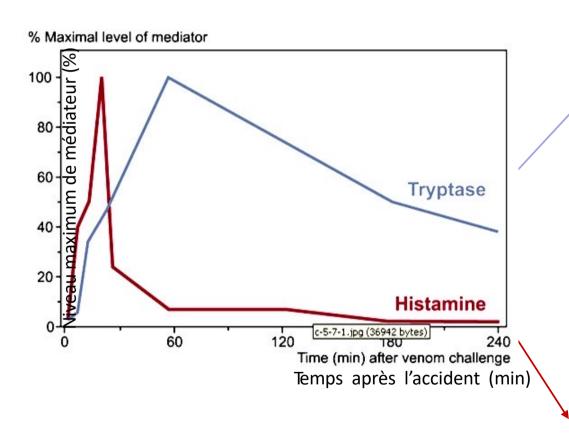
Difficile à doser dans le plasma (retour à son niveau de base 1h après l'accident)

#### 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
  - Corrélé 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
  - ½ 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

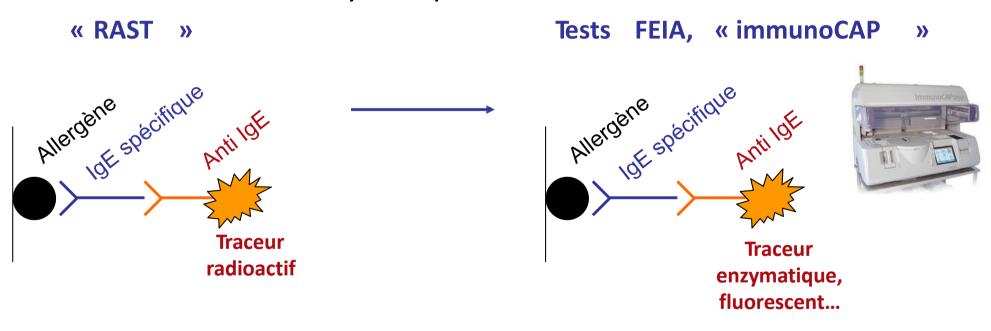
## Tests spécifiques

- 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



# 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:

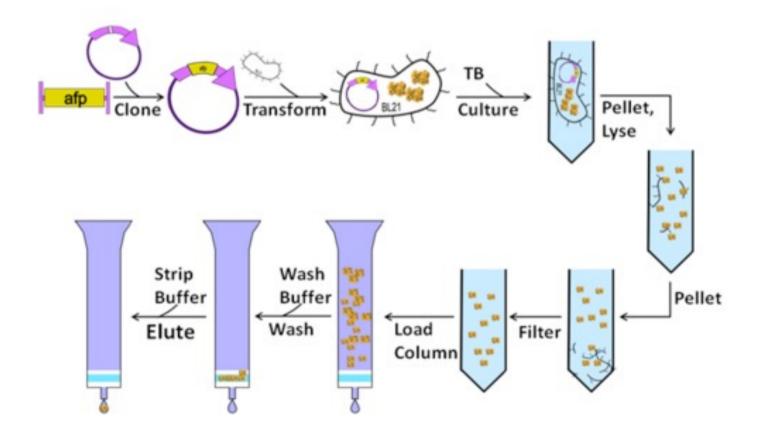
en fonction des sources : obtenus à partir de sources allergéniques complexes: grains de pollens, squames et phanères d'animaux, cultures d'acariens ou de blattes.....

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

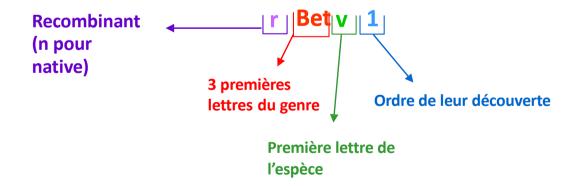


## Comment obtenir/isoler des allergènes moléculaires ?

- 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

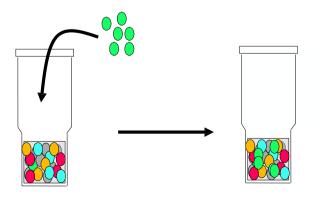
- 1. Outil pour améliorer les tests biologiques « classiques »
- 2. Outil « dépister » les réactions croisées sur des bases moléculaires et aider à l'interprétation des polysensibilisations cutanées
- 3. Outil pour évaluer la sévérité de l'allergie
- 4. Outil pour améliorer les indications de l'immunothérapie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

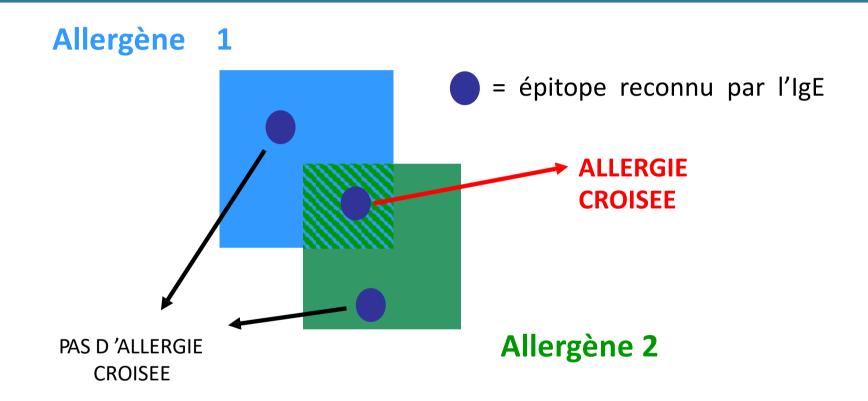
• k82:4,39 kU/L

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 »



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

#### **Constatation 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</li>
- Hevb3:<0,35</li>
- Hevb5:<0,35
- Hevb6.01 :<0,35</li>
- Hevb6.02 :<0,35</li>
- Hevb8 : >100
- Hevb9 :<0,35</li>
- 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

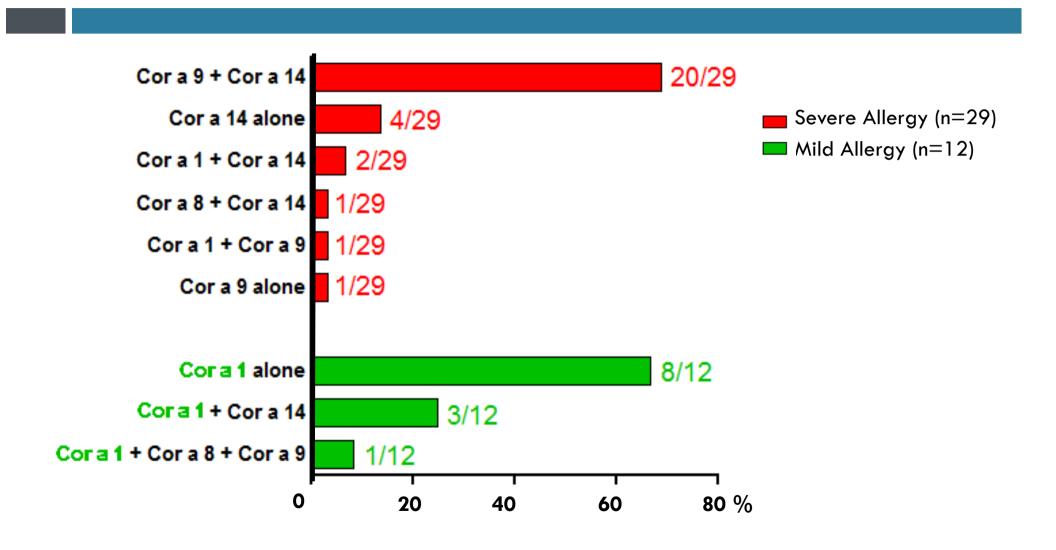
#### 3. Identification de Marqueurs de sévérité

## 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



**BOULEAU** 

Y IgE spécifiques des allergènes recombinants

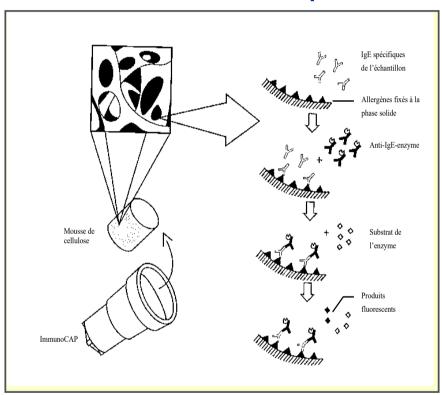
$$Z = X + Y$$

Indication de l'immunothérapie

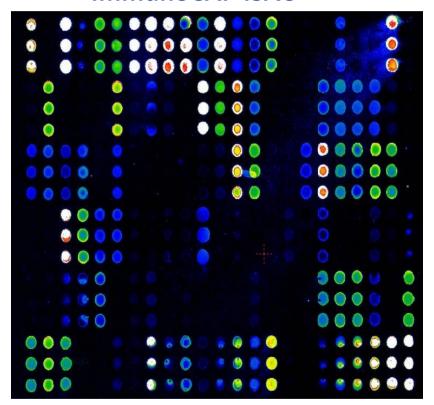
Allergènes majeurs Bet v 1	Négatifs	Positifs	Positifs
Allergènes mineurs Bet v 2 + 4	Positifs / Négatifs	Positifs	Négatifs
Z:	<b>Faible</b>	<b>Moyenne</b>	↓ Forte

## Les allergènes moléculaires en pratique : Test unitaire / Biopuce multiallergénique

#### ImmunoCAP® classique



#### ImmunoCAP ISAC®



#### Un unique résultat pour

1 source allergénique ou

1 allergène moléculaire

#### De multiples résultats :

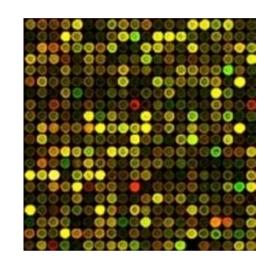
- 112 allergènes moléculaires (r ou n) couvrant 51 sources allergéniques sur 30μL de serum

#### 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 (30µL) 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 l

1/ Tests sériques (nouveaux outils = allergènes moléculaires)

2/ Tests cellulaires: Test d'Activation des Basophiles

## Limites du dosage des IgE spécifiques

- 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)
- 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)

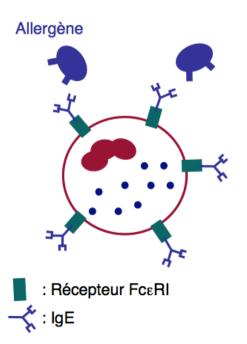
= Test d'Activation des Basophiles

#### 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



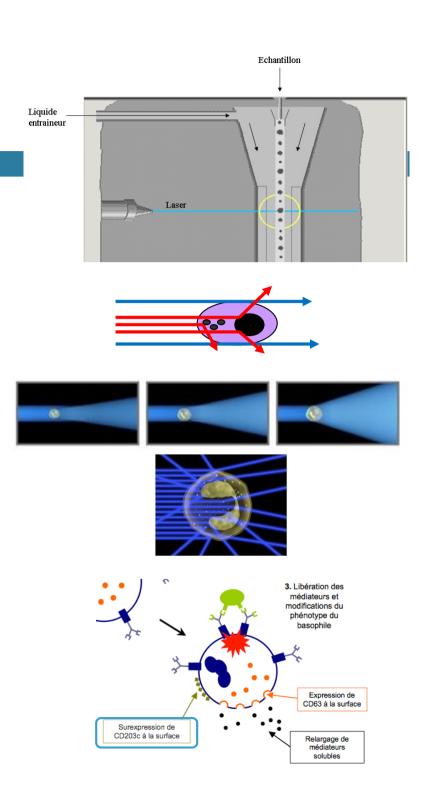
## Avec quel outil ? Cytométrie en Flux

➤ 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:

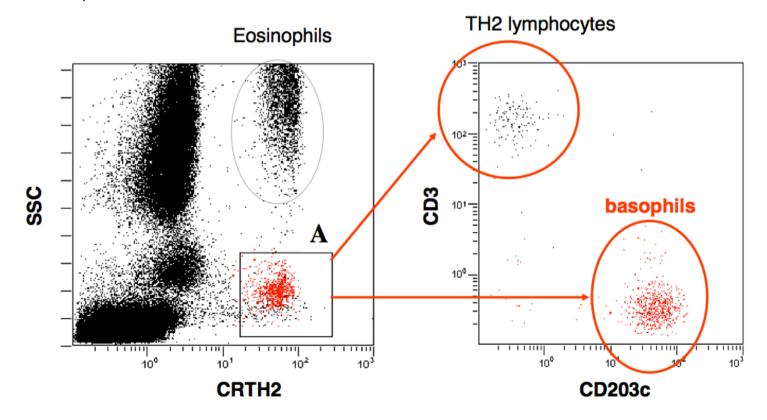
- Au moins 3 dilutions en se basant sur le Prick Test
- Vérifier l'absence de toxicité pour les basophiles
- Vérifier l'absence d'activation non spécifique

#### ✓ 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)

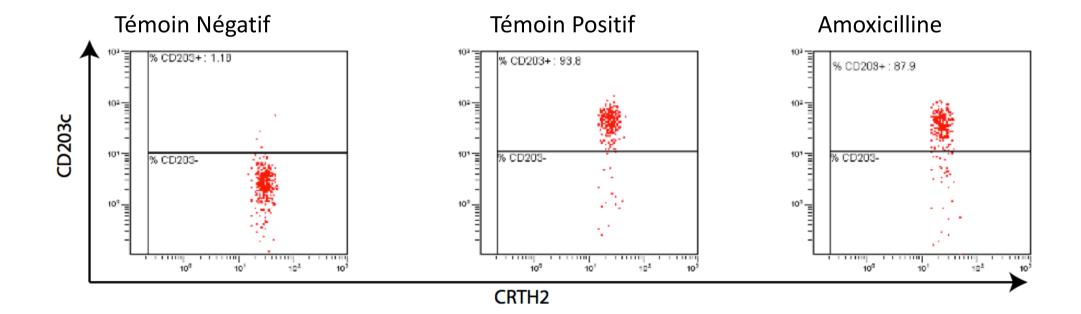
- Pas de consensus sur l'identification des basophiles
- Marquages les plus utilisés :
  - **□** CD3-, CRTH2+
  - □ CCR3+, Faible SSC



## 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 <b>faible</b>	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)

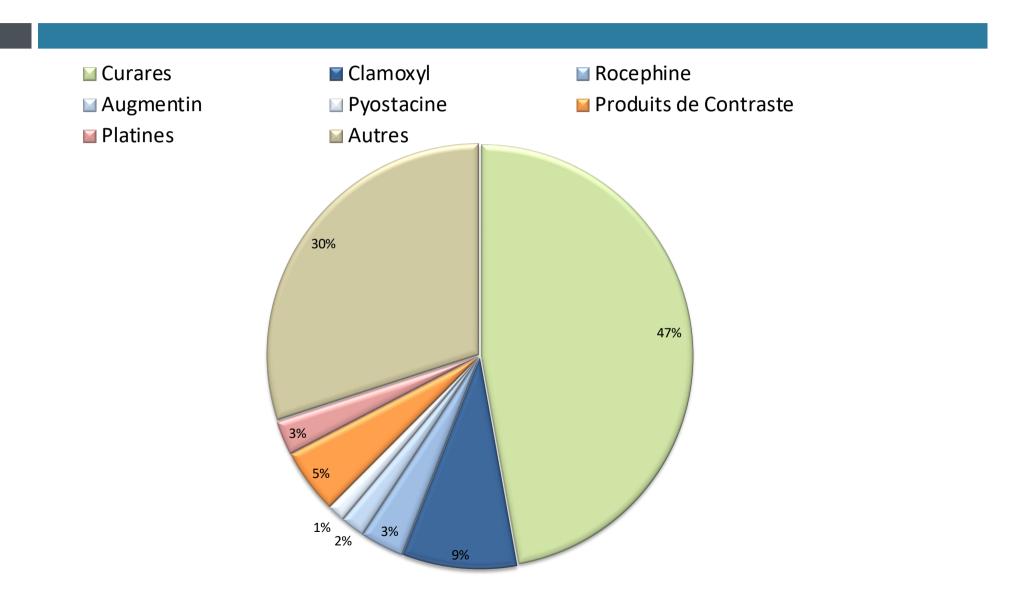
### Exemple d'activation en présence d'Amoxicilline



# 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)



#### b-lactamines:

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

Ebo DG et al., Expert Review, 2011

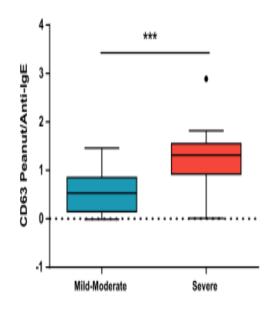
## **Curares:**

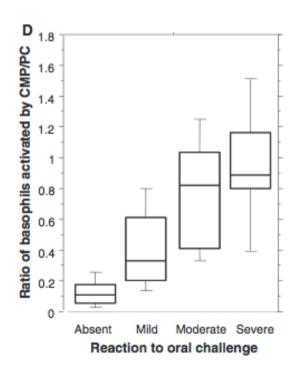
Study (year)	Stimulus	Reference test	Activation marker	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Patients and control individuals (n)
Abuaf et al. (1999)	NMBA	Н	CD63 CD45	64 43	81 96	28
Monneret et al. (2002)	NMBA	H ± ST	CD63	54	100	56
Sudheer et al. (2005)	NMBA	Н	CD63 CD203c	79 36	100 100	31
Kvedariene et al. (2006)	NMBA	H + ST	CD63	36-86 <sup>†</sup>	93	92
Ebo et al. (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

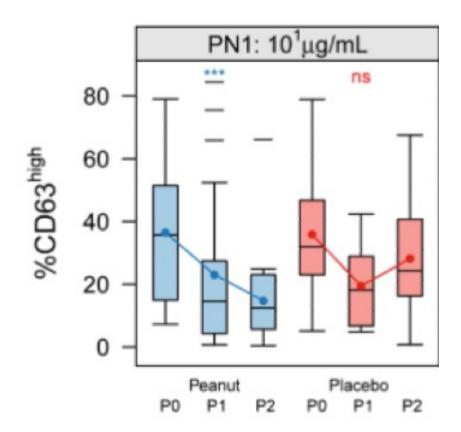
- Evaluer la pertinence clinique d'une sensibilisation :
  - Ex IgE *Aspergillus fumigatus* chez les patients muco/asthmatiques : ABPA?
- Marqueur de « gravité » de l'allergie :





#### 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 <sub>H</sub> 2	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	Complement Phagocytes	Activation des macrophages	Cytotoxicité
		Complément	<b>₹</b>	Complexe immun  Complément	T <sub>H</sub> 1	UTC ₽
			Agoniste antagoniste		Cytotoxines	
Exemple de réaction d'hypersen- sibilité	Rhinite allergique, asthme, anaphylaxie systémique	Certaines allergies médicamenteuses (ex: pénicilline), réaction transfusion- nelle, anémie hémo- lytique auto-immune	Maladie de Graves (agoniste) Myasthénie (antagoniste)	Maladie sérique, Lupus érythéma- teux disséminé	Dermite de contact, Rejet de greffe, Arthrite rhumatoïde	Dermite de contact Rejet de greffe, Diabète sucré

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

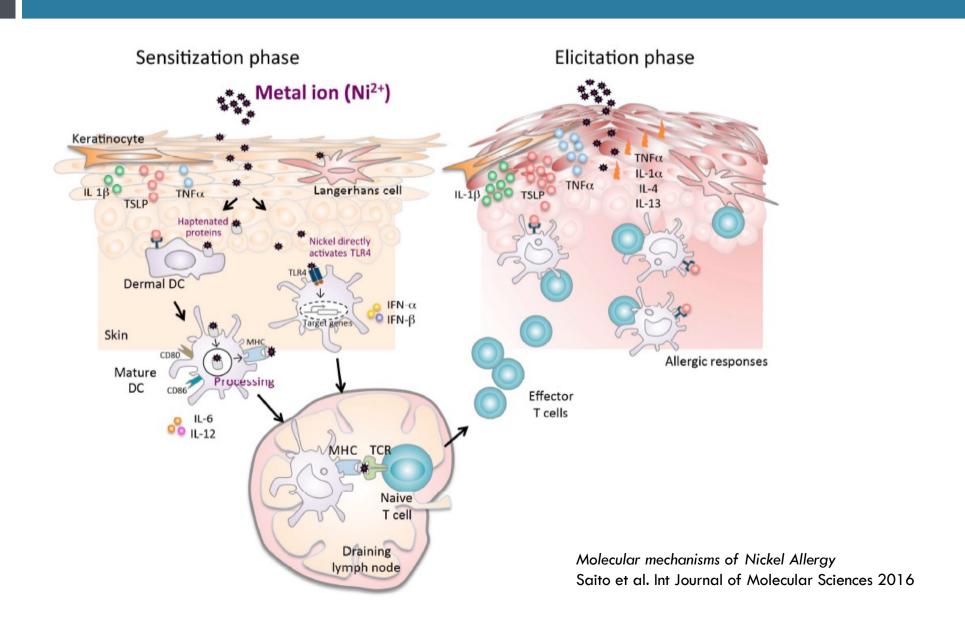
#### Hypersensibilité de type IV : Les antigènes

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

#### Haptènes:

- Substances responsables d'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

Défense anti-infectieuse

2. Eczéma de contact

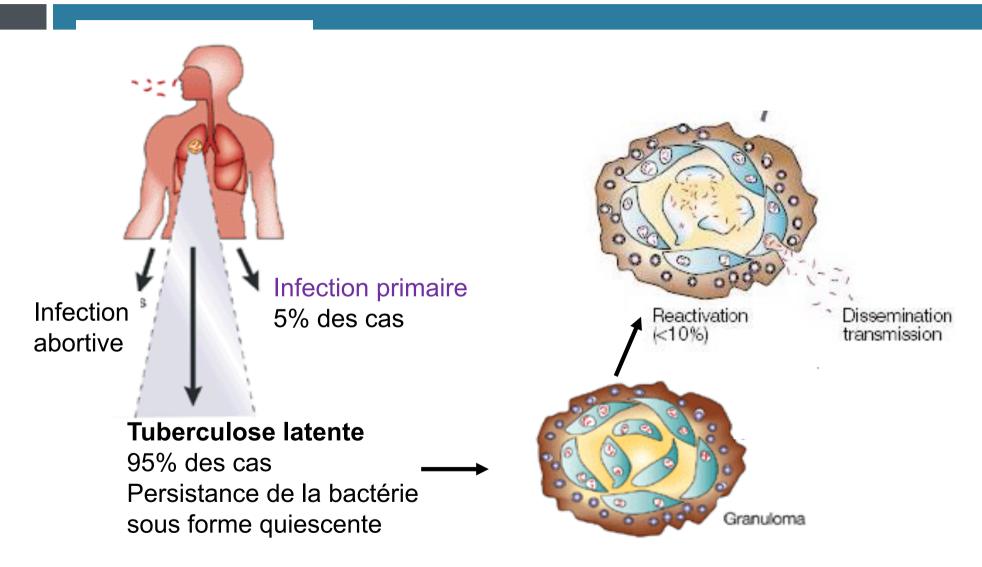
3. Hypersensibilité médicamenteuse retardée

Infections bactériennes, parasitaires, mycosiques et virales :

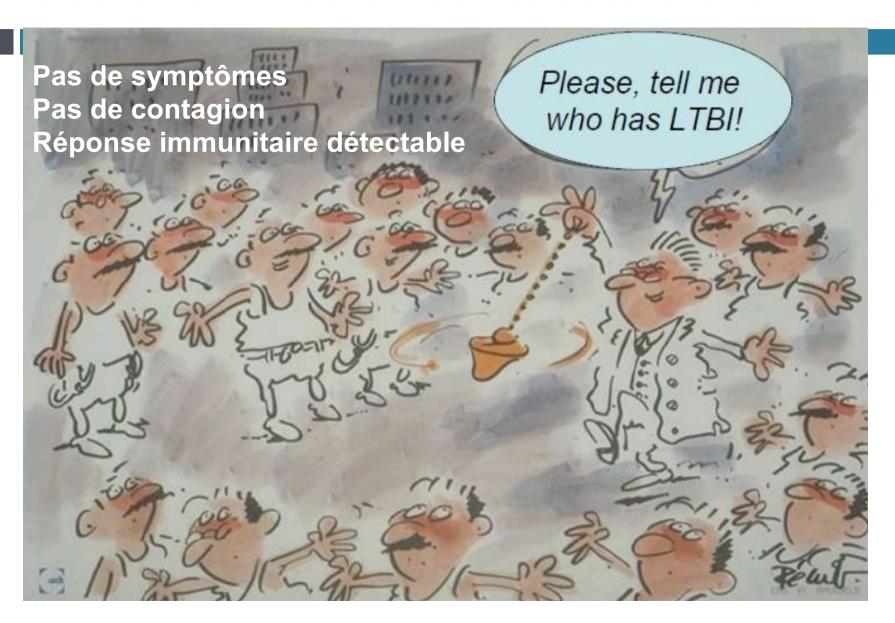
- · Mycobacterium tuberculosis, leprae
- · Brucella
- · Toxoplasma gondii
- · Leishmania major
- · Candida albicans
- · CMV, herpes

Exemple : exploration de l'immunité anti-tuberculeuse

## Contamination par Mycobacterium tuberculosis

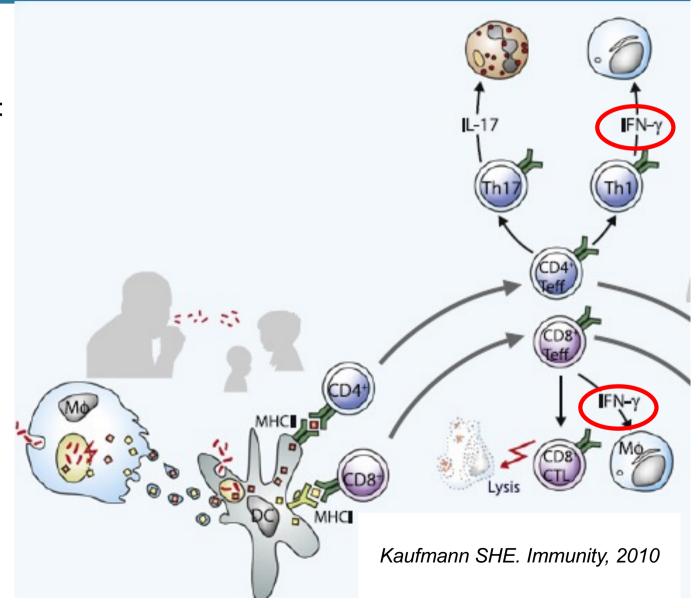


#### Détection de l'infection tuberculeuse latente

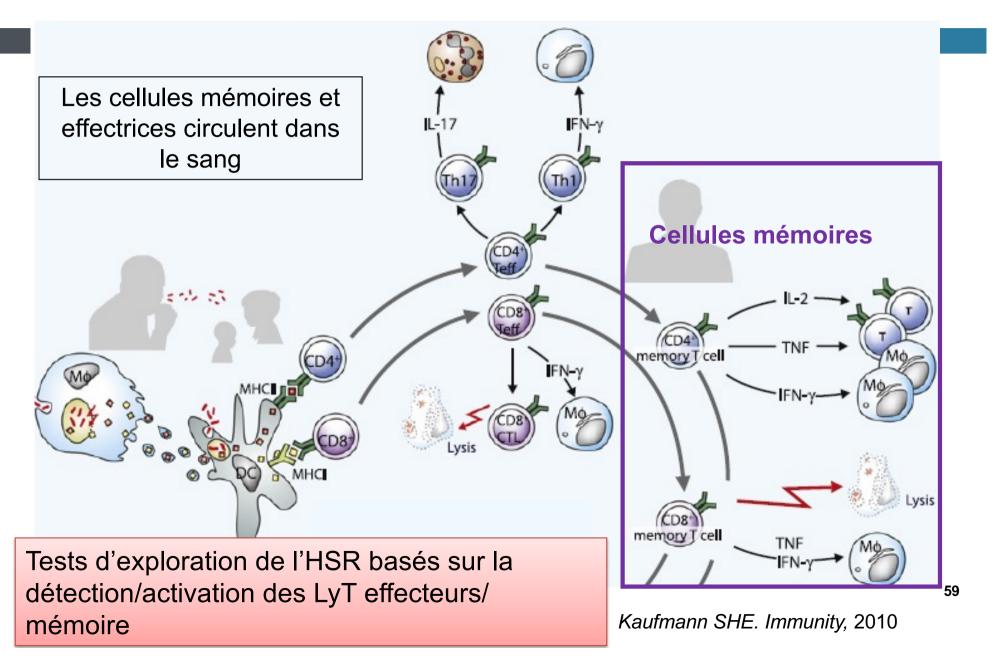


## Immunité anti-tuberculeuse : Réponse immunitaire adaptative

- Immunité antituberculeuse 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

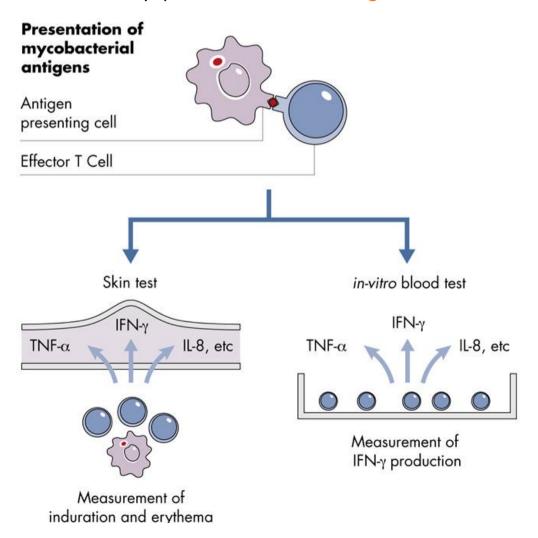


#### Immunité anti-tuberculeuse : Mémoire immunitaire



## 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)

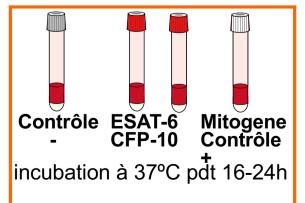


#### QuantiFERON®-TB GOLD PLUS

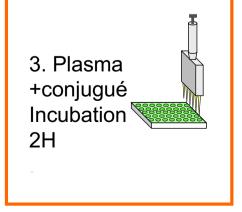


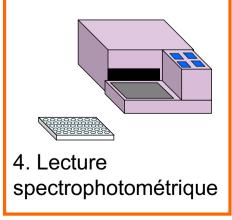
- Test ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)
- Incubation du sang total périphérique (anticoagulant héparine) avec les protéines mycobactériennes
- Dosage de l'IFN-γ plasmatique par technique ELISA (UI/mL)
- □ B 150
- □ Sensibilité : 80-90%











## Test IGRA: QuantiFERON: Interprétation

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

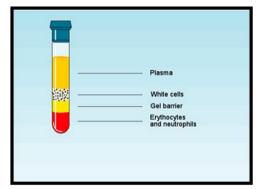
- Variabilités inter et intra individuelles importantes : pas d'interprétation quantitative des résultats
- > **Zone grise:** 0,35 0,6 UI/mL-> résultat à contrôler

#### Tests IGRA T-SPOT®TB: Technique ELISPOT

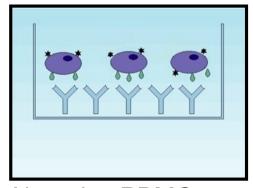
A partir de Cellules mononucléées

Antigènes spécifiques (testés séparément):

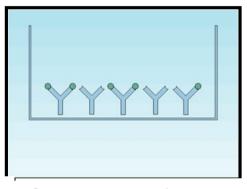
Antigènes spécifiques (testés séparément) : ESAT, CFP-10



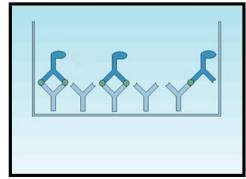
PBMC après extraction Ficoll ou tubes BD CPT



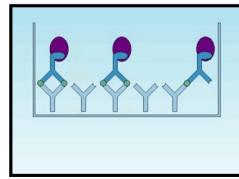
Ajout des PBMC et Ags TB. Les Ly T spé sécrètent l'IFN-g.



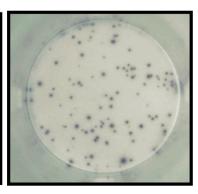
Capture de l'IFN-g par les anticorps. Incubation.



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-x

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

65

- □ 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-**?**

## 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

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-TNFα

#### 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)

#### Test de Transformation Lymphocytaire (référence)



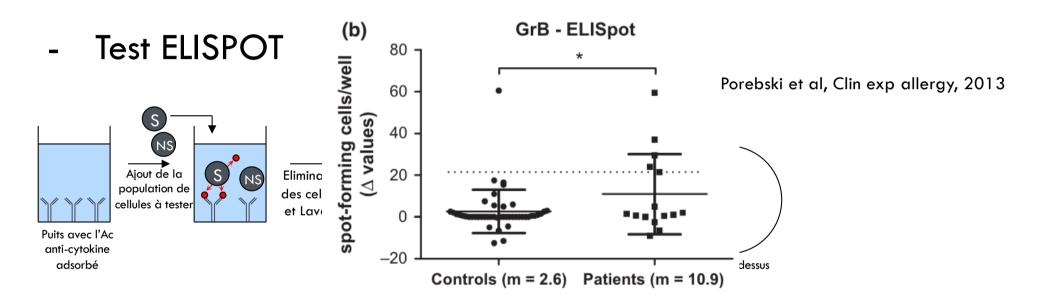
Incubation 6j, 37°C

Mesure de la prolifération lymphocytaire :

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

#### - Limites:

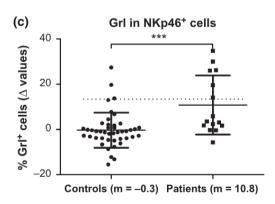
- Liées à l'utilisation de la radioactivité
- Sensibilité faible (60%)
- Techniques longues (6-7j)



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

#### - 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)
  - intractyoplasmiques (Granulysine, granzyme B)
  - cytokines (IFN-γ, IL-4, IL-5)



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