



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

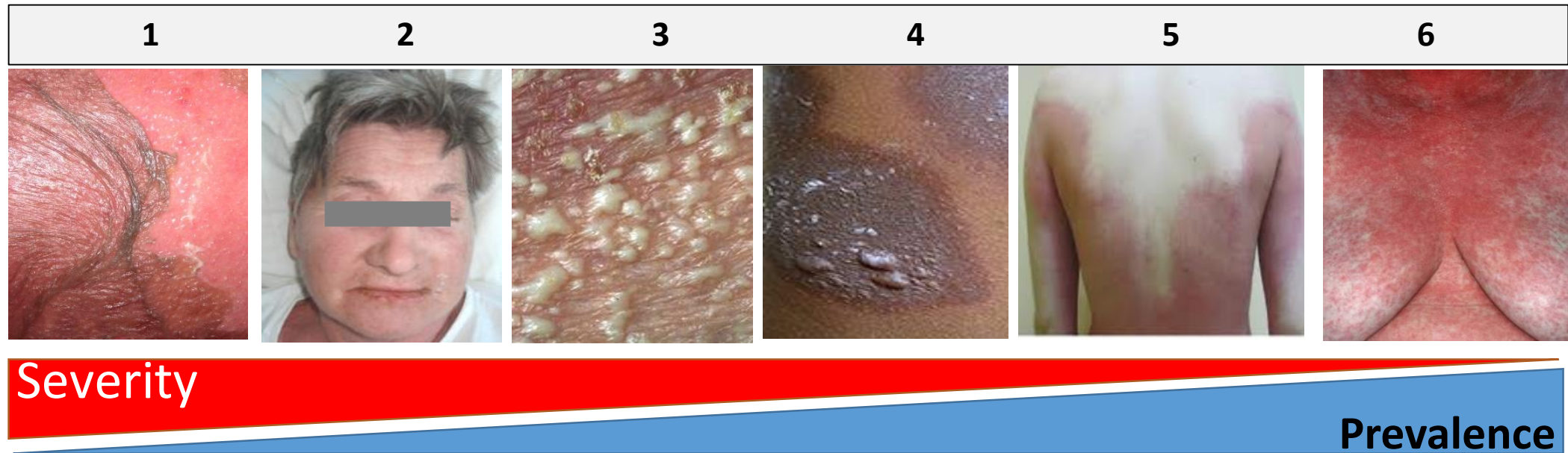
marine-alexia.lefevre@inserm.fr



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 le patient, 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.
- L'analyse moléculaire = aide à la caractérisation de l'inflammation cutanée (discriminer patch test vrai et faux positif)
- 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 aiguë généralisée

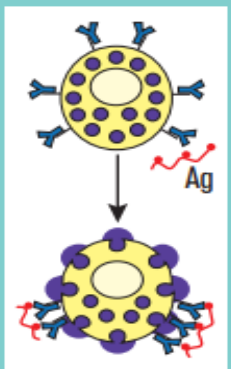
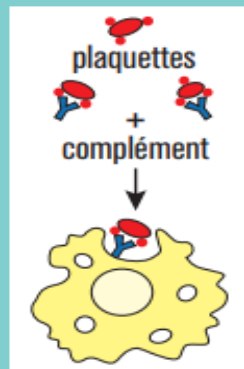
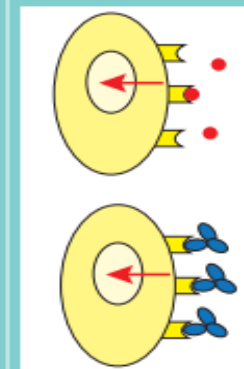
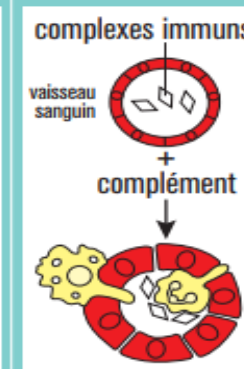
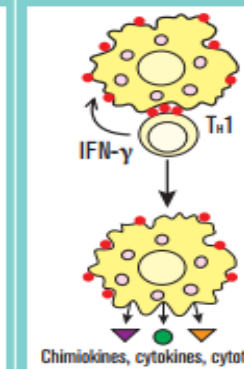
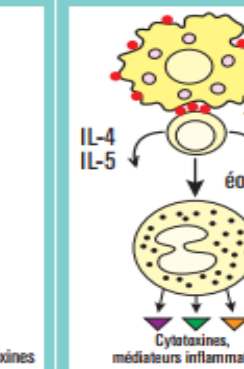
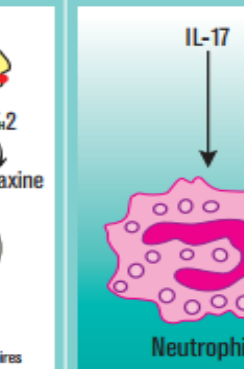
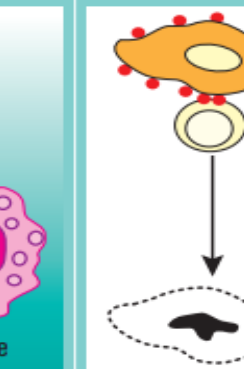
4 – EPF: érythème pigmenté fixe

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 altérant la signalisation	Complément, phagocytes	Macrophages	Éosinophiles	Neutrophiles	Cytotoxicité
							

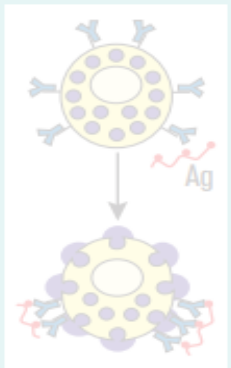

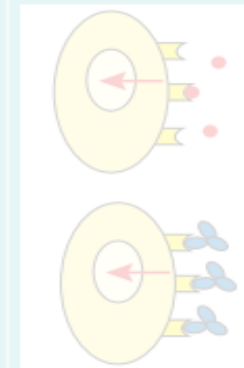

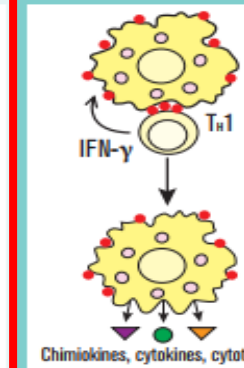
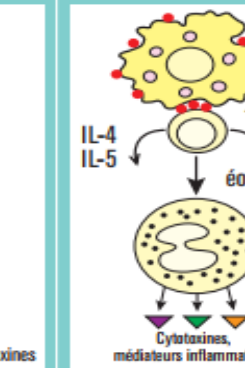
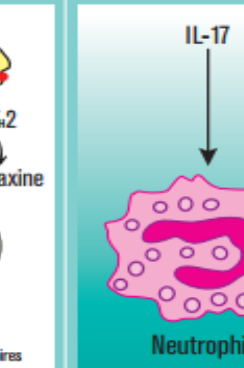
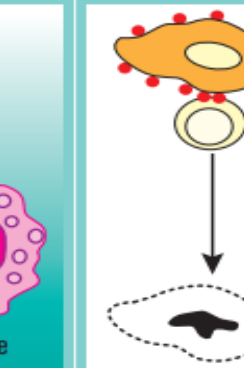
EXEMPLES DE MALADIES

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
------------------------------	---	------------------------	-------------------------------------	---	--	--	--

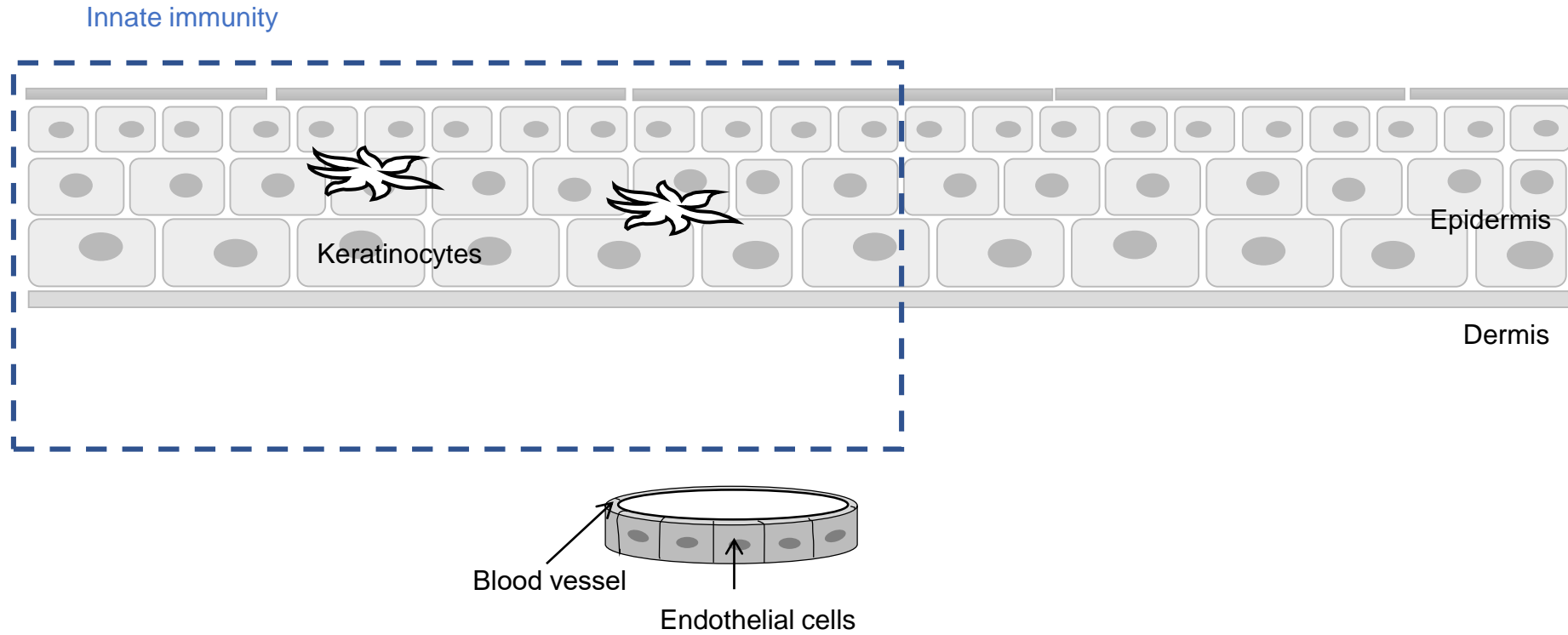
ALLERGIES AUX MÉDICAMENTS

Choc anaphylactique	Cytopénie médicamenteuse		Vascularite immuno-allergique, pseudo-maladie sérique	Exanthème, DRESS	DRESS	Pustulose exanthématique	Nécrolyse épidermique, Syndrome de Lyell/syndrome de Stevens-Johnson
---------------------	--------------------------	--	---	------------------	-------	--------------------------	--

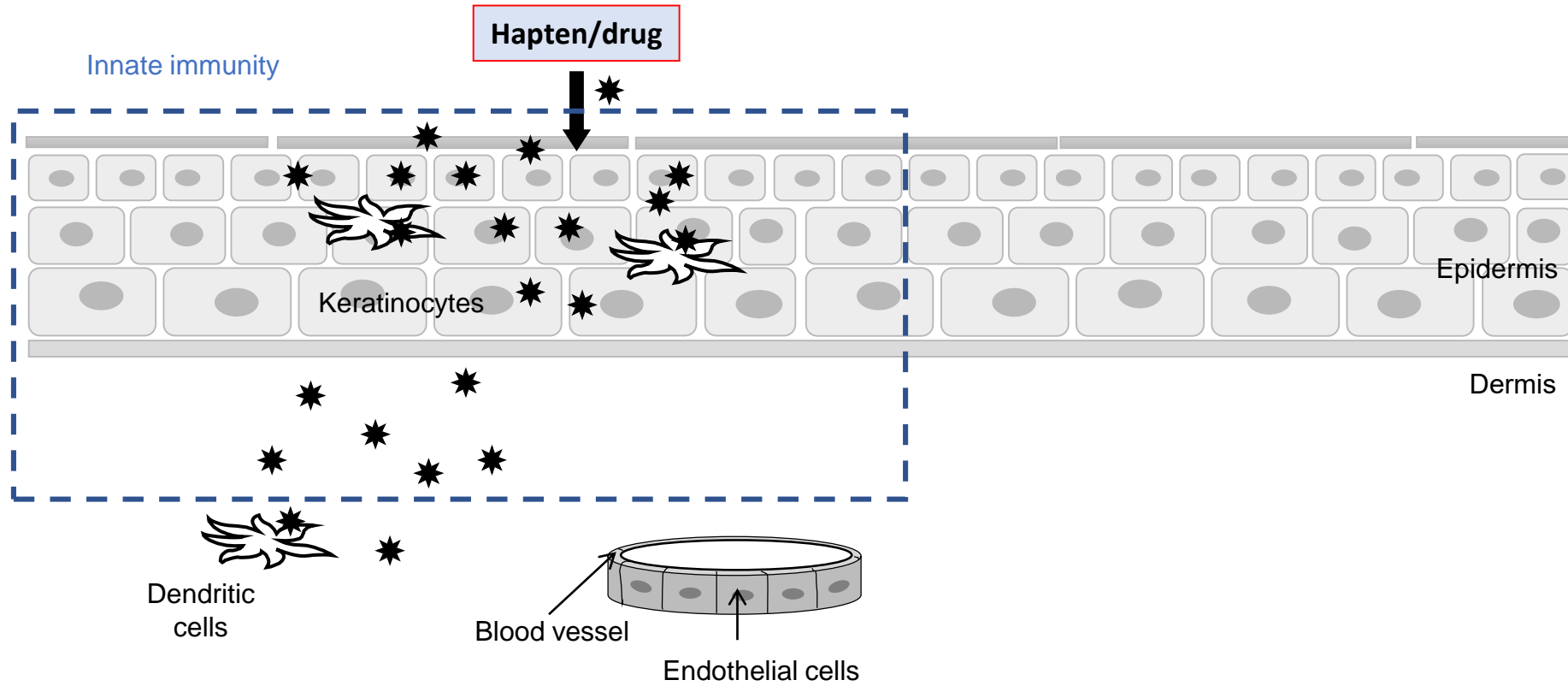
Physiopathologie

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 altérant 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

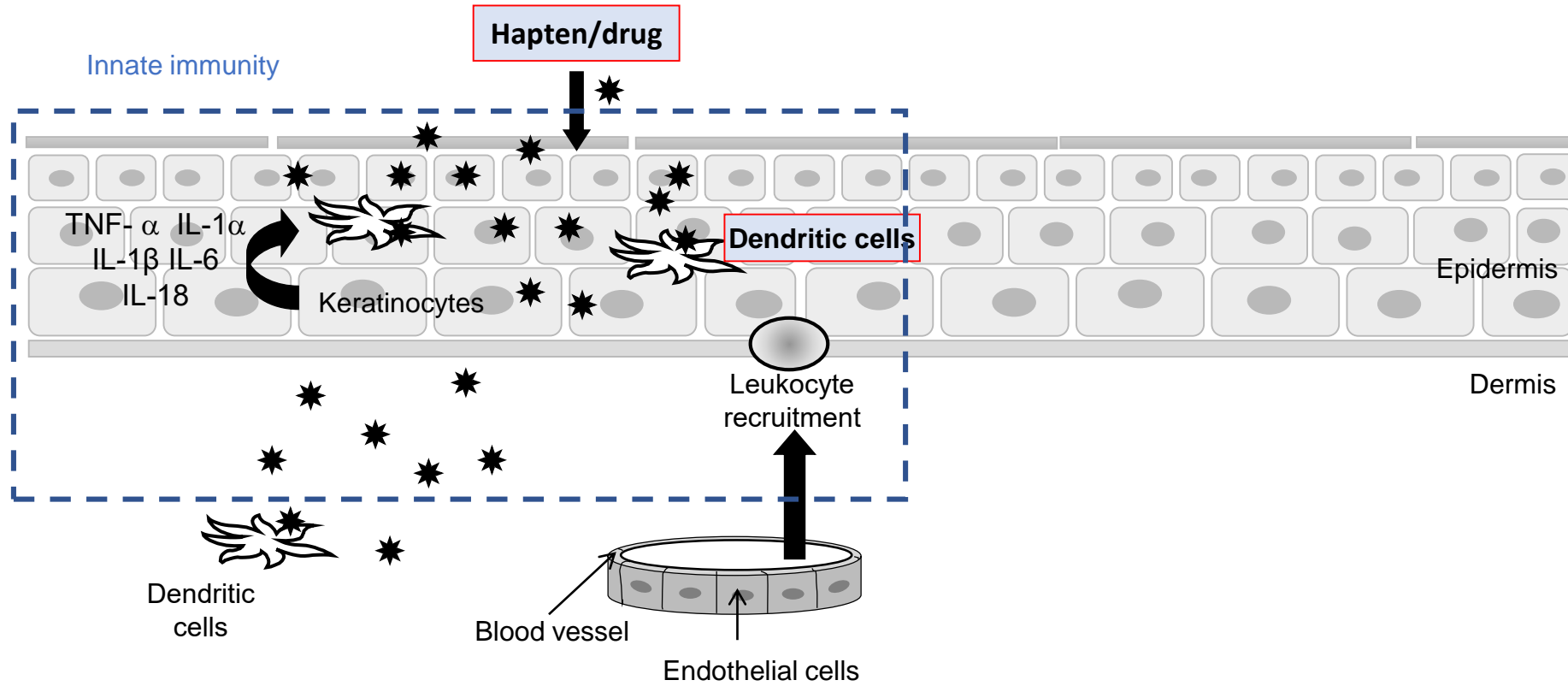
Physiopathologie



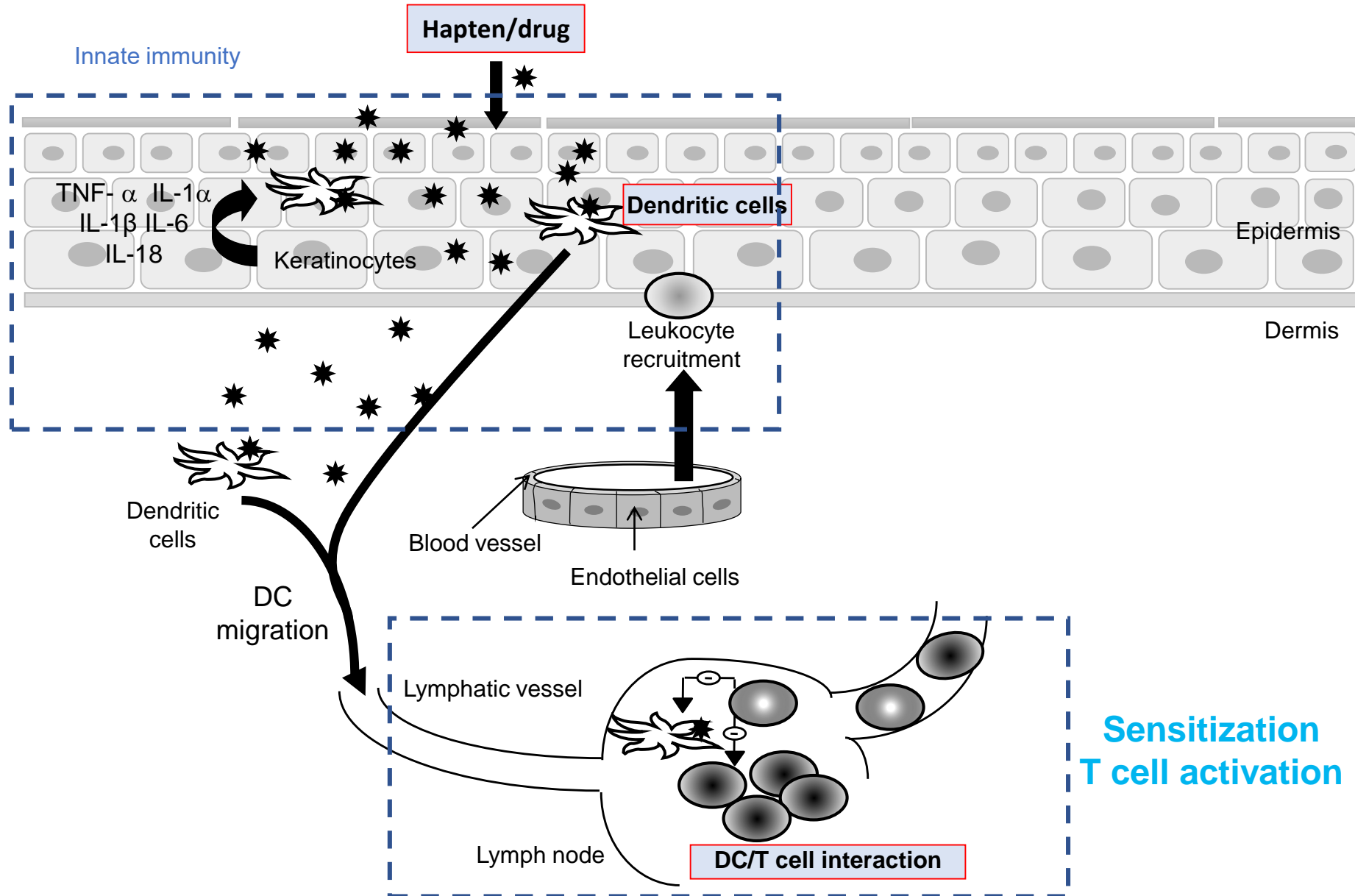
Physiopathologie



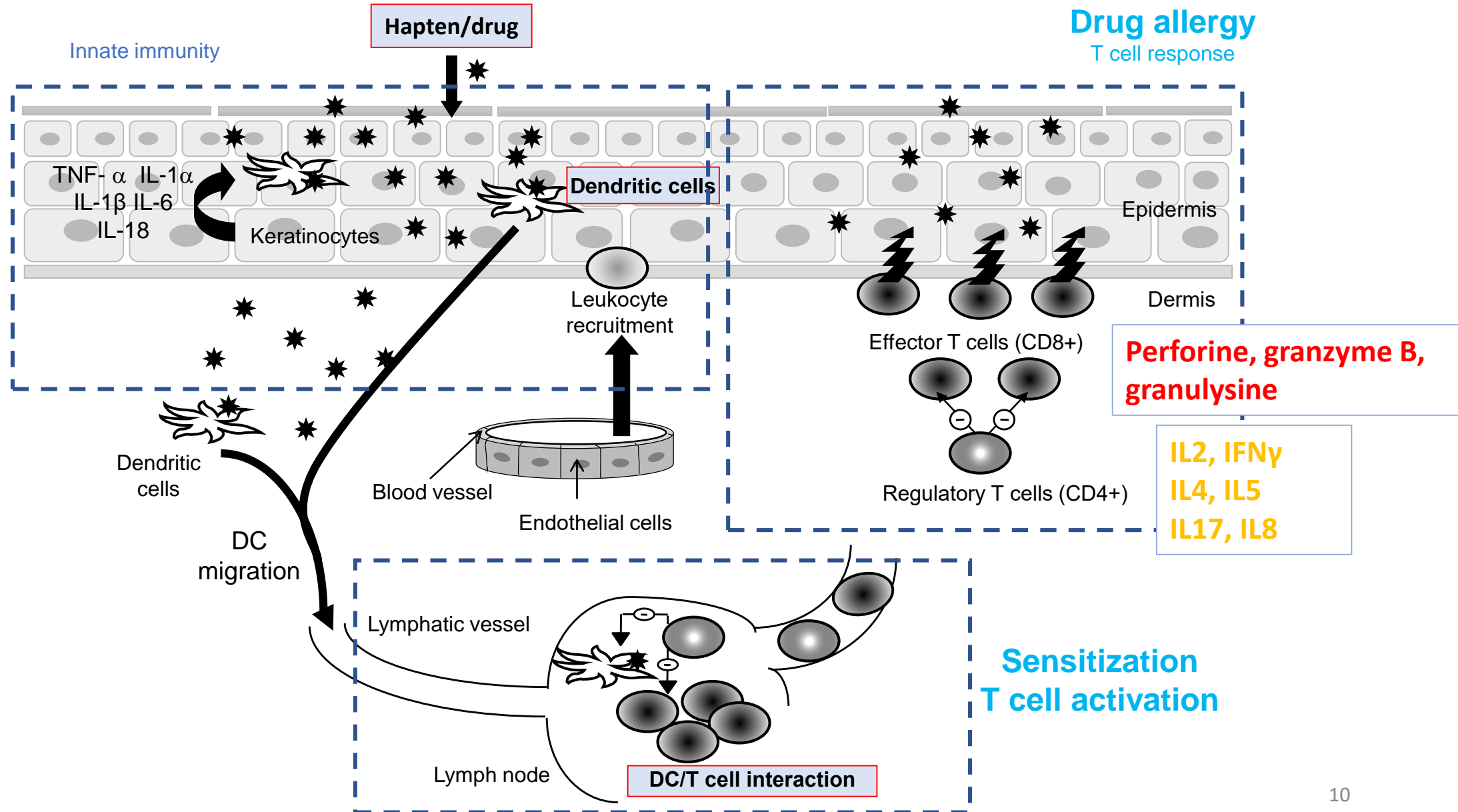
Physiopathologie



Physiopathologie



Physiopathologie



Physiopathologie

- IVa: Lymphocytes Th1, IFN γ , 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

ALLERGIQUES (ET AUTO-IMMUNES) LL & COOMBS			
TYPE IV			
CD4 Th1	CD4 Th2	CD4 Th17	CD8 cytotoxique
Ag solubles	Ag solubles		Ag cellulaires
Macrophages	Éosinophiles	Neutrophiles	Cytotoxicité
<p>IFN-γ T_H1 Chimiokines, cytokines, cytotoxines</p>	<p>IL-4 IL-5 T_H2 éotaxine Cytotoxines, médiateurs inflammatoires</p>	<p>IL-17 Neutrophile</p>	<p>CTL</p>
DE MALADIES			
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
DX MÉDICAMENTS			
Exanthème, DRESS	DRESS	Pustulose exanthématique	Nécrolyse épidermique, Syndrome de Lyell/syndrome de Stevens-Johnson

Physiopathologie

- IVa: **Lymphocytes Th1, IFN γ** , 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**

ALLERGIQUES (ET AUTO-IMMUNES) LL & COOMBS			
TYPE IV			
CD4 Th1	CD4 Th2	CD4 Th17	CD8 cytotoxique
Ag solubles	Ag solubles		Ag cellulaires
Macrophages	Éosinophiles	Neutrophiles	Cytotoxicité
<p>IFN-γ T_{H1} Chimiokines, cytokines, cytotoxines</p>	<p>IL-4 IL-5 T_{H2} éotaxine Cytotoxines, médiateurs inflammatoires</p>	<p>IL-17 Neutrophile</p>	<p>CTL</p>
DE MALADIES			
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
JX MÉDICAMENTS			
Exanthème, DRESS	DRESS	Pustulose exanthématique	Nécrolyse épidermique, Syndrome de Lyell/syndrome de Stevens-Johnson

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 :

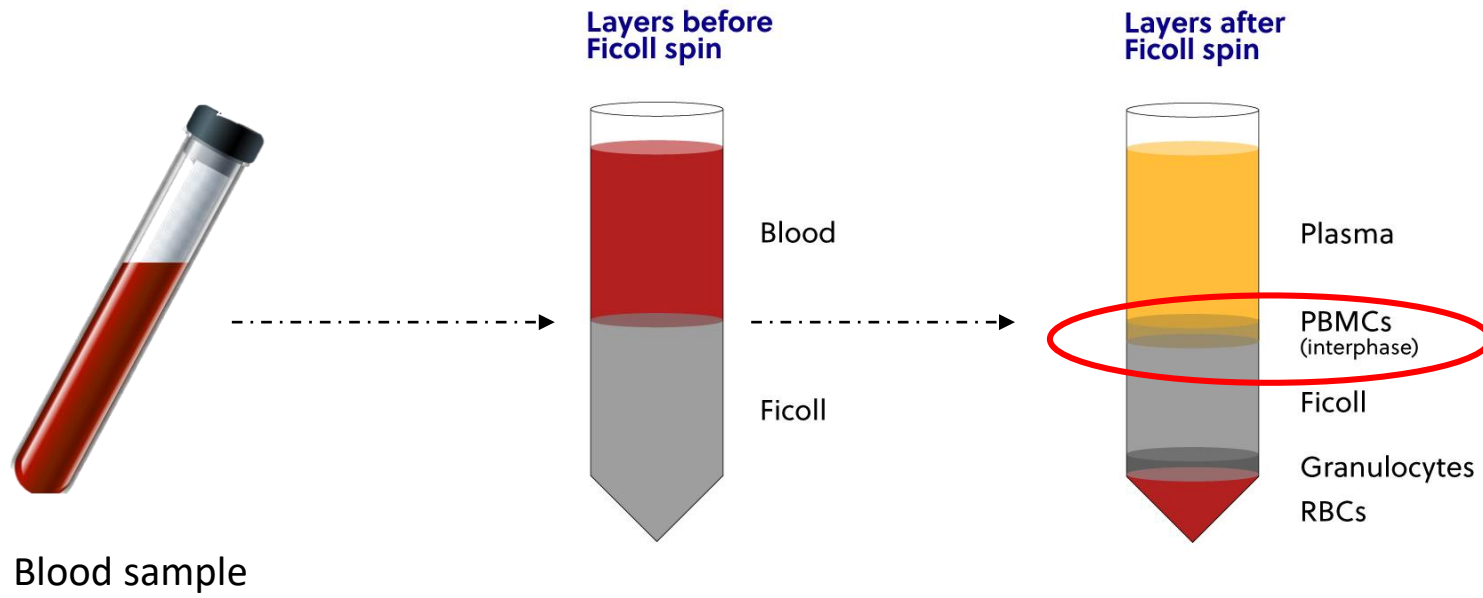
- Liées à l'utilisation de la radioactivité
- Sensibilité variable
- Techniques longues (6-7j)

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

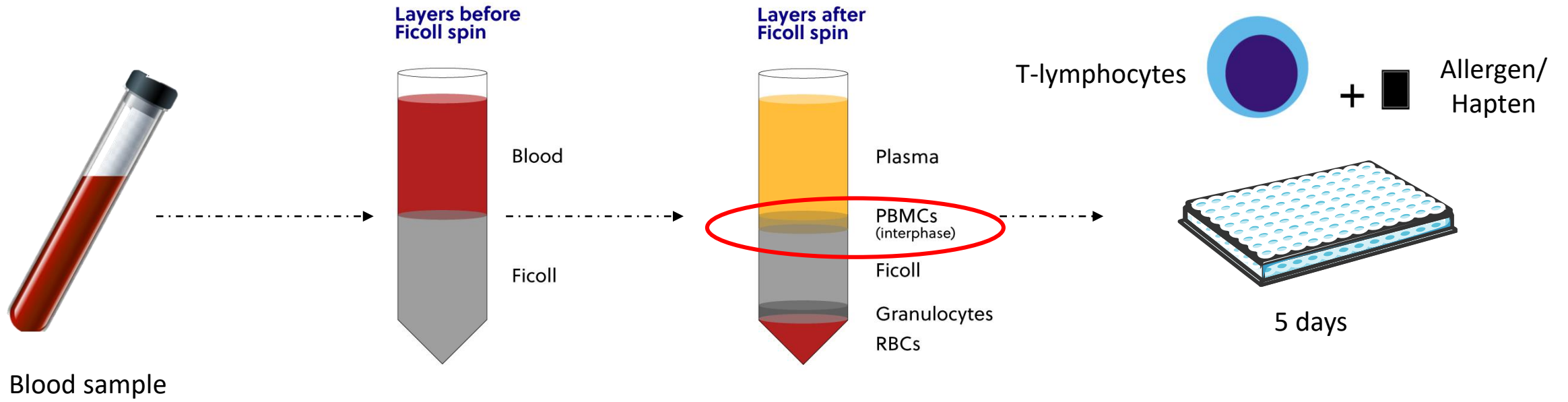


Blood sample

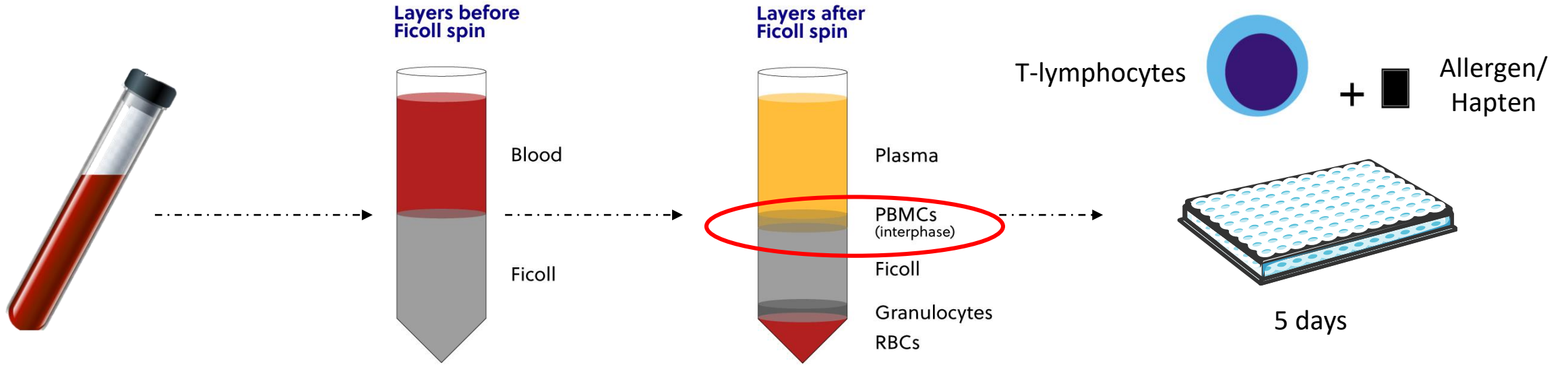
Le test de transformation lymphocytaire (TTL)



Le test de transformation lymphocytaire (TTL)



Le test de transformation lymphocytaire (TTL)



Blood sample

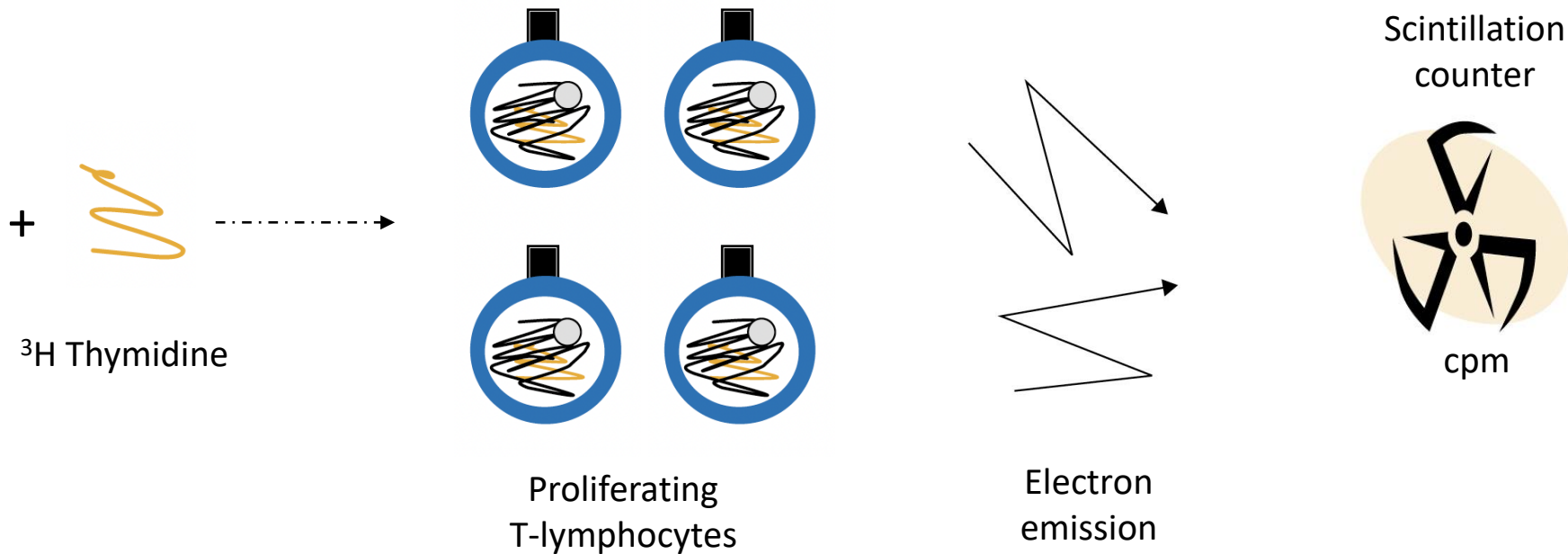
Layers before
Ficoll spin

Layers after
Ficoll spin

T-lymphocytes

Allergen/
Hapten

5 days



+

³H Thymidine

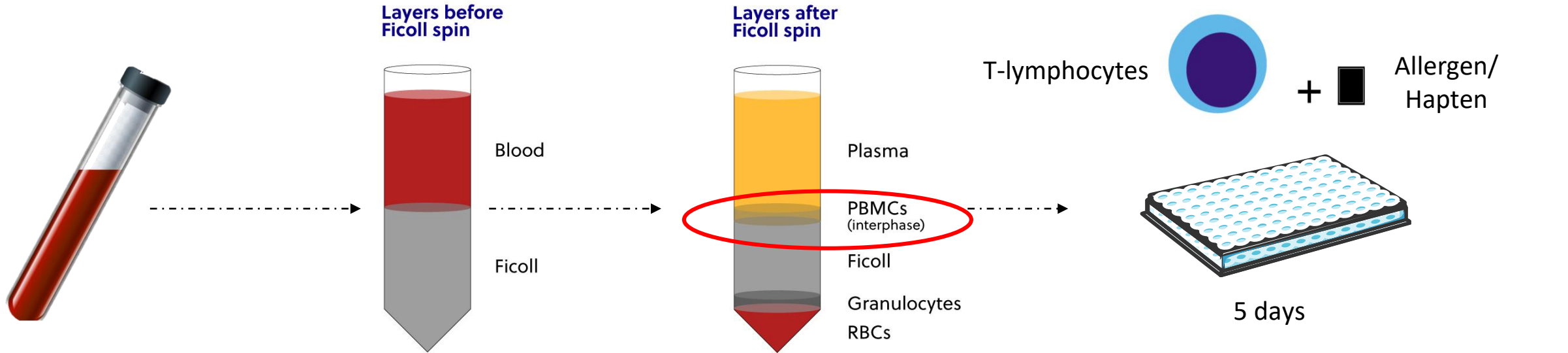
Proliferating
T-lymphocytes

Electron
emission

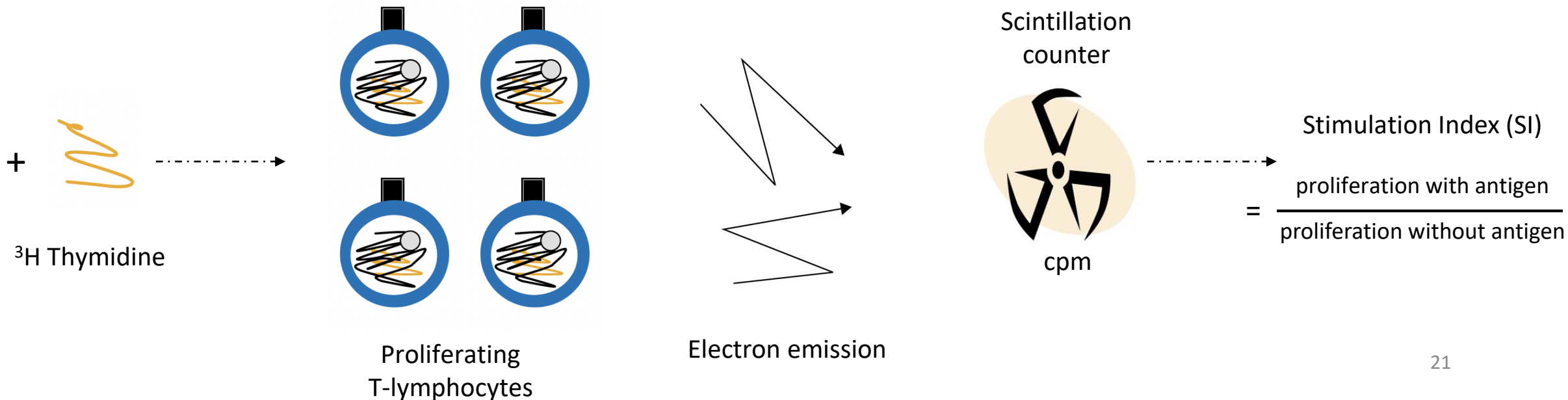
Scintillation
counter

cpm

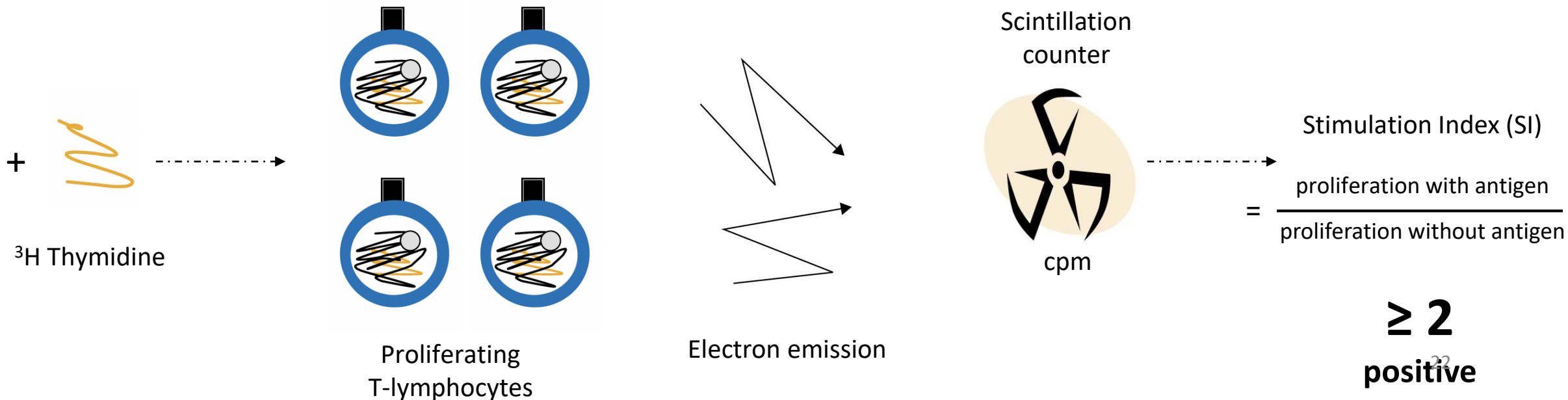
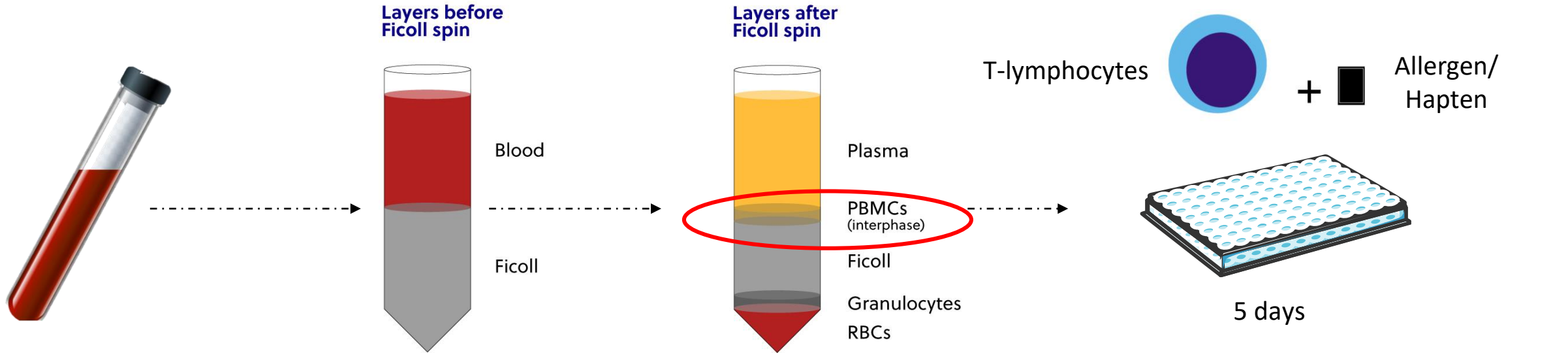
Le test de transformation lymphocytaire (TTL)



Blood sample

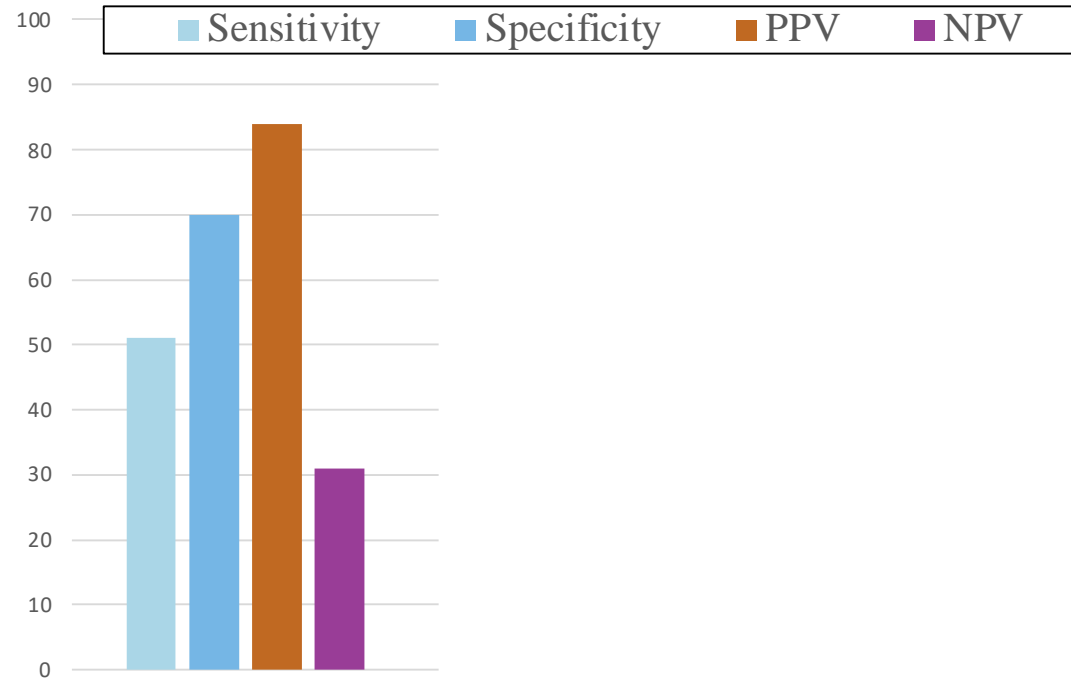


Le test de transformation lymphocytaire (TTL)



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 +
Sensitivity (%)	52
Specificity (%)	70
PPV (%)	84
NPV (%)	32

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 (except BL)	23	44	57	73	57

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

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 (except BL)	23	44	57	73	57

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

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

Outils diagnostic fiable dans les DRESS et les réactions aux bêtalactamines

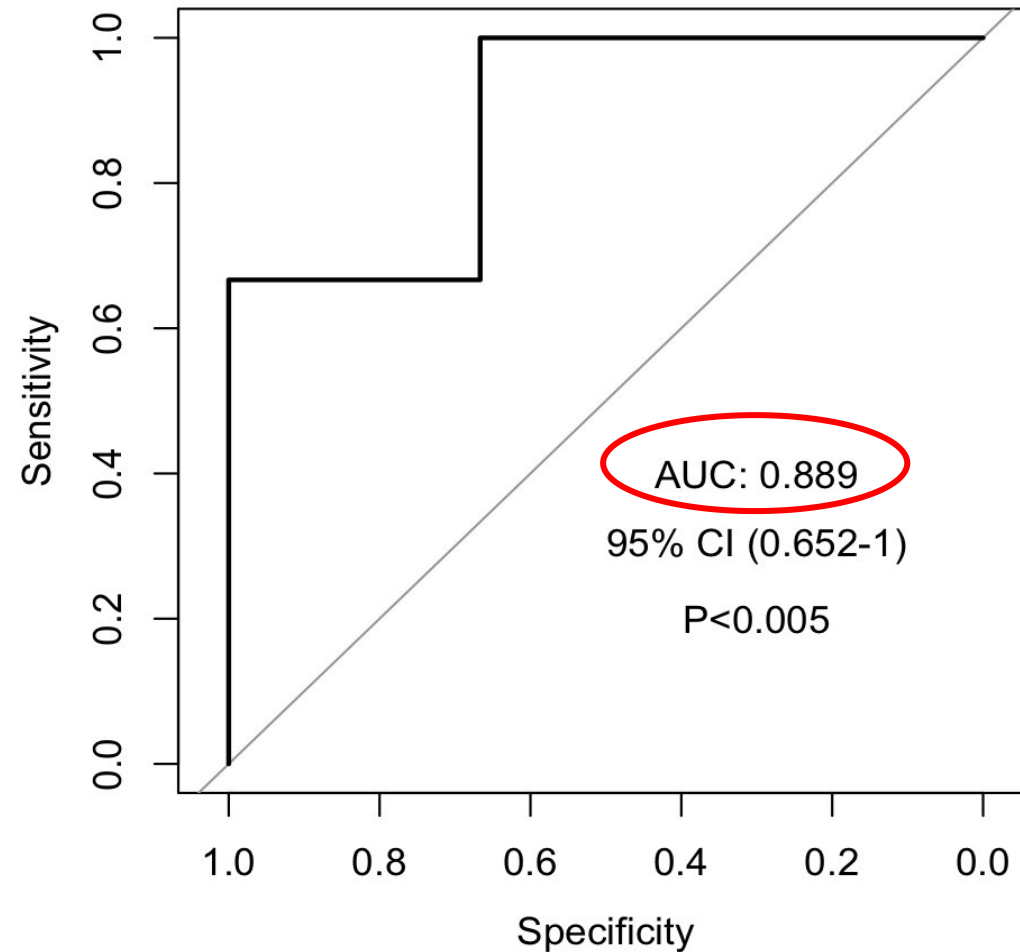
	N	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Reaction Type					
DRESS	20	60	80	90	40
MPE	15	50	60	71	37
Molecule					
Beta lactams	15	67	100	100	43
Other molecules (except BL)	23	44	57	73	57

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

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.



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.

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

	<i>In vivo</i> drug challenge		Sum
	Bad tolerance	Good tolerance	
LTT positive	1	0	1
LTT Negative	1	17	18
Sum	2	17	19

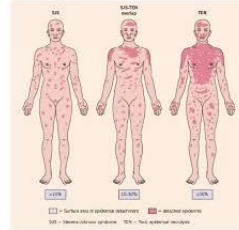
Sensitivity: 50%
Specificity 100%
PPV= 100%
NPV= 94%

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

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 bêtalactames, anti-épileptiques, allopurinol, Bactrim (sulfaméthoxazole)

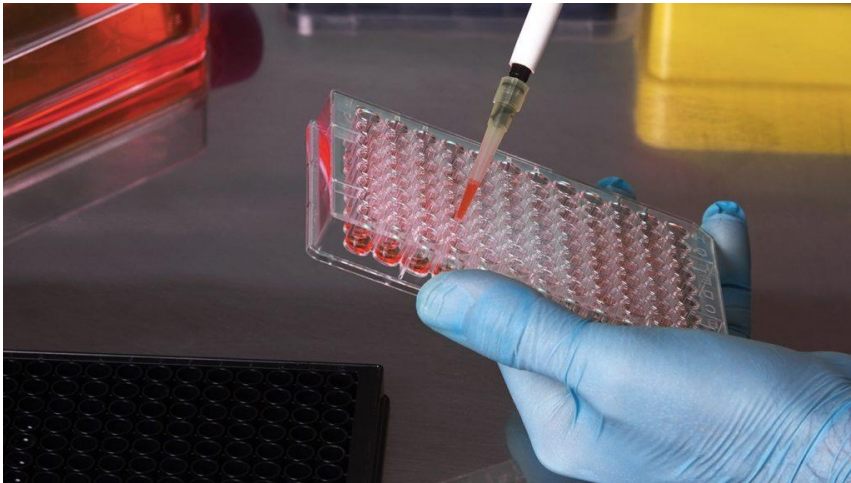


Timing de réalisation

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

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 : **IFN γ** , IL-5, **Granzyme B**, Perforine

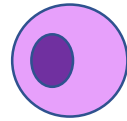
Limites :

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

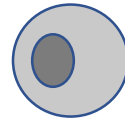
ELISpot (enzyme-linked immunospot)



Anticoprs de capture anti-IFNg



Cellule stimulée



Cellule non stimulée



Cytokine (IFNg)

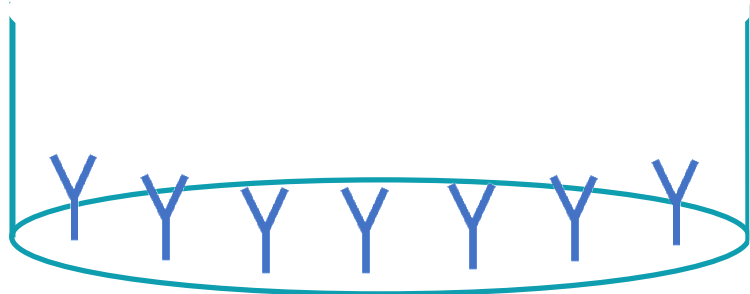


Anticoprs de détection anti-IFNg + enzyme

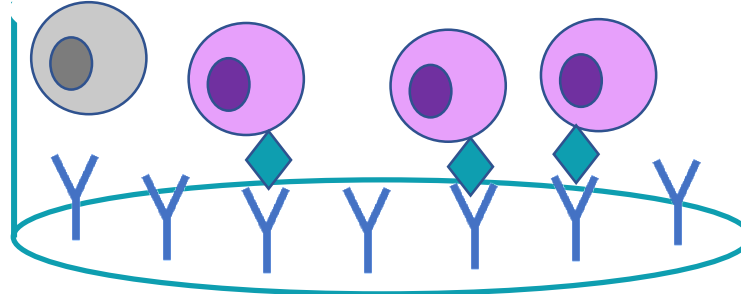


Substrat: spot coloré

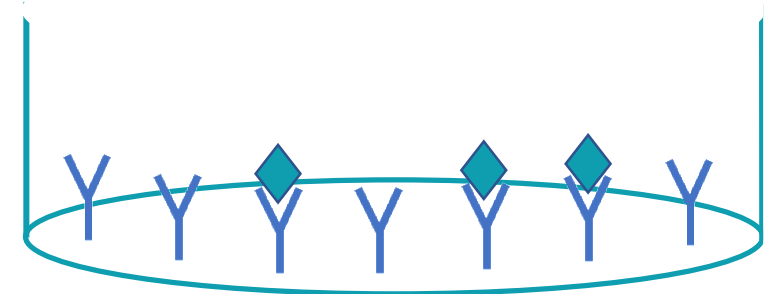
1



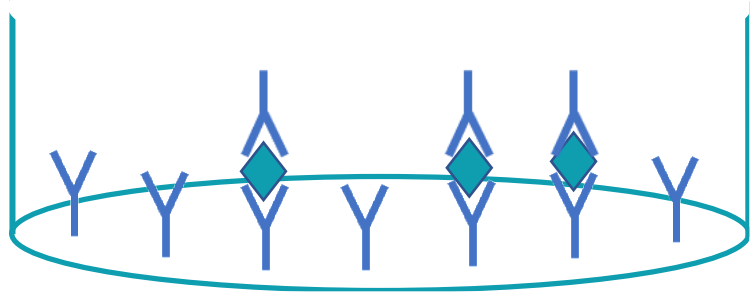
2



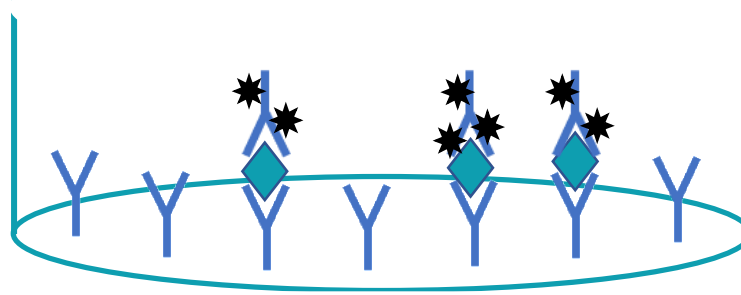
3



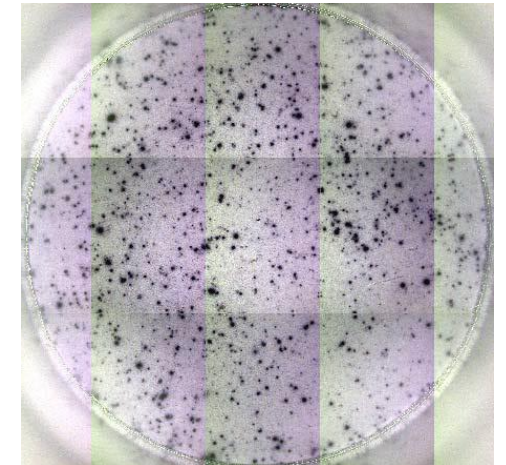
4



5

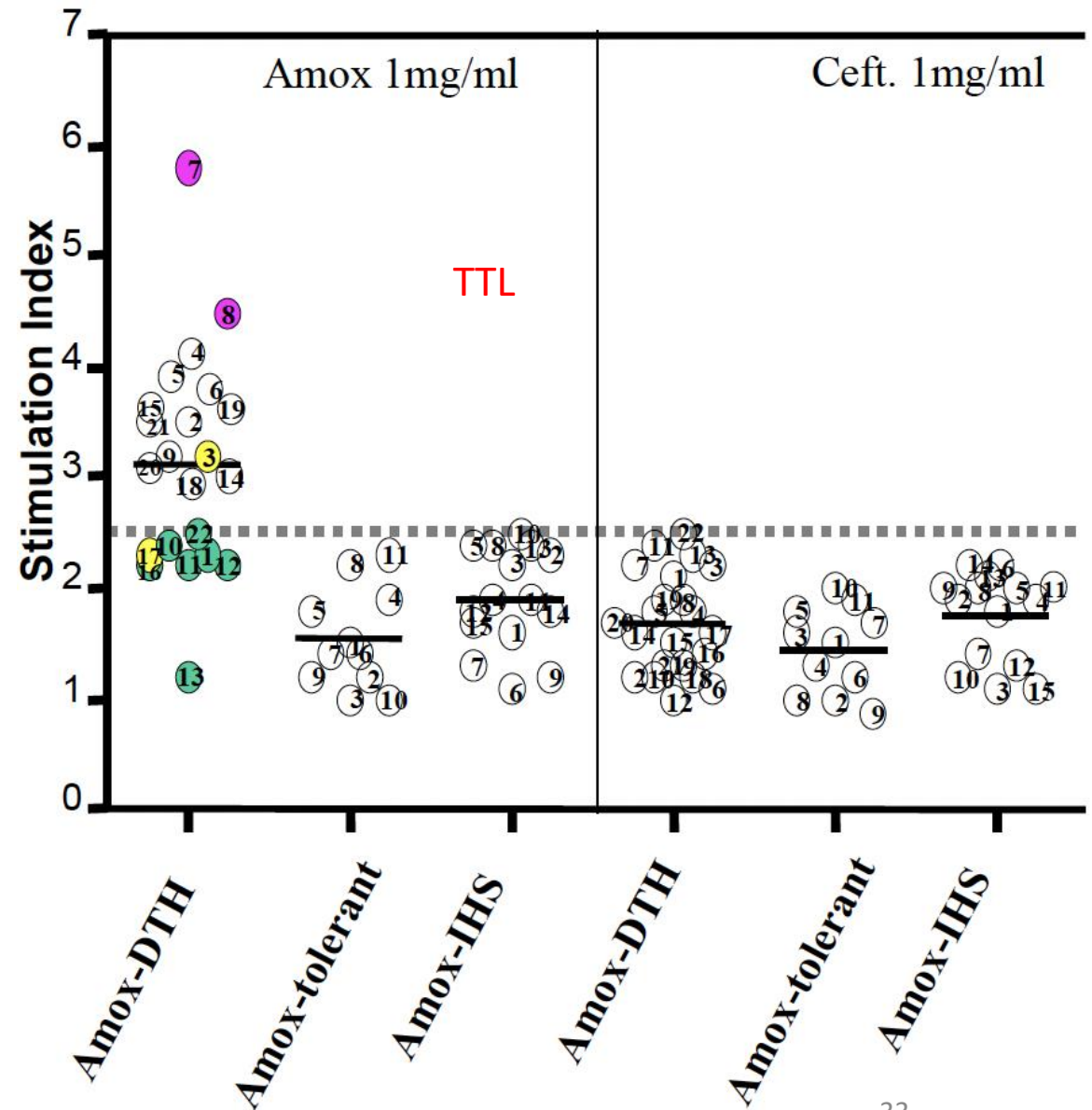
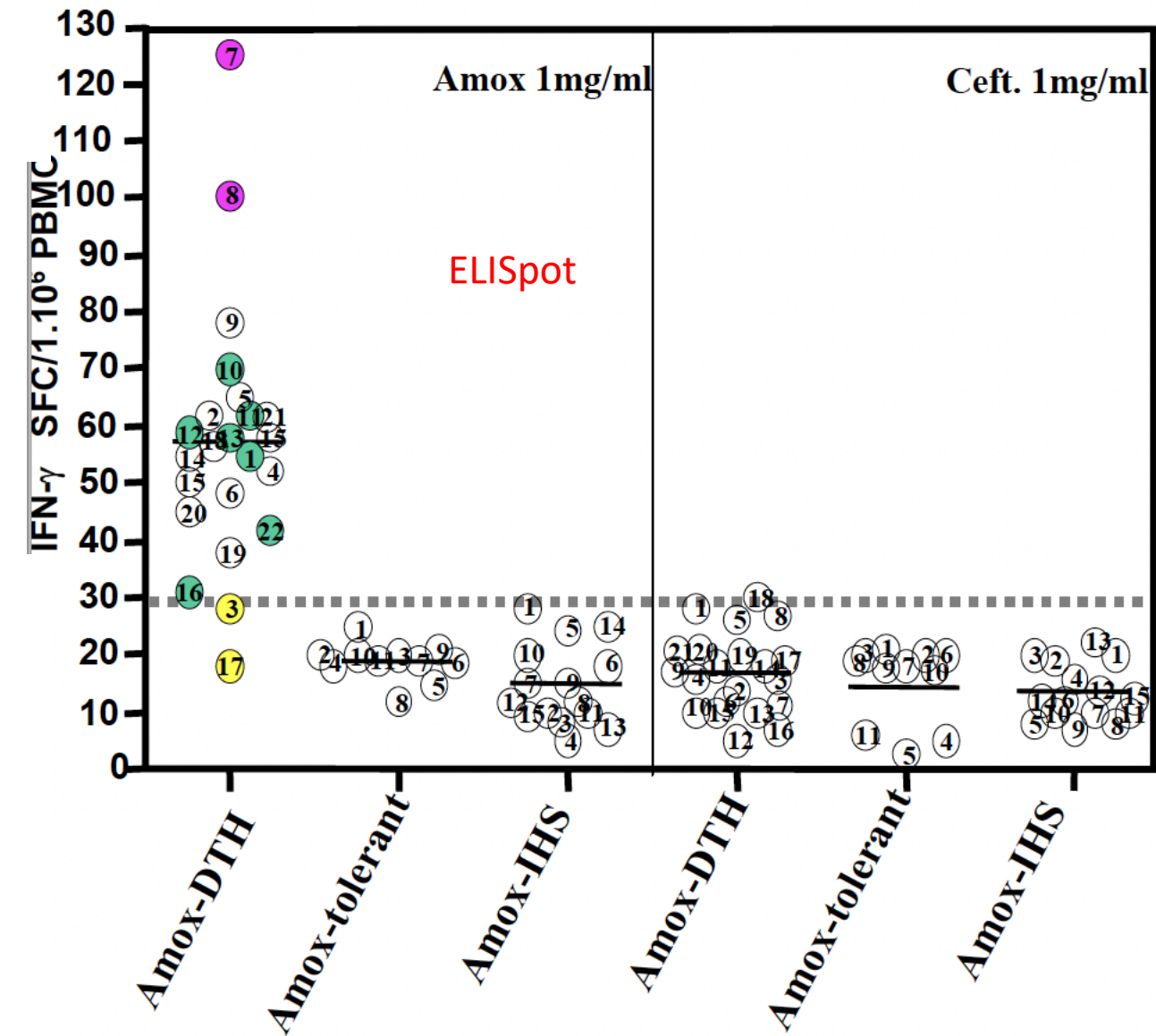


6

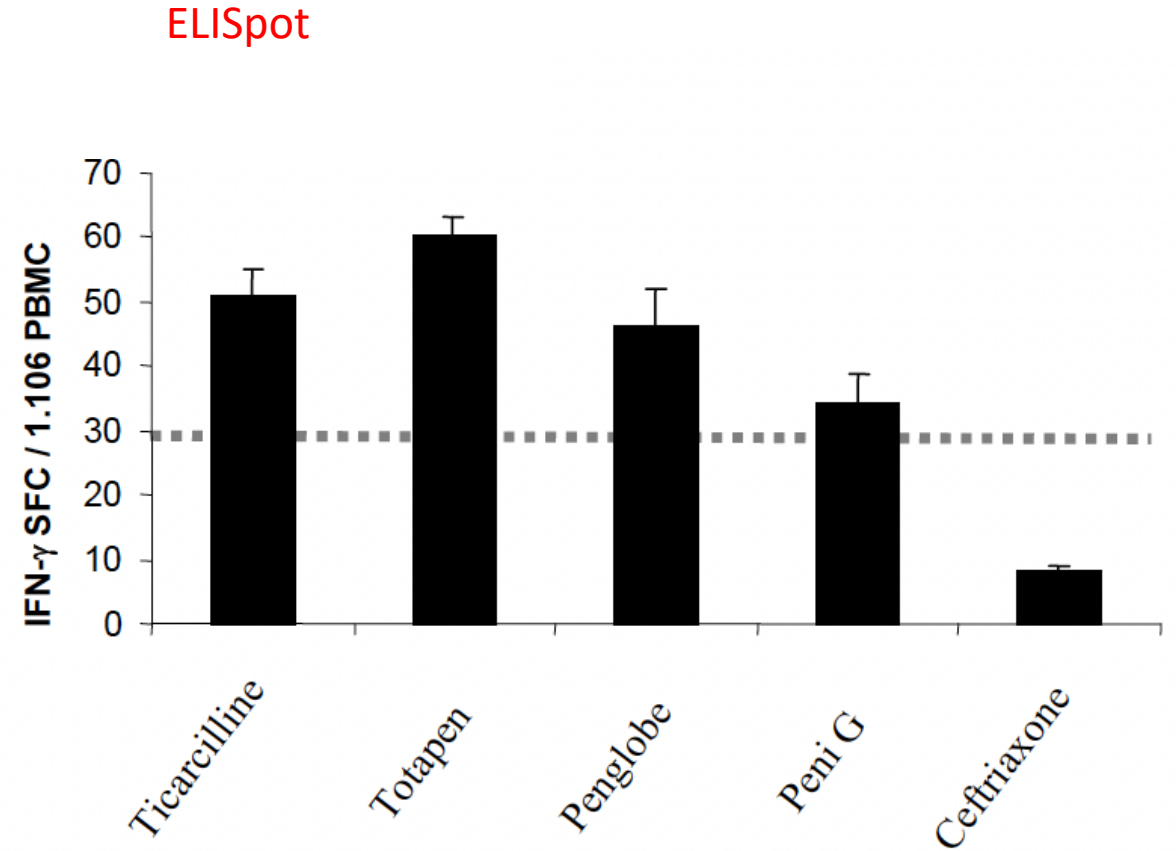
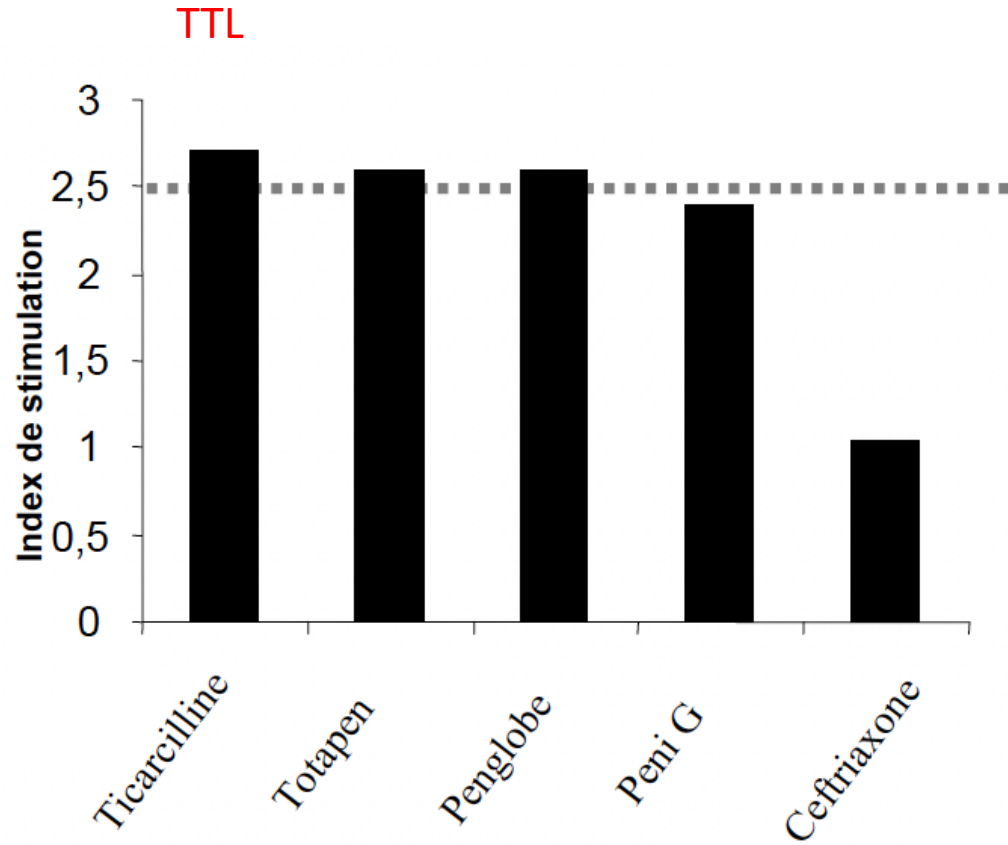


ELISpot (enzyme-linked immunospot)

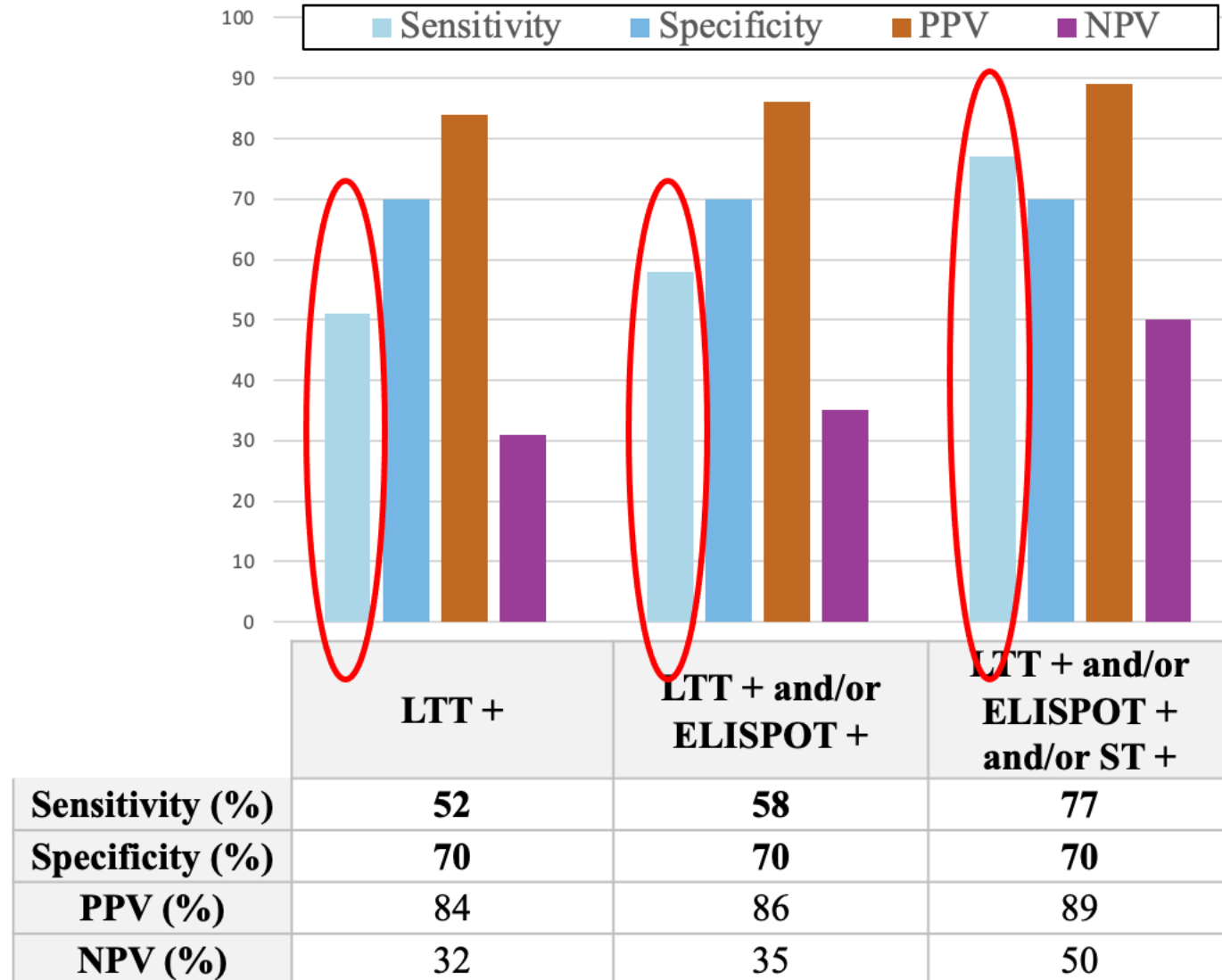
meilleure sensibilité de détection que le TTL dans les réactions aux bêtalactamines



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



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

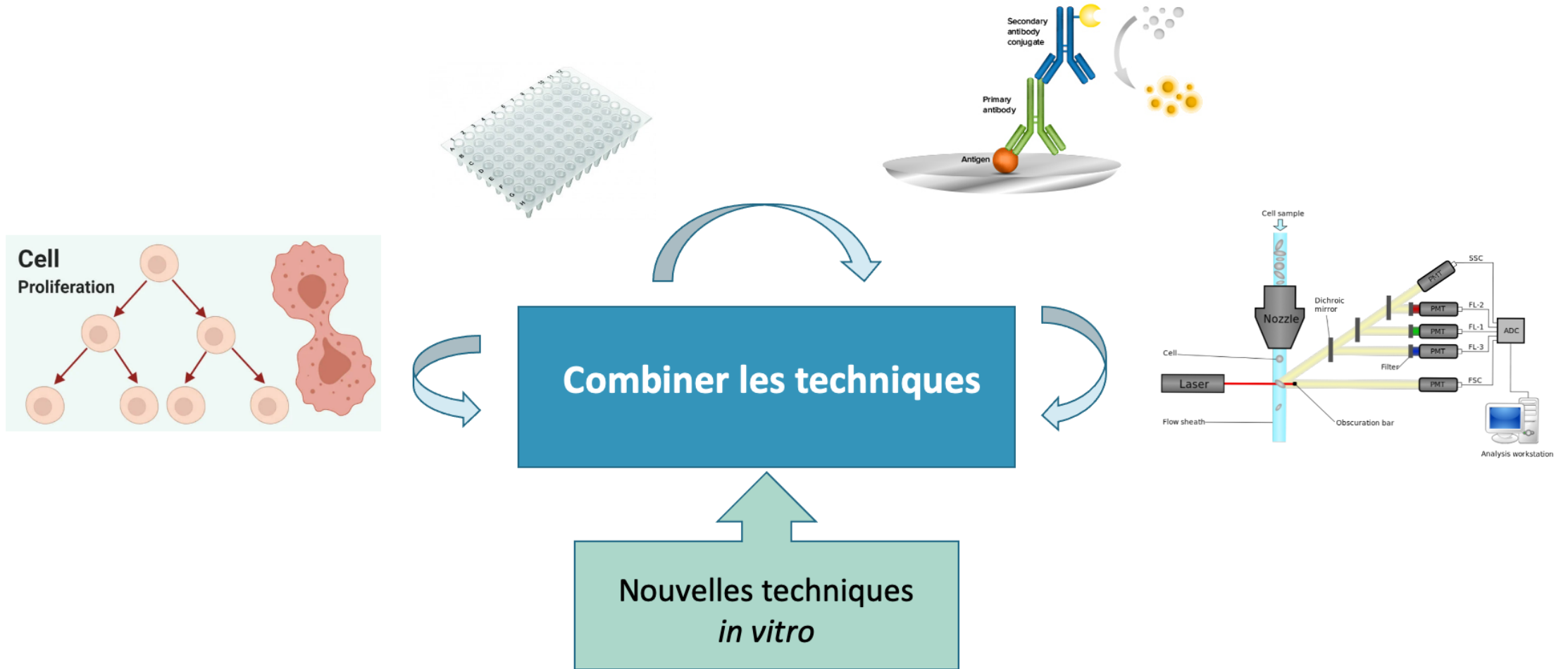


Autres techniques immuno-biologiques

- **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

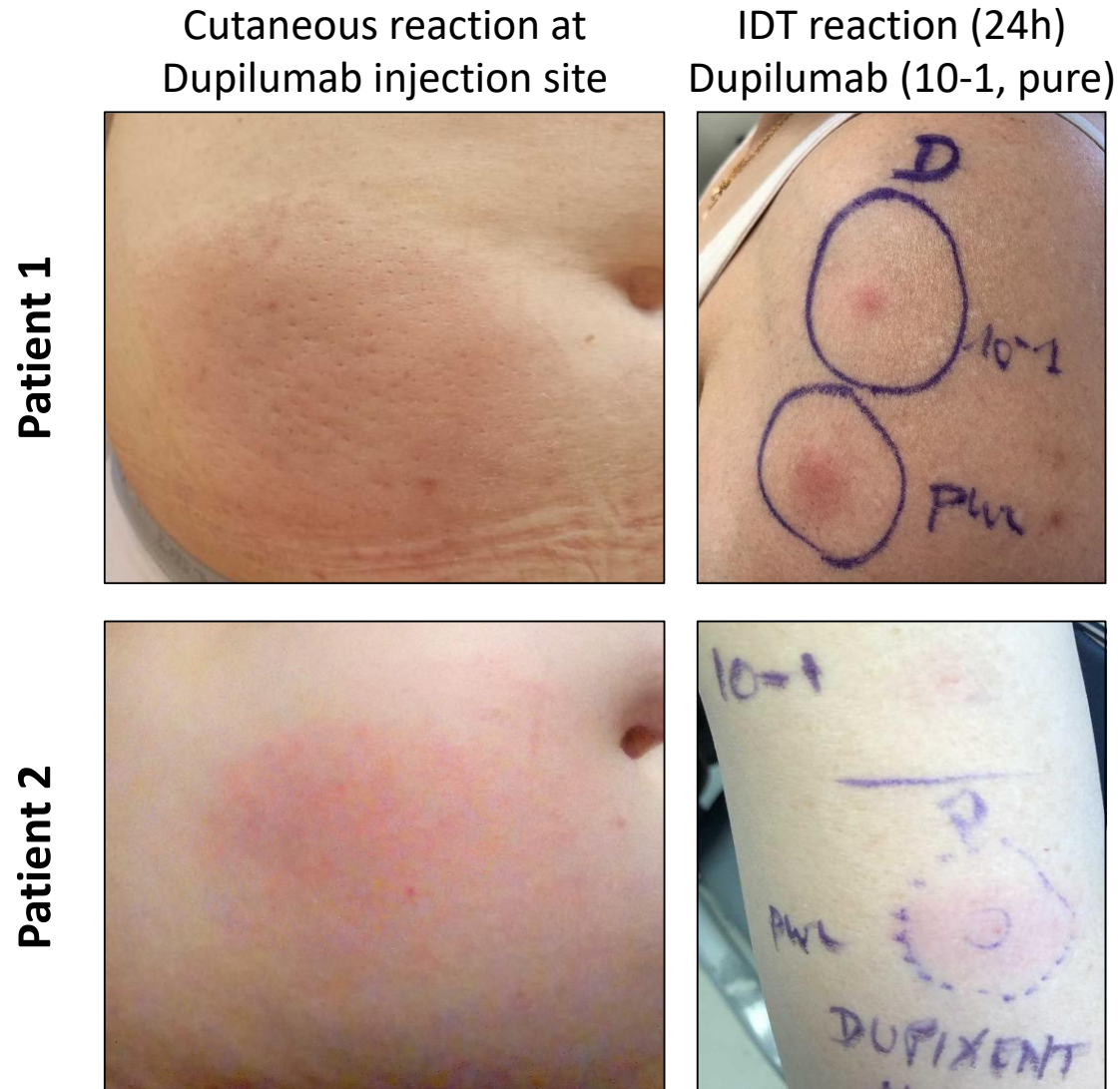


Cyto-LTT: combine la mesure de l'activation lymphocytaire avec la production de cytokines et la mesure de la réponse cytotoxique

L'analyse moléculaire pour caractériser l'inflammation cutanée

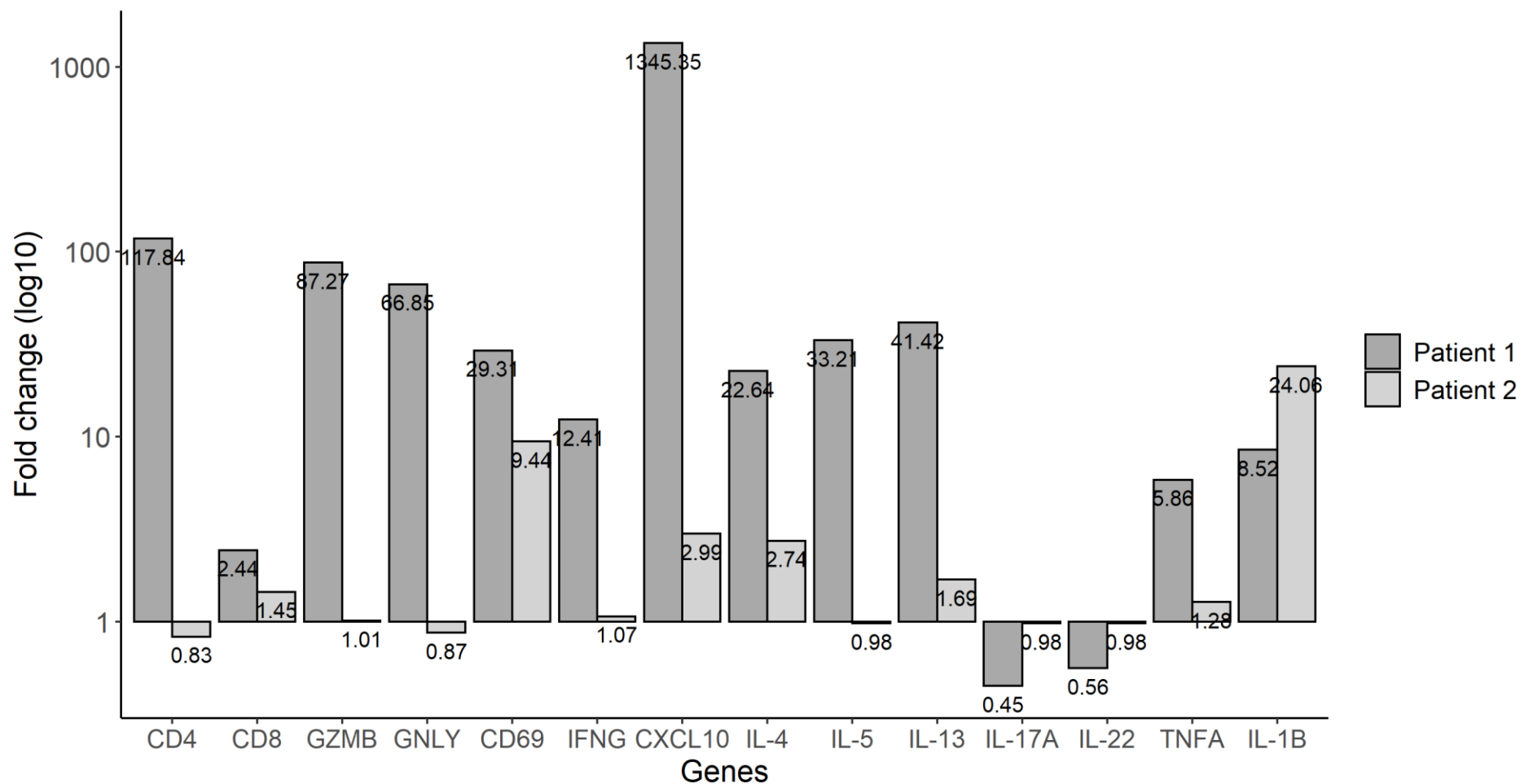
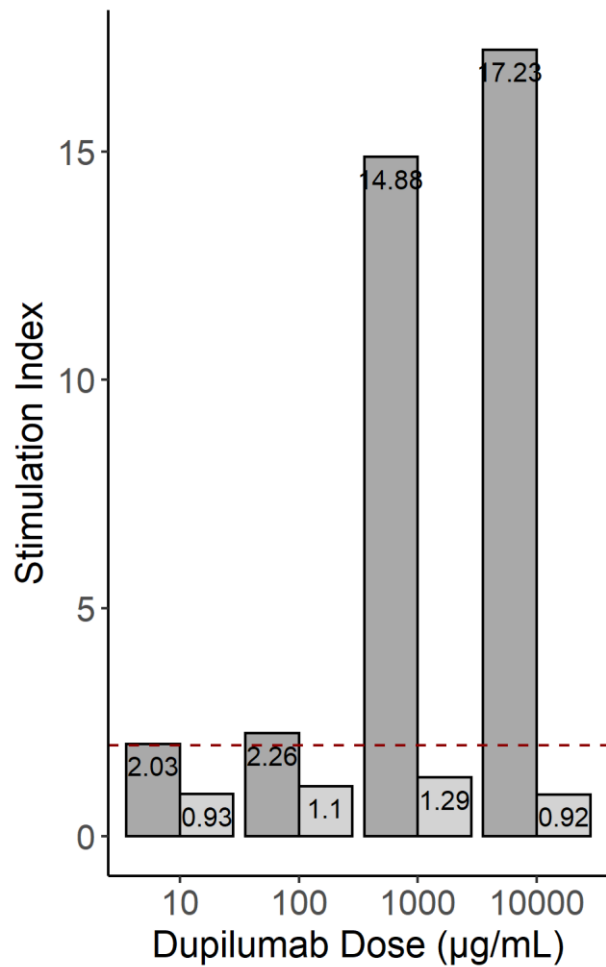
L'analyse moléculaire pour caractériser l'inflammation cutanée

Ex: hypersensibilité retardée au dupilumab



L'analyse moléculaire pour caractériser l'inflammation cutanée

Ex: hypersensibilité retardée au dupilumab

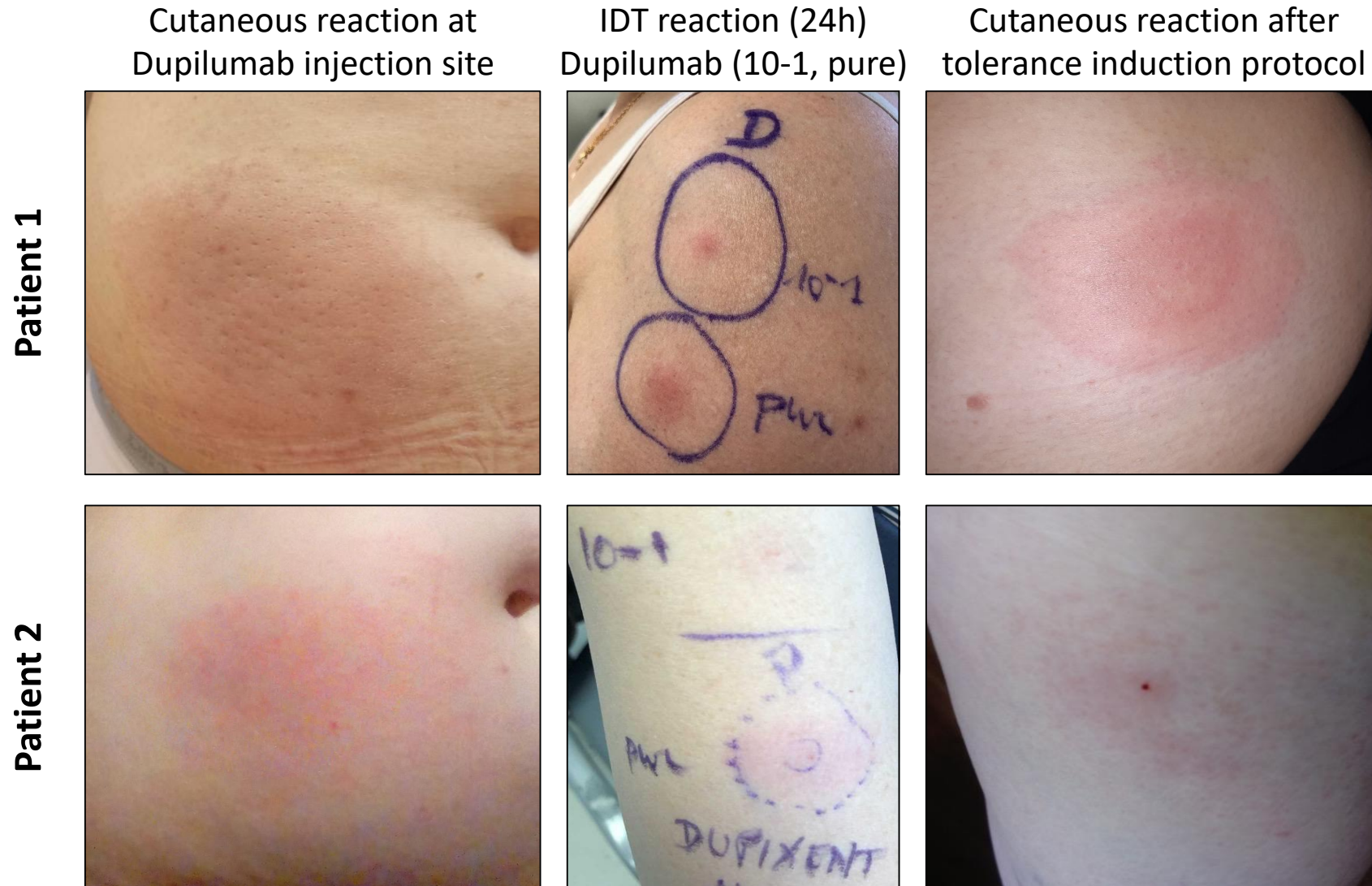


Test de transformation lymphocytaire

Analyse moléculaire

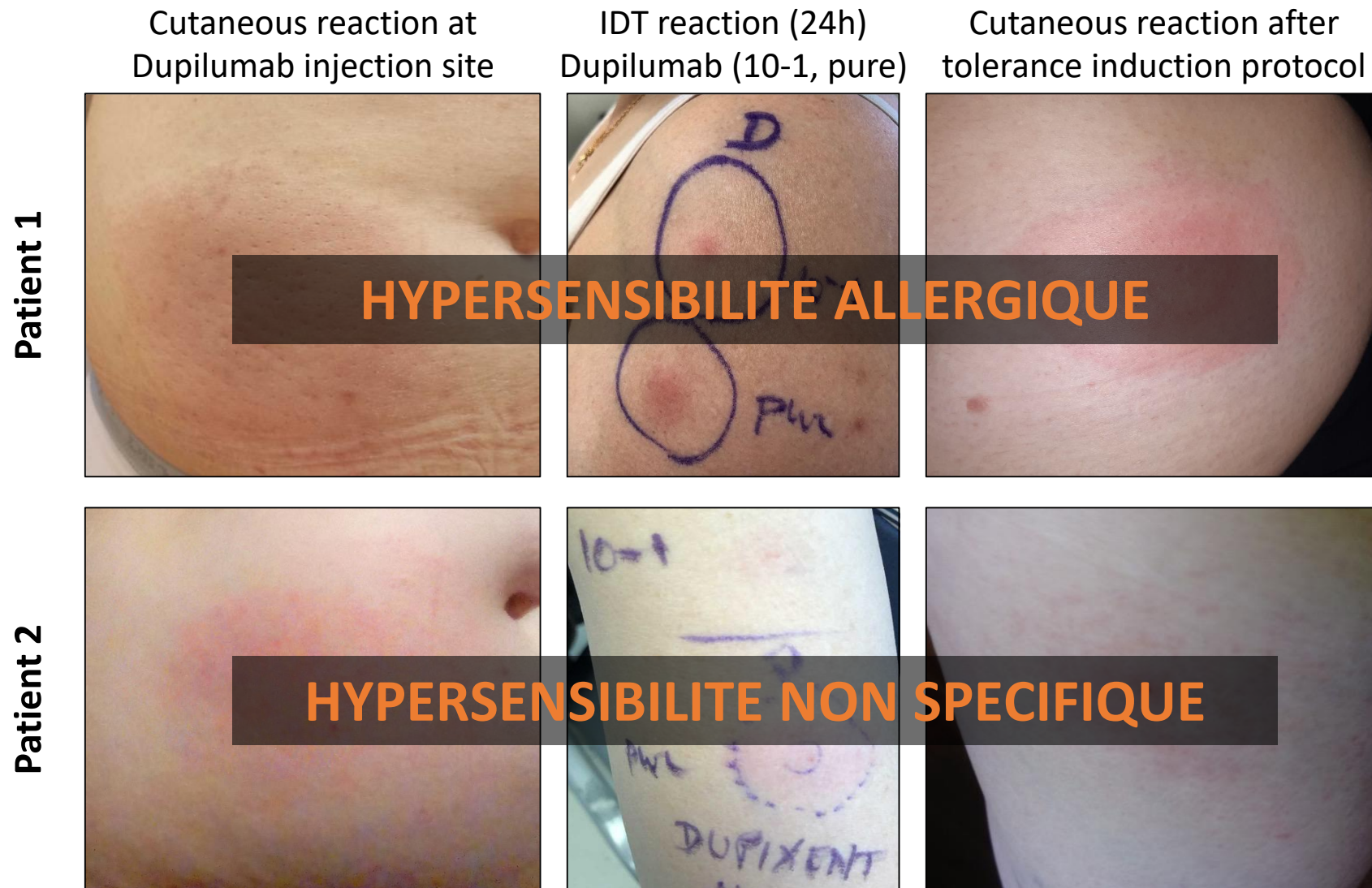
L'analyse moléculaire pour caractériser l'inflammation cutanée

Ex: hypersensibilité retardée au dupilumab



L'analyse moléculaire pour caractériser l'inflammation cutanée

Ex: hypersensibilité retardée au dupilumab



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

Conclusions

- Les tests immunobiologiques sont basés sur la compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans les réactions d'hypersensibilité retardée.
- Méthodes non invasives, sans risque pour le patient, permettant de tester plusieurs médicaments à la fois et sécuriser les réintroductions d'alternatives médicamenteuses.
- L'analyse moléculaire = aide à la caractérisation de l'inflammation cutanée (discriminer patch test vrai et faux positif)
- 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

