

Biologie de l'allergie

Module 2 – Allergologie AURA

18/01/2024

Dr Anaïs Nombel

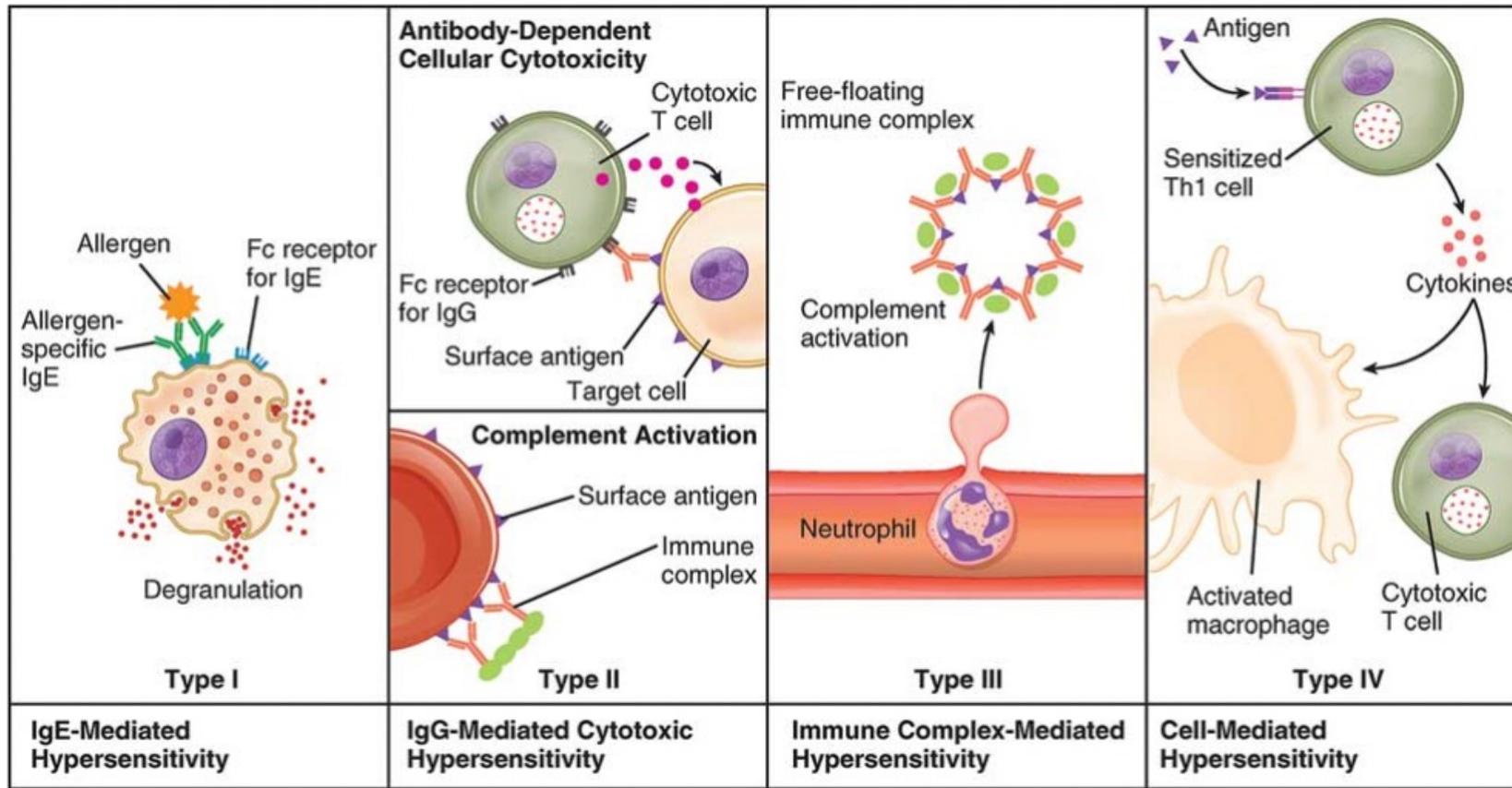
AHU – Service d'immunologie biologique
Hôpital Lyon Sud



Réactions d'hypersensibilité

	Effecteurs	Délai	Mécanismes	Aspects cliniques
Type I	IgE	immédiat 5-30 min.	Pontage par l'Ag des IgE fixées sur mastocytes et basophiles → médiateurs vasoactifs	Erythème Œdème Prurit Anaphylaxie
Type II	HS Médiée par Ac IgM, IgG	semi-retardée 5-8 h	AC dirigés contre Ag cellulaires ⇒ destruction cellulaire (C' ou ADCC)	Transfusion incompatible Anémie hémolytique auto-immune Incompatibilité foetomaternelle
Type III	HS à immunocomplexes	semi-retardée 2-8 h	Dépôt tissulaire d'immunocomplexes ⇒ activation C' et réponse inflammatoire	Arthus localisé Maladie sérique Glomérulonéphrite Lupus
Type IV	HS cellulaire	retardée 24-72 h	T sensibilisés à l'Ag libèrent des cytokines qui activent des macrophages ou des cellules T cytotoxiques	Induration, nodule HS tuberculique Dermatite de contact Rejet de greffe

Exploration biologique des réactions d'hypersensibilité

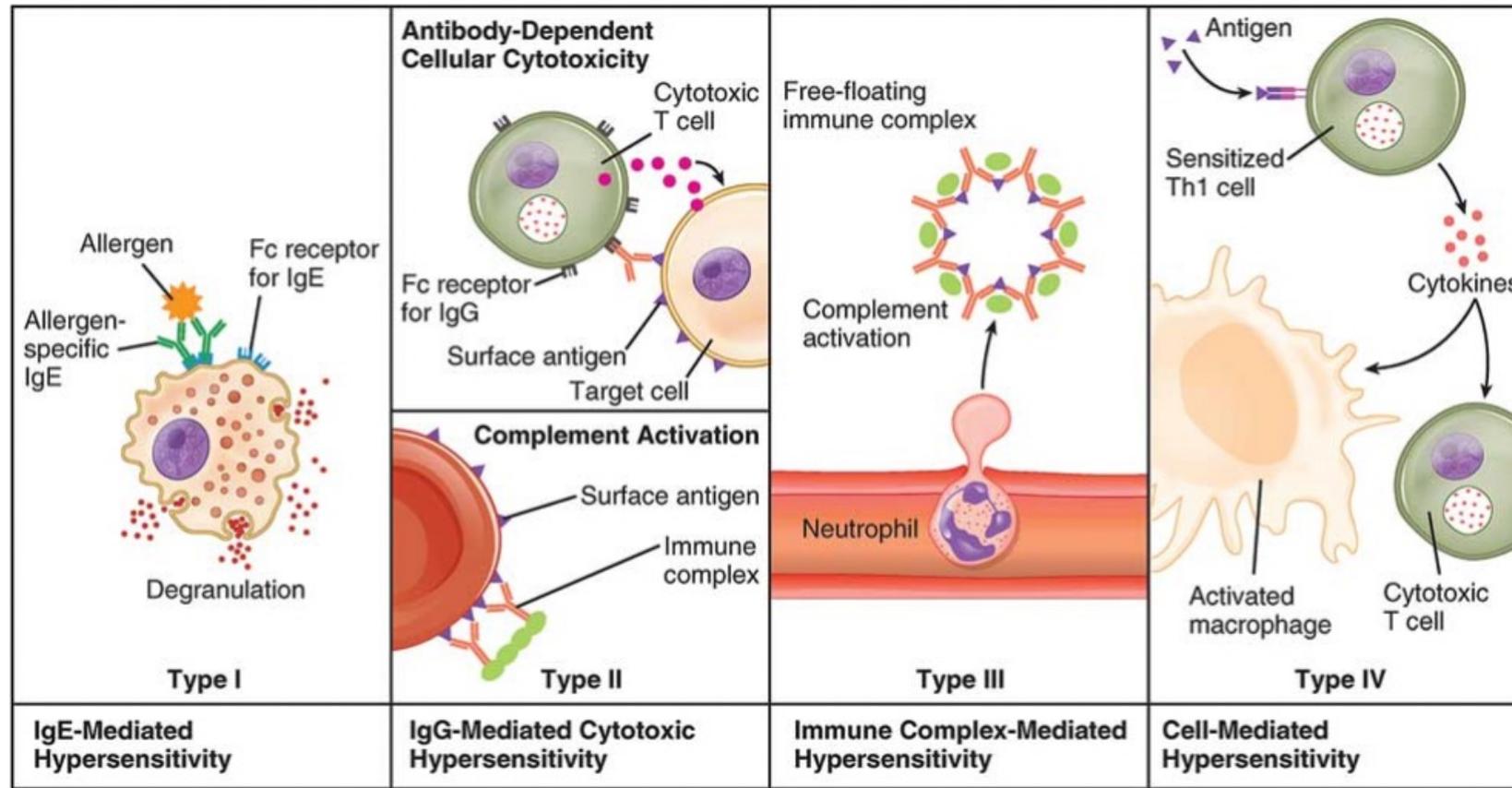


Histamine/Tryptase
 IgE spécifiques
 Test d'activation des basophiles

Test fonctionnel
 des cellules
 Natural Killer

ELISPOT
 QuantiFERON

Exploration biologique des réactions d'hypersensibilité



Histamine/Tryptase
IgE spécifiques
Test d'activation des basophiles

Test fonctionnel
 des cellules
 Natural Killer

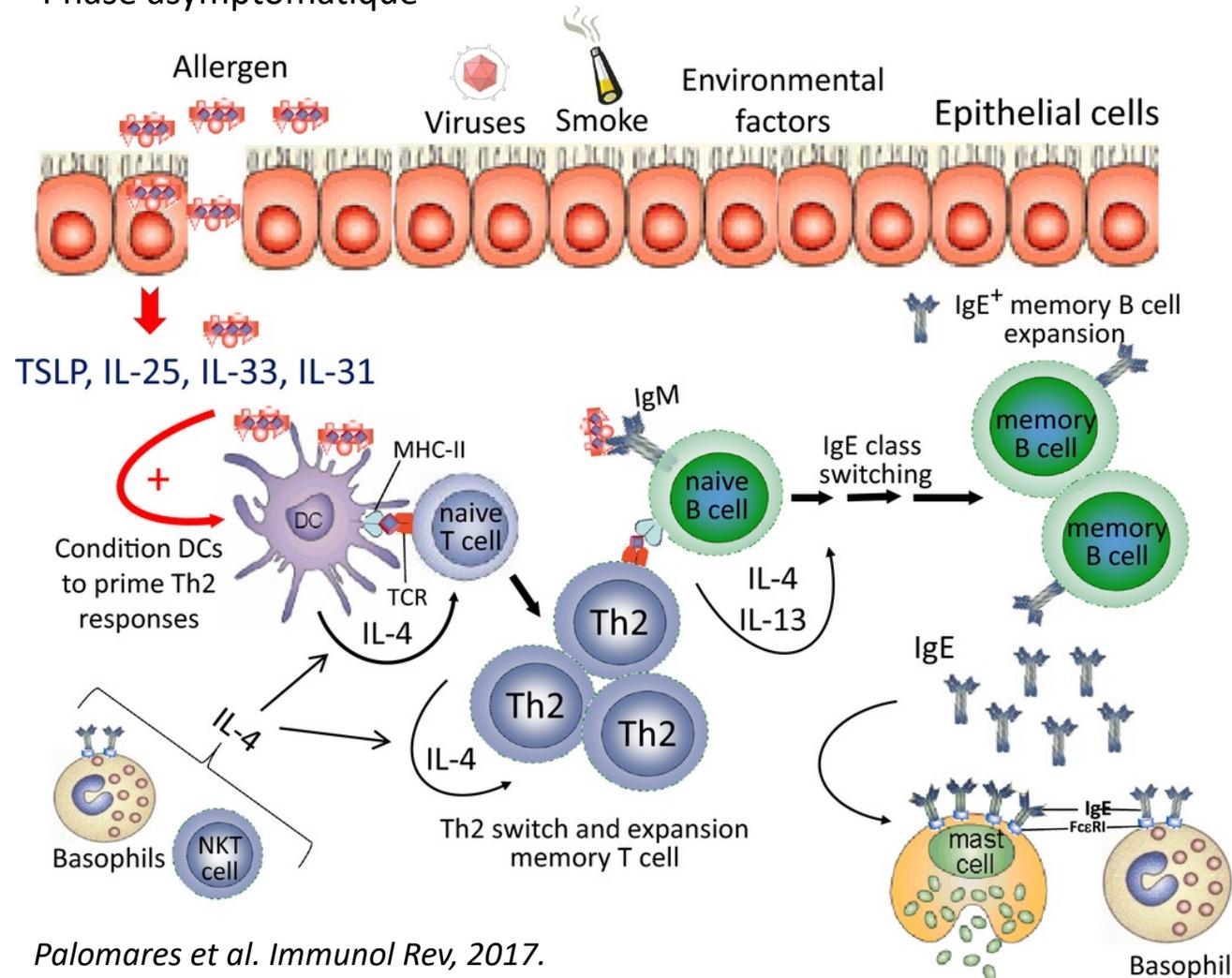
ELISPOT
 QuantiFERON

Physiopathologie de l'hypersensibilité immédiate

Physiopathologie de l'hypersensibilité immédiate

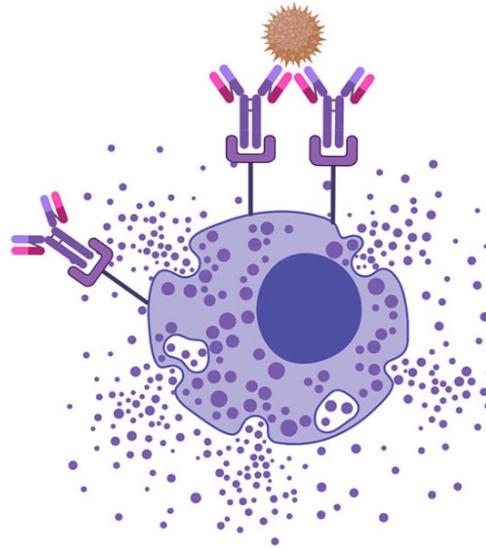
- **Première rencontre avec l'allergène = sensibilisation**

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



Physiopathologie de l'hypersensibilité immédiate

- **Seconde rencontre : Phase de déclenchement (phase clinique)**
 - Pontage par l'allergène de 2 IgE fixées à la surface des basophiles/mastocytes
 - Libération des médiateurs responsables des **signes cliniques**



Nunez-Borque et al. Front Immunol, 2022

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

Diagnostic de l'hypersensibilité immédiate

Diagnostic d'une hypersensibilité immédiate (HSI)



- Interrogatoire :
Recherche des allergènes responsables des signes cliniques



- Tests cutanés
- Disparition des signes à l'éviction de l'allergène



- Tests de provocation



+/- Biologie

Place de la biologie

- Pas de biologie:
 - Quand symptomatologie simple, facilement reliée à un allergène lors de l'interrogatoire
- Biologie:
 - Quand patient vu par un non spécialiste
 - Quand tests cutanés irréalisables (eczéma, peau aréactive) ou interprétation difficile (dermographisme)
 - Aide des nouveaux outils disponibles au diagnostic et à la prise en charge (TPO, éviction, désensibilisation)

Tests biologiques utilisés pour l'exploration de l'HSI

Tests **sériques** :

IgE spécifiques (Apport des allergènes moléculaires)

Histamine

Tryptase

Tests **cellulaires**:

Test d'activation des basophiles (TAB)

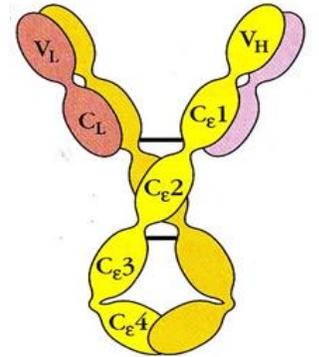
Tests sériques

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)
 - Unitaire (identification)

IgE Totales

- Faible concentration dans le sérum : Ig la plus faiblement représentée dans le sérum (50-100 ng/L)
 - **Exprimée en UI (1 UI = 2,4 ng)**
- 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
 - Polysensibilisations
 - Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique (ABPA)
 - Infections parasitaires
 - Certains 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

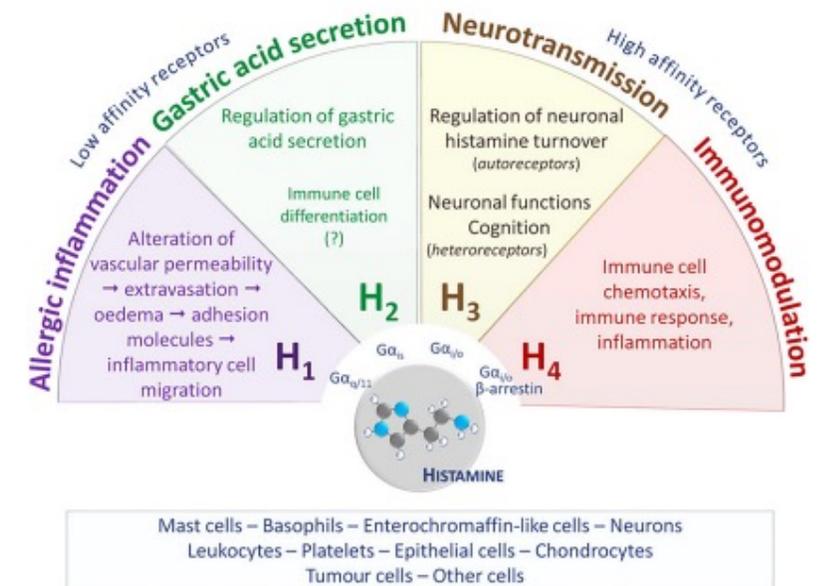
Sur la production de mucus

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)



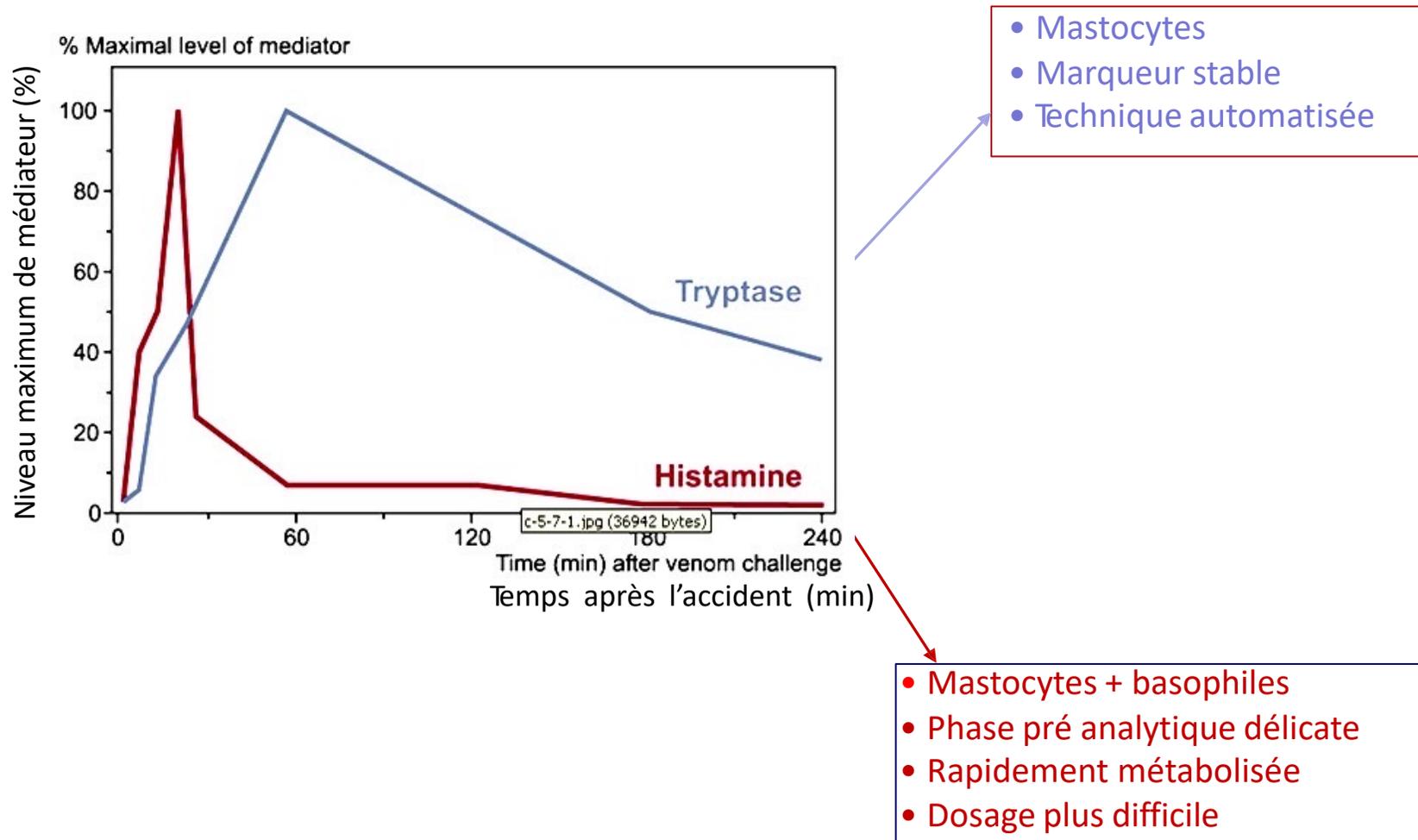
Tiligada et al. Br J Pharmacol, 2020.

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

Médiateurs dégranulés : Tryptase et Histamine

Pour objectiver la dégranulation des basophiles et des mastocytes



Tryptase et Histamine

Exemple de cinétique

	Temps 1	Temps 2	Temps 3
Délai après choc	10 minutes	1 à 2 heures	> 6 heures
Histamine (Val. réf. : < 10)	>100 nmol/L	20 nmol/L	
Tryptase (Val. réf. : < 11)	37.0 µg/L	24.3 µg/L	10.9 µg/L

Commentaire Tryptase : Ce résultat peut être en faveur d'un choc anaphylactique.

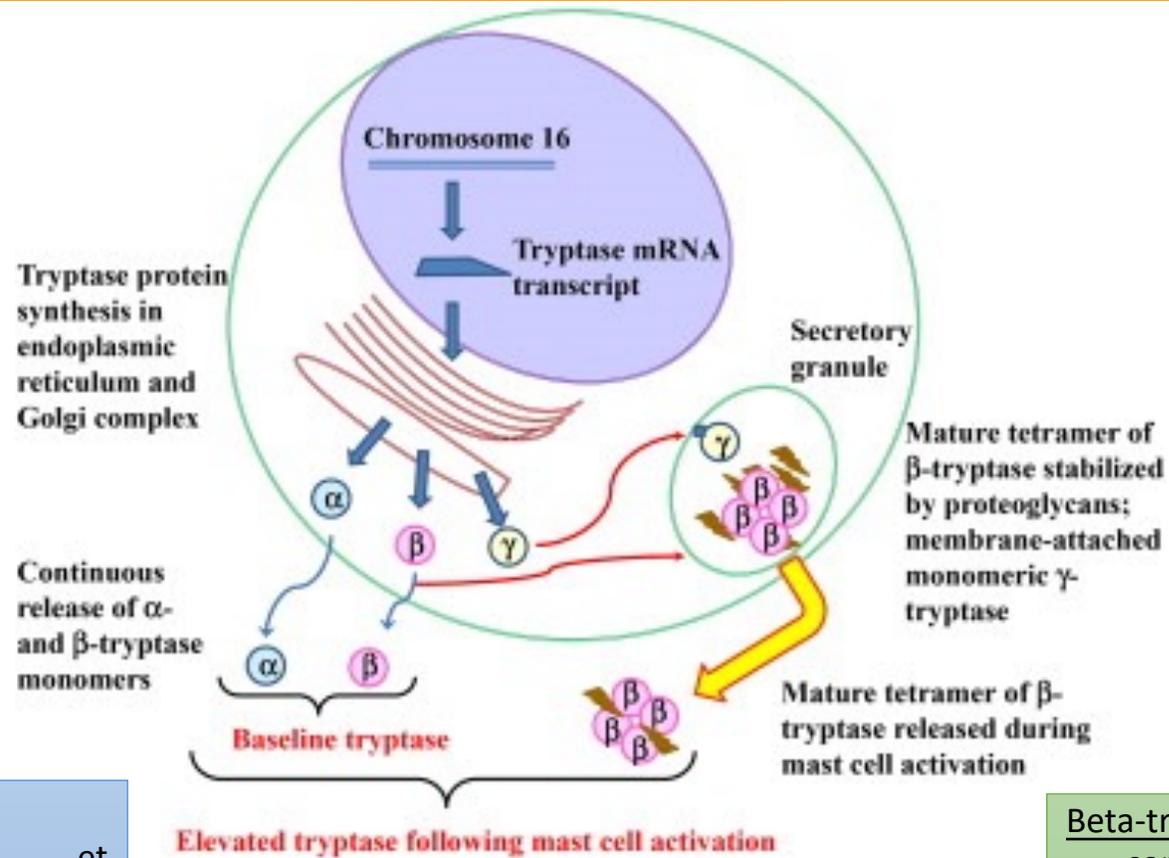
Variation significative de la tryptase quand :

Tryptasémie > 1,2 X [Tryptasémie basale] + 2 µg/L

ou

Tryptasémie > 135% [Tryptasémie basale]

Tryptase et pathologie mastocytaire



Vitte J, Mol Immunol 2015

A l'état basal:

Libération continue et faible de zymogènes (protryptases alpha ou bêta)

Les mastocytes secrètent **au repos** de l'**alpha-tryptase** dont le dosage sérique permet une **estimation de la masse mastocytaire totale** : élévation **continue** en cas de **mastocytose systémique**.

Beta-tryptase :

- concentrée sélectivement dans les granules sécrétoires des mastocytes humains et libérée dans la circulation à la suite d'une **activation des mastocytes**.
- marqueur biologique de la dégranulation mastocytaire. Marqueur des chocs anaphylactiques.

Tryptase et pathologie mastocytaire

- L'alpha-tryptase, secrétée continuellement par les mastocytes est responsable du **taux basal** de tryptase sérique de chaque individu.
- Son dosage sérique permet une estimation de la masse mastocytaire totale.

-> **Augmentation** de la tryptase dans la **mastocytose systémique**

Dosage de tryptase à réaliser :

- chez tout patient allergique aux **venins d'hyménoptères** ayant fait une réaction systémique
- en cas de réactions d'**hypersensibilité immédiate à répétition sans étiologie** retrouvée.

Tableau I. Critères majeurs et critères mineurs du diagnostic de MS*.

Critère majeur	Infiltrat dense multifocal de mastocytes dans la moelle osseuse ou dans un autre organe extracutané, avec plus de 15 mastocytes par agrégat
Critères mineurs	1. Morphologie anormale des mastocytes médullaires ou d'un autre organe extracutané
	2. Mutation de c-KIT au codon 816
	3. Immunophénotypage des mastocytes médullaires exprimant le CD2 et/ou le CD25
	4. Taux de tryptase sérique > 20 ng/ml

*Le diagnostic positif nécessite la présence d'un critère majeur et d'un critère mineur ou de 3 critères mineurs.

Le critère majeur est constitué par la présence d'agrégats de plus de 15 mastocytes anormaux au sein de la biopsie ostéo-médullaire ou de tout autre organe atteint en dehors de la peau.

Le taux de tryptase sérique doit être > 20 ng/ml en dehors d'une association à une autre hémopathie myéloïde. Un taux de tryptase sérique < 20 ng/ml est présent dans 20 à 30% des cas de MS.

Tests spécifiques

- IgE spécifiques (~ 600 tests)

Tests multiallergéniques
(mélanges/dépistage)

Tests unitaires
(identification)

- Différents types d'allergènes
 - Allergènes inhalés = pneumallergènes
 - Pollens, animaux, arthropodes, acariens, moisissures
 - Allergènes ingérés = trophallergènes
 - Allergènes injectés
 - Médicaments
 - Venins d'hyménoptères
 - Allergènes professionnels

L'allergie : un langage codé...

- 1 code pour chaque allergène :
 - 1 lettre pour la catégorie
 - 1 chiffre

Lettre	Catégorie	Exemple
c	Médicament	c1: pénicilline
d	Acariens	d1 : <i>D. pteronyssinus</i>
e	Animaux	e1 : le chat
f	Aliments	f13 : l'arachide
g	Graminées	g3 : dactyle
i	Insecte	i1 : abeille
k	Professionnel	k82 : latex
m	Moisissures	m3 : <i>Aspergillus</i>
o	Divers	o1 : coton
p	Parasite	p1 : ascaris
t	Arbres	t3 : boulot
w	Herbacées	w1 : ambroisie

Techniques utilisées

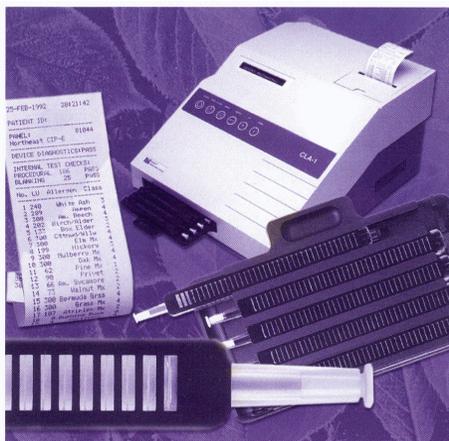


Techniques manuelles :
- Histamine



Techniques automatisées :

- IgE totales
- Phadiatop
- Trophatop
- IgE spécifiques
- Tryptase
- IgG: IgG4 spécifiques



CLA :
Mixte
Trophallergènes
Pneumallergènes

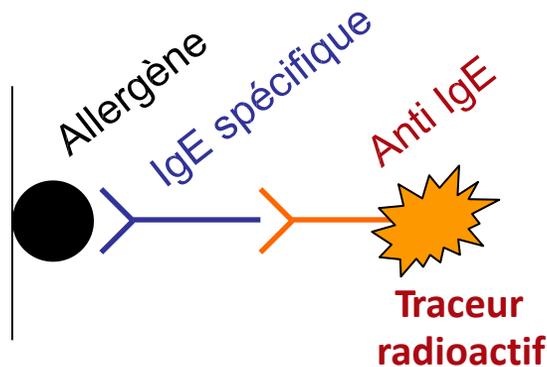
ISAC / ALEX



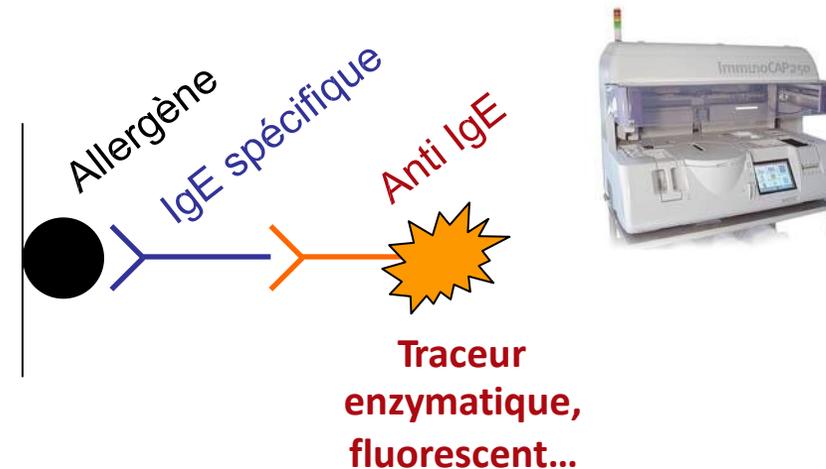
Techniques de dosage des IgE spécifiques

- Dérivent toutes du RAST (Radioallergosorbant Test) (1974)
- Techniques actuelles :
 - Même principe
 - Détection enzymatique

« RAST »

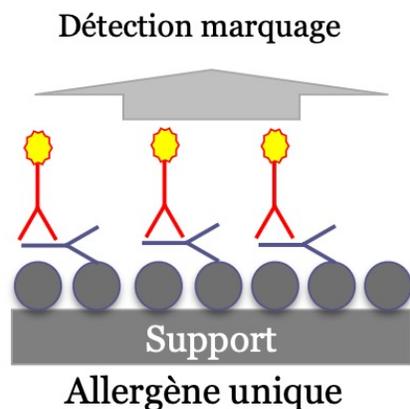


Tests FEIA, « immunoCAP »



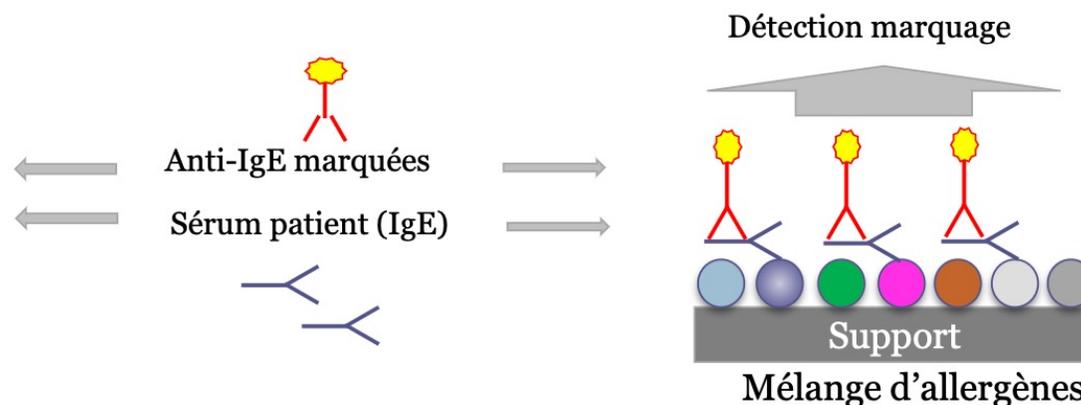
Techniques de dosage des IgE spécifiques

Tests unitaires (identification)



- Quantitatif (kU/L)
- Gamme de mesure : <math><0,10</math> à >100 kU/L

Tests multiallergéniques (mélanges/dépistage)



- Pneumallergènes : Phadiatop
- Mélanges alimentaires : fx (~40 mélanges)

Trophatop enfant

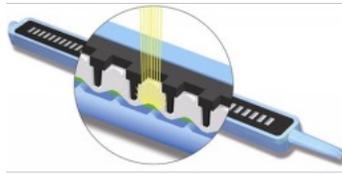
- Blanc d'œuf, lait de vache, arachide, moutarde
- Poisson, noisette, soja, blé
- Crevette, kiwi, bœuf, sésame

Trophatop adulte

- Blanc d'œuf, lait de vache, arachide, poisson, soja, blé
- Noisette, crevette, kiwi, banane
- Sésame, levure de bière, ail, céleri

Tests multiparamétriques sur un même support

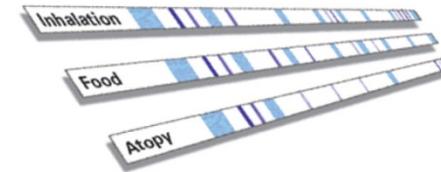
CLA
Eurobio/Ingen



TAP
Eurobio/Ingen



Euroline
Euroimmun



- 30 allergènes
 - Résultats semi-quantitatif
 - Principalement des extraits
 - Recherche des IgE anti-CCD (TAP et Euroline)
- Techniques manuelles pouvant être automatisée
- Performances analytiques < à celles des tests unitaires

Nomenclature : Arrêté du 28 novembre 2003

Tests de dépistage

(pas d'identification de l'allergène)

- Recherche d'IgE spécifiques vis-à-vis de mélanges d'allergènes

- Ordonnances indiquant au maximum :
 - 1 mélange de pneumallergène
 - 3 mélanges alimentaires

Tests d'identification

- Tests unitaires vis-à-vis d'allergènes multiples
- Tests de quantification des IgE spécifiques vis-à-vis d'allergènes unitaires

- Ordonnances indiquant au maximum :
 - 5 aliments
 - 5 pneumallergènes
 - 5 venins
 - 5 médicaments
 - 1 test pour le latex

Nomenclature : Arrêté du 28 novembre 2003

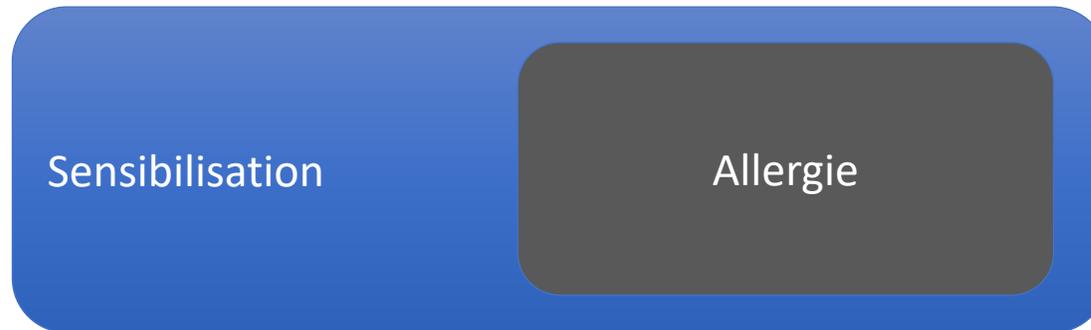
Tableau récapitulatif :

Cumulable avec	IgE totales	Phadiatop	Trophatop	CLA	IgE unitaires respiratoire	IgE unitaires alimentaire	RAST latex	RAST venins	RAST médicaments
IgE totales		NON	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI	OUI
Phadiatop	NON		OUI	NON	NON	NON	OUI	OUI	OUI
Trophatop	NON	OUI		NON	NON	NON	OUI	OUI	OUI
CLA	NON	NON	NON		NON	NON	OUI	OUI	OUI
IgE unitaires respiratoire	NON	NON	NON	NON		OUI	OUI	OUI	OUI
IgE unitaires alimentaire	NON	NON	NON	NON	OUI		OUI	OUI	OUI
RAST latex	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI		OUI	OUI
RAST venins	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI		OUI
RAST médicaments	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	

NABM v.56, octobre 2019 – HAS mai 2005

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
 - CLA
- IgE spécifiques avec extraits allergéniques naturels

Limites des extraits allergéniques naturels

- Composition **non standardisée** (mélange de protéines allergéniques et non allergéniques)
- 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)....
 - Procédés de **purification** et de **stockage** utilisés (contaminations)

Evolution de l'allergologie biologique

- IgE totales
- Tests de screening
 - Mélange d'allergènes
 - CLA
- IgE spécifiques avec extraits allergéniques naturels

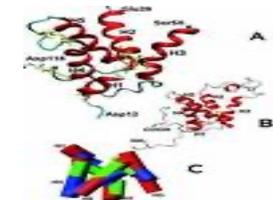


Manque de sensibilité et de spécificité

Des extraits allergéniques

Aux

Allergènes moléculaires



La source allergénique

Source allergénique



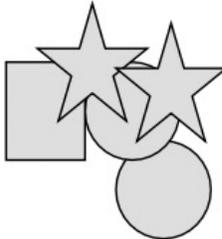
=



Composants allergisants



Composants non allergisants

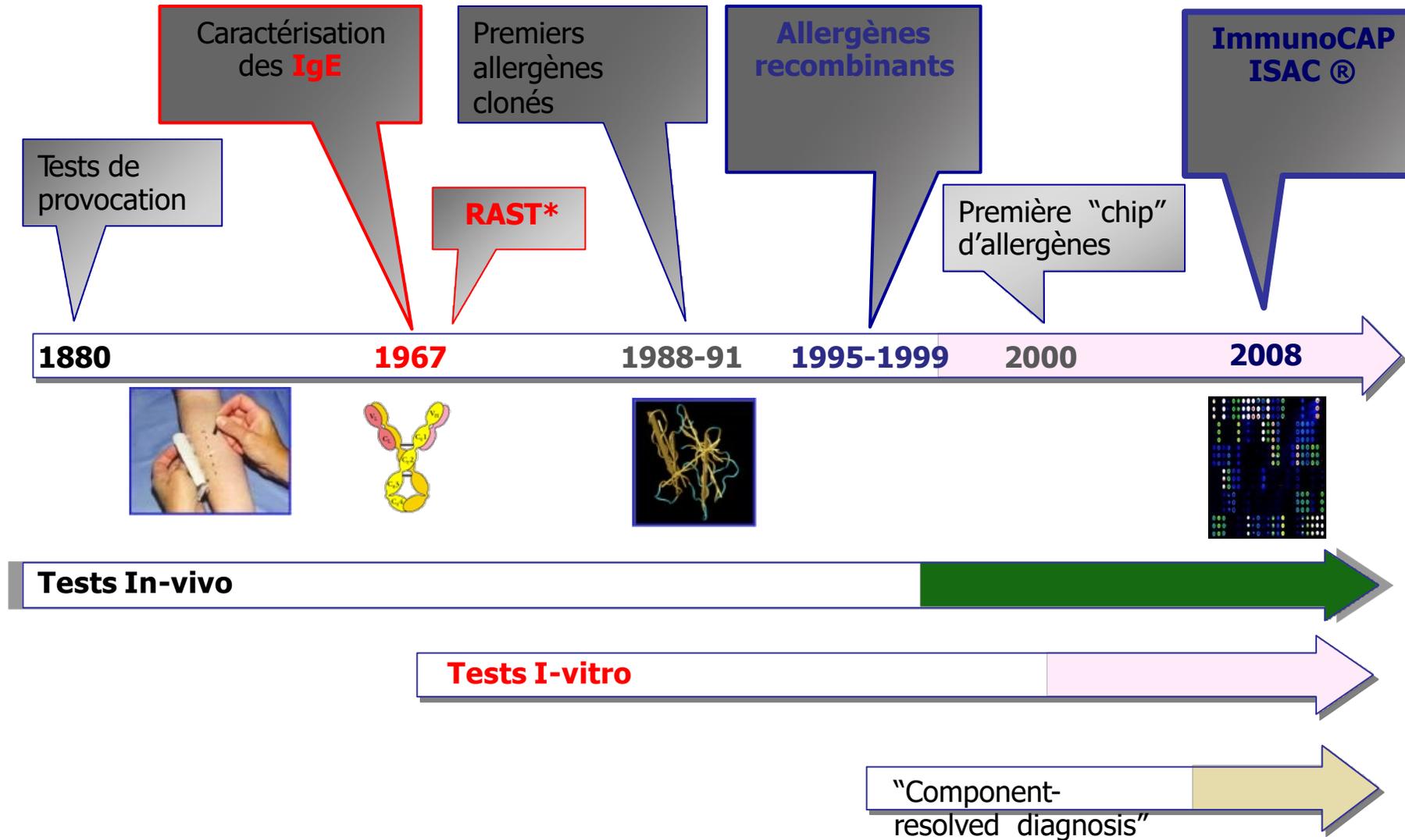


Σ molécules différentes



**Allergènes MAJEURS (spécifiques d'espèce)
et allergènes mineurs (croisants)**

Un peu d'histoire....

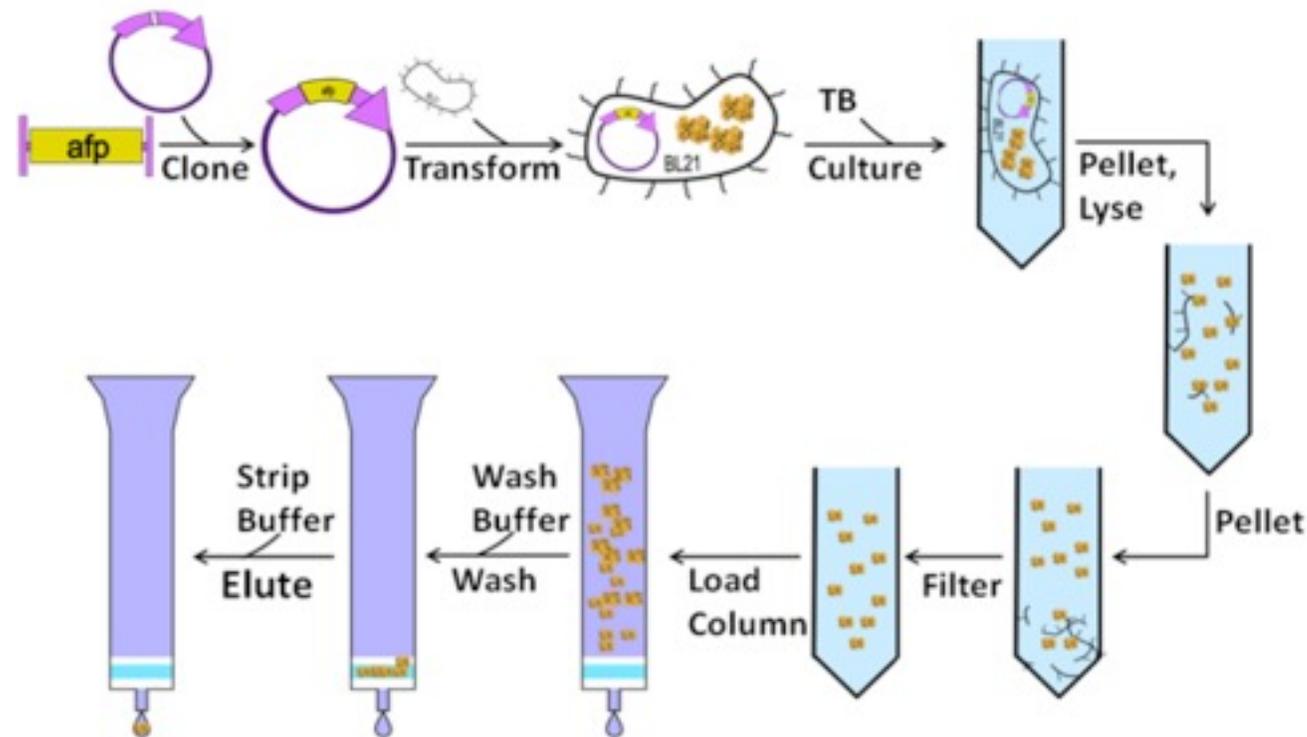


Comment obtenir/isoler des allergènes moléculaires ?

- **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)

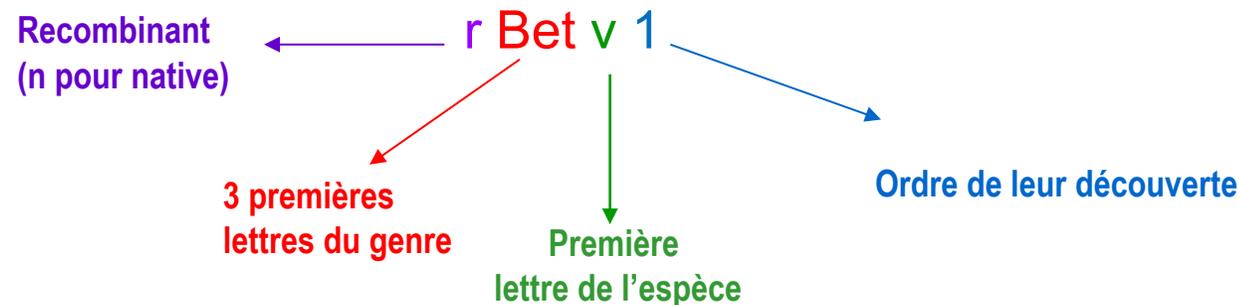
Comment obtenir/isoler des allergènes moléculaires ?

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



Nomenclature des allergènes

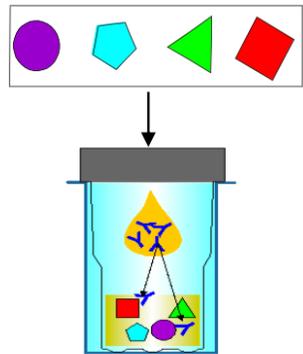
- + de 1000 allergènes (regroupés en 175 familles) identifiés
- Nomenclature officielle :
 - Préfixe « n » pour l'allergène naturel purifié
 - « r » pour recombinant
- Exemple du bouleau, *Betula verucosa* (t215)



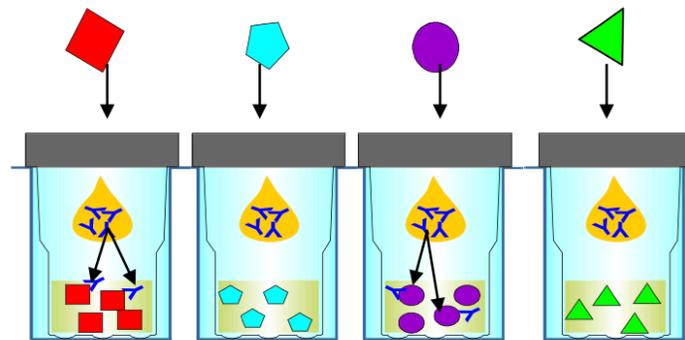
Avantages des allergènes recombinants

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

Source allergénique



Composants allergéniques natifs ou recombinants



Dosage plus spécifique

Apport pratique des allergènes moléculaires

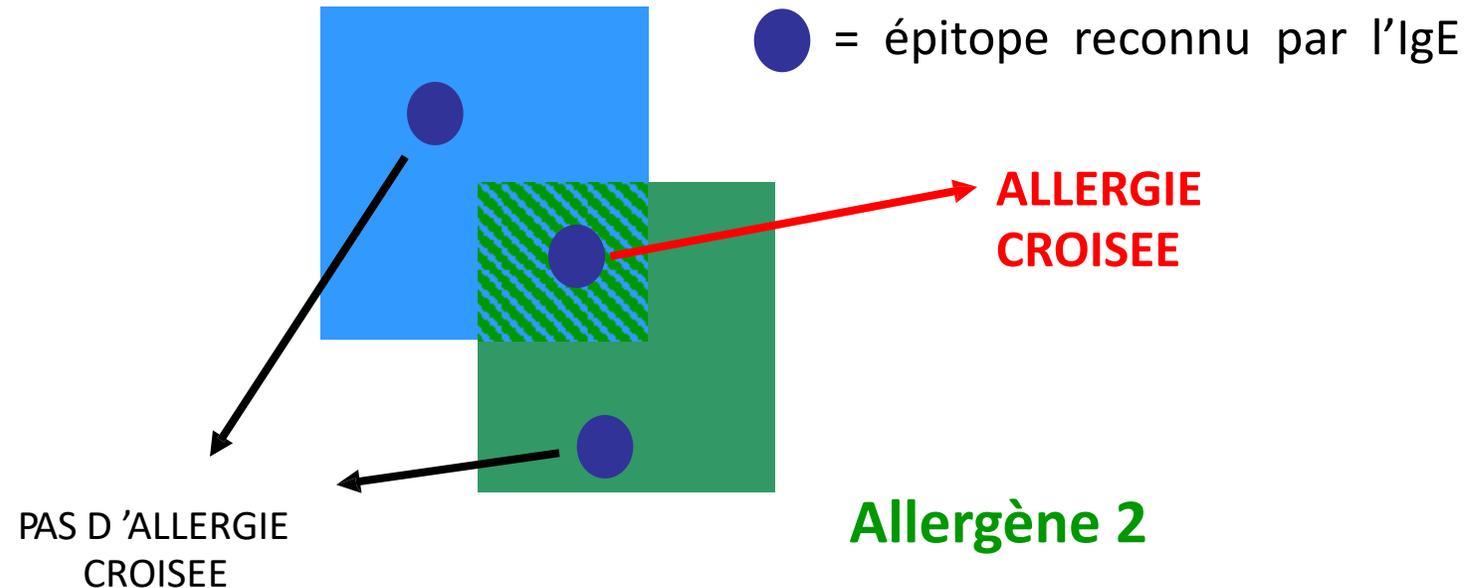
1. Outil pour « dépister » les réactions croisées sur des bases moléculaires et aider à l'interprétation des polysensibilisations cutanées
2. Outil pour améliorer les tests biologiques « classiques »
3. Outil pour contribuer à un diagnostic plus spécifique
4. Outil pour améliorer/personnaliser la prise en charge du patient (immunothérapie spécifique, établir un risque de réactions sévères, indication d'un TPO, éviction)

Apport pratique des allergènes moléculaires

- 1. Outil pour « dépister » les réactions croisées sur des bases moléculaires et aider à l'interprétation des polysensibilisations cutanées**
2. Outil pour améliorer les tests biologiques « classiques »
3. Outil pour contribuer à un diagnostic plus spécifique
4. Outil pour améliorer/personnaliser la prise en charge du patient (immunothérapie spécifique, établir un risque de réactions sévères, indication d'un TPO, éviction)

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

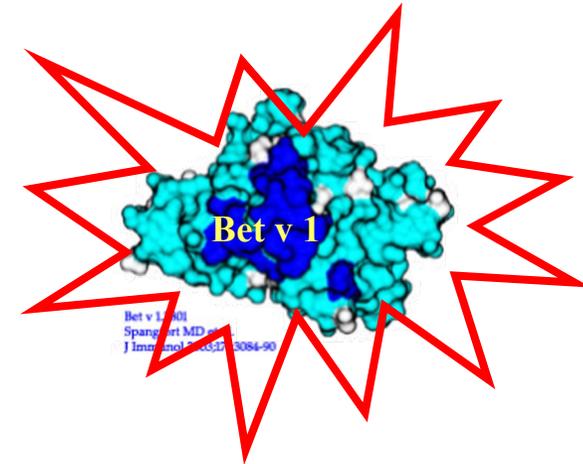
- **entre espèces *taxonomiquement proches* :**
 - Acariens (d1,d2)
 - Graminées (dactyle et phléole)
 - Frêne / olivier : famille des Oléacées
- **entre espèces *taxonomiquement éloignées* :**
 - La relation botanique ne permet plus d'expliquer les réactions croisées
 - **Notion de *famille moléculaire*** (protéines provenant de divers allergènes et ayant la même *fonction physiologique*)

Réactions croisées entre allergènes inhalés et aliments

<i>Allergènes inhalés</i>	<i>Aliments</i>
<i>Pollens de Bouleau, Aulne, Noisetier</i>	<i>Noix/noisette, amande, pomme, poire, cerise, abricot, pêche, kiwi</i>
<i>Pollen d'Armoise</i>	<i>Céleri, carotte, fenouil, anis, aneth, paprika, Coriandre, camomille, cumin, tournesol</i>
<i>Pollen d'Ambroisie</i>	<i>Melon, banane</i>
<i>Acariens de la poussière domestique</i>	<i>Crevette, homard, langouste, crabe escargot</i>
<i>Latex</i>	<i>Avocat, banane, marron, kiwi, figue, papaye, épinard, pomme de terre, tomate</i>
<i>Plumes d'oiseaux</i>	<i>Œuf de poule</i>
<i>Pollens (tous)</i>	<i>Miel</i>

Famille des PR-10

- Allergies croisées pollens-aliments
- Syndrome « Pomme-Bouleau »
- Base moléculaire des RC bien décrite : les PR-10
- Allergènes sensibles :
 - À la **pepsine** : syndromes locaux (oraux ++)
 - À la **chaleur/cuisson** : aliment cuit, en général toléré
- Réactions allergiques aux fruits et légumes du nord de l'Europe



Gly m 4



Ara h 8



Dau c 1



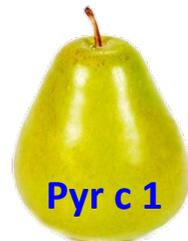
Pru ar 1



Cor a 1



Pru p 1



Pyr c 1



Mal d 1



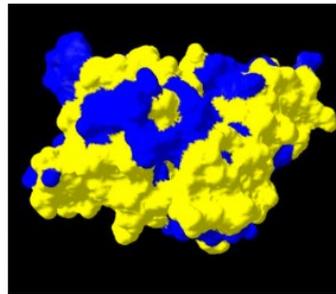
Pru av 1



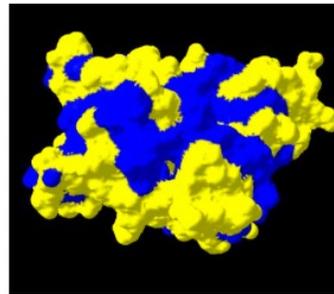
Api g 1

Expliquer des réactions croisées sur des bases moléculaires

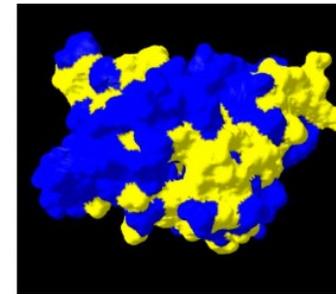
Identité / allergène	Bet v 1	Mal d 1	Gly m 4	Api g 1
% séquences	100	56	47	39
% surface	100	71	60	47



Bet v 1 vs. Mal d 1



Bet v 1 vs. Gly m 4



Bet v 1 vs. Api g 1

 Surface commune

Degré de similitude des épitopes conformationnels

D'après Radauer, Allergy School Bichenberg 2007

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

Apport pratique des allergènes moléculaires

1. Outil pour « dépister » les réactions croisées sur des bases moléculaires et aider à l'interprétation des polysensibilisations cutanées
- 2. Outil pour améliorer les tests biologiques « classiques »**
3. Outil pour contribuer à un diagnostic plus spécifique
4. Outil pour améliorer/personnaliser la prise en charge du patient (immunothérapie spécifique, établir un risque de réactions sévères, indication d'un TPO, éviction)

Amélioration des tests biologiques, exemple du soja (f14)

- Présence en faible quantité du composant **Gly m4** dans l'extrait naturel utilisé pour le test f14 (IgE spécifiques graine de soja)
- Conseils sur les mesures à prendre par l'utilisateur



Il est recommandé de compléter le bilan biologique avec le test rGly m4

- Pour les patients sensibilisés au pollen de bouleau, chez lesquels est suspectée une allergie au soja
- Et/ou les patients avec une histoire convaincante d'allergie au soja, mais avec un résultat négatif pour le test f14

*Un résultat négatif pour f14 (graine de soja) et positif pour **rGly m 4** (PR-10) est souvent associé à des **réactions locales**.*

*Cependant des **réactions systémiques** peuvent survenir, en particulier chez les patients allergiques au pollen d'arbres apparentés au bouleau lors de la consommation de **grandes quantités de soja peu transformé** (ex: lait de soja).*

Amélioration des tests biologiques, exemple de la noisette (f17)

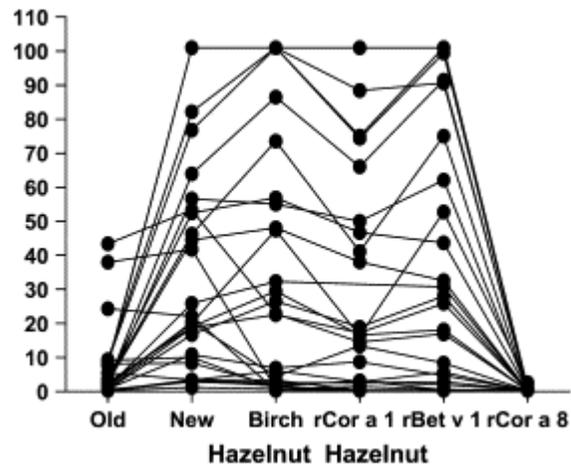


Noisette (f17)

- Cor a1 (PR-10, homologue de Bet v 1) détruite par le chauffage lors de la préparation de f17
- Enrichissement du test f17 en **rCor a 1**

- **Caution:** The Phadia hazelnut ImmunoCAP (f17) has been supplemented with recombinant Cor a1 and now detects Bet v 1-specific IgE, which leads to elevated values for persons with birch pollen allergy

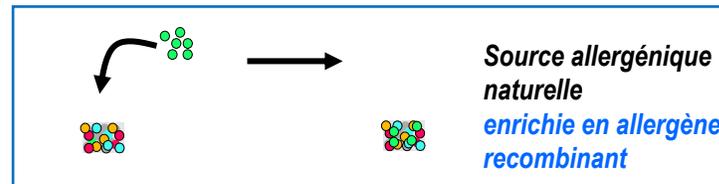
(Sicherer S. et al, JACI, August 2008 413-415)



Moyenne IgE spécifiques $\times 14$
chez patients sensibilisés à Bet v 1

Depuis décembre 2013 : enrichissement en Cor a 8

Amélioration des tests biologiques



Latex (k82)

- Hev b5 : allergène majeur, en faible quantité dans les extraits de latex
- Enrichissement du test k82 en **rHev b5**
- Meilleure détection des patients monosensibilisé à Hev b5



Noix (f256)

- Amélioration du procédé d'extraction pour mieux extraire **Jug r1** (albumine 2s) jusque la peu présent dans l'extrait classique
- Intérêt pour les patients monosensibilisé à Jug r1



Venin de guêpes

- Enrichissement des extraits de guêpe poliste et vespula en antigène 5 (**Pol d5 et Ves v5**)

Apport pratique des allergènes moléculaires

1. Outil pour « dépister » les réactions croisées sur des bases moléculaires et aider à l'interprétation des polysensibilisations cutanées
2. Outil pour améliorer les tests biologiques « classiques »
- 3. Outil pour contribuer à un diagnostic plus spécifique**
4. Outil pour améliorer/personnaliser la prise en charge du patient (immunothérapie spécifique, établir un risque de réactions sévères, indication d'un TPO, éviction)

Allergènes moléculaires et diagnostic plus spécifique

Exemple du latex

Allergènes	Familles moléculaires	Majeur (M) - mineur (m)
Hev b 1	Facteur d'élongation	m
Hev b 2	1,3 β -glucanase	M
Hev b 3	REF-like protéine	m
Hev b 4	Lécithinase	m
Hev b 5	Acidic protein	M
Hev b 6.01	Précurseur de lectine	M
Hev b 6.02	Lectine	M
Hev b 7	Patatin-like protéine	m
Hev b 8	Profiline	m
Hev b 9	Enolase	m
Hev b 10	Superoxyde-dismutase	m
Hev b 11	Chitinase	m
Hev b 12	LTP	m
Hev b 13	Nodulin-like protéine	M

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**

Réaction croisée biologique : latex

- Biologie :
 - Latex : 36,1 kU/L
 - Hev b1 : < 0,10 kU/L
 - Hev b2 : < 0,10 kU/L
 - Hev b3 : < 0,10 kU/L
 - Hev b4 : < 0,10 kU/L
 - Hev b5 : < 0,10 kU/L
 - Hev b6.01: < 0,10 kU/L
 - Hev b6.02: < 0,10 kU/L
 - **Hev b8 : > 100 kU/L**
 - Hev b9 : < 0,10 kU/L
 - Hev b11 : < 0,10 kU/L
- TC négatifs
- Pas d'arguments en faveur d'une allergie au latex
- Mais très pollinique
- Hev b8 : **profiline**
- Réactions croisées avec de nombreux pollens et aliments d'origine végétale

Allergènes moléculaires et diagnostic plus spécifique

Exemple de l'arachide

- IgE spécifiques arachide (extrait total)

	sensibilité	spécificité
f13	100 %	42,5 %

→ Régime d'éviction non pertinent

Allergènes moléculaires et diagnostic plus spécifique

Exemple de l'arachide

Les allergènes de l'arachide

<u>Ara h 1</u>	<u>Ara h 2-6-7</u>	<u>Ara h 3-4</u>	<i>Ara h 5</i>	<u>Ara h 8</u>	<u>Ara h 9</u>
Viciline Globuline 7S	Conglutine Albumine 2S	Légumine Globuline 11S	Profiline	PR 10	LTP
Protéines de stockage <i>Stables chaleur et digestion</i>				<i>Thermosensible</i>	<i>Stable chaleur et digestion</i>
<i>Cor a 11</i> <i>Ses i 3</i> <i>Gly m 5</i> <i>Pis s 1</i>	<i>Cor a 14</i> <i>Ses i 1, 2</i>	<i>Cor a 9</i> <i>Ses i 6,7</i> <i>Gly m 6</i>	<u>Bet v 2</u> <i>Cor a 2</i> <i>Gly m 3</i>	<u>Bet v 1</u> <i>Cor a 1</i> <u>Glym 4</u>	<u>Cor a 8</u>
Allergènes majeurs Réactions sévères			Allergène mineur	Syndrome oral	Réactions parfois sévère

Vers un diagnostic biologique plus spécifique

	sensibilité	spécificité
f13	100 %	42,5 %
Ara h 2	98,9 %	97,5 %
Ara h 1	78,7 %	95 %
Ara h 3	66 %	92,5 %

Nancy

Codreanu F, Collignon O, Roitel O, Thouvenot B, Sauvage C, Vilain AC, et al.
A novel immunoassay using recombinant allergens simplifies peanut allergy diagnosis.
Int Arch Allergy Immunol 2011; 154:216-26.

Apport pratique des allergènes moléculaires

1. Outil pour « dépister » les réactions croisées sur des bases moléculaires et aider à l'interprétation des polysensibilisations cutanées
2. Outil pour améliorer les tests biologiques « classiques »
3. Outil pour contribuer à un diagnostic plus spécifique
4. Outil pour **améliorer/personnaliser la prise en charge du patient** (immunothérapie spécifique, établir un risque de réactions sévères, indication d'un TPO, éviction)

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

Famille des LTP

- Protéines stables à la chaleur : réaction avec les aliments crus et cuits
- Protéines stables à la digestion : réactions souvent systémiques
- Allergies alimentaires aux fruits en l'absence d'allergie pollinique
- Réactions allergiques aux fruits et légumes du sud de l'Europe



Cor a 8



Pru p 3



Zea m 14



Pru av 3



Pru ar 3



Ara h 9



Mal d 3



Jug r 3

LTP

rPar j 2
nArt v 3
Ole e 7
Pla a3
nPru p 3
rCor a 8
Ara h 9
Mal d 3
Jug r 3
Tri a 14

Les protéines de stockage

Raisonnement par source allergénique ou par familles moléculaires



Prolamines

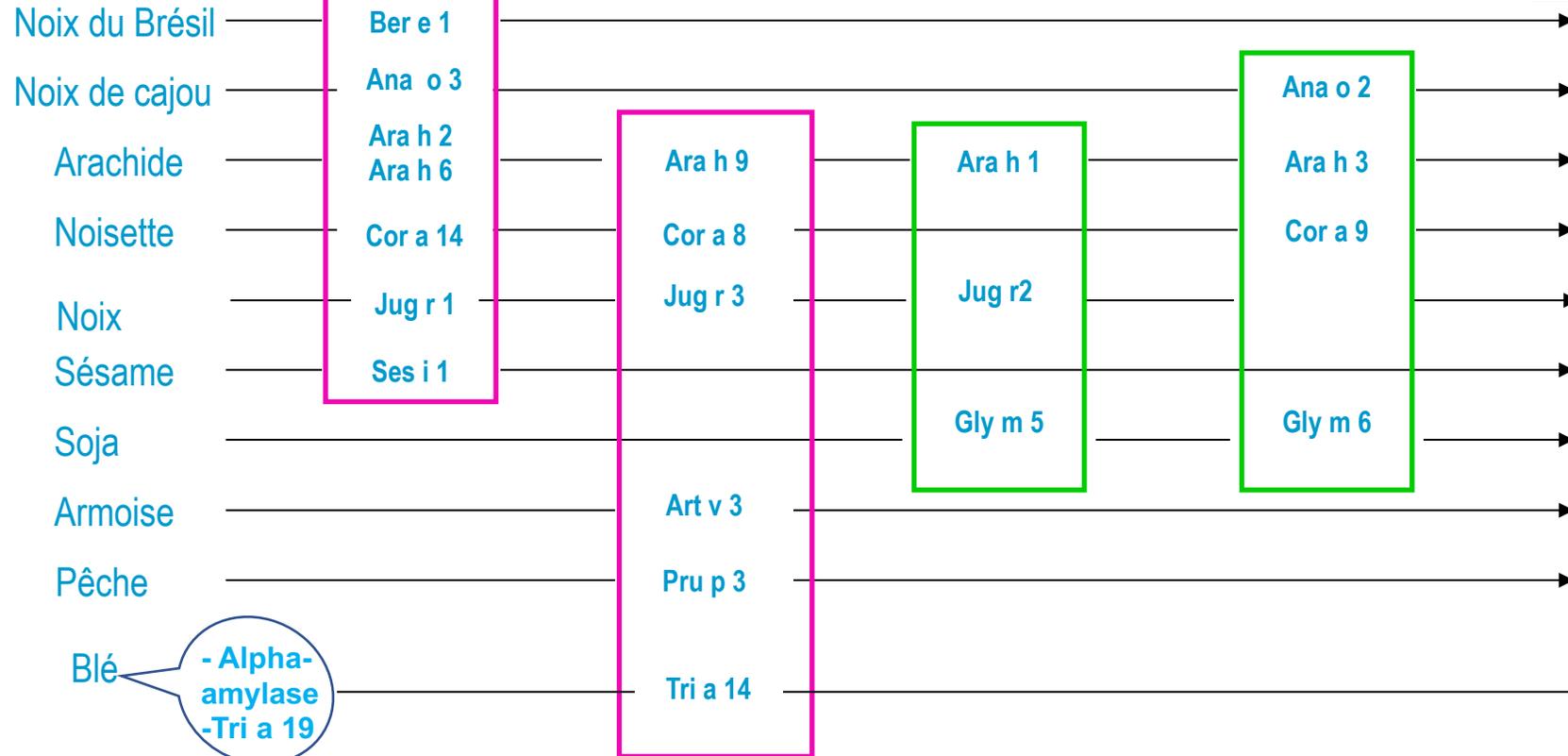
Cupines

Albumines 2S

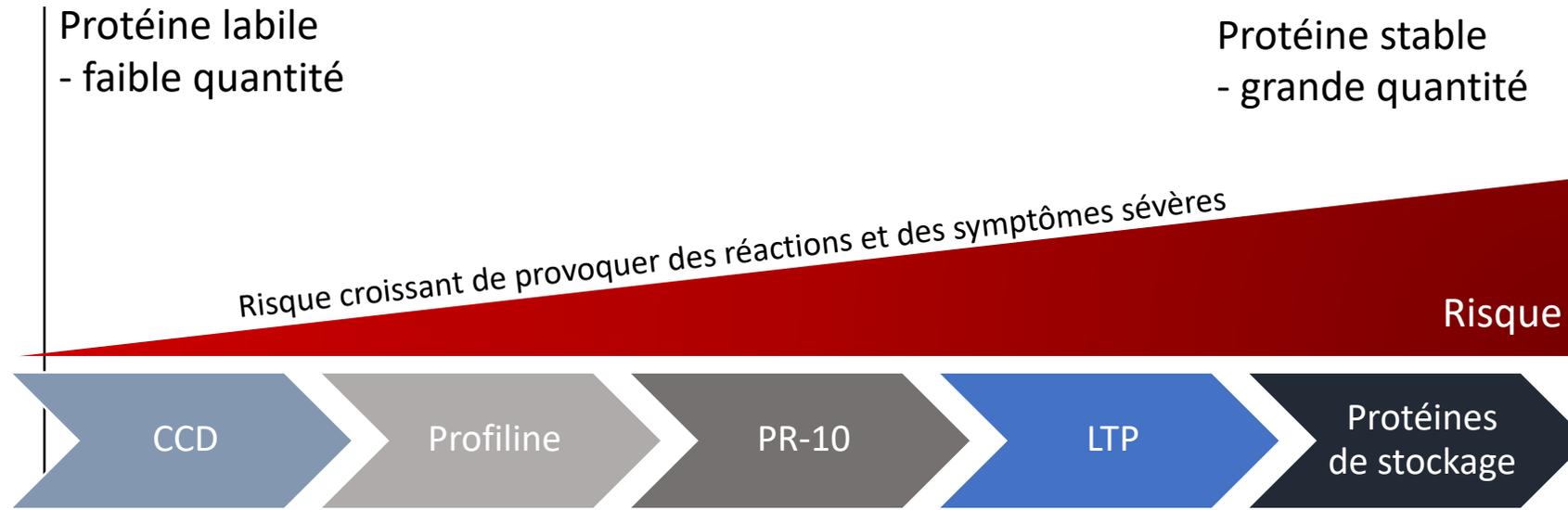
LTP

Vicilines
Globulines 7S

Légumine
Globulines 11S

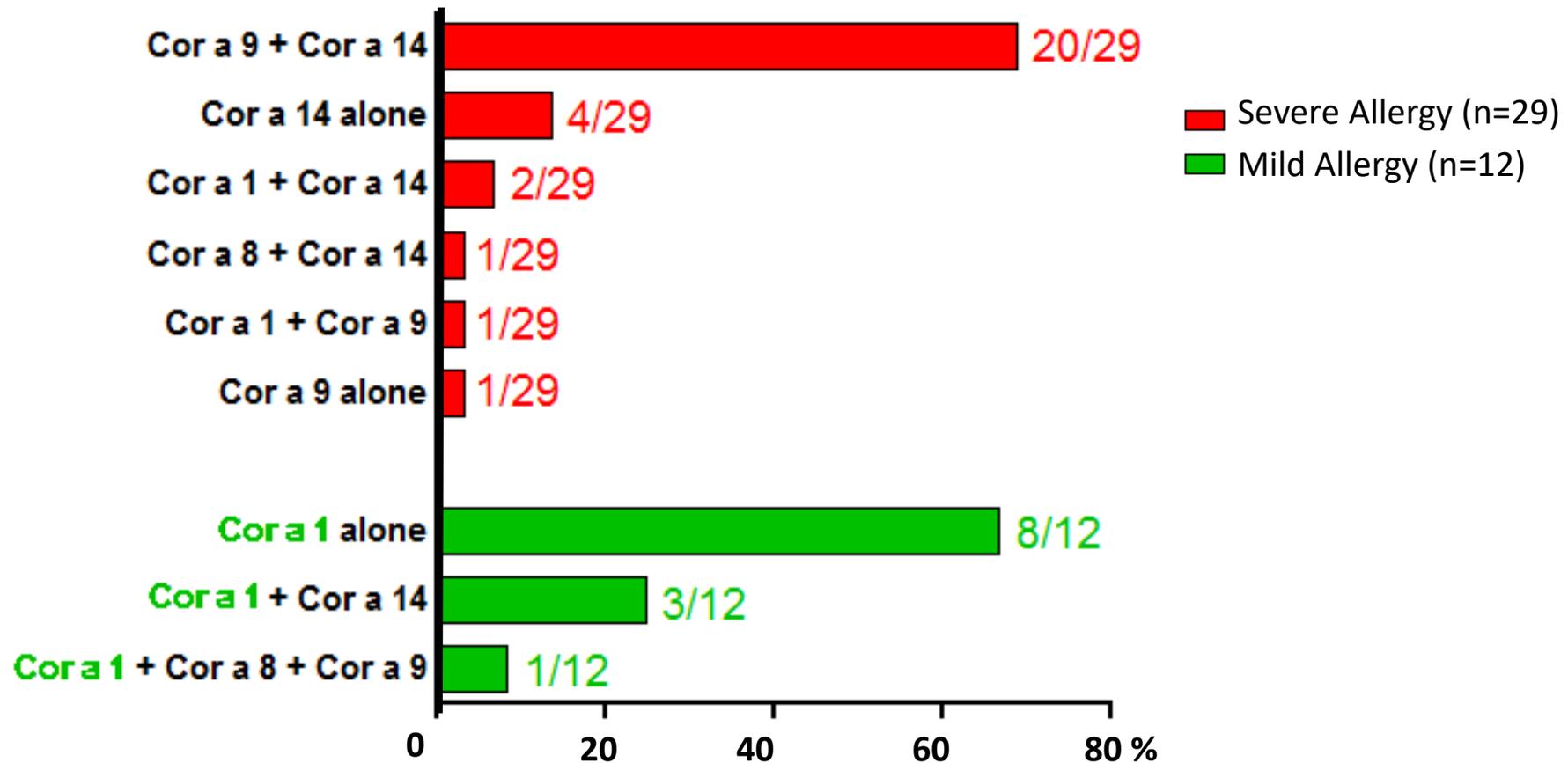


Evaluation (simplifiée) du risque en fonction de la famille moléculaire



- ❑ Identification de **marqueurs de sévérité** de l'allergie
- ❑ Identification de **marqueurs de persistance** de l'allergie
- Basé sur les propriétés physicochimiques des protéines allergéniques

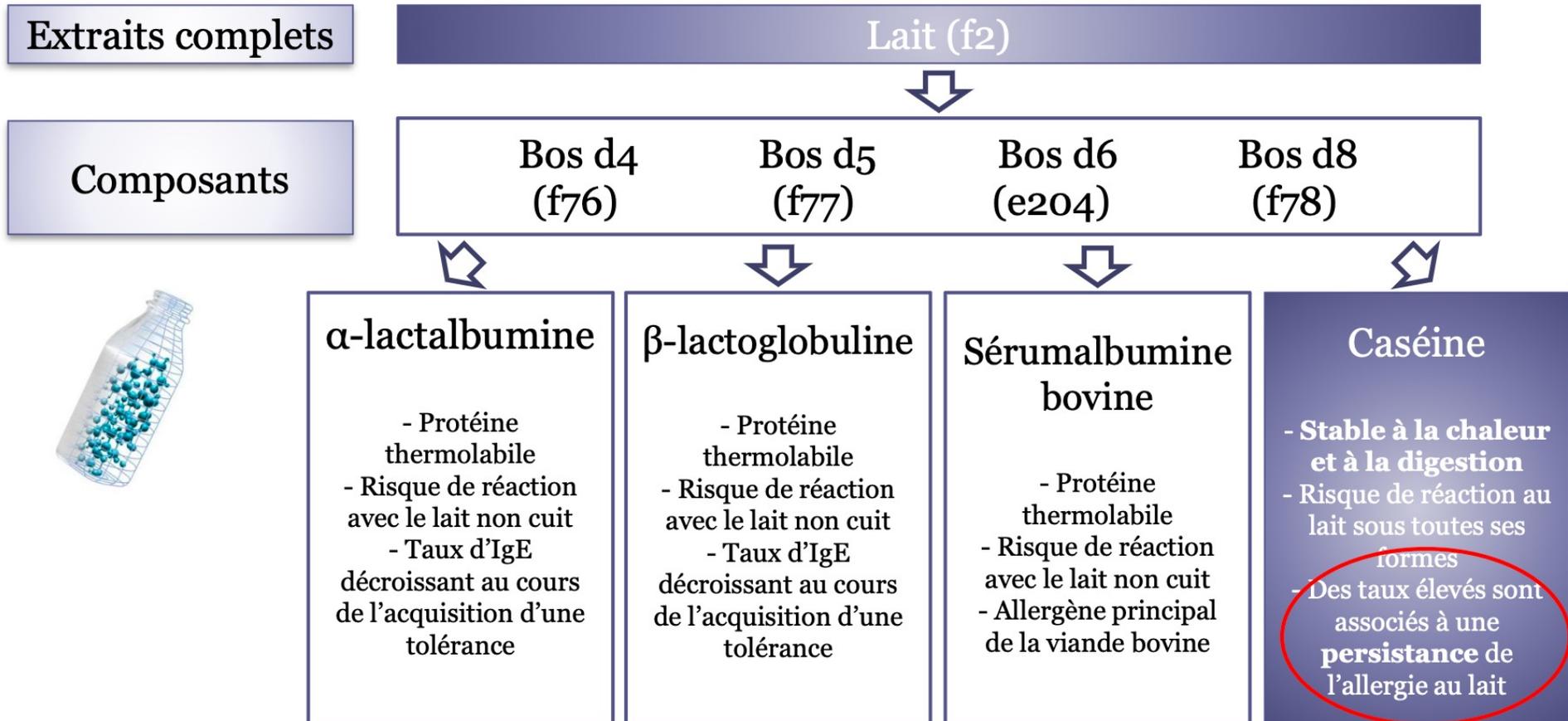
Identification de marqueurs de sévérité : exemple de la noisette



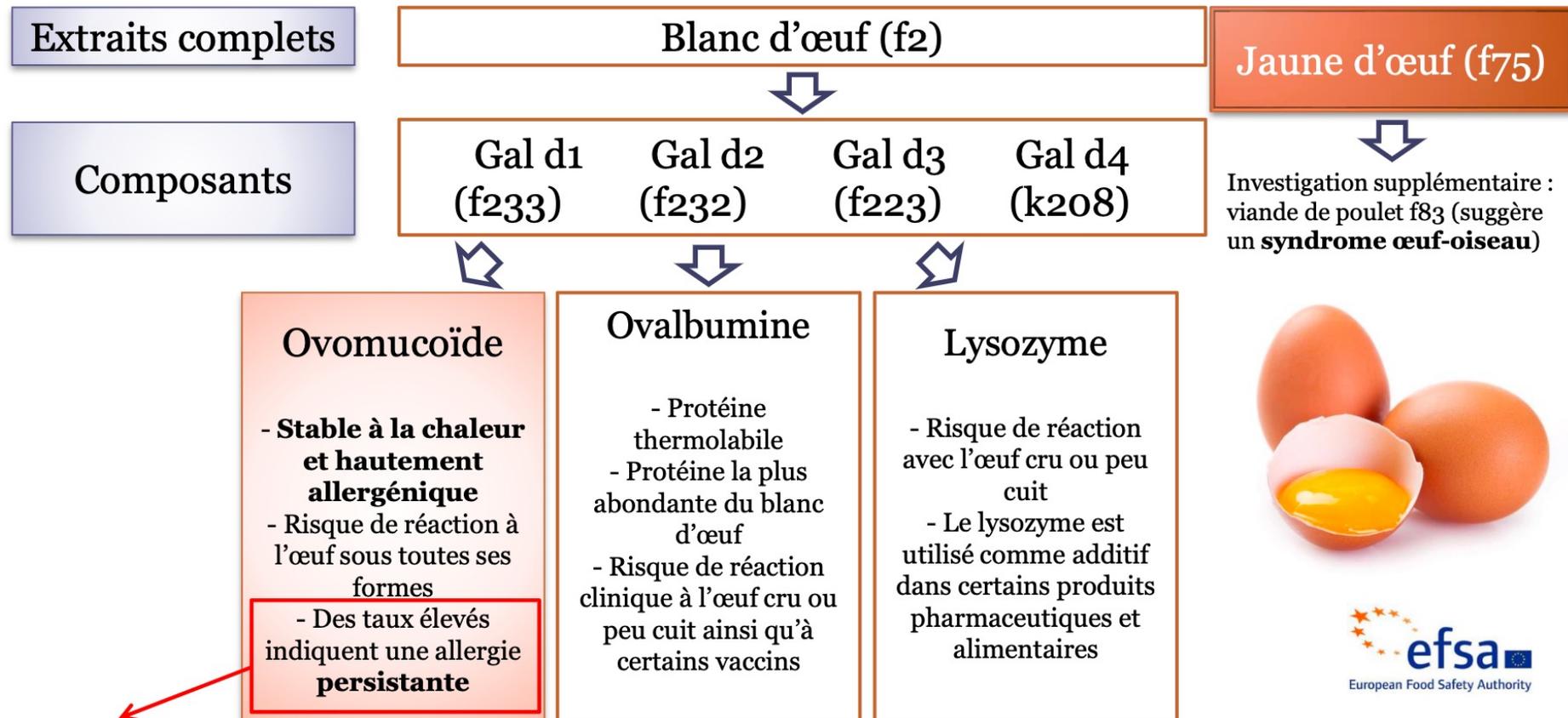
Identification de marqueurs de persistance de l'allergie

1. Confirmation de l'allergie IgE médiée

2. Aide à la prise en charge



Identification de marqueurs de persistance de l'allergie



tolérance si < 1kU/L

réaction clinique / persistance si > 11 kU/L

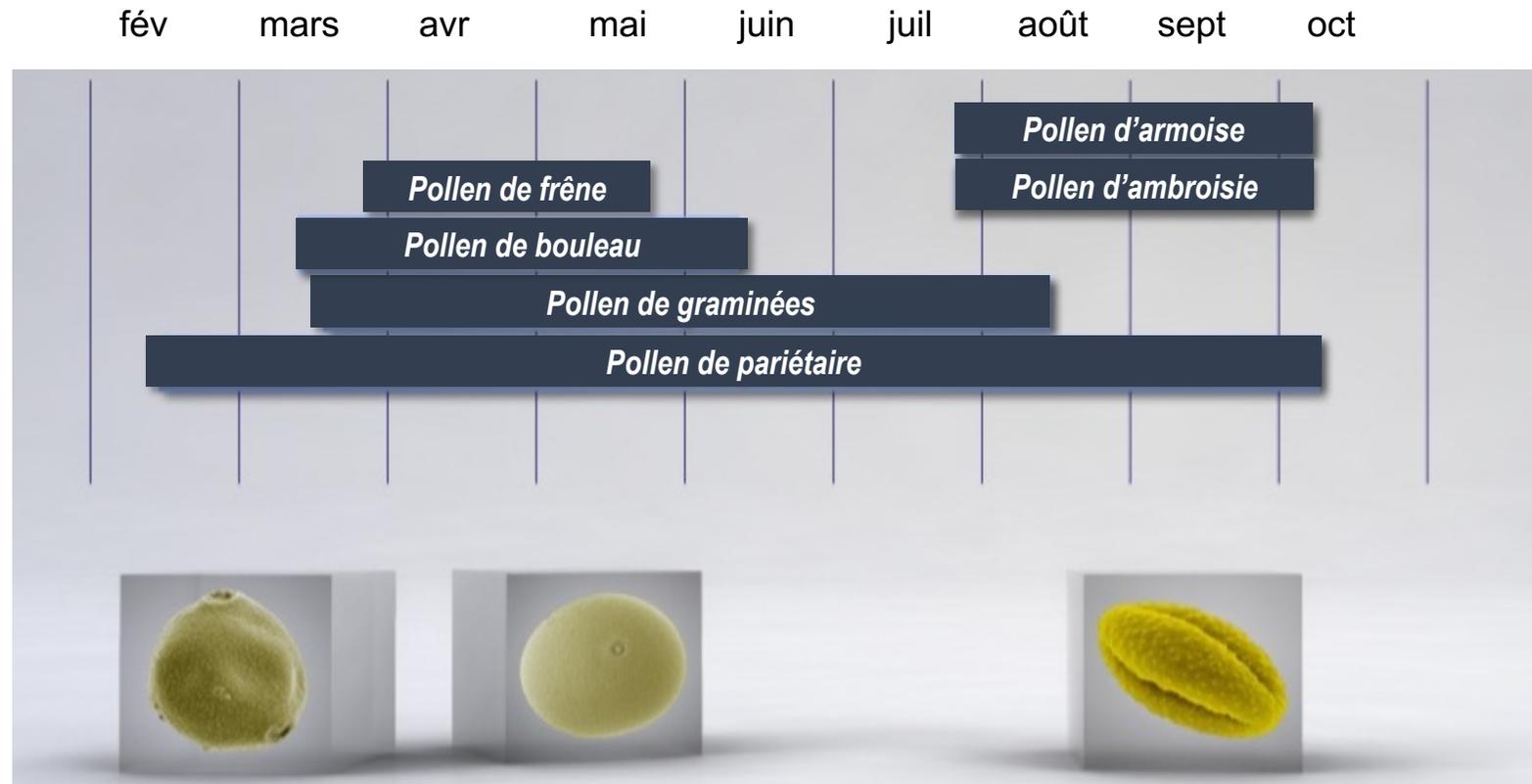
State of the art and new horizons in the diagnosis and management of egg allergy
 Benhamou A. H., Caubet J.-C., Eigenmann P. A., Nowak-We, grzyn A, Marcos C. P., Reche M, Urisu A. Allergy 2010,65, 283–289

Outils pour améliorer les indications de l'immunothérapie spécifique

- Polysensibilisation à des pollens...



Les saisons polliniques se chevauchent



Outils pour améliorer les indications de l'immunothérapie spécifique

- Est-ce de vraies sensibilisations dues à des composants spécifiques ?



Outils pour améliorer les indications de l'immunothérapie spécifique

- ... ou une réactivité croisée due à des composants « croisants » ?



Outils pour améliorer les indications de l'immunothérapie spécifique

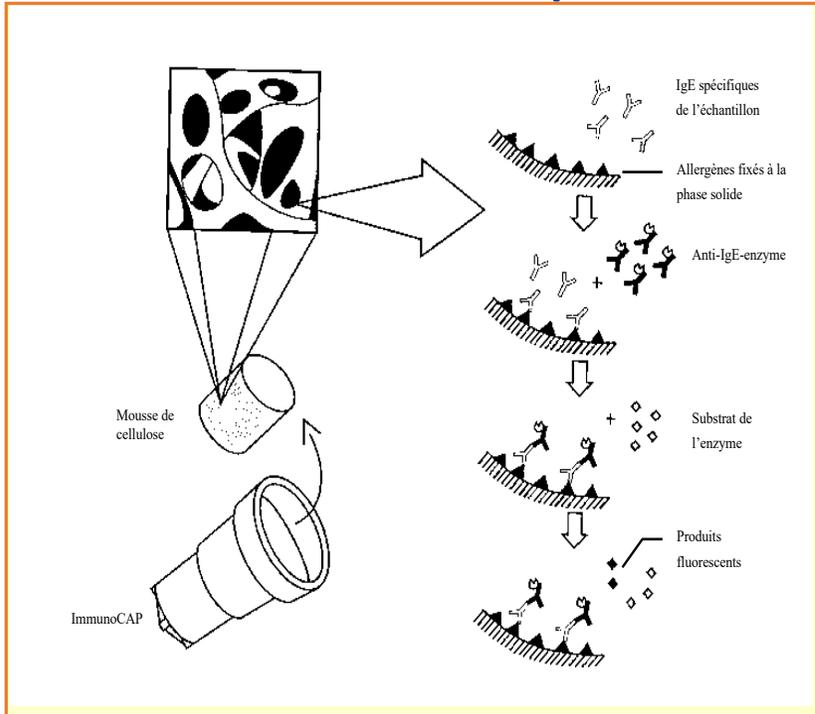
	Composants allergéniques marqueurs d'une vraie sensibilisation	Composants allergéniques marqueurs de réactivité croisée*
Arbres	<p>Bouleau rBet v 1</p> <p>Cyprès nCup a 1</p> <p>rOle e 9</p>	<p>Profiline rBet v 2</p> <p>Polcalcine</p>
Graminées	<p>Phléole rPhl p 1</p> <p>rPhl p 5b</p> <p>rPhl p 1+ 5b</p>	<p>Profiline rPhl p 7</p> <p>Polcalcine rPhl p 12</p> <p>rPhl p 7 + 12</p>
Herbacées	<p>Armoise nArt v 1</p> <p>nArt v 3</p> <p>Ambroisie nAmb a 1</p>	

**Une immunothérapie a plus de chances de réussir
chez les patients sensibilisés
à des composants spécifiques du pollen**

Les allergènes moléculaires en pratique

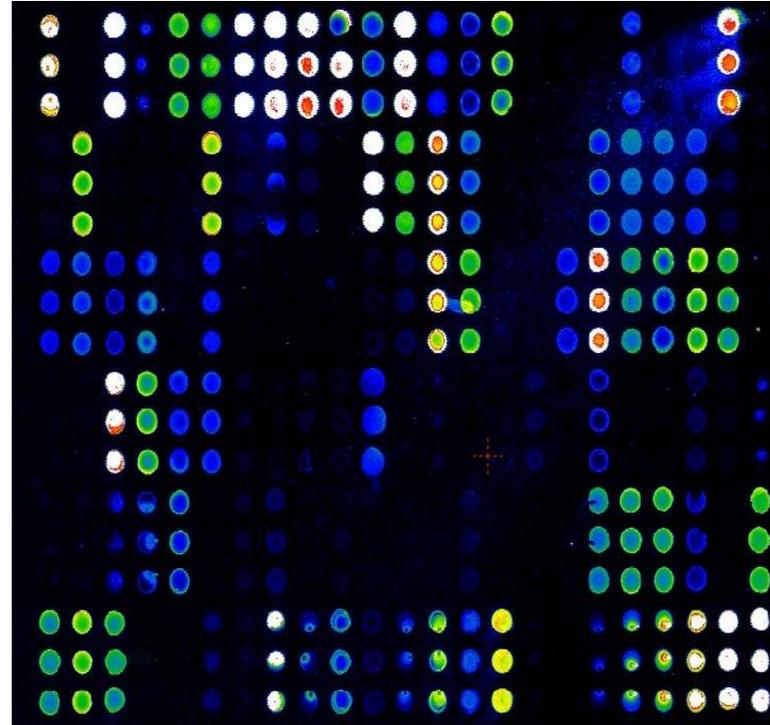
Test unitaire / Biopuce multiallergénique

ImmunoCAP® classique



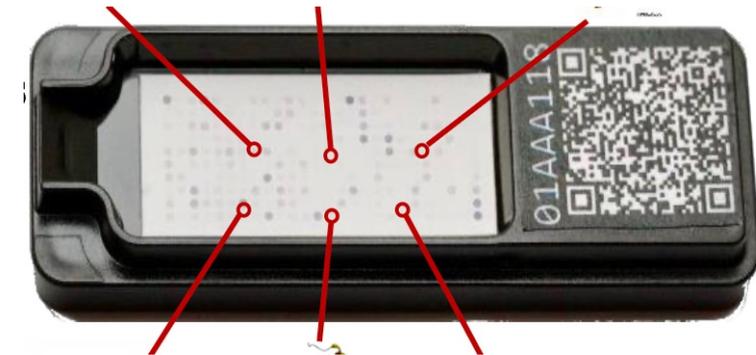
Un *unique* résultat pour
1 source allergénique ou
1 allergène moléculaire

ImmunoCAP ISAC®



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

Test ALEX®



282 allergènes fixés sur des
microbilles
- 156 extraits
- 126 allergènes moléculaires
Semi-quantitatif

Qu'est-ce que la technologie Biopuce?

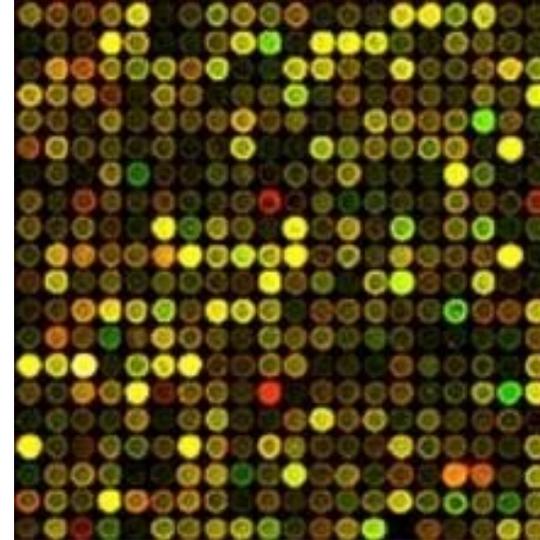
Faible quantité de sérum ($< 100\mu\text{L}$)

Fixation de différentes biomolécules sur un format microscopique

Détermination d'un profil de sensibilisation

Obtention d'un grand nombre de résultats simultanément : « Vision élargie »

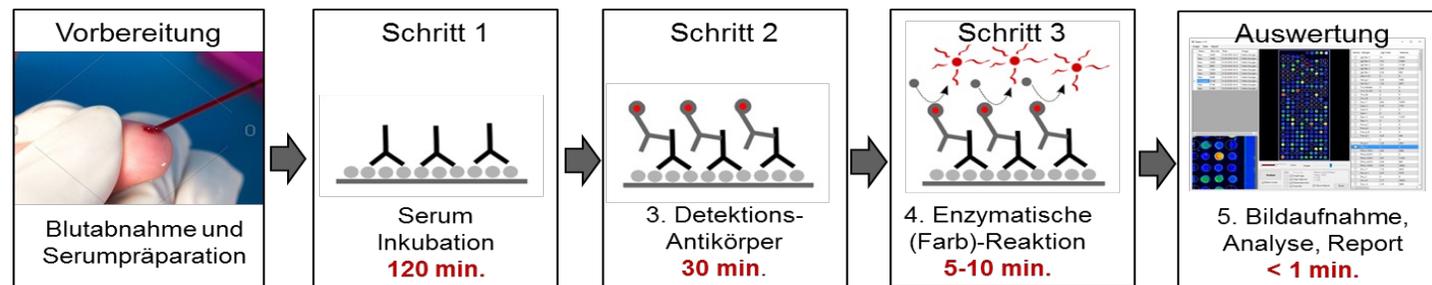
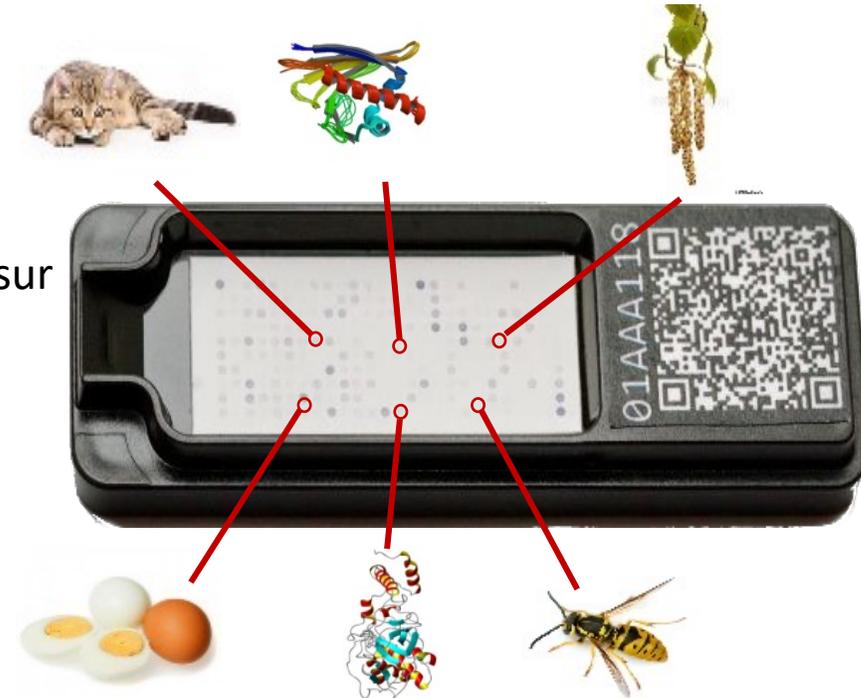
Possibilité d'explorations parallèles (ex : IgE/IgG)



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

Biopuces multiallergéniques : Test ALEX – Macroarray Diagnostics

- 282 allergènes fixés sur des microbilles
 - 156 extraits
 - 126 allergènes moléculaires
- Dosage semi-quantitatif : calibrateurs intégrés sur chaque biopuce
- Estimation du taux d'IgE totales
- Signal colorimétrique
- Commercialisé en France par Nephrotek

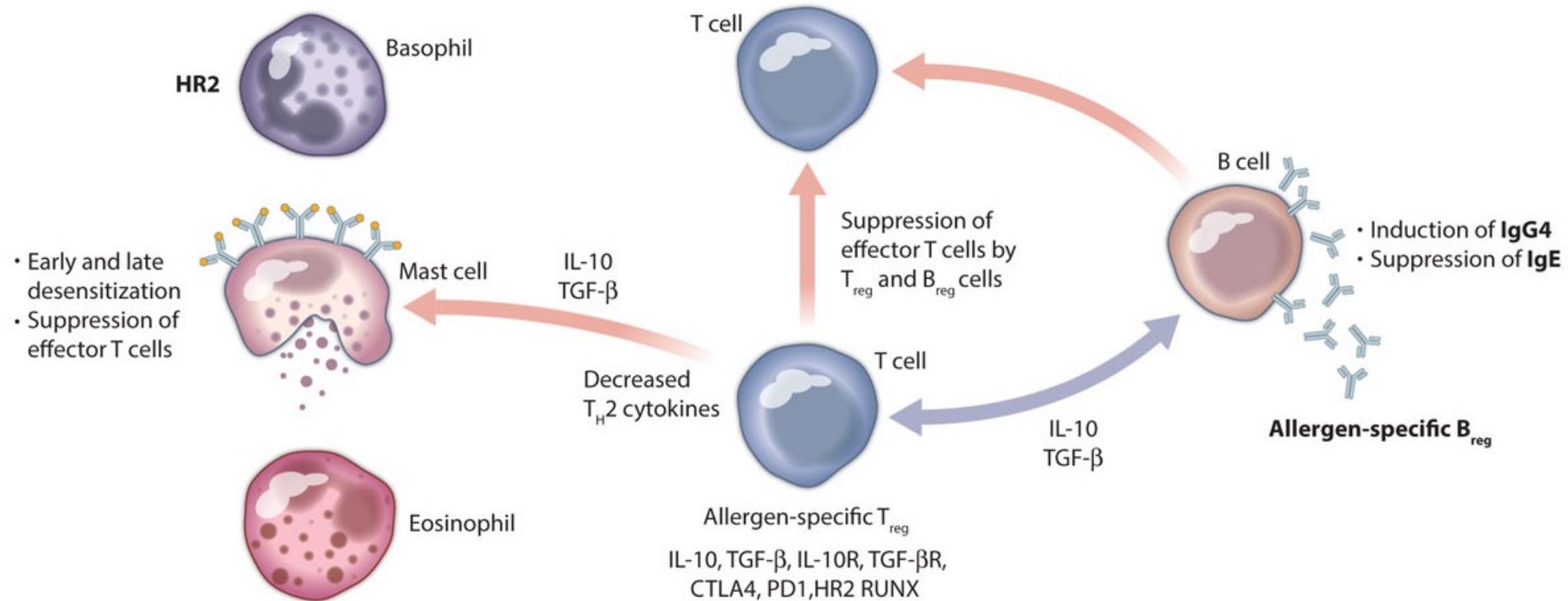


Indications des biopuces multi-allergéniques

- Définition du profil de sensibilisation d'un polysensibilisé
 - Asthme sévère
 - Allergies alimentaires multiples et sévères
 - Poser l'indication d'une immunothérapie spécifique chez un polysensibilisé
- Histoire clinique mal ou non expliquée par les tests traditionnels
- Pathologies nécessitant un bilan allergologique étendu au diagnostic
- Diagnostic d'élimination de l'allergie
- Etudes épidémiologiques
- Limites :
 - Souvent moins sensibles que les tests unitaires
 - Non exhaustifs !

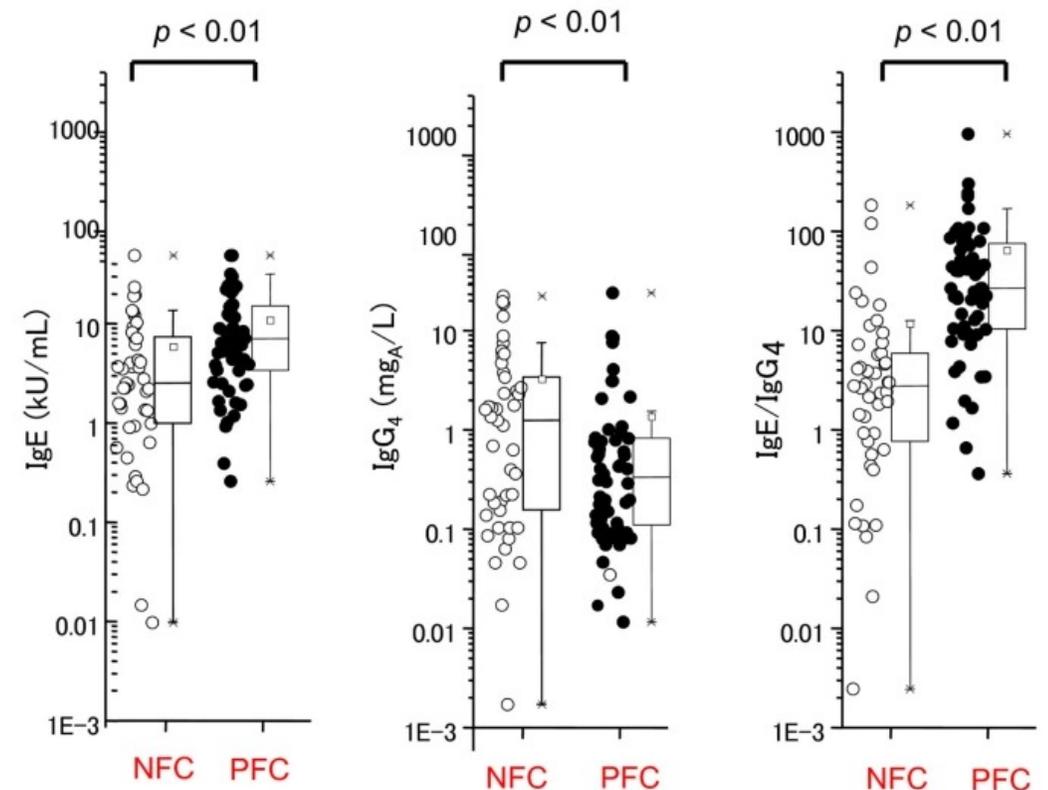
IgG4 spécifiques

- Mécanismes de tolérance



IgG4 spécifiques

- Production d'IgG4 spécifiques de l'allergène induite au cours de l'ITS
- Suivi de la concentration en IgG4
- Suivi du ratio IgG4/IgE
- ITS aliments, venin d'hyménoptère

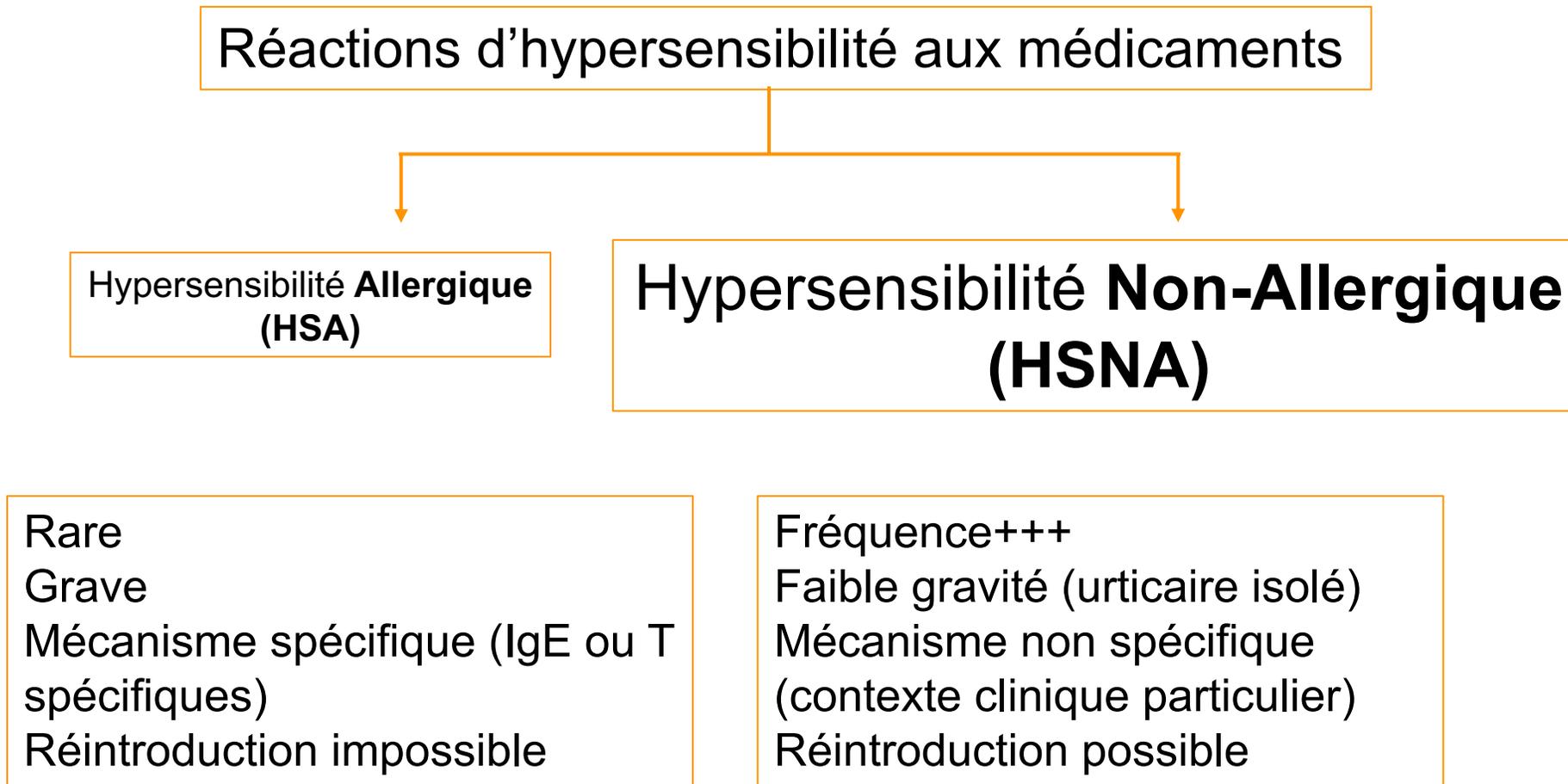


Dot plots and Whisker's box plots showing levels of specific IgE (left column), IgG₄ (middle column), and IgE/IgG₄ ratio (right column) to determine the NFC (negative food challenge) or PFC (positive food challenge) group of egg allergy. 76

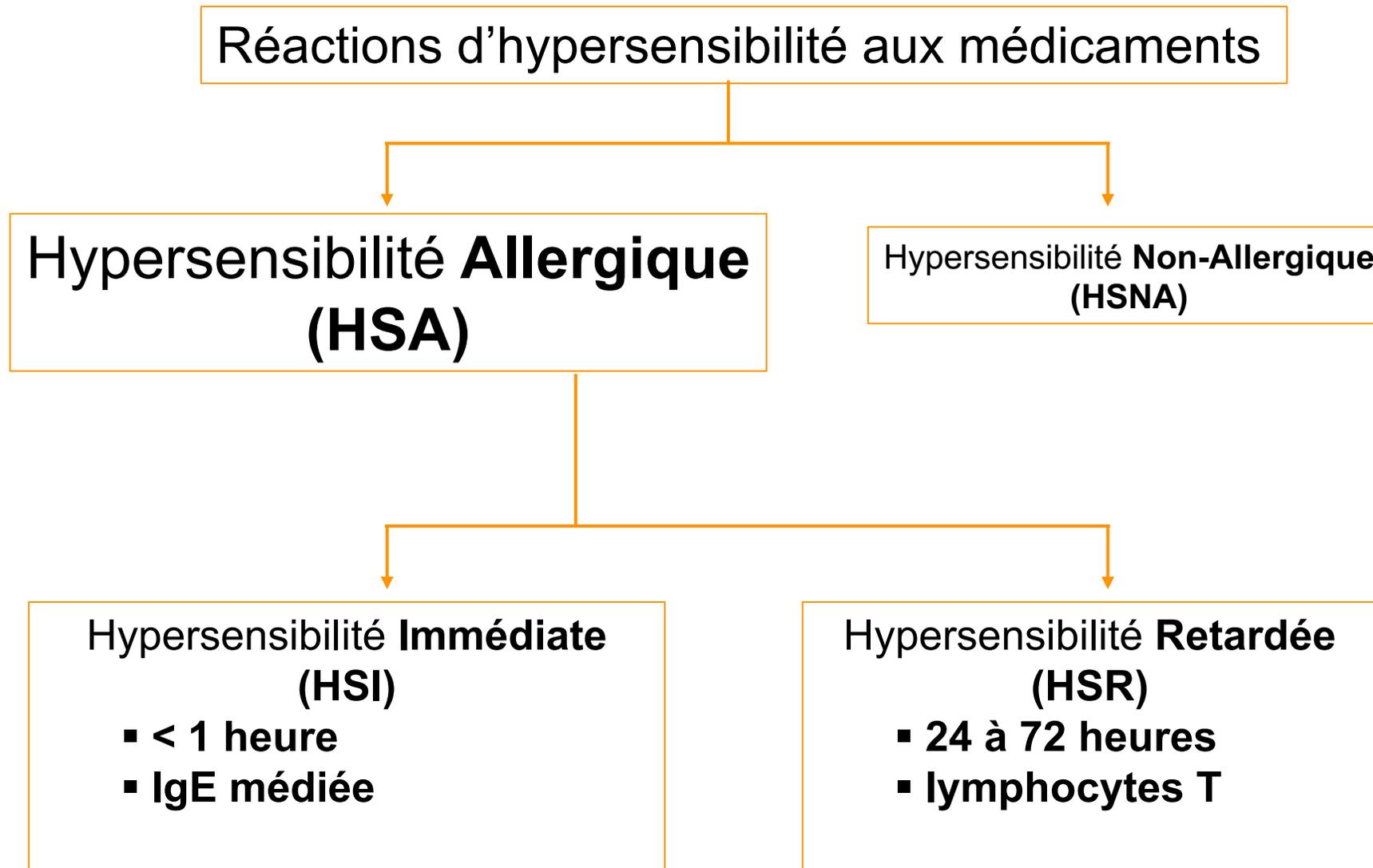
Tests cellulaires

Tests d'activation des basophiles

Réactions d'hypersensibilité aux médicaments



Réactions d'hypersensibilité aux médicaments



Limites du dosage des IgE spécifiques

1. Nombre limité de tests commerciaux disponibles pour certains antigènes (médicaments) pour des raisons :
 - Techniques : Difficulté de produire des réactifs pour doser des IgE spécifiques dirigées contre des haptènes
 - Commerciales : Fréquence faible des allergies médicamenteuses par rapport aux allergies aux antigènes protéiques (respiratoires, alimentaires et venins)
2. Le dosage des IgE spécifiques est un dosage **quantitatif**, qui ne prend pas en compte l'affinité de l'IgE vis-à-vis de l'Ag
 - Quantité d'IgE n'est pas forcément un signe de gravité de l'allergie
 - Certains individus ont des IgE spécifiques sans être allergique : sensibilisation biologique

Limites du dosage des IgE spécifiques

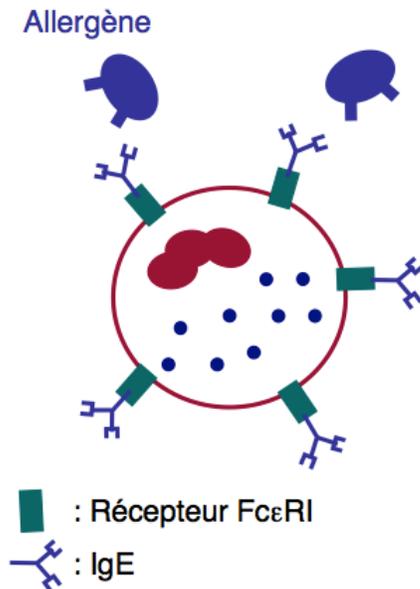
Nécessité de développer des tests « à la carte » permettant de tester n'importe quel allergène (ie : médicament qu'a reçu le patient lors de son accident)

= Test d'Activation des Basophiles

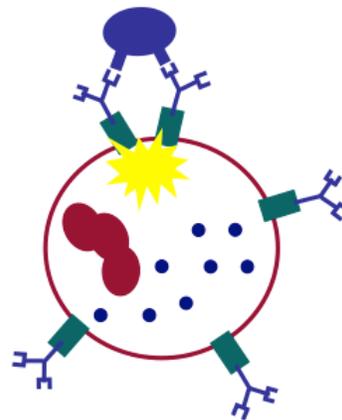
Test d'Activation des Basophiles (TAB)

- Principe :
 - Reproduire *in vitro* les conditions ayant conduit aux phénomènes allergiques cliniques observés chez le patient :

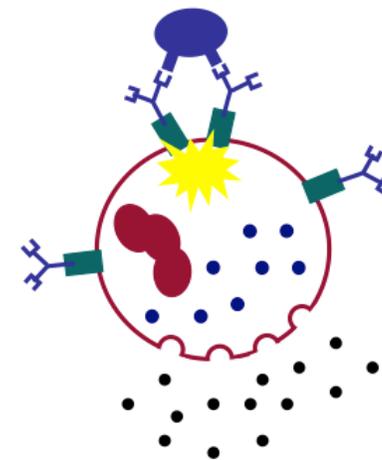
Incubation des basophiles sensibilisés avec l'allergène ayant provoqué la réaction



Pontage des récepteurs R_{cε}RI par l'allergène

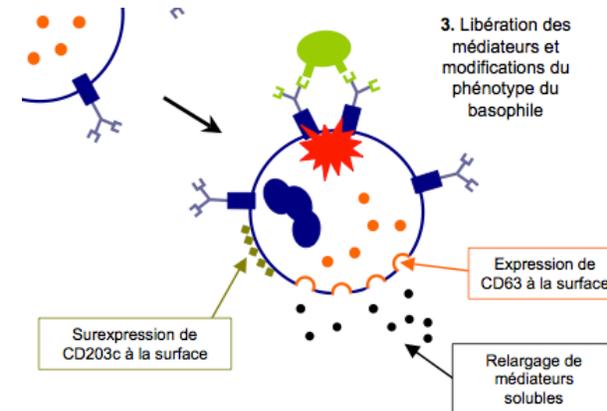
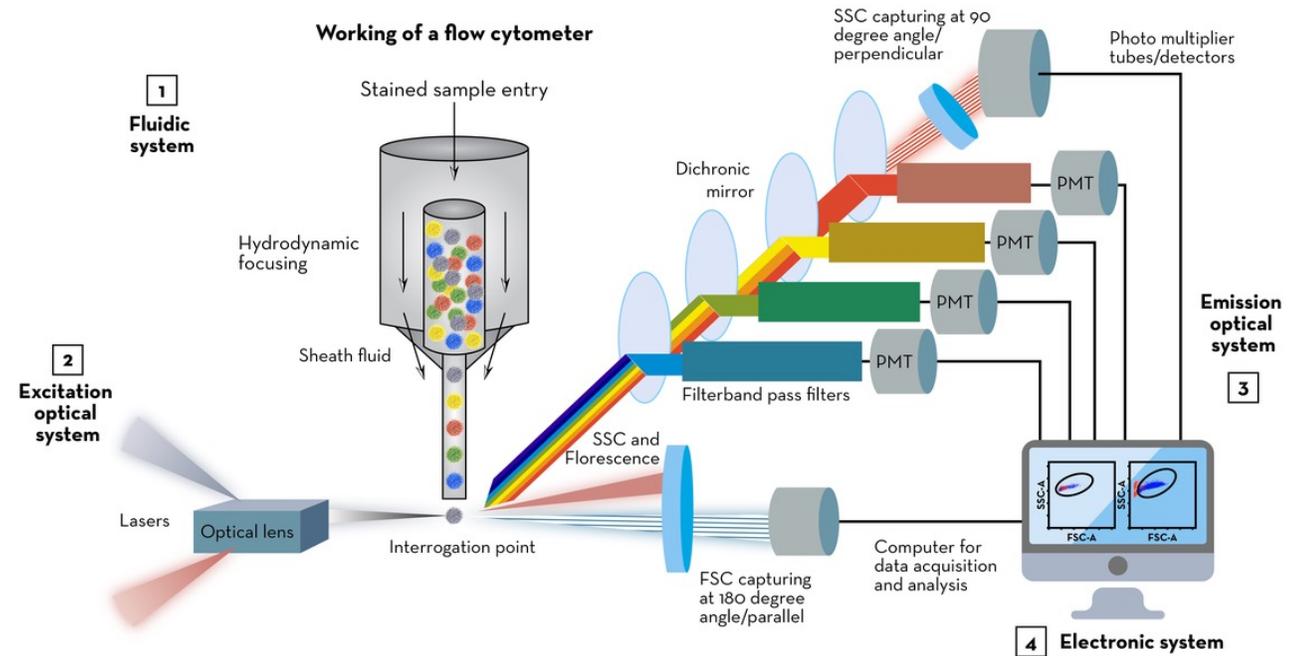


Libération des médiateurs et modification du phénotype du basophile



Identification des basophiles en 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

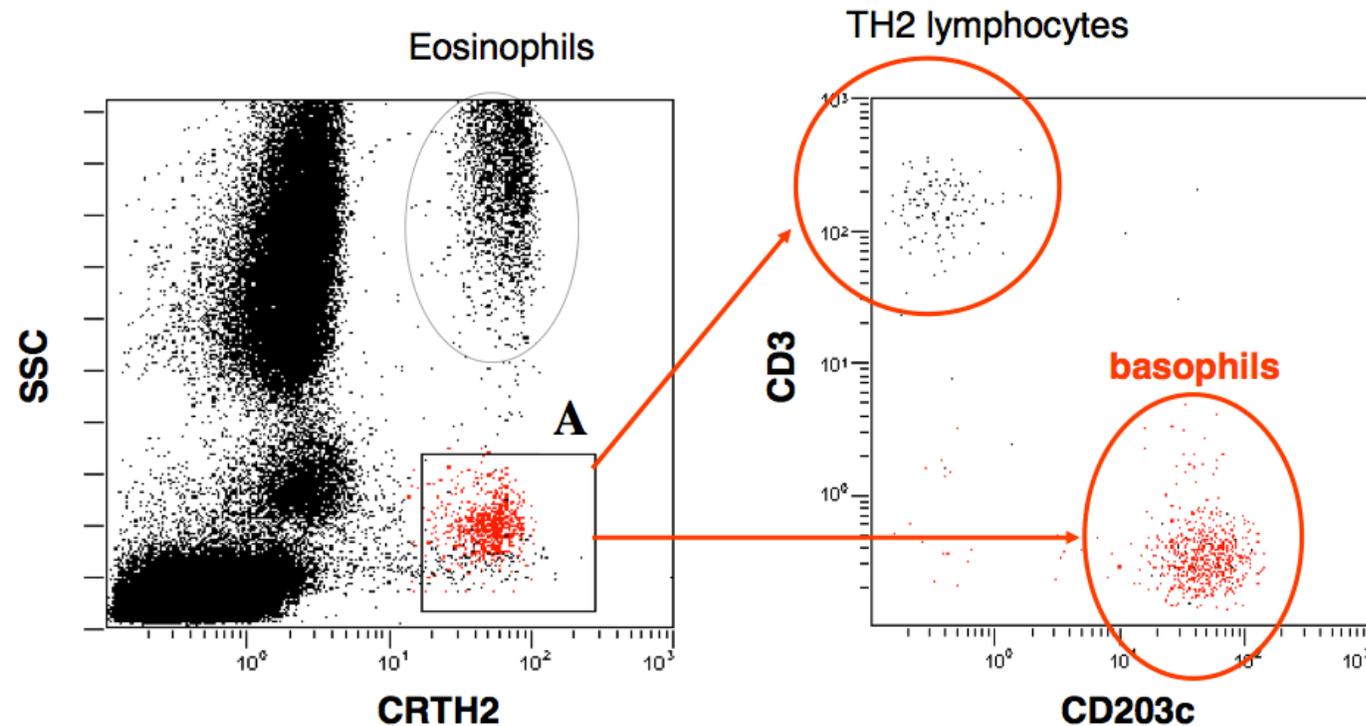
- ✓ **Réalisation de contrôles:**
 - Contrôle **négatif**: en présence de tampon seul
 - Contrôle **positif** : stimulation par anti-IgE ou anti-récepteur FcεRI
N.B. ≈ 10% de non répondeurs

- ✓ **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

Identification des basophiles en cytométrie en flux

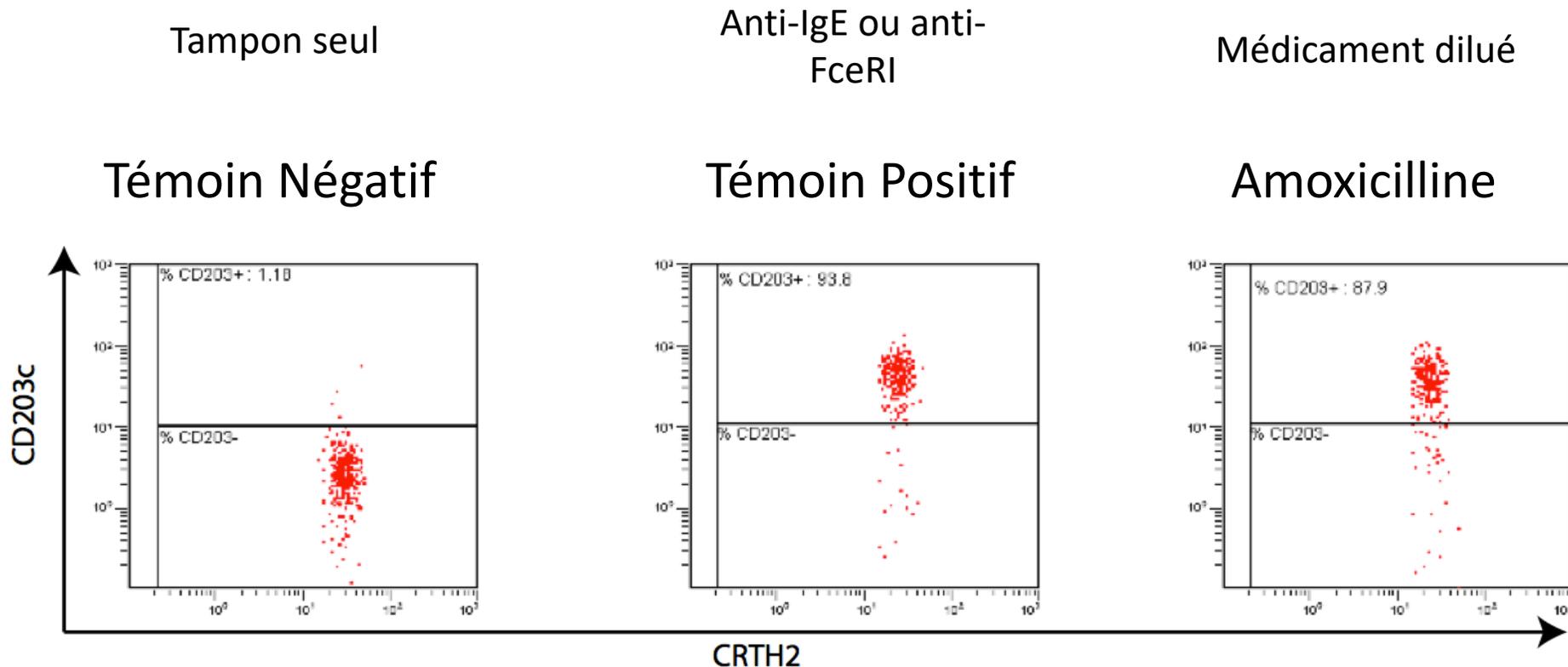
- Pas de consensus sur l'identification des basophiles
- Marquages les plus utilisés :
 - CD3-, CRTH2+
 - CCR3+, Faible SSC



Principaux marqueurs d'activation des basophiles

	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



- Expression en % de basophiles activés et/ou index de stimulation
- Seuil de positivité : 10% voire 5%, à définir pour chaque médicament

Principaux médicaments testés

- Antibiotiques :
 - B-lactamines,
 - Fluoroquinolones
- Curares
- Produits de contraste iodés
- Anesthésiques locaux
- Bleu patente
- Produits de chimiothérapie (Platines, Taxol)

β -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 \pm ST \pm IgE \pm DPT	CD63	49	91	110
Abuaf <i>et al.</i> (2008)	H \pm ST	CD203c CD63	52 22	100 79	41
Eberlein <i>et al.</i> (2010)	H \pm ST \pm 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

Caractéristiques des 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**

TAB : suivi des ITS

- ITS aliments :

Lait de vache, blanc d'œuf, poisson, arachide, noisette, pistache, blé...

- Venins d'hyménoptère

En résumé sur l'hypersensibilité de type I

- Allergie = sensibilisation + symptômes cliniques
- Outils biologiques :
 - Objectiver un accident anaphylactique : Histamine / Tryptase
 - Mettre en évidence une sensibilisation à des trophallergènes, pneumallergènes, venins, certains médicaments : IgE spécifiques
 - TAB utilisés lorsque les dosages d'IgE spécifiques ne sont pas disponibles. (médicaments)
 - Pas d'intérêt du dosage des IgE totales
- Apport des allergènes moléculaires :
 - Amélioration des tests biologiques classiques
 - Réactions croisées
 - Prise en charge (sévérité/indication d'une ITS)
- Interprétation d'un bilan biologique : tenir compte de l'anamnèse et de la clinique (importance du dialogue biologiste/clinicien)

Merci de votre attention

Des questions ? : anais.nombel@chu-lyon.fr