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

La science pour la santé
From science to health

Take-home messages

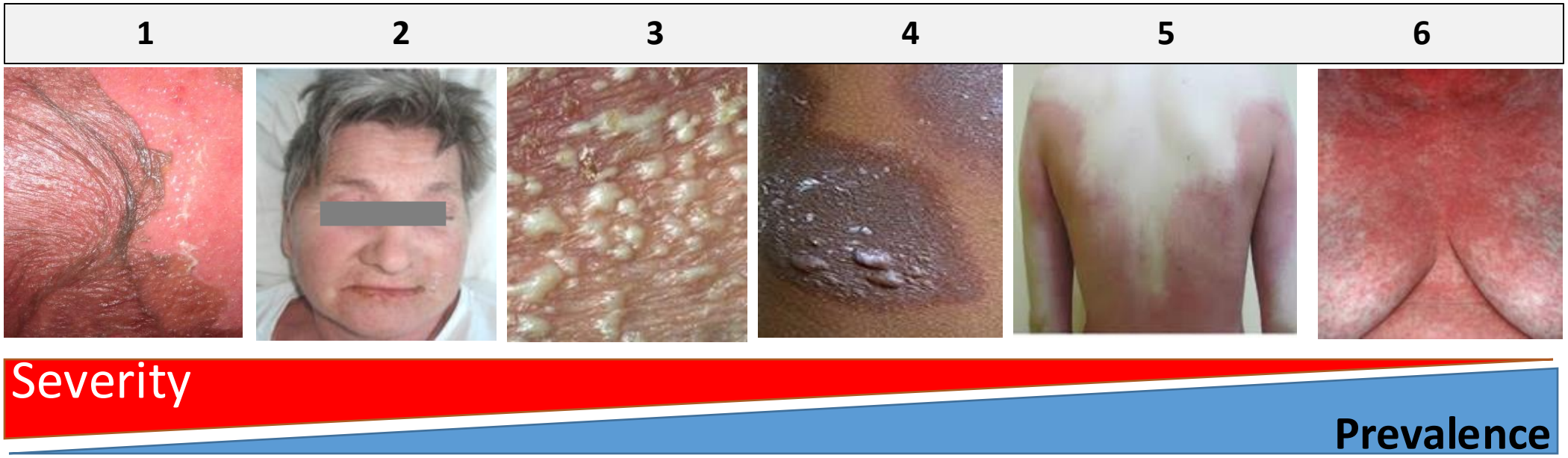
- **Les tests immunobiologiques sont basés sur la compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans les réactions d'hypersensibilité retardée.**

- **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 aigue généralisée

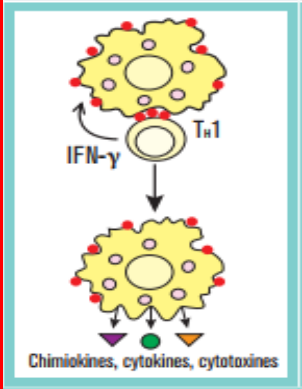
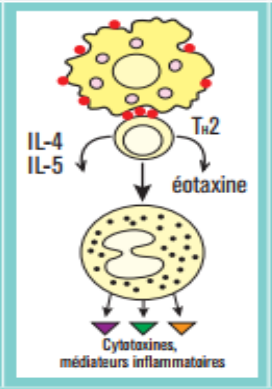
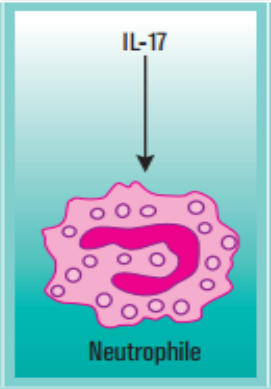
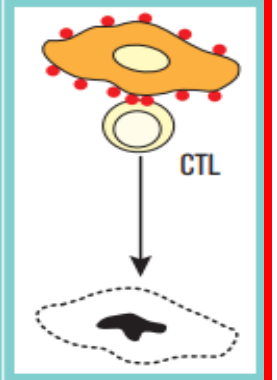
4 – EPF: érythème pigmenté fixe

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

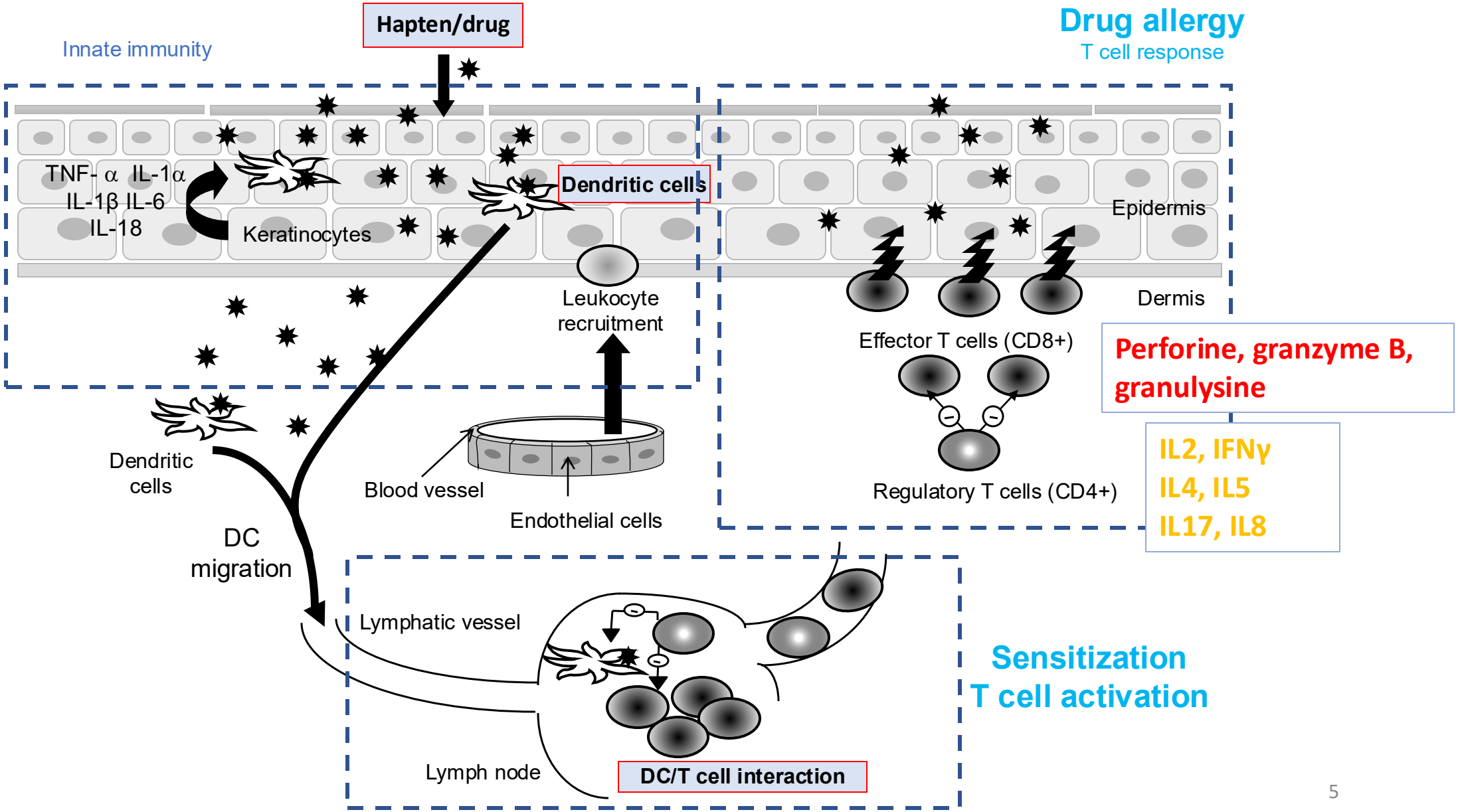
6– EMP: exanthème maculopapuleux

Physiopathologie

CLASSIFICATION DES MALADIES ALLERGIQUES (ET AUTO-IMMUNES) SELON GELL & COOMBS

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

Physiopathologie



D'après Nosbaum et al. Eur J Dermatol 2011

Physiopathologie

- IVa: **Lymphocytes Th1, IFNγ**, macrophages

  →**EMP**

- IVb: **Lymphocytes Th2, IL5**, polynucléaires éosinophiles

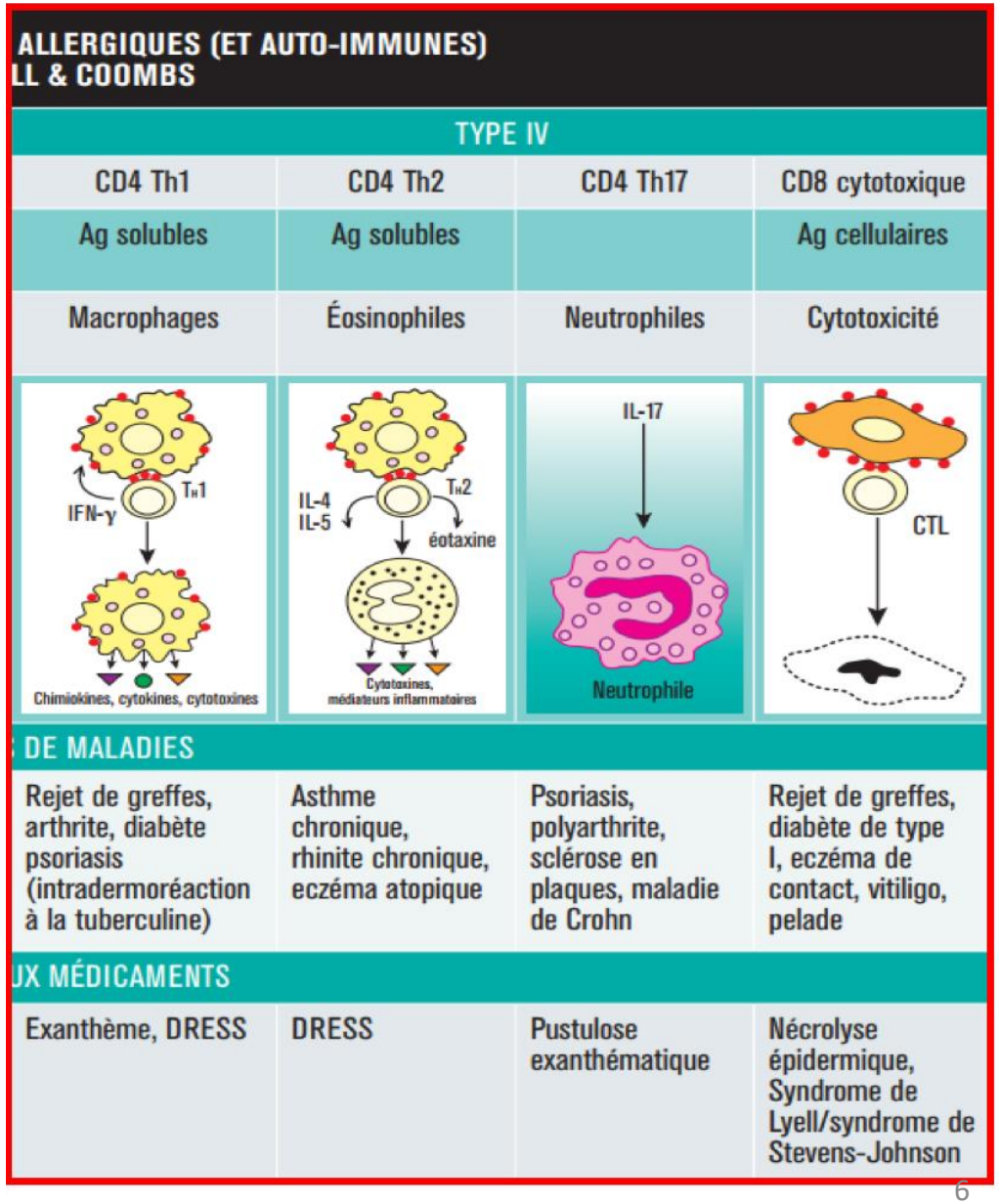
  →**DRESS**

- IVc: **Lymphocytes TCD8+ cytotoxiques, granzyme B, perforine, granulysine**

  →**SJS/NET**

- IVd: **Lymphocytes Th17, IL17, IL8**, polynucléaires neutrophiles

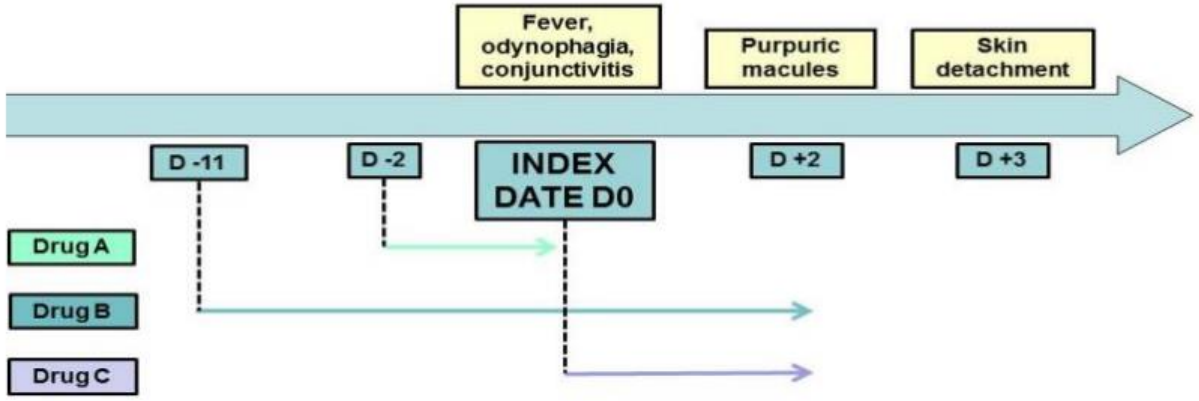
  →**PEAG**



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

Diagnostic des hypersensibilités retardées médicamenteuses

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



RegiSCAR Item		RegiSCAR Item Score if Present		RegiSCAR Item Score if Absent
Fever ≥38.5°C		0		-1
Enlarged lymph nodes (>1 cm size, at least 2 sites)		1		0
Eosinophilia				
≥700 or ≥10%	≥1,500/µL ≥20%	1	2	0
Atypical lymphocytes		1		0
Rash ≥50% of body surface area		1		0
Rash suggestive (≥2 of facial edema, purpura infiltration, desquamation)		1		0
Skin biopsy suggesting alternative diagnosis		-1		0
Disease duration >15 days		0		-2
Organ involvement				
1 organ	≥2 organs	1	2	0
Investigation for alternative cause (blood cultures, antinuclear antibodies, serology for hepatitis viruses, mycoplasma, chlamydia) ≥3 done and negative		1		0
Total				

*Total score <2: excluded; 2-3: possible; 4-5: probable; ≥6: definite.

Diagnostic des hypersensibilités retardées médicamenteuses

- 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...)

- Explorations immunologiques:

  ❶ **Tests cutanés (patch-tests +/- IDR)**

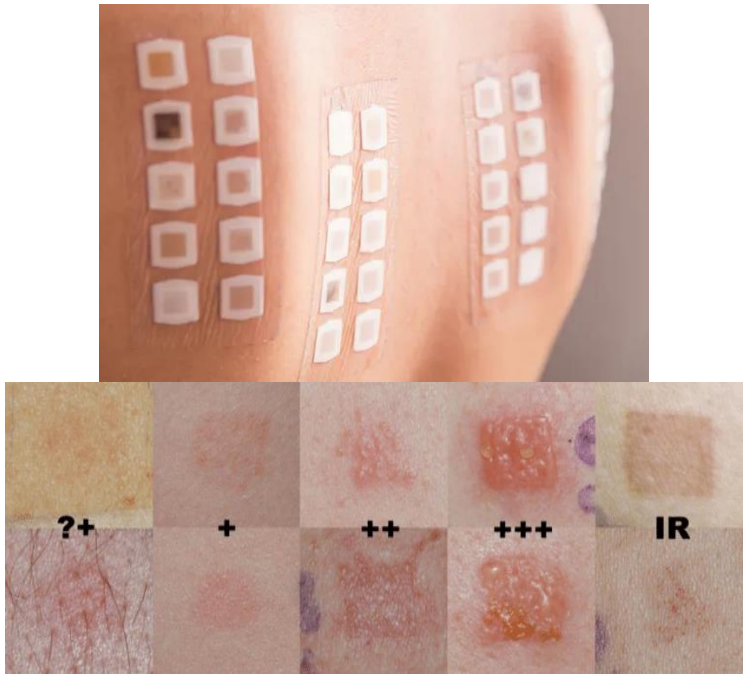
  ❷ **Tests de réintroduction**

  ❸ **Tests *in vitro***

Tests cutanés

Tests épicutanés ou patch-tests (PT):

- Contact épidermique
- Test pratiqué à distance de la réaction:
  - Au moins 6 semaines après un exanthème maculo-papuleux simple.
  - Au moins 6 mois après une toxidermie sévère comme le DRESS (en milieu spécialisé seulement)
- Lecture retardée 72h-96h



Intradermoréaction (IDR):

- Injection intradermique (derme superficiel)
- Réservée aux médicaments sous forme injectable (substance diluée)
- Test pratiqué à distance de la réaction en cas de PTs négatifs:
  - Au moins 6 semaines après un exanthème maculo-papuleux
  - Discuté dans les formes sévère (en milieu spécialisé seulement)
- Lecture retardée 48h-72h

Tests de reintroduction

- **Gold standard** pour confirmer l'imputabilité d'un médicament
- Administration contrôlée du médicament suspect
- Dose minimale disponible
- Médicament **indispensable** sans alternative
- **Non recommandée dans les toxidermies sévères** (Risque de **réactivation sévère**): à envisager uniquement si bénéfice > risque, et **après discussion collégiale**
- Environnement contrôlé : **centre spécialisé**, plateau technique, réanimation disponible sur place

Tests *in vitro* / immuno-biologiques

Mettre en évidence la présence de lymphocytes T spécifiques d'allergène (médicament) dans le sang du patient

- Prolifération lymphocytaire : **test de transformation lymphocytaire**
- Production de cytokines : **ELISpot**

Pour :

- Renforcer le diagnostic clinique
- Sécuriser les réintroductions médicamenteuses (= 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
- Non réalisés en routine

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

- Mesure de la prolifération lymphocytaire

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

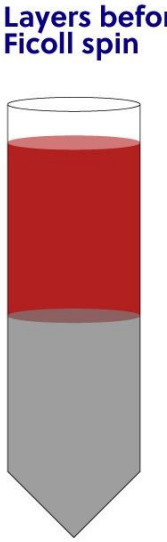
→ Témoigne de la présence de LT spécifique

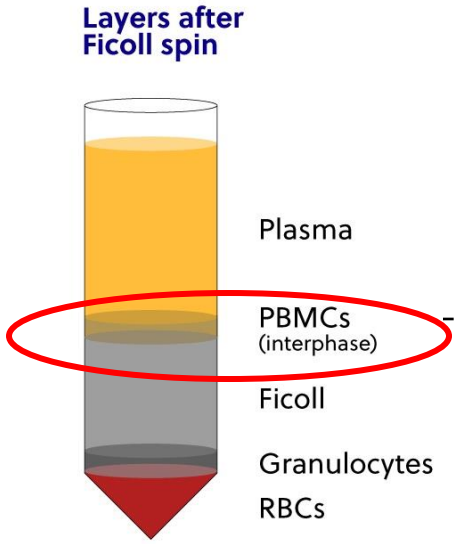
Limites :

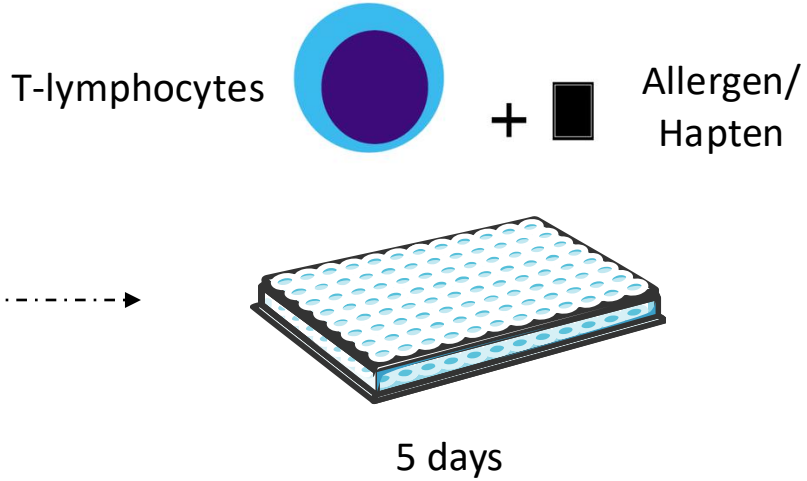
- Liées à l'utilisation de la radioactivité
- Sensibilité variable
- Techniques longues (6-7j)

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

Blood sample

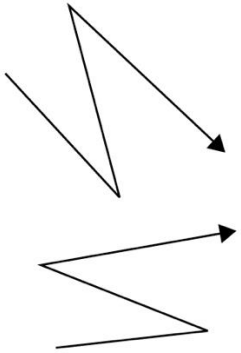






+ ^{3}H Thymidine

Proliferating
T-lymphocytes



Electron emission

Stimulation Index (SI)

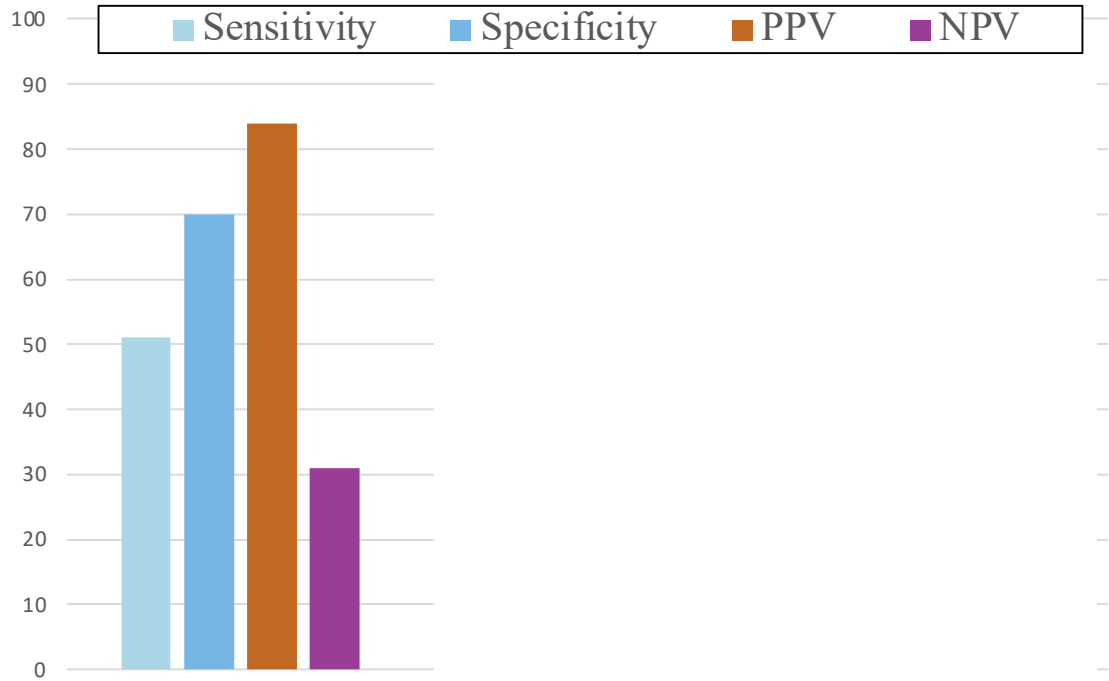
$$= \frac{\text{proliferation with antigen}}{\text{proliferation without antigen}}$$

≥ 2

positive

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

26 patients DHS
(MPE/DRESS/...)
41 drugs

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

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

Outils diagnostic fiable dans les DRESS et les réactions aux bêtalactamines

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

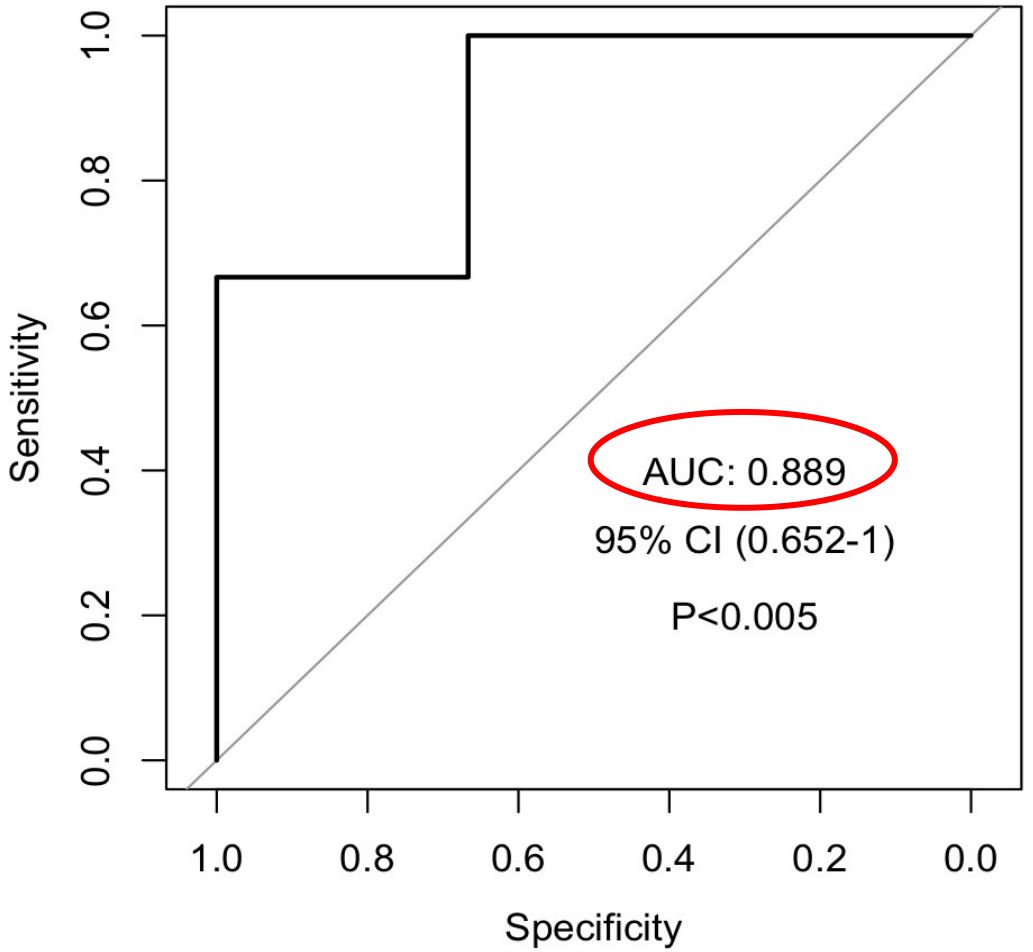
Summary of sensitivity, specificity, PPV and NPV of LTT according to clinical presentations or drug therapeutic groups.

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

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

Outils diagnostic fiable dans les DRESS et les réactions aux bêtalactamines

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



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

Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

cut off optimal de 2 pour toutes les molécules et de 3 pour la famille des bêtalactamines

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

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

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

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

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

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

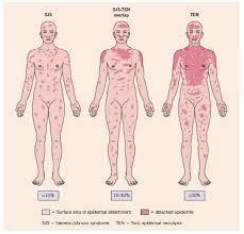
Contingency table: Sensitivity, specificity, PPV and NPV of LTT of LTT for alternative drugs using drug provocation tests as gold standard

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

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

Se: 27% à 88.8%;

Sp: 63% à 100%



Sévérité de la réaction

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

Molécule impliquée

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

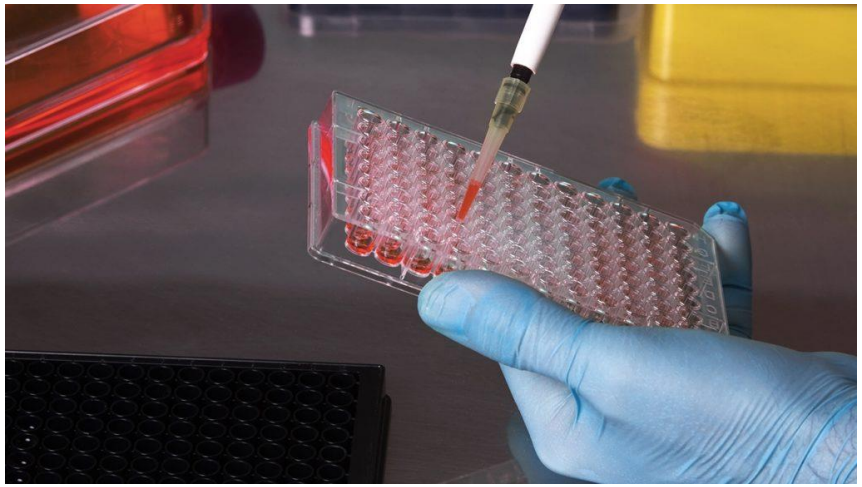
Timing de réalisation

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

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

ELISpot (enzyme-linked immunospot)

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



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

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

ELISpot (enzyme-linked immunospot)

Anticoprs de capture anti-IFNg

Cellule stimulée

Cellule non stimulée

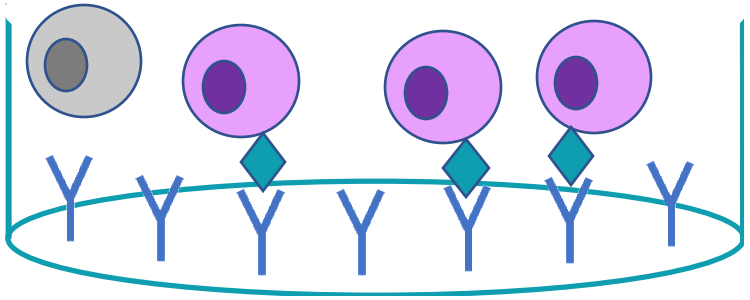
Cytokine (IFNg)

Anticoprs de détection anti-IFNg + enzyme

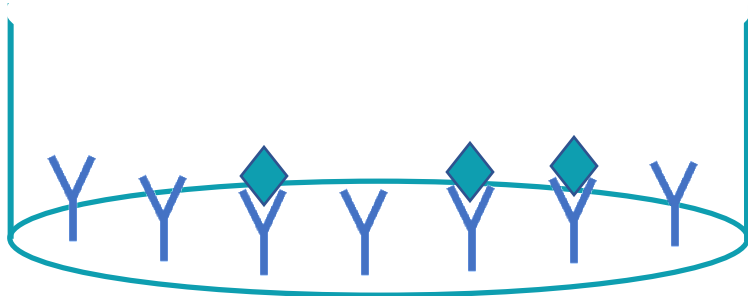
Substrat: spot coloré

1

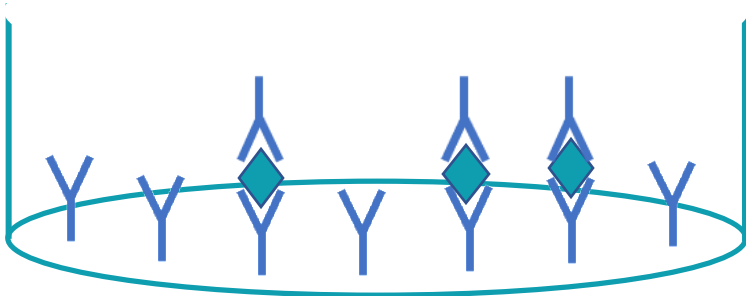
2



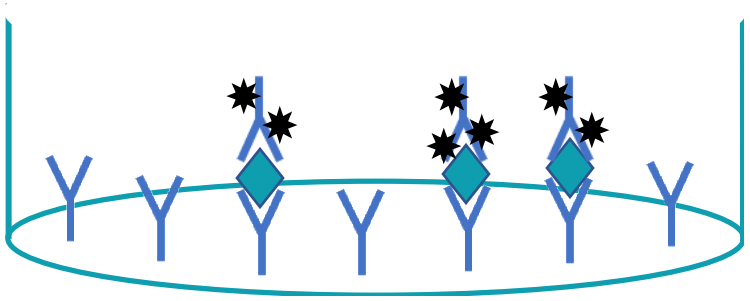
3



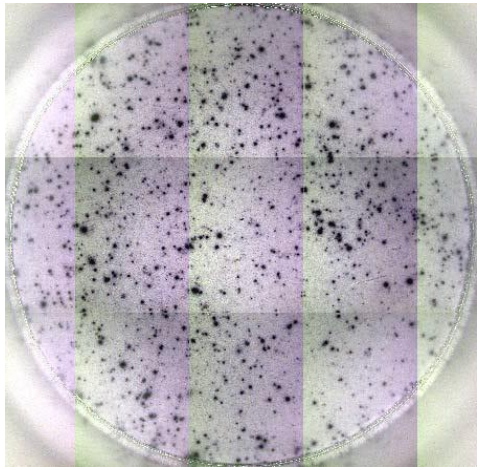
4



5

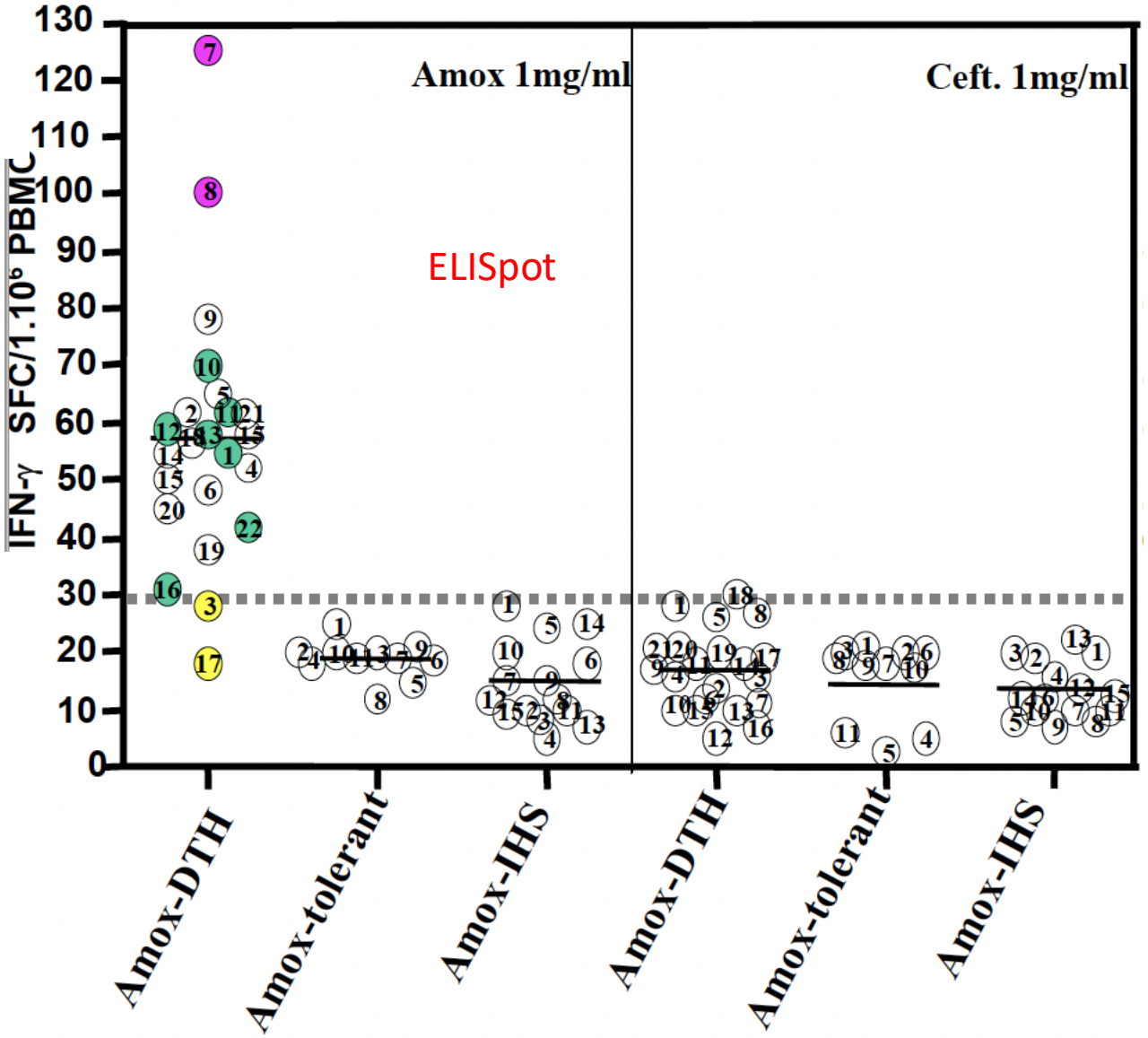


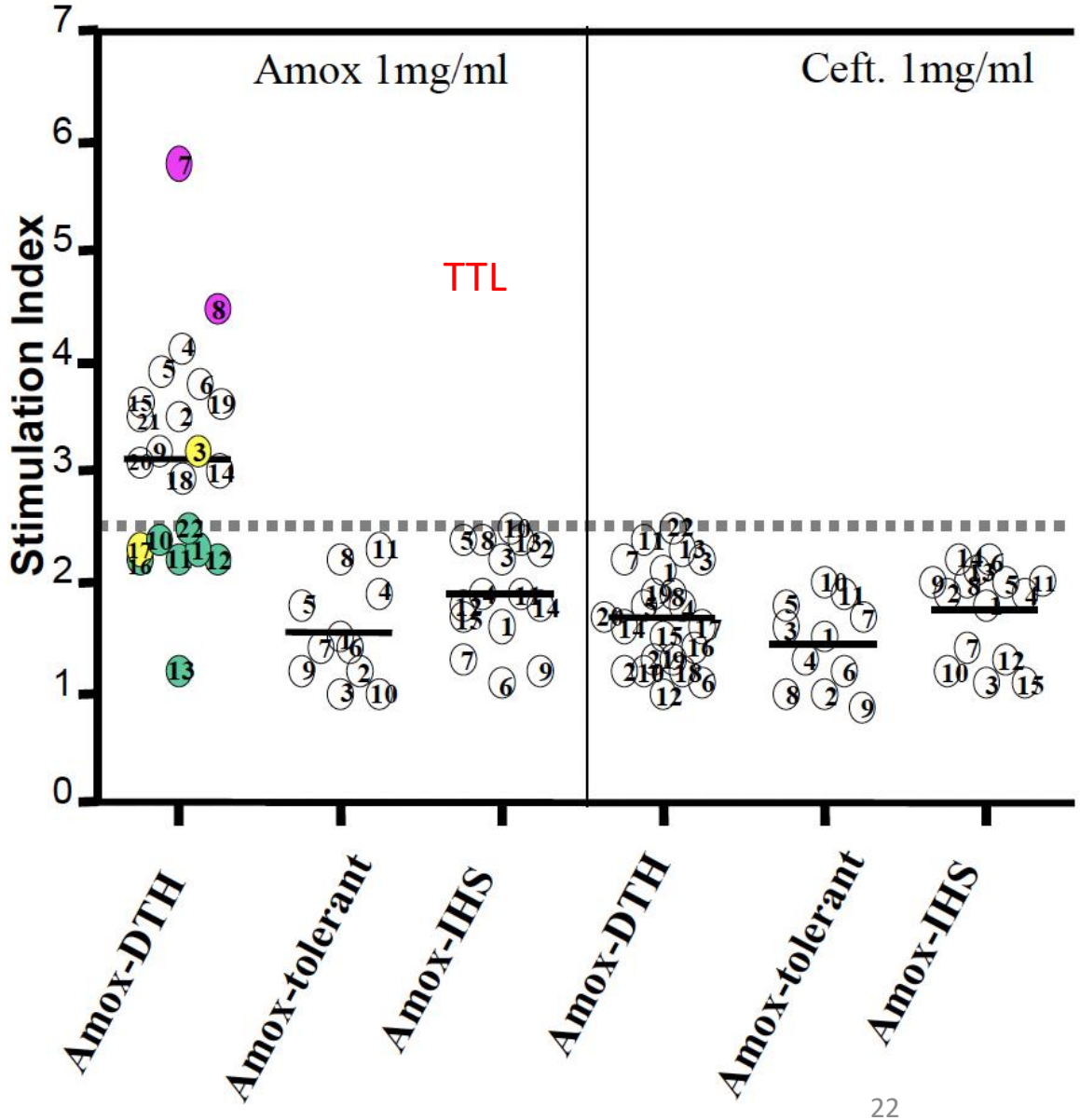
6



ELISpot (enzyme-linked immunospot)

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

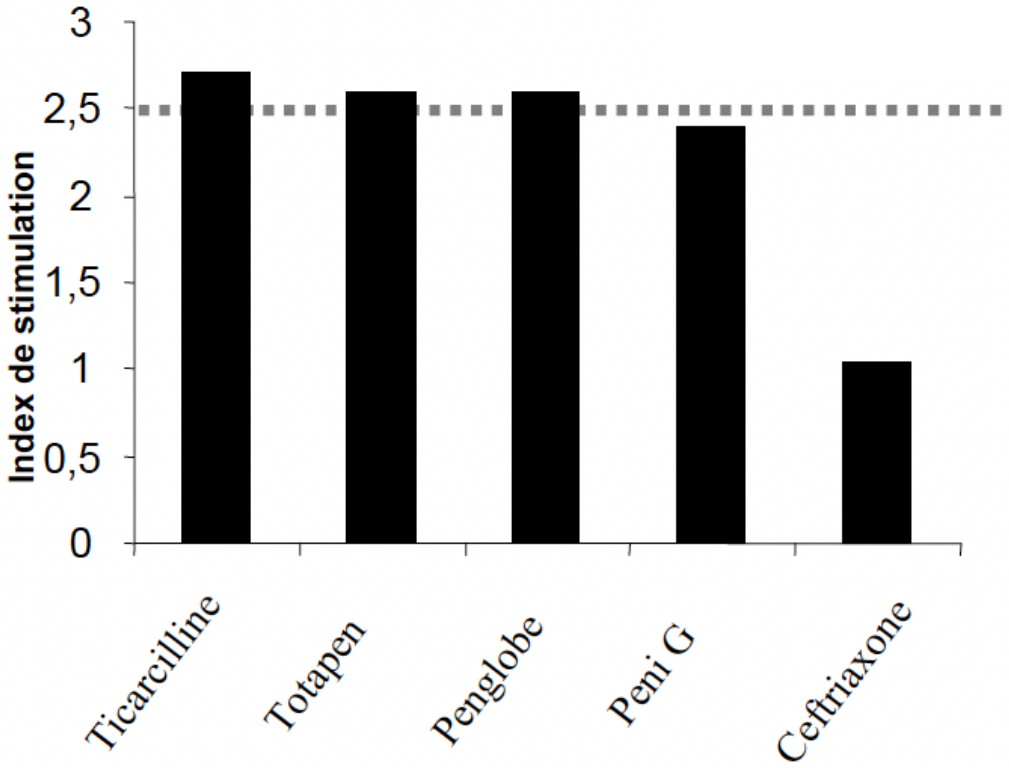




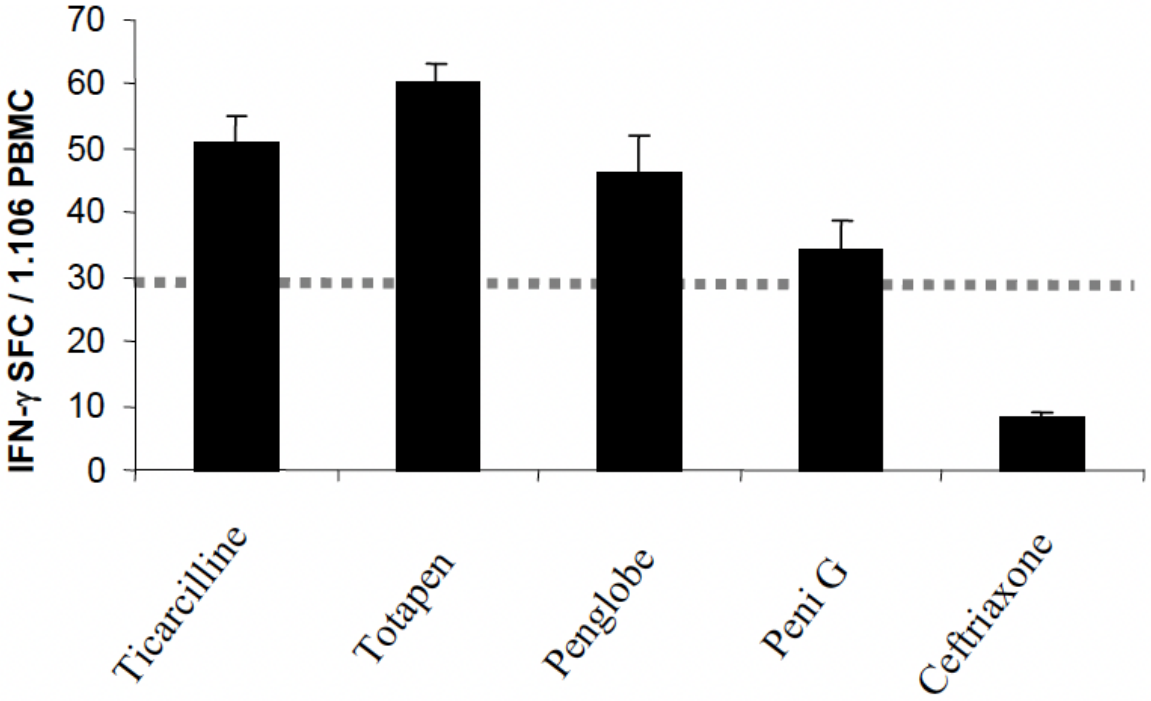
Rozières A. et al. Allergy. 2009.

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

TTL

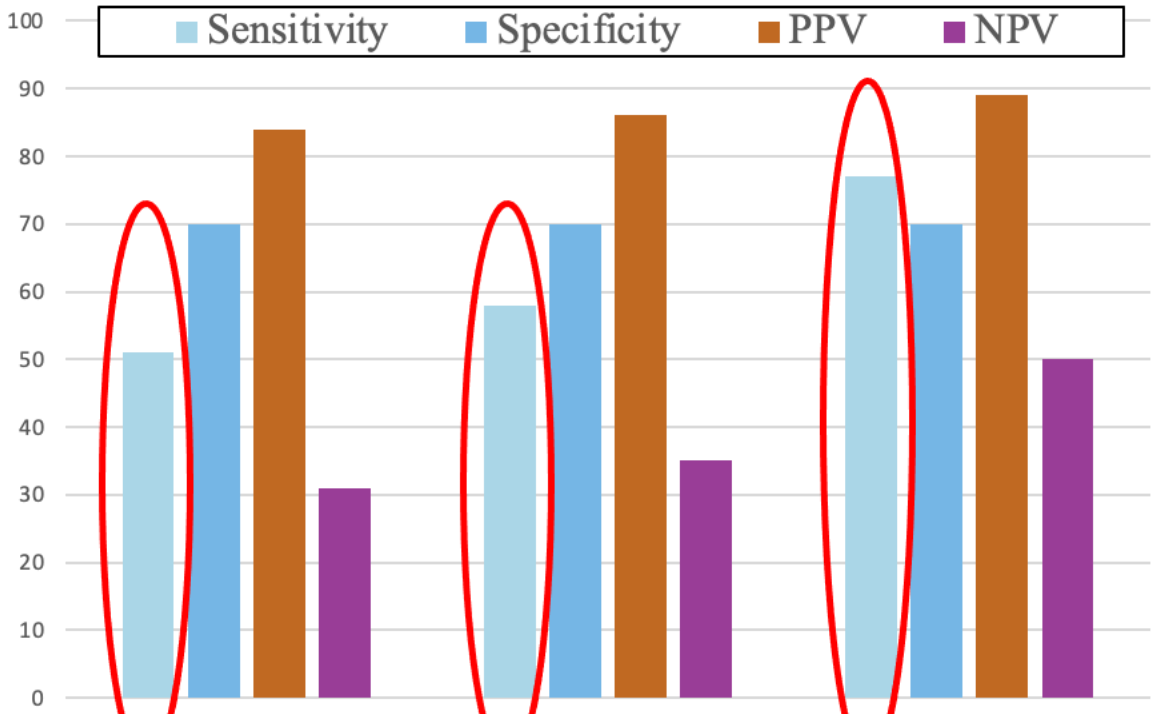


ELISpot



Rozières A. et al. Allergy. 2009.

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



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

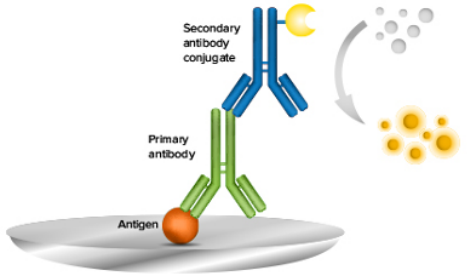
Egeley C. et al. Thèse de docteur en médecine. 2021.

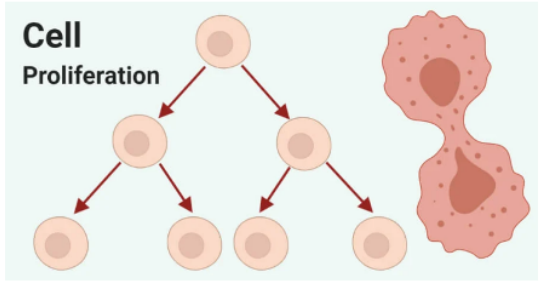
Autres techniques immuno-biologiques

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

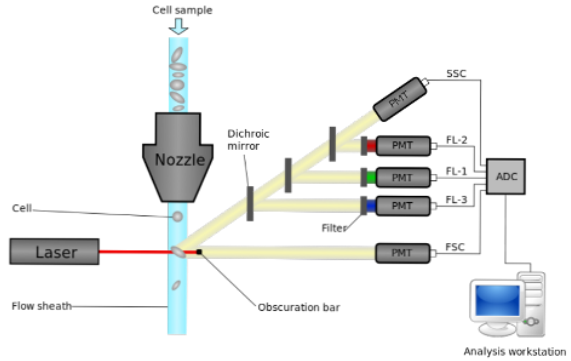
- **Cytométrie en flux** :
  - Expression de marqueurs d'activation lymphocytaire membranaire (CD69)
  - Réponse cytotoxique (Granzyme B, Granulysine)
  - Cytokines (IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-8)

Autres techniques immuno-biologiques





Combiner les techniques



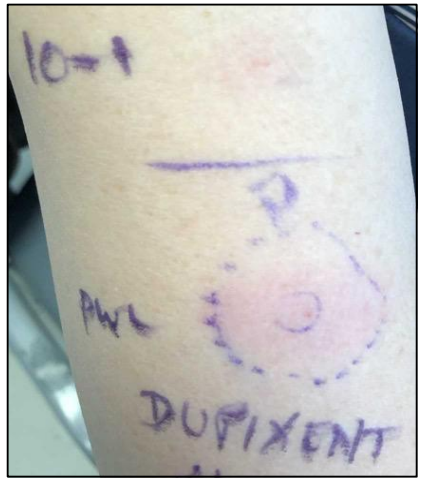
Nouvelles techniques
in vitro

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

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

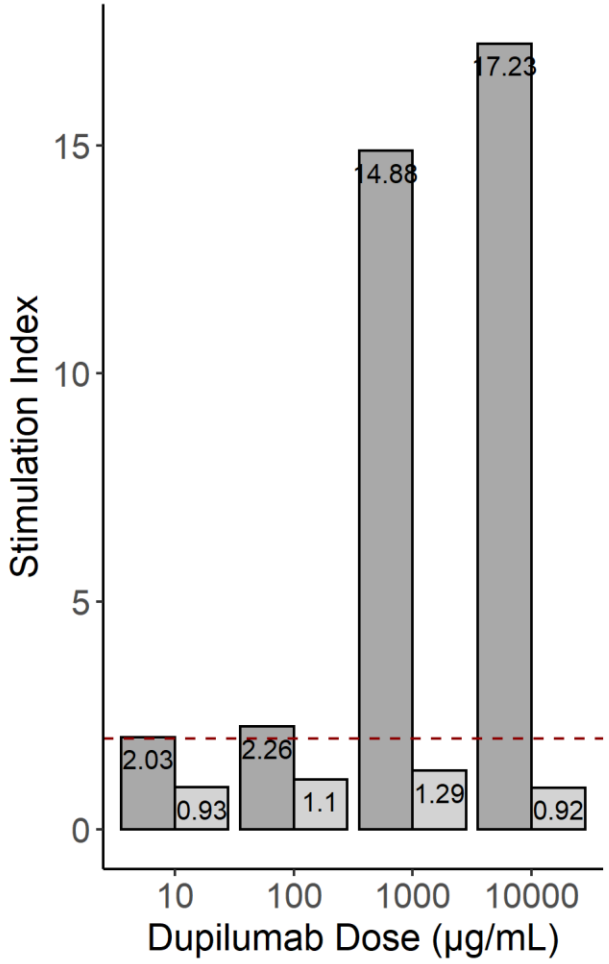
L’analyse moléculaire pour caractériser l’inflammation cutanée

Ex: hypersensibilité retardée au dupilumab

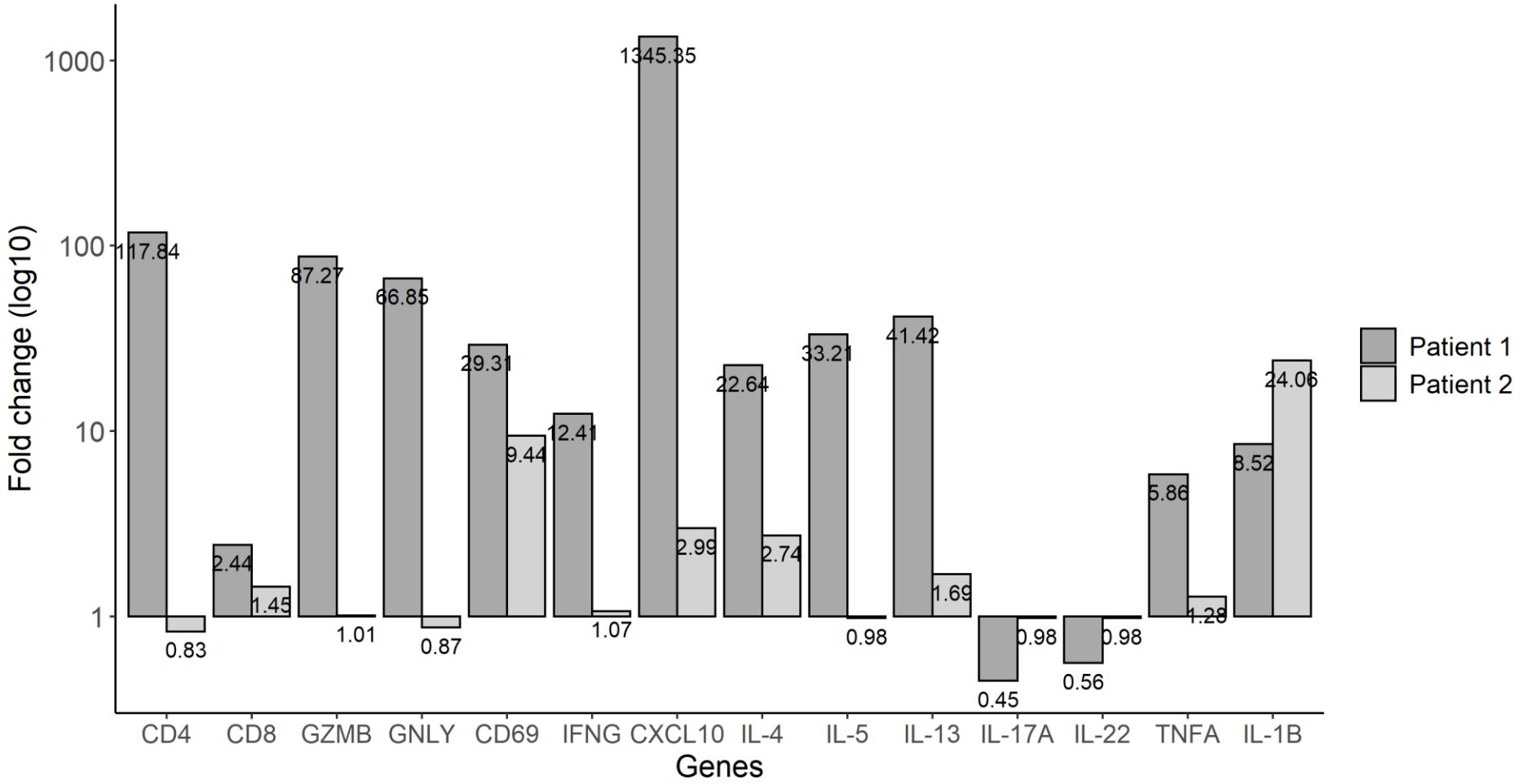
	Cutaneous reaction at Dupilumab injection site	IDT reaction (24h) Dupilumab (10-1, pure)
Patient 1		
Patient 2		

L'analyse moléculaire pour caractériser l'inflammation cutanée

Ex: hypersensibilité retardée au dupilumab



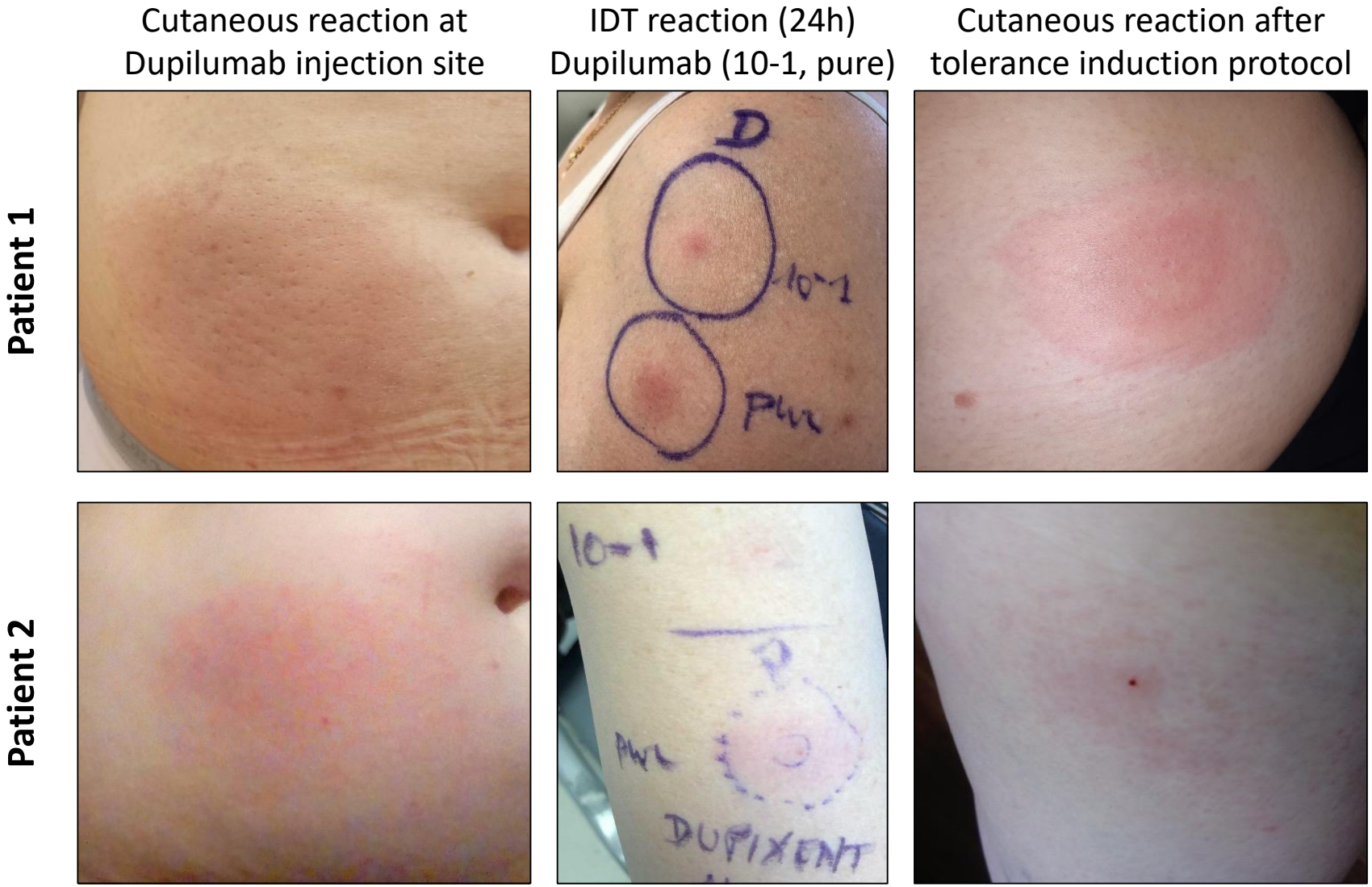
Test de transformation lymphocytaire



Analyse moléculaire

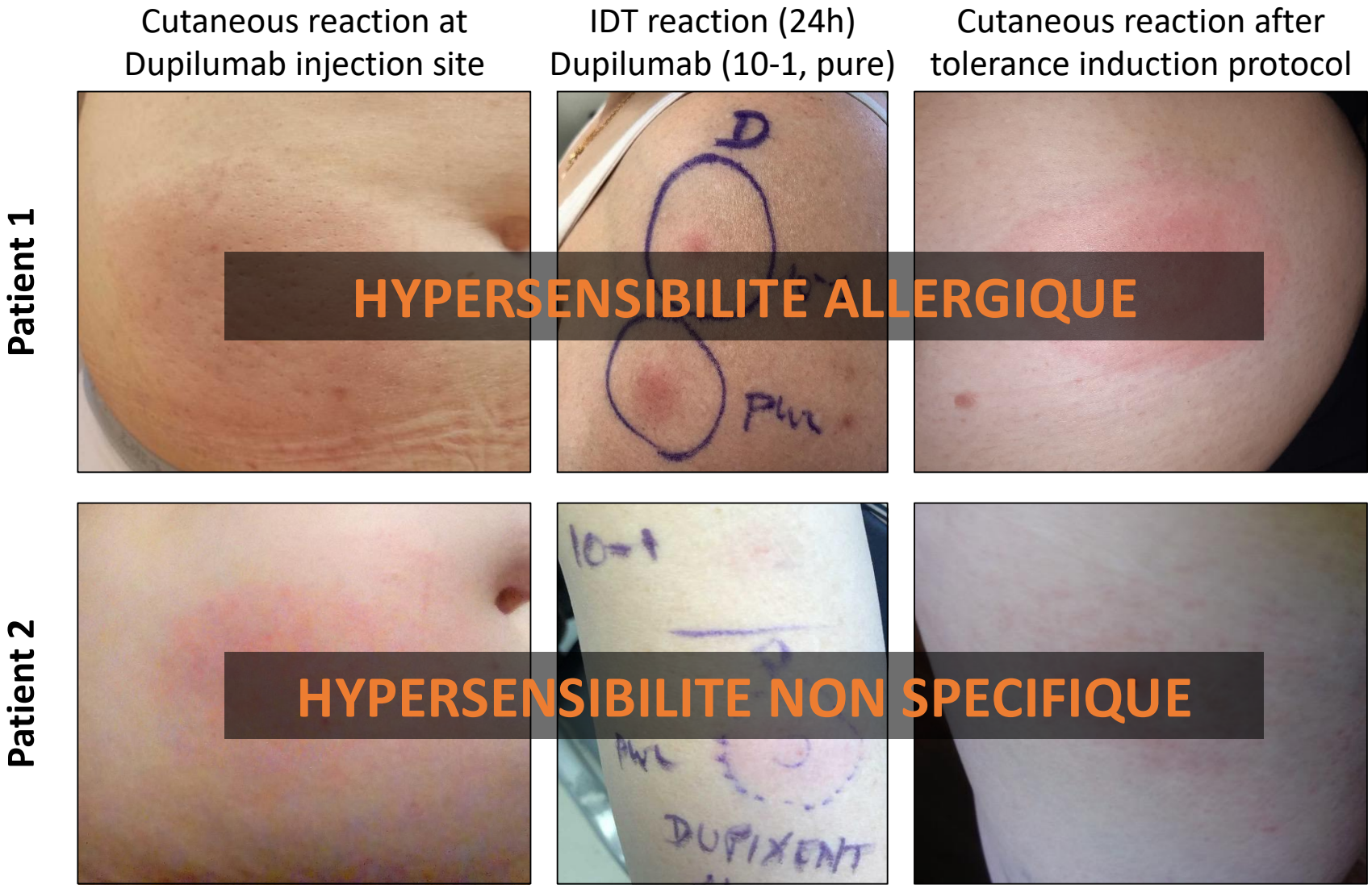
L’analyse moléculaire pour caractériser l’inflammation cutanée

Ex: hypersensibilité retardée au dupilumab



L'analyse moléculaire pour caractériser l'inflammation cutanée

Ex: hypersensibilité retardée au dupilumab



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.**

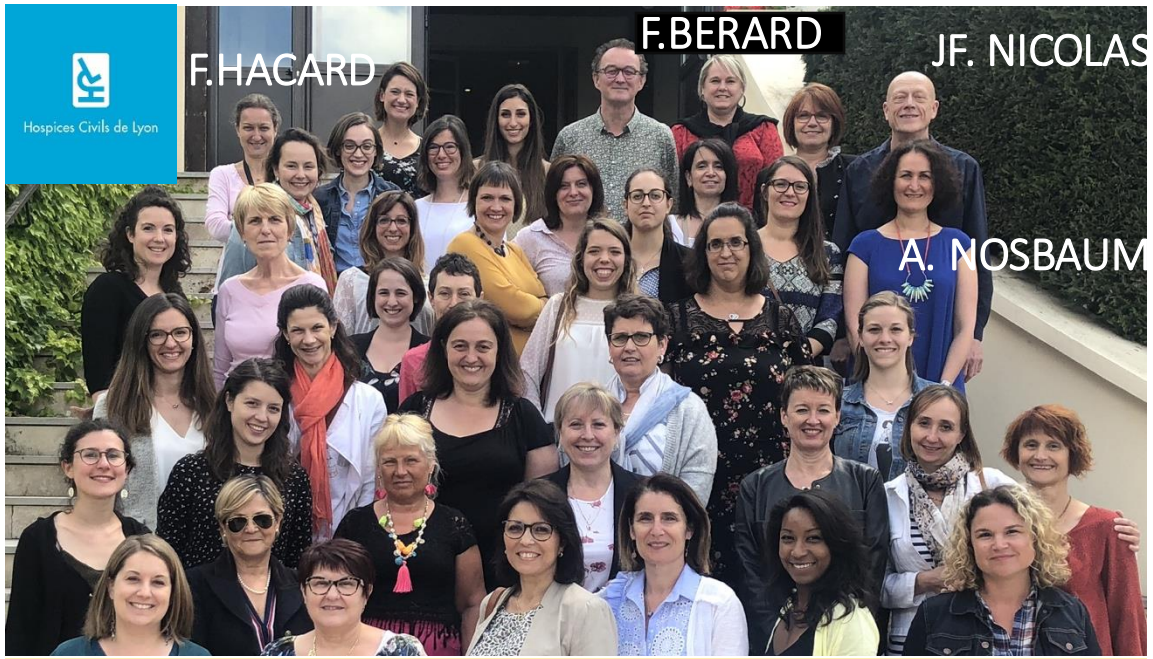
- **L'analyse moléculaire = aide à la caractérisation de l'inflammation cutanée (discriminer patch test vrai et faux positif)**

- **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