

Biologie de l'Allergie Immédiate

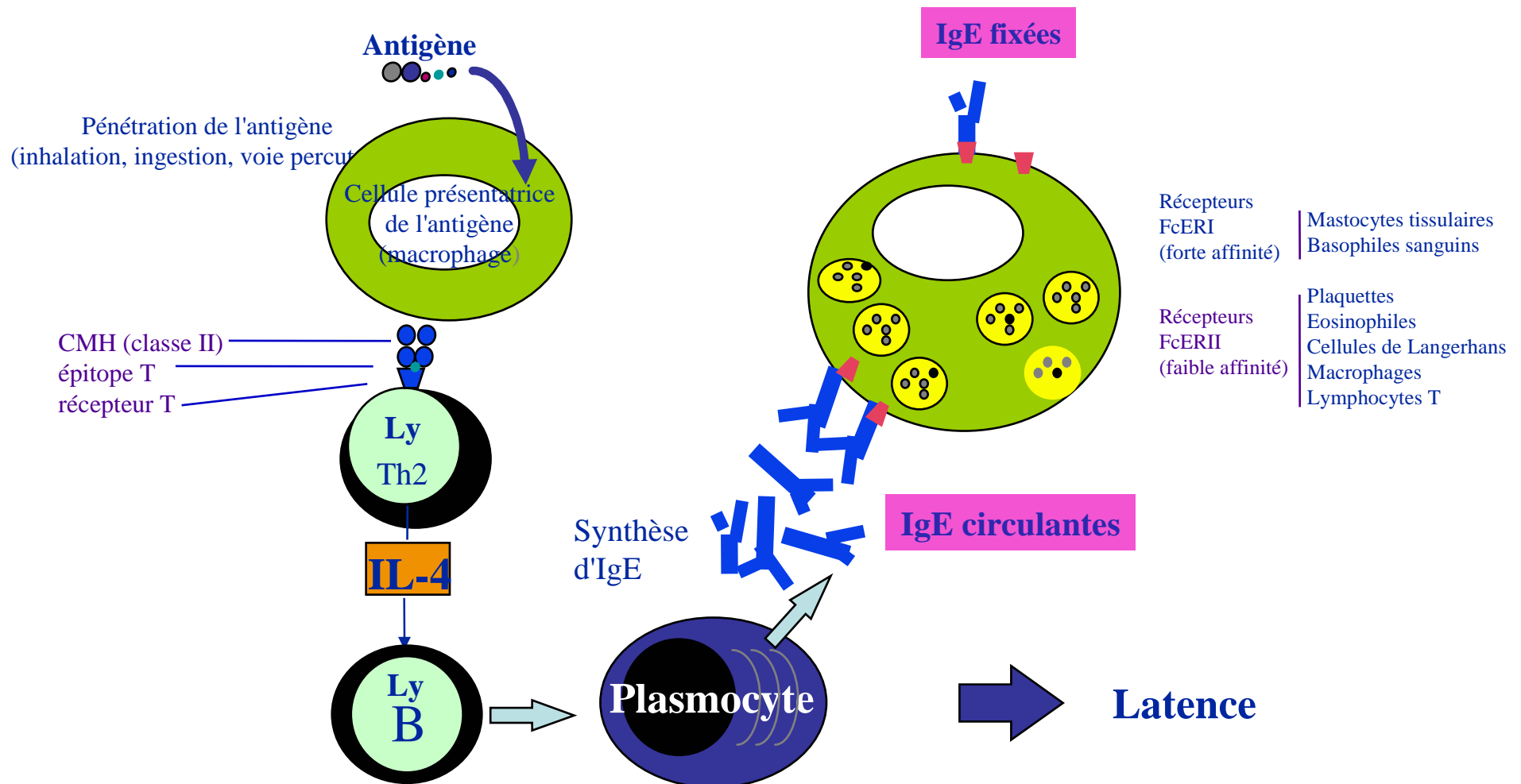
**J.Bienvenu - F.Bienvenu
Laboratoire d'Immunologie
Centre Hospitalier Lyon-Sud**

***DES-DESC
Séminaire Biologie de l'Allergie
15 Mars 2012***

La réaction immédiate

- Première rencontre avec l'allergène

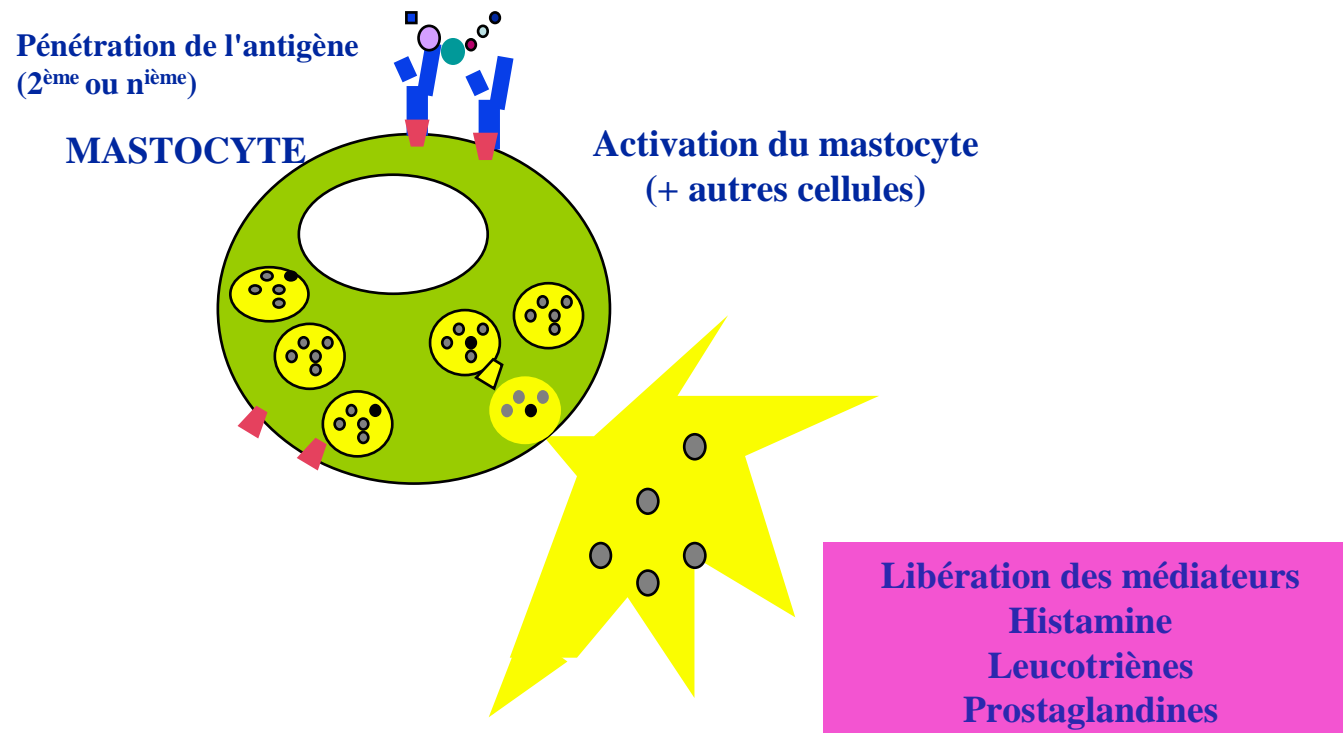
- mise en route des réponses immunologiques et de la mémoire
- coopération entre lymphocytes T et B pour induire la synthèse des IgE



La réaction immédiate

- Seconde rencontre

- allergène immédiatement reconnu par IgE membranaires
- réaction explosive après pontage de 2 IgE
- libération de nombreux médiateurs de la réponse allergique



Stratégie de prise en charge d'une hypersensibilité immédiate

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

+/- Biologie

+/- Biologie

- - : quand symptomatologie simple, facilement reliée à un allergène lors de l'interrogatoire
- + :
 - quand patient vu par un **non spécialiste**
 - quand **tests cutanés irréalisables** (eczéma, peau aréactive) ou d'interprétation difficile (dermographisme)
 - grâce aux **nouveaux outils disponibles** qui apportent une aide précieuse au diagnostic et à la prise en charge (TPO, éviction, désensibilisation)

Tests biologiques utilisés pour l'exploration de l'HSI

- Tests **sériques**
 - Tests **cellulaires** : basophiles sensibilisés exprimant des IgE spécifiques
-
- Nouveaux outils : **allergènes moléculaires**

Marqueurs **sériques** utilisés pour l'exploration de l'HSI

- *Tests non spécifiques :*
 - (Hyperéosinophilie)
 - IgE totales
- *Tests spécifiques :*
 - IgE spécifiques :
 - Multiallergéniques (dépistage)
 - Unitaires (identification)
- *Médiateurs solubles après dégranulation :*
 - *Tryptase, Histamine* (→ origine allergique d'une réaction?)

IgE totales

- Concentration sérique faible (50-100ng/mL)
- Concentration à interpréter en fonction de l'âge
- Résultat en UI (standard OMS) : 1 UI = 2,4 ng

- Sensibilité/spécificité # 70%
 - **20% des sujets sains : concentration élevée**
 - **20 % des allergiques : concentration faible**
- Facteurs influençant les concentrations:
 - mono/polysensibilisation,
 - nature de l'allergène,
 - saison,
 - traitement

Indications des IgE totales

- **Nomenclature:** B 40,
non cumulable avec les autres tests d'allergie
- **Indications :** Confirmation du diagnostic et suivi thérapeutique dans :
 - Dermatite atopique, urticaire chronique
 - Polysensibilisations
 - Infections (parasitaires, virales): **Aspergillose BP**
 - Déficits immunitaires congénitaux (**Wiskott-Aldrich, Job-Buckley**)
 - Maladies inflammatoires/dysimmunitaires

Marqueurs **sériques** utilisés pour l'exploration de l'HSI

- *Tests non spécifiques* :
 - (Hyperéosinophilie)
 - IgE totales
- *Tests spécifiques* : IgE spécifiques

Tests biologiques spécifiques dans l'exploration de l'allergie

- *Tests spécifiques* : IgE spécifiques (~ 600 tests)
- Tests *multiallergéniques* (mélanges/dépistage)
- ou *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*

Nomenclature

Tests de dépistage

(sans identification de l'allergène)

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

Ordonnances indiquant au maximum :

- 1 mélange pneumallergènes : **B 51**
- 3 mélanges alimentaires : **3 × B 51**

Tests d'identification

- Test unitaire vis-à-vis d'allergènes multiples : **B 80**
- Tests de quantification des IgE spécifiques vis-à-vis d'allergènes unitaires

Ordonnances indiquant au maximum :

- 5 tests pour les catégories :
 - Aliments : **5 × B 51**
 - Pneumallergènes : **5 × B 51**
 - Venins : **5 × B 51**
 - Médicaments : **5 × B 51**
 - 1 test pour le latex : **B 51**



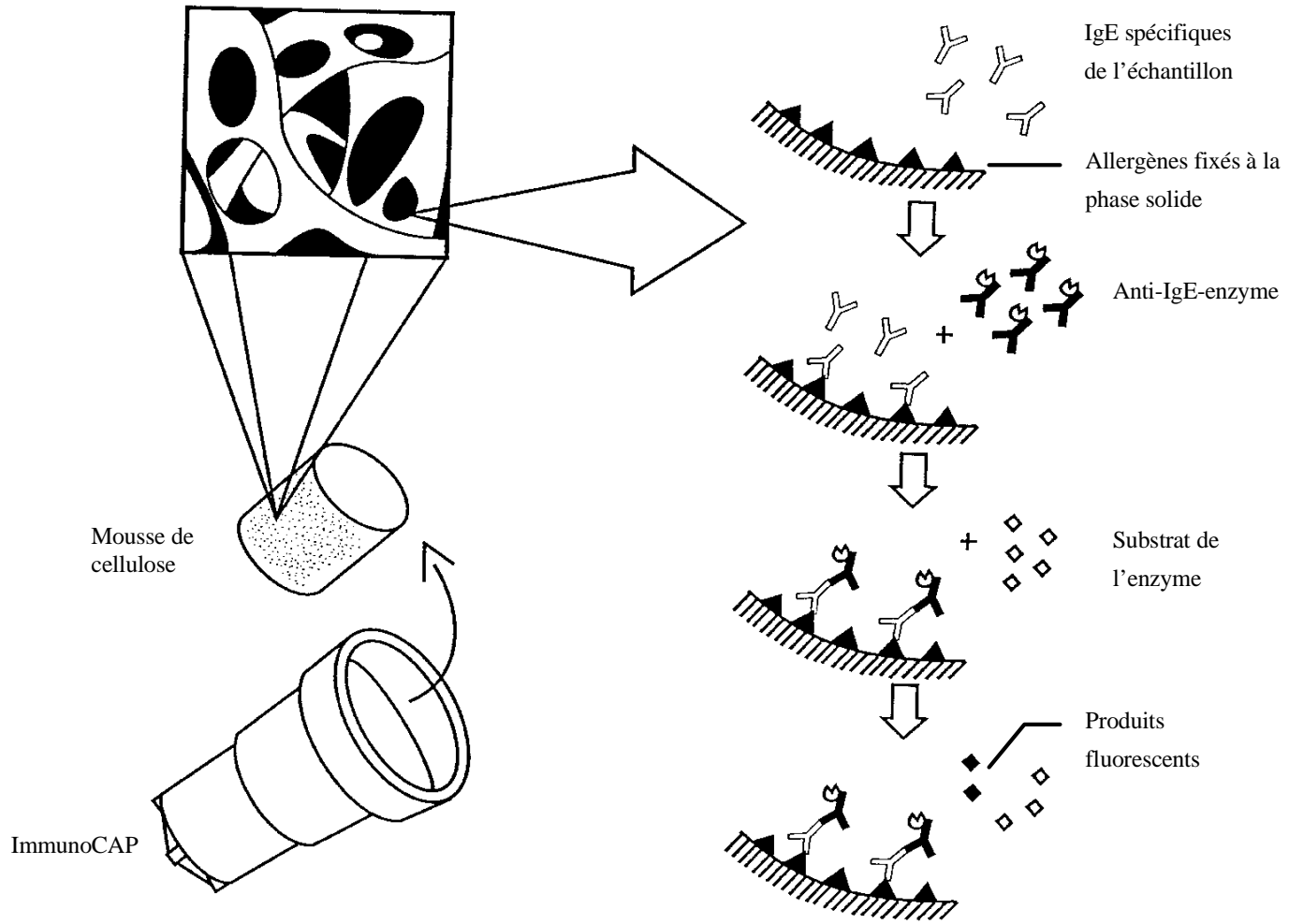
- Mentionner la technique, ses limites, interprétation des résultats

Dosage des IgE spécifiques

- Le dosage des IgE spécifiques reste un *test particulier* dans *l'immunodiagnostic*
- Evolutions techniques :
 - Quantification : « classes » → kU/L
 - Limite de détection : 0,1 kU/L
 - Automatisation : manuelle/série/accès aléatoire et continu
 - Temps de rendu du résultat : >12h → 65 minutes

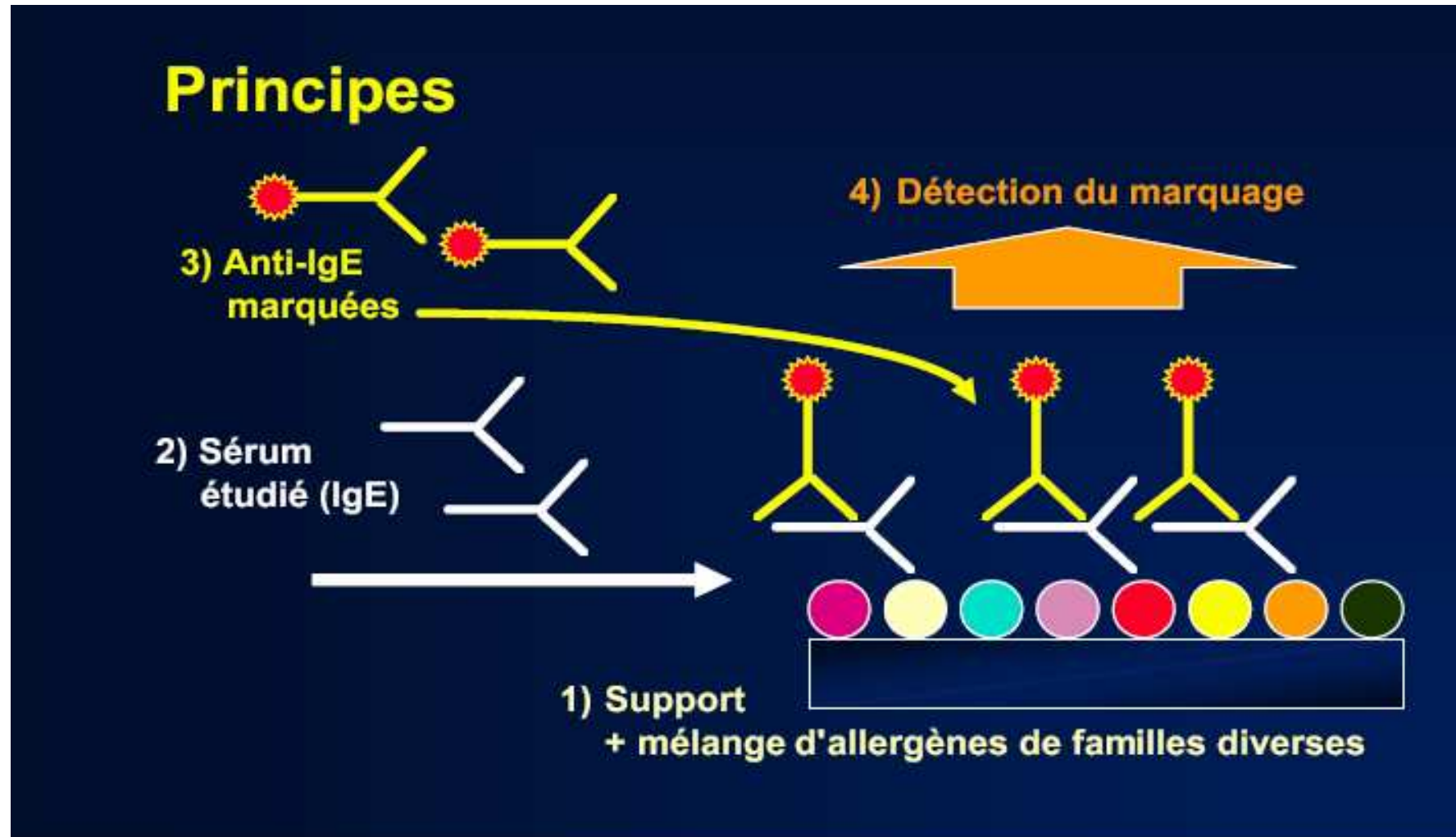
IgE spécifiques / techniques

- Dérivent toutes du *RAST* (1974)
- Fixation de l'allergène sur un support / incubation avec le sérum/ révélation du complexe avec anti-IgE marqué
- Pas de technique de référence
- Pas de standard international IgE spécifiques
- Contrôles : contrôle national, Quality Club



Tests de dépistage

Test multiallergénique de dépistage



2 exemples : mélanges pneumallergènes / trophallergènes

Tests de dépistage pneumallergènes

- **Composition** des différents mélanges :
 - **Phadiatop** : ne contient pas : ambrosie (w1),blatte (i6), alternaria (m6)
 - **Alatop** :d1, e1, e5, g2, g6, m1, m6, w1, w9, w19, t3, t17
 - **Stallertest** :d1, e1, e5, g3, m6, w6, w19, t3, t9, i6
- **Performances** Phadiatop :
 - Sensibilité : 91 %
 - Spécificité : 93 %
 - Corrélation avec diagnostic clinique : 92 %

Limites des tests de dépistage

– *Faux-négatifs* :

- Tous les pneumallergènes ne sont pas représentés (cyprès)

– *Faux-positifs* :

- Sensibilisation non responsable de la pathologie observée

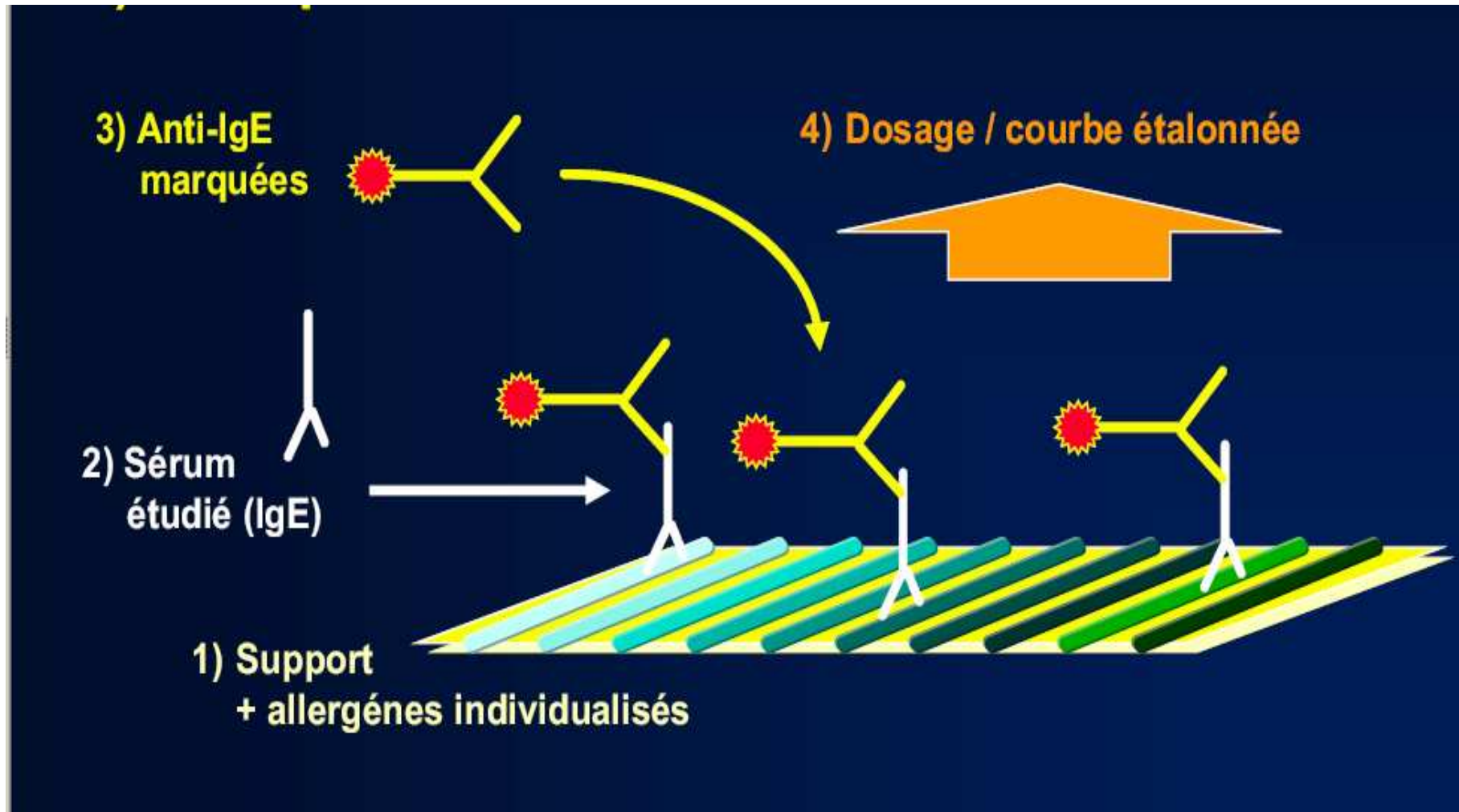
Tests de dépistage **aliments**

- **Trophatop enfant** : mélange d'allergènes choisis en fonction de la prévalence des sensibilisations
- Données du CICBAA :
 - Blanc d'œuf : 34%
 - Arachide : 26%
 - Lait : 11%
 - Légumineuses : 5,2%
 - Poissons : 4,4%
 - Groupe des noix : 4,1%
- Allergènes **d'origine animale** : 51,2% chez enfant (chez l'adulte: allergènes d'origine végétale majoritaires).
- www.cicbaa.org

Limites des tests de dépistage aliments

- ***Faux-négatifs*** : tous les allergènes ne sont pas représentés
- ***Faux-positifs*** : réactions croisées avec les pollens

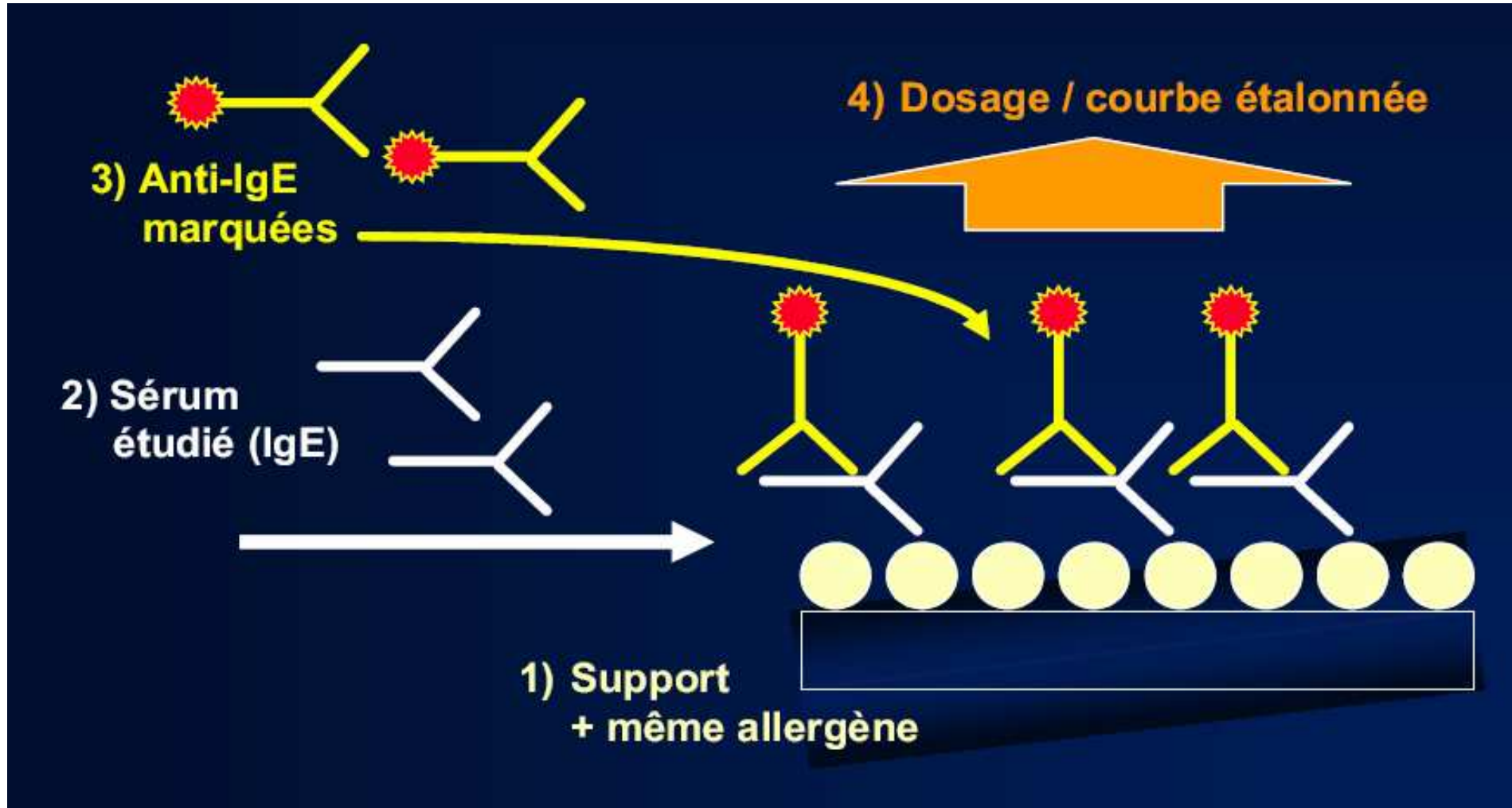
Test multiallergénique (allergènes séparés sur un même support) : CLA



CLA-30

- Test d'*identification* (B 80)
- 3 types de pipettes :
 - 30 pneumallergènes
 - 30 trophallergènes
 - pipettes mixtes (19 P / 11 T)
- Test intéressant :
 - si bien « techniqué »
 - et bien interprété / utilisé
 - peut permettre d'identifier des réactions croisées
- Mais : allergènes non moléculaires

Dosage des IgE spécifiques



Autres tests

- **IgG/IgG4 spécifiques** : suivi de désensibilisation
- **Tryptase /Histamine** :
 - Origine anaphylactique d'un choc peropératoire
 - Test de provocation orale
- **ECP** : asthme,
syndromes hyperéosinophiliques

Histamine

- Chocs anaphylactiques per-anesthésiques
- **Histamine : URGENCE**
 - $\frac{1}{2}$ vie plasmatique : 10 à 20 min. (choc)
 - ➤ Prélèvement **15 à 30 minutes après le choc, sur EDTA**
 - Centrifugé très rapidement
 - Dosage immunoenzymatique
 - Valeurs normales: inf. à 6 nmol/L

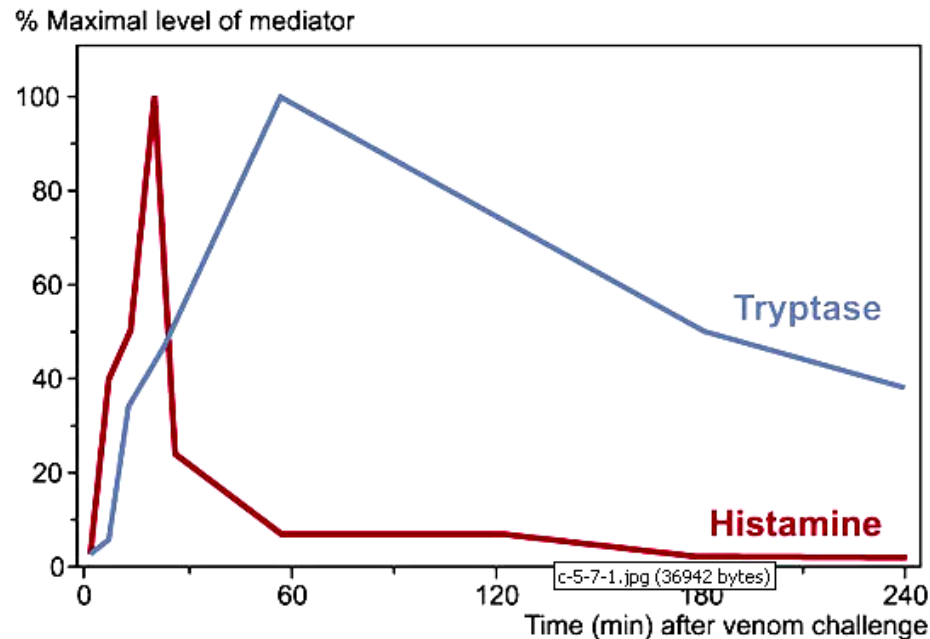
La tryptase

- La tryptase est une sérine protéase, enzyme stockée dans les granules des mastocytes tissulaires (derme, poumons, muqueuses, sous-muqueuses intestinales).
- C'est un tétramère, constitué de 2 sous-unités **alpha** et 2 sous-unités **bêta** liées de façon non covalente, de poids moléculaire : 134kD.

La bêta-tryptase

- La bêta-tryptase, concentrée sélectivement dans les granules sécrétoires des mastocytes est libérée dans la circulation à la suite d'une **activation des mastocytes**.
 - C'est le marqueur biologique de la *dégranulation* mastocytaire.
 - Les concentrations sont alors augmentées dans le sérum
 - Marqueur des chocs anaphylactiques
- Sa demi-vie est d'environ **90 à 120 minutes** (Avantage +++/histamine)

Cinétique de libération de la Beta tryptase sérique :



- Une élévation sérique est mesurable entre 15 minutes et 6 h après l'évènement déclencheur
- Pic en 1 h : contact allergénique par voie intradermique,
- Pic en 15 min : contact allergénique par voie intraveineuse,
- La demi-vie d'élimination est de 90/120min., ce qui permet des prélèvements tardifs.

L'alpha-tryptase

- L'alpha-tryptase, secrétée continuellement par les mastocytes est responsable du *taux basal* de tryptase sérique de chaque individu.

Valeurs normales: inf. à 12,5 micromoles/L

- Son dosage sérique permet une estimation de la masse mastocytaire totale.
- On observera une **augmentation de la tryptase** dans la **mastocytose systémique** (*prolifération anormale des mastocytes dans de nombreux tissus : peau, moelle osseuse, tube digestif...*)

Les Allergènes moléculaires dans le diagnostic biologique de l'allergie

Une évolution liée aux limites des extraits allergéniques naturels

- Composition **variable, hétérogène** (mélange de protéines allergéniques et non allergéniques) **non standardisée**
- Variabilité:
 - en fonction des **sources** : obtenus à partir de **sources allergéniques complexes** : grains de pollens, squames et phanères d'animaux, cultures d'acariens ou de blattes.....
 - des **procédés de préparation** : extraction aqueuse, dégradation des allergènes fragiles lors de la préparation (chauffage)....
 - des procédés de **purification** et de **stockage** utilisés (contaminations)

LES ALLERGENES MOLECULAIRES

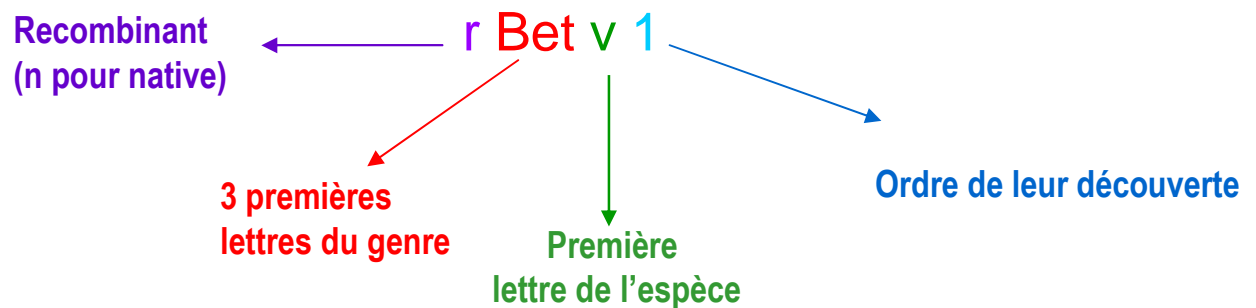
- **Les allergènes moléculaires :**

- soit **natifs** purifiés à partir de sources allergéniques naturelles
- soit « **recombinants** » synthétisés par génie génétique à partir de cellules procaryotes, le plus souvent *E.Coli*

- A ce jour, **1004 allergènes** (regroupés en 175 familles) ont été identifiés

- **Nomenclature** : désignation selon une nomenclature officielle, précédée de « n » pour l'allergène naturel purifié, et « r » pour recombinant :

Exemple du bouleau, **Betula verucosa** :



Sites :AllFam (<http://www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/>), Allergome (<http://www.allergome.org>)

Apport pratique des allergènes recombinants

1. Outil pour améliorer les tests biologiques « classiques »
2. Outil pour « dépister » les réactions croisées sur des bases moléculaires et aider à l'interprétation des polysensibilisations cutanées
3. Outil pour contribuer au diagnostic de certitude
4. Outil pour personnaliser la prise en charge du patient (immunothérapie, tests de provocation)

2. Outil pour

- « **dépister** » et **expliquer les réactions croisées** sur des bases moléculaires et
- aider à l'interprétation des **polysensibilisations cutanées**
(par identification des marqueurs de **sensibilisation initiale** à une source allergénique)

Différents types de réactions croisées

1. Réactions croisées entre espèces *taxonomiquement proches* :

Ex : acariens (d1,d2) , graminées (dactyle et phléole),
frêne / olivier : famille des Oléacées

2. Réactions croisées entre espèces *taxonomiquement éloignées* :

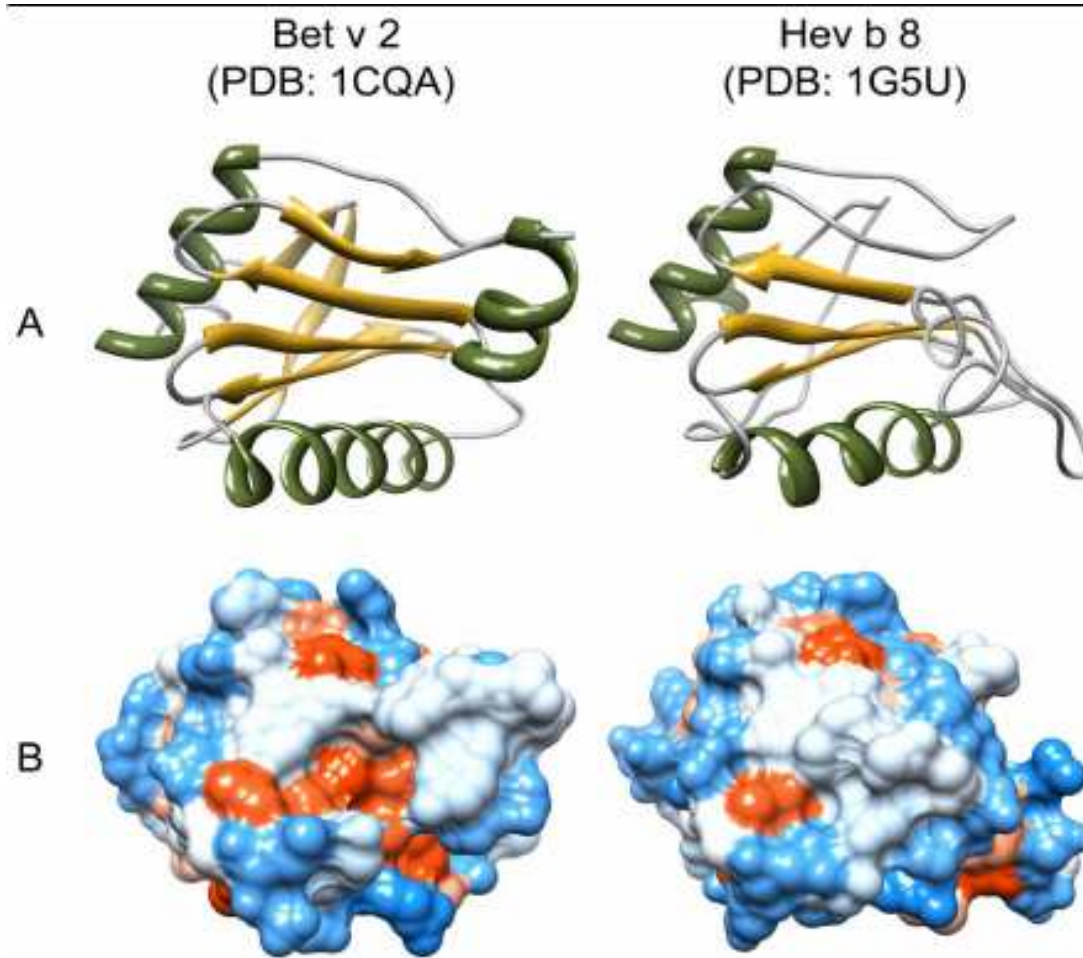
Ex : pomme / bouleau : allergie orale chez # 50% des allergiques au pollen de bouleau (*PR10* : Betv1-Mald1)

La relation botanique ne permet plus d'expliquer les RC.



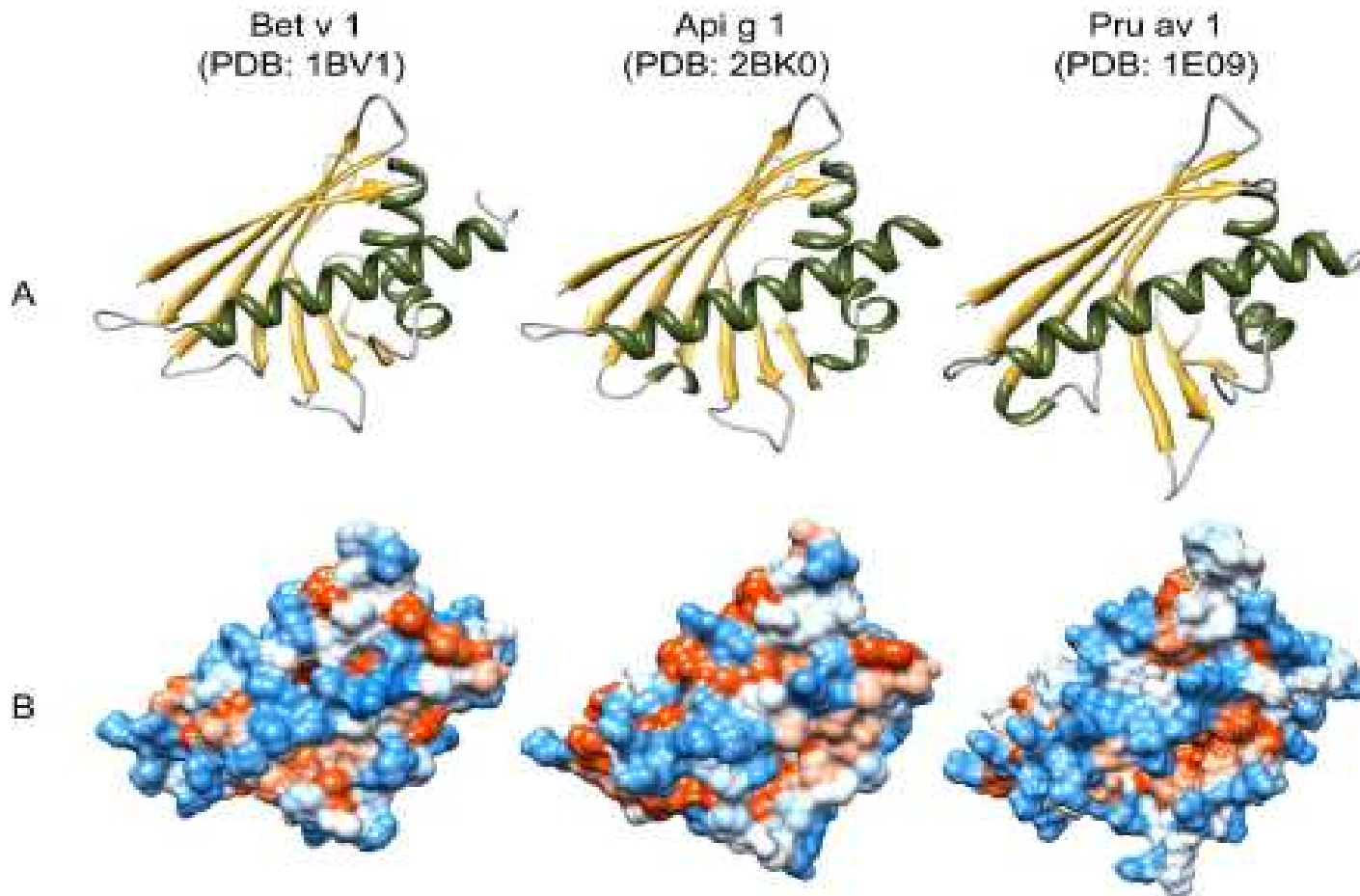
Explication par la structure des allergènes et leur fonction :
notion de *famille moléculaire* (rassemble des protéines provenant de diverses sources allergéniques et ayant la même *fonction physiologique*)

Les Profilines



D'après Hauser et al.

Les PR-10 (Bet v 1-like)

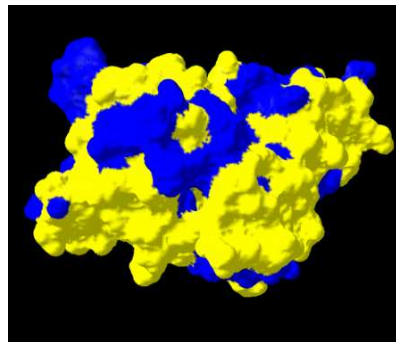


D'après Hauser et al.

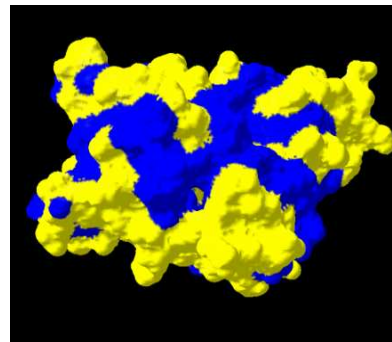
Communauté entre allergènes

Exemple des PR-10

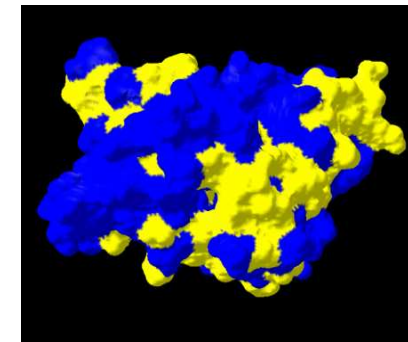
Identité/allergène	Bet v 1	Mal d 1	Gly m 4	Api g 1
% séquences	100	56	47	39
% surface	100	71	60	47



Bet v 1 vs. Mal d 1



Bet v 1 vs. Gly m 4



Bet v 1 vs. Api g 1

Degré de similitude des épitopes conformationnels

Autres exemples de **réactions croisées** entre espèces taxonomiquement éloignées :

Constataction clinique → **Explication moléculaire**



– pomme / bouleau : allergie orale chez # 50% des allergiques au pollen de bouleau (**PR10** : Betv1-Mald1)



– Graminées/latex : Ac anti-latex chez patients souffrant de pollinose (**profiline** :Hevb8, Phlp12...)

– Acariens/blattes/crustacés/escargot : **tropomyosines**

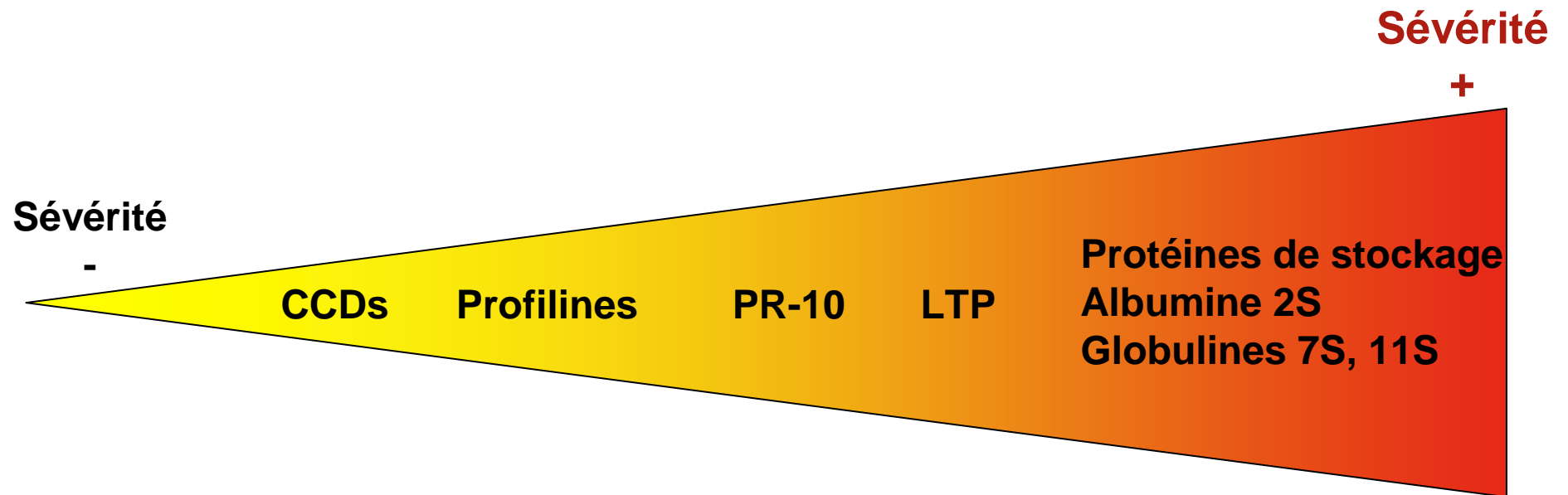
3. Outil pour contribuer au **diagnostic de certitude**

- Notion d'allergènes « majeurs » spécifiques d'espèce
- Identification de **marqueurs de sévérité** de l'allergie
- Identification de **marqueurs de persistance** d'allergie

(Ex : Latex, Arachide)

Apport des allergènes moléculaires dans le diagnostic de l'allergie

3) Identification de **marqueurs de sévérité** de l'allergie



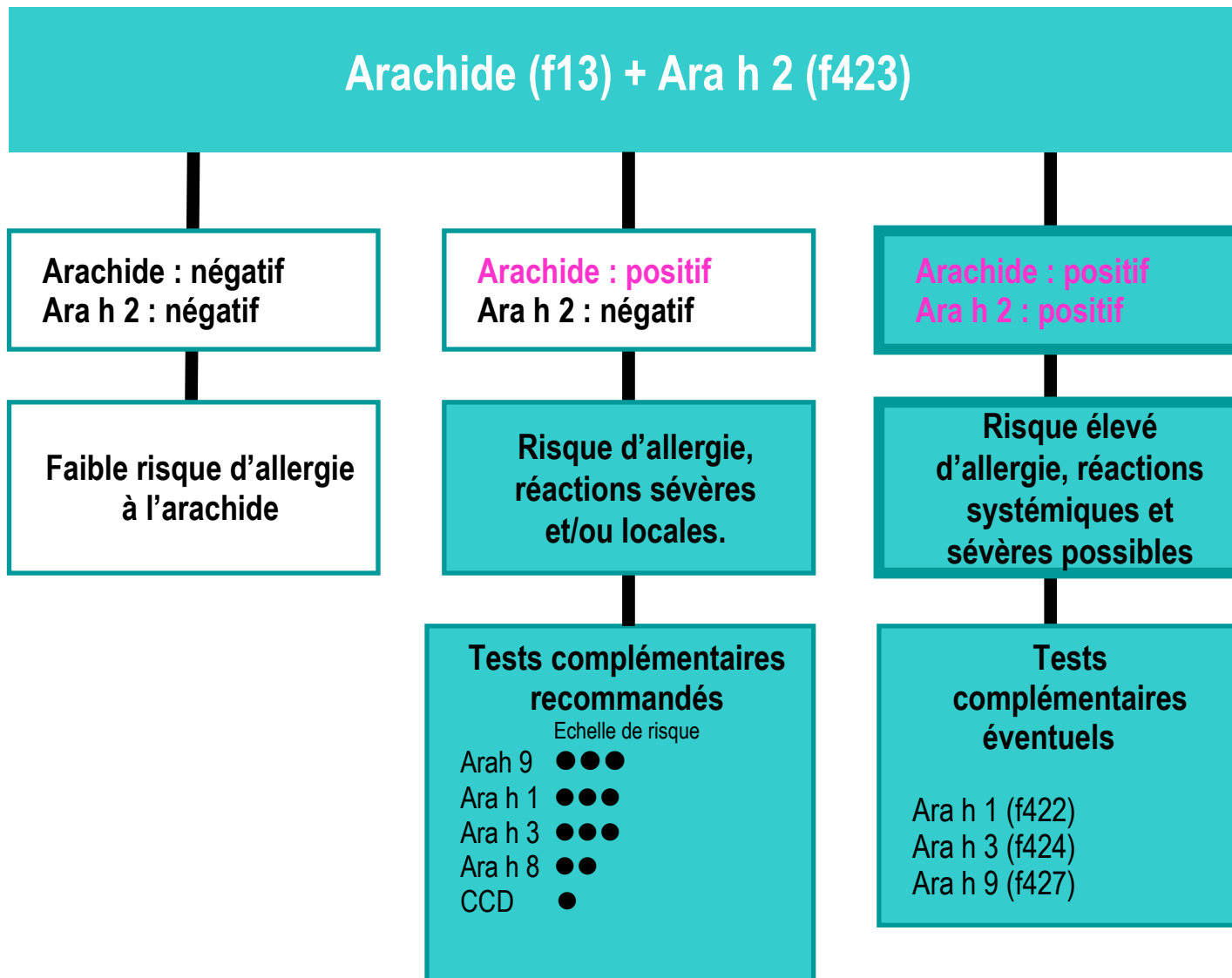
Apports de ces allergènes

- + **spécifiques** / f13 :
(résultats de Nancy)

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

Suspicion d'allergie à l'arachide

Est-ce une allergie ? Risque de réactions sévères ?

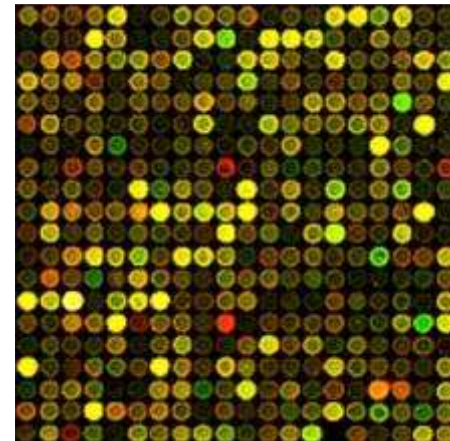


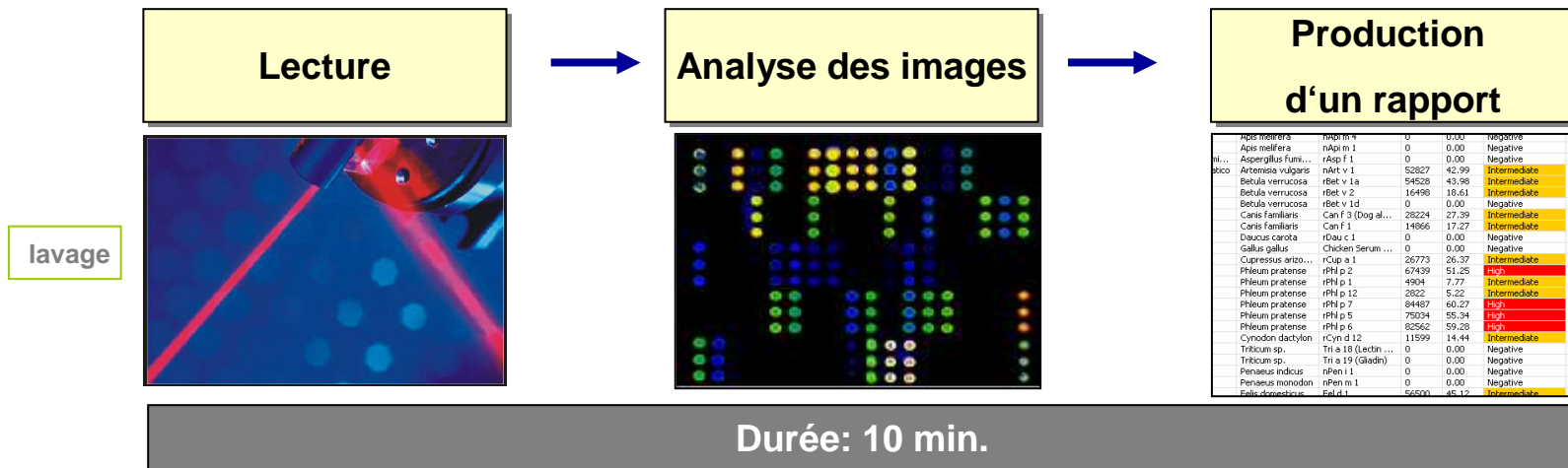
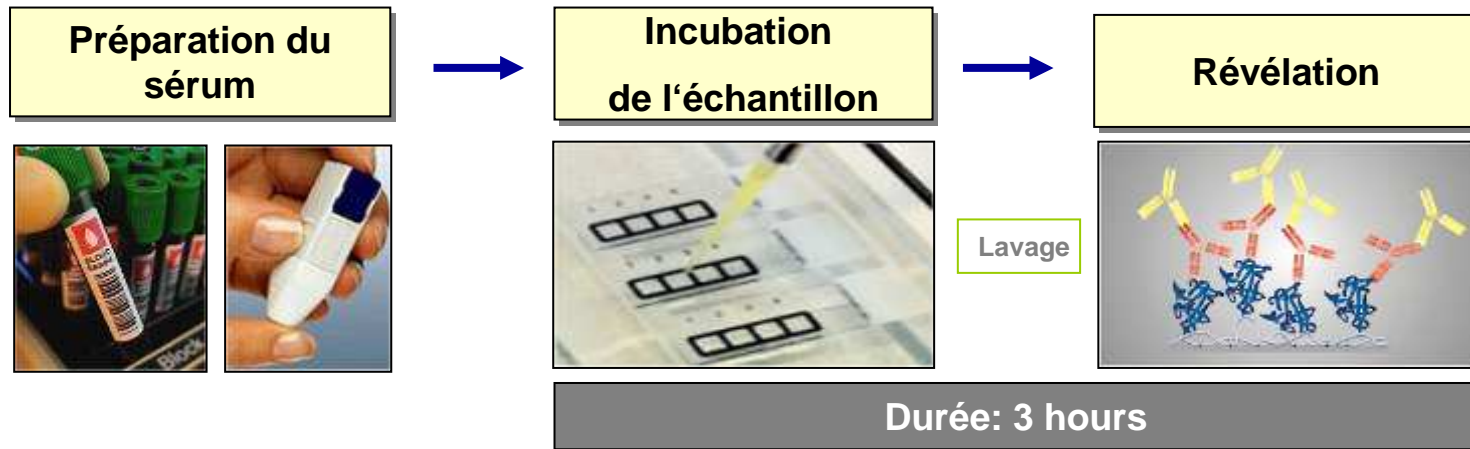
4. Outil pour **personnaliser la prise en charge** du patient suivant son profil de sensibilisation :

- Tests de provocation, régime d'éviction...
- Immunothérapie
- Immunothérapie à la carte ?

Qu'est-ce que la technologie Biochip ?

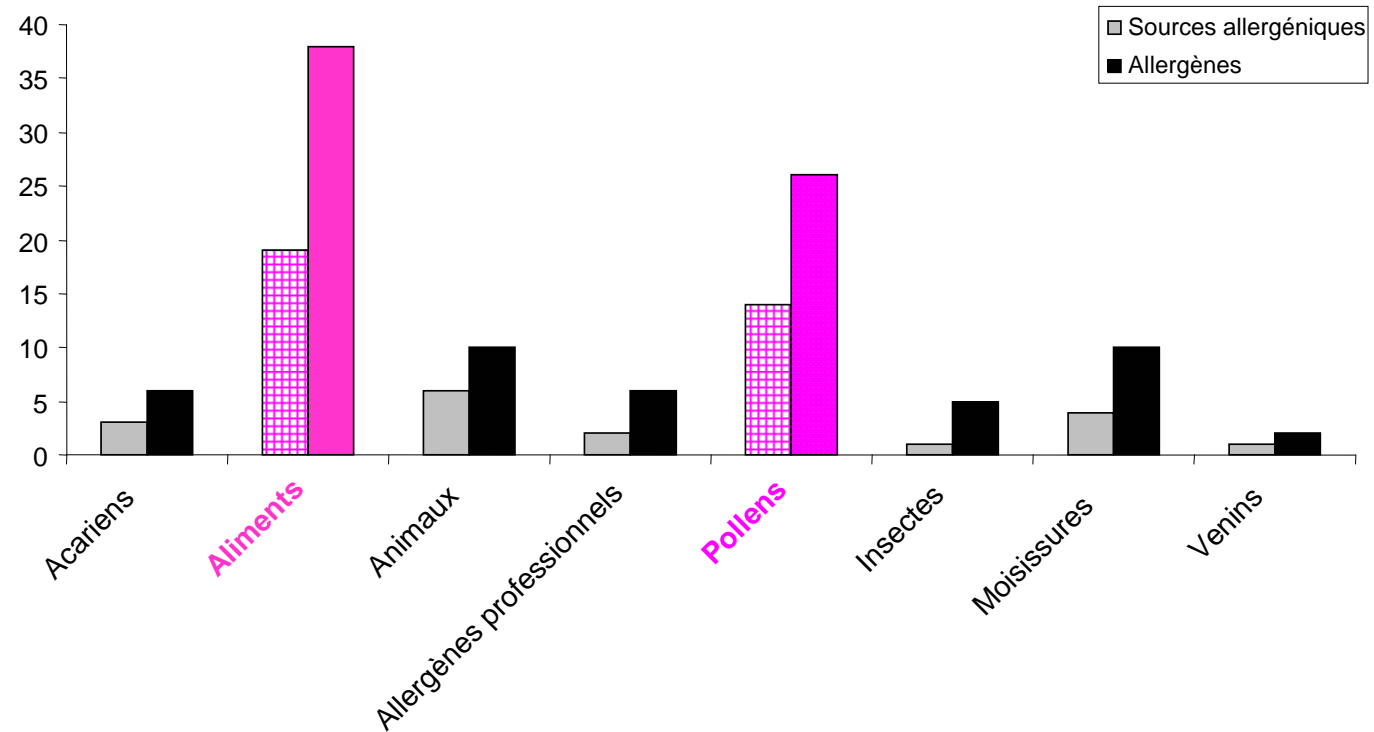
- La possibilité de fixer différentes biomolécules sur un format microscopique
- La possibilité d'obtenir simultanément un (très) grand nombre de résultats
- La possibilité d'exploration parallèles (ex: IgE / IgG)
- D'infimes quantités de sérum (**20 μ L**) et de réactifs





- 1ère page : résumé
- Puis rapport exhaustif par source allergénique et par famille protéique

103 allergènes représentant 49 sources allergéniques



46 molécules natives, 57 molécules recombinantes

(/86 ImmunoCap)