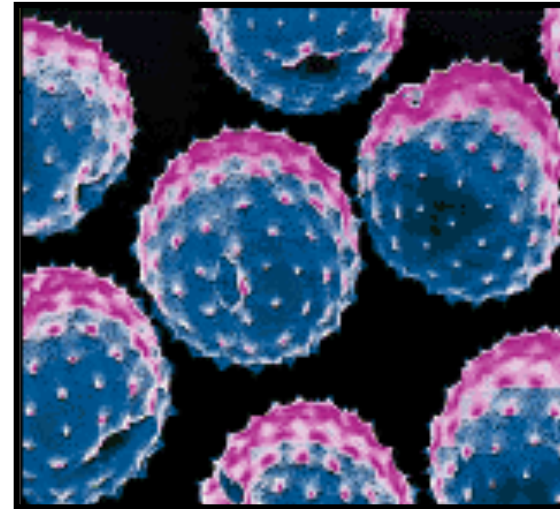


TESTS BIOLOGIQUES EN ALLERGOLOGIE : exploration cellulaire et humorale



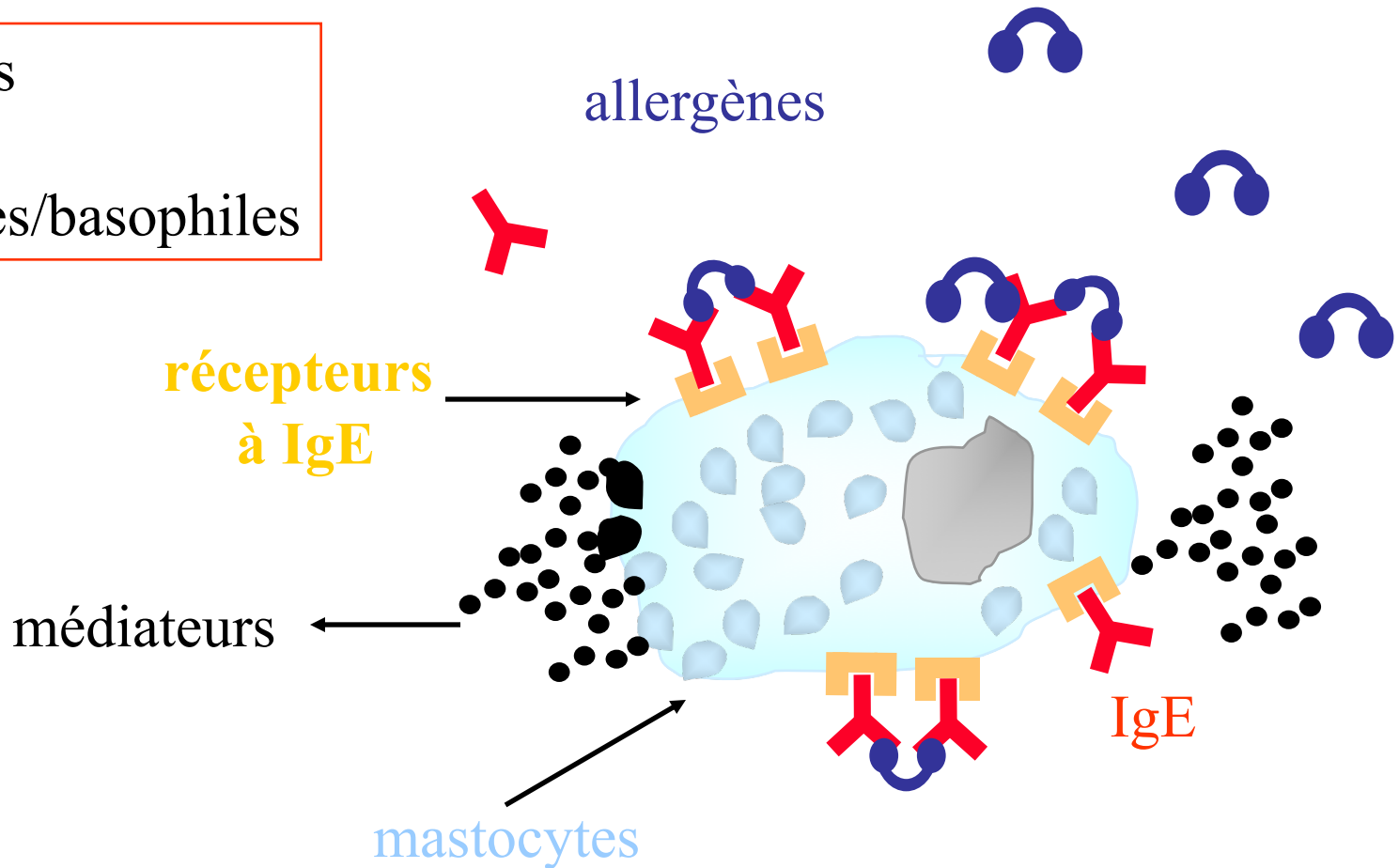
Dr Céline Beauvillain
Laboratoire d'Immunologie
et d'Allergologie
INSERM U1307-CRCI2NA
CHU Angers

Biologie de l'allergie : du fondamental au diagnostic

- 1- La réaction allergique
- 2- Le diagnostic
- 3- Résumé

Hypersensibilité de type I

Allergènes
IgE
Mastocytes/basophiles



Dégranulation des mastocytes dépendante des IgE
→ libération de médiateurs → allergie

Biologie de l'allergie : du fondamental au diagnostic

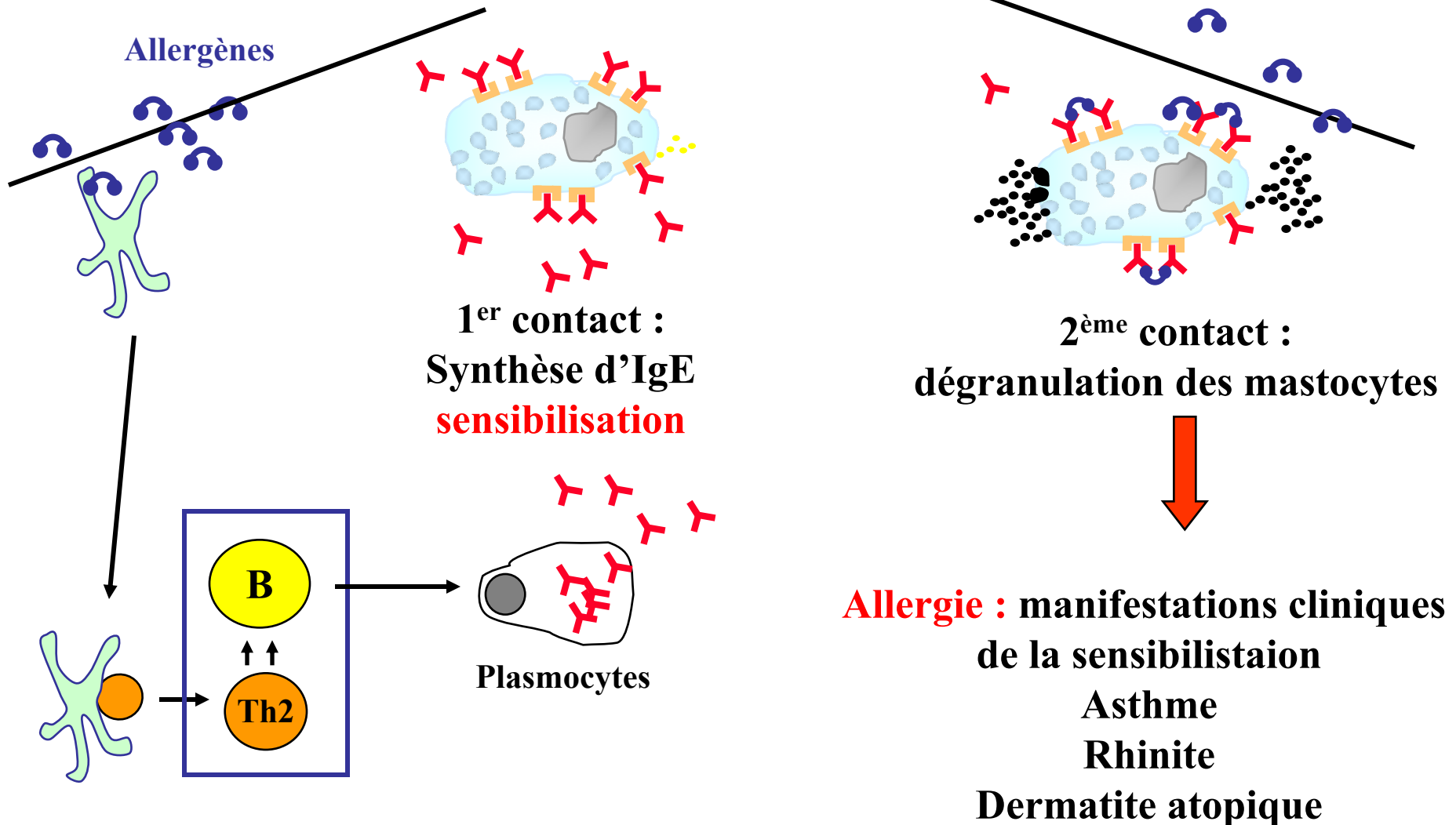
1- La réaction allergique

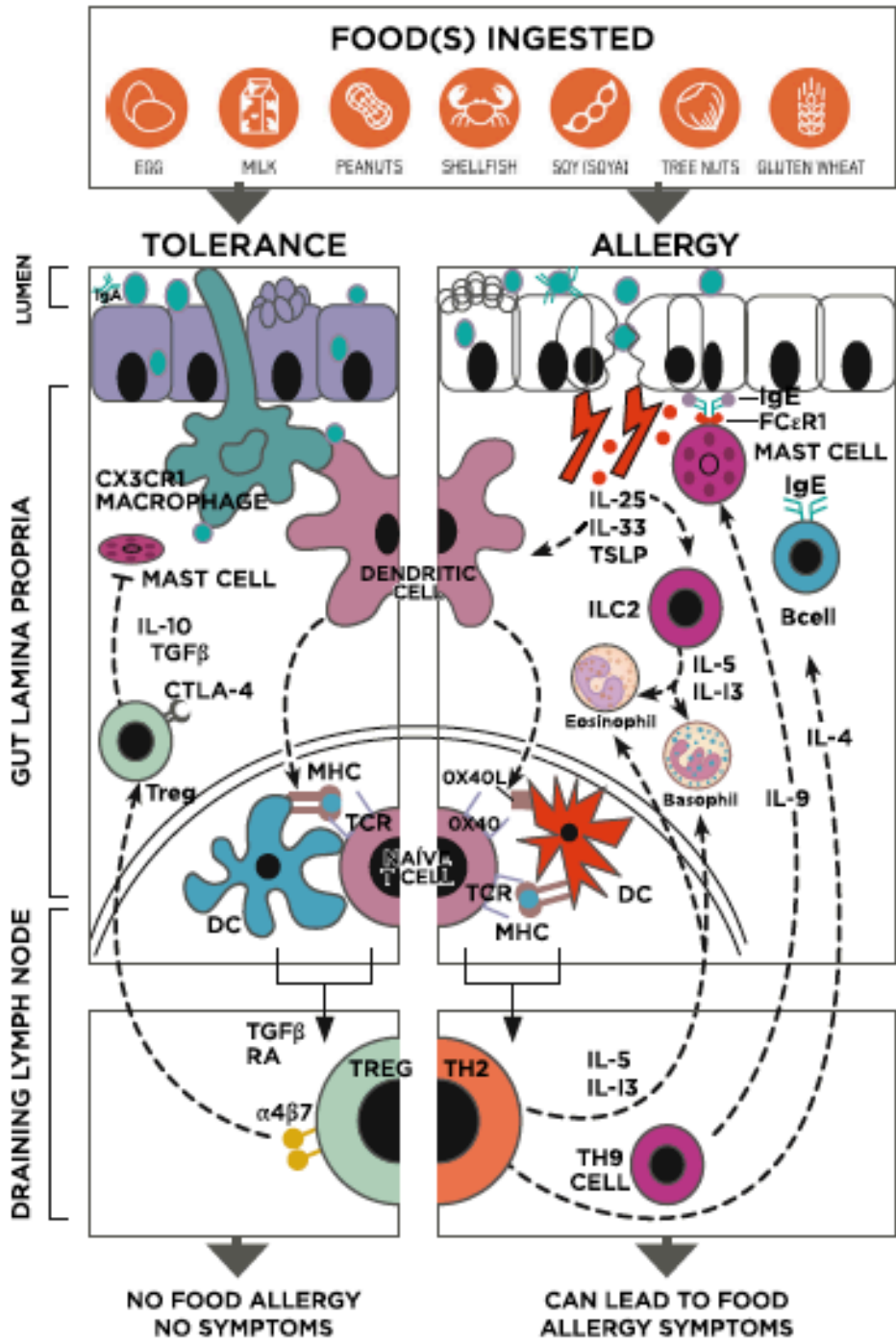
- Sensibilisation
- Réaction immédiate
- Réaction retardée

2- Le diagnostic

3- Résumé

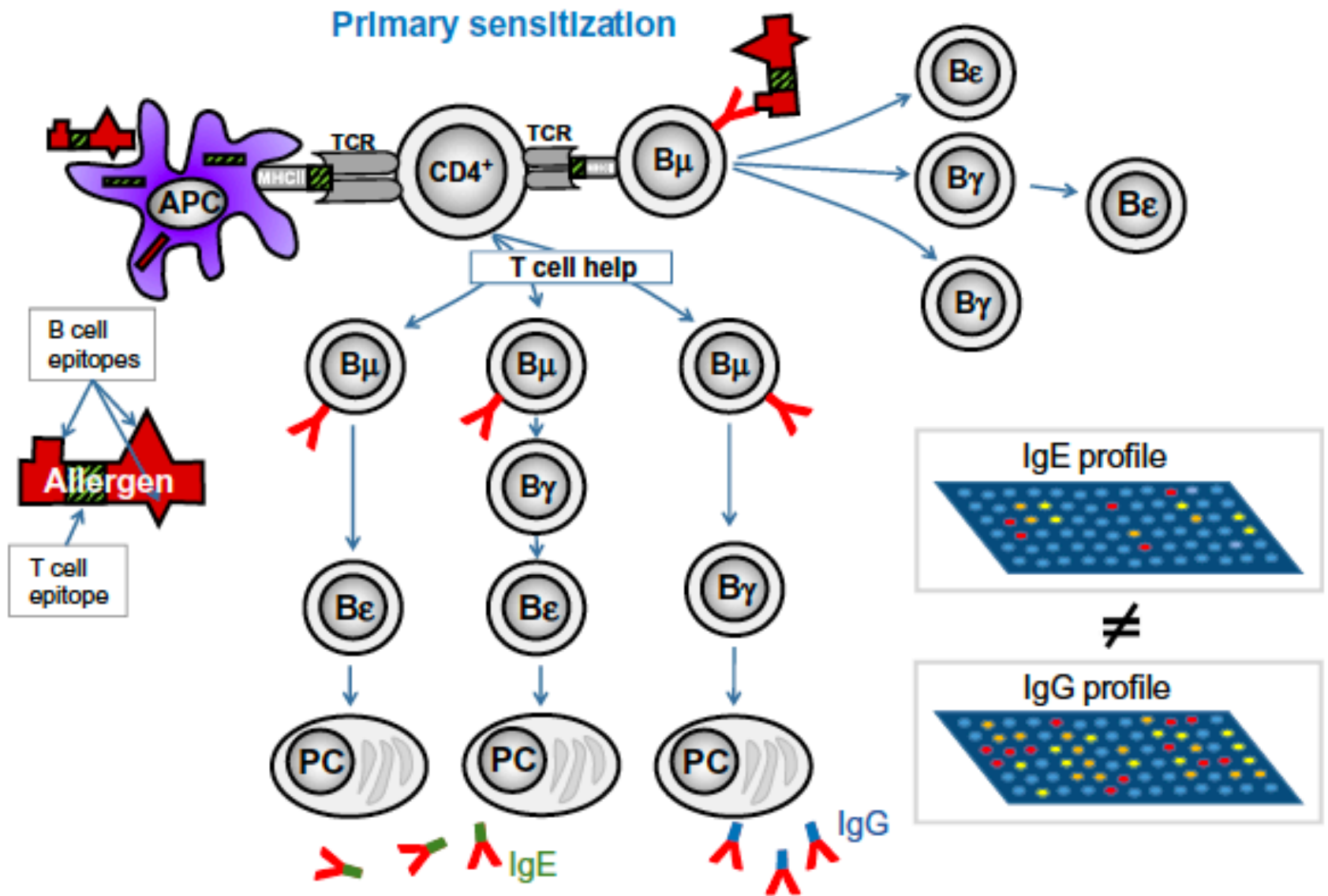
La réponse allergique vis-à-vis d'un allergène requiert deux contacts





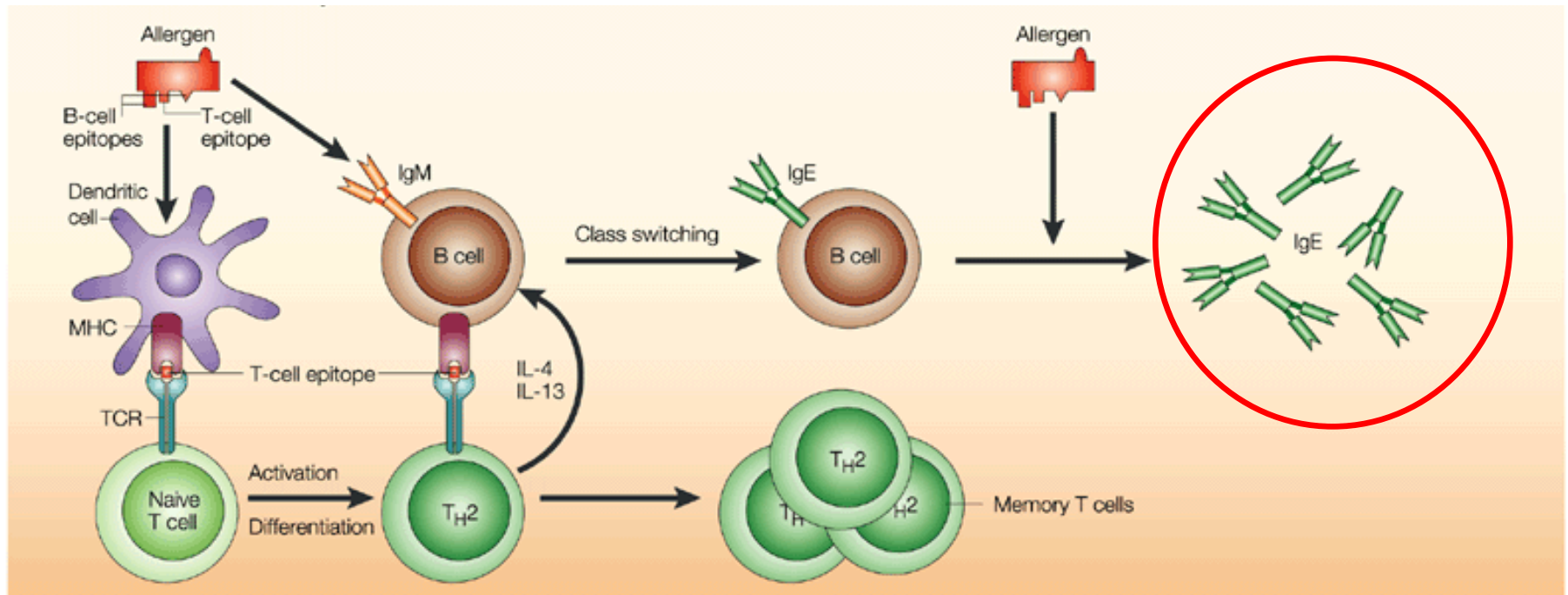
Biologie de l'allergie : du fondamental au diagnostic

- 1- La réaction allergique
 - Sensibilisation
 - Réaction immédiate
 - Réaction retardée
- 2- Le diagnostic
- 3- Résumé

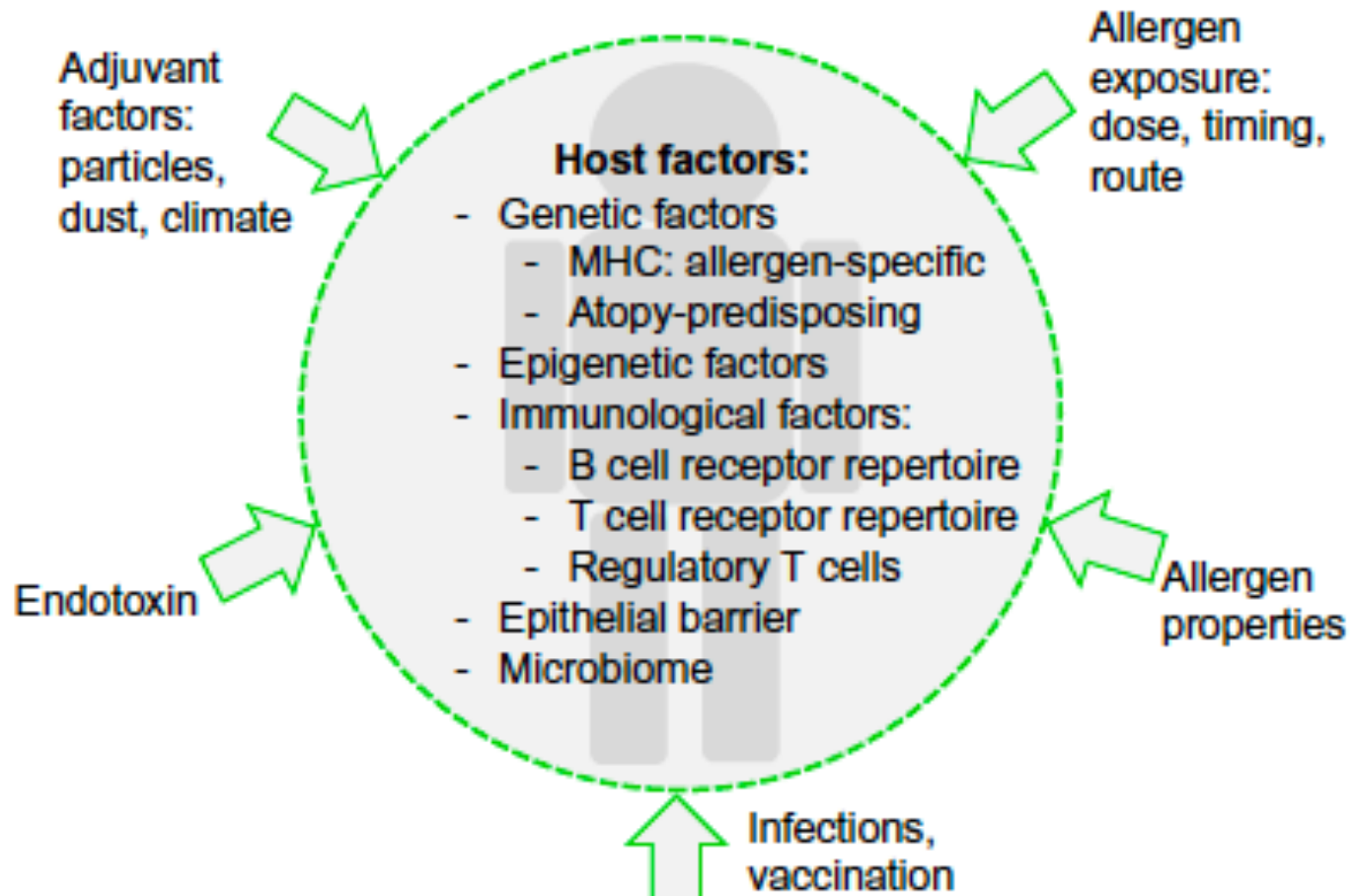


LA REACTION ALLERGIQUE

SENSIBILISATION du mastocyte et du basophile



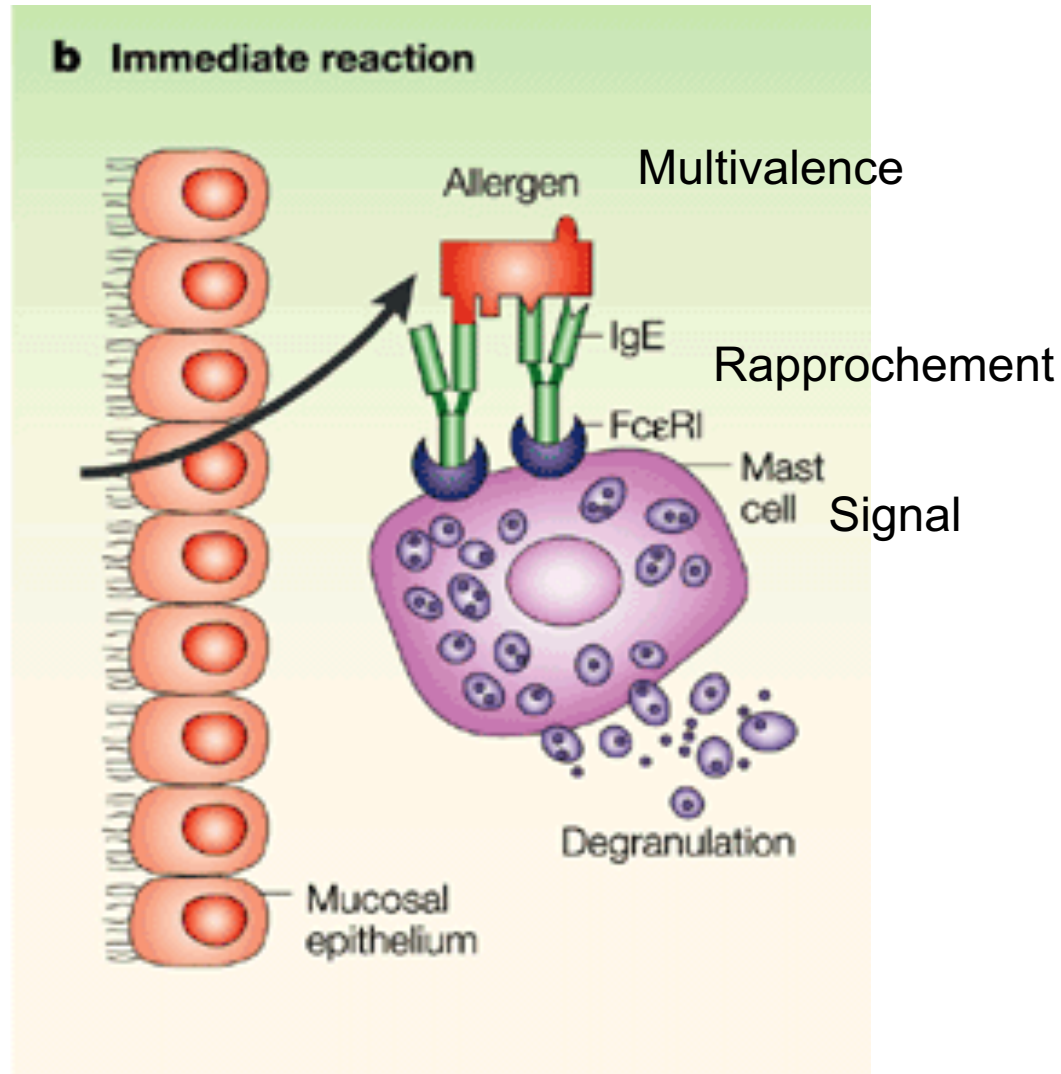
Factors in allergic sensitization



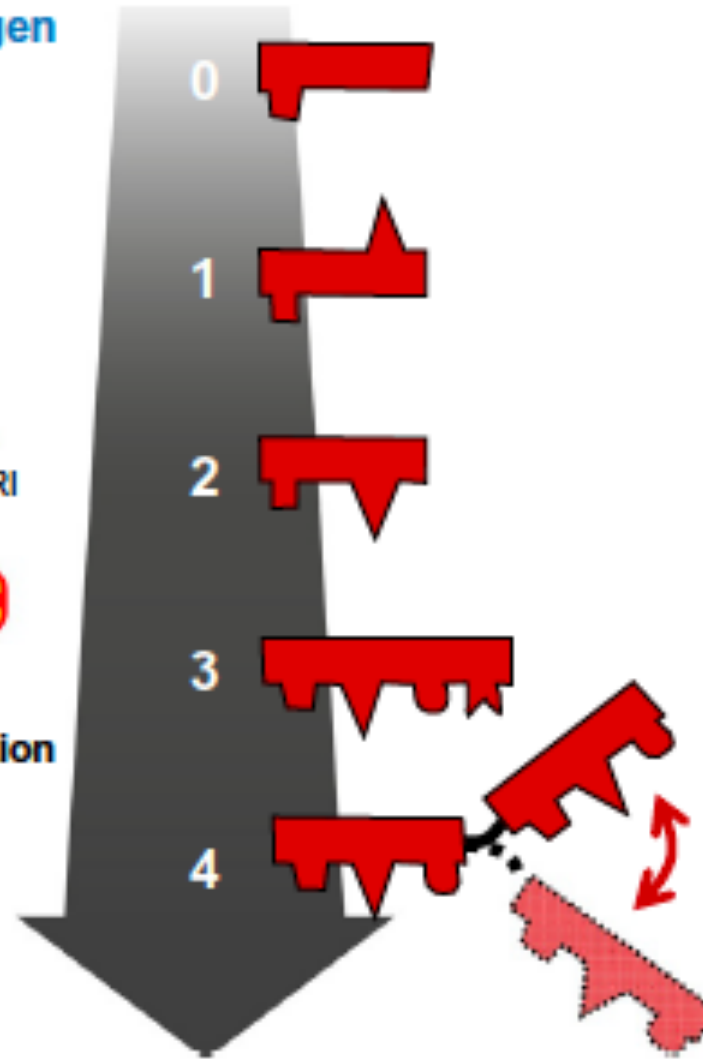
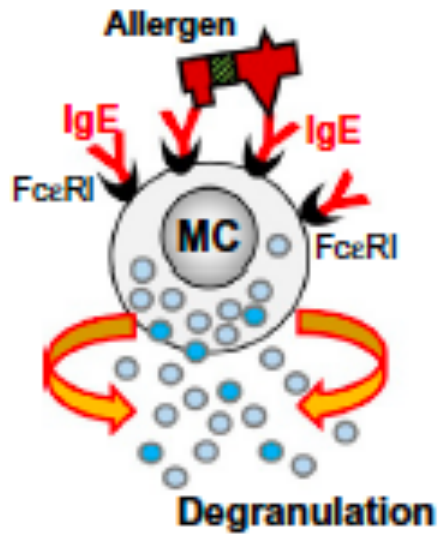
Biologie de l'allergie : du fondamental au diagnostic

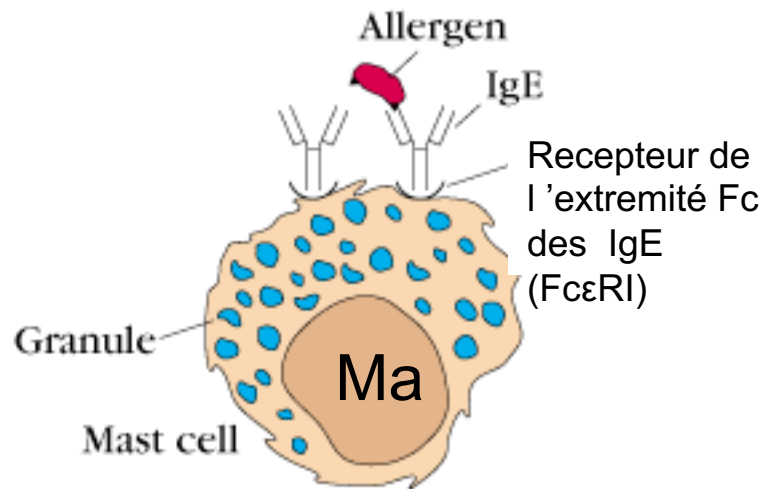
- 1- La réaction allergique
 - Sensibilisation
 - Réaction immédiate
 - Réaction retardée
- 2- Le diagnostic
- 3- Résumé

LA REACTION ALLERGIQUE : Déclenchement

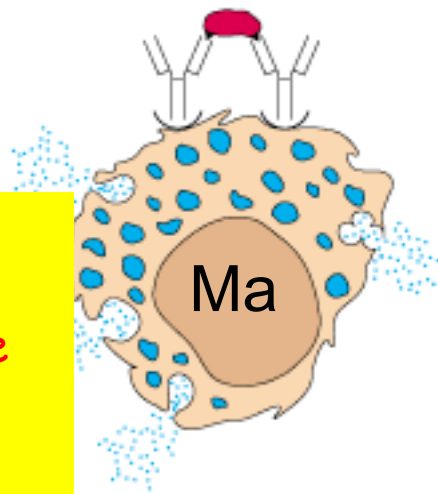


Potency of an allergen

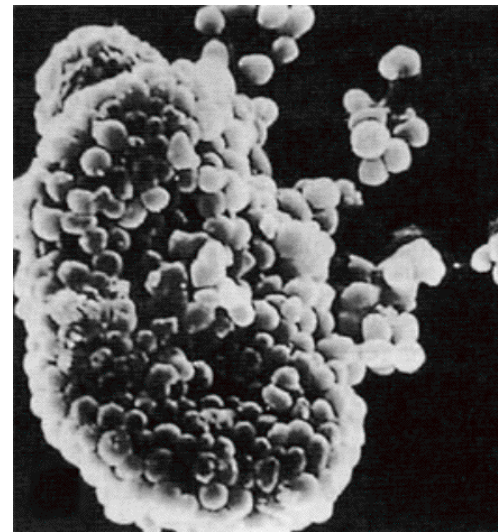




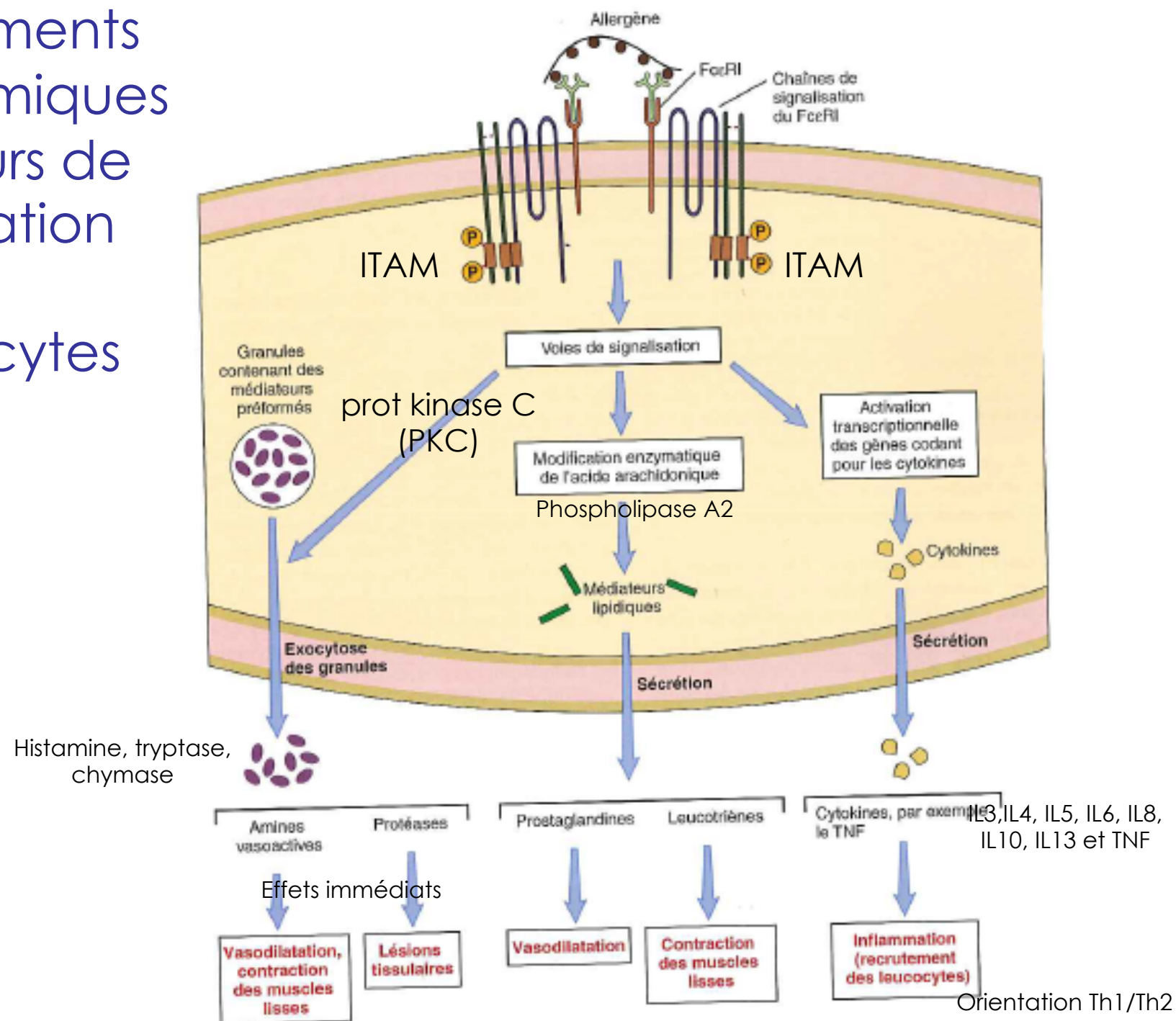
DEGRANULATION



Histamine et autres substances de l'allergie immédiate

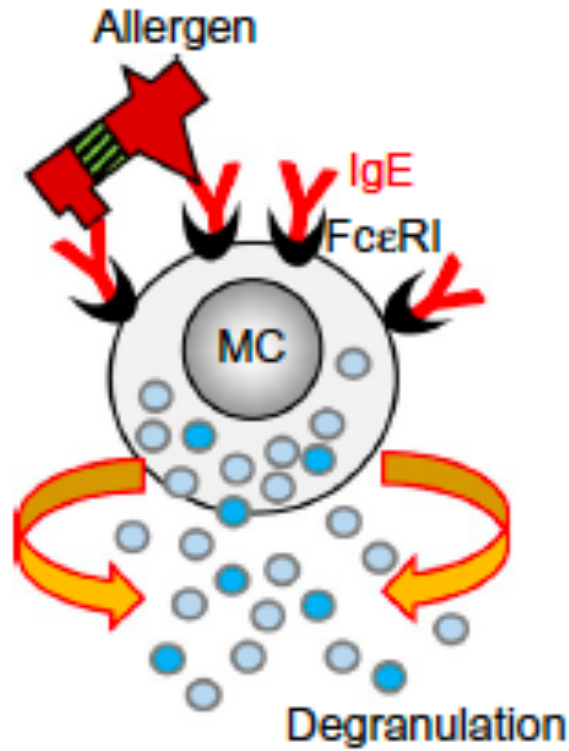


Événements biochimiques au cours de l'activation des mastocytes

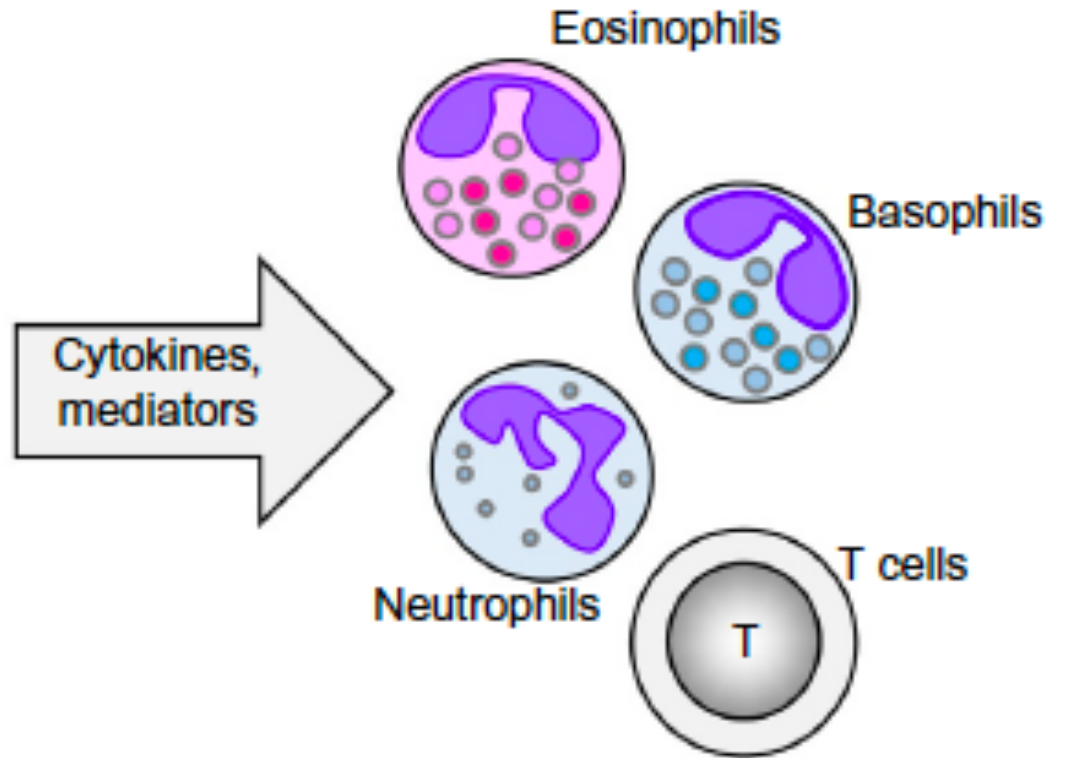


A

Immediate response



Late phase response



Biologie de l'allergie : du fondamental au diagnostic

1- La réaction allergique

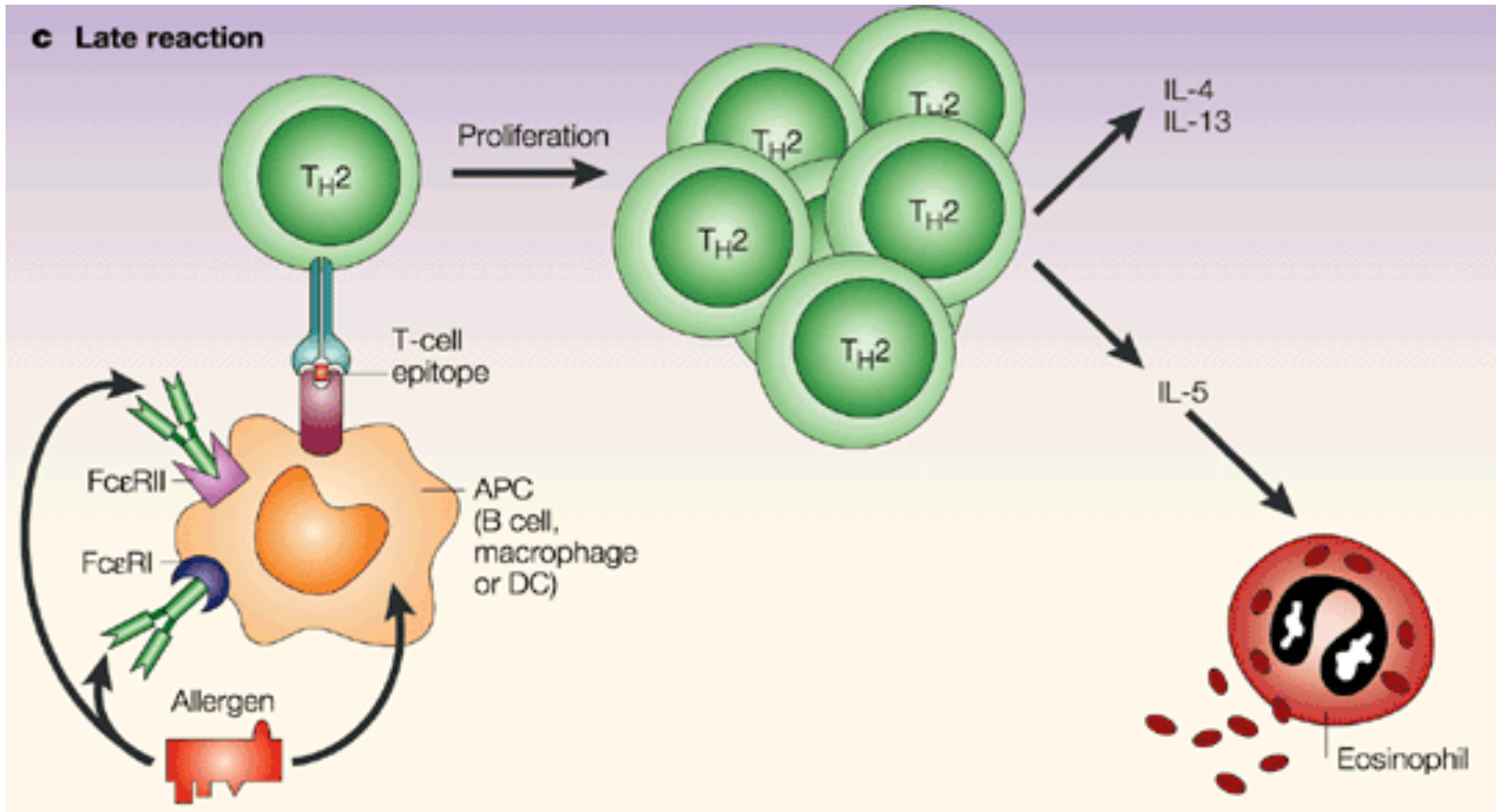
- Sensibilisation
- Réaction immédiate
- Réaction retardée

2- Le diagnostic

3- Résumé

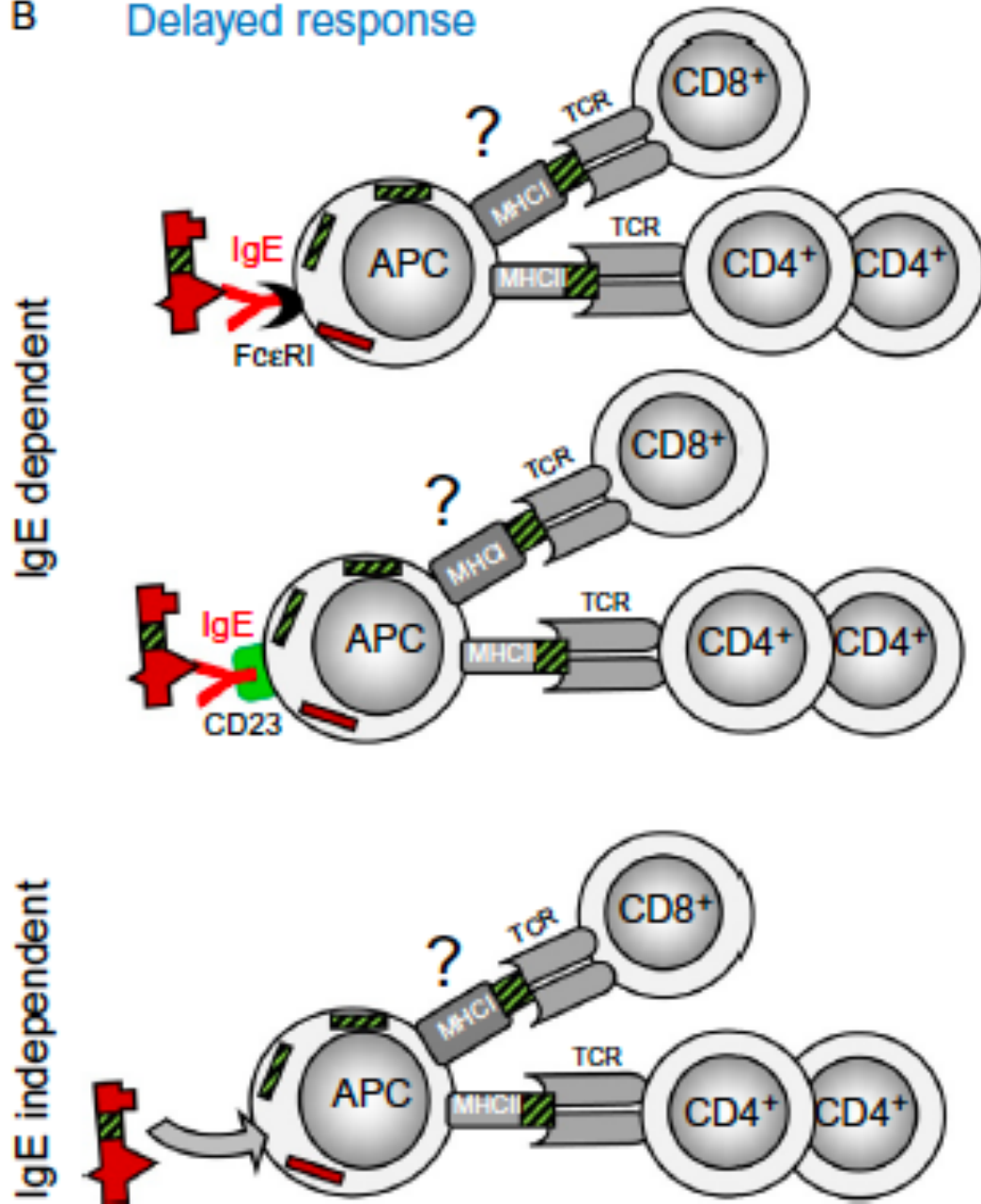
LA REACTION ALLERGIQUE

La phase tardive



- A la réaction immédiate fait suite chez certains patients, une réaction inflammatoire tardive (retardée / 4-6 h après contact)
- Acteurs de phase tardive : **éosinophiles, lymphocytes Th2**

B Delayed response



La phase tardive ou réaction inflammatoire localisée

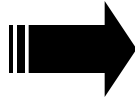
- 4-6 heures après initiation de la réaction allergique - dure 1 à 2 jours
- Infiltration de cellules dites inflammatoires
 - éosinophiles (30%) : la cellule responsable des dégâts tissulaires
 - neutrophiles (30%)
 - lymphocytes T CD4+ activés
 - basophiles
- Médiateurs produits pendant la phase précoce favorisent le recrutement local et l'activation de cellules inflammatoires
 - cytokines : IL-4, TNF α , IL-1
 - chimiokines : IL-8, éotaxine, Rantes, MIP-1a, MCP-3 ..
 - histamine : active les cellules endothéliales (IL-6, IL-8)
 - IgE : activation cellules CD23+

Biologie de l'allergie : du fondamental au diagnostic

- 1- La réaction allergique
- 2- Le diagnostic
- 3- Résumé

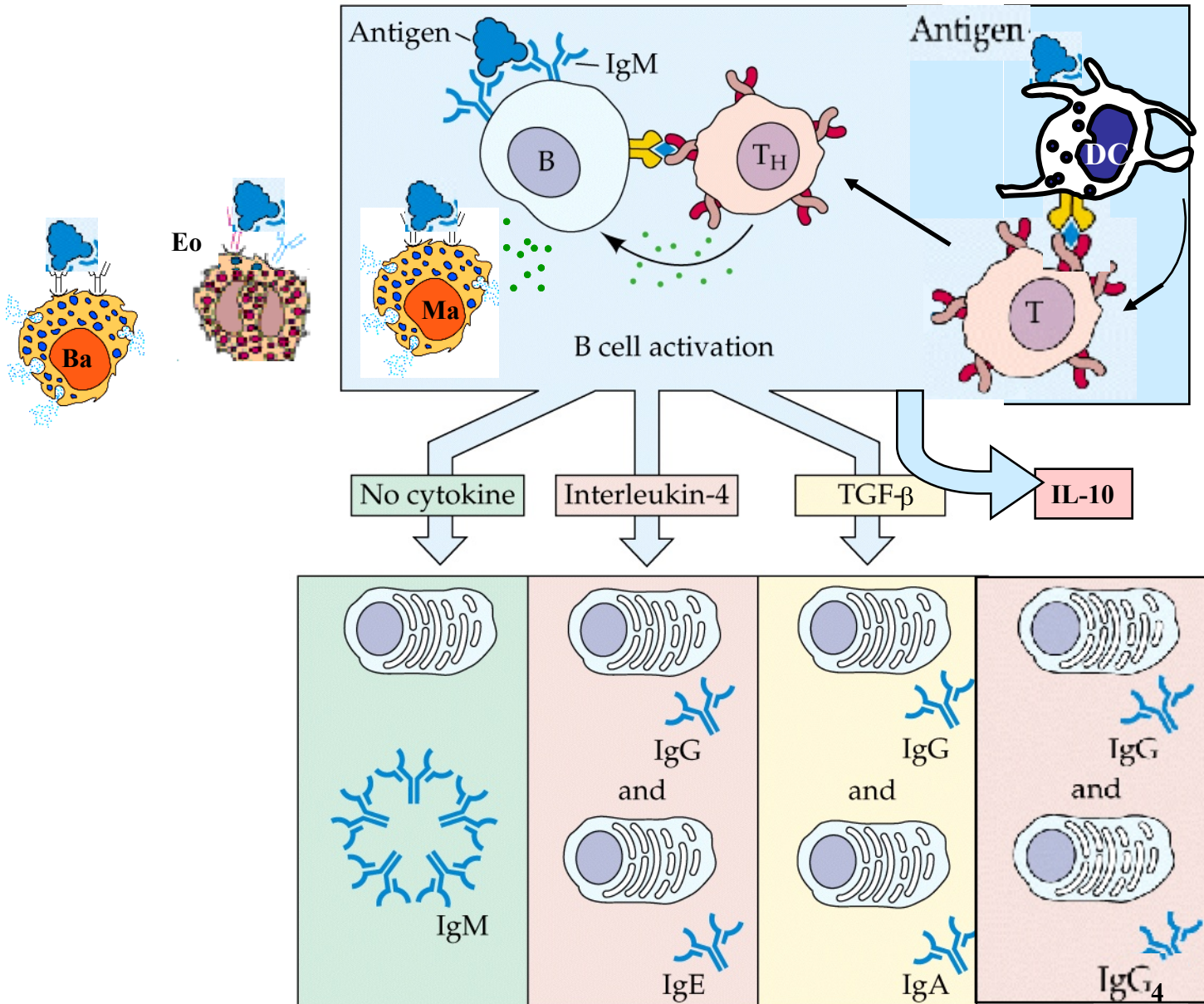
Démarche diagnostique

- Interrogatoire :

Historique  imputabilité

- Examen clinique

Démarche diagnostique



Test cutané

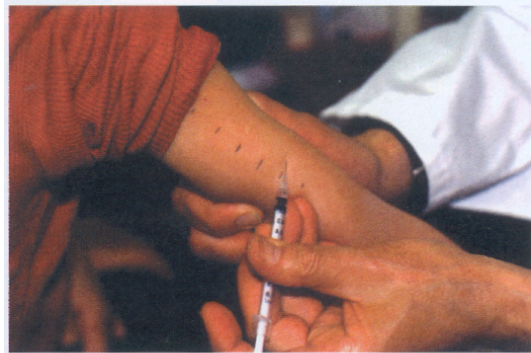
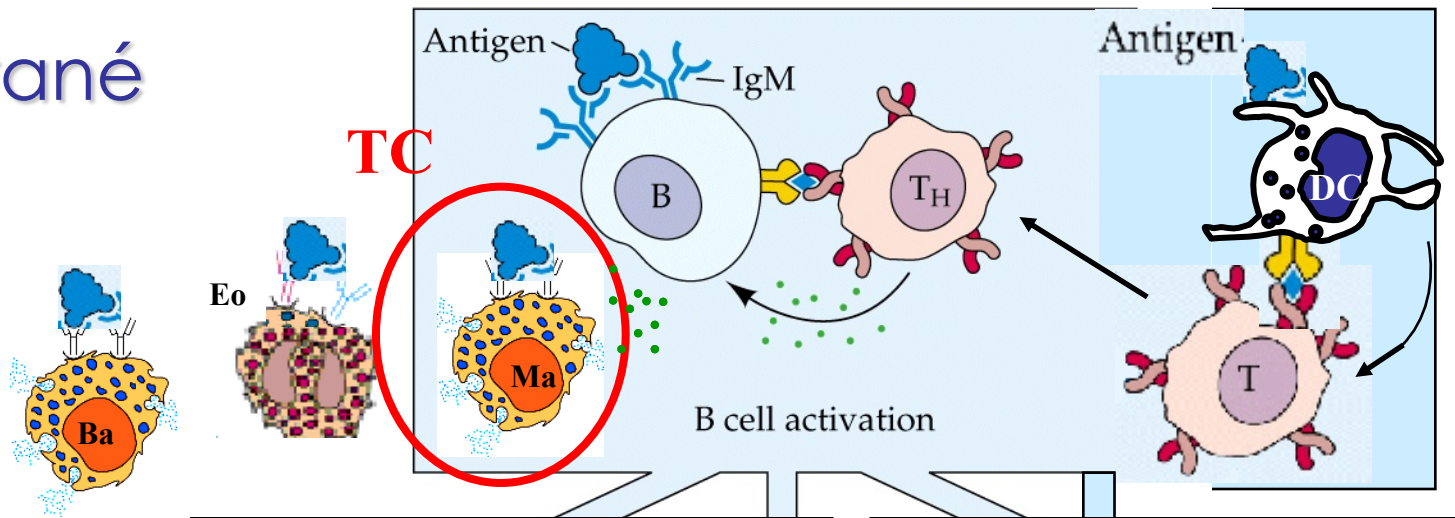
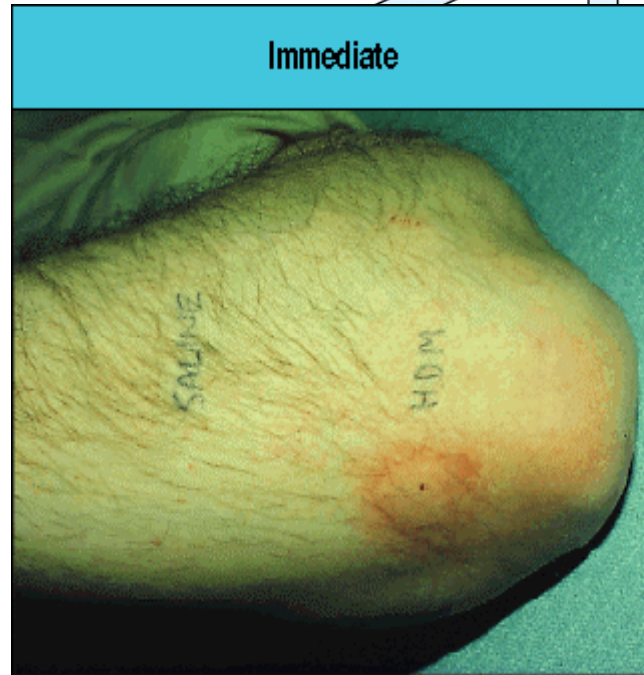


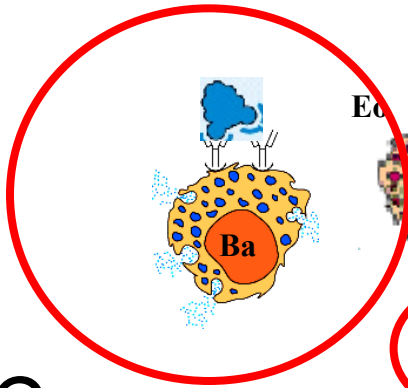
FIG. 11 Tests cutanés à lecture immédiate par intra-dermo réaction.



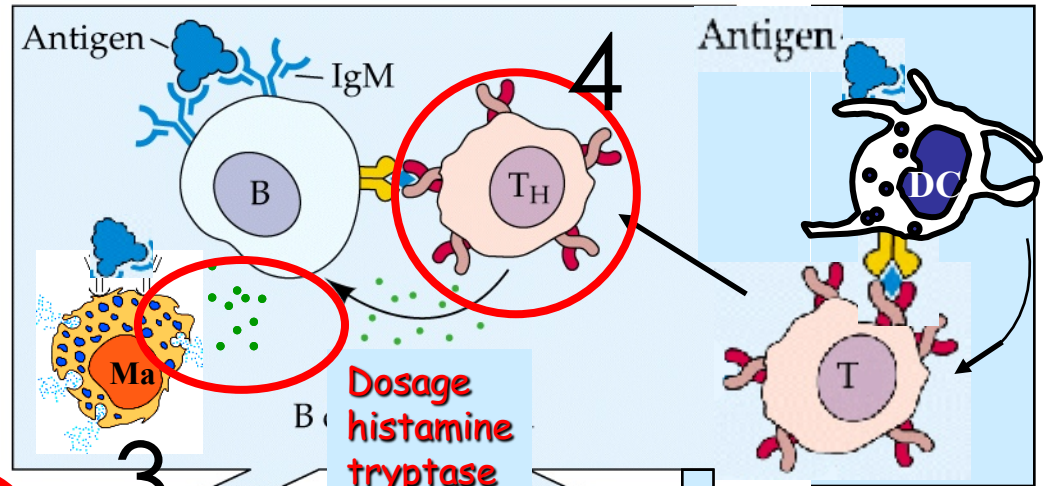
Tests biologiques

TAB
HR

2



Dosage ECP



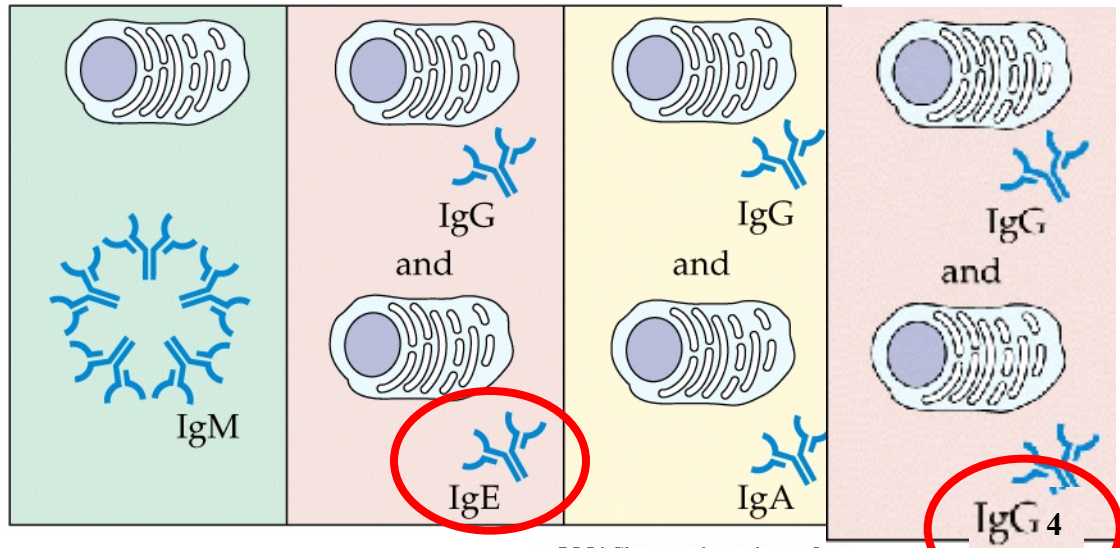
Dosage
histamine
tryptase

No cytokine

Interleukin-4

TGF-β

IL-10

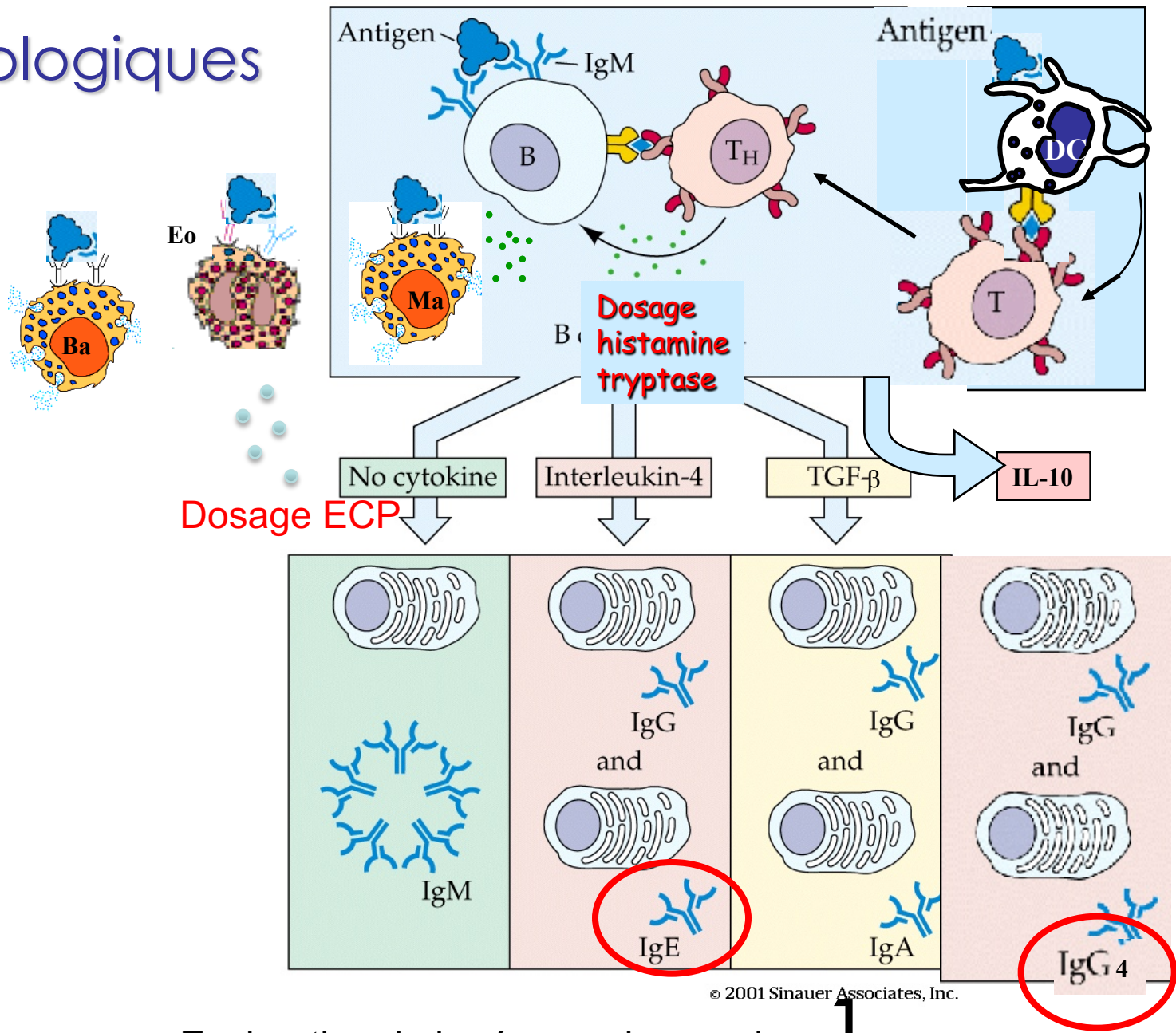


© 2001 Sinauer Associates, Inc.

Exploration de la réponse humorale

1

Tests biologiques

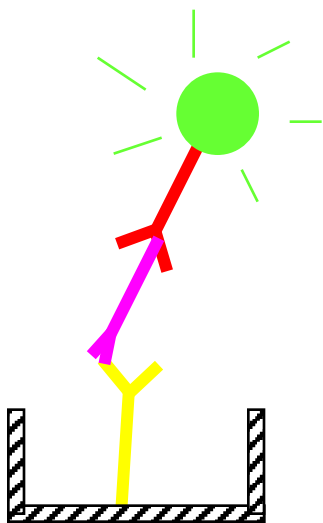


Exploration de la réponse humorale

Diagnostic biologique : Dosages des Ig

IgE totales
IgE spécifiques

Quantitatifs ou semi-quantitatifs



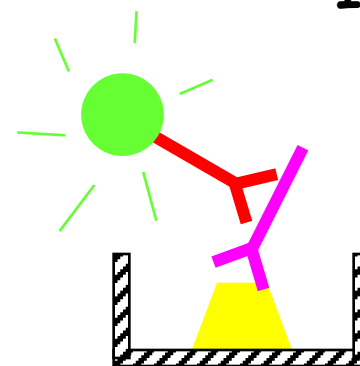
IgE totales

Ac anti-IgE

Serum patient

Ac anti IgE

→ Mesure de la fluorescence



IgE spécifiques

Ac anti IgE

Serum patient

Allergène



Valeurs de références des IgE totales

- Valeurs de référence selon l'âge (données fournisseur)
- 6 semaines <4 kU/L
- 3 mois <7,2 kU/L
- 6 mois <12,8 kU/L
- 9 mois <17,4 kU/L
- 1 an <22,8 kU/L
- 2 ans <40,3 kU/L
- 3 ans <56 kU/L
- 4 ans <70 kU/L
- 6 ans <98 kU/L
- 8 ans <124 kU/L
- 10 ans <148 kU/L
- Adultes <114 kU/L
- Calibration selon le standard 75/502 de l'OMS (human IgE), 1 UI/L ~ 2.4ng/L IgE

Technique des CLA-Hitachi

- Bandelettes coatées avec 30 allergènes (3 types de bandelettes)
- Mise en contact avec sérum du patient
- Révélation par anti-IgE couplés à une enzyme
- Réaction de chimioluminescence
- Lecture au luminomètre
- Résultats sous forme de classes de 0 à 4



Résultats du test :

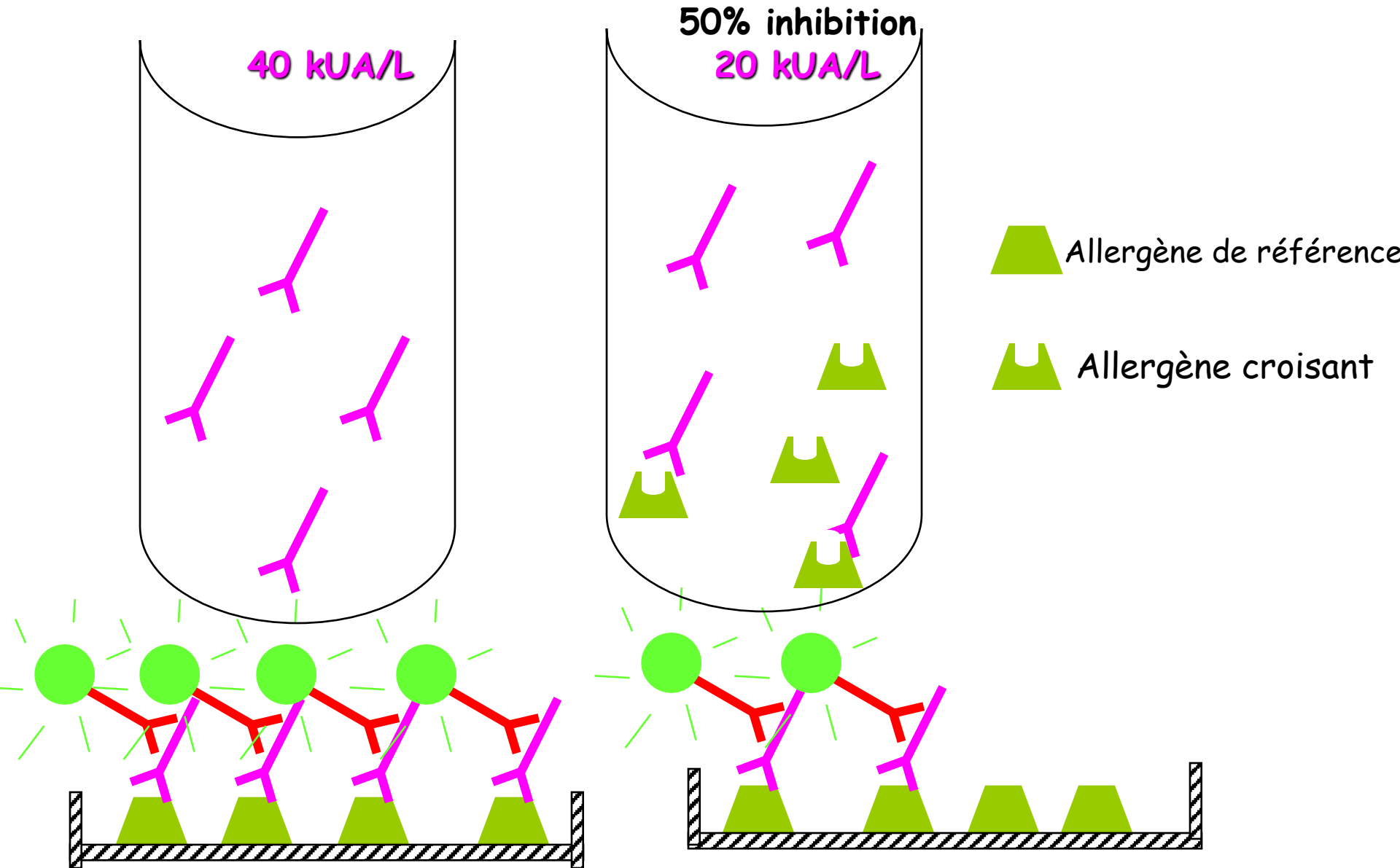
•Le Luminomètre mesure l'émission de lumière en unités de luminescence (ULs) desquelles sont soustraites celles du contrôle négatif. Les valeurs sont ensuite classées de 0 à 4 selon le tableau de résultats ci-dessous :

CLA Classe	ULs nettes	Concentration d'IgE
4	> 242	Niveau très élevé
3	143-242	Niveau élevé
2	66-142	Niveau modéré
1	27-65	Faible niveau
0/1	12-26	Très faible niveau
0	0-11	Aucune IgE détectée

Inhibition des IgE spécifiques

- Pour mettre en évidence une ou des protéines communes entre 2 allergènes
- Pour vérifier l'activité d'un extrait allergénique (allergie croisée)
- Pour sélectionner un allergène en vue d'une désensibilisation

Inhibition de Cap



Diagnostic biologique de l'allergie

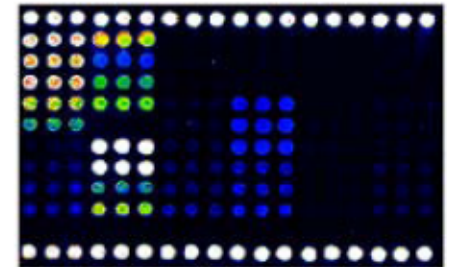
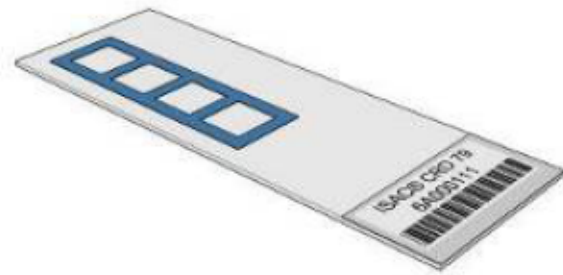
- Diagnostic à l'échelon moléculaire
- Raisonnement par famille moléculaire
 - Différencier sensibilisation primaire et sensibilisation croisée
 - Etablir un risque de réaction sévère potentiel
 - Meilleure sélection des indications d'ITS

Evolution des techniques de dosage des IgE spécifiques

- Grand nombre d'allergènes pouvant être testés en même temps
- Faible quantité de sérum
- Quantification des résultats
- Détermination d'un profil allergénique
- En 2 ou 3^{ème} intention : tests multiallergènes utilisant le CRD = components-resolved diagnostic, suivant les protéines reconnues par les IgE → Il existe différentes familles de protéines allergéniques reconnues par les IgE.
- → Comment??

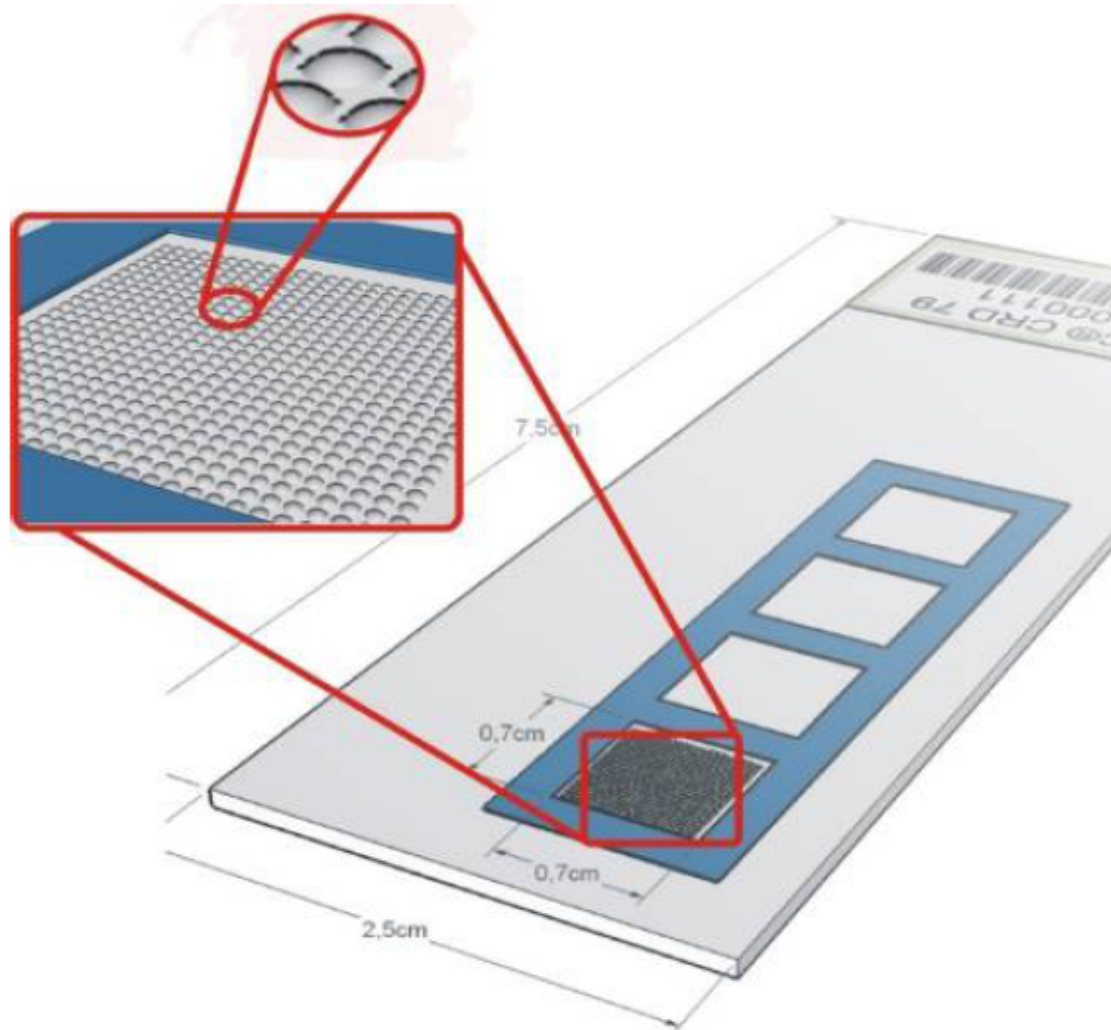
ImmunoCAP ISAC®

Immuno Solid-Phase Allergen Chip



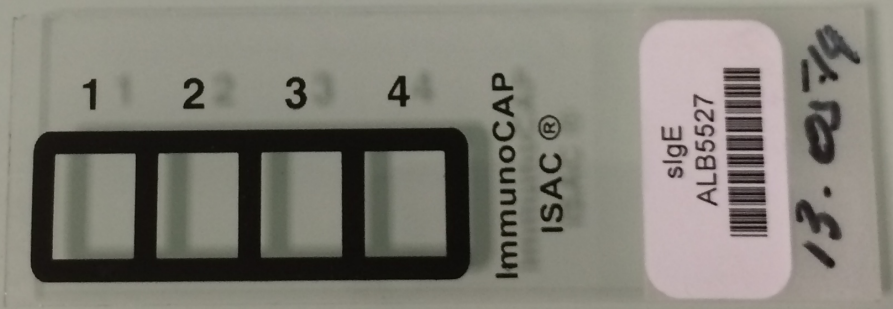
ImmunoCAP ISAC[®]

Ø ~ 200 µm

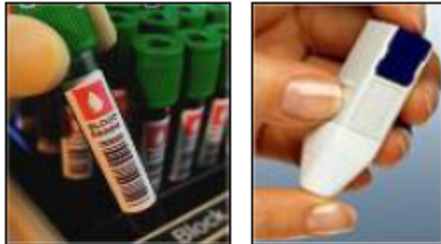


Dimensions

~ 100 picogram / spot > 100 allergènes / cm²



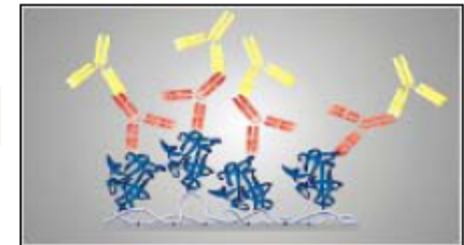
Préparation du sérum



Incubation de l'échantillon



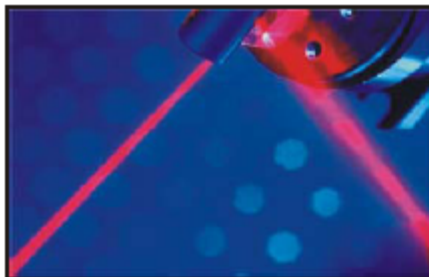
Révélation



Lavage

Durée: 3 hours

Lecture



Analyse des images



Production d'un rapport

Aspergillus	rAsp v 1	0	0,80	Negative
Aspergillus	rAsp v 2	0	0,80	Negative
Aspergillus Fum...	rAsp F 1	0	0,80	Negative
Aspergillus vulgatus	rAsp v 1	92837	42,99	Intermédiaire
Beitula verrucosa	rBet v 1a	94525	43,98	Intermédiaire
Beitula verrucosa	rBet v 2	16495	16,61	Intermédiaire
Beitula verrucosa	rBet v 1d	0	0,80	Negative
Caric fanalis	Carif 3/09ag al...	28224	27,39	Intermédiaire
Caric fanalis	Carif 1	14965	17,27	Intermédiaire
Daucus carota	rDau c 1	0	0,80	Negative
Gallus gallus	Chicken Serum ...	0	0,80	Negative
Cupressus arbo...	rCup a 1	28775	28,37	Intermédiaire
Phleum pratense	rPh p 2	67439	51,25	High
Phleum pratense	rPh p 1	4904	7,77	Intermédiaire
Phleum pratense	rPh p 12	2022	5,22	Intermédiaire
Phleum pratense	rPh p 7	91487	60,27	High
Phleum pratense	rPh p 5	75034	55,34	High
Phleum pratense	rPh p 6	82562	56,28	High
Cynodon dactylon	rCyn d 12	11599	14,44	Intermédiaire
Trifolium sp.	Trif 18 (Lucid)	0	0,80	Negative
Trifolium sp.	Trif 19 (Gladi)	0	0,80	Negative
Penaeus indicus	rPen i 1	0	0,80	Negative
Penaeus monodon	rPen in 1	0	0,80	Negative
Crataegus sp.	Crat 1	50201	45,12	Intermédiaire

Durée: 10 min.



SCIENTIFIC
N° 123456789
Commercial par H&M Diagnostics - Phadia
N° 23 456789 10 11 1234567

N° Vert : 0800 21 20 72
Phadia

Phadia
Réception

C A P I T A L B I O

CapitalBio

LuxScan-10K/A

can images

oad images

Results

Calibration

Export

Administration

Shut down

Errors

Phadia MIA

Image Sample Data Approval Report

Zoom in (+) | Zoom out (-) | Full | Clear



Move array | Move feature | Quantify | Reset | Annotate

INFORMATION ECHANTILLON

ID Echantillon : **CUK2427_1**
 Date échantillon : 13.12.2018
 Statut validation : Mesuré
 Date impression : 09.01.2019
 Courbe de calibration : CTR03 07/01/2019
 CUK2427_2

INFORMATION PATIENT

ID Patient :
 Nom :
 Date de naissance :
 ID/MR#:

INFORMATION MEDECIN PRESCRIPTEUR

Médecin prescripteur : **Dr BONNEAU Jean-Charles**
 Adresse : ALLERGOLOGIE
 CHU ANGERS

allergie

1. Résumé des résultats des dosages d'IgE spécifiques positifs

Composants d'aéroallergènes principalement spécifiques d'espèces

Pollens de graminées

Chiendent digité	nCyn d 1	Graminées, groupe 1	3,1 ISU-E	
Phléole	rPhl p 1	Graminées, groupe 1	21 ISU-E	
	rPhl p 2	Graminées, groupe 2	8,7 ISU-E	
	nPhl p 4	Réticuline oxydase	15 ISU-E	
	rPhl p 5	Graminées, groupe 5	50 ISU-E	
	rPhl p 6	Graminées, groupe 6	2,3 ISU-E	
	rPhl p 11	Protéine apparentée à Ole e 1	10 ISU-E	

Pollens d'arbres

Platane	nPla a 2	Polygalacturonase	0,8 ISU-E	
---------	----------	-------------------	-----------	--

Microorganismes

Alternaria	rAlt a 1	Glycoprotéine acide	0,8 ISU-E	
------------	----------	---------------------	-----------	--

Composants marqueurs de réactivité croisée

CCD				
CCD	nMUXF3	CCD	0,6 ISU-E	

ISAC Standardized Units (ISU-E)

< 0.3
 0.3 - 0.9
 1 - 14.9
 ≥ 15

Niveau

Indétectable
 Faible
 Modéré / Elevé
 Très élevé





ALEX® est un test de nouvelle génération permettant le diagnostic des allergies de type I (IgE dépendantes), basé sur une technologie exclusive à nano-billes donnant un large panorama de l'état de sensibilisation allergénique de chaque patient, avec un panel de plus de 280 extraits d'allergènes natifs et moléculaires complété par le dosage des IgE totales.



Les points forts :

- Large panel d'allergènes, optimisé individuellement ;
- Inhibition intégrée des CCD (*Cross-Reactive Carbohydrate Determinants*) ;
- Mesure simultanée des IgE totales et spécifiques ;
- Test multiplex avec composition de panels à la demande.

L'obtention de profils complets de sensibilisation par les systèmes monoplex classiques peut être difficile. Souvent, plusieurs cycles de tests sont nécessaires pour établir un diagnostic clair, et le dosage des IgE totales doit être réalisé séparément.

Pour rationaliser cette approche fragmentée, **ALEX®** donne une image exhaustive de la situation du patient, incluant les IgE totales.

Parmi les allergènes moléculaires disponibles en exclusivité dans ce panel, figurent les marqueurs de risque de chaque famille protéinique allergisante, comme les protéines de stockage, ainsi que d'autres nouveaux marqueurs (par exemple, l'acarien *Malassezia sympodialis*).

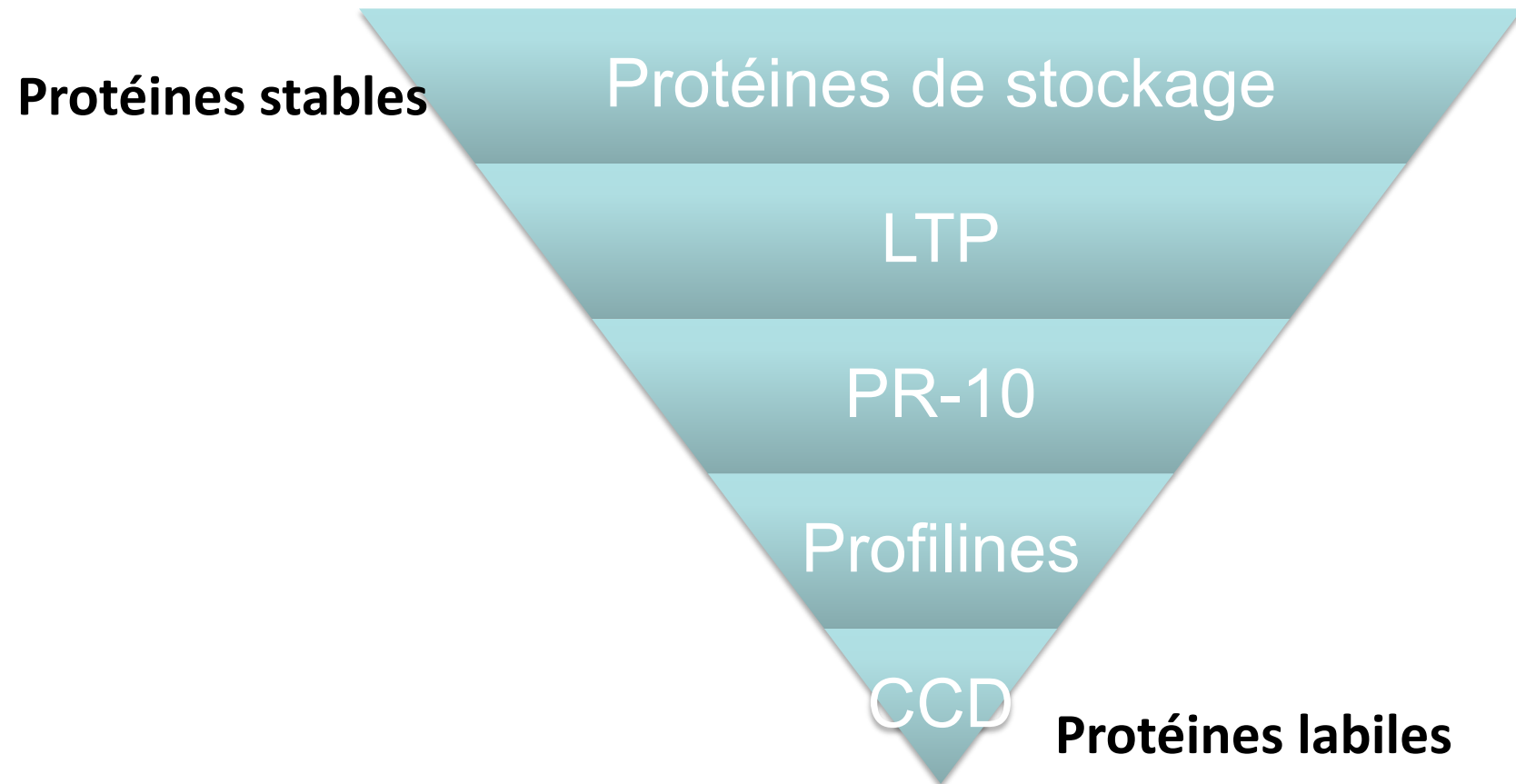
Le protocole ALEX® intègre un puissant inhibiteur de CCD mis en œuvre pendant l'incubation du sérum et minimisant les erreurs d'interprétation pour les patients ayant des IgE CCD positifs (responsable de réactivités croisées importantes *in vitro*) tout en augmentant de fait la spécificité des résultats du test.



Interprétation biologique

- En fonction des données de la littérature
- Des données cliniques disponibles du patient

Risque de symptômes ou sévérité des symptômes selon le type de protéines



Exemple : l'arachide

- Ara h1, Ara h2 et Ara h3 sont des protéines de stockage de l'arachide.
- Ara h9 est une LTP et Ara h8 est une PR10.
- Ara h2 est une protéine associée à des réactions cliniques, alors qu'Ara h8 est labile et peu susceptible d'être attribuable à des réactions cliniques significatives. Bien qu'un résultat positif d'IgE anti-arachide puisse suggérer une allergie potentielle, des niveaux indétectables aux Ara h1, 2, 3 et 9 (protéines stables) et un résultat positif isolé à Ara h8 suggèrerait généralement une tolérance générale.
- Cependant, le niveau des IgE spécifiques de la protéine peut également fournir des informations de diagnostic (et pas simplement la présence d'un résultat de test positif); par exemple, des concentrations croissantes d'IgE spécifique à Ara h2 sont associées à un risque accru de réaction à l'arachide.

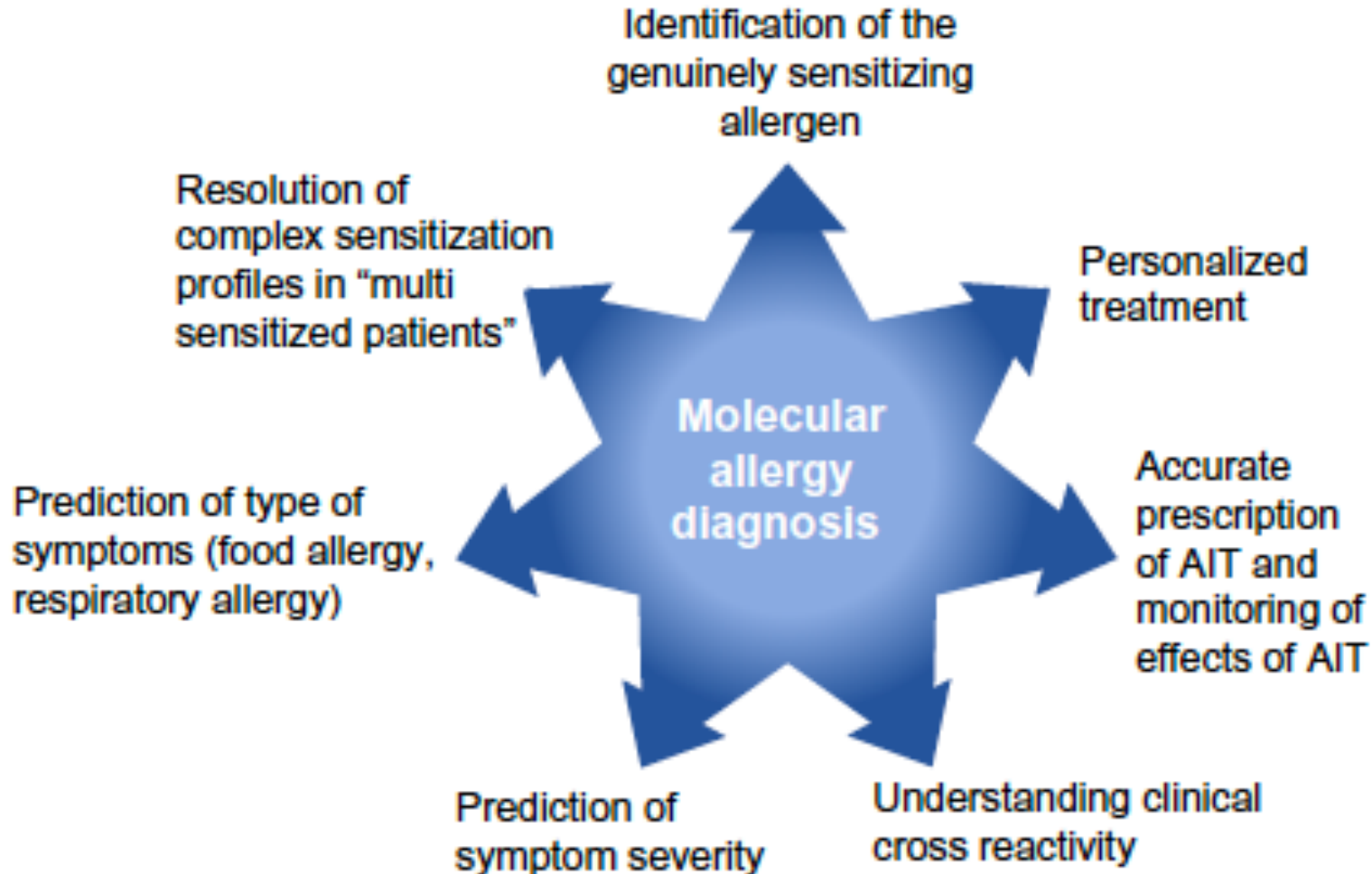
Exemple (suite)

- **Ara h 1 and Ara h 6 Sensitization Causes Clinical Peanut Allergy in Ara h 2-Negative Individuals. Etude parue en 2019 sur population islandaise. (Magnusdottir H et al, 2019, Int Arch Allergy Immunol)**

Intérêts

- Intérêt principal = liaison des IgE à des protéines spécifiques dans un aliment peut fournir des informations diagnostiques plus spécifiques que les tests qui rapportent la liaison des IgE à des extraits constitués de mélanges de protéines.
- Connaître les familles de protéines auxquelles réagissent les IgE des patients permet l'identification des réactions croisées comme par exemple avec les familles PR-10 et LTP.
- Intérêt pour indication d'un test de réintroduction en allergie alimentaire par exemple ou pour ITS.

Diagnostic moléculaire de l'allergie



Dosage des IgG4

Augmentation du taux d'IgG4 spécifiques observée pendant une désensibilisation = indicateur d'efficacité thérapeutique (évolution inverse des titres d'IgE spécifiques)

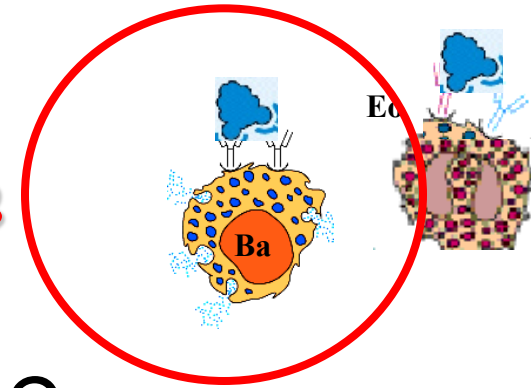
Participation au suivi de la réponse du patient au cours de l'ITS : peu utilisé car pas indispensable pour juger de l'efficacité de l'ITS

Dosage doit être effectué avant le début du ttt puis à intervalles réguliers en fonction du protocole de désensibilisation.

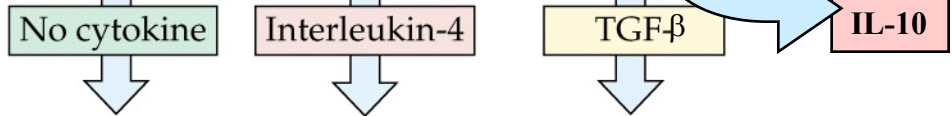
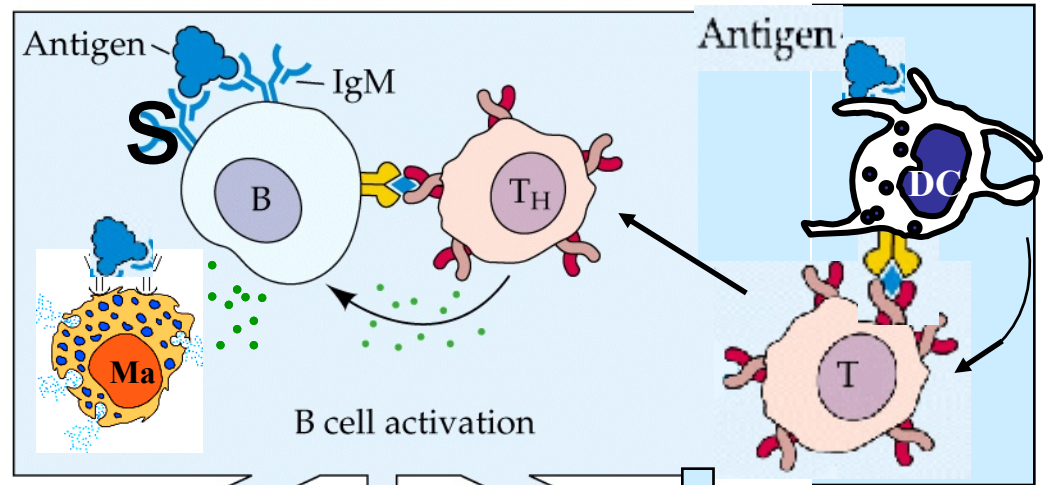
→ Même technique que pour la détection des IgE spécifiques

Tests biologiques

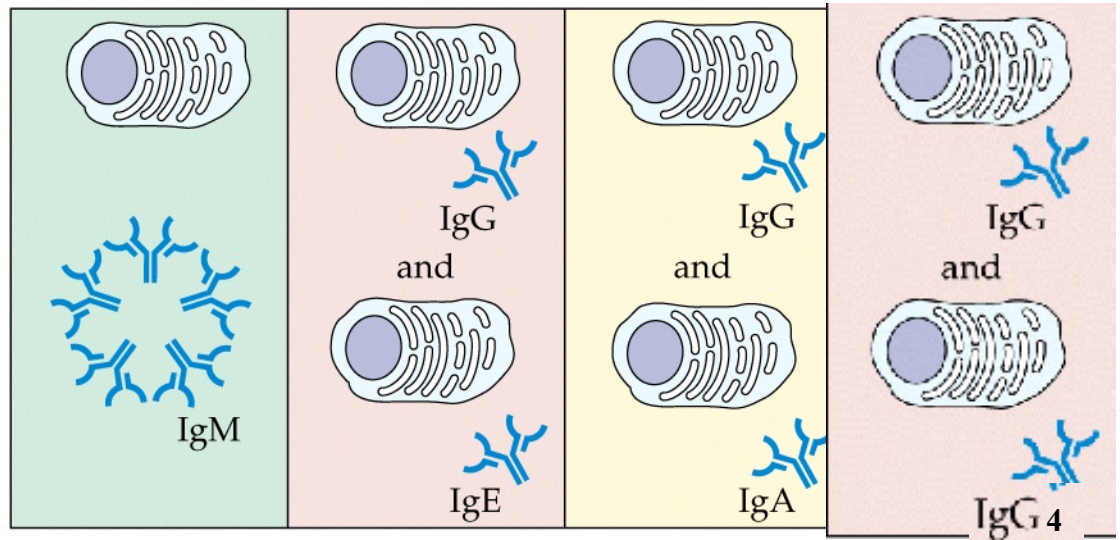
TAB
HR



2



Tests cellulaires



Tests de provocation in vitro

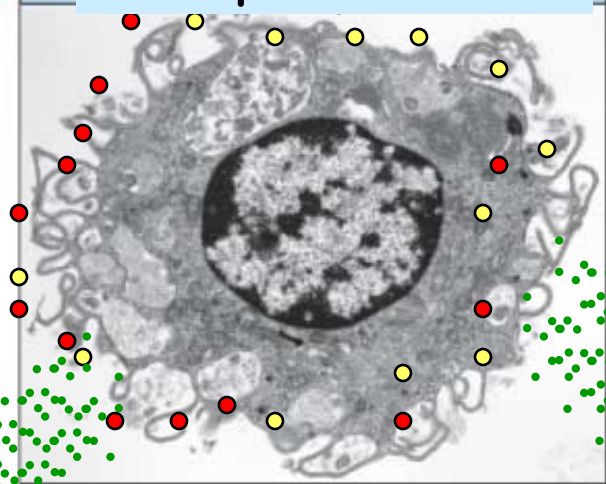
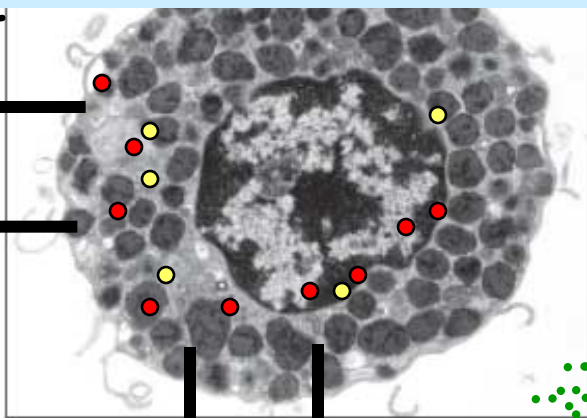
- Tests cellulaires
- Tests avec l'allergène incriminé
- TAB (test d'activation des basophiles)
 - Histaminolibération

Basophile sang total

Basophile activé

Exposition des molécules d'activation

Anti IgE total



- CD 63
- CD203

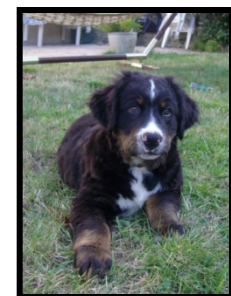
Relargage d'histamine



venins



médicaments



aliments



Animaux

Histamine

Demi vie de quelques minutes → effets de courte durée car rapidement métabolisée

10% du contenu granulaire des mastocytes

Vasodilatation

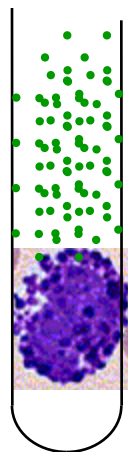
Augmentation de la perméabilité vasculaire

Contraction des muscles lisses (bronche & digestif)

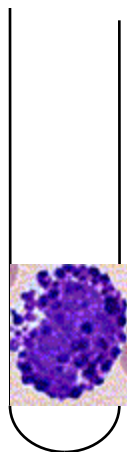
Augmentation de la production de mucus

Attraction des cellules inflammatoires

Totale

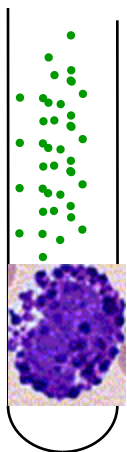


EAU



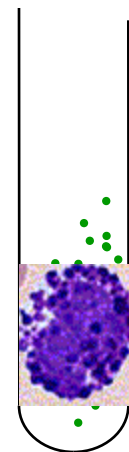
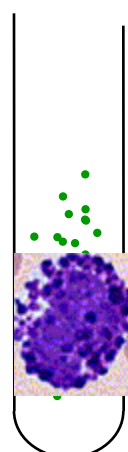
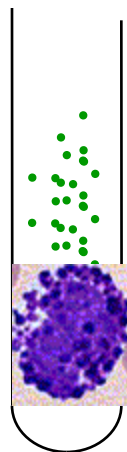
PBS

Positif

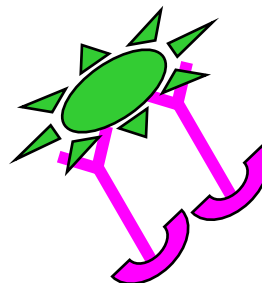


Anti IgE

dilutions



Allergène



$$\text{Dilution 1 HR} = \text{His}(\text{ng/ml}) / \text{His totale} \times 100$$

Le test est positif lorsqu'une dilution de l'allergène libère plus de 5% de l'histamine totale. Si libération de plus de 5% dans le tube PBS alors test invalide car libération spontanée d'histamine.

TAB

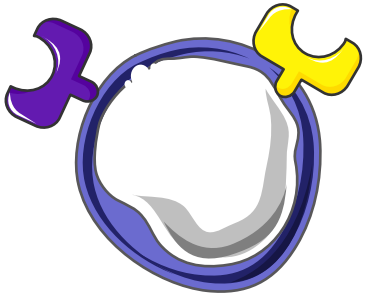
CYTOMÉTRIE EN FLUX

Lymphoid cells

(from lymph nodes)

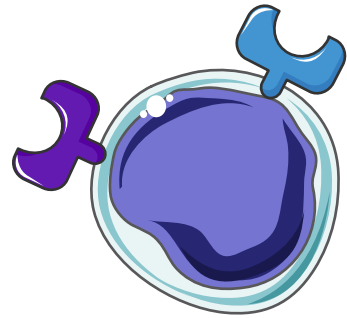
Cell type

Cell surface markers



CD8 T Lymphocyte

CD3 + CD8+

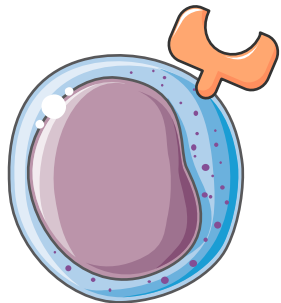


CD4 T Lymphocyte

CD3 + CD4+



Humain : CD3- CD16+CD56+



Natural Killer



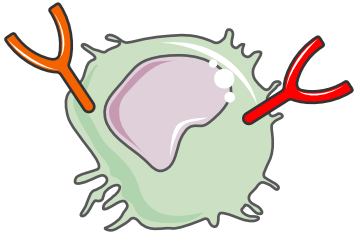
Souris CD3- DX5+

Myeloid cells

(from bone marrow)

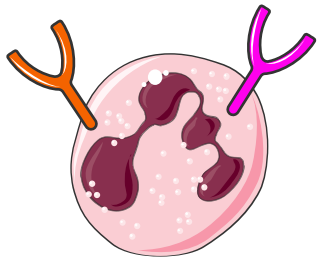
Cell type

Cell surface markers



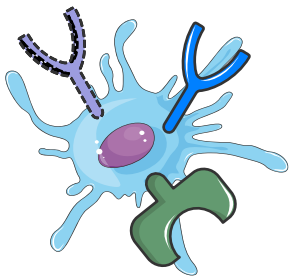
Macrophage

CD11b+ CD14



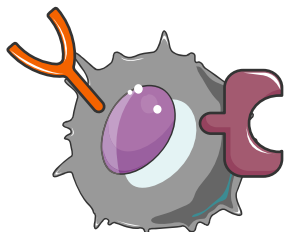
Poly-Morphonuclear
Neutrophil (PMN)

CD11b+ CD66b



Dendritic Cells

CD11b+ CD11c+ MHC II +

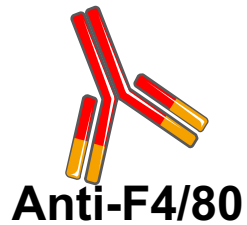


MDSC

Gr1+ CD11b+

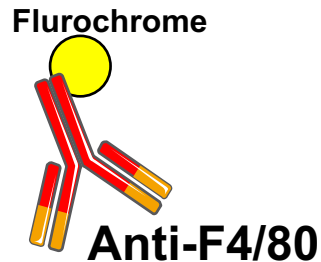


The use of antibodies

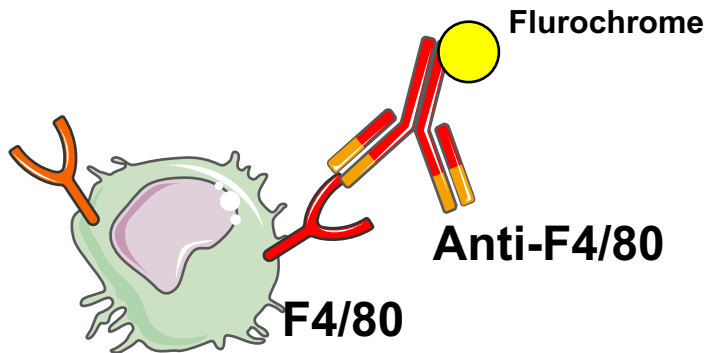


Antibodies are directed against a specific antigen

They are used here as **biological tools** to identify cell surface markers



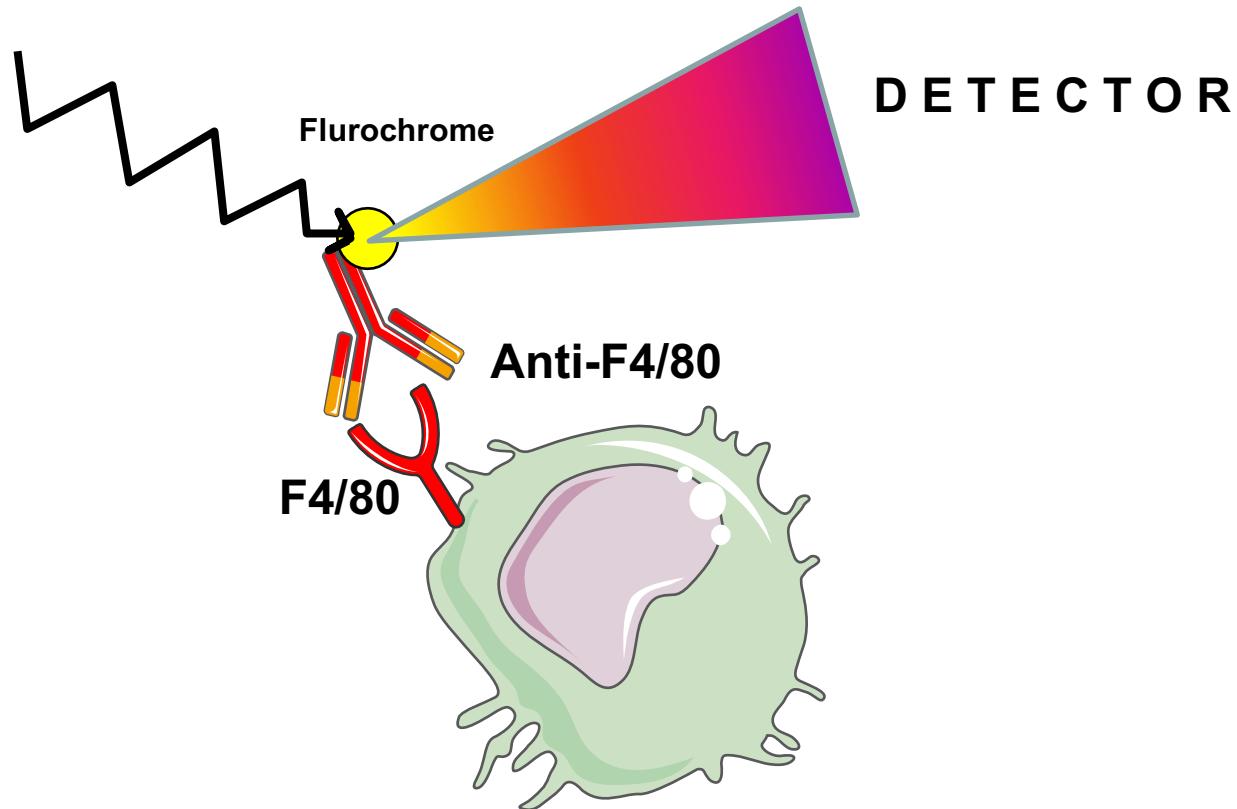
Antibody coupling to fluorochrome



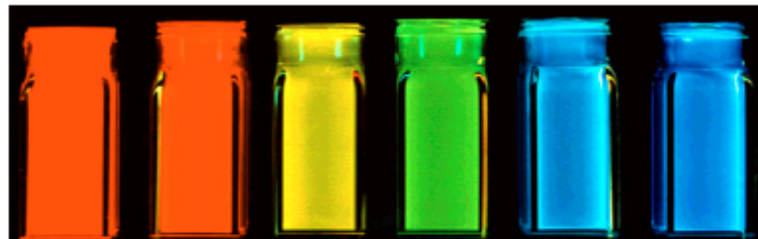
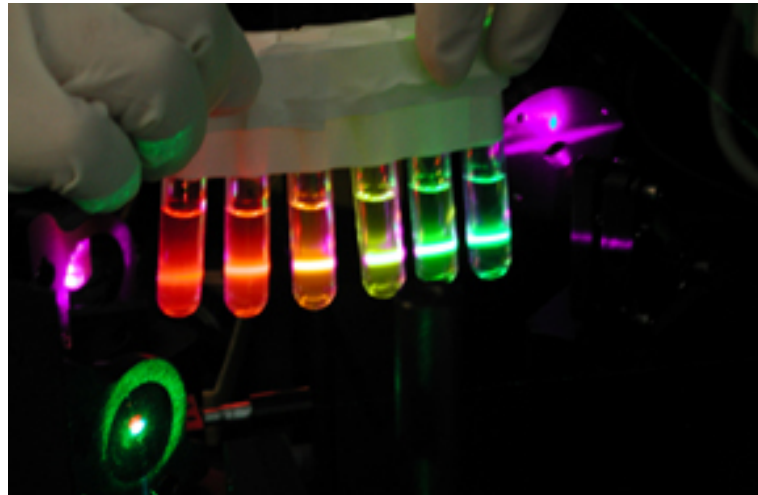
Detection of binding by **Flow cytometry**

Fluorochrome labelled antibodies

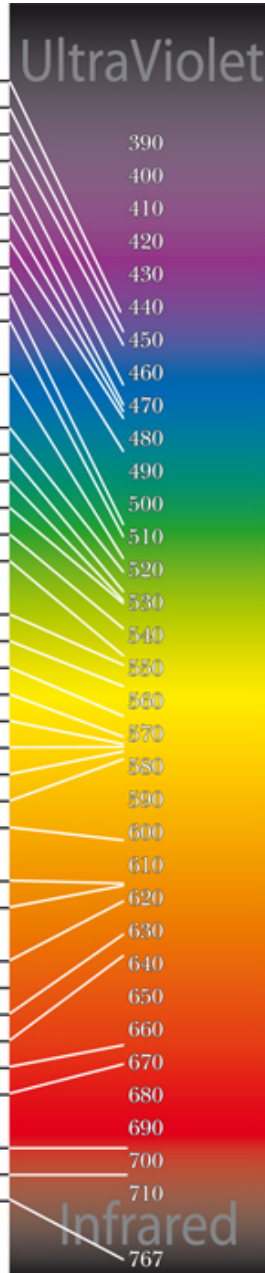
Antibody directed against a cell surface marker
Excitation of fluorochrome by LASER
Detection of emitted light by Detector



Fluorochromes



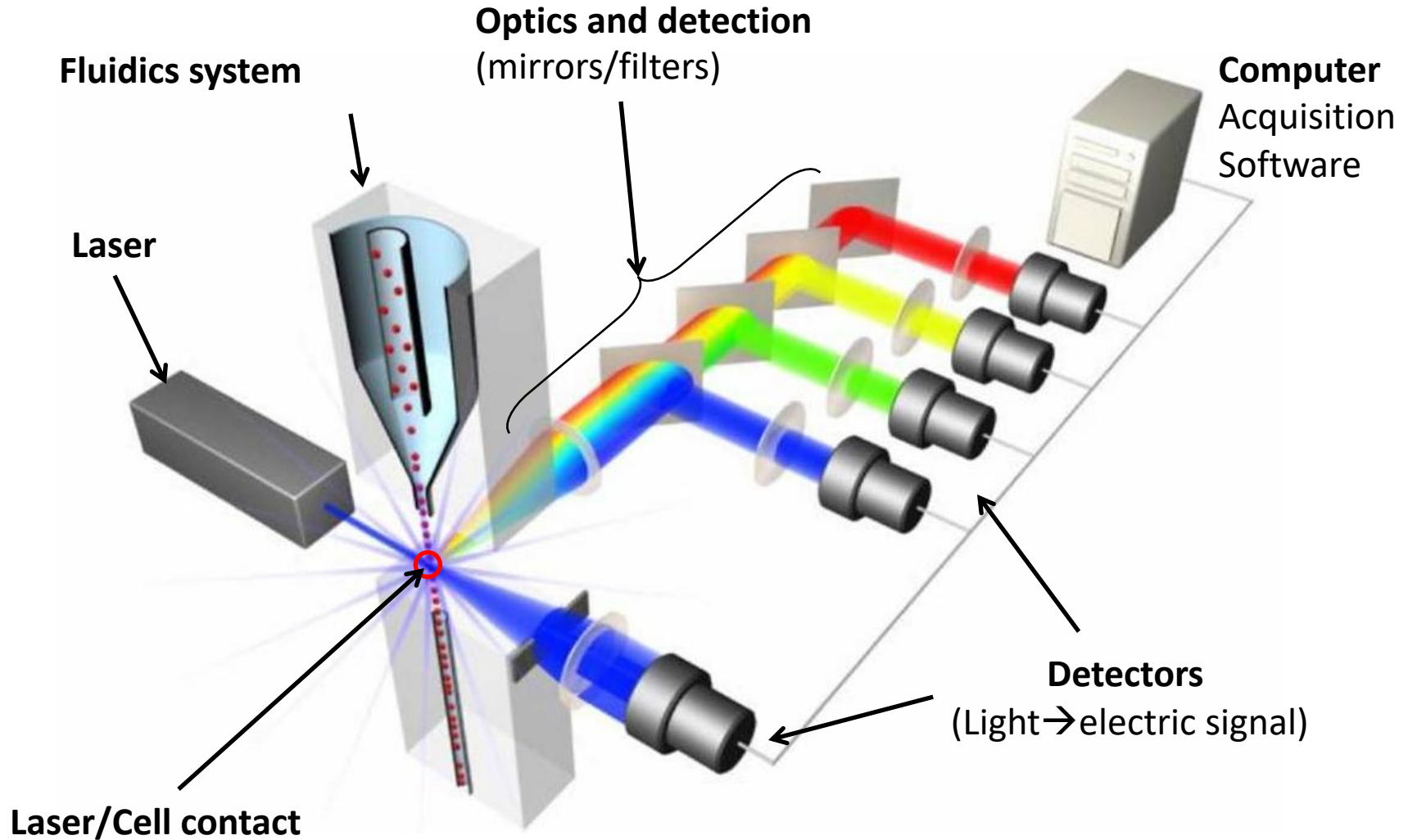
Fluorophore	Absorption (nm)	Emission (nm)
Fast Blue	360	440
Alexa Fluor® 350	346	445
AMCA	350	450
Bisbenzamide	360	461
Aequorin	Ca ⁺⁺ photoprotein	469
Hoechst 33258	360	470
ACMA UV	412, 430	471, 474
Hoechst 33342	343	483
Cy2	489	506
GFP Wild type Non UV ex.	475	509
GFP Wild type UV ex.	395	509
Alexa Fluor® 488	494	517
Calcein	496	517
Fluorescein (FITC/DTAF)	495	520
Fluoro-Jade® B	480	525
Lucifer yellow	425	528
JC-1	514	529
Fluoro-Gold (Hydroxystilbamidine)	361	536
Alexa Fluor® 430	430	545
Eosin	524	545
6-JOE UV	520	548
Alexa Fluor® 532	530	555
Cy3	548	562
Alexa Fluor® 546	554	570
Alexa Fluor® 555	555	571
TRITC	547	572
B-phycoerythrin	545, 565	575
R-phycoerythrin	480, 545, 565	578
Rhodamine	539, 574	602
Alexa Fluor® 568	578	602
Texas Red®	589	615
Alexa Fluor® 594	590	617
Propidium Iodide (PI)	536	617
Ethidium Bromide	493	620
Feulgen (Pararosanoline)	570	625
Acid Fuchsin	540	630
Alexa Fluor® 633	621	639
Alexa Fluor® 647	649	666
Cy5	650	670
PE-Cy5 conjugates	480, 565, 650	670
Alexa Fluor® 660	668	698
Alexa Fluor® 680	684	707
PE-Cy7 conjugates	480, 565, 743	767
Cy7	743	767



Flow cytometry

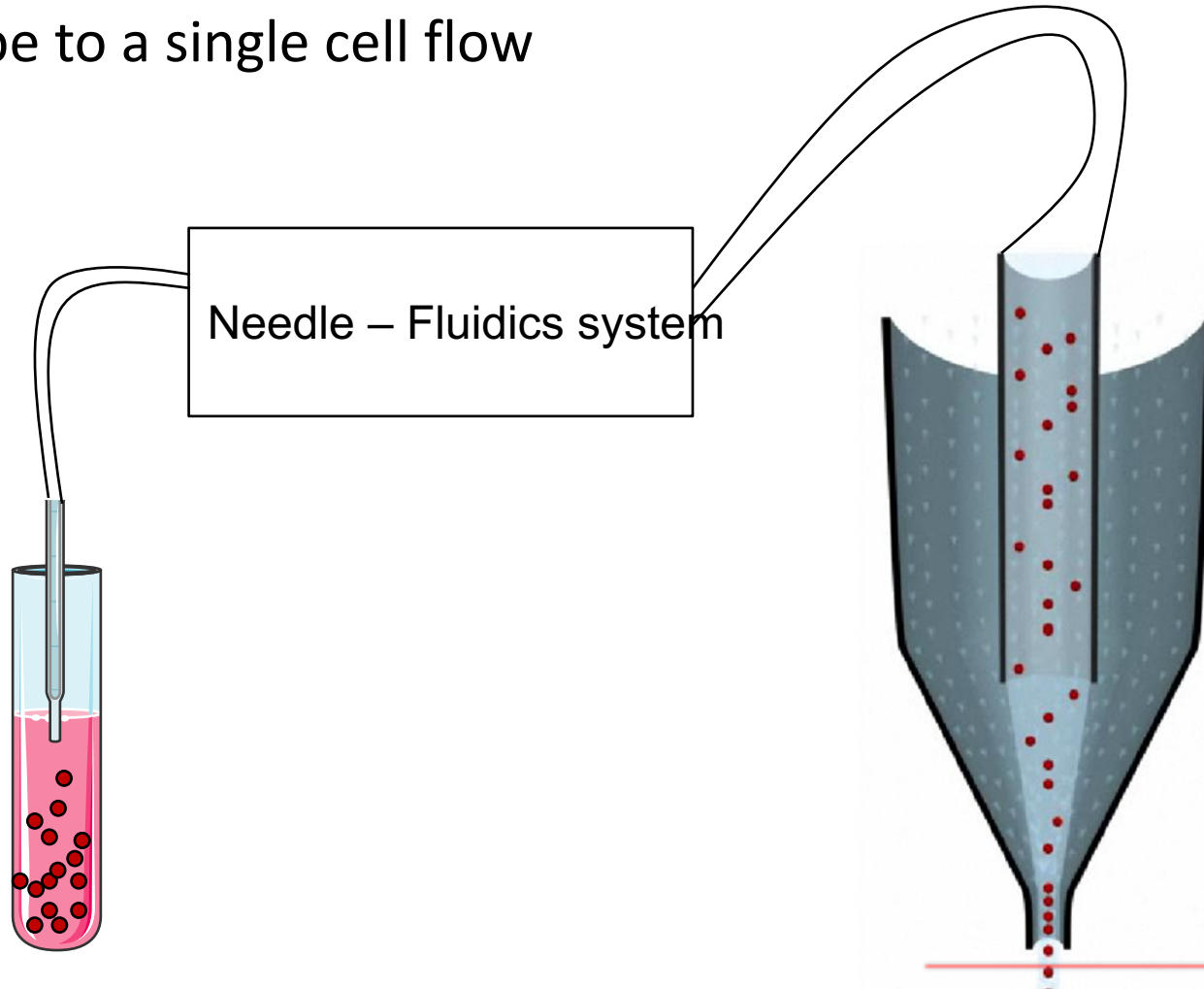
- Flow cytometry aims to measure the properties of individual particles (ie. Cells)
- Powerful technique = allow the analysis of 1000cells/sec
- Each cell pass through a laser beam and refracted/diffused light is analysed
- Mainly based on fluorochrome-labeled antibodies directed against cell surface markers.
- Applications :
 - ✓ Routine diagnosis : hematology, immunology labs
 - ✓ Research lab : cell characterisation in complex populations

What is a Flow cytometer ?



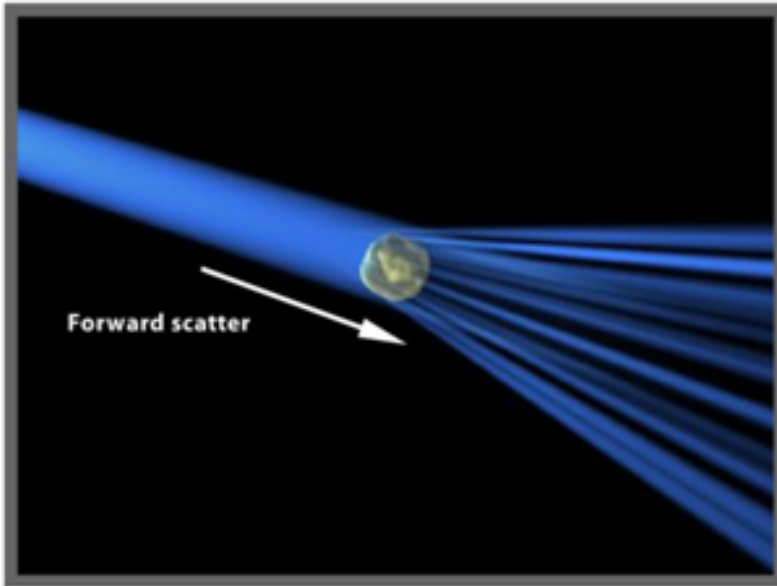
Fluidics system

From a mixed cell population in suspension in a tube to a single cell flow

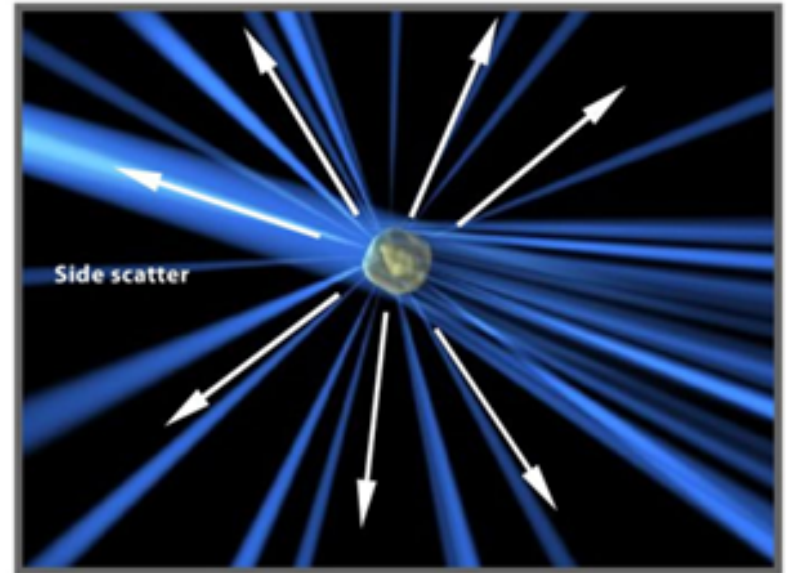


LASER

Forward Scatter (FSC) Side Scatter (SSC)

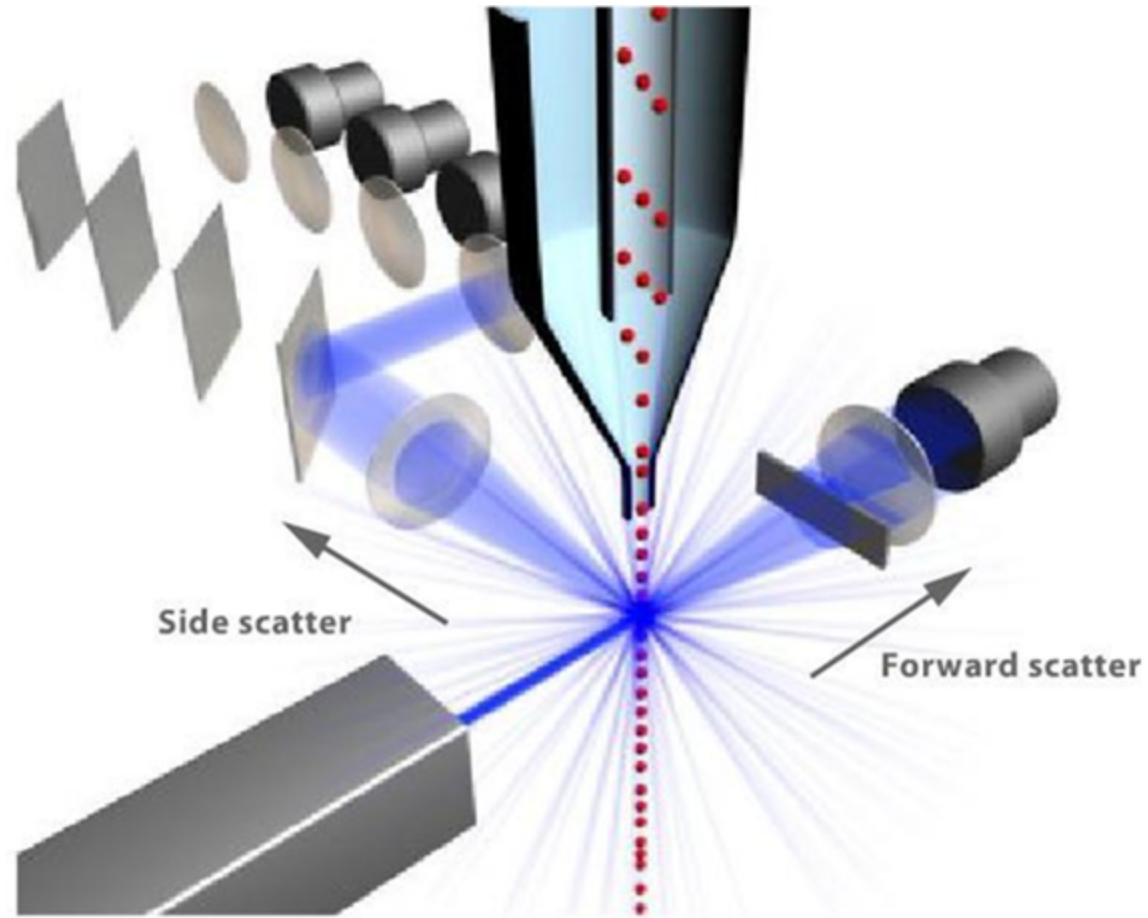


Indication on cell size



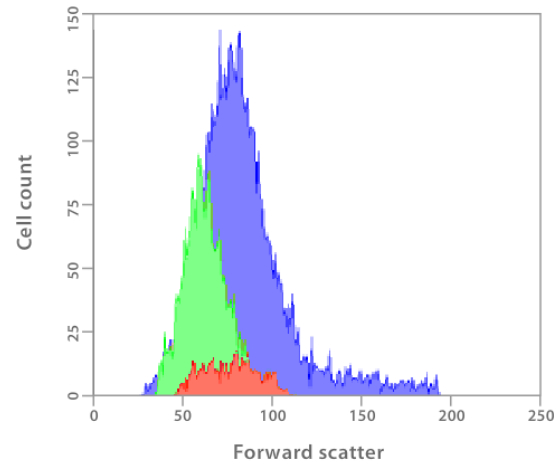
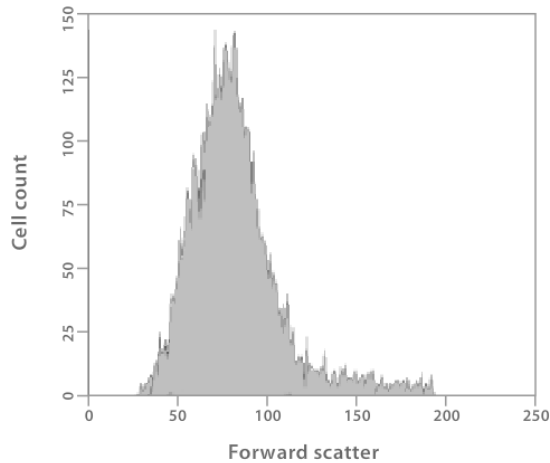
Indication on cell content
(granulosity)

Forward Scatter (FSC) Side Scatter (SSC)

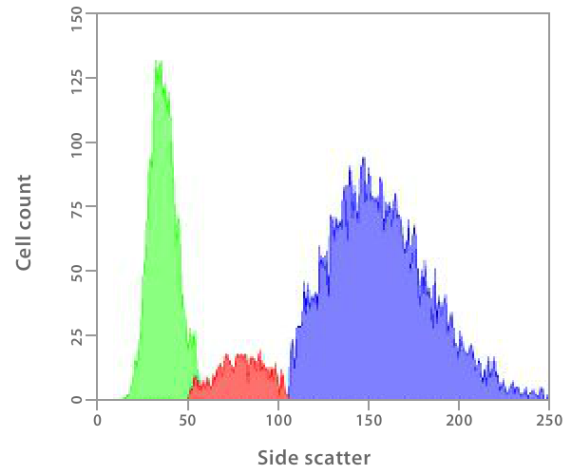


What can we see on computer screen?

Histogram



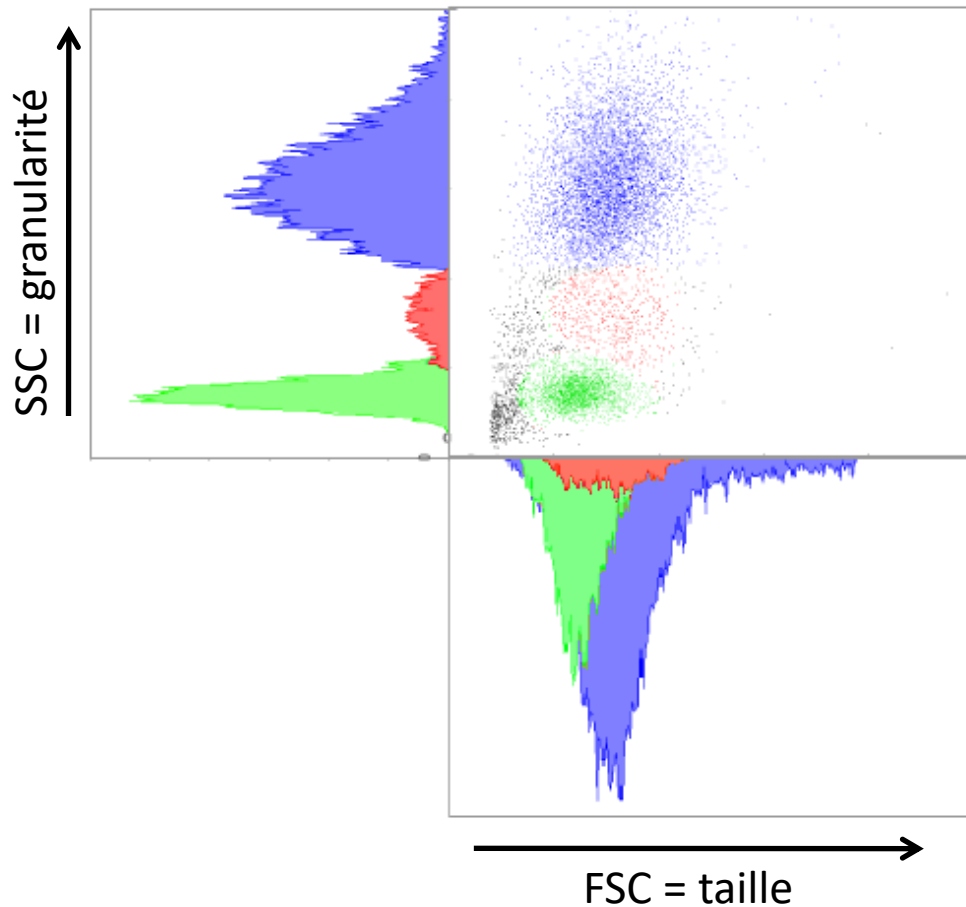
FSC = Size



SSC = granularity

What can we see on computer screen?

Two-parameters

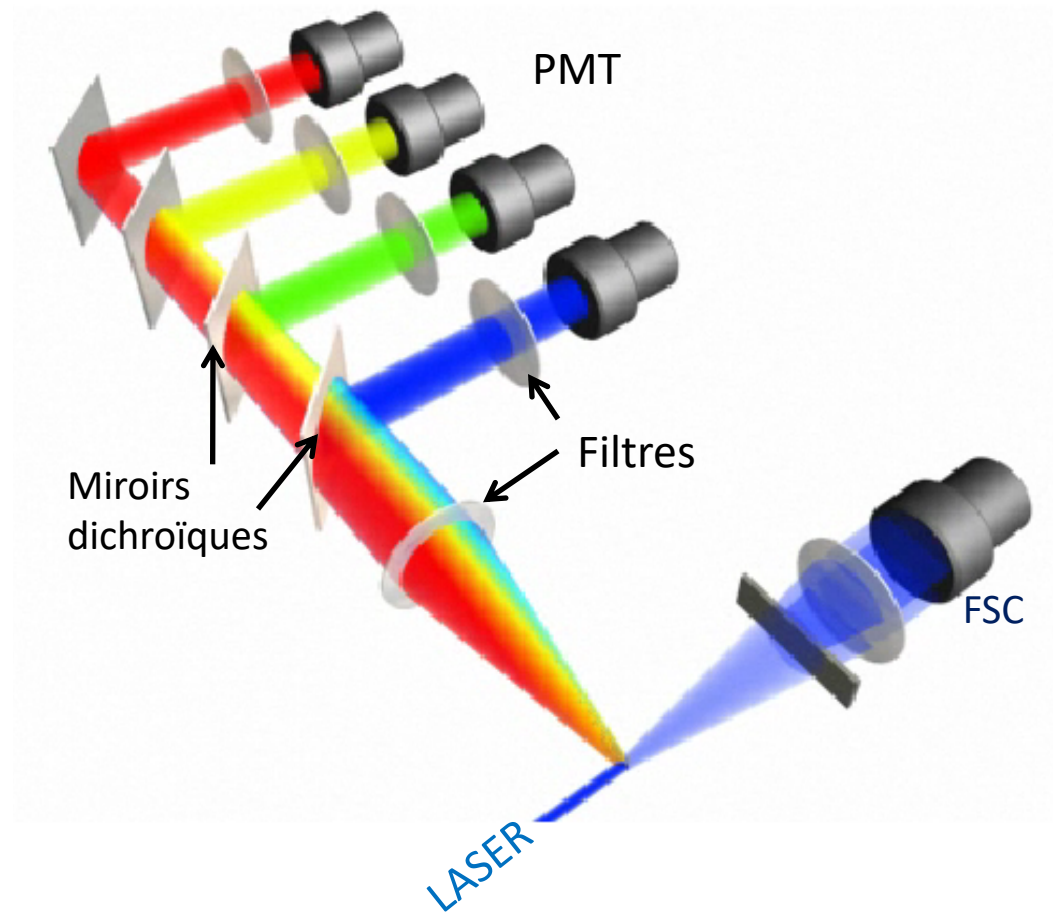


Each point is a single cell

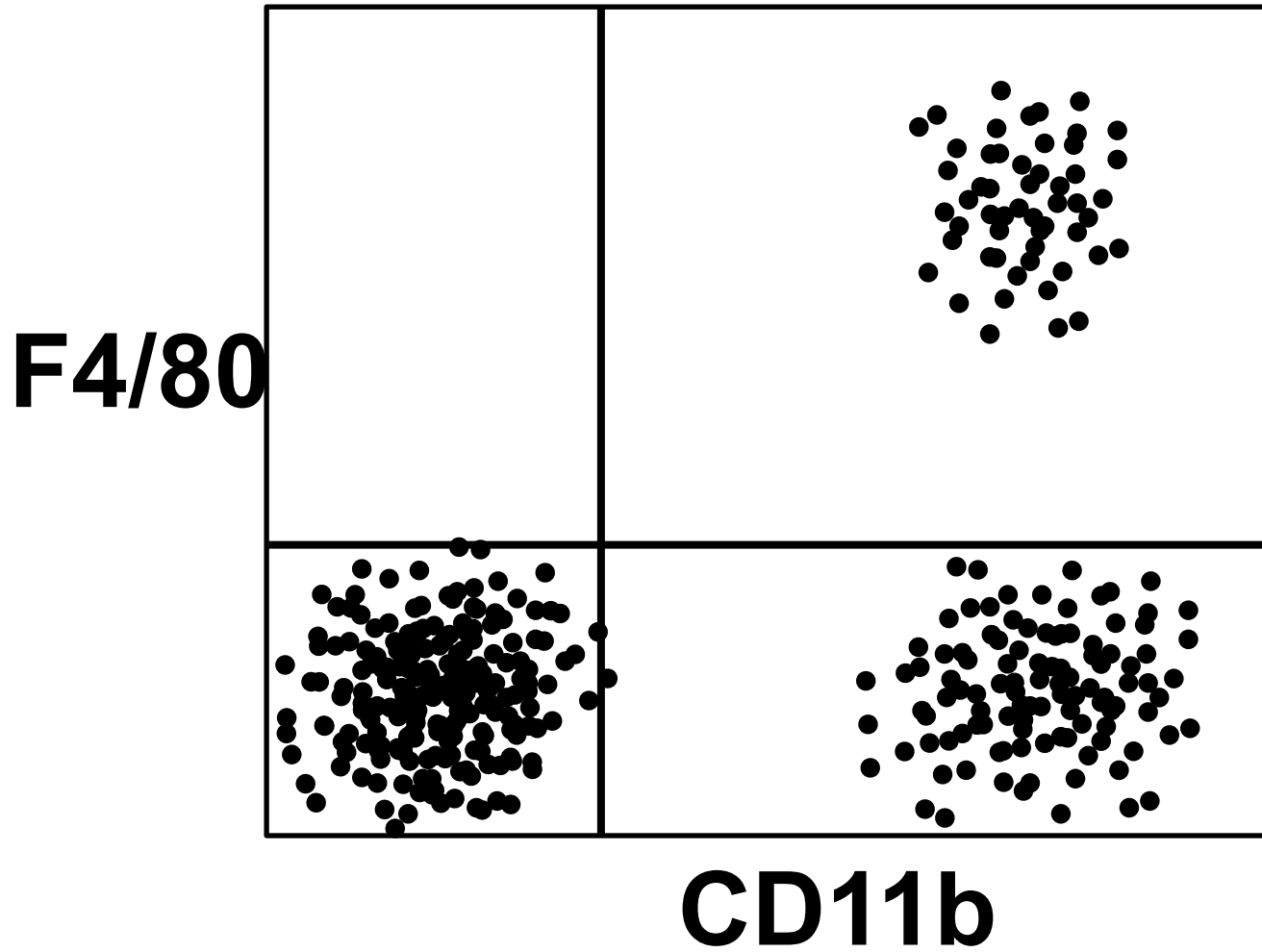
(X;Y) coordinates

Optics & Detection

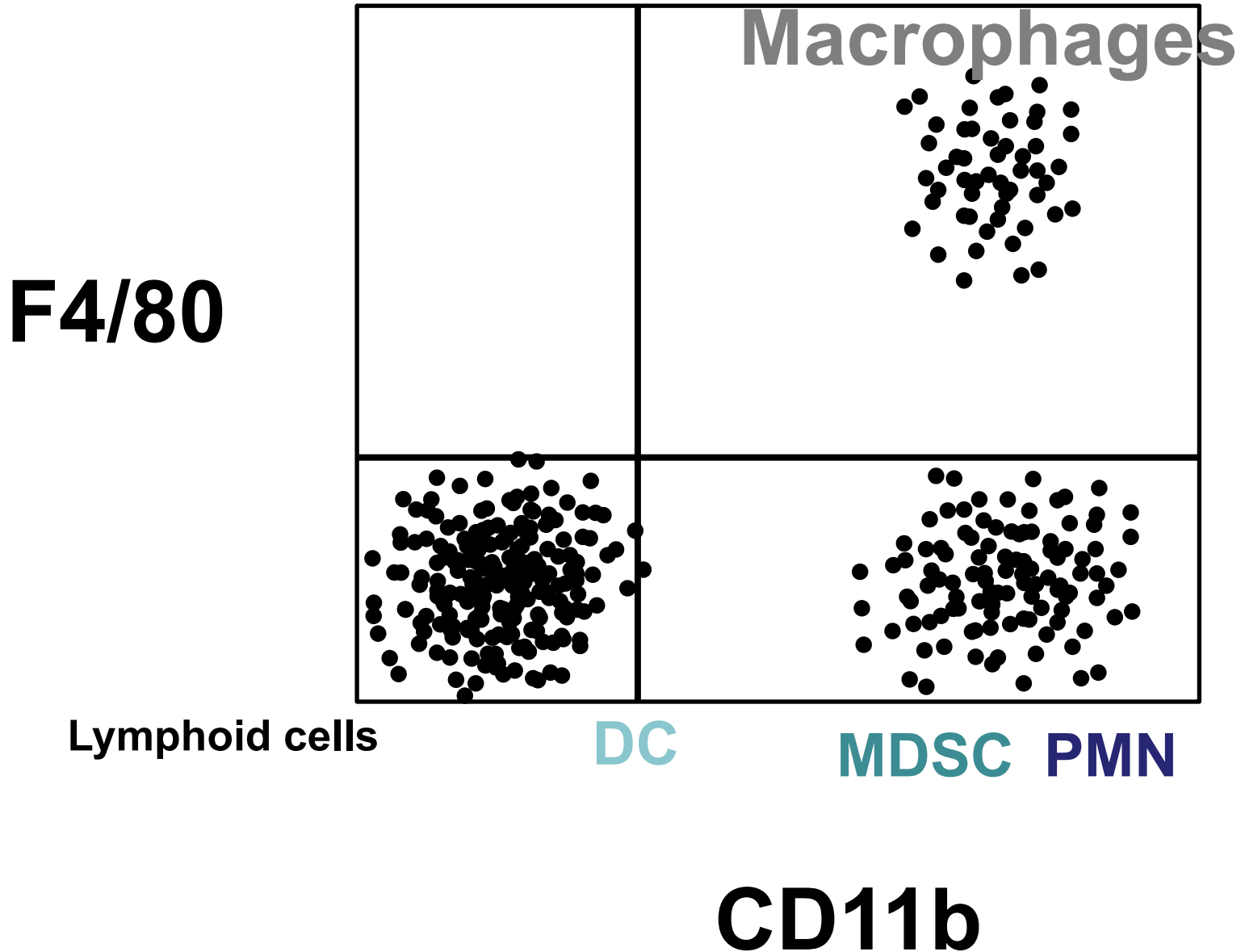
Fluorescence is dissociated by mirrors and filters, and directed on detectors.



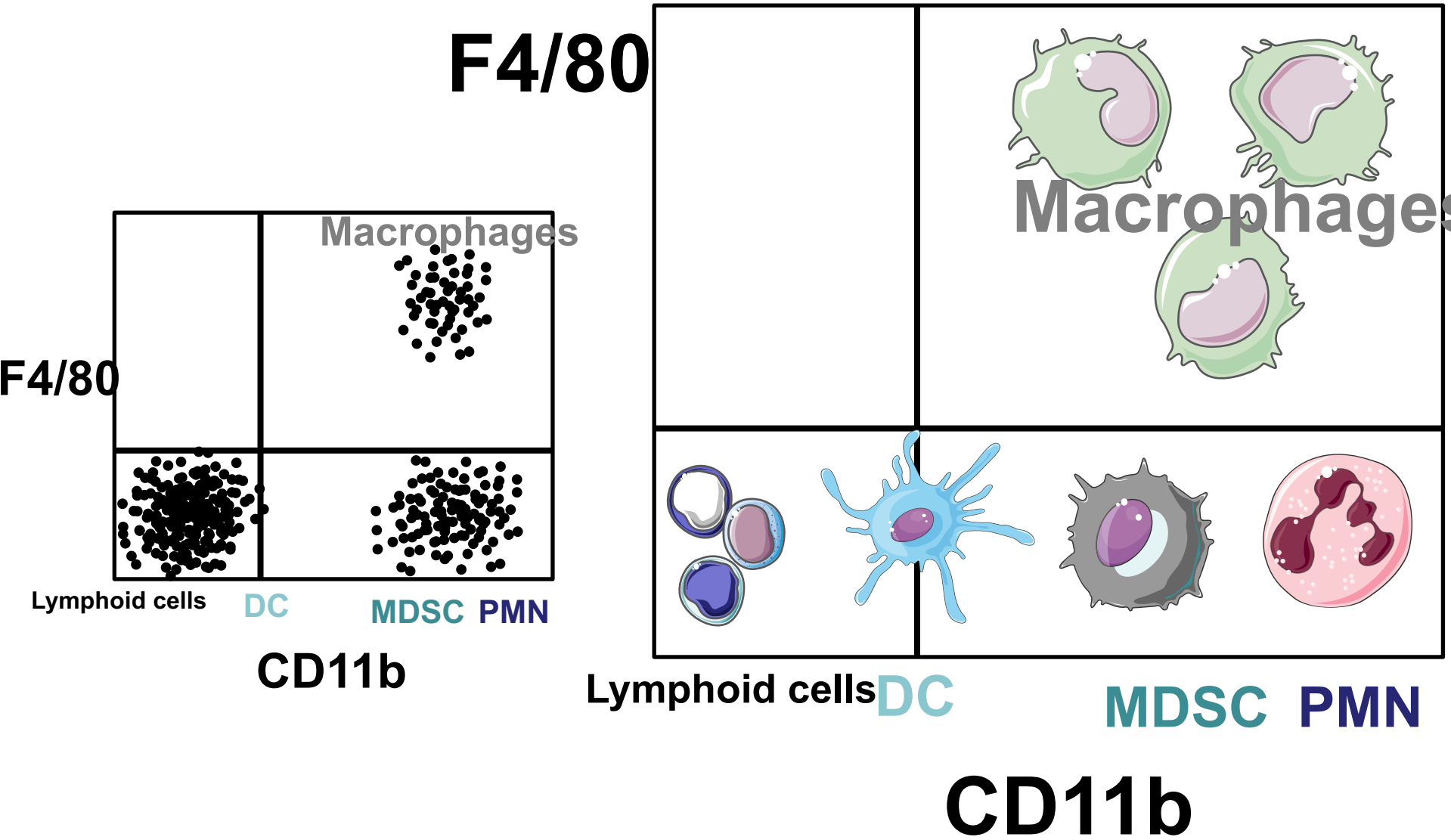
Data analysis



Data analysis

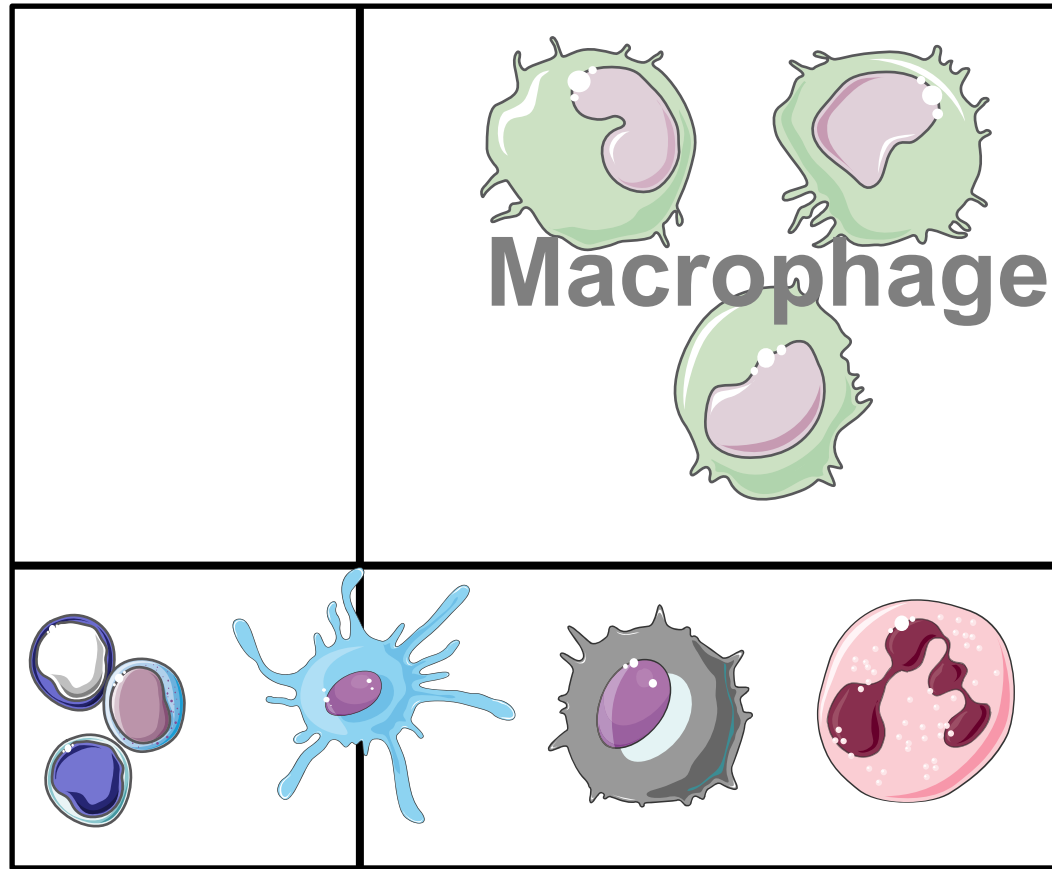


Data analysis



Data analysis

F4/80



Macrophages

Lymphoid cells

DC

MDSC PMN

CD11b

TEST d'ACTIVATION DES BASOPHILES

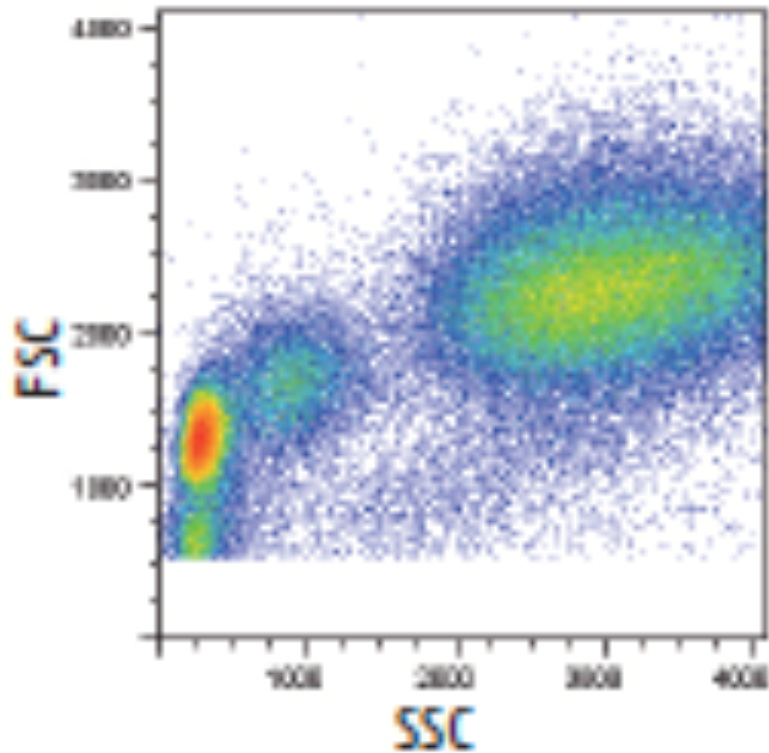


Figure 1 : 3 populations distinctes; lymphocytes, monocytes et granulocytes sur l'histogramme FSC/SSC.

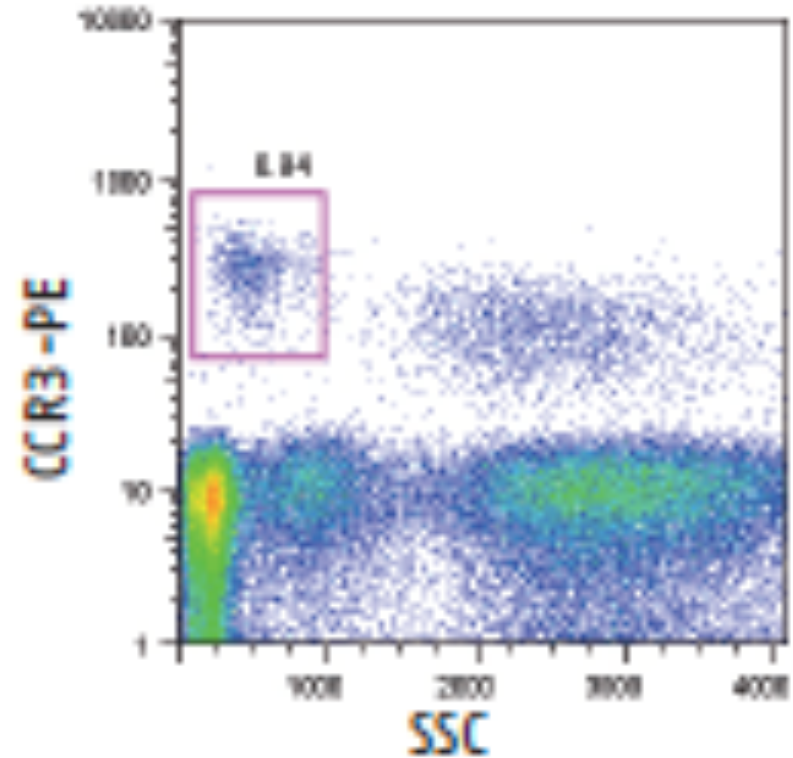
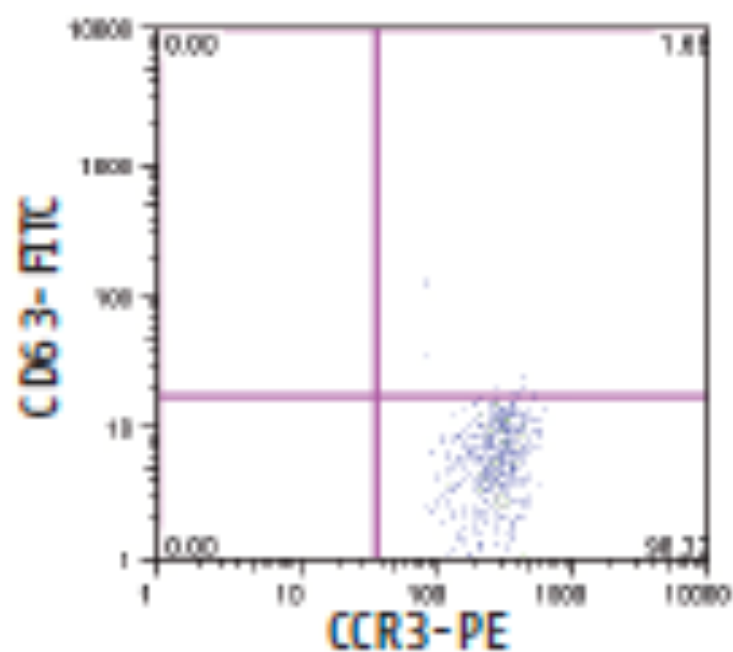
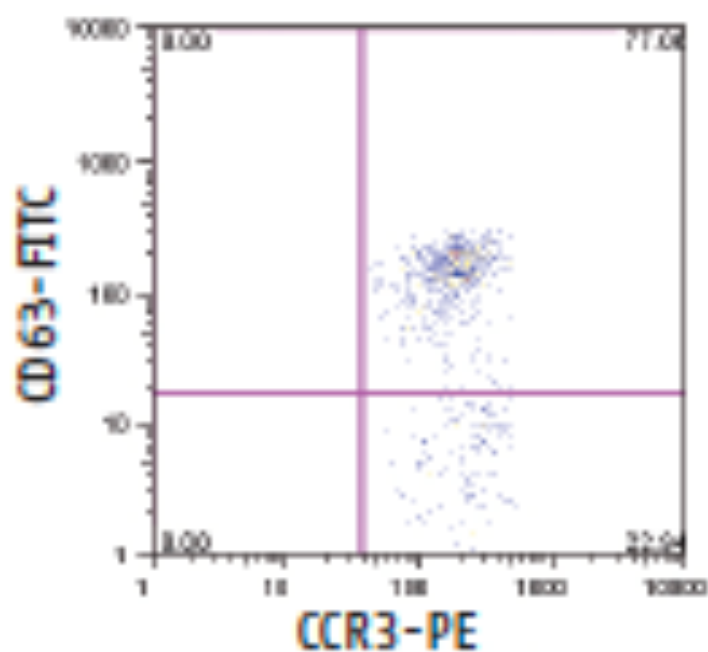


Figure 2 : sélection des basophiles CCR3^{pos} / SSC^{low}



Fenêtres de lecture	Compte (n=)	%
Total	602	100.0
Q2 (CD63 ⁺)	11	1.7

Figure 3 : Témoin négatif (PB) avec uniquement le tampon de stimulation.



Fenêtres de lecture	Compte (n=)	%
Total	650	100.0
Q2 (CD63 ⁺)	467	77.1

Figure 4 : Contrôle de stimulation positif (PC) avec le contrôle de stimulation Ac anti-FcεRI.

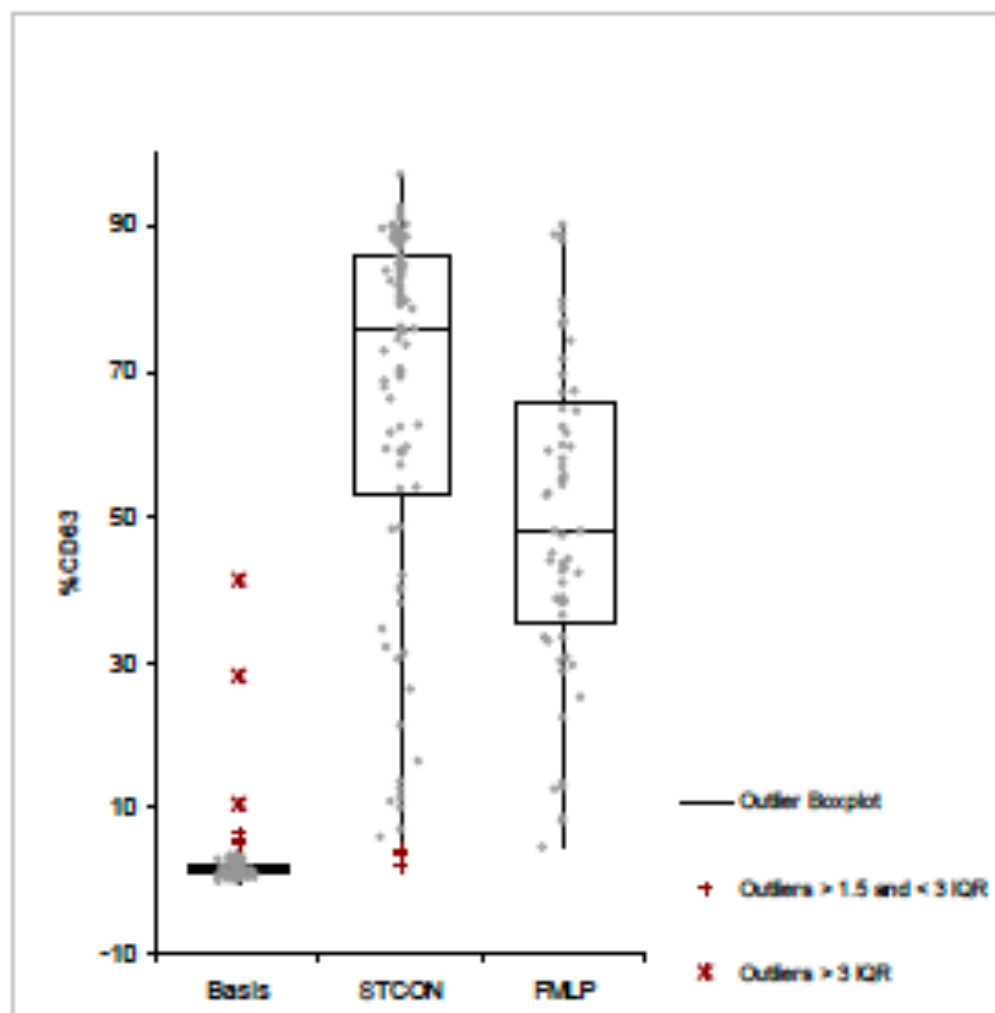


Figure 5 : Boîte à moustaches contrôles positifs et négatifs de donneurs de sang normaux. Basis : contrôle négatif (n=98) ; STCON : contrôle AcM positif anti-FcεRI (n=98) ; FMLP : contrôle positif FMLP (n=61)

Suivi de l'immunothérapie spécifique

Dans cette étude, les tests CAST® (Flow CAST® et CAST® ELISA) ont été utilisés afin d'étudier leur possibilité à servir de marqueurs de suivi d'immunothérapie spécifique (ITS).

La baisse de réponse des basophiles après ITS peut être démontrée chez les patients allergiques au venin d'abeille par rapport aux patients avant ITS.

De plus, tester le Flow CAST® avec différentes concentrations de venin d'abeille permet d'identifier les sujets allergiques au venin d'abeille ayant besoin d'un traitement ITS plus fort ou plus long pour une protection complète.

Basophil activation tests in bee venom immunotherapy, Poster: Hausmann et al. 2014

Suivi de l'ITS : venins d'abeille *honey bee* et de guêpe *yellow jacket*

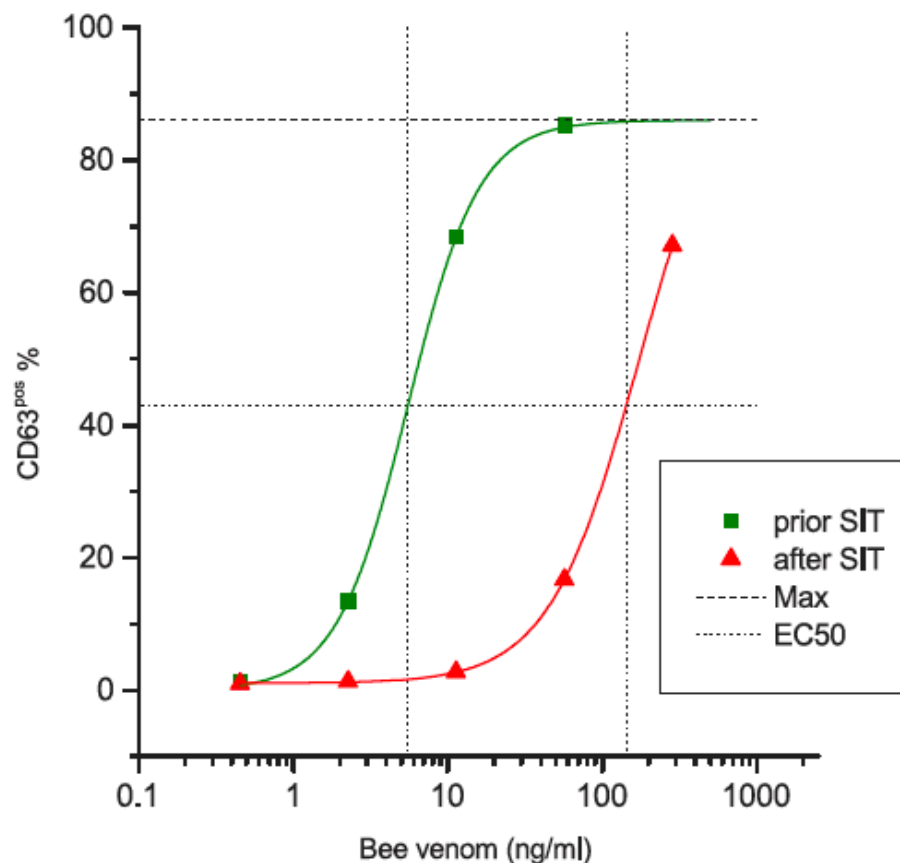
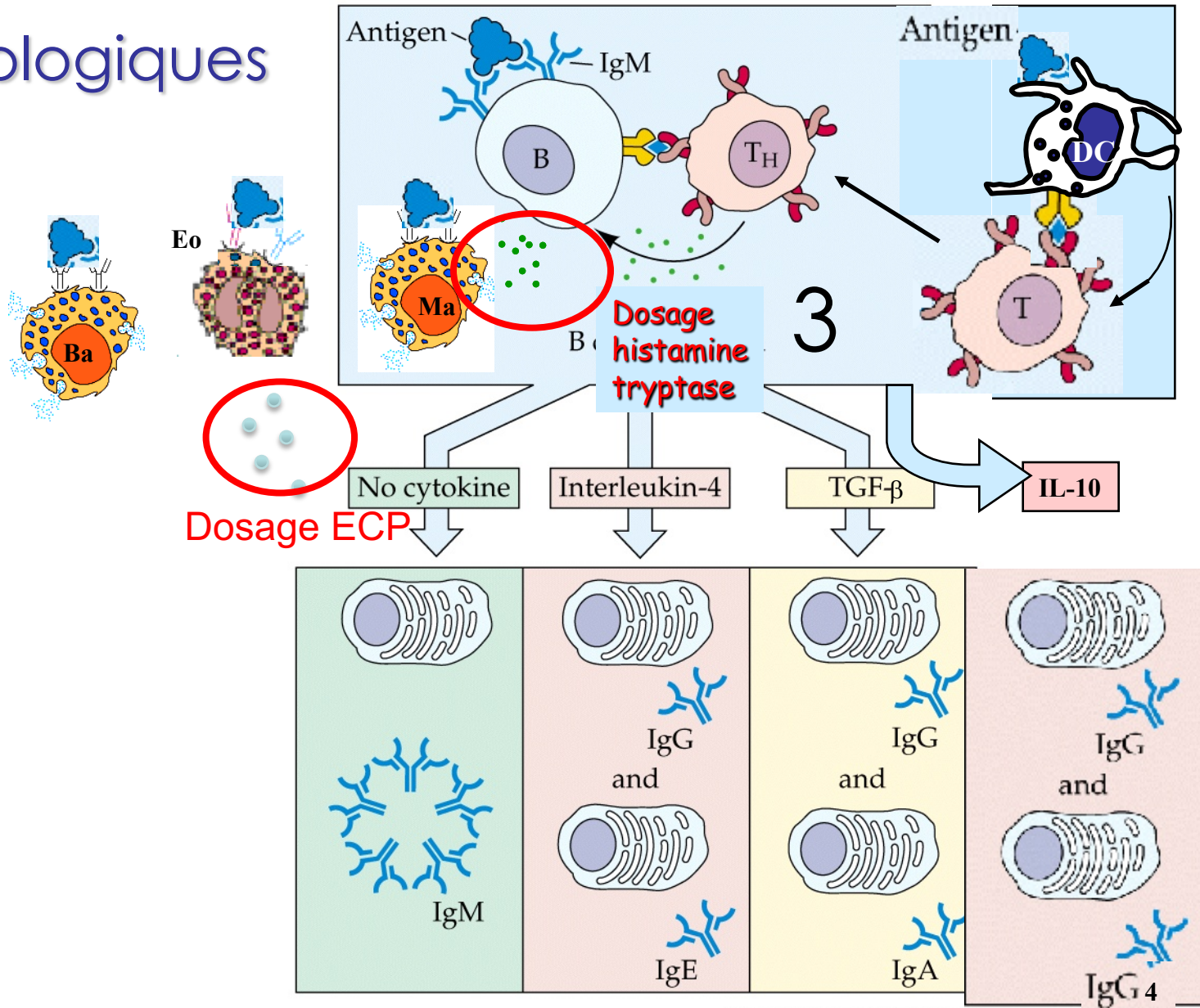


Figure 2: Flow CAST® with Bee venom Check allergen (BAG2-I1CHK) of a patient before (prior SIT) and after 3 years of specific immunotherapy (after SIT). EC50 (prior SIT): 5 ng/mL; EC50 (after SIT): 120 ng/mL; Ratio EC50 (prior SIT/after SIT) = 24.

Tests biologiques



Diagnostic du choc anaphylactique

Dosage de l'histamine plasmatique :

Pic dans les 5 premières minutes : 1/2 vie (10 à 20 min.)

prélèvement dans la 1/2 h sur EDTA et centrifugé dans les 20 min à 4°C avant congélation ou dosage

Valeurs normales : < 1ng/ml

Dosage de la tryptase :

20 % du contenu protéique des mastocytes

Intérêt : cinétique + lente que l'histamine

- . Prélèvements + tardifs que l'histamine possible
pic : 15 min → 2 h (1/2 vie 2h)**
- . Pas de conditionnement particulier**
- . Dosage immunofluorométrie
Valeur normale : < 11 µg / l**
- Consensus de 2012 pour analyse si dégranulation mastocytaire
suite à un choc : t2h > t24h : 120%+2**

Contrôle à distance (mastocytose)

Tryptase

Demi-vie : 2h

Principale sérine-protéase des mastocytes



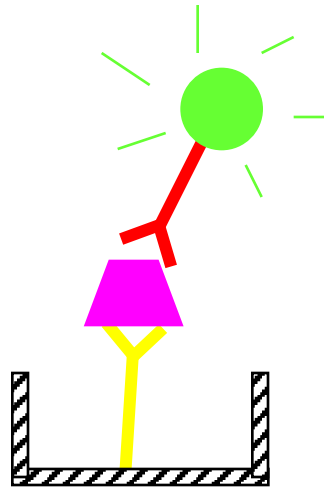
Augmente la secretion du mucus et la contraction des muscles lisses (bronches)

Active le complement

Clivage des peptides broncho et vasodilatateur

Tryptase Cap Phadia®

Mesure de l'antigène Tryptase



Ac anti tryptase

Serum patient

Ac anti tryptase

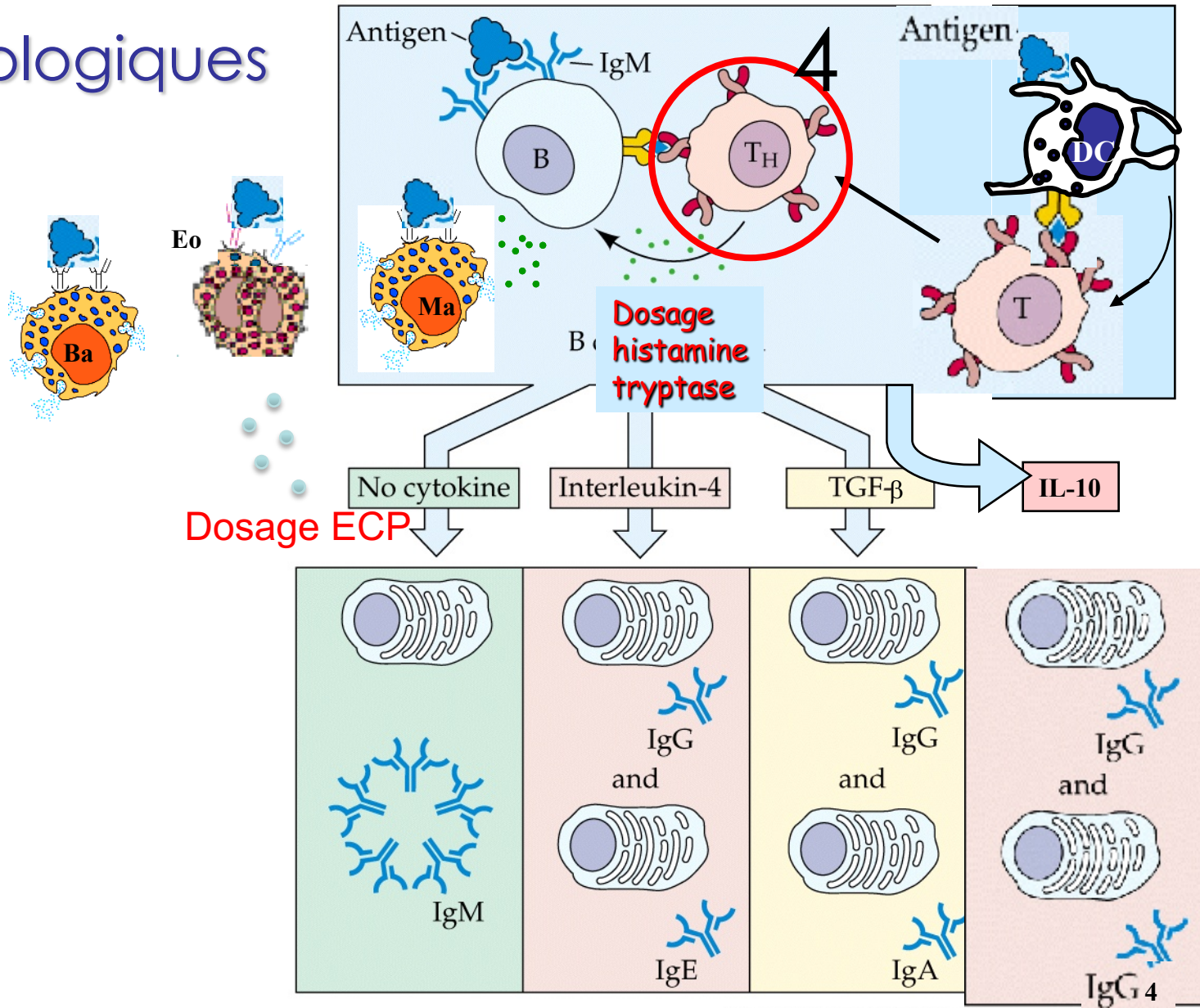
Dosage tryptase

- Protéase spécifique du mastocyte, libération en continu (sécrétions basales de formes immatures) ou brutale (dégranulation anaphylactique de formes matures). Le dosage de la tryptase mesure les 2 formes et renseigne ainsi la richesse en mastocytes d'un individu donné.
- Utilisé pour diag des anaphylaxies par dégranulation mastocytaire, pour diag et suivi des mastocytoses systémiques, suivi de certaines hémopathies malignes, l'évaluation du risque clinique d'anaphylaxie chez des patients allergiques aux venins d'hyméoptères.
- Tryptasémie de base est stable.
- Ce paramètre présente une valeur médico-légale, il est possible de réaliser un prélèvement post-mortem.

Dosage ECP (protéine cationique des éosinophiles)

- Médiateur contenu dans les granules secondaires de l'éosinophile, libéré lors de l'activation cellulaire
- Dosage permet d'estimer la gravité de l'inflammation des voies aériennes et de suivre l'évolution d'un asthme. Taux d'ECP augmente au cours des rhinites et de l'asthme allergique, DA, affections gastro-intestinales IgE-dépendants (oesophagites...), allergie alimentaire, parasitoses, churg-stauss, hyperéosinophilie idiopathique, polypose nasosinusienne
- Examen de 2nde intention peu utilisé dans le suivi des maladies allergiques. Il existe une forte variabilité interindividuelle de l'augmentation de niveaux d'ECP en pathologie et son évaluation ne présente pas d'intérêt diag. Dans la DA, la sévérité est plus facilement évaluée avec score SCORAD.

Tests biologiques



Analyse de la réponse T antigène spécifique

- Pour tout type de réactions allergiques, il y a reconnaissance de l'antigène par un lymphocyte T mémoire ou effecteur
- Des tests in vitro et in vivo sont utilisés pour la détection des T mémoires ou effecteurs :
 - Les patch-tests in vivo avec l'antigène suspecté peuvent être utilisés pour déterminer la cause de l'allergie médicamenteuse mais leur sensibilité est relativement faible.
 - Il existe des tests in vitro de prolifération, de production cytokinique...

Analyse de la réponse T antigène spécifique

A-Tests non-fonctionnels :

- α Tetramer staining (T cells)

B-Tests fonctionnels :

- α Cell proliferation (thymidine, fluorescent probes: CFSE, PKH26..)

- α Cytokine production (intracellular, ELISA, ELISPOT..)

Analyse de la réponse T antigène spécifique

A-Tests non-fonctionnels :

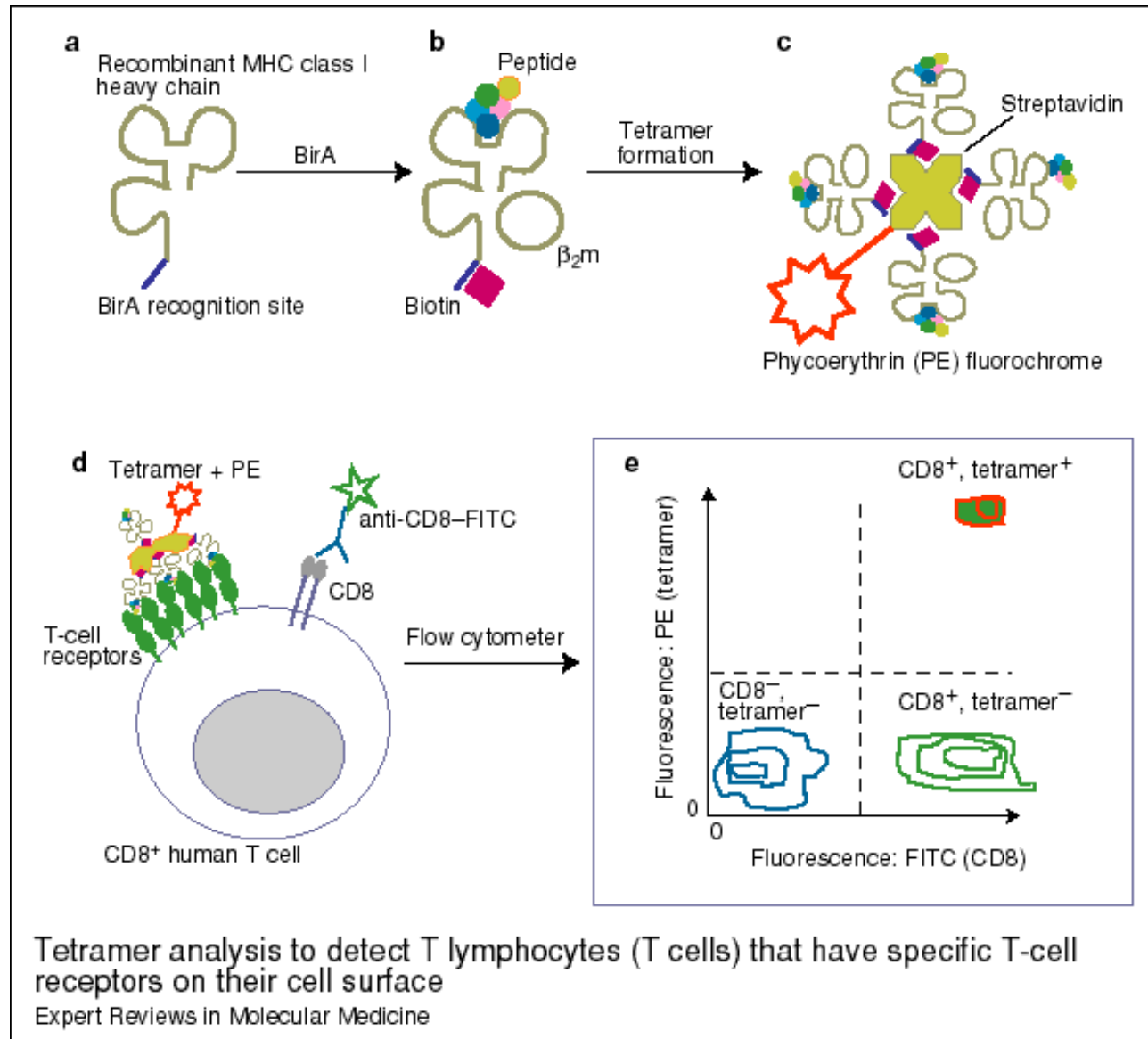
- α Tetramer staining (T cells)

B-Tests fonctionnels :

- α Cell proliferation (thymidine, fluorescent probes: CFSE, PKH26..)
- α Cytokine production (intracellular, ELISA, ELISPOT..)

Tetramer (pentamer...) analysis:

identification des lymphocytes T avec des TCR Ag-spécifiques



Analyse de la réponse T antigène spécifique

A-Tests non-fonctionnels :

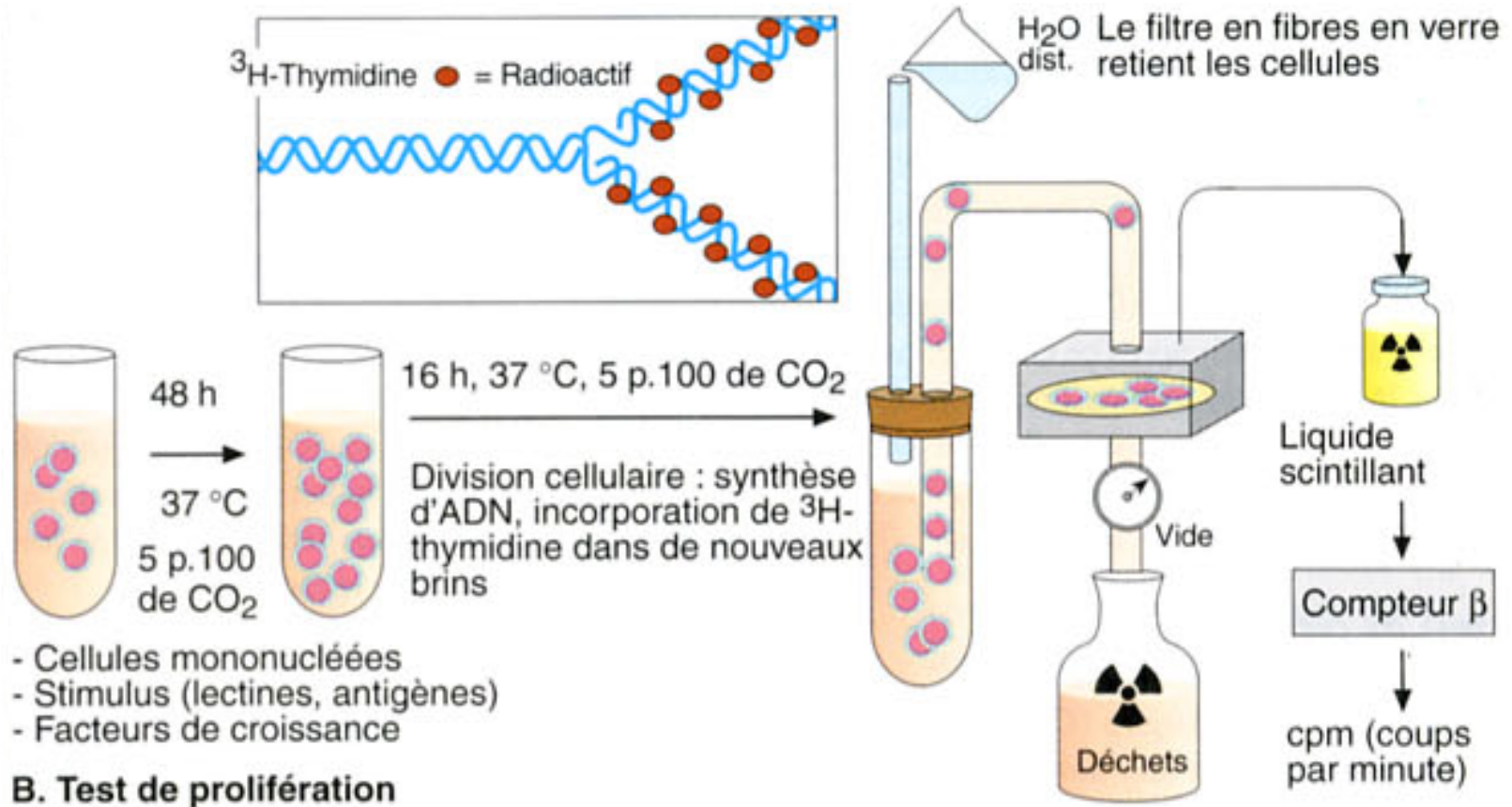
- α Tetramer staining (T cells)

B-Tests fonctionnels :

- α Cell proliferation (thymidine, fluorescent probes: CFSE, PKH26..)

- α Cytokine production (intracellular, ELISA, ELISPOT..)

Test de prolifération : thymidine tritiée (Ag-spécifique ou non)

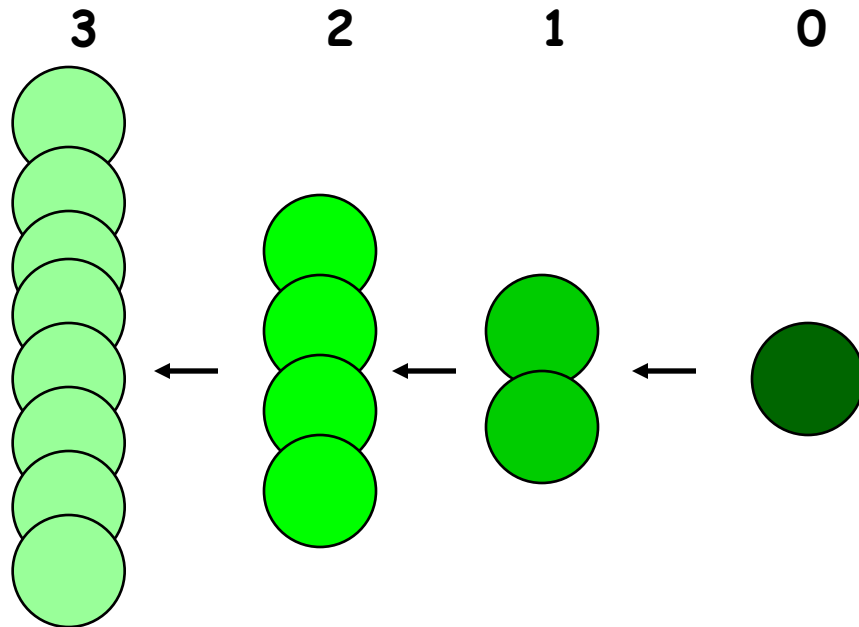


CFSE (CFDA-SE) proliferation assay

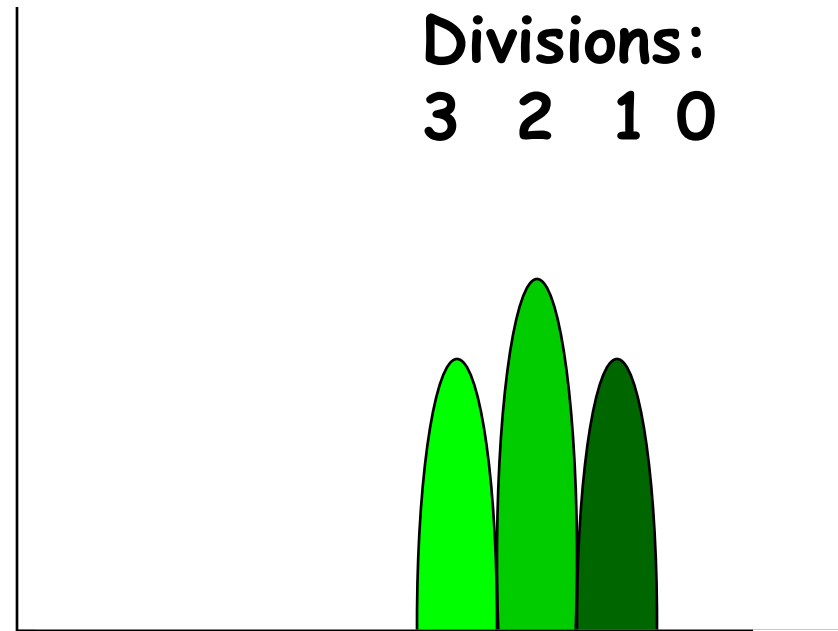
CFDA-SE: carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

Dilution of CFSE with cell division

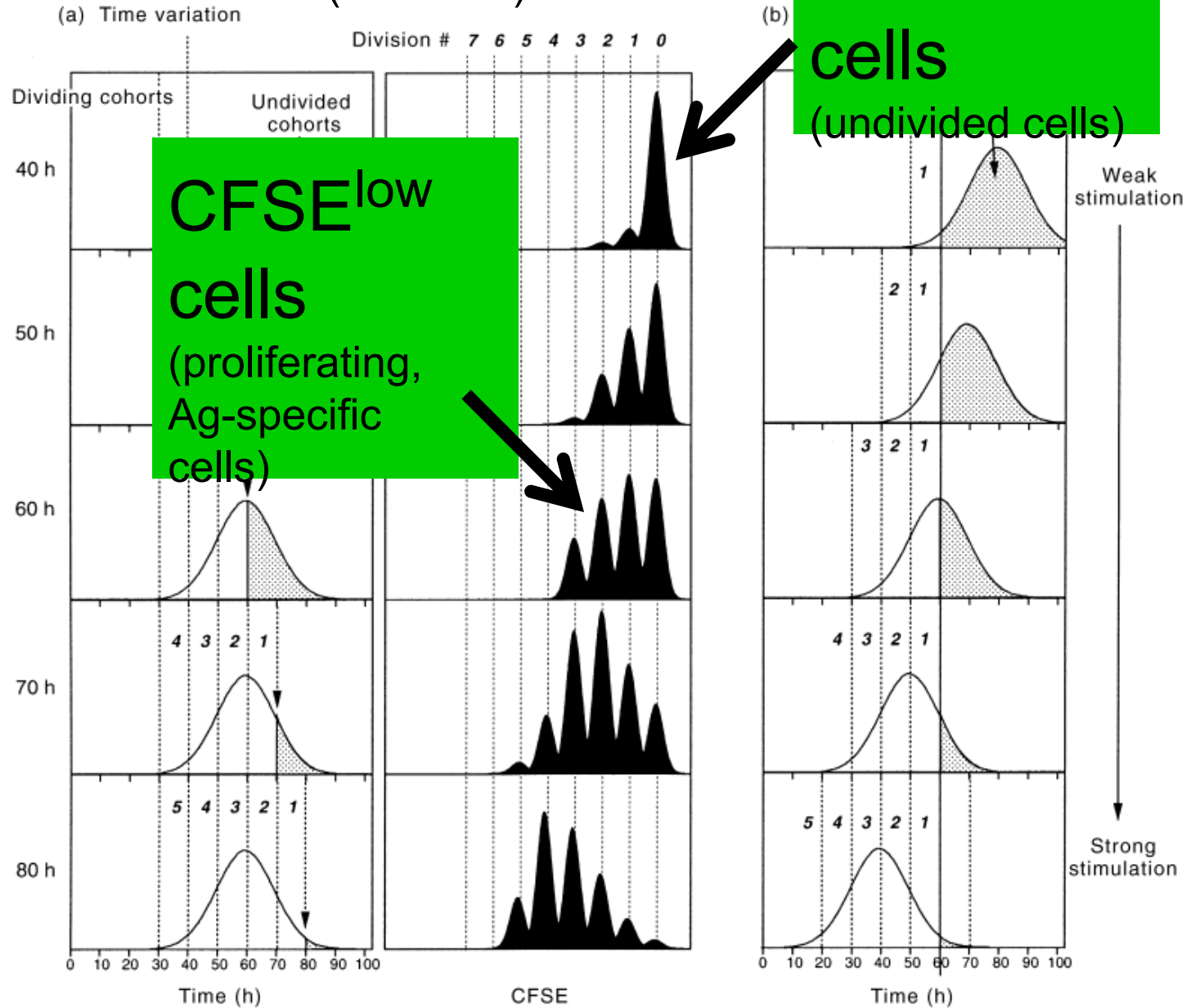
Divisions:



Lyons and Parish, 1994
JIM, 171;131

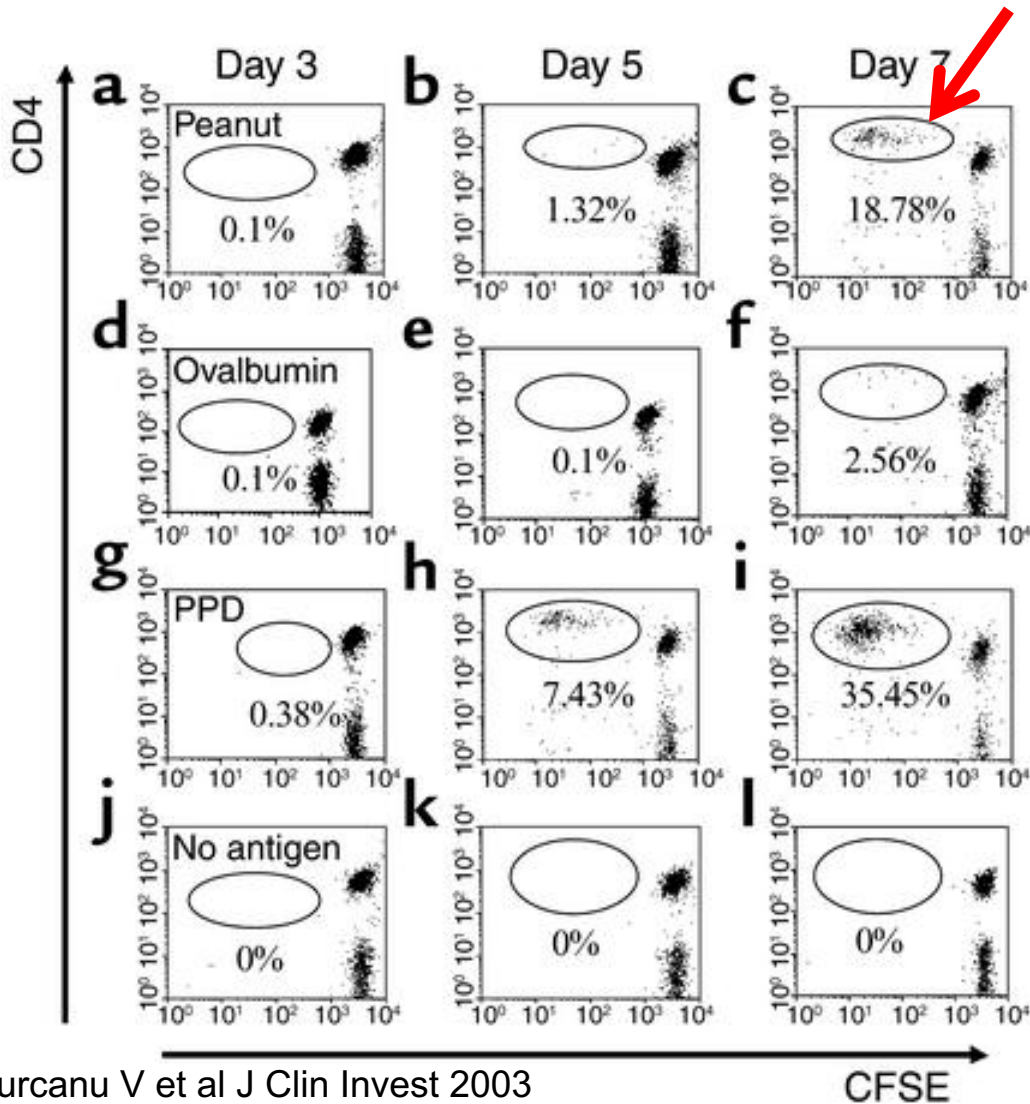


Ag-specific T cells ($CFSE^{low}$) are distinguishable from other cells in culture ($CFSE^{high}$)

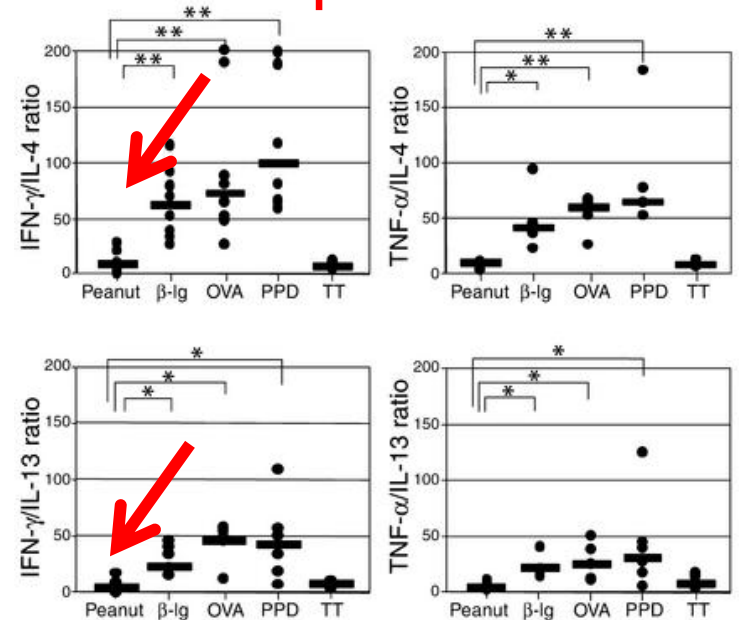


Peanut allergy

PBMCs from a PA donor were isolated, labeled with CFSE, and cultured in the presence of 100 µg/ml peanut extract



Th2 polarization



Peanut specific T cells in peanut allergic patients:

$INF\gamma^{low}TNF\alpha^{low}IL4^{high}IL5^{high}IL13^{high}$

Peanut specific T cells in non allergic or patients with outgrown PA allergy:

$INF\gamma^{high}TNF\alpha^{high}IL4^{low}IL5^{low}IL13^{low}$

Analyse de la réponse T antigène spécifique

A-Tests non-fonctionnels :

α Tetramer staining (T cells)

B-Tests fonctionnels :

α Cell proliferation (thymidine, fluorescent probes: CFSE, PKH26..)

α Cytokine production (intracellular, ELISA, ELISPOT..)

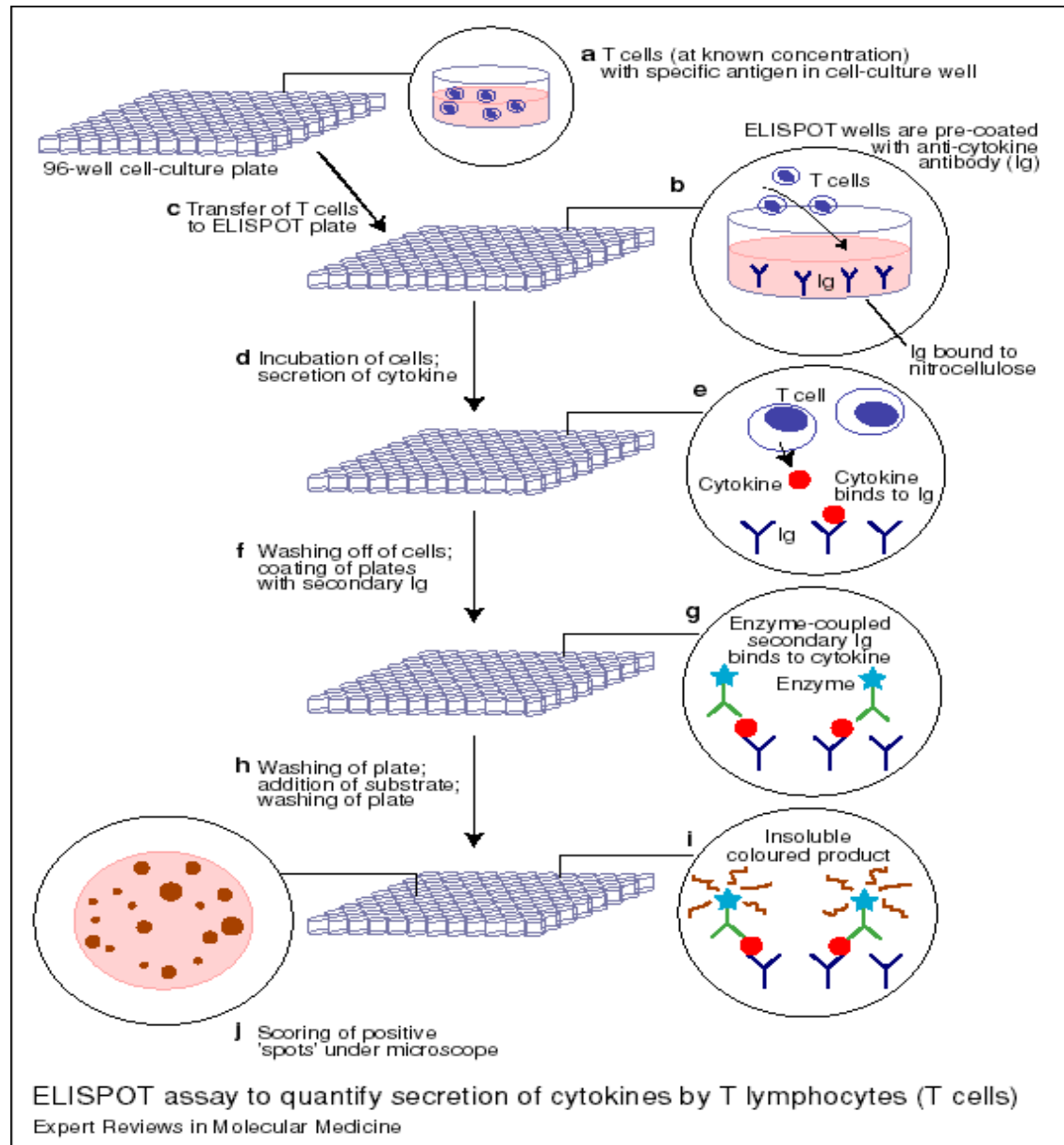
ELISPOT

ELISPOT assays are orders of magnitude more sensitive for detecting rare cells than are FACS-based techniques such as tetramer or intracytoplasmic cytokine staining.

Measures frequencies of the antigen-specific cells and the type of molecules these lymphocytes secrete, ELISPOT assays not only establish the magnitude (clonal size) but also the quality (effector class, e.g. Th1, Th2, Th17 etc) of Ag-specific immunity.

Tests utilisés pour allergie retardée (HS de type IV aux médicaments).

Principe de l'ELISPOT



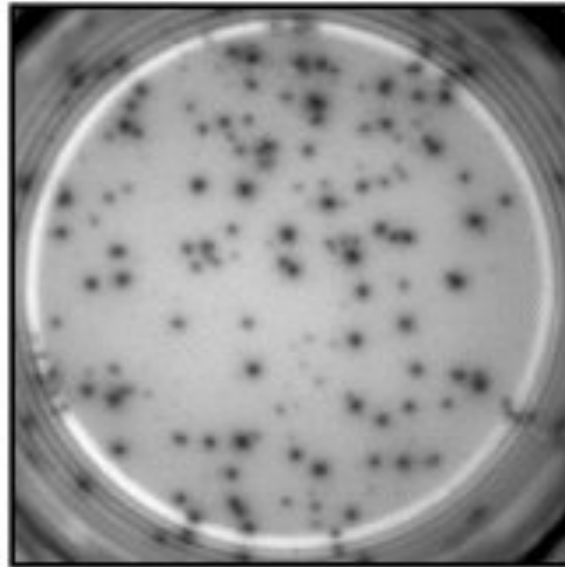
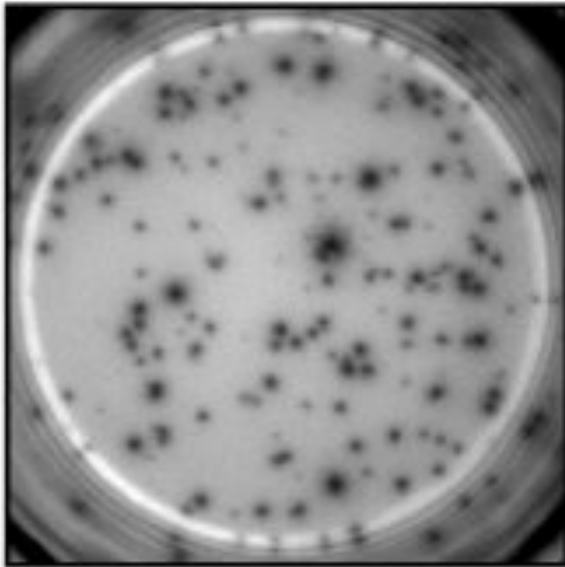
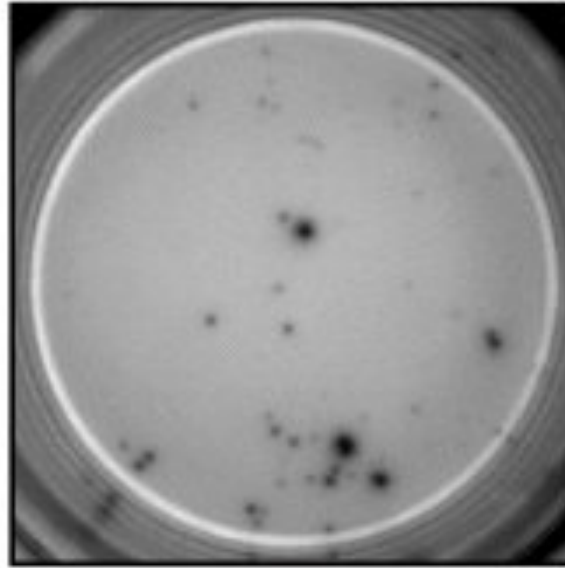
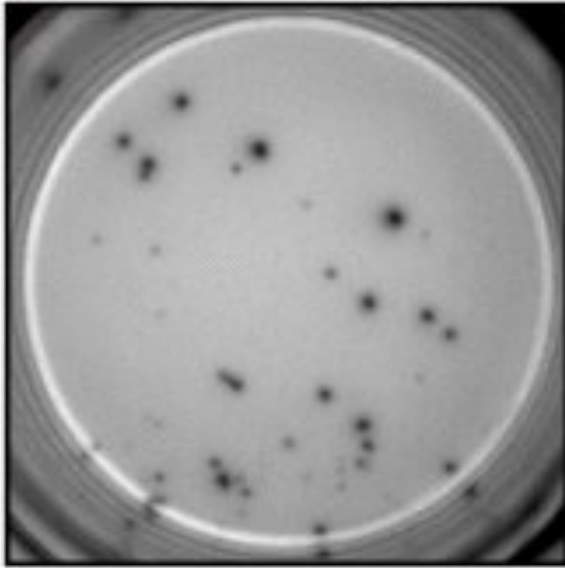


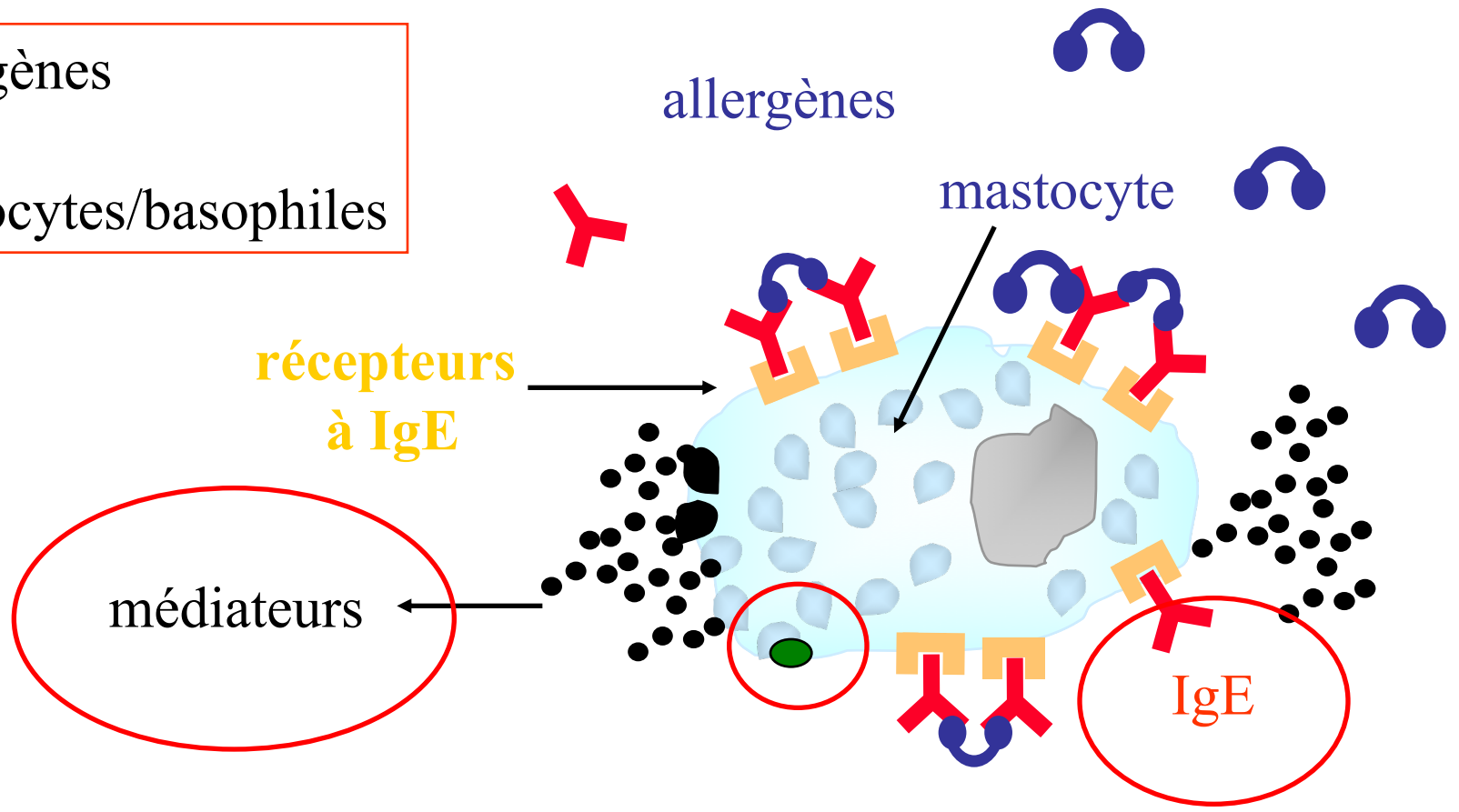
Figure A-29 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Biologie de l'allergie : du fondamental au diagnostic

- 1- La réaction allergique
- 2- Le diagnostic
- 3- Résumé

RESUME

Allergènes
IgE
Mastocytes/basophiles



Dégranulation des mastocytes/basophile dépendante des IgE
→ libération de médiateurs → ALLERGIE