

Anciens et nouveaux outils diagnostiques en allergologie: jusqu'où aller?

Ligue pulmonaire genevoise,
Centre de Varembe, Genève, 17 novembre 2011

François Spertini
Service d'Immunologie et d'Allergie
CHUV, Lausanne

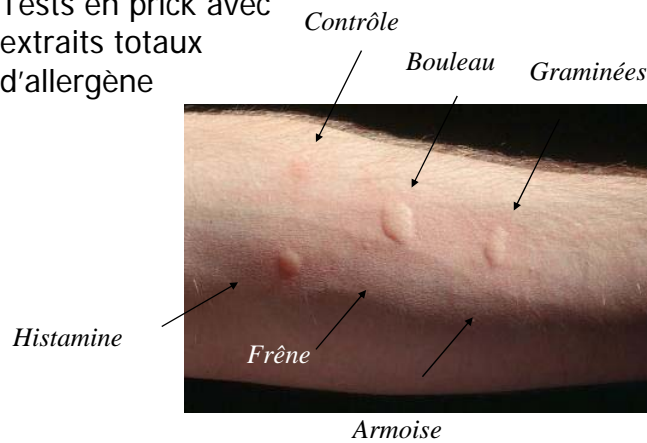


Diagnostic en allergologie

- A ce jour essentiellement basé sur
 - L'anamnèse
 - Les tests cutanés
 - Prick tests (SPT) ou prick-prick tests
 - Intradermoréaction (IDR)
 - (Allergy patch tests)
 - Les tests *in vitro*
 - Anticorps IgE spécifiques mis en évidence par essais en phase solide (type CAP, Phadia)

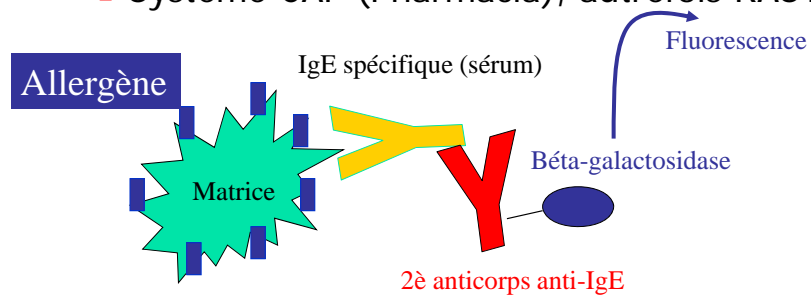
Tests *in vivo* : prick tests

- Tests en prick avec extraits totaux d'allergène



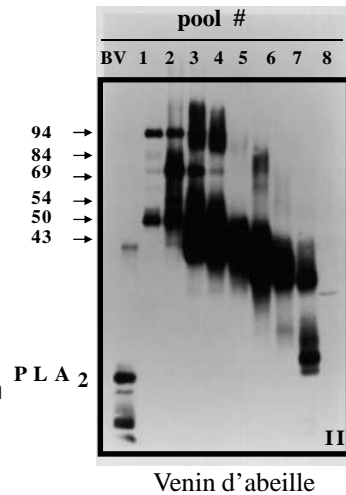
Tests *in vitro*

- IgE spécifiques
 - Tests en phase solide (type ELISA modifié)
 - Système CAP (Pharmacia), autrefois RAST



Qualité de l'allergène

- Extraits totaux d'allergènes
 - Multiples protéines et autres contaminants
 - Protéines non allergéniques
 - Allergènes avec activité enzymatique
 - Autodigestion de l'extrait
 - Dégradation rapide
- Particulièrement vrai pour les allergènes alimentaires
- Impératif de trouver une substitution
 - Pour le diagnostic
 - Pour la thérapie (ITS)



L'allergène en diagnostic allergologique classique

- Extraits totaux d'allergènes
 - Allergènes respiratoires
 - Globalement très bonne sensibilité et spécificité
 - Bonne VPP et VPN
 - Allergènes alimentaires
 - Médiocre sensibilité et spécificité
 - Médiocre VPP et VPN



Qualité de l'allergène

- Extraits d'allergènes
 - Malgré des efforts de standardisation, restent standardisés « à l'interne »
 - Difficilement défendables comme agents *thérapeutiques*
 - En partie « sauvables » pour le diagnostic *in vivo*
 - Allergènes respiratoires fréquents (SPT)
 - Certainement pas le cas pour les allergènes alimentaires (SPT)



Qualité de l'allergène

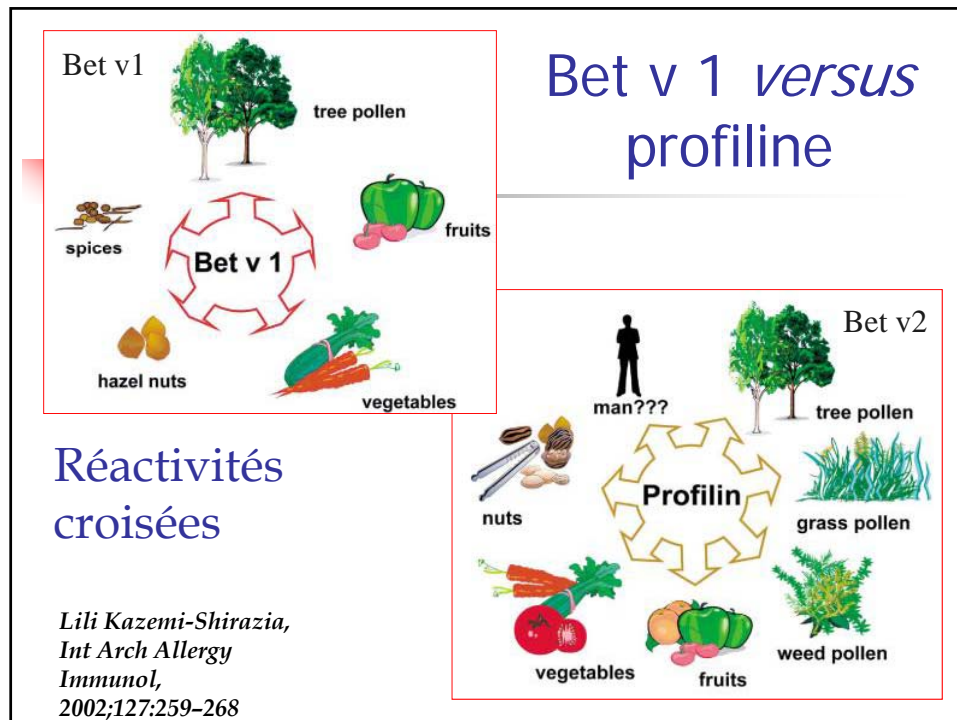
- Question clé
 - L'avenir de "l'allergène" comme outil diagnostique ET thérapeutique passe par sa "certification" par les autorités de régulation (ordonnance de mars 2010 de l'EMA, PEI, FDA, Swissmedic...)
 - Nécessité d'un niveau optimal
 - De pureté
 - De stabilité
 - De reproductibilité (GLP, GMP)
 - De preuve d'efficacité, de non toxicité
 - Ne répondent que dans de rares indications aux ordonnances de l'EMA et de Swissmedic, même simplifiées
 - Restriction drastique de l'offre d'extraits pour l'ITS

Développement logique

- Diagnostic *in vivo*
 - Maintenir les extraits qui peuvent se conformer à l'ordonnance
 - Mort assurée de la plupart des mélanges allergéniques folkloriques....
 - Développer des produits de substitution
 - Allergènes purifiés
 - Allergènes synthétiques
 - Allergènes recombinants

Allergènes recombinants polliniques

Source	Nom	Fonction	Poids mol. (kD)	Fréq. liaison IgE	
Phleum pratense	Phl p1	expansine	27	96	
	Phl p2	inconnu	10,0	60	
	Phl p4	inconnu	55	56	
	Phl p5	ribonucléase	32-38	80	
	Phl p6	P-particle associated	13	75	
	Phl p7	Ca-binding	6-8,6	10	
	Phl p12	profiline	14	20	
	Phl p13	polygalacturonase	55-60	50	
	Betula	Bet v1	IPR prot	17	90-95
		Bet v2	profiline	14,1	20
		Bet v4	Ca ²⁺ binding	6-8,6	10
		Bet v5	isoflavone réductase	33	30
		Bet v6	inconnu	30-35	?
Bet v8		pectinestérase	55	?	

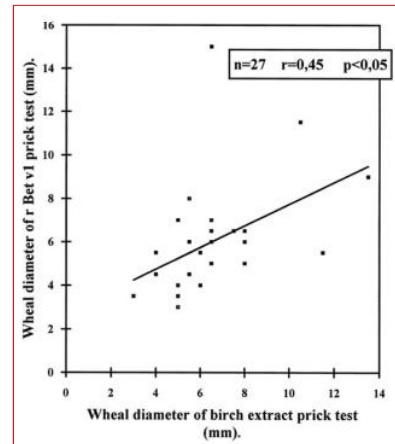


Familles d'allergènes

- Protéine PR-10
 - Protéines homologues de Bet v 1, thermo-labiles
 - Souvent associée à des symptômes locaux tels que le syndrome oral
 - Souvent associée à des réactions allergiques à des fruits et légumes dans le nord de l'Europe
- LTP (non-specific Lipid Transfer Protein, nsLTP)
 - Protéine stable à la chaleur et la digestion, provoquant des réactions aux aliments cuits également
 - Souvent associée à des réactions systémiques et plus sévères
- Profilin
 - Rarement associées à des symptômes cliniques mais, chez une minorité de patients, peut provoquer des réactions qui peuvent même être sévères
- Protéine de stockage, CCD, tropomyosine, parvalbumine, albumine

Skin testing with recombinant allergens rBet v 1 and birch profilin, rBet v 2 : Diagnostic value for birch pollen and associated allergies *Pauli et al., JACI, 1996;97:1100-9*

- Correlation of wheal diameters obtained by prick tests with birch extract (Stallergene, 100 IR) and prick tests with rBet v 1 (3 µg/ml) in 27 patients.



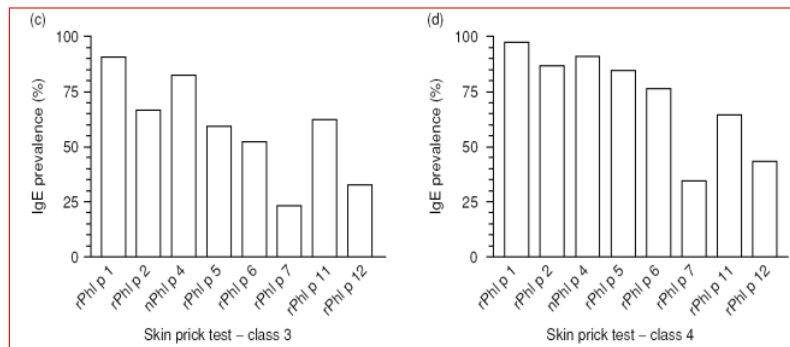
Conditions d'application des tests *in vitro* recombinants ou purifiés

- Répondre aux ordonnances de Swissmedic ou autres autorités de régulation
 - Obtention d'un niveau optimal
 - de sensibilité
 - de spécificité
 - de valeur prédictive pos. ou nég.
 - en comparaison des SPT ou des CAP-extraits
 - Choix des allergènes majeurs

Corrélation IgE spécifiques – tests cutanés

Mari A., CEA 2003;33, 43

- Corrélation tests cutanés en prick par l'extrait total et prévalence des IgE spécifiques anti-recombinants de *Phleum pratense*



Conditions d'application des tests *in vitro* recombinants ou purifiés

- La qualité, les caractéristiques des tests en phase solide dépendent
 - Du support
 - De la qualité de l'allergène
 - Conformation/refolding
 - Des conditions de coating
 - De la nature de l'allergène
 - Allergène isolé *versus* mélange
 - Compétition possible entre allergènes
 - Du révélateur (2^e anticorps et marquage)
 - Du mode de lecture

Applications diagnostiques des allergènes recombinants ou purifiés

- Tests cutanés
 - Comparables à la protéine native
 - Meilleure spécificité, car moins de risque de contamination par d'autres allergènes
 - Nécessité d'un refolding optimal
 - Indépendents de la variabilité de la glycosylation (PLA2)
- Provocation nasale ou bronchique
- Tests in vitro
 - Type CAP
 - ELISA
 - Immunoblots
 - Libération d'histamine in vitro

M. van Hage-Hamsten et al., Methods 32 (2004) 281–291

Allergènes des venins d'hyménoptères

D. Comte et al. RMS, 2011

Espèce	Protéine/peptide	Allergène	Poids moléculaire (kDa)	Vecteur
<i>Apis mellifera</i>	Phospholipase A2	Api m1	16	P
	Hyaluronidase	Api m2	43	P, E
	Phosphatase acide	Api m3	47	E
	Dipeptidylpeptidase IV	Api m5	100	ND
	CUB serine protéase	Api m7	39	P
	Carboxylesterase	Api m8	70	ND
<i>Vespa vulgaris</i>	Phospholipase A1	Ves v1	34	P
	Hyaluronidase	Ves v2	38	P
	Dipeptidylpeptidase IV	Ves v3	100	ND
	Antigène 5	Ves v5	23	P, E
<i>Polistes dominulus</i>	Antigène 5	Pol d5	23	E

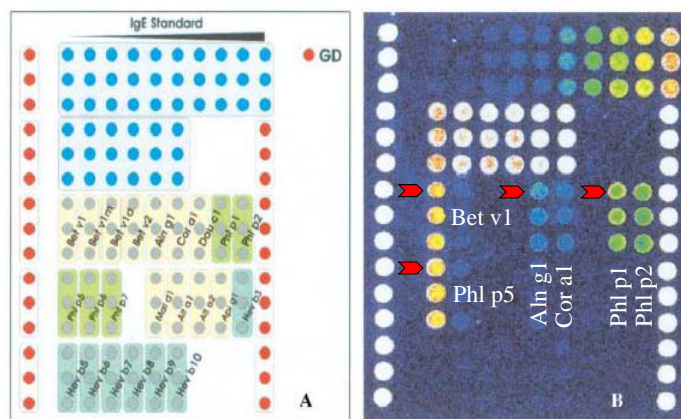
P: vecteur d'expression procaryote; E: vecteur d'expression eucaryote; ND: pas de données.
(Adapté de de Graaf DC, et coll. Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *J Proteomics* 2009;72:145-54).

- Excellente spécificité
- Permettent d'écarter les faux positifs liés aux CCD
- Evitent les doubles désensibilisations inutiles

Component-resolved diagnosis

- Remplacement de l'extrait pollinique total par ses composants majeurs (et mineurs) sous forme recombinante ou purifiée
 - Standardisation aisée
 - Stabilité contrôlable
 - Absence d'interactions interprotéiques
 - Faible consommation de sérum
- Miniaturisation sous forme de microarrays (ISAC, Phadia > 100 composants)
- Gros effort de mise au point!

Microarrayed recombinant allergens



Deinhofer et al., Methods, 32 (2004) 249

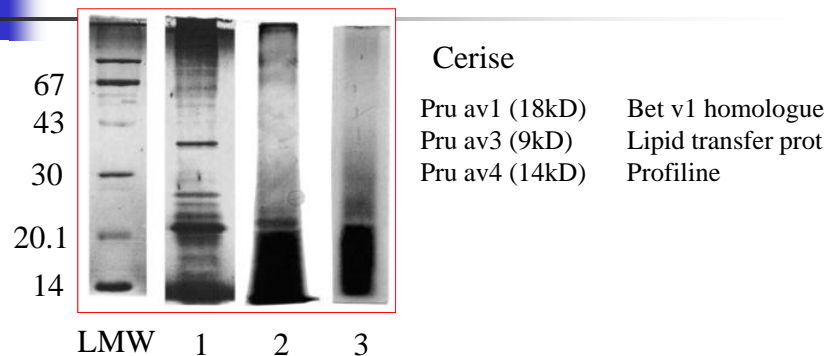
Intérêt tout particulier dans le diagnostic de l'allergie alimentaire

- VPP de l'allergie alimentaire avec les extraits standard est très médiocre
 - Dégradation rapide
- Prick-pricks avec l'aliment frais nettement plus performant
 - Standardisation impossible
- *Amélioration de la sensibilité et spécificité du diagnostic grâce aux allergènes recombinants ou purifiés d'origine alimentaire??*
 - Identification de sous-groupes répondeurs (LTP versus profiline, etc...)

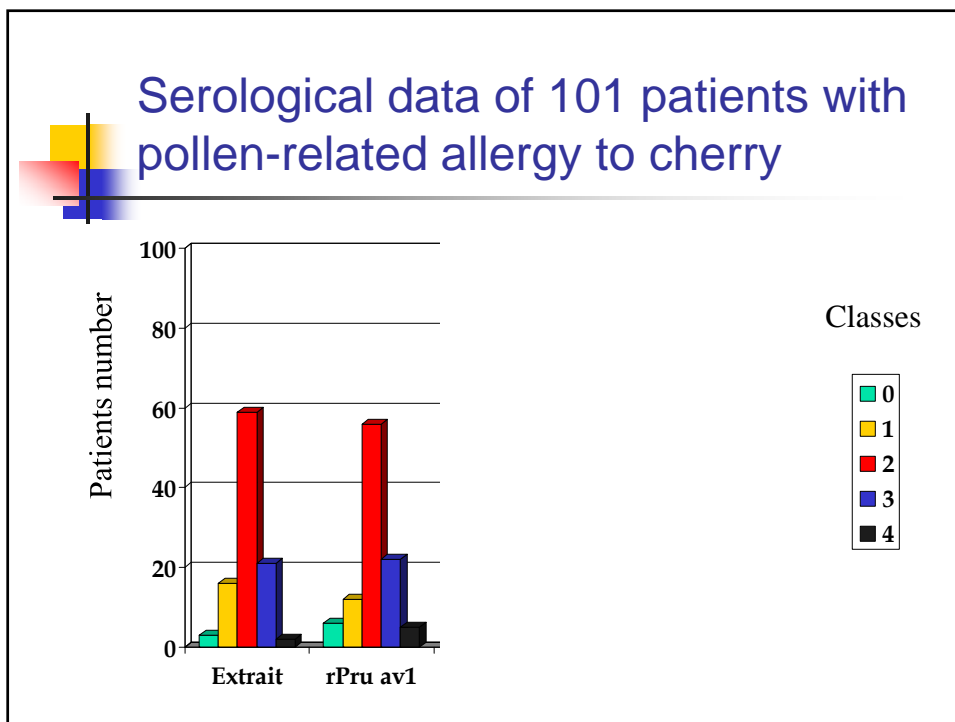
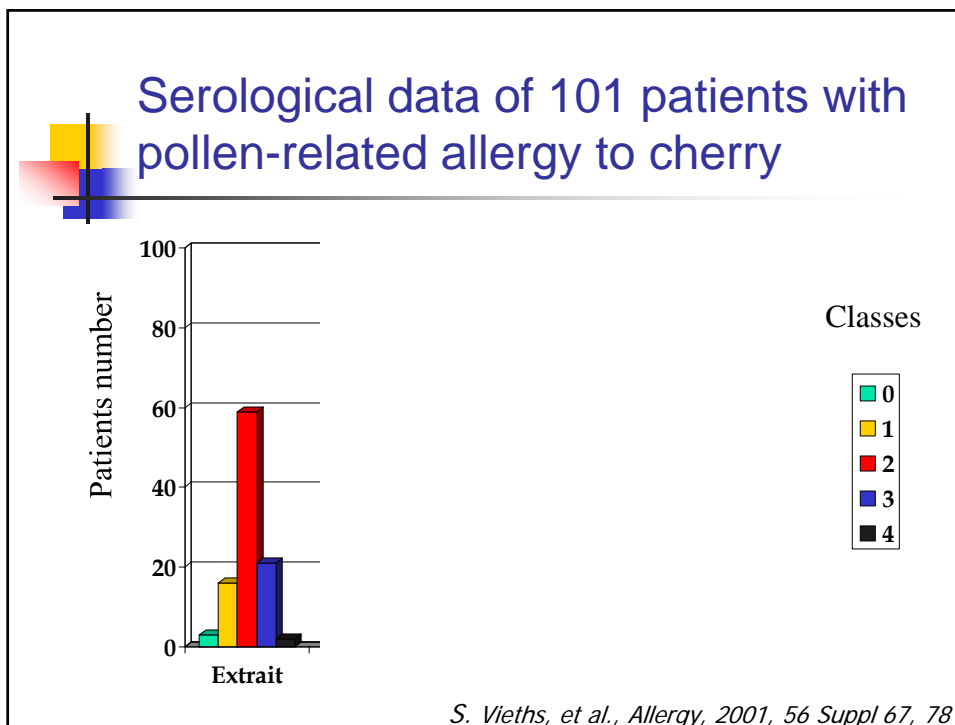
S. Vieths, et al., *Allergy*, 2001, 56 Suppl 67, 78; Ballmer-Weber et al., *JACI*, 2002, 110:167

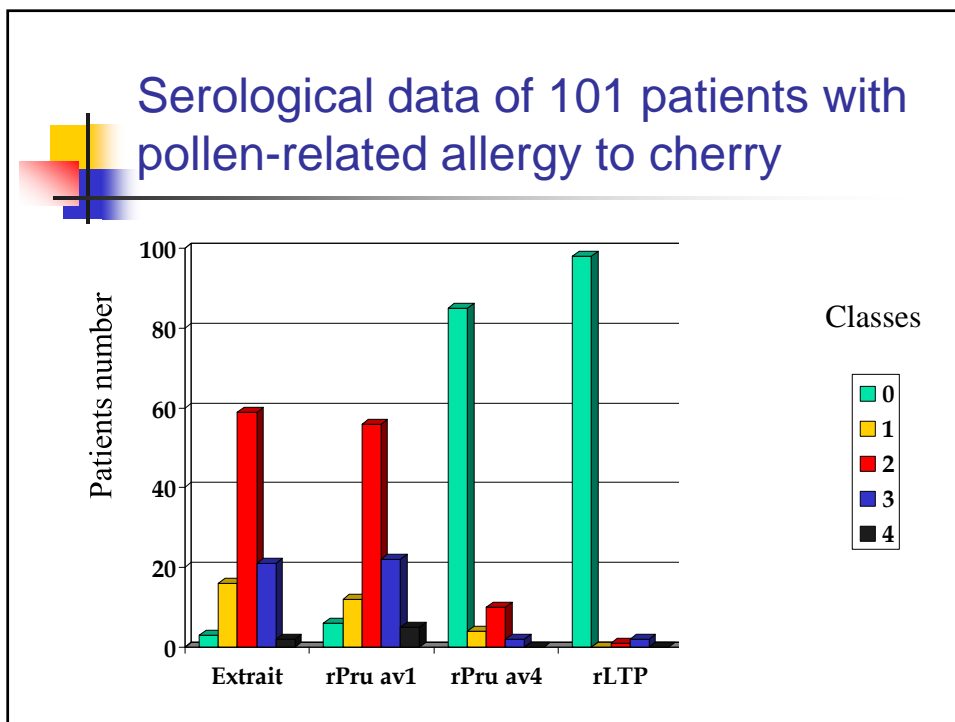
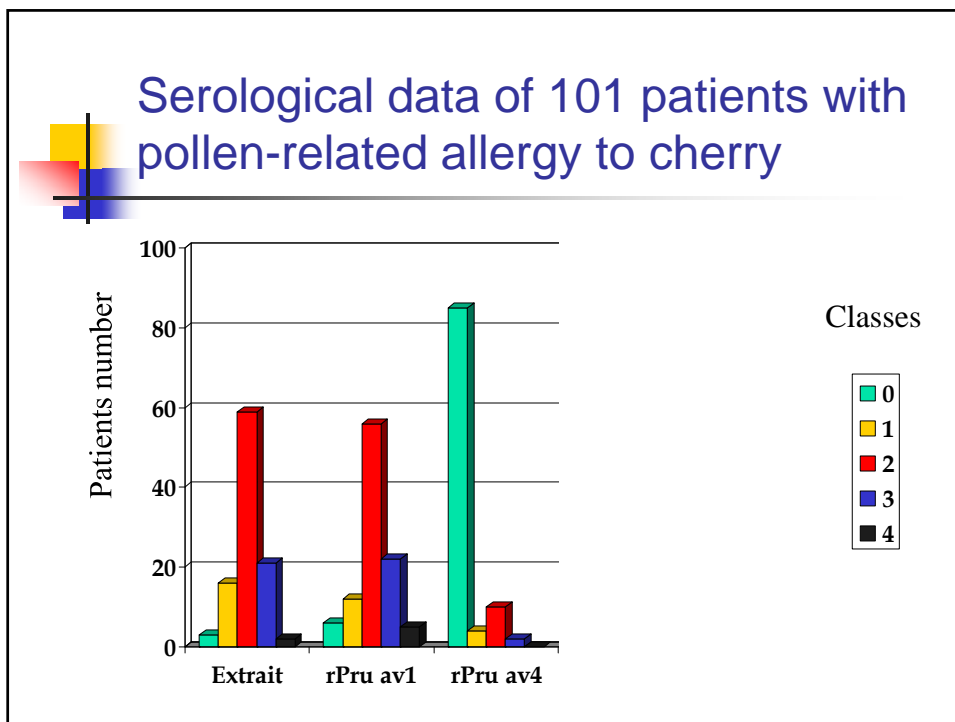
Diagnostic de l'allergie alimentaire

S. Vieths, et al., *Allergy*, 2001, 56 Suppl 67, 78

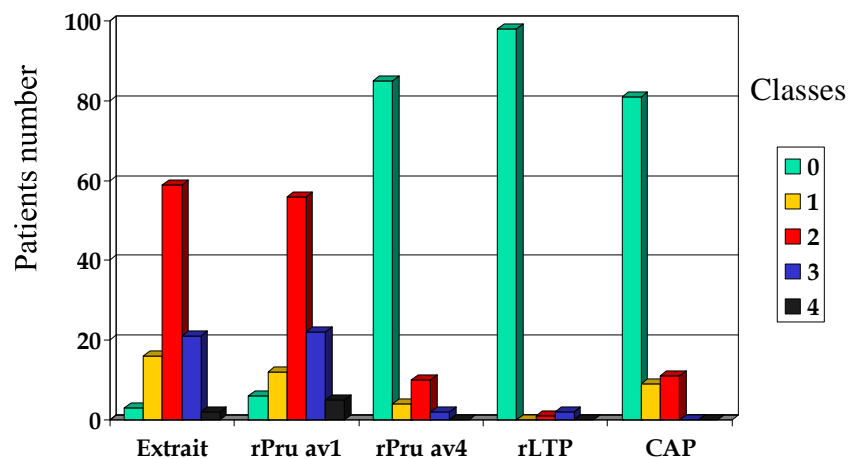


1. Low temperature acetone powder method (méth. optimisée)
2. Extrait de pelure
3. Extrait commercial





Serological data of 101 patients with pollen-related allergy to cherry



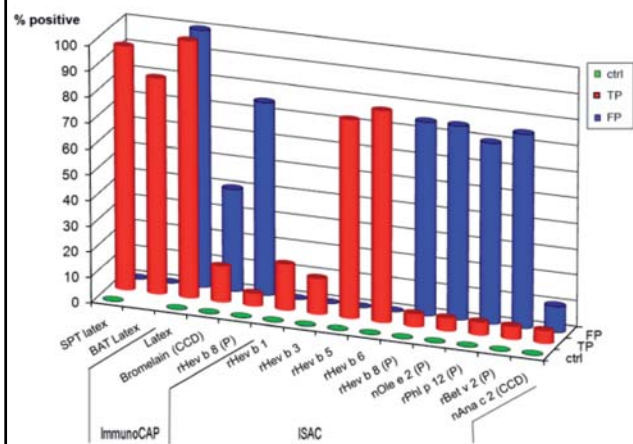
Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy

Ballmer-Weber et al., JACI, 2002, 110:167

Type de sensibilité et sévérité clinique

- rPru v1 (PR-10) 10/18 monosensibilisés
 - Sx de SOC modéré (prurit oral)
- rPru v3 (LTP) 6/8 monosensibilisés
 - Sx sévères (urticaire, angioedème)

Component-resolved diagnosis from latex allergy by microarray *Ebo et al., CEA, 2009*



- Percentages of positive skin test (SPT) and sIgE results by ISAC microarray and traditional singleplexed ImmunoCAP in control individuals (CTRL), latex-allergic patients (TP) and individuals sensitized to NRL (false positive: FP). Percentages of positive basophil activation tests (BAT) in TP and FP.

Pronostic de l'ITS selon la réponse contre les allergènes majeurs ou mineurs *P. Schmid-Grendelmeier, Hautarzt, 2010*

Tab. 1 Retrospektive Beurteilung des Erfolgs der SIT und Sensibilisierungsspektrum auf Major- und Minorallergene (anhand von 746 Patienten)

Besserung	Major + Minor +	Major + Minor -	Major - Minor +	Major - Minor -	Total
Keine	24	13	41	6	84
Mäßig	109	28	26	3	166
Gut	123	137	9	0	269
Sehr gut	74	147	6	0	227
Total	330	325	82	9	746

Bestimmte Majorallergene: Bet v 1 und/oder Phl p 1/Phl p 5. Bestimmte Minorallergene: Bet v 2/Bet v 4 oder Phl p 7/Phl p 12.



Conclusions: Intérêt des allergènes recombinants ou purifiés/CRD

- Diagnostic
 - Excellente stabilité des protéines (homologables...)
 - Identification précise des sensibilités
 - Identification des réactions croisées
 - Appréciation de leur signification clinique, du risque clinique
 - A l'avenir
 - Screening *in vitro* (component resolved diagnosis) avant SPT dans les situations complexes (alimentaires)?
- *Lege artis*, on ne peut néanmoins pas se passer pour autant de l'anamnèse, de la clinique ou de la provocation (DBPCFC)



En pratique

- Recherche d'allergie immédiate spécifique à des allergènes respiratoires, alimentaires ou du milieu professionnel **selon l'anamnèse**
- **Evaluer l'indication à des tests *in vitro*** (par le praticien) **ou *in vivo*** (par le spécialiste)



En pratique

- Distinguer clairement la nature de la réaction allergique
 - Type I (tests en prick, CAP, provocation...)
 - Type IV (tests en IDR, patch)
- Distinguer la réaction allergique d'une réaction irritative
 - Cas de certaines réactions aux bois exotiques, aux médicaments, aux plantes...



En pratique

- Quels tests de premiers recours pour le praticiens (réactions type I)
 - Tests *in vitro* classiques (IgE contre extraits d'allergènes respiratoires communs)
 - Viser les tests globaux
 - Phadiatop (gamme d'allergènes respiratoires)
 - Mélanges alimentaires (noix, céréales, crustacés...)
 - Si positifs, référer au spécialiste
 - Si anamnèse précise, CAP (IgE spécifiques, recombinants) pour les agents suspects
 - Mais attention! Avec modération...40.- par tests
 - Les pricks sont bien plus rentables (>30 tests pour 40.- env.)



En pratique

- Pas d'indication pour le non spécialiste à effectuer
 - des tests IgE spécifiques pour des allergènes recombinants
 - Réactivité croisée
 - des multi-tests types ISAC



**MERCI DE VOTRE
ATTENTION**