

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2021

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Sévérité de la réaction allergique et dose réactogène lors du test de
provocation oral chez l'enfant allergique à l'arachide : apport du
Test d'Activation des Basophiles**

Présentée et soutenue publiquement le 26 octobre 2021 à 18h
au Pôle Formation
par **Céline MIAUX**

JURY

Présidente :

Madame la Professeure Cécile CHENIVESSE

Assesseures :

Madame la Professeure Myriam LABALETTE

Madame la Docteure Stéphanie ROGEAU

Directeur de thèse :

Monsieur le Docteur Antoine DESCHILDRE

AVERTISSEMENT

**La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les
thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs**

LISTE DES ABREVIATIONS

TPO : Test de Provocation Oral

TAB : Test d'Activation des Basophiles

ITO : Induction de Tolérance Orale

DCR : Dose Cumulée Réactogène

FASS : Food Allergy Severity Score

CMF : Cytométrie en flux

TC : Tests Cutanés

Ac : Anticorps

IgE : Immunoglobuline E

CD : Cluster de Différenciation

CCR : Chemokine Cell Receptor

B CD63+ : Basophiles activés

RIHN : Référentiel des actes Innovants Hors Nomenclature

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1
INTRODUCTION	3
MATERIELS ET METHODES	6
I) Caractéristiques générales	6
II) Population de l'étude	6
A. Critères d'inclusion	6
B. Critères d'exclusion	6
III) Données anamnestiques recueillies.....	6
IV) Test de Provocation Oral.....	8
A. Conditions de réalisation	8
B. Sévérité de la réaction et dose cumulée réactogène (DCR)	9
<u>1) Sévérité de la réaction lors du TPO</u>	<u>9</u>
<u>2) Dose cumulée réactogène</u>	<u>9</u>
V) Le Test d'Activation des Basophiles (TAB)	10
A. Principe du TAB	10
B. Réalisation du TAB.....	11
<u>1) Produits utilisés.....</u>	<u>11</u>
<u>2) Les différentes conditions d'incubation</u>	<u>12</u>
C. Interprétation du TAB	15
<u>1) Identification des basophiles dans la population leucocytaire</u>	<u>15</u>
<u>2) Les différents contrôles.....</u>	<u>16</u>
<u>3) Les résultats du TAB</u>	<u>19</u>
VI) Test cutanés et dosage des IgE spécifiques	21
VII) Analyse statistique.....	22

RESULTATS	23
I) Caractéristiques de la population.....	23
II) Sévérité des réactions allergiques durant le TPO	24
III) Dose cumulée réactogène durant le TPO	27
IV) Activation des basophiles et sévérité de la réaction allergique au TPO	27
A. Témoin positif	27
B. Réactivité des basophiles et sévérité de la réaction.....	28
<u>1) Positivité du TAB</u>	<u>28</u>
<u>2) CD-max</u>	<u>28</u>
<u>3) Pourcentage de basophiles activés et ratio.....</u>	<u>28</u>
<u>4) Pourcentage de basophiles activés par la concentration minimale activatrice</u>	<u>29</u>
C. Sensibilité des basophiles et sévérité de la réaction.....	29
D. Paramètre le plus performant pour évaluer la sévérité des réactions.....	30
V) Activation des basophiles et DCR lors du TPO	30
A. Témoin positif	30
B. Réactivité des basophiles et DCR.....	30
<u>1) Positivité du TAB</u>	<u>30</u>
<u>2) CD-max</u>	<u>31</u>
<u>3) Pourcentage de basophiles activés et ratio.....</u>	<u>31</u>
<u>4) Pourcentage de basophiles activés par la concentration minimale activatrice</u>	<u>32</u>
C. Sensibilité des basophiles et DCR.....	32
<u>1) Concentration minimale activatrice</u>	<u>32</u>
<u>2) CD-sens et EC50</u>	<u>32</u>
D. Paramètres les plus performants pour évaluer le seuil réactogène.....	33
VI) Performances du TAB.....	38
A. Sévérité de la réaction	38
B. Seuil réactogène (DCR).....	39

VII) Etude des autres marqueurs allergologiques.....	40
A. Concernant l'étude de la sévérité de la réaction	40
B. Concernant l'étude du seuil réactogène.....	40
DISCUSSION.....	41
I) TAB et allergie alimentaire	42
A. Le TAB comme biomarqueur de la sévérité	44
B. Le TAB comme biomarqueur du seuil réactogène	45
II) Scores de gravité des réactions allergiques : les limites	46
III) Détermination de la dose réactogène : les limites	47
IV) Avantages et limites du TAB	48
A. Avantages	48
<u>1) Pour le patient</u>	<u>48</u>
<u>2) Réaction cellulaire vraie.....</u>	<u>48</u>
B. Limites	48
<u>1) Conditions de réalisation et coût</u>	<u>49</u>
<u>2) Patients non répondeurs</u>	<u>49</u>
<u>3) Basophiles et mastocytes.....</u>	<u>49</u>
<u>4) Variabilité inter-individuelle et interprétations des résultats</u>	<u>50</u>
V) Forces et limites de l'étude	50
A. Forces	50
B. Limites	51
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	52
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	53
ANNEXES.....	57

RESUME

Contexte : Le Test de Provocation Oral (TPO) est un examen clé du diagnostic de l'allergie à l'arachide. Le TPO nécessite une structure de soins spécialisée et n'est pas dénué de risque pour le patient, mais il permet d'apporter des informations précieuses notamment sur la sévérité de la réaction allergique et sur la dose réactogène. Le but de cette étude était d'évaluer le Test d'Activation des Basophiles (TAB) comme biomarqueur prédictif de la sévérité et de la dose réactogène.

Méthode : Etude monocentrique rétrospective réalisée au CHU de Lille, ayant inclus tous les enfants allergiques à l'arachide, ayant bénéficié d'un TAB au moment de la réalisation d'un TPO à l'arachide confirmant l'allergie, en vue d'une Induction de Tolérance Orale (ITO) entre 2015 et 2021. Pour chaque enfant nous avons recueilli les données anamnestiques suivantes : comorbidités allergiques (asthme, dermatite atopique, rhinite allergique, autre allergie alimentaire), résultats du TPO (gravité de la réaction allergique définie par le score FASS (réaction sévère si score de 4 ou 5), dose cumulée réactogène (DCR) en mg de protéine d'arachide (DCR faible si ≤ 100 mg de protéine d'arachide), traitement administré) et les résultats du TAB à l'arachide et au rArah2 (témoin positif, réactivité des basophiles pour les différentes concentrations ainsi que leur ratio par rapport au témoin positif, CD-max, concentration minimale activatrice, EC 50 et CD-sens).

Résultats : Soixante-quatorze enfants ont été inclus, d'âge médian de 8 ans (6 ; 11), ayant un score de sévérité FASS médian de 2 (2 ; 3) et une Dose Cumulée Réactogène (DCR) médiane de 191,5 mg de protéine d'arachide (66,3 ; 941,3) lors du TPO. Les 17 enfants du groupe « réaction sévère » ont une réactivité des basophiles plus importante avec un ratio médian de pourcentage de basophiles activés par le rArah2/ pourcentage de basophiles activés par l'anticorps anti-FC ϵ RI à 1 (0,9 ; 1,2) contre 0,9 (0,1 ; 1) chez les 57 patients du groupe « réaction faible/modérée » pour une dilution au 1/5^{ème} de rArah2 ($p = 0,008$). L'aire sous la courbe est à 0,73 [IC95% 0,58-0,89] déterminant une valeur seuil

optimale du ratio à 1,04 avec une VPP à 0,58 [IC95% 0,28-0,85] et une VPN à 0,86 [0,74-0,94]. Les 27 enfants du groupe « DCR faible » ont une sensibilité des basophiles plus importante avec un CD-sens rArah2 à 2000 (303 ; 3333) contre 370,4 (82 ; 2000) chez les 47 patients du groupe « DCR élevée » ($p = 0,013$). Un TAB positif pour les deux concentrations les plus faibles d'arachide (0,1 ng/mL et 1 ng/mL) et de rArah2 (0,02 ng/mL et 0,2 ng/mL) est significativement associé à une faible DCR. A contrario, un TAB positif uniquement pour les deux concentrations les plus élevées d'arachide (20 ng/mL et 100 ng/mL) et de rArah2 (4 ng/mL et 20 ng/mL) est significativement associé à une DCR élevée. Les 27 enfants du groupe « DCR faible » ont également une réactivité des basophiles plus importantes avec un CD-max arachide à 88,8% (71,5 ; 93,3) contre 66,8% (23,7 ; 91,9) ($p=0,007$) et un CD-max rArah2 à 86,3% (77,4 ; 93,2) contre 50,5% (19,6 ; 85,5) chez les 47 patients du groupe « DCR élevée » ($p = 0,002$).

Conclusion : Le TAB pourrait être un biomarqueur prédictif de la sévérité de la réaction allergique survenant lors du TPO arachide ainsi que de la dose réactogène. Toutefois, ses performances ne semblent pas, d'après notre étude, suffisantes pour remplacer le TPO et prédire avec précision ces caractéristiques de l'allergie à l'arachide.

INTRODUCTION

L'allergie à l'arachide est une des allergies alimentaires les plus fréquentes. En Europe, 2,60% (IC95% 2,1-3,1) des enfants présentent une allergie alimentaire et 1,55% (IC95% 1,18-1,93) d'entre-eux une allergie à l'arachide (1). En France, en 2005, la prévalence a été évaluée à 0,6% (IC95% 0,3-1) chez les enfants de 6 à 17 ans (2). L'allergie à l'arachide est l'allergie alimentaire la plus fréquemment impliquée dans la survenue de réactions sévères pouvant mettre en jeu le pronostic vital, notamment chez l'enfant (3). La prévalence de l'allergie à l'arachide a considérablement augmenté durant les 2 à 3 dernières décennies devenant un nouvel enjeu de santé publique (4).

Actuellement, le diagnostic de l'allergie à l'arachide est évoqué sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques (histoire clinique compatible, réalisation de tests cutanés, dosage d'IgE spécifiques) et confirmé le cas échéant par la réalisation d'un Test de Provocation Oral (TPO) à l'arachide, gold standard du diagnostic de l'allergie à l'arachide (5). En plus d'affirmer ou d'infirmer le diagnostic, le TPO apporte de nombreux renseignements sur le profil du patient, notamment par la sévérité de la réaction allergique lors de ce test et par la dose réactogène. Cependant, la réalisation d'un TPO nécessite une surveillance hospitalière, dans un centre de référence, avec du personnel formé et n'est pas dénué de risque, avec la possibilité de survenue d'une anaphylaxie (6).

Jusqu'à récemment, la prise en charge de l'allergie à l'arachide reposait exclusivement sur l'éviction stricte de l'arachide et sur la prescription d'une trousse d'urgence contenant notamment un stylo auto-injectable d'Adrénaline pour le traitement des réactions allergiques sévères (7). Aujourd'hui, l'immunothérapie essentiellement orale est une proposition nouvelle en développement dans la prise en charge de l'allergie à l'arachide (8). A l'heure de la médecine personnalisée, l'enjeu ne se limite donc plus uniquement à la confirmation

du diagnostic d'allergie à l'arachide mais à la caractérisation très précise du profil du patient afin de lui proposer une prise en charge adaptée de son allergie alimentaire (9). Par conséquent, un biomarqueur performant, qui pourrait refléter avec précision le risque de survenue de réactions graves ainsi que le seuil réactogène permettrait de préciser les caractéristiques de l'allergie sans avoir recours au TPO. A l'heure actuelle, aucun marqueur fiable de sévérité ou de seuil réactogène n'a été identifié.

Le Test d'Activation des Basophiles (TAB) a été évalué pour diagnostiquer l'allergie à l'arachide (10) avec de meilleures performances que les tests cutanées et le dosage des IgE spécifiques, pour évaluer la persistance d'une allergie au lait (11) ou pour suivre une Induction de Tolérance Orale (ITO) à l'arachide (12,13).

Certaines études ont analysé l'intérêt du TAB comme biomarqueur de la sévérité et du seuil réactogène dans l'allergie à l'arachide, confirmée par un TPO. Dans l'étude de 2014, menée par Blumchen et al, les auteurs ont trouvé une corrélation entre plusieurs paramètres du TAB (pourcentage de basophiles activés à différentes concentrations et CD-sens) et le seuil réactogène. En revanche, aucun paramètre du TAB n'était corrélé à la sévérité de la réaction allergique (14). Dans une autre étude, menée par Santos et al, les résultats suggéraient que la sévérité de la réaction allergique à l'arachide lors du TPO était corrélée à la réactivité des basophiles au cours du TAB et que le seuil réactogène était corrélé à la sensibilité des basophiles (15). Des études plus récentes ont retrouvé les mêmes résultats que dans l'étude de Blumchen et al., à savoir une corrélation entre le pourcentage de basophiles activés, du CD-sens et la dose cumulée réactogène. Elles n'ont pas non plus montré de corrélation entre les paramètres du TAB et la sévérité de la réaction allergique à l'arachide lors du TPO (16,17).

Nous proposons d'évaluer le TAB comme outil prédictif de la sévérité de la réaction allergique à l'arachide et du seuil réactogène observés lors du TPO. Cette étude, menée dans l'unité d'allergologie pédiatrique du CHU de Lille a été conduite chez les enfants pour lesquels un TPO a été réalisé pour confirmer l'allergie à l'arachide, avant initiation d'une ITO.

Notre objectif principal était de déterminer si la réactivité du TAB est corrélée à la gravité de la réaction allergique, en d'autres termes, si le TAB permettait de discriminer les patients à risque de réaction sévère de ceux non à risque de réaction sévère.

Nos objectifs secondaires étaient les suivants :

- Déterminer si la sensibilité du TAB est corrélée au seuil réactogène faible, en d'autres termes, si le TAB permet de discriminer les patients ayant une faible dose réactogène de ceux ayant une dose réactogène plus élevée.
- Déterminer une valeur seuil du TAB permettant de distinguer les patients à risque de réaction grave et les patients ayant un seuil réactogène faible.
- Evaluer le lien entre la sévérité de la réaction allergique, le seuil réactogène et les autres marqueurs allergologiques : tests cutanés, IgE spécifiques à l'arachide et recombinants (rArah1, rArah2, rArah3, rArah8 et rArah9)

MATERIELS ET METHODES

I) Caractéristiques générales

Il s'agit d'une étude monocentrique réalisée dans le service de pneumologie et allergologie pédiatriques du CHU de Lille de janvier 2015 à juillet 2021. (Déclaration CNIL n°DEC 19-037). Les données ont été recueillies de façon prospective au sein d'un protocole de service mais ont été analysées rétrospectivement.

II) Population de l'étude

A. Critères d'inclusion

La population cible était les enfants âgés de 3 à 18 ans, suivis pour une allergie à l'arachide, ayant bénéficié d'un Test d'Activation des Basophiles (TAB) vis-à-vis de l'arachide au moment de la réalisation d'un Test de Provocation Oral (TPO) à l'arachide confirmant l'allergie à l'arachide, en vue d'une Induction de Tolérance Orale (ITO).

B. Critères d'exclusion

Les critères d'exclusion étaient les suivants :

- Traitement en cours par omalizumab
- Antécédent d'Immunothérapie Orale à l'arachide
- TAB ininterprétable
- Absence de réaction allergique lors du TPO arachide

III) Données anamnestiques recueillies

Pour chaque patient, nous avons recueilli les données suivantes :

- **Les comorbidités allergiques :**

- La présence d'un asthme, d'une dermatite atopique ou d'une rhinite allergique
 - La présence d'une sensibilisation aux pneumallergènes
 - La présence d'une autre allergie alimentaire
 - La notion d'une réaction allergique antérieure avec l'arachide
 - La dose d'arachide ingérée en vie réelle
- **Les données du TPO :**
- L'âge de réalisation
 - La sévérité de la réaction observée définie par le score FASS (Annexe1)
 - La dose cumulée réactogène en mg de protéine d'arachide
 - Les traitements reçus par le patient
 - La nécessité d'une hospitalisation pour surveillance au décours
- **Les résultats des tests allergologiques classiques :**
- Tests cutanés : témoin positif à l'histamine et test à l'extrait natif d'arachide
 - Dosage des IgE spécifiques : IgE arachide et recombinants (rArah1, rArah2, rArah3, rArah8 et rArah9)
- **Les résultats du TAB arachide et rArah2 :**
- Le témoin positif
 - Le pourcentage de basophiles activés pour chaque dilution
 - Le CD-max
 - La concentration minimale activatrice
 - L'EC 50 et le CD-sens

IV) Test de Provocation Oral

A. Conditions de réalisation

Le TPO à l'arachide était réalisé au cours d'une Hospitalisation de Jour. Le test se déroulait en ouvert avec pose d'une voie veineuse périphérique selon le protocole habituel du service.

Le TPO comportait une escalade de 9 doses allant de 5 mg d'arachide (1,25 mg de protéine d'arachide) à 5g d'arachide (1250 mg de protéine d'arachide) données sous forme de cacahuète grillée (Tableau I).

Une première dose facultative de 1 mg d'arachide (0,25 mg de protéine d'arachide) pouvait être administrée en cas d'antécédent d'anaphylaxie à l'arachide ou d'un profil de sensibilisation important.

Tableau I. Schéma d'escalade des doses d'arachide lors du TPO

	Dose de la prise en mg d'arachide (en mg de protéine d'arachide)	Dose cumulée en mg de protéine d'arachide
<i>Prise facultative</i>	<i>1 mg (0,25 mg)</i>	
Prise n°1	5 mg (1,25 mg)	1,25 mg
Prise n°2	10 mg (2,5 mg)	3,75 mg
Prise n°3	50 mg (12,5 mg)	16,25 mg
Prise n°4	200 mg (50 mg)	66,25 mg
Prise n°5	500 mg (125 mg)	191,25 mg
Prise n°6	1000 mg (250 mg)	441,25 mg
Prise n°7	2000 mg (500 mg)	941,25 mg
Prise n°8	5000 mg (1250 mg)	2191,25 mg
Prise n°9	5000 mg (1250 mg)	3441,25 mg

Les doses étaient données par intervalle de 20 à 30 minutes en l'absence de symptômes cliniques.

En cas de symptômes subjectifs ou transitoires, le médecin pouvait décider de donner à nouveau la même dose d'arachide ou bien d'augmenter l'intervalle de temps entre deux prises. Une évaluation médicale et la prise de constantes (tension artérielle, pouls, saturation en oxygène) étaient réalisées de manière systématique avant chaque nouvelle prise. Le TPO était interrompu lorsque l'enfant présentait au moins un symptôme objectif observé par le médecin référent. L'ensemble des symptômes était recueilli dans le dossier clinique. L'enfant recevait alors un traitement médicamenteux adapté à la nature des symptômes.

B. Sévérité de la réaction et dose cumulée réactogène (DCR)

1) Sévérité de la réaction lors du TPO

La gravité de la réaction allergique présentée par l'enfant au cours du TPO était évaluée selon le score FASS (Food Allergy Severity Score) (Annexe 1). Ce score peut s'exprimer de manière quantitative allant de 1 à 5 (score FASS-5) ou de manière qualitative (score FASS-3). Une réaction légère correspond à un score de 1, une réaction modérée correspond à un score de 2 ou 3 et une réaction sévère correspond à un score de 4 ou 5. Nous avons utilisé le score FASS-3 pour différencier un groupe ayant eu des réactions légères et modérées et un groupe ayant eu des réactions sévères.

2) Dose cumulée réactogène

La DCR correspond à la dose totale d'arachide ingérée et entraînant une réaction allergique, motivant ainsi l'arrêt du TPO. La DCR est exprimée en mg de protéine d'arachide. Nous avons réparti les patients en deux groupes : DCR faible (soit une DCR \leq 100 mg de protéine d'arachide) et DCR élevée (soit une DCR $>$ 100 mg de protéine d'arachide).

V) Le Test d'Activation des Basophiles (TAB)

A. Principe du TAB

Les TAB de notre étude ont tous été réalisés au laboratoire d'Immunologie du CHU de Lille avec le kit Flow CAST® (Bühlmann, Suisse) permettant une analyse standardisée. Le TAB est réalisé sur sang total prélevé sur tube EDTA (4 mL) par ponction veineuse périphérique avant le TPO. Les tubes sont acheminés au laboratoire immédiatement après le prélèvement, à température ambiante et sont analysés dans la demi-journée.

Le TAB est réalisé par cytométrie en flux (CMF) sur sang total. L'objectif de ce test est de détecter le nombre de basophiles activés, c'est-à-dire le nombre de basophiles qui ont dégranulé lorsque ceux-ci se trouvent dans différentes conditions. Pour rappel, la CMF est une méthode d'analyse qui permet de caractériser et de compter, à grande vitesse, des cellules en suspension dans un flux liquidien. Dans le cas du TAB, les basophiles sont détectés par l'intermédiaire de marqueurs de surface à l'aide d'anticorps couplés à un fluorochrome qui va émettre un signal de fluorescence détecté par le cytomètre et permettant ainsi le comptage des cellules. Tous les basophiles expriment à leur surface le marqueur CCR3 et le marqueur CD203c à un faible niveau d'expression. Les basophiles activés eux expriment à leur surface, en plus du marqueur CCR3, le marqueur CD63 et/ou le marqueur CD203c à un plus haut niveau d'expression, témoins de la dégranulation.

Le TAB permet donc de reproduire *in vitro* ce qui se passe au niveau cellulaire *in vivo* lorsque le patient entre en contact avec un allergène (Figure 1) (18).

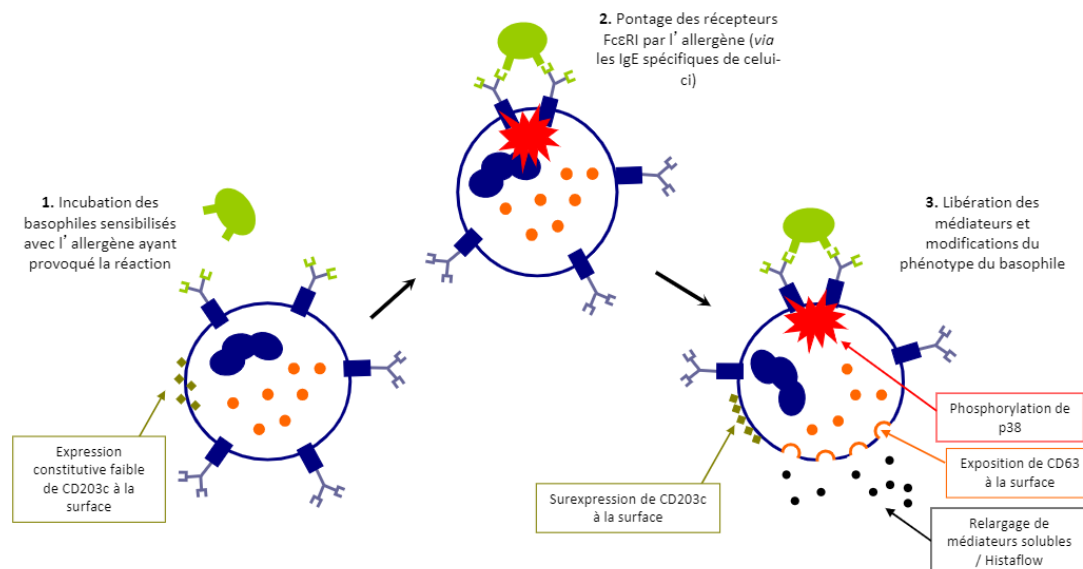


Figure 1. Mécanisme d'activation des basophiles par les allergènes et modification des marqueurs membranaires après activation

B. Réalisation du TAB

1) Produits utilisés

Le kit utilisé au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille est le kit Flow CAST® (Bühlmann, Suisse) contenant :

- 1 flacon de tampon de stimulation (contenant du calcium, de l'héparine et de l'IL-3)
- 1 flacon de contrôle de stimulation (Ac anti-FcεRI)
- 1 flacon de contrôle de stimulation (fMLP)
- 1 flacon de réactif de coloration contenant un mélange d'anticorps anti-CD63 marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (anti-CD63-FITC) et d'anticorps anti-CCR3 marqués à la phycoérythrine (anti-CCR3-PE).
- 1 flacon de réactif de lyse
- 1 flacon de tampon de lavage

La réalisation du TAB nécessite également 1 flacon d'allergène arachide et 1 flacon d'allergène rArah2, à reconstituer.

Le laboratoire d'immunologie du CHU de Lille utilise, en plus de ce kit, un anticorps supplémentaire : il s'agit d'anticorps anti-CD203c couplé au fluorochrome Pc7 (Beckman Coulter, Etats-Unis).

2) Les différentes conditions d'incubation

On réalise 13 conditions différentes d'incubation qui servent à valider le test et à l'interpréter (Annexe 2).

- Milieu n°1 = Témoin négatif

Le témoin négatif est réalisé afin de s'assurer de l'absence de stimulation spontanée des basophiles. Le milieu est constitué uniquement de solution de tampon de stimulation.

- Milieu n°2 = 1^{er} témoin positif (stimulus IgE-like)

Ce premier témoin positif est réalisé afin de s'assurer de la capacité des basophiles du patient à dégranuler. Cette stimulation de la dégranulation met en jeu les médiateurs de la voie IgE-médiée. Le sang du patient est incubé avec du tampon de stimulation et un contrôle de stimulation contenant des anticorps monoclonaux anti-FcεRI (Figure 2).

Les récepteurs FcεRI sont des récepteurs de haute affinité des IgE. Ils se trouvent à la surface de la membrane cellulaire des basophiles et des mastocytes.

Contrôle de stimulation par Ac anti-FcεRI

➔ utilisation de la voie de dégranulation IgE dépendante

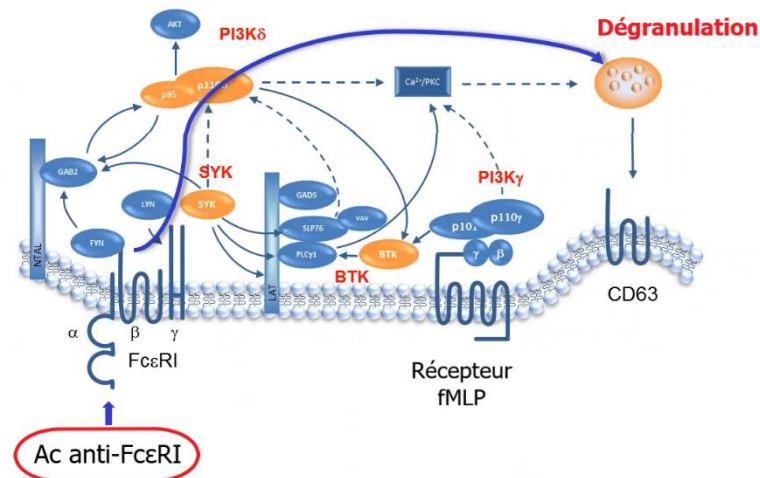


Figure 2. Activation du basophile par l'anticorps anti-FcεRI

In vivo, chez un patient allergique, le fragment Fc des IgE vient se fixer sur le récepteur FcεRI. Lorsque l'allergène vient se fixer sur le fragment Fab des IgE cela va entraîner un pontage des récepteurs FcεRI à l'origine de l'activation et de la dégranulation du basophile. Le contrôle de stimulation contenant des anticorps anti-FcεRI vient déclencher, *in vitro*, la réaction de pontage des récepteurs FcεRI venant mimer le complexe IgE-allergène.

- Milieu n°3 = 2^{ème} témoin positif (stimulus non IgE-like)

Ce deuxième contrôle positif est réalisé afin de s'assurer de la viabilité des basophiles du patient. Cette stimulation de la dégranulation ne met pas en jeu les mêmes médiateurs que ceux de la voie IgE-médiée. Le sang du patient est incubé avec du tampon de stimulation et un contrôle de stimulation contenant du formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) (Figure 3).

Le fMLP est un tripeptide bactérien qui active les basophiles par l'intermédiaire des récepteurs fMLP couplés à la protéine γ, entraînant la dégranulation du basophile.

Contrôle de stimulation par fMLP

➡ utilisation de la voie de dégranulation non IgE dépendante

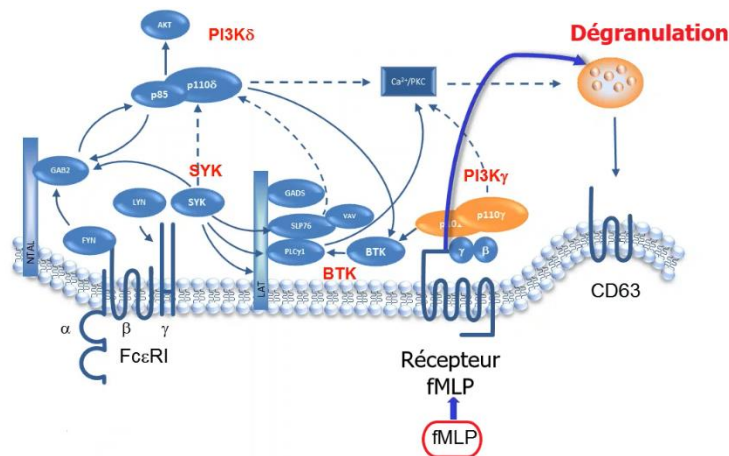


Figure 3. Activation du basophile par l'anticorps le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP).

- Milieu n°4 à milieu n°8 = incubation avec l'extrait d'arachide

Le sang du patient est incubé avec un tampon de stimulation et une solution allergénique d'extrait d'arachide. La solution allergénique est utilisée à cinq concentrations différentes : pure, diluée au 1/5^{ème}, au 1/10^{ème}, au 1/100^{ème} et au 1/1000^{ème} (Tableau II).

Tableau II. Concentration en extrait d'arachide des 5 milieux réalisés

	Dilution	Concentration initiale après reconstitution et dilution	Concentration dans le milieu réactionnel
Milieu n°4	Pure	100 ng/mL	22,2 ng/mL
Milieu n°5	1/5 ^{ème}	20 ng/mL	4,44 ng/mL
Milieu n°6	1/10 ^{ème}	10 ng/mL	2,22 ng/mL
Milieu n°7	1/100 ^{ème}	1 ng/mL	2,22.10 ⁻¹ ng/mL
Milieu n°8	1/1000 ^{ème}	0,1 ng/mL	2,22.10 ⁻² ng/mL

- **Milieu n°9 à milieu n°13 = incubation avec l'extrait rArah2**

Le sang du patient est incubé avec un tampon de stimulation et une solution allergénique du recombinant rArah2. La solution allergénique est utilisée à cinq concentrations différentes : pure, diluée au 1/5^{ème}, au 1/10^{ème}, au 1/100^{ème} et au 1/1000^{ème} (Tableau III).

Tableau III. Concentration en extrait de rArah2 des 5 milieux réalisés

	Dilution	Concentration initiale après reconstitution et dilution	Concentration dans le milieu réactionnel
Milieu n°9	Pure	20 ng/mL	4,4 ng/mL
Milieu n°10	1/5 ^{ème}	4 ng/mL	8,8.10 ⁻¹ ng/mL
Milieu n°11	1/10 ^{ème}	2 ng/mL	4,4.10 ⁻¹ ng/mL
Milieu n°12	1/100 ^{ème}	0,2 ng/mL	4,4.10 ⁻² ng/mL
Milieu n°13	1/1000 ^{ème}	0,02 ng/mL	4,4.10 ⁻³ ng/mL

C. Interprétation du TAB

1) Identification des basophiles dans la population leucocytaire

La première étape de l'interprétation du TAB consiste en l'identification des basophiles parmi les leucocytes grâce à l'histogramme obtenu en CMF. La population des basophiles s'identifie par sa structure et l'expression du marqueur CCR3. Il est souhaitable d'acquérir au moins 500 basophiles par condition lors de l'analyse en CMF. Un fenêtrage de la population des basophiles est réalisé permettant de poursuivre les analyses sur cette population spécifique (Figure 4).

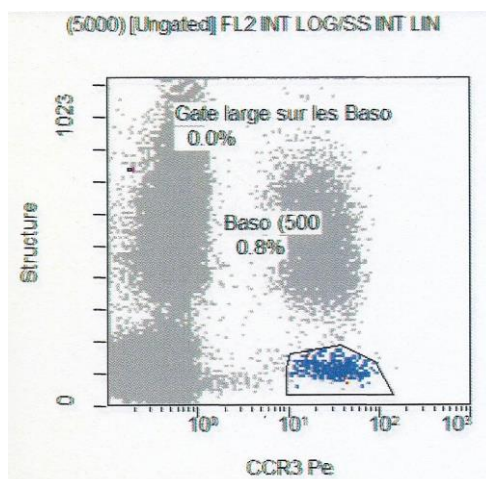


Figure 4. Identification des basophiles parmi la population leucocytaire en fonction de la structure et de l'expression du marqueur CCR3.

2) Les différents contrôles

Afin de s'assurer de la conformité du TAB et de la bonne interprétation, 3 contrôles sont réalisés : 1 contrôle négatif et 2 contrôles positifs.

a) Le contrôle négatif (seuil < 2,5%)

Le contrôle négatif permet de s'assurer de l'absence de stimulation spontanée des basophiles. Le seuil est fixé à 2,5%, c'est-à-dire qu'il ne doit pas y avoir plus de 2,5% de basophiles activés lors du contrôle négatif pour que le TAB soit interprétable (Figure 5).

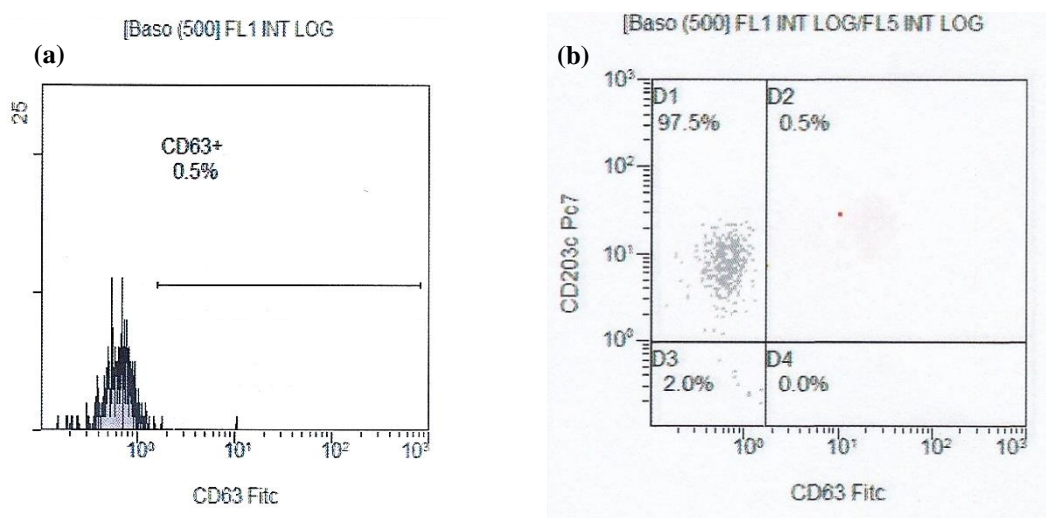


Figure 5. Contrôle négatif favorable à l'interprétation du TAB.

- (a) Histogramme mono-paramétrique (marqueur CD63) montrant une activation de 0,5% des basophiles
- (b) Histogramme bi-paramétrique (marqueur CD63 et CD203c) montrant une activation de 0,5% des basophiles

b) Les contrôles positifs

- 1^{er} contrôle positif = stimulation par Ac anti-FcεRI (seuil > 10%)

Ce premier contrôle positif permet de s'assurer de la capacité des basophiles du patient à dégranuler. Cette stimulation de la dégranulation met en jeu les médiateurs de la voie IgE médiée. Le seuil est fixé à 10%, c'est-à-dire qu'il faut qu'au moins 10% des basophiles du patient aient dégranulé lors de l'incubation dans ce milieu pour que le TAB soit interprétable (Figure 6).

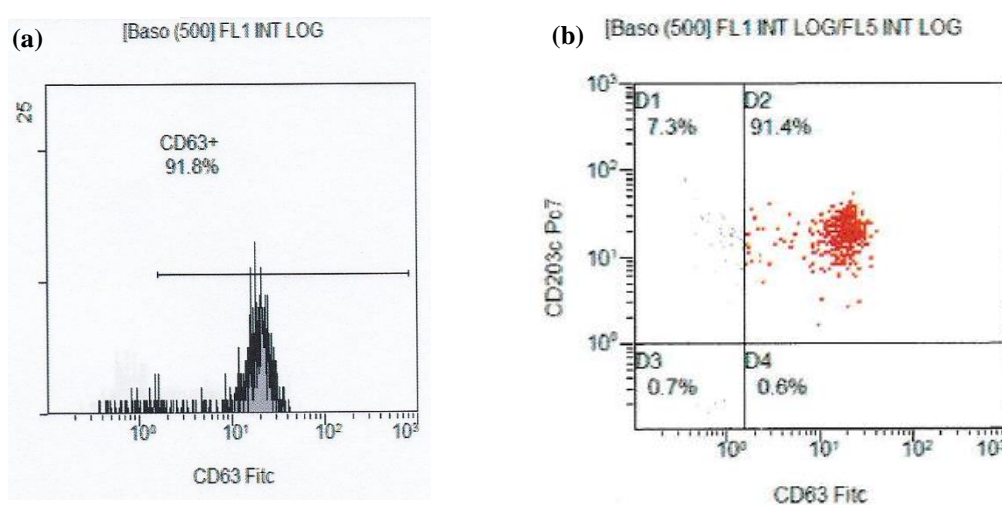


Figure 6. Contrôle positif par stimulation par anti-FcεRI favorable à l'interprétation du TAB

- (a) **Histogramme mono-paramétrique (marqueur CD63) montrant une activation de 91,8% des basophiles**
- (b) **Histogramme bi-paramétrique (marqueur CD63 et CD203c) montrant une activation de 91,4% des basophiles**

Lors du contrôle positif, on peut également s'assurer de l'augmentation de l'expression du marqueur CD203c à la surface du basophile par rapport au témoin négatif, résultat de la dégranulation (Figure 7).

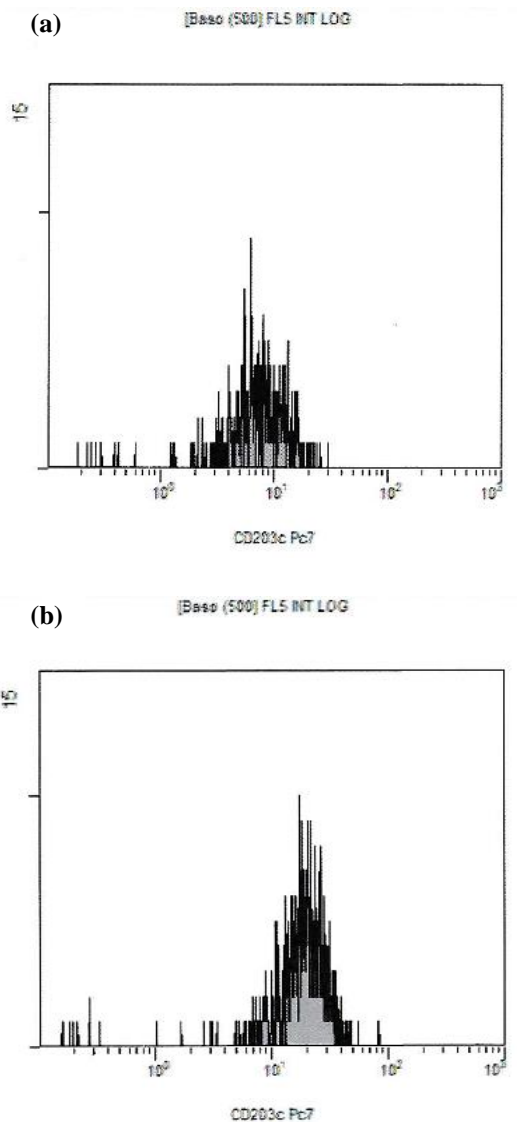


Figure 7. Histogrammes mono-paramétriques (marqueur CD203c) montrant une activation des basophiles avec surexpression du marqueur CD203c

- (a) Témoin négatif
- (b) Témoin positif (anti-FcεRI)

- 2^{ème} contrôle positif = stimulation par fMLP (seuil > 10%)

Ce deuxième contrôle positif permet de s'assurer de la viabilité des basophiles du patient. Cette stimulation de la dégranulation ne met pas en jeu les mêmes médiateurs que ceux de la voie IgE médiée. Le seuil est fixé à 10%, c'est-à-dire qu'il faut qu'au moins 10% des basophiles du patient aient dégranulé lors de l'incubation dans ce milieu pour que le TAB soit interprétable (Figure 8). Les résultats de ce témoin positif ne sont pas rendus au clinicien mais permettent au biologiste d'interpréter le TAB, notamment en s'assurant d'une bonne viabilité des basophiles, même en l'absence de réaction au contact de l'allergène.

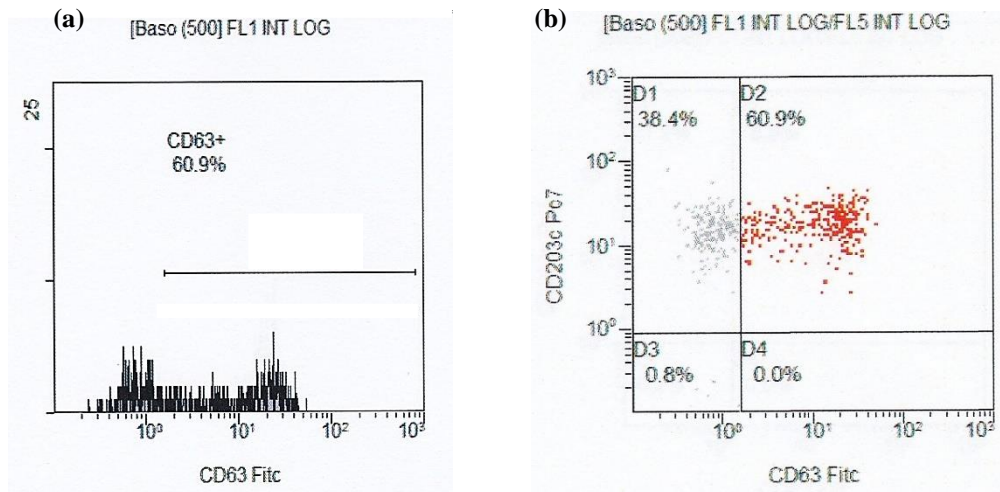


Figure 8. Contrôle positif par stimulation par fMLP favorable à l'interprétation du TAB

- (a) Histogramme mono-paramétrique (marqueur CD63) montrant une viabilité de 60,9% des basophiles
- (b) Histogramme bi-paramétrique (marqueur CD63 et CD203c) montrant une viabilité de 60,9% des basophiles

3) Les résultats du TAB

Les histogrammes obtenus en CMF pour chaque allergène et chaque dilution (Annexe 3) vont être analysés par le biologiste et pour chaque patient nous recevons des résultats quantitatifs et qualitatifs (Annexe 4).

Certains résultats sont le reflet de la réactivité des basophiles tandis que d'autres sont le reflet de la sensibilité des basophiles.

a) La réactivité

Les résultats reflétant la réactivité du basophile permettent de quantifier l'importance de la réaction des basophiles du patient en présence de l'allergène. Ils sont le reflet, *in vitro*, de l'intensité de l'activation des basophiles et donc de l'intensité du relargage d'histamine, à l'origine de la sévérité de la réaction anaphylactique clinique présentée par le patient.

Les différents résultats du TAB reflétant la réactivité des basophiles sont les suivants :

- La positivité du TAB selon les différentes concentrations et les différents allergènes : le TAB étant considéré comme positif pour un pourcentage de basophiles activés > 15% pour l'arachide et pour un pourcentage de basophiles activés > 10% pour le recombinant rArah2.
- Le pourcentage de basophiles activés pour chaque dilution de solution allergénique d'arachide et de rArah2
- Le ratio du pourcentage de basophiles activés par l'allergène sur le pourcentage de basophiles activés par l'Ac anti-FcεRI, et ce pour chaque dilution de solution allergénique d'arachide et de rArah2
- Le pourcentage maximal de basophiles activés entre les différentes dilutions d'arachide ou de rArah2, appelé CD-max (Figure 9)
- Le pourcentage de basophiles activés par la concentration minimale activatrice pour chaque solution allergénique d'arachide et de rArah2

b) La sensibilité

Les résultats reflétant la sensibilité du basophile permettent de quantifier la quantité d'allergène nécessaire pour faire réagir les basophiles du patient. Ils sont le reflet, *in vitro*, de la concentration nécessaire d'allergène pour faire dégranuler les basophiles du patient et donc de la dose nécessaire d'allergène pour déclencher une réaction allergique chez le patient.

Les différents résultats du TAB reflétant la sensibilité des basophiles sont les suivants :

- La concentration minimale d'allergène positivisant le TAB pour chaque allergène testé. La valeur exacte de la concentration minimale activatrice n'est jamais connue, il s'agit d'une approximation obtenue en fonction des différentes dilutions d'allergène testées.

- La concentration nécessaire d'allergène pour activer 50% du CD-max, appelée EC 50 (Figure 9).

Le calcul de l'EC50 a été réalisé grâce à un logiciel de statistiques en ligne, à partir de l'équation suivante :

$$Y = Min + \frac{Max - Min}{1 + \left(\frac{X}{EC50}\right)^{coefficient\ de\ Hill}}$$

Cette équation permet de modéliser une courbe de tendance logarithmique de type dose-effet, à partir des valeurs observées lors de la réalisation du TAB et ainsi de calculer la valeur de l'EC50.

- Le seuil de sensibilité allergénique des basophiles, appelé CD-sens et calculé à partir de l'EC 50 selon la formule suivante : $CD-sens = 1/EC50 \times 100$

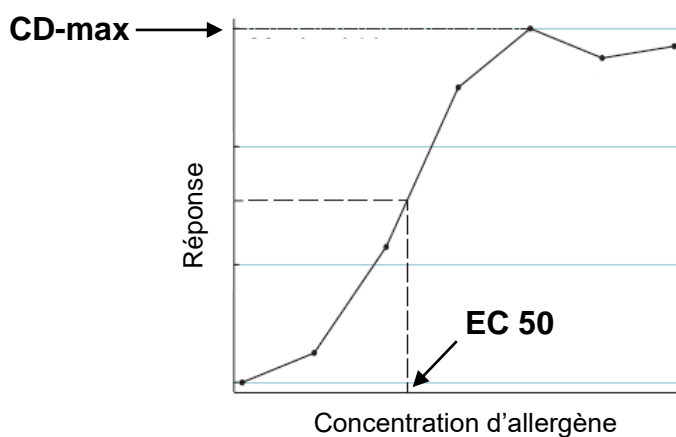


Figure 9. Courbe dose-réponse de l'activation des basophiles

VI) Test cutanés et dosage des IgE spécifiques

Les tests cutanés à l'arachide ont été réalisés le jour du TPO. Un témoin positif à l'histamine et un témoin négatif sont réalisés à partir de solutions commerciales. Le test cutané à l'arachide est réalisé à partir d'arachide native. Les tests cutanés sont réalisés à l'aide de STALLERPOINT® par du personnel formé.

Un prélèvement sanguin était réalisé par ponction veineuse périphérique sur tube sec le matin avant le début du TPO pour réaliser le dosage des IgE spécifiques arachide et IgE spécifiques des recombinants moléculaires de l'arachide rArah1, rArah2, rArah3, rArah8 et rArah9 (Immucap, Thermofisher®, Suède). Les résultats sont exprimés en kUa/L.

VII) Analyse statistique

Les variables qualitatives ont été décrites en termes de fréquence et de pourcentage. Les variables numériques ont été décrites en termes de médiane et d'intervalle interquartiles. La normalité des variables numériques a été vérifiée graphiquement et testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Les comparaisons de deux groupes de patients, définis selon la sévérité de la réaction puis définis selon la dose réactogène, ont été réalisées à l'aide d'un test du Chi-deux ou de Fisher exact (lorsque les conditions de validité du test du Chi-deux ne sont pas vérifiées) pour les variables qualitatives nominales, à l'aide d'un test de tendance de Cochran-Armitage pour les variables qualitatives ordinales, et à l'aide d'un test du U de Mann-Whitney pour les variables numériques. Pour les paramètres du TAB significatifs, ainsi que pour les IgE arachide et les IgE rArah2, la courbe ROC a été tracée et l'aire sous la courbe associée a été calculée ainsi que son intervalle de confiance à 95%. Des tests bilatéraux ont été réalisés avec un niveau de significativité de 5%. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute version 9.4) (Mme E. Drumez, Unité de Biostatistiques, CHU de Lille).

RESULTATS

I) Caractéristiques de la population

Sur les 103 patients éligibles, 74 patients ont été inclus, 27 filles (36,5%) et 47 garçons (63,5%) (Figure 10). L'âge médian était de 8 ans (6 ; 11).

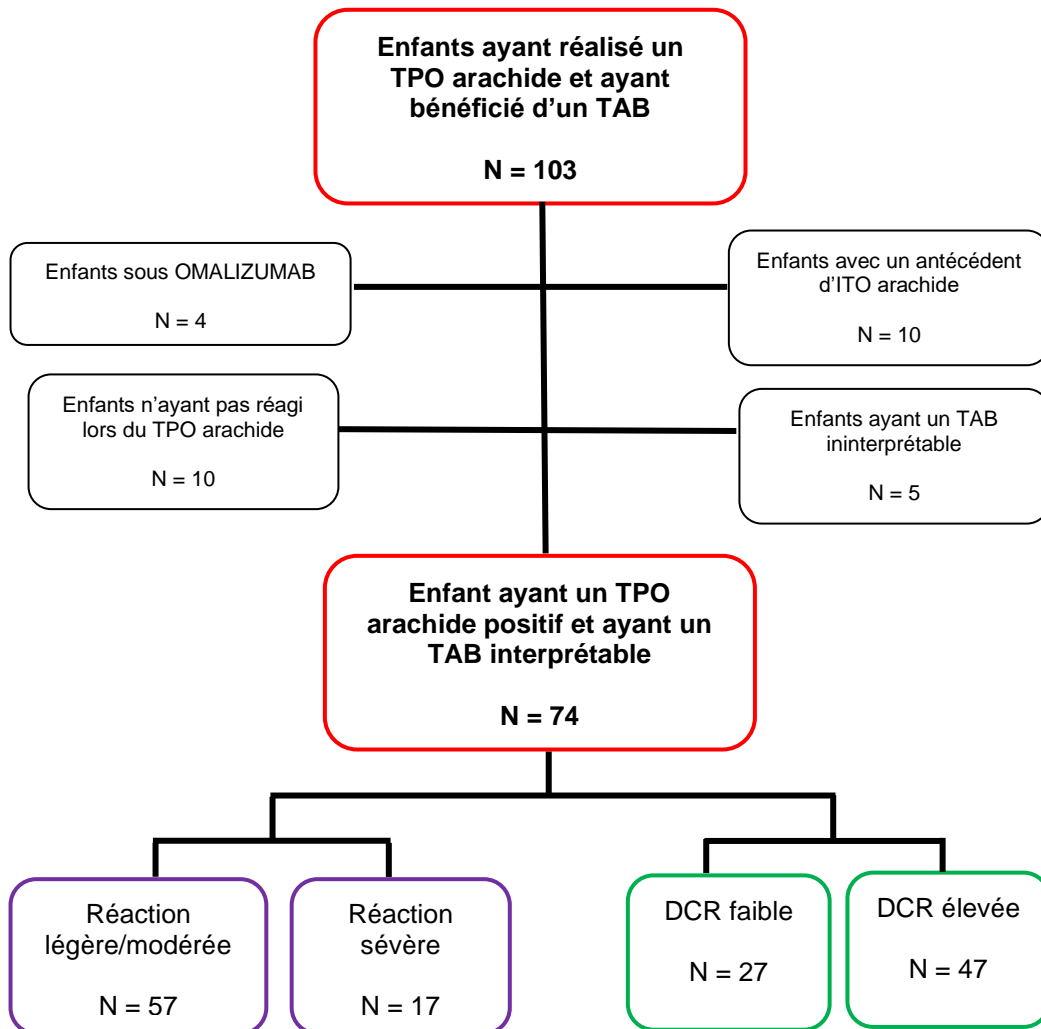


Figure 10. Diagramme de flux. TPO : Test de Provocation Oral ; TAB : Test d'Activation des Basophiles ; ITO : Induction de Tolérance Orale ; DCR : Dose Cumulée Réactogène

Parmi les 29 patients exclus, 4 étaient sous omalizumab, 10 avaient déjà réalisé une ITO à l'arachide, 10 n'ont pas eu de réaction clinique lors du TPO arachide et 5 avaient un TAB ininterprétable. Parmi les patients inclus, 51 enfants (68,9%) étaient asthmatiques, 45 enfants (60,8%) présentaient une dermatite atopique et 38 enfants (51,4%) étaient traités

pour une rhinite allergique. Soixante-dix enfants (94,6%) avaient déjà consommé accidentellement de l'arachide et parmi eux 68 enfants avaient déjà eu une réaction clinique. Vingt-deux enfants (29,7%) présentaient une autre allergie alimentaire dont 9 (12,2%) présentaient une allergie aux fruits à coque (Tableau IVa).

II) Sévérité des réactions allergiques durant le TPO

Selon le score de FASS (Annexe 1), 17 enfants (23%) ont eu une réaction sévère (Tableau V). Trente-cinq patients (47,3%) ont nécessité un traitement par Adrénaline intramusculaire, 3 patients (4,1%) ont nécessité un remplissage intra-veineux et 6 patients (8,1%) ont été hospitalisés une nuit pour surveillance. Les deux groupes de sévérité étaient comparables pour le résultat des tests cutanés à l'arachide ($p = 0,76$), pour le taux d'IgE spécifiques arachide ($p = 0,36$), ainsi que pour le taux d'IgE des recombinants majeurs (rArah1, rArah2 et rArah3). Le nombre de patients asthmatiques tend à être plus élevé dans le groupe ayant présenté une réaction sévère (Tableau IVb).

Tableau IVa. Caractéristiques de la population étudiée selon les groupes de sévérité et de dose réactogène

	Population étudiée (n = 74)	Sévérité			DCR		
		Faible/Modérée (n = 57)	Sévère (n=17)	P value	Faible DCR (≤ 100 mg) (n=27)	DCR élevée (> 100 mg) (n=47)	P value
Age (années)	8 (6 ; 11)	9 (6 ;11)	6 (5 ;8)	0,07	9 (6 ; 10)	7 (5 ; 11)	0,92
Sexe masculin nb, (%)	47 (63,5)	37 (64,9)	10 (58,8)	0,68	16 (59,3)	31 (66)	0,61
Dermatite atopique nb, (%)	45 (60,8)	34 (59,6)	11 (64,7)	0,71	17 (63)	28 (59,6)	0,77
Asthme nb, (%)	51 (68,9)	36 (63,2)	15 (88,2)	0,05	19 (70,4)	32 (68,1)	0,84
Rhinite allergique nb, (%)	38 (51,4)	29 (50,9)	9 (52,9)	0,88	12 (44,4)	26 (55,3)	0,37
Sensibilisation aux pneumallergènes nb, (%)	48 (64,9)	37 (64,9)	11 (64,7)	0,99	17 (63)	31 (66)	0,80
Autre allergie alimentaire nb, (%)	22 (29,7%)	17 (29,8)	5 (29,4)	0,97	9 (33,3)	13 (27,7)	0,61
Consommation antérieure d'arachide nb, (%)	70 (94,6)	54 (94,7)	16 (94,1)	NA	25 (92,6)	43 (91,5)	NA
Réaction allergique à l'arachide antérieure au TPO nb, (%)	68 (91,9)	54 (94,7)	14 (82,4)	NA	25 (92,6)	43 (91,5)	NA
Age de la 1^{ère} réaction (années) (n = 67)	2 (1 ; 4)	2,5 (1 ; 4)	2 (1 ; 3)	0,64	3 (1,5 ; 4)	2 (1 ; 3)	0,37
Dose réactogène estimée ≥ 1 arachide lors de la réaction en vie réelle nb, (%) (n = 66)	16 (24,2)	13 (24,5)	3 (23,1)	1	3 (13)	13 (30,2)	0,12

Les résultats sont exprimés en nombre (pourcentage) ou en médiane (Q1 ; Q3). NA : non analysable car effectifs trop petits

Tableau IVb. Caractéristiques de la population étudiée selon les groupes de sévérité et de dose réactogène

	Population étudiée (n = 74)	Sévérité			DCR		P value
		Faible/Modérée (n = 57)	Sévère (n=17)	P value	Faible DCR (≤ 100 mg) (n=27)	DCR élevée (> 100 mg) (n=47)	
Score FASS-5	2 (2 ;3)	2 (2 ; 3)	4 (4 ; 5)	*	2 (1,5 ; 3)	3 (2 ;4)	0,16
DCR (mg de protéine d'arachide)	191,5 (66,3 ; 941,3)	191,5 (66,3 ; 941,3)	191,5 (191,3 ; 941,3)	0,33	64 (16,3 ; 66,3)	441,5 (191,5 ; 1443)	*
Injection d'adrénaline lors du TPO nb, (%)	35 (47,3)	20 (35,1)	15 (88,2)	< 0,001	10 (37)	25 (53,2)	0,18
Hospitalisation au décours du TPO nb, (%)	6 (8,1)	1 (1,8)	5 (29,4)	NA	1 (3,7)	5 (10,6)	NA
TC arachide (mm)	10 (8 ; 14)	10 (8 ; 13)	10 (8 ; 15)	0,76	12 (9 ; 14)	10 (7 ; 12)	0,074
IgE arachide (kUA/L)	18,6 (1,7 ; 78,3)	15,8 (1,2 ; 78,7)	32,1 (3,8 ; 73,9)	0,36	42,8 (4,4 ; 92,7)	8,6 (0,8 ; 72,9)	0,041
IgE rArah1 (kUA/L) (n = 72)	0,9 (0 ; 23,1)	0,6 (0 ; 28,1)	3,6 (0 ; 18,6)	0,66	5,9 (0 ; 35,2)	0,6 (0 ; 14,7)	0,28
IgE rArah2 (kUA/L)	11,7 (1,3 ; 46,3)	10,1 (0,7 ; 51,2)	13,7 (2,5 ; 37,9)	0,42	30,3 (2,6 ; 74,3)	5,5 (0,5 ; 37,9)	0,022
IgE rArah3 (kUA/L) (n = 72)	0,2 (0 ; 4)	0,1 (0 ; 3,7)	0,3 (0 ; 6,6)	0,60	0,7 (0 ; 9,2)	0 (0 ; 2,8)	0,15
IgE rArah8 (kUA/L) (n = 71)	0 (0 ; 0)	0 (0 ; 0)	0 (0 ; 1,1)	0,10	0 (0 ; 0)	0 (0 ; 0)	0,54
IgE rArah9 (kUA/L) (n = 71)	0 (0 ; 0)	0 (0 ; 0)	0 (0 ; 0)	0,75	0 (0 ; 0)	0 (0 ; 0)	0,62
Nombre de recombinants majeurs de l'arachide avec IgE ≥ 0,10 kUa/L	3 (1 ; 3)	3 (1 ; 3)	2,5 (1 ; 3)	0,63	3 (1 ; 3)	2 (1 ; 3)	0,28

Les résultats sont exprimés en nombre (pourcentage) ou en médiane (Q1 ; Q3). NA : non analysable car effectifs trop petits

* Valeurs de P-value non indiquées car les caractéristiques correspondent au critère de classification de gravité ou de dose réactogène

III) Dose cumulée réactogène durant le TPO

La DCR médiane est de 191,5 mg de protéine d'arachide (66,3 ; 941,3). La dose cumulée réactogène varie entre 0,5 mg de protéine d'arachide et 3441,25 mg de protéine d'arachide. Au total, 27 patients (36,5%) ont réagi pour une dose cumulée faible (Tableau V). Ils avaient des taux plus importants d'IgE spécifiques arachide ($p = 0,041$) et d'IgE rArah2 ($p = 0,022$) que les patients ayant une DCR élevée (> 100 mg de protéine d'arachide). Le diamètre des tests cutanés tend également à être plus important dans le groupe DCR faible que dans le groupe DCR élevée ($p = 0,07$) (Tableau IVb).

Tableau V. Répartition des grades de sévérité et des doses réactogènes durant le TPO dans la population étudiée (n=74)

Score de sévérité (FASS-5)	Nombre (%) de patients	DCR de protéine d'arachide (mg)	Nombre (%) de patients
1	10 (13,5)	DCR < 1,25	3 (4)
2	28 (37,8)	$1,25 \leq \text{DCR} < 66,25$	11 (14,9)
3	19 (25,7)	$66,25 \leq \text{DCR} < 441,25$	28 (37,8)
4	12 (16,2)	$441,25 \leq \text{DCR} < 3441,25$	27 (36,5)
5	5 (6,8)	DCR $\geq 3441,25$	5 (6,8)

Résultats exprimés en nombre (pourcentage)

IV) Activation des basophiles et sévérité de la réaction allergique au TPO

A. Témoin positif

Les deux groupes de sévérité sont comparables pour la valeur du témoin positif (anti-

FcεRI) ce qui permet de s'assurer que les basophiles des patients ont la même capacité d'activation dans les deux groupes.

B. Réactivité des basophiles et sévérité de la réaction

1) Positivité du TAB

Concernant la positivité du TAB dans sa globalité, il n'y a pas de différence significative entre les groupes de sévérité. Cependant, on observe que dans le groupe de réactions sévères, 100% des patients avaient un TAB positif pour les deux allergènes testés alors que dans le groupe de réactions faibles/modérées, 87,7% des patients avaient un TAB arachide positif et 86% des patients avaient un TAB rArah2 positif.

2) CD-max

Concernant les valeurs de CD-max pour l'arachide et le rArah2, il n'y a pas de différence significative entre les groupes de sévérité. Le CD-max arachide médian est de 82,7% (33,9 ; 91,3) dans le groupe « réactions sévères » contre 71,5% (39,3 ; 95,1) dans le groupe « réactions légères/modérées » ($p=0,52$). Le CD-max rArah2 médian est de 80,7% (29,7 ; 91,3) dans le groupe « réactions sévères » contre 77,4% (40,6 ; 93,5) dans le groupe « réactions légères/modérées » ($p = 0,48$).

3) Pourcentage de basophiles activés et ratio

a) Extrait d'arachide

Il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes de sévérité.

b) Extrait de rArah2

Les patients ayant eu une réaction sévère ont un ratio basophiles activés par le rArah2/basophiles activés par l'anti-FcεRI significativement plus élevé pour la dilution au 1/5^{ème} (4 ng/mL) ($p = 0,008$) et pour la dilution au 1/1000^{ème} (2.10^{-2} ng/mL) ($p =$

0,041) (Tableau VI, Figure 11). Ces résultats ont également été retrouvés lors de l'analyse des groupes de sévérité en fonction de la nécessité ou non d'injection d'Adrénaline lors du TPO (Annexe 5).

Cette différence n'est pas significative pour les ratios de basophiles activés par le rArah2/basophiles activés par l'anti-FcεRI à la concentration pure (20 ng/mL), à la dilution 1/10^{ème} (2 ng/mL) et à la dilution 1/100^{ème} (0,2 ng/mL).

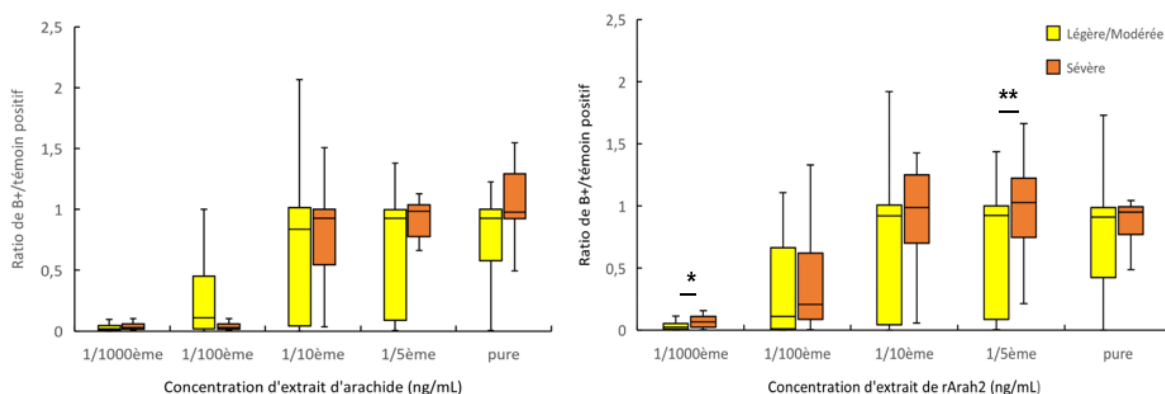


Figure 11. Ratio de B CD63+/témoin positif aux différentes concentrations d'arachide et de rArah2 en fonction des groupes de sévérité
 * P-value < 0,05 et ** P-value < 0,01

4) Pourcentage de basophiles activés par la concentration minimale activatrice

Il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes de sévérité concernant le pourcentage de basophiles activés par la concentration minimale activatrice d'arachide et de rArah2.

C. Sensibilité des basophiles et sévérité de la réaction

Il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes de sévérité sur les différents paramètres du TAB évaluant la sensibilité des basophiles.

D. Paramètre le plus performant pour évaluer la sévérité des

réactions

Le meilleur paramètre du TAB pour évaluer la sévérité des réactions allergiques est le ratio de basophiles activés par le rArah2 à la dilution 1 /5^{ème} / basophiles activés par l'anti-FcεRI, en se basant sur la valeur la plus basse de la P-value (Figure 12). Il s'agit également du paramètre le plus performant pour distinguer les groupes de sévérité en fonction du recours à l'injection d'Adrénaline durant le TPO (Annexe 5).

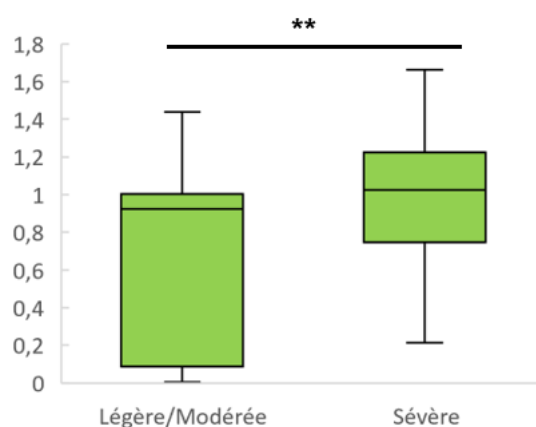


Figure 12. Comparaison des valeurs du ratio de basophiles activés à la dilution 1/5^{ème} de rArah2/ anti-FcεRI entre les groupes de sévérité

* P-value < 0,05 et **P-value < 0,01

V) Activation des basophiles et DCR lors du TPO

A. Témoin positif

Les deux groupes selon la DCR sont comparables concernant la valeur du témoin positif (anti-FcεRI) ce qui permet de s'assurer que les basophiles des patients ont la même capacité d'activation dans les deux groupes.

B. Réactivité des basophiles et DCR

1) Positivité du TAB

Il y a significativement plus de TAB positifs dans le groupe de patients ayant une faible DCR par rapport au groupe ayant une DCR élevée. (p = 0,024). On remarque

également que dans le groupe ayant une faible DCR, 100% des patients avaient un TAB arachide et rArah2 positifs (Tableau VI) alors que dans le groupe DCR élevée, 85,1% de patients avaient un TAB arachide positif et 83% avaient un TAB rArah2 positifs.

2) CD-max

Les valeurs de CD-max pour l'arachide et le rArah2 sont significativement plus élevées dans le groupe ayant une faible DCR. Le CD-max arachide médian est de 88,8% (71,5 ; 93,3) dans le groupe DCR faible contre 66,8% (23,7 ; 91,9) dans le groupe DCR élevée ($p = 0,007$). Le CD-max rArah2 médian est de 86,3% (77,4 ; 93,2) dans le groupe DCR faible contre 50,5% (19,6 ; 89,5) dans le groupe DCR élevée ($p = 0,002$).

3) Pourcentage de basophiles activés et ratio

a) Extrait d'arachide

Le pourcentage de basophiles activés par l'arachide est significativement plus élevé dans le groupe ayant une faible DCR pour la concentration pure, la dilution au 1/5^{ème}, la dilution au 1/10^{ème} et la dilution au 1/100^{ème} ($p = 0,017$, $p = 0,008$, $p = 0,009$ et $p = 0,007$). Dans le groupe ayant une DCR faible, seuls les ratios aux dilutions 1/10^{ème} et 1/100^{ème} sont significativement plus élevés ($p = 0,043$ et $p = 0,032$) (Figure 13A).

b) Extrait de rArah2

Le pourcentage de basophiles activés par le rArah2 est significativement plus élevé dans le groupe ayant une faible DCR pour la concentration pure, la dilution au 1/5^{ème}, la dilution au 1/10^{ème} et la dilution au 1/100^{ème} ($p = 0,002$, $p < 0,001$, $p = 0,002$ et $p = 0,007$).

Seul le ratio à la dilution 1/100^{ème} est significativement plus élevé dans le groupe ayant une DCR faible ($p = 0,016$) (Figure 13A).

4) Pourcentage de basophiles activés par la concentration

minimale activatrice

Le pourcentage de basophiles activés pour la concentration minimale positivant le TAB pour l'arachide et le rArah2 est significativement plus élevé dans le groupe ayant une faible DCR ($p = 0,032$ et $p = 0,044$).

C. Sensibilité des basophiles et DCR

1) Concentration minimale activatrice

La concentration minimale activatrice pour l'arachide et le rArah2 est significativement plus faible dans le groupe DCR faible ($p = 0,042$ et $p = 0,026$) (Figure 13B).

Cela se remarque également sur le graphique (Figure 13A) où la réactivité des basophiles lors du TAB pour les patients ayant une faible DCR est décalée sur la gauche par rapport à ceux ayant une DCR élevée. Cela signifie donc que lors du TAB, les basophiles des patients ayant une faible DCR ont réagi pour des concentrations plus faibles d'arachide et de rArah2.

Un TAB positif pour les deux concentrations les plus faibles d'arachide et de rArah2 est significativement associé à une DCR ≤ 100 mg lors du TPO ($p = 0,005$ et $p = 0,004$).

A contrario, un TAB positif uniquement pour les concentrations les plus élevées d'arachide et de rArah2 est significativement associé à une DCR > 100 mg lors du TPO ($p = 0,005$ et $p = 0,004$).

2) CD-sens et EC50

Les patients ayant une faible DCR lors du TPO ont une sensibilité des basophiles significativement plus élevée en présence de rArah2, exprimée par un CD-sens plus élevé ($p = 0,013$) et par une EC50 plus faible ($p = 0,013$) (Tableau VII).

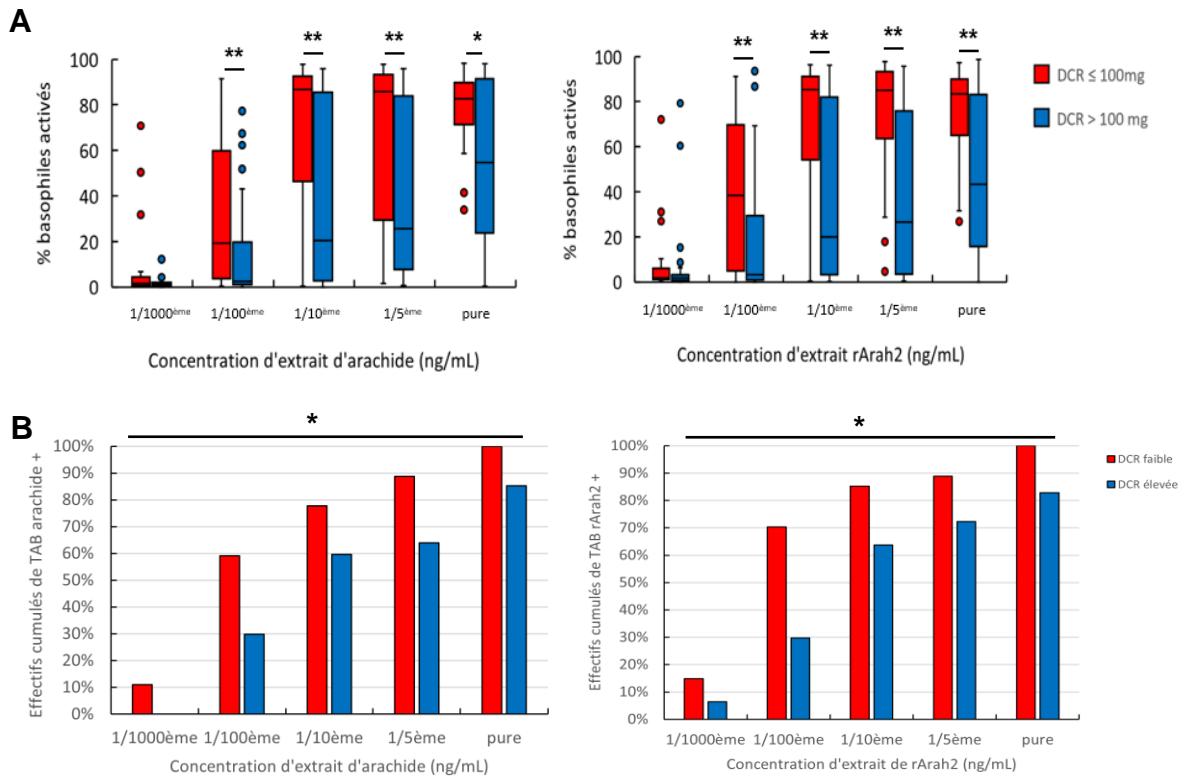


Figure 13.

- (A) Réactivité des basophiles aux différentes concentrations d'arachide et de rArah2 en fonction des groupes de dose réactogène
- (B) Comparaison des effectifs cumulés des concentrations minimales d'arachide et de rArah2 positivant le TAB entre les groupes de dose réactogène
- * P-value < 0,05 et ** P-value < 0,01

D. Paramètres les plus performants pour évaluer le seuil

réactogène

Le meilleur paramètre du TAB pour évaluer le seuil réactogène, parmi ceux évaluant la sensibilité des basophiles, est le CD-sens pour le rArah2, en se basant sur la valeur la plus basse de la P-value (Figure 14).

Le meilleur paramètre du TAB pour évaluer le seuil réactogène, parmi ceux évaluant la réactivité des basophiles, est le CD-max en présence d'arachide et de rArah2.

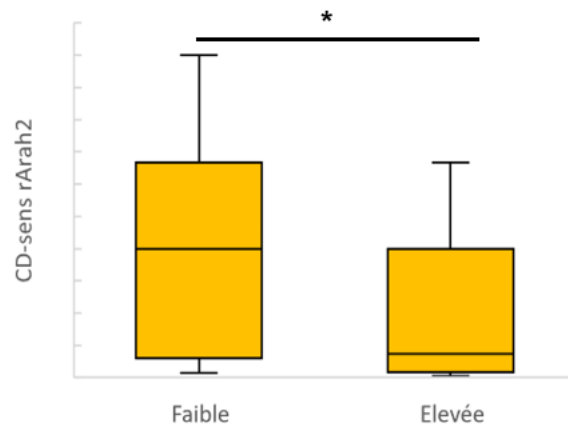


Figure 14. Comparaison des valeurs de CD-sens rArah2 entre les groupes de dose réactogène
*** P-value < 0,05 et **P-value < 0,01**

Tableau VI. Paramètres du TAB évaluant la réactivité des basophiles entre les groupes de sévérité et les groupes de dose réactogène

	Population étudiée (n=74)	Sévérité			DCR		
		Faible/Modérée (n = 57)	Sévère (n = 17)	P value	Faible DCR (≤ 100 mg) (n=27)	DCR élevée (> 100 mg) (n=47)	P value
Témoin positif (% de basophiles activés)	84,2 (59,5 ; 93,2)	84,9 (71,8 ; 91,7)	74,4 (22,7 ; 94,7)	0,54	85,5 (74,4 ; 93,7)	81,7 (52 ; 91,8)	0,18
TAB arachide positif (nb, %)	67 (90,5)	50 (87,7)	17 (100)	NA	27 (100)	40 (85,1)	NA
%B CD63+ Concentration pure d'arachide (% de basophiles activés)	76,1 (33,9 ; 89,8)	77,7 (33,9 ; 86,9)	71,5 (35,2 ; 92,8)	0,46	82,7 (71,5 ; 89,8)	54,7 (23,7 ; 91,4)	0,017
Ratio pur/témoin positif arachide	1 (0,7 ; 1)	0,9 (0,6 ; 1)	1 (1 ; 1,3)	0,058	1 (0,9 ; 1)	0,9 (0,5 ; 1)	0,099
% B CD63+ Dilution au 1/5^{ème} d'arachide (n = 64) (% de basophiles activés)	63,8 (12,3 ; 89)	64,9 (8 ; 88,7)	51,4 (20,4 ; 94)	0,39	85,8 (29,3 ; 93,3)	25,6 (8 ; 83)	0,008
Ratio 1/5^{ème}/témoin positif arachide (n = 64)	1 (0,2 ; 1)	0,9 (0,1 ; 1)	1 (0,8 ; 1)	0,12	1 (0,4 ; 1)	0,8 (0,1 ; 1)	0,17
%B CD63+ Dilution au 1/10^{ème} d'arachide (% basophiles activés)	53 (4,1 ; 90,8)	64 (3,5 ; 88,8)	46,4 (15,8 ; 93,3)	0,40	86,6 (46,4 ; 92,5)	20,5 (2,7 ; 85,5)	0,009
Ratio 1/10^{ème}/témoin positif arachide	0,9 (0,1 ; 1)	0,8 (0,1 ; 1)	0,9 (0,6 ; 1)	0,31	1 (0,6 ; 1)	0,6 (0 ; 1)	0,043
%B CD63+ Dilution au 1/100^{ème} d'arachide (% de basophiles activés)	4,7 (1,4 ; 32,8)	4,9 (1,4 ; 29,7)	3,8 (2,1 ; 32,8)	0,96	19,2 (3,8 ; 59,9)	2,5 (1,2 ; 1,8)	0,007
Ratio 1/100^{ème}/témoin positif arachide	0,1 (0 ; 0,4)	0,1 (0 ; 0,4)	0,3 (0,1 ; 0,4)	0,51	0,2 (0,1 ; 0,7)	0,1 (0 ; 0,4)	0,032
%B CD63+ Dilution au 1/1000^{ème} d'arachide	1,4 (0,7 ; 2,9)	1,4 (0,6 ; 3)	1,5 (1 ; 2,4)	0,69	1,5 (0,7 ; 4,3)	1,3 (0,6 ; 2)	0,11
Ratio 1/1000^{ème}/témoin positif arachide	0 (0 ; 0,1)	0 (0 ; 0)	0 (0 ; 0,1)	0,11	0 (0 ; 0,1)	0 (0 ; 0,1)	0,59
CD-max arachide (% de basophiles activés)	82,4 (33,9 ; 93)	82,7 (33,9 ; 91,3)	71,5 (39,3 ; 95,1)	0,52	88,8 (71,5 ; 93,3)	66,8 (23,7 ; 91,9)	0,007
%B CD63+ Concentration minimale activatrice d'arachide (% de basophiles activés)	32,3 (19,4 ; 59,9)	31,8 (19,2 ; 59,9)	32,8 (19,8 ; 55,1)	0,73	46,4 (24,4 ; 67,5)	28,6 (18 ; 51,8)	0,032

Les résultats sont exprimés en nombre (pourcentage) ou en médiane (Q1 ; Q3). NA : non analysable car effectifs trop petits

Tableau VI (suite). Paramètres du TAB évaluant la réactivité des basophiles entre les groupes de sévérité et les groupes de dose réactogène

	Population étudiée (n=74)	Sévérité			DCR		
		Faible/Modérée (n = 57)	Sévère (n = 17)	P value	Faible DCR (≤ 100 mg) (n=27)	DCR élevée (> 100 mg) (n=47)	P value
TAB rArah2 positif (nb, %)	66 (89,2)	49 (86)	17 (100)	0,19	27 (100)	39 (83)	0,024
%B CD63+ Concentration pure de rArah2 (% de basophiles activés)	68 (29,7 ; 87,6)	67,4 (29,7 ; 88,5)	68,5 (30,7 ; 90,6)	0,62	83,4 (65 ; 89,9)	43,3 (15,8 ; 83,2)	0,002
Ratio pur/témoin positif rArah2	0,9 (0,5 ; 1)	0,9 (0,4 ; 1)	1 (0,8 ; 1)	0,088	1 (0,8 ; 1)	0,9 (0,4 ; 1)	0,056
%B CD63+ Dilution au 1/5^{ème} rArah2 (n = 63) (% de basophiles activés)	46,7 (11,3 ; 89,5)	64,8 (5,5 ; 89,5)	39,6 (24,3 ; 84,6)	0,53	85,1 (69,1 ; 93,2)	26,5 (4,5 ; 74,4)	< 0,001
Ratio 1/5^{ème}/témoin positif rArah2 (n = 63)	1 (0,1 ; 1)	0,9 (0,1 ; 1)	1 (0,9 ; 1,2)	0,008	1 (0,9 ; 1)	0,8 (0,1 ; 1)	0,32
%B CD63+ Dilution au 1/10^{ème} rArah2 (% de basophiles activés)	52,4 (4,7 ; 88)	66,3 (3,2 ; 88)	42 (13,4 ; 85,6)	0,60	85,2 (54,2 ; 91,3)	19,9 (3,2 ; 82)	0,002
Ratio 1/10^{ème}/témoin positif rArah2	0,9 (0,1 ; 1)	0,9 (0,1 ; 1)	1 (0,7 ; 1,2)	0,06	1 (0,6 ; 1)	0,7 (0 ; 1)	0,12
%B CD63+ Dilution au 1/100^{ème} de rArah2 (% de basophiles activés)	5 (1,2 ; 60,1)	5,1 (0,8 ; 60,1)	4,9 (3,4 ; 54,6)	0,53	38,4 (4,8 ; 69,8)	3,1 (0,8 ; 29,3)	0,007
Ratio 1/100^{ème}/témoin positif rArah2	0,2 (0 ; 0,7)	0,1 (0 ; 0,7)	0,2 (0,1 ; 0,6)	0,41	0,5 (0,1 ; 0,9)	0,1 (0 ; 0,5)	0,016
%B CD63+ Dilution au 1/1000^{ème} de rArah2 (% de basophiles activés)	1,9 (0,8 ; 4,2)	1,7 (0,6 ; 4,3)	2,2 (1,4 ; 2,9)	0,47	1,9 (1,2 ; 6)	1,8 (0,6 ; 3,1)	0,28
Ratio 1/1000^{ème}/Témoin positif rArah2	0 (0 ; 0,1)	0 (0 ; 0,1)	0,1 (0 ; 0,1)	0,041	0 (0 ; 0,1)	0 (0 ; 0,1)	0,96
CD-max rArah2 (% de basophiles activés)	79,1 (31,5 ; 91,8)	80,7 (29,7 ; 91,3)	77,4 (40,6 ; 93,5)	0,48	86,3 (77,4 ; 93,2)	50,5 (19,6 ; 89,5)	0,002
%B CD63+ concentration minimale activatrice de rArah2 (% de basophiles activés)	28,3 (15,4 ; 59,6)	29,3 (16,5 ; 59,6)	27,2 (13,4 ; 54,6)	0,88	32,2 (17,8 ; 65,6)	21,5 (11,9 ; 53,9)	0,044

Les résultats sont exprimés en nombre (pourcentage) ou en médiane (Q1 ; Q3). NA : non analysable car effectifs trop petits

Tableau VII. Paramètres du TAB évaluant la sensibilité des basophiles entre les groupes de sévérité et les groupes de dose réactogène

	Population étudiée (n=74)	Sévérité			DCR		
		Faible/Modérée (n = 57)	Sévère (n = 17)	P value	Faible DCR (≤ 100 mg) (n=27)	DCR élevée (> 100 mg) (n=47)	P value
Nb de TAB arachide se positivant :							
- au 1/1000 ^{ème} (0,1 ng/mL)	3 (4,1)	3 (5,3)	0 (0)		3 (11,1)	0 (0)	
- au 1/100 ^{ème} (1 ng/mL)	27 (36,5)	21 (36,8)	6 (35,3)		13 (48,1)	14 (29,8)	
- au 1/10 ^{ème} (10 ng/mL)	19 (25,7)	11 (19,3)	8 (47,1)	0,30	5 (18,5)	14 (29,8)	0,005
- au 1/5 ^{ème} (20 ng/mL)	5 (6,8)	4 (7)	1 (5,9)		3 (11,1)	2 (4,3)	
- au pur (100 ng/mL)	13 (17,6)	11 (19,3)	2 (11,8)		3 (11,1)	10 (21,3)	
Concentration minimale activatrice d'arachide (en ng/mL)	10 (1 ; 20)	10 (1 ; 20)	10 (1 ; 10)	0,79	1 (1 ; 10)	10 (1 ; 60)	0,042
EC 50 arachide (en ng/mL)	0,6 (0,2 ; 4,2)	0,5 (0,2 ; 4,4)	1,6 (0,3 ; 2,1)	0,74	0,3 (0,2 ; 1,7)	1,6 (0,2 ; 4,2)	0,19
CD-sens arachide	154,5 (23,8 ; 467,9)	207,9 (22,5 ; 474,9)	62,1 (47,2 ; 395,3)	0,75	297,2 (57,8 ; 538,5)	62,1 (23,6 ; 406,8)	0,19
Nb de TAB rArah2 se positivant :							
- au 1/1000 ^{ème} (0,02 ng/mL)	7 (9,5)	4 (7)	3 (17,6)		4 (14,8)	3 (6,4)	
- au 1/100 ^{ème} (0,2 ng/mL)	26 (35,1)	24 (42,1)	2 (11,8)		15 (55,6)	11 (23,4)	
- au 1/10 ^{ème} (2 ng/mL)	20 (27)	9 (15,8)	11 (64,7)	0,13	4 (14,8)	16 (34)	0,004
- au 1/5 ^{ème} (4 ng/mL)	5 (6,8)	4 (7)	1 (5,9)		1 (3,7)	4 (8,5)	
- au pur (20 ng/mL)	8 (10,8)	8 (14)	0 (0)		3 (11,1)	5 (10,6)	
Concentration minimale activatrice de rArah2 (en ng/mL)	1,1 (0,2 ; 2)	0,2 (0,2 ; 2)	2 (0,2 ; 2)	0,79	0,2 (0,2 ; 2)	2 (0,2 ; 2)	0,026
EC 50 rArah2 (en ng/mL)	0,1 (0 ; 0,9)	0,1 (0 ; 0,9)	0,1 (0 ; 0,3)	0,61	0,1 (0 ; 0,3)	0,3 (0,1 ; 1,2)	0,013
CD-sens rArah2	1056 (115,5 ; 2500)	833,3 (115,5 ; 2500)	1250 (370,4 ; 2500)	0,61	2000 (303 ; 3333)	370,4 (82 ; 2000)	0,013

Les résultats sont exprimés en nombre (pourcentage) ou en médiane (Q1 ; Q3). NA : non analysable car effectifs trop petits

VI) Performances du TAB

A. Sévérité de la réaction

Nous avons établi une courbe ROC (Figure 15) afin d'étudier les performances du ratio rArah2 à la dilution 1/5^{ème} pour prédire la sévérité de la réaction allergique à l'arachide lors du TPO. L'aire sous la courbe est égale à 0,73 [IC 95% 0.58-0.89].

Le seuil optimal du ratio rArah2 à la dilution 1/5^{ème} est 1,04 (Tableau VIII), avec une sensibilité de 0,5 et une spécificité de 0,9.

Le ratio rArah2 à la dilution 1/5^{ème} est fortement associé à la sévérité de la réaction allergique survenant lors du TPO arachide (OR = 6,9 [IC95% 1,32-36,12]).

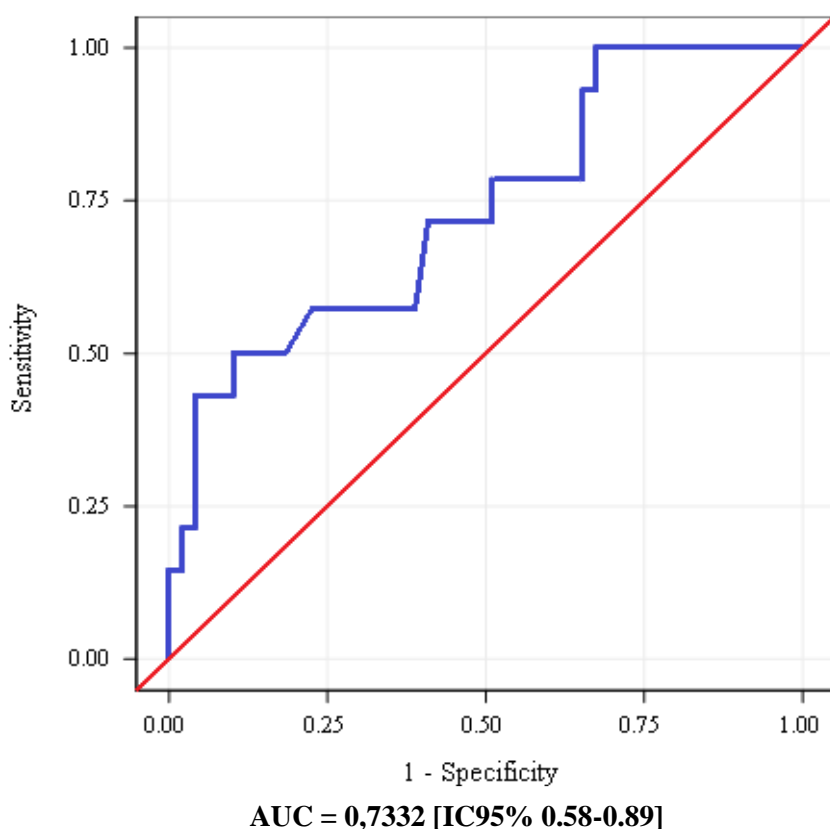


Figure 15. Courbe ROC des performances du TAB rArah2 (ratio à la dilution 1/5^{ème}) pour prédire la sévérité de la réaction allergique à l'arachide lors du TPO.

Tableau VIII. Performances du ratio rArah2 à la dilution 1/5^{ème} au seuil optimal de 1,04 pour prédire la survenue d'une réaction allergique sévère à l'arachide au cours du TPO

Seuil du ratio rArah2 à la dilution 1/5 ^{ème}	Sensibilité	Spécificité	Valeur Prédictive Positive	Valeur Prédictive Négative
1,04	0,5 [IC95% 0,23-0,77]	0,90 [IC95% 0,78-0,97]	0,58 [IC95% 0,28-0,85]	0,86 [IC95% 0,74-0,94]

B. Seuil réactogène (DCR)

Nous avons établi une courbe ROC (Figure 16) afin d'étudier les performances du CD-sens rArah2 pour prédire le seuil réactogène lors du TPO à l'arachide. L'aire sous la courbe est égale à 0,67 [IC95% 0,55-0,80]. Il n'a pas été possible de déterminer une valeur seuil.

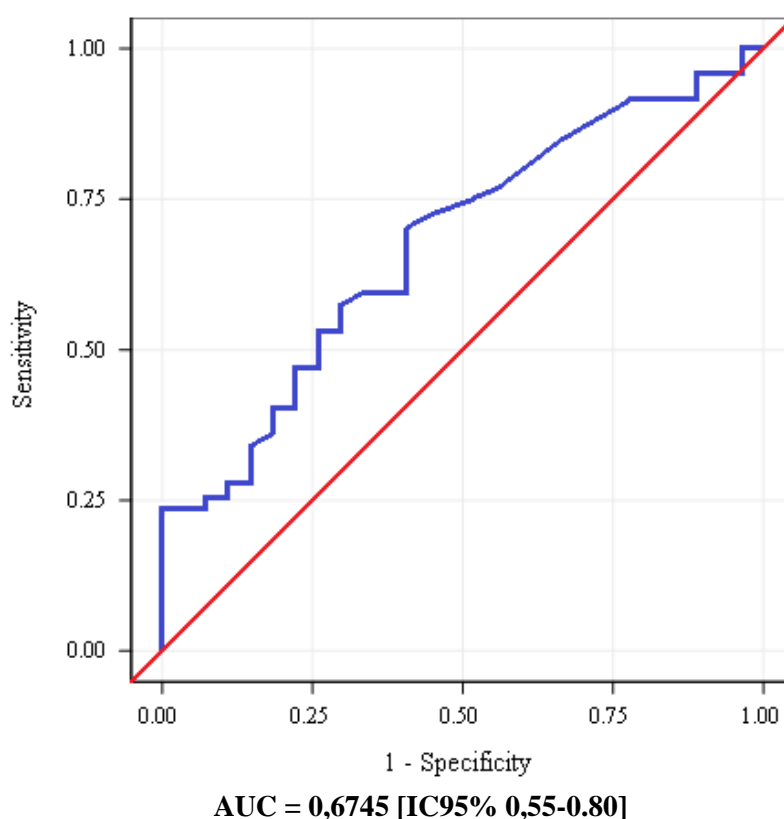


Figure 16. Courbe ROC des performances du TAB rArah2 (CD-sens) pour prédire le seuil réactogène lors du TPO arachide.

VII) Etude des autres marqueurs allergologiques

A. Concernant l'étude de la sévérité de la réaction

Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les deux groupes de sévérité concernant les autres marqueurs allergologiques, c'est-à-dire, le test cutané à l'extrait natif d'arachide et les taux d'IgE arachide, rArah1, rArah2, rArah3, rArah8, rArah9 (Tableau IV). On ne retrouve pas non plus de différence significative concernant le nombre de recombinants majeurs de l'arachide positifs.

B. Concernant l'étude du seuil réactogène

Une différence significative a été retrouvée entre les deux groupes de seuil réactogène pour les taux d'IgE arachide et d'IgE rArah2 (Tableau IV). Nous avons établi des courbes ROC (Figure 17) afin d'étudier les performances de ces paramètres pour prédire le seuil réactogène lors du TPO. L'aire sous la courbe du paramètre IgE arachide est égale à 0,64 [IC95% 0,52-0,77] et l'aire sous la courbe du paramètre IgE rArah2 est égale à 0,66 [IC95% 0,54-0,79]. Il n'a pas été possible de déterminer de valeur seuil pour ces deux paramètres.

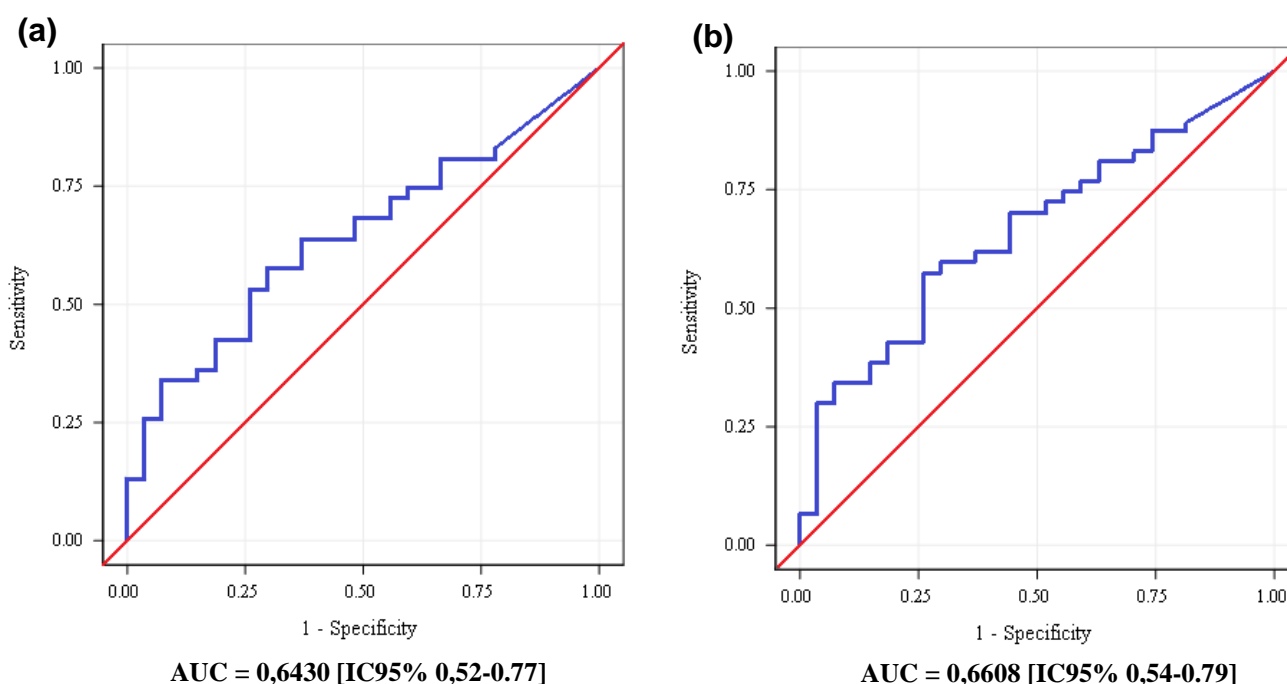


Figure 17. Courbes ROC des performances des IgE arachide (a) et des IgE rArah2 (b) pour prédire le seuil réactogène lors du TPO arachide.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons évalué le TAB comme test prédictif de la sévérité de la réaction allergique à l'arachide et du seuil réactogène lors du TPO. Concernant la sévérité, le résultat le plus significatif est le ratio entre le pourcentage de basophiles activés par le rArah2 à la dilution 1/5^{ème} sur le pourcentage de basophiles activés par le témoin positif (anti-FcεRI). Néanmoins, malgré une association très forte entre ce paramètre et le risque de réaction allergique sévère lors du TPO (OR = 6,9 [IC95% 1,32-36,12]), la valeur de l'aire sous la courbe (AUC = 0,7332 [IC95% 0,58-0,89]) montre que ce paramètre reste insuffisamment performant, ne permettant pas de définir une valeur seuil pour prédire avec précision le risque de réaction sévère sans recourir au TPO. Concernant l'étude du seuil réactogène, notre étude a mis en évidence une différence significative du CD-sens rArah2 selon le niveau de la dose réactogène, faible ou non. Cependant l'étude de la courbe ROC (AUC = 0,6745 [IC95% 0,55-0,80]) montre que ce test n'est pas non plus assez performant pour distinguer les deux groupes. Ce paramètre du TAB ne paraît donc pas suffisamment performant pour détecter les personnes à risque de réaction allergique à l'arachide pour de faibles doses. Par conséquent, si nous avons émis l'hypothèse que le seuil réactogène serait lié à la sensibilité des basophiles mesurée au cours du TAB, notre étude a plutôt mis en évidence, une différence significative pour la CD-max pour les deux extraits d'allergène (arachide et rArah2), paramètre du TAB évaluant la réactivité des basophiles.

I) TAB et allergie alimentaire

Dans notre étude, l'objectif était d'étudier les performances du TAB pour différencier, parmi les patients allergiques à l'arachide, les patients à risque de réaction sévère et les patients à risque de seuil réactogène faible, caractéristiques approchées à travers le résultat du TPO. L'enjeu actuel dans le domaine de l'allergie alimentaire, notamment dans l'allergie à l'arachide, ne se limite plus au diagnostic de l'allergie à l'arachide mais à la caractérisation très précise du profil du patient afin de lui proposer une prise en charge ciblée de son allergie alimentaire (9).

Jusqu'à présent, le TPO reste le gold standard pour le diagnostic de l'allergie à l'arachide, donnant une information sur la sévérité potentielle de l'allergie ainsi que sur la dose réactogène. Plusieurs études ont analysé les paramètres allergologiques classiques (tests cutanés et dosage des IgE spécifiques) comme tests diagnostiques de l'allergie à l'arachide, du risque de réaction sévère et du risque de réaction pour une faible dose d'arachide mais aucune d'entre elles n'a trouvé de résultats assez performants pour éviter le recours au TPO (19,20).

Dans les années 90, l'arrivée du TAB puis son développement dans l'exploration de l'allergie alimentaire (21) ont inspiré de nouveaux travaux à la recherche d'un test diagnostique efficace pour confirmer le diagnostic de l'allergie (22), pour estimer le plus précisément possible le risque de réaction sévère et pour identifier le risque de réaction à de faibles doses d'allergène (14–17) (Tableau IX).

Tableau IX. Présentation des principaux résultats des études portant sur l'étude du lien entre la sévérité de la réaction allergique, la dose réactogène et les différents paramètres du TAB.

	Blumchen et al. (2014) (14)	Santos et al. (2015) (15)	Reier-Nilsen et al. (2018) (16)	Bonnet et al. (2020) (17) <i>Résultats préliminaires</i>	Résultats de notre étude		
Population d'étude	63 enfants	49 enfants	96 enfants	41 enfants	74 enfants		
Age (médiane, Q1-Q3) (en années)	6,5 (3,2 ; 17,8)	5,4 (4,7 ; 5,9)	9,7 (Min 5,6 ; Max 14,6)	NC	8 (6 ; 11)		
Taux d'IgE rArah2 (médiane, Q1-Q3) (en kUa/L)	45 (0,04 ; 256)	1,65 (0,20 ; 15,20)	61,8 (Min 0,38 ; Max 492)	NC	11,7 (1,3 ; 46,3)		
Sévérité de la réaction allergique lors du TPO (médiane, Q1-Q3)	III (I ; IV) Score de Sampson modifié	3 (3 ; 4) Score d'Ewan	2 (Min 1 ; Max 2) Score EAACI modifié	NC	2 (2 ; 3) Score FASS		
DCR lors du TPO (médiane, Q1-Q3) (en mg de protéine d'arachide)	400 (12 ; 18000)	100 (30 ; 630)	35 (Min 1 ; Max 3943)	NC	191,5 (66,3 ; 941,3)		
TAB et sévérité	Pas de corrélation significative retrouvée	%B CD63+ arachide 10 µg/mL %B CD63+ arachide 1 µg/mL %B CD63+ arachide 100 ng/mL %B CD63+ arachide 10 ng/mL %B CD63+ arachide 1 ng/mL	P=0,012 P=0,049 P=0,003 P=0,009 P=0,016	Pas de corrélation significative retrouvée	Corrélation significative retrouvée pour : - CD-max arachide et rArah2 (r = 0,75) - AUC du TAB arachide et rArah2 (r = 0,73)	%B CD63+ rArah2 4ng/mL/ témoin + %B CD63+ rArah2 0,02 ng/mL/ témoin +	P=0,008 P=0,041
		%B CD63+ arachide 100 ng/mL/ anti-IgE	P<0,001				
		CD-max arachide	P=0,025				
TAB et DCR	%B CD63+ arachide 50 ng/mL %B CD63+ arachide 0,5 ng/mL	EC 50 arachide CD-sens arachide	P=0,019 P=0,005	%B CD63+ arachide 5ng/mL	Corrélation significative retrouvée pour : - CD-max arachide et rArah2 - AUC du TAB arachide et rArah2	%B CD63+ arachide 100 ng/mL %B CD63+ arachide 20 ng/mL %B CD63+ arachide 10 ng/mL %B CD63+ arachide 1 ng/mL %B CD63+ rArah2 20 ng/mL %B CD63+ rArah2 4 ng/mL %B CD63+ rArah2 2 ng/mL %B CD63+ rArah2 0,2 ng/mL	P=0,017 P=0,008 P=0,009 P=0,007 P=0,002 P<0,001 P=0,002 P=0,007
						CD-max arachide CD-max rArah2	P=0,007 P=0,002
	CD-sens arachide			P=0,008		Pas d'étude réalisée sur la CD-sens arachide	Pas de corrélation significative retrouvée pour la CD-sens arachide et rArah2

NC : non connu

A. Le TAB comme biomarqueur de la sévérité

Le tableau IX résume les principaux résultats des études. D'emblée, il faut souligner l'hétérogénéité des populations étudiées et des critères utilisés pour définir la sévérité favorisant donc des résultats et des conclusions différents d'une étude à l'autre. Il est également important de souligner que certaines études (14,16) n'ont pas mis en évidence de corrélation significative entre les paramètres du TAB et le risque de réaction sévère à l'arachide.

Dans l'étude menée par Santos et al. (15), les auteurs montrent une importante différence significative entre les deux groupes de sévérité (score d'Ewan de 1 et 3 définissant le groupe « réaction légère/modérée » et score d'Ewan à 4 et 5 définissant le groupe « réaction sévère ») pour le ratio de basophiles activés par l'arachide à la concentration 100 ng/mL / témoin positif (anti-IgE). Cette concentration d'arachide correspond à notre concentration pure. Dans notre étude, nous avons trouvé un résultat similaire avec une différence significative pour le ratio rArah2 à la dilution 1/5^{ème} (concentration 4 ng/mL). Les ratios, qui rapportent le nombre de basophiles activés à la valeur du témoin positif, semblent être plus intéressants pour l'étude de la sévérité des réactions cliniques. Le témoin positif est le reflet de la capacité des basophiles du patient à s'activer et à dégranuler. Dans notre étude, les valeurs du témoin positif s'étendent de 13,6% à 98,8% avec une médiane à 84,2% (59,5%-93,2%) ce qui montre une hétérogénéité de la capacité des basophiles à s'activer entre les patients. Il est donc nécessaire d'étudier la réactivité des basophiles vis-à-vis des allergènes en la comparant au témoin positif de chaque patient. Le fait d'avoir un résultat significatif pour le rArah2 et non pour l'arachide pour l'étude de la sévérité peut s'expliquer par le fait que la protéine rArah2 fait partie de la famille des protéines de stockage de l'arachide, allergènes personnels impliqués dans l'allergie à cet aliment notamment du fait de sa présence en grande quantité dans l'aliment et de sa stabilité à la chaleur et donc à la digestion.

Dans notre étude, nous avons également mis en évidence une différence significative pour le ratio rArah2 à la dilution 1/1000^{ème} (concentration 0,02 ng/mL) ($p = 0,041$). Cependant cette différence significative est à relativiser car on remarque que les pourcentages de basophiles activés médians pour les deux groupes de sévérité sont inférieurs au seuil de positivité du TAB ($< 10\%$). Ce résultat est donc biaisé par l'activation spontanée des basophiles qui a un impact important sur des pourcentages d'activation aussi faibles.

Les résultats des études (Tableau IX) montrent des résultats hétérogènes sur l'intérêt de la CD-max comme paramètre du TAB permettant de distinguer les patients à risque de réaction sévère. Dans notre travail, nous n'avons pas trouvé de différence significative de la CD-max pour l'extrait d'arachide et de rArah2 entre les deux groupes de sévérité. Enfin, on remarque également (Tableau IX) que, tout comme dans notre étude, la sévérité de la réaction allergique survenant durant le TPO est plutôt corrélée aux paramètres du TAB étudiant la réactivité des basophiles.

B. Le TAB comme biomarqueur du seuil réactogène

Dans l'étude de Blumchen et al. (14) et celle de Santos et al. (15), les auteurs ont mis en évidence une corrélation entre le CD-sens arachide et le seuil réactogène observé lors du TPO. Dans notre étude, nous avons également montré une différence significative du CD-sens rArah2 entre les groupes de DCR. Cependant, une étude plus récente (17), retrouve des résultats différents avec une absence de corrélation significative retrouvée entre le CD-sens arachide et rArah2 et le seuil réactogène observé durant le TPO. Dans ce travail mené par Bonnet et al. (17) ainsi que dans notre étude, les paramètres du TAB semblant être les plus performants pour différencier les groupes de seuil réactogène seraient le CD-max arachide et rArah2. L'étude de Santos et al. (15) semblait suggérer que le seuil réactogène était uniquement corrélé aux paramètres du TAB étudiant la sensibilité des basophiles.

En effet, plus la concentration d'allergène activant les basophiles au cours du TAB serait faible plus la dose d'allergène entraînant une réaction allergique chez le patient serait faible. Cependant, dans les autres études citées (14,16,17) ainsi que dans notre étude, des différences significatives ont aussi été retrouvées entre les deux groupes de seuil réactogène pour les paramètres du TAB évaluant la réactivité des basophiles. Les différences observées entre les études peuvent s'expliquer par des populations étudiées différentes, par des divergences dans les protocoles de TPO et leur réalisation (absence d'harmonisation des quantités de protéine d'arachide données au patient lors du TPO, lecture des symptômes et scores de gravité différents par exemple) et par l'utilisation de concentrations d'allergènes différentes entre les laboratoires pour la réalisation du TAB.

II) Scores de gravité des réactions allergiques : les limites

Dans notre étude, nous avons utilisé le score FASS (Annexe 1) pour grader la sévérité des réactions allergiques survenant au cours du TPO arachide. Il s'agit actuellement du seul score de sévérité validé (23) spécifiquement dans l'allergie alimentaire. En 2018, Muraro et al (24) ont rappelé la nécessité d'harmoniser les scores de sévérité des réactions allergiques afin d'améliorer la prise en charge des réactions par les professionnels de santé et par les patients eux-mêmes. Plus récemment, une revue systématique de la littérature (25) a comparé les différents scores de sévérité des allergies alimentaires disponibles actuellement, confirmant la nécessité d'harmoniser ces scores. Actuellement, 17 scores de sévérité ont été établis pour les allergies alimentaires (19,26–41) dont huit sont dédiés à la population pédiatrique (19,26,27,29,30,32,34,35) et six sont dédiés uniquement à l'allergie à l'arachide (19,28,32,33,39,40). Ces différents scores de sévérité sont partiellement interchangeables (Annexe 6). Aucun de ces scores n'a été validé dans la pratique.

D'après ce constat, le groupe de travail DEFASE (25), va essayer de développer un score de sévérité harmonisé afin de grader les réactions allergiques alimentaires chez l'adulte et l'enfant.

Cette nécessité est illustrée par une étude récente, menée par Stafford et al. (42), dans laquelle les auteurs ont interrogé 334 médecins spécialisés en allergologie dans le monde entier sur leur façon de classer la sévérité des réactions allergiques. Pour cela, ils ont envoyé 32 descriptions cliniques de réactions allergiques alimentaires qui ont été présentées quatre par quatre selon un algorithme. Sur les quatre descriptions affichées à l'écran, le médecin devait choisir selon lui qu'elle était la moins grave et la plus grave réaction allergique. Les 32 items ont ensuite été classés en fonction de l'importance de la sévérité de la réaction allergique donnée par les médecins. Les résultats du « score » de gravité attribués par les médecins ont ensuite été comparés aux scores de gravité décrits dans la littérature et ont montré une hétérogénéité des résultats avec un recouvrement partiel des différents scores (Annexe 7).

En l'absence d'harmonisation de la gradation de la sévérité des réactions allergiques, il est difficile de comparer les résultats des études cherchant à mettre en évidence un biomarqueur de la sévérité des réactions allergiques.

III) Détermination de la dose réactogène : les limites

La dose cumulée réactogène exacte pour un patient donné n'est jamais connue, nous ne pouvons obtenir qu'une approximation de celle-ci. La notion de dose réactogène survenant au cours d'un TPO est très dépendante du protocole du TPO et notamment du schéma de doses choisi (43). Un grand intervalle entre les doses d'arachide va avoir tendance à surestimer la dose réactogène. Actuellement, en dépit des recommandations (5), il n'y a pas encore de consensus sur le protocole de TPO ni de schéma d'escalade de doses standardisé. De plus, le gold standard du TPO est la

réalisation en double aveugle, rendant plus complexe encore la réalisation (5).

Par ailleurs, les symptômes subjectifs présentés par le patient peuvent entraîner un arrêt prématuré du TPO et une sous-estimation de la DCR, notamment dans les TPO réalisés en ouvert. Pour pallier cette difficulté, Grabenhenrich et al, ont proposé une grille décisionnelle d'arrêt du TPO en fonction des symptômes présentés par le patient (Annexe 8) (44). L'utilisation de ce type de grille décisionnelle permettrait de standardiser les conditions d'arrêt du TPO et d'homogénéiser en partie les seuils réactogènes entre les études.

Enfin, les conditions de la réalisation du TPO en milieu hospitalier, très différents de la consommation des aliments en vie réelle, peut modifier l'expression des symptômes et donc l'évaluation de la dose réactogène du patient vis-à-vis de l'arachide (40).

IV) Avantages et limites du TAB

A. Avantages

1) Pour le patient

Il s'agit d'un examen peu invasif et dénué de risque. De plus, cet examen ne nécessite pas de suspendre le traitement anti-histaminique pour pouvoir être réalisé.

2) Réaction cellulaire vraie

Contrairement au dosage des IgE spécifiques qui consiste en une simple liaison d'IgE sur une molécule d'allergène, le TAB est une véritable réaction cellulaire qui se déroule *in vitro* et est donc plus proche de la réalité de la réaction allergique. Il est le reflet de la capacité de l'allergène à provoquer une dégranulation dans un délai court.

B. Limites

Le TAB partage les limites inhérentes à toute étude cellulaire : dans quelle mesure une étude *ex vivo* peut-elle reproduire une réaction *in vivo* ? Jusqu'à quel point un

basophile sanguin est-il représentatif du mastocyte tissulaire ? Une cellule sortie de son micro-environnement, avec des variations de température, garde-t-elle son fonctionnement physiologique ?

1) Conditions de réalisation et coût

Le TAB n'est pas un examen biologique de routine et n'est disponible que dans certains centres spécialisés, experts, rompus à sa réalisation. Les différentes manipulations nécessaires à sa réalisation ne sont pas automatisées, c'est donc un examen qui prend du temps et qui nécessite un personnel formé et entraîné. De plus, il s'agit d'un examen qui nécessite une très bonne coordination entre le service de prélèvement et le laboratoire car l'analyse doit être réalisée au maximum dans la demi-journée suivant le prélèvement de sang afin de maximiser la viabilité et la fonctionnalité des basophiles. L'étude menée par Sturm et al (45) a montré une baisse de 70,9% de réactivité des basophiles pour un délai de 18h à +4°C entre le moment du prélèvement et le moment de réalisation de l'analyse. Enfin, le TAB est un examen coûteux, environ 270 euros, et non remboursé puisqu'il fait partie du Référentiel des actes Innovants Hors Nomenclature (RIHN). Cependant ce coût est à relativiser en regard du coût d'une Hospitalisation de Jour pour la réalisation d'un TPO qui est d'environ 514 euros.

2) Patients non répondeurs

Chez environ 5% à 10% des patients, les basophiles ne répondent pas à un contrôle positif (anti-FcεRI, fMLP ou anti-IgE) (46). Ce résultat se retrouve également dans notre étude avec environ 5% de patients non répondeurs (5 enfants sur les 103 sélectionnés au départ).

3) Basophiles et mastocytes

Les mastocytes sont les principales cellules qui relarguent des médiateurs responsables des réactions allergiques immédiates, or le TAB ne teste que l'activation

des basophiles et la réaction de ces cellules est ensuite extrapolée à l'activation des mastocytes. On peut donc souligner cette limite du TAB : reflet fidèle de la réaction allergique *in vivo* ?

4) Variabilité inter-individuelle et interprétations des résultats

Il existe une grande variabilité entre les patients allergiques concernant la réactivité et la sensibilité des basophiles. Comme précisé plus haut, cela se constate par l'hétérogénéité de réponse au témoin positif. Il apparaît difficile de résumer le TAB à une valeur numérique que ce soit le CD-max pour évaluer la réactivité ou l'EC50 et le CD-sens pour évaluer la sensibilité (Figure 18). Ce constat a déjà été fait par Patil et al. (47) qui proposait une étude de l'AUC de la courbe dose-réponse du TAB afin de pouvoir comparer les réponses des différents patients à un allergène donné. Cette courbe dose-réponse reflète très précisément, à la fois le profil de réactivité et de sensibilité des basophiles, cependant il ne s'agit pas d'un paramètre facile à utiliser en routine.

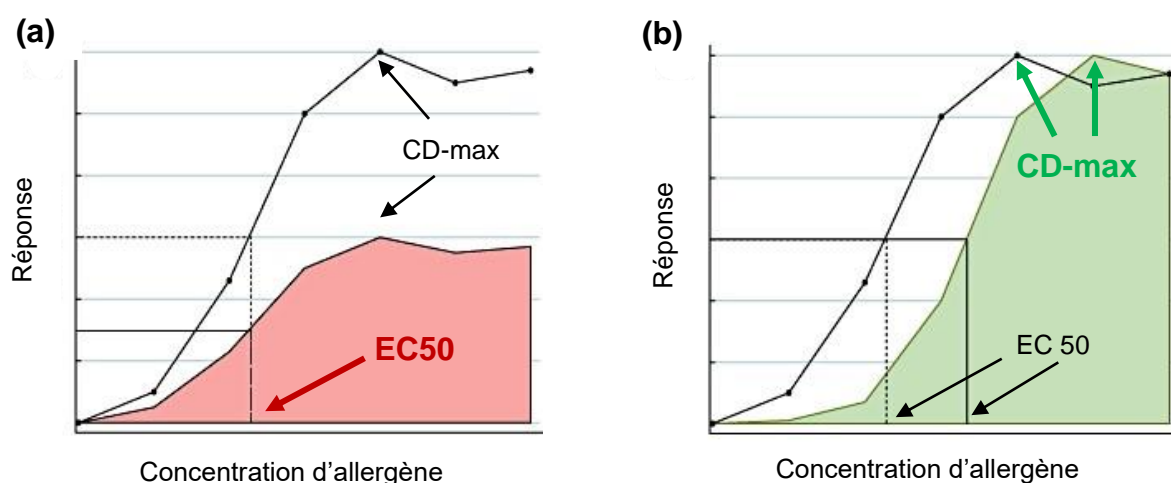


Figure 18. Courbes dose-réponse de l'activation des basophiles

- (a) Variation de la réponse maximale chez des patients ayant la même sensibilité
- (b) Variation de la sensibilité chez des patients ayant la même réponse maximale

V) Forces et limites de l'étude

A. Forces

Tout d'abord, notre étude a été menée sur un effectif important en comparaison aux

autres études déjà publiées (14–17), il s'agit d'une population bien caractérisée d'enfants allergiques à l'arachide réalisant un TPO en vue d'une ITO. De plus, la standardisation du recueil de données, via le protocole en vigueur dans l'unité et son recueil prospectif, permet l'exhaustivité. Le TPO a été réalisé dans un centre de référence en allergologie par du personnel formé. Le score de sévérité de la réaction allergique choisi dans cette étude est le seul actuellement validé (48). Enfin, le TAB a été réalisé par une équipe experte et entraînée et réalisé selon les recommandations de la littérature (49). Les analyses étaient toutes standardisées et réalisées dans le même laboratoire.

B. Limites

Tout d'abord, nous avons réalisé des TPO en ouvert et non en double-aveugle, le gold standard (5). De plus, notre étude est réalisée dans un centre de recours en allergologie sur une population bien caractérisée qui ne reflète pas l'ensemble de la population des enfants allergiques à l'arachide. Il s'agit donc d'un biais de sélection qu'une étude multicentrique permettrait d'améliorer. La sévérité de la réaction allergique et la dose réactogène ont été obtenues au cours de la réalisation d'un TPO en centre hospitalier avec un bon contrôle des cofacteurs pouvant faire varier ces paramètres (asthme non contrôlé, infection virale en cours, traitement par antibiotiques ou AINS, activité physique), de ce fait ils ne sont pas le reflet exact de la vraie vie. Enfin, notre effectif reste limité et il sera nécessaire de réaliser d'autres études sur des effectifs plus grands afin d'augmenter la puissance pour pouvoir évaluer les performances du TAB comme test diagnostique du risque de réaction sévère ou de réaction pour une faible dose réactogène sans avoir recours à la réalisation d'un TPO.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude s'inscrit dans l'hétérogénéité des résultats des études évaluant les performances du TAB dans l'évaluation de l'allergie à l'arachide. Nos résultats qui pourraient paraître globalement décevants ne sont toutefois pas suffisants pour conclure sur le manque d'intérêt de cet examen. En effet, travailler sur des effectifs plus importants et donc mieux représentatifs, en homogénéisant les protocoles de TPO et le score de gravité, permettrait de clarifier le positionnement de cet examen dans la stratégie de prise en charge des patients.

D'autres pistes sont à l'étude comme la simplification du TAB ou l'évaluation d'autres cellules comme le mastocyte. Le développement de ces outils permettrait à l'avenir de revoir la place du TPO, examen qui est une source de stress pour le patient et sa famille et qui se heurte aux conditions de sa réalisation. C'est la condition du développement de nouvelles stratégies de prise en charge de l'allergie alimentaire dans le futur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Roberts G, Muraro A, Sheikh A, et al. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2014;69:992-1007.
2. Rancé F, Grandmottet X, Grandjean H. Prevalence and main characteristics of schoolchildren diagnosed with food allergies in France. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2005;35:167-72.
3. Pouessel G, Turner PJ, Worm M, Cardona V, Deschildre A, Beaudouin E, et al. Food-induced fatal anaphylaxis: From epidemiological data to general prevention strategies. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2018;48:1584-93.
4. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141:41-58.
5. Sampson HA, Gerth van Wijk R, Bindslev-Jensen C, Sicherer S, Teuber SS, Burks AW, et al. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology-European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:1260-74.
6. Perry TT, Matsui EC, Conover-Walker MK, Wood RA. Risk of oral food challenges. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1164-8.
7. Muraro A, Worm M, Alviani C, Cardona V, DunnGalvin A, Garvey LH, et al. EAACI guideline: Anaphylaxis (2021 update). *Allergy*. 2021;
8. Marrs T, Flohr C, Perkin MR. Assessing the efficacy of oral immunotherapy for the desensitisation of peanut allergy in children (STOP II): a phase 2 randomised controlled trial: a critical appraisal. *Br J Dermatol*. 2015;173:1125-9.
9. Deschildre A, Elegbédé CF, Just J, Bruyère O, Van der Brempt X, Papadopoulos A, et al. Peanut-allergic patients in the MIRABEL survey: characteristics, allergists' dietary advice and lessons from real life. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2016;46:610-20.
10. Santos AF, Douiri A, Bécares N, Wu S-Y, Stephens A, Radulovic S, et al. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:645-52.
11. Rubio A, Vivinus-Nébot M, Bourrier T, Saggio B, Albertini M, Bernard A. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy*. 2011;66:92-100.
12. Thyagarajan A, Jones SM, Calatroni A, Pons L, Kulis M, Woo CS, et al. Evidence of pathway-specific basophil anergy induced by peanut oral immunotherapy in peanut-allergic children. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2012;42:1197-205.
13. Jones SM, Pons L, Roberts JL, Scurlock AM, Perry TT, Kulis M, et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:292-300, 300.e1-97.

14. Blumchen K, Beder A, Beschorner J, Ahrens F, Gruebl A, Hamelmann E, et al. Modified oral food challenge used with sensitization biomarkers provides more real-life clinical thresholds for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:390-8.
15. Santos AF, Du Toit G, Douiri A, Radulovic S, Stephens A, Turcanu V, et al. Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135:179-86.
16. Reier-Nilsen T, Michelsen MM, Lødrup Carlsen KC, Carlsen K-H, Mowinckel P, Nygaard UC, et al. Predicting reactivity threshold in children with anaphylaxis to peanut. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2018;48:415-23.
17. Bonnet B, Godignon M, Michaud E, Lambert C, Merlin E, Fauquert J-L, et al. Could BAT reduce the number of oral food challenge? A prospective study. *World Allergy Organ J*. 2020;13:100335.
18. Rouzair P. Basophiles : tests d'activation. *Biol Médicale*. :7.
19. Astier C, Morisset M, Roitel O, Codreanu F, Jacquenet S, Franck P, et al. Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:250-6.
20. Ta V, Weldon B, Yu G, Humblet O, Neale-May S, Nadeau K. Use of Specific IgE and Skin Prick Test to Determine Clinical Reaction Severity. *Br J Med Med Res*. 2011;1:410-29.
21. Sainte-Laudy J, Vallon C, Guérin JC. [Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis]. *Allerg Immunol (Leipz)*. 1994;26:211-4.
22. Sainte-Laudy J, Ménétrey C, Brianchon C, Lienhardt-Roussie A, Cogné M. Évaluation de la cytométrie en flux par rapport aux tests de provocation en simple insu pour le diagnostic de l'allergie alimentaire chez l'enfant. *Rev Fr Allergol*. 2009;49:454-61.
23. Rivas MF. Gaps in management including an anaphylaxis severity score [Internet]. Communication présenté à: Training course on ANAPHYLAXIS - Digital édition 2021; 2021. Disponible sur: www.ga2lenwebinar.online/presentations/list/373781?page_id=2
24. Muraro A, Fernandez-Rivas M, Beyer K, Cardona V, Clark A, Eller E, et al. The urgent need for a harmonized severity scoring system for acute allergic reactions. *Allergy*. 2018;73:1792-800.
25. Arasi S, Nurmatov U, Dunn-Galvin A, Daher S, Roberts G, Turner PJ, et al. Consensus on DEfinition of Food Allergy SEverity (DEFASE) an integrated mixed methods systematic review. *World Allergy Organ J*. 2021;14:100503.
26. Gupta RS, Warren CM, Smith BM, et al. The Public Health Impact of Parent-Reported Childhood Food Allergies in the United States. *Pediatrics*. 2018;142:e20181235. *Pediatrics*. 2019;143:e20183835.
27. Gupta RS, Springston EE, Warrier MR, Smith B, Kumar R, Pongracic J, et al. The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics*. 2011;128:e9-17.
28. Primeau MN, Kagan R, Joseph L, Lim H, Dufresne C, Duffy C, et al. The psychological

- burden of peanut allergy as perceived by adults with peanut allergy and the parents of peanut-allergic children. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2000;30:1135-43.
29. Amin AJ, Davis CM. Changes in prevalence and characteristics of IgE-mediated food allergies in children referred to a tertiary care center in 2003 and 2008. *Allergy Asthma Proc*. 2012;33:95-101.
 30. Boyano-Martínez T, Pedrosa M, Quirce S, García-Ara C. Accidental allergic reactions in children allergic to hen's egg. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22:109-15.
 31. Ewan PW, Clark AT. Long-term prospective observational study of patients with peanut and nut allergy after participation in a management plan. *Lancet Lond Engl*. 2001;357:111-5.
 32. Hourihane JO, Kilburn SA, Dean P, Warner JO. Clinical characteristics of peanut allergy. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 1997;27:634-9.
 33. Hourihane JO, Grimshaw KEC, Lewis SA, Briggs RA, Trewin JB, King RM, et al. Does severity of low-dose, double-blind, placebo-controlled food challenges reflect severity of allergic reactions to peanut in the community? *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2005;35:1227-33.
 34. Itazawa T, Adachi Y, Takahashi Y, Miura K, Uehara Y, Kameda M, et al. The severity of reaction after food challenges depends on the indication: A prospective multicenter study. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol*. 2020;31:167-74.
 35. Macdougall CF, Cant AJ, Colver AF. How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland. *Arch Dis Child*. 2002;86:236-9.
 36. Ben-Shoshan M, Harrington DW, Soller L, Fragapane J, Joseph L, St Pierre Y, et al. A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:1327-35.
 37. Burks AW, Jones SM, Wood RA, Fleischer DM, Sicherer SH, Lindblad RW, et al. Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children. *N Engl J Med*. 2012;367:233-43.
 38. Fleischer DM. The natural history of peanut and tree nut allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007;7:175-81.
 39. Sicherer SH, Furlong TJ, DeSimone J, Sampson HA. Self-reported allergic reactions to peanut on commercial airliners. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:186-9.
 40. van der Zee T, Dubois A, Kerkhof M, van der Heide S, Vlieg-Boerstra B. The eliciting dose of peanut in double-blind, placebo-controlled food challenges decreases with increasing age and specific IgE level in children and young adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128:1031-6.
 41. Clark S, Wei W, Rudders SA, Camargo CA. Risk factors for severe anaphylaxis in patients receiving anaphylaxis treatment in US emergency departments and hospitals. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:1125-30.
 42. Stafford A, Bartra J, Aston A, Mills ENC, Fernandez-Rivas M, Turner PJ. Improving Severity Scoring of Food-Induced Allergic Reactions: A Global « Best-Worst Scaling »

Exercise. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;S2213-2198 00789-3.

43. Dubois AEJ, Turner PJ, Hourihane J, Ballmer-Weber B, Beyer K, Chan C-H, et al. How does dose impact on the severity of food-induced allergic reactions, and can this improve risk assessment for allergenic foods?: Report from an ILSI Europe Food Allergy Task Force Expert Group and Workshop. *Allergy.* 2018;73:1383-92.
44. Grabenhenrich LB, Reich A, Bellach J, Trendelenburg V, Sprickelman AB, Roberts G, et al. A new framework for the documentation and interpretation of oral food challenges in population-based and clinical research. *Allergy.* 2017;72:453-61.
45. Sturm EM, Kranzelbinder B, Heinemann A, Groselj-Strele A, Aberer W, Sturm GJ. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78:308-18.
46. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008;74:201-10.
47. Patil SU, Shreffler WG. Immunology in the Clinic Review Series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation. *Clin Exp Immunol.* 2012;167:59-66.
48. Rivas MF, Fernández AG, García IG. Software Tool for implementing the Food Allergy Severity Score - FASS [Internet]. Zenodo; 2021. Disponible sur: <https://zenodo.org/record/4836276>
49. Hemmings O, Kwok M, McKendry R, Santos AF. Basophil Activation Test: Old and New Applications in Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2018;18:77.

ANNEXE 1

Classification FASS (48)
(Food Allergy Severity Score)
 Score de gravité des réactions allergiques

FASS 3	FASS 5	Symptômes	
Réaction légère	Grade 1	Syndrome oral isolé	
Réaction modérée	Grade 2	1 symptôme parmi : - rhinite - conjonctivite - éruption cutanée - symptômes digestifs	Associé ou non à un syndrome oral
	Grade 3	2 symptômes ou + parmi : - rhinite - conjonctivite - éruption cutanée - symptômes digestifs	Associés ou non à un syndrome oral
Réaction sévère	Grade 4	- angioœdème laryngé ET / OU - atteinte respiratoire	Associé(s) ou non à : - un syndrome oral - une rhino-conjonctivite - une éruption cutanée - des symptômes digestifs
	Grade 5	- atteinte cardio-vasculaire ET / OU - troubles de conscience	Associé(s) ou non à : - un syndrome oral - une rhino-conjonctivite - une éruption cutanée - des symptômes digestifs - un angioœdème laryngé - une atteinte respiratoire

ANNEXE 2

Protocole expérimental du TAB arachide et rArah2

	Témoin négatif (1 tube)	Témoin positif (anti-FcεRI) (1 tube)	Témoin positif (fMLP) (1 tube)	Arachide (5 tubes)	rArah2 (5 tubes)
Tampon de stimulation	50 µL				
Réactif de coloration (anti-CD63-FTIC/anti-CCR3-PE)	20 µL				
Anti-CD203c-Pc7	5 µL				
Conditions particulières du milieu	50 µL de tampon de stimulation	50 µL de contrôle de stimulation (anti-FcεRI)	50 µL de contrôle de stimulation (fMLP)	50 µL de solution allergénique d'arachide aux différentes dilutions réalisées (1 dilution par tube)	50 µL de solution allergénique de rArah2 aux différentes dilutions réalisées (1 dilution par tube)
Sang total du patient	50 µL				

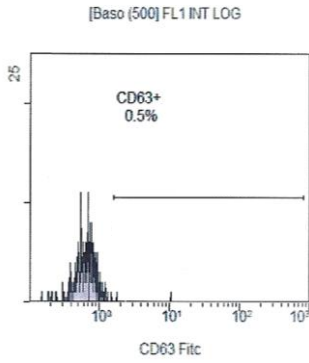
- ↳ Mélanger délicatement puis incuber 15 min à 37°C au bain-marie
- Ajouter 2 mL de réactif de lyse, mélanger et incuber 6 min à 20°C
- Centrifuger les tubes pendant 5 min à 1800 rpm et aspirer le surnageant
- Ajouter 200 µL de tampon de lavage
- Passer les tubes en CMF sur l'automate Navios®, Beckman Coulter, Etats-Unis

Reconstitution des flacons d'allergènes et réalisation des différentes dilutions

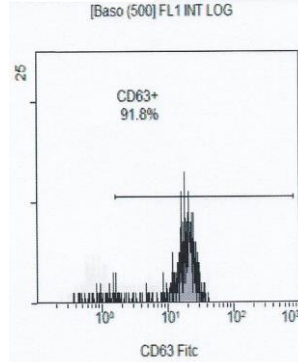
Pure	Ajouter 250µL de tampon de stimulation pour reconstituer le flacon d'allergène
Dilution au 1/5^{ème}	30 µL de solution pure + 120 µL de tampon de stimulation
Dilution au 1/10^{ème}	30 µL de solution pure + 270 µL de tampon de stimulation
Dilution au 1/100^{ème}	30 µL de la solution diluée au 1/10 ^{ème} + 270 µL de tampon de stimulation
Dilution au 1/1000^{ème}	30 µL de la solution diluée au 1/100 ^{ème} + 270 µL de tampon de stimulation

ANNEXE 3

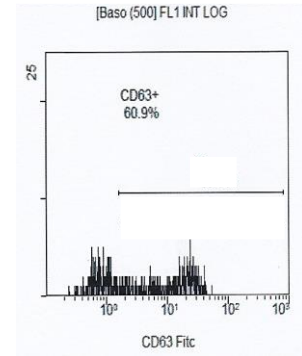
Histogrammes mono-paramétriques (marqueur CD63) obtenus en CMF lors de la réalisation d'un TAB arachide et rArah2



Témoïn négatif

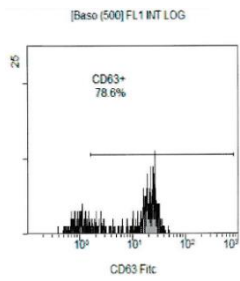


1^{er} témoïn positif (anti-FcεRI)

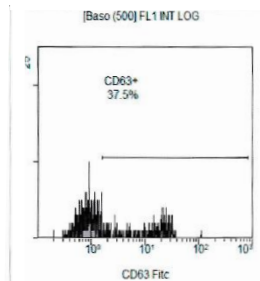


2^{ème} témoïn positif (fMLP)

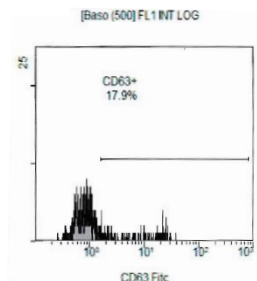
→ Différentes dilutions d'arachide



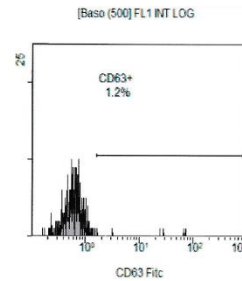
Pur



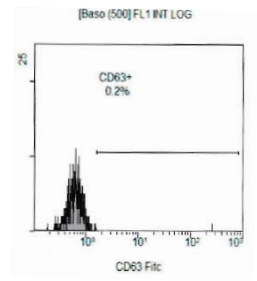
1/5^{ème}



1/10^{ème}

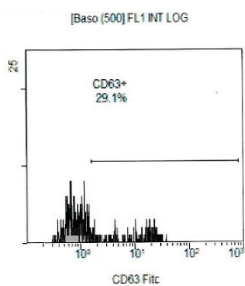


1/100^{ème}

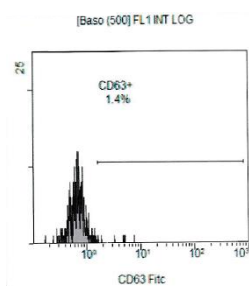


1/1000^{ème}

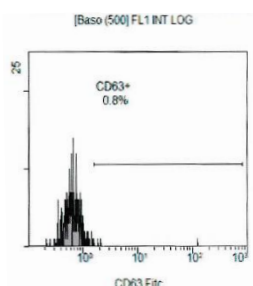
→ Différentes dilutions de rArah2



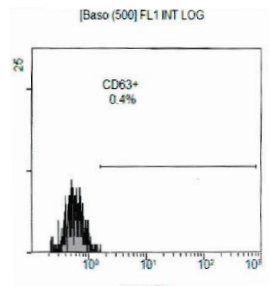
Pur



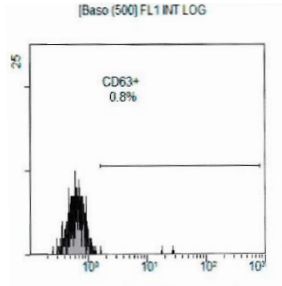
1/5^{ème}



1/10^{ème}



1/100^{ème}



1/1000^{ème}

ANNEXE 4

Résultats du Test d'Activation des Basophiles (TAB) Analyse en cytométrie en flux (CMF)

- TEST D'ACTIVATION DES BASOPHILES HUMAINS (TAB) : ANALYSE DE LA REACTIVITE CELLULAIRE : Cytométrie en flux.

Nature du prélèvement : Sang total/Tube E.D.T.A.

Activation spontanée	0.5	%	N : <2.5
Contrôle positif(témoin de stimulation)	91.8	%	N : >10

ACTIVATION DES BASOPHILES PAR L'ALLERGENE SPECIFIQUE :

f13 Arachide:

Concentration 1	78.6	%
Concentration 2	37.5	%
Concentration 3	17.9	%
Concentration 4	1.2	%
Concentration 5	0.2	%

Conclusion : Test positif

f423 nAra h 2 Arachide:

Concentration 1	29.1	%
Concentration 2	1.4	%
Concentration 3	0.8	%
Concentration 4	0.4	%
Concentration 5	0.8	%

Conclusion : Test positif

Réactifs et méthode: Cytométrie en flux BUHLMANN flow cast.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de basophiles
CCR3/CD 63 +

Pour les allergènes alimentaires.
≥ 15% Test positif

Pour les allergènes alimentaires recombinants.
≥ 10% Test positif.

Interprétation : Test d'activation des basophiles :
- pour l'arachide f13 : POSITIF au pur, 1/5eme, 1/10eme et négatif au 1/100eme et 1/1000eme,
- pour Ara h2 : POSITIF au pur et négatif au 1/5eme, 1/10eme, 1/100eme et 1/1000eme.

ANNEXE 5

Etude des paramètres du TAB en fonction du recours ou non à l'Adrénaline au cours du TPO

Les paramètres du TAB étudiant la sensibilité des basophiles vis-à-vis de l'arachide et du rArah2 ne sont pas présentés car les résultats ne sont pas significatifs.

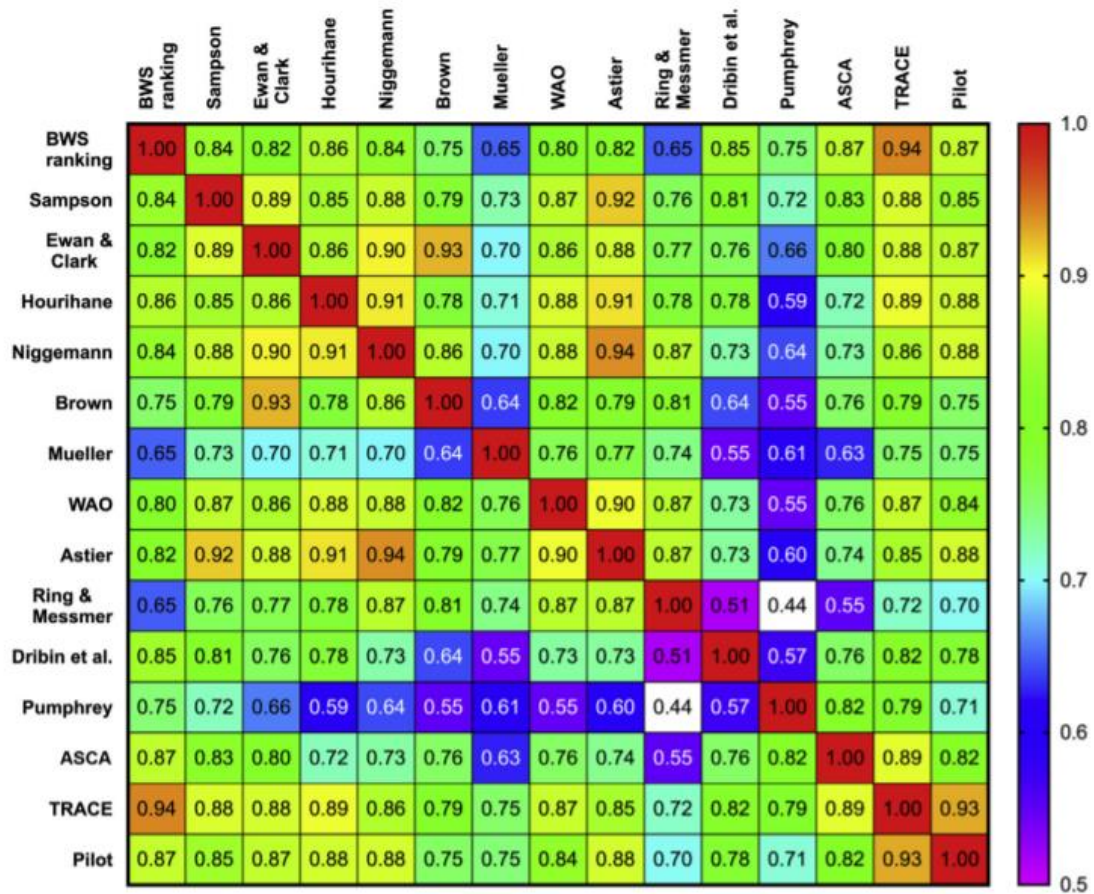
	Injection d'Adrénaline au cours du TPO (n = 35)	Pas d'injection d'Adrénaline au cours du TPO (n = 39)	P value
Témoin positif (% de basophiles activés)	83,4 (44,1 ; 94,7)	85,5(67 ; 91,8)	1
TAB arachide positif (nb, %)	34 (97,1)	33 (84,6)	NA
%B CD63+ Concentration pure d'arachide (% de basophiles activés)	78,8 (40,8 ; 92,2)	70,5 (26,6 ; 87)	0,16
Ratio pur/témoin positif arachide	1 (0,8 ; 1)	0,9 (0,4 ; 1)	0,077
%B CD63+ Dilution au 1/5^{ème} d'arachide (% de basophiles activés)	71,6 (23,3 ; 90,3)	24,9 (5,1 ; 88,7)	0,13
Ratio 1/5^{ème} /témoin positif arachide	1 (0,7 ; 1)	0,6 (0,1 ; 1)	0,017
%B CD63+ Dilution au 1/10^{ème} d'arachide (% de basophiles activés)	66,8 (18 ; 91,1)	39,9 (2 ; 88,8)	0,14
Ratio 1/10^{ème} /témoin positif arachide	0,9 (0,5 ; 1)	0,7 (0 ; 1)	0,044
%B CD63+ Dilution au 1/100^{ème} d'arachide (% de basophiles activés)	6,4 (2,1 ; 29,7)	3,1 (1 ; 48,1)	0,64
Ratio 1/100^{ème} /témoin positif arachide	0,2 (0 ; 0,4)	0,1 (0 ; 0,6)	0,38
%B CD63+ Dilution au 1/1000^{ème} d'arachide (% de basophiles activés)	1,3 (1 ; 2,9)	1,4 (0,6 ; 3)	0,67
Ratio 1/1000^{ème} /témoin positif arachide	0 (0 ; 0,1)	0 (0 ; 0)	0,49
CD-max arachide (% de basophiles activés)	83,5 (41,4 ; 93,8)	70,5 (26,6 ; 91,3)	0,15
%B CD63+ Concentration minimale activatrice d'arachide (% de basophiles activés)	29,7 (19,4 ; 59,9)	33,9 (19,2 ; 64)	0,92
TAB rArah2 positif (nb, %)	34 (97,1)	32 (82,1)	0,059
%B CD63+ Concentration pure de rArah2 (% de basophiles activés)	70,6 (32,1 ; 87,6)	65,7 (16,1 ; 89,2)	0,36
Ratio pur/témoin positif rArah2	1 (0,8 ; 1)	0,9 (0,3 ; 1)	0,075
%B CD63+ Dilution 1/5^{ème} de rArah2 (% de basophiles activés)	68,7 (24,3 ; 87,8)	30,6 (4,5 ; 89,8)	0,30
Ratio 1/5^{ème}/témoin positif rArah2	1 (0,7 ; 1,2)	0,6 (0,1 ; 1)	0,004
%B CD63+ Dilution 1/10^{ème} de rArah2 (% de basophiles activés)	64,2 (15,4 ; 86,3)	20 (2,9 ; 88,4)	0,27
Ratio 1/10^{ème}/témoin positif rArah2	1 (0,6 ; 1,1)	0,5 (0 ; 1)	0,029
%B CD63+ Dilution 1/100^{ème} de rArah2 (% de basophiles activés)	8,1 (3,1 ; 60,1)	2,4 (0,7 ; 60,5)	0,27
Ratio 1/100^{ème}/témoin positif rArah2	0,2 (0,1 ; 0,7)	0 (0 ; 0,7)	0,21
%B CD63+ Dilution 1/1000^{ème} de rArah2 (% de basophiles activés)	2,4 (1,2 ; 4,2)	1,5 (0,6 ; 4,3)	0,27
Ratio 1/1000^{ème}/témoin positif rArah2	0 (0 ; 0,1)	0 (0 ; 0,1)	0,091
CD-max rArah2 (% de basophiles activés)	83,1 (40,6 ; 93,2)	68,9 (20 ; 91,3)	0,17
%B CD63+ Concentration minimale activatrice de rArah2 (% de basophiles activés)	38,4 (15,4 ; 60,4)	24,3 (14,2 ; 46,3)	0,18

Les résultats sont exprimés en nombre (pourcentage) ou en médiane (Q1 ; Q3).

NA : non analysable car effectifs trop petits

ANNEXE 7

Etude de la corrélation entre les différents score de gravité des réactions allergiques
(coefficient de Spearman, r_s) (42)



ANNEXE 8

Grille décisionnelle d'arrêt du TPO en fonction des symptômes du patient (44)

Food challenge day

www.diagnosing-food-allergy.org

ID/Name: _____ Date of challenge: _____ Blinding key: _____ Dosing schedule: _____
(e.g. study name)

before challenge		during/after challenge								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Blood pressure [mmHg]	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /
<input type="checkbox"/> PEF	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
<input type="checkbox"/> FEV ₁	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
O ₂ saturation	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%

Other doses
(repeated regular OR
cumulative, eg. on other day)

discharged

if clinically indicated,
challenge is stopped

usually an indication to
stop the challenge

Doses	Number of planned doses:	start time	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Food matrix used:	full dose (≥80%)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	partial dose (<80%)		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Food matrix used:	full dose (≥80%)		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	partial dose (<80%)		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

No symptoms

Time at START of symptoms

Skin	Symptoms	1	2	3	4	5	6	7	8	9	other	other
		Pruritus	1 occasional scratching									
	2 continuous scratching for >2 min at a time											
	3 hard continuous scratching leading to excoriations scratching of palms, soles, genitals, scalp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Rash	1 few areas of faint erythema											
	2 areas of erythema (≤50%)											
	3 generalized marked erythema (>50%)											
Urticaria	hives											
	<3 number of new hives	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.
	>10 generalized involvement											
Angioedema Lip, Face	1 mild lip edema											
	2 significant lip edema OR face edema											

Delayed reaction? (2-24h after challenge)

yes no unknown

Has the symptom occurred within 24h before the challenge?

Time Date

Respiratory	Symptoms	1	2	3	4	5	6	7	8	9	other	other
		Nose	1 rare bursts, occasional sniffing									
	2 <10 bursts, frequent sniffing OR intermittent rubbing of nose											
	3 long bursts, persistent rhinorrhea OR continuous rubbing											
Eyes	2 intermittent rubbing of eyes											
	3 continuous rubbing, periorcular swelling, redness, expiratory wheezing to auscultation											
Wheezing	1 inspiratory and expiratory wheezing to auscultation											
	2 inspiratory and expiratory wheezing to auscultation											
	3 use of accessory muscles OR audible wheezing											
Laryngeal	1 persistent throat tightness/pain											
	2 >3 episodes of throat clearing OR cough											
	3 frequent dry cough OR hoarseness											

delayed reaction

last 24h

Gastrointestinal	Symptoms	1	2	3	4	5	6	7	8	9	other	other
		Subjective	1 complaints of nausea OR abdominal pain									
	2 frequent complaints of nausea OR pain with normal activity											
	3 notably distressed due to GI symptoms, with decreased activity											
Oral cavity	1 itchy mouth											
	2 blisters of oral mucosa											
Emesis	1 number of episodes	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.
Diarrhoea	1 number of episodes	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.

delayed reaction

last 24h

Cardio/Neuro	Symptoms	1	2	3	4	5	6	7	8	9	other	other
		Cardio-vascular	1 tachycardia									
	2 >20% drop in blood pressure											
	3 cardiovascular collapse											
Neurologic	1 subjective response (e.g. weak, dizzy)											
	2 significant change in mental status											
	3 loss of consciousness											

Other

specify: _____

specify: _____

Treatment Drug (route) dose/time dose/time Drug (route) dose/time dose/time Drug (route) dose/time dose/time

Challenge day outcome

Negative

no or insufficient symptoms, all planned doses given

Inconclusive

e.g. stopped on patient's request, symptoms unclear

Positive

sufficient symptoms, stopped or symptoms after planned final dose

Challenge stopped? no yes, after dose: _____

Please describe symptom(s) that lead to your conclusion (to carry on to last dose OR to stop the challenge):

Please rate severity of the reaction from 0 to 10... based on symptoms only: _____

...including e.g. timing, treatment response: _____

...patient's rating: _____

Supervising physician (name/signature): _____



This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License. To view a copy of this license, visit creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/

AUTEUR : Nom : MIAUX

Prénom : Céline

Date de soutenance : 26 octobre 2021

Titre de la thèse : Sévérité de la réaction allergique et dose réactogène lors du test de provocation oral chez l'enfant allergique à l'arachide : apport du Test d'Activation des Basophiles

Thèse - Médecine - Lille « 2021 »

Cadre de classement : Allergologie

DES + spécialité : Allergologie

Mots-clés : TAB, allergie alimentaire, arachide, test de provocation oral, sévérité, dose réactogène, enfant

Résumé : Contexte : Le diagnostic de l'allergie à l'arachide repose actuellement sur la réalisation d'un Test de Provocation Oral (TPO). Le TPO nécessite une structure de soins spécialisée et n'est pas dénué de risque pour le patient, mais il permet d'apporter des informations précieuses notamment sur la sévérité de la réaction allergique et sur la dose réactogène. Le but de cette étude était d'évaluer le Test d'Activation des Basophiles (TAB) comme biomarqueur prédictif de la sévérité et de la dose réactogène.

Méthode : Etude monocentrique rétrospective réalisée au CHU de Lille de 2015 à 2021, ayant inclus tous les enfants allergiques à l'arachide, ayant bénéficié d'un TAB au moment de la réalisation d'un TPO à l'arachide confirmant l'allergie à l'arachide, en vue d'une Induction de Tolérance Orale (ITO).

Résultats : Nous avons inclus 74 enfants, d'âge médian de 8 ans, ayant un score FASS médian de 2 et une Dose Cumulée Réactogène (DCR) médiane de 191,5 mg de protéine d'arachide lors du TPO. Les 17 enfants du groupe de réaction sévère ont une réactivité des basophiles plus importante avec un ratio de basophiles activés/anti-FCεRI à 1 (0,9 ; 1,2) contre 0,9 (0,1 ; 1) chez les 57 patients du groupe réaction faible/modérée pour une dilution au 1/5^{ème} de rArah2 ($p = 0,008$). L'aire sous la courbe est à 0,73 [IC95% 0,58-0,89]. Les 27 enfants du groupe DCR faible ont une sensibilité des basophiles plus importante avec un CD-sens rArah2 à 2000 (303 ; 3333) contre 370,4 (82 ; 2000) chez les 47 patients du groupe DCR élevée ($p = 0,013$). Un TAB positif pour les deux concentrations les plus faibles d'arachide et de rArah2 est significativement associé à une faible DCR. A contrario, un TAB positif uniquement pour les deux concentrations les plus élevées d'arachide et de rArah2 est significativement associé à une DCR élevée. Les 27 enfants du groupe DCR faible ont également une réactivité des basophiles plus importantes avec un CD-max arachide à 88,8% (71,5 ; 83,3) contre 66,8% (23,7 ; 91,9) ($p=0,007$) et un CD-max rArah2 à 86,3% (77,4 ; 93,2) contre 50,5% (19,6 ; 85,5) chez les 47 patients du groupe DCR élevée ($p = 0,002$).

Conclusion : Le TAB pourrait être un biomarqueur prédictif de la sévérité de la réaction allergique survenant lors du TPO arachide ainsi que de la dose réactogène. Toutefois, ses performances ne semblent pas, d'après notre étude, suffisantes pour remplacer le TPO et prédire avec précision ces caractéristiques de l'allergie à l'arachide.

Composition du Jury :

Présidente : Madame la Professeure Cécile CHENIVESSE

**Assesseures : Madame la Professeure Myriam LABALETTE
Madame la Docteure Stéphanie ROGEAU**

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Antoine DESCHILDRE