

Contribution de la cytométrie de flux au diagnostic d'une allergie

Flow cytometry in the diagnosis of allergy

N. Abuaf ^{a,*}, B. Rajoely ^a, H. Gaouar ^b, C. Pecquet ^b, F. Leynadier ^b

^a Service d'hématologie et d'immunologie biologique, hôpital Tenon, AP-HP, France

^b Service de médecine interne et d'allergologie, hôpital Tenon, AP-HP, France

Reçu le 1 octobre 2003 ; accepté le 9 octobre 2003

Résumé

Pour l'exploration d'une allergie in vitro, la cytométrie de flux a rendu accessible des tests cellulaires pratiqués jusque-là par des laboratoires de recherche. L'analyse par cytométrie de l'activation in vitro des polynucléaires basophiles est devenue courante. Après incubation avec l'allergène, les basophiles sont fixés puis marqués avec des anticorps anti-IgE, leur activation est détectée avec les anticorps monoclonaux anti-CD63 ou anti-CD203c. Dans le diagnostic d'une allergie de type immédiat, les tests sur les basophiles sont un complément au dosage des IgE spécifiques. Avec certains allergènes, en particulier médicamenteux, la cytométrie de flux a une sensibilité supérieure au dosage des IgE spécifiques. L'interprétation des résultats peut être délicate, en particulier des concentrations élevées de certains médicaments peuvent se révéler toxiques in vitro. La cytométrie offre aussi l'opportunité d'explorer les allergies ayant pour mécanisme l'immunité cellulaire. La détection de la synthèse de cytokines dans les lymphocytes T ou les basophiles, après incubation avec l'allergène est techniquement au point. Il reste à démontrer l'intérêt diagnostique. L'exploration de l'allergie par la cytométrie de flux est appelée à se développer.

© 2003 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

For the laboratory investigation of allergic diseases, flow cytometric methods to detect leukocytes that have been activated by allergen in vitro have recently been developed. Cellular tests for the detection of in vitro-activated blood basophils are complementary to specific IgE determinations. After in vitro incubation with allergen, basophils are fixed and then labeled with anti-IgE antibodies, and activation is then identified with anti-CD63 or anti-CD203c monoclonal antibodies. Assays based on basophil activation complement the measurement of specific IgE. With some allergens, particularly in cases of drug-induced allergy, flow cytometry has greater sensitivity than specific IgE determination. However, high concentrations of drugs can induce cell toxicity, and this may be confused with basophil activation. Cytometry can also be used to explore allergies with a cell-mediated mechanism. The detection of cytokine synthesis in T cells and basophils incubated with allergen is now technically feasible, but the usefulness of this procedure in the diagnosis of allergy remains to be demonstrated. We believe that the application of flow cytometry to the investigation of allergy is likely to increase.

© 2003 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Allergie ; Polynucléaire basophile ; Cytométrie de flux ; IgE ; CD63 ; CD203c

Keywords : Allergy ; Diagnosis ; Basophils ; Flow cytometry ; IgE ; CD63 ; CD203c

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : nissen.abuaf@tnn.ap-hop-paris.fr (N. Abuaf).

1. Rappels des fonctions, de l'origine et de la différenciation du polynucléaire basophile (PNB)

Mastocytes et PNB se caractérisent par la présence sur leur membrane de récepteurs à IgE de forte affinité (FcεRI), et de larges granulations cytoplasmiques présentant une métachromasie (certains colorants comme le bleu de toluidine, prennent une teinte azurophile).

PNB et mastocytes ont un précurseur commun. Sous l'effet de cytokines (IL-3, GM-CSF), il se différencie en progéniteur des PNB et des éosinophiles ou en progéniteur des mastocytes. Ce dernier à son tour sous l'effet des cytokines de son environnement (facteur de croissance des cellules souches SCF ou C-kit ligand, IL-4, et autres cytokines produites par les fibroblastes tissulaires) se transforme en mastocyte muqueux contenant seulement de la tryptase ou en mastocyte séreux contenant de la tryptase, de la chymase et de la carboxypeptidase [1]. Ces protéases ne sont pas trouvées dans le PNB des sujets normaux, mais la tryptase peut être présente chez les allergiques.

L'activation des mastocytes et des polynucléaires basophiles (PNB) classiquement provoque les réactions d'hyper-sensibilité immédiate. Des travaux récents ont montré que ces cellules interviennent aussi dans les réactions inflammatoires, l'immunité naturelle mais aussi dans les maladies auto-immunes [1,2]. Dans les modèles expérimentaux de maladies auto-immunes, les animaux dépourvus de mastocytes ne développent pas de maladie ou bien font une forme atténuée [2].

La gamme des médiateurs que ces cellules peuvent libérer est très vaste. Certains sont préformés et stockés dans les granulations comme l'histamine, des protéases, du TNFα. D'autres sont néoformés après activation : leucotriènes, prostaglandines et des cytokines Th1 et Th2, en particulier de l'IL-4. En synergie avec leur production de cytokines Th2, les mastocytes et les PNB sont aussi capables de polariser les lymphocytes Th0 en Th2, pérennisant les réactions allergiques [3]. Ces cellules auraient de surcroît la capacité de se transformer en cellules présentatrices d'antigène. Des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et des molécules de costimulation ont été détectées sur des cultures de mastocytes [4]. Toutes ces molécules, qu'il s'agisse de cytokines, de récepteurs ou de n'importe quelle autre molécule présente à la surface des PNB et des mastocytes, sont désormais accessibles à l'investigation par la cytométrie de flux. Dans les prochaines années nous connaissons mieux les différences entre les cellules des allergiques et celles des sujets non allergiques.

Les PNB possèdent la plupart des propriétés du mastocyte sauf en ce qui concerne les protéases (tryptase, chymase et carboxypeptidase), et en cas d'allergie, leur réactivité vis-à-vis d'un allergène est comparable. Ils sont de surcroît très accessibles, puisque localisés pour l'essentiel dans le sang, ce qui n'est pas le cas des mastocytes.

2. Conditions de l'activation du basophile « in vitro ex vivo »

L'activation nécessite la présence de calcium ionisé (l'EDTA est inhibiteur), et pour être optimale une température de 37 °C, car les PNB doivent avoir un métabolisme actif. L'allergène doit posséder au moins deux épitopes distincts pour pouvoir créer un pontage entre deux molécules d'IgE fixées sur les FcεRI. Ces récepteurs de type ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation module*), doivent être agrégés pour induire le signal d'activation. Cette condition n'est pas toujours remplie pour les allergènes médicamenteux. In vivo, on suppose que le médicament ou un de ses métabolites se couplent à des protéines porteuses pour être immunogène, mais aussi pour déclencher une réaction allergique. Les médicaments sont assimilés à des haptènes monovalents.

Mastocyte et PNB possèdent aussi des récepteurs pour les IgG, les FcγRIIb sont des récepteurs de type ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition module*) inhibant leur activation. Ce mécanisme permettrait d'expliquer l'effet bénéfique de la désensibilisation allergique spécifique, qui augmente le taux des anticorps IgG.

3. Rappels sur la cytométrie de flux et le ciblage des polynucléaires basophiles

Le cytomètre de flux est un appareil comportant cinq éléments :

- une fluidique pour déplacer les cellules dans un flux liquide ;
- un rayon laser ayant une longueur d'onde de 488 nm, obtenu par ionisation à un voltage très élevé, du gaz argon contenu dans un tube. Les appareils destinés à la recherche ont plusieurs rayons lasers avec des longueurs d'ondes différentes ;
- un système optique, pour le recueil et le filtrage en fonction de la longueur d'onde des signaux lumineux ;
- un appareillage électronique composé de photomultiplicateurs (PMT) pour transformer et amplifier les signaux optiques en signaux électroniques et numériques ;
- un ordinateur pour l'analyse et l'archivage des résultats.

Les cellules en traversant la trajectoire du rayon laser vont le diffracter (Fig. 1). La lumière émise perpendiculairement au rayon incident (grands angles ou *Side scatter* (SS)) et celle émise dans l'axe du rayon (petits angles ou *Forward scatter* (FS)) serviront à caractériser une cellule. FS renseigne sur la taille et SS sur la granulosité et la complexité. Ce principe est utilisé également dans les automates d'hématologie pour la numération des cellules. En cytométrie de flux, on analyse en plus la fluorescence des cellules (*fluorescence activated cell sorter* (FACS)). Celles-ci sont rendues fluorescentes soit par un colorant spécifique (par l'exemple le thiazole orange ou le bromure d'éthidium qui colorent l'ARN ou l'ADN), soit par des anticorps qui sont couplés à un fluorochrome. Les cytomètres modernes permettent d'analyser en routine simulta-

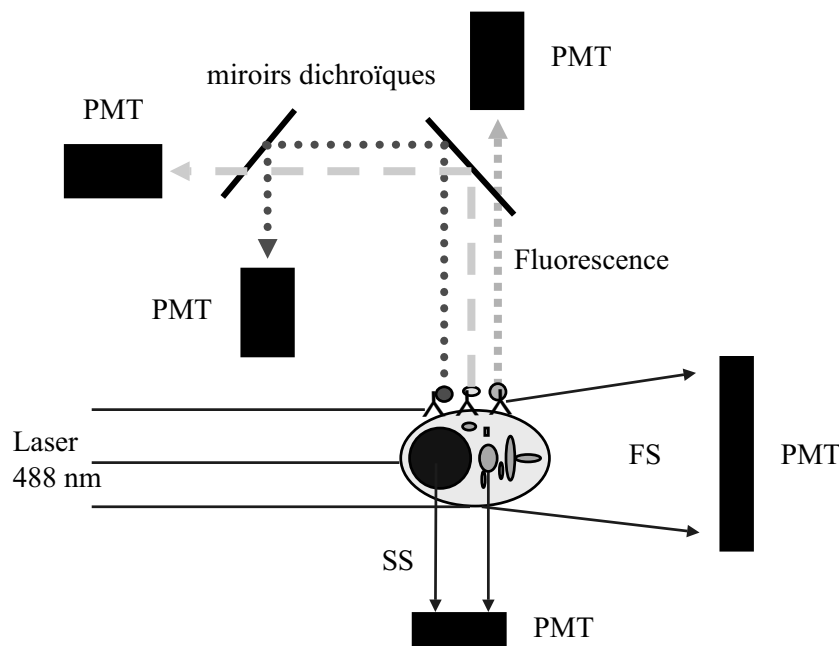


Fig. 1. Principes de l'analyse des cellules par cytométrie de flux. La cellule en mouvement dans un flux liquide, traverse le rayon laser et diffracte la lumière aux grands angles (SS) et aux petits angles (FS). FS est proportionnel à la taille de la cellule et SS à la granulosité. Des anticorps spécifiques de la cellule sont utilisés comme marqueurs. Les fluorochromes qui sont couplés aux anticorps, après excitation par le rayon laser, vont émettre des rayonnements fluorescents. Ceux-ci seront déviés et filtrés par un système associant miroirs dichroïques et filtres. Pour chaque longueur d'onde sélectionnée, un photomultiplicateur transformera les rayons lumineux en impulsions électroniques.

nément quatre fluorochromes différents. Chaque cellule est identifiée grâce à ses caractéristiques en FS, SS et la fluorescence émise par les anticorps qui se sont fixés sur sa membrane.

Sur l'histogramme FS/SS, les polynucléaires basophiles (PNB), se situent entre les lymphocytes et les monocytes. Pour bien les distinguer des autres cellules, il faut utiliser un anticorps spécifique, un anti-IgE, anti-récepteur de l'IgE ou un anti-CD203C (voir plus bas). En plus d'un anticorps spécifique on utilise aussi l'anticorps anti-CD45, marqueur des leucocytes, il permet d'exclure les globules rouges mal lysés, et les amas de plaquettes, qui n'expriment pas le CD45.

4. Détection des basophiles activés par cytométrie de flux

Après activation de ces cellules, des protéines stockées dans les granulations sont transloquées sur la membrane cytoplasmique (Figs. 2 et 3A). Des anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome sont utilisés pour détecter leur présence sur la membrane. C'est le cas du CD63 (gp53) [4–12], du CD203c (ectonucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3) [14,15] qui commencent à être utilisés couramment (Fig. 3B). Le CD203c est présent à l'état basal sur la membrane, mais il décuple en cas d'activation. On

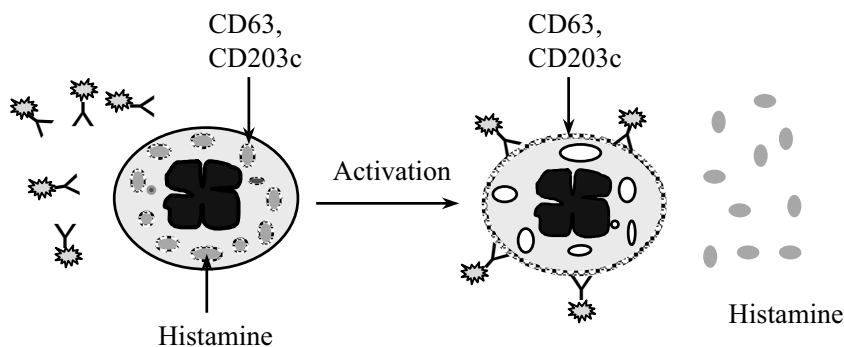
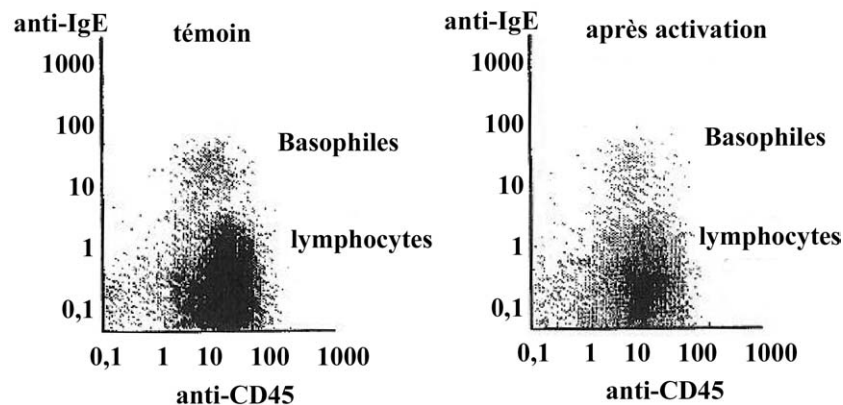


Fig. 2. Les marqueurs d'activation du polynucléaire basophile. L'histamine, le CD63 (gp 53) et le CD203c (une ecto-enzyme) sont stockés au niveau des granulations, ils ne sont pas accessibles aux anticorps. Après activation, l'histamine est libérée dans le surnageant tandis que le CD63 et le CD203c sont transloqués sur la membrane cytoplasmique. Les anticorps se fixent alors sur la cible exposée sur la membrane.

A-Ciblage des basophiles avec les anticorps anti-IgE et anti-CD45



B-Mesure de l'activation des basophiles avec l'anticorps anti-CD63

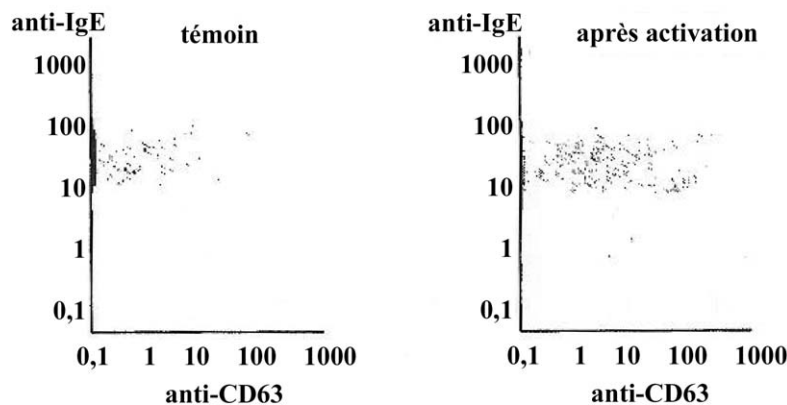


Fig. 3. Ciblage et mesure de l'activation du polynucléaire basophile (PNB).

A. Les PNB sont marqués et identifiés à l'aide des anticorps anti-IgE et anti-CD45. Le logiciel du cytomètre permet de construire une fenêtre d'intérêt ciblée sur les PNB. Ces cellules seront analysées séparément.

B. Les anticorps anti-CD63 (ou CD203c) permettront de détecter les PNB activés.

observe aussi une diminution de certaines molécules sur la surface de la membrane et c'est le cas des IgE (Fig. 3A) [16].

5. Matériel et méthodes

L'activation des PNB peut se faire sur sang total (avant lecture au cytomètre, les globules rouges sont lysés), sur la couche leucocytaire (buffy coat) après centrifugation du sang ou après fractionnement sur un gradient de densité (Ficoll). Nous avons opté pour cette dernière solution car cela réduit le bruit de fond dû aux autres cellules du sang [5]. En bref, des cellules mononuclées enrichies en PNB sont isolés sur un gradient de Ficoll ($d = 1,077$, Eurobio®, Les Ulis), à partir d'un prélèvement sur héparine. La concentration des leucocytes est ajustée à $10^7/\text{ml}$. Les cellules et les allergènes sont dilués dans du tampon phosphate salin (PBS pH 7,4) conte-

nant du calcium (1,2 mM) et du magnésium (2 mM) sous forme de chlorure et de l'albumine bovine à 0,2 %. Habituellement on test trois dilutions de l'allergène 1/10, 1/100, 1/1000. Cent μl de leucocytes ou de sang total, sont incubés 20 minutes à 37 °C, avec 100 μl de l'allergène. Après fixation avec 50 μl de paraformaldéhyde à 4 %, ils sont marqués avec des anticorps monoclonaux (10 μl de chaque) couplés à des fluorochromes. Dans les techniques sur sang total, la lyse des hématies se fait avant fixation. Il est important de respecter l'ordre indiqué. En effet si la fixation se fait après incubation avec les anticorps (comme c'est le cas dans les immunophénotypages lymphocytaires), on peut observer une activation non spécifique des PNB, car les anti-IgE sont d'excellents activateurs.

Le CD203c (Beckmann-Coulter) n'est disponible que couplé à la R-phycoérythrine, il n'est pas pour l'instant possible de réaliser un quadruple marquage anti-(CD45,

Tableau 1

Sensibilité et spécificité comparative des critères d'activation du basophile et des tests cutanés dans le diagnostic d'une allergie aux curarisants (21 allergiques et 29 témoins, résultats extrait de [6])

Indices	Cytométrie de flux altération des marqueurs des basophiles			Test cutané	
	CD63	sIgE*	CD45	Dilution du médicament 1/100 1/1000	
Sensibilité	0,64	0,52	0,43	1	0,57
Spécificité	0,93	0,96	0,93	0,63	1
Odds ratio	24	26	10	>>**	>>

* s : surface de la cellule. L'activation des basophiles entraîne la perte de l'IgE membranaire, et une augmentation de l'expression de CD63 et de CD45. Lorsque cette étude a été réalisée, l'anticorps anti-CD203c n'était pas encore disponible.

** Si la sensibilité ou la spécificité sont proches de 1, l'Odds ratio tend vers l'infini.

CD63, CD203c, IgE), on se satisfera des triples marquages suivants :

- pour la détection du marqueur d'activation CD63 :
 - un anticorps monoclonal anti-CD63 couplé à la fluorescéine ;
 - un anticorps monoclonal anti-CD45 couplé au tandem R-phycoérythrine-cyanine 5.1 ;
 - un anticorps polyclonal anti-IgE (Vector, Burlingame, CA) conjugué à la R-phycoérythrine par l'avidine biotine ;
- pour la détection du marqueur d'activation CD203c :
 - un anticorps monoclonal anti-CD203c marqué à la R-phycoérythrine ;
 - un anticorps monoclonal anti-CD45 couplé au tandem R-phycoérythrine-cyanine 5.1 ;
 - un anticorps polyclonal anti-IgE conjugué à la fluorescéine par l'avidine biotine.

L'activation des PNB est exprimée soit en pourcentage d'augmentation (Δf) de la moyenne de la fluorescence (mean fluorescence intensity) des PNB, soit en pourcentage de cellules (Δc) dépassant un niveau seuil de fluorescence (cut-off) choisi arbitrairement. Les critères d'activation utili-

sés dans la littérature sont avec les anticorps anti-CD63 et anti-CD203c, un $\Delta f \geq 15\%$ ou un $\Delta c \geq 10\%$, ou une baisse du nombre de cellules fortement marquées par l'anti-IgE, $\Delta c \geq 15\%$.

6. Contribution des tests d'activation des PNB au diagnostic d'une allergie

Si le dosage des IgE spécifiques reste la méthode la plus répandue pour la détection in vitro de l'hypersensibilité immédiate, les techniques cellulaires et plus particulièrement la cytométrie de flux, offrent des avantages dans certaines cas [5] (Tableau 1) :

- le dosage des IgE spécifiques n'est pas disponible, c'est souvent le cas pour les médicaments [6–10] (Tableau 1). Le test de dégranulation des PNB a été utilisé pour confirmer le diagnostic de kyste hydatique [17] ;
- les allergènes disponibles pour le dosage des IgE ne détectent pas tous les patients allergiques. Par exemple pour le latex et le cyprès, la sensibilité est meilleure en cytométrie de flux [11–13] (Tableaux 2, 3 et 4) ;

Tableau 2

Comparaison du test d'activation des basophiles in vitro déterminé par la mesure du sCD63, au dosage des IgE spécifiques

Allergie (référence)	Expression sur les basophiles de CD63 (%)		IgE spécifiques dans le sérum (%)	
	Sensibilité	Spécificité	Sensibilité	Spécificité
Alimentaires (8,9)	80–82	63–100	69–79	78
Latex* (11,12)	90–93	100	70–88	100
Pollen de cyprès* (13)	91	100	76	100
Myorelaxants (7)	54	100	62	100
β -lactamines (12)	42–50	93	25–39	86

* Lorsque ces travaux ont été faits, les allergènes disponibles pour le dosage des IgE ne permettaient pas de détecter tous les patients allergiques.

Tableau 3

Un nouveau marqueur d'activation des basophiles, le CD203c. Application au diagnostic in vitro de l'allergie aux hyménoptères. (Résultats extrait de [14])

Allergies	Patients	CD203c sur les basophiles (%)	IgE spécifiques dans le sérum* (%)	Test cutané (%)
Venin de guêpe**	26	22/26 (85)	24/26 (92)	25/26 (96)
Venin d'abeille**	5	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
Guêpe et abeille	8	8/8 (100)	8/8 (100)	7/7 (100)
Non allergiques	9	0/9 (0)	NF	NF

* IgE spécifiques $\geq$ classe I, dosées par UniCAP, Pharmacia Upjohn.

** Les basophiles ont été également testés avec des protéines purifiées de venin (Api m1, m2, m4, Ves v1, v2 et v5). À l'exception d'Api m4 toujours négatif, toutes les autres fractions sont positives à des degrés divers selon le patient.

Tableau 4

Un nouveau marqueur d'activation des basophiles, le CD203c, comparaison avec le CD63. Application au diagnostic in vitro de l'allergie au latex. (Résultats extrait de [15])

Groupes	Patients	CD203c sur les basophiles (%)	CD63 sur les basophiles (%)	IgE spécifiques dans le sérum* (%)
Allergie au latex**	16	12/16 (75)***	8/16 (50)	11/16 (69)
Non allergiques	11	0/11 (0)	0/11 (0)	0/11 (0)

* IgE spécifiques $\geq$ classe I, dosées par UniCAP, Pharmacia Upjohn.

** Les basophiles ont été incubés in vitro avec un mélange de deux extraits de latex, Stallergènes et Allerbio.

*** Le CD203c détecte en moyenne 2,2 fois plus de basophiles activés que le CD63.

- la présence d'IgE n'est pas toujours synonyme d'allergie, surtout si les anticorps ont une faible avidité. Des tests cutanés ou un test cellulaire positifs constituent une preuve plus directe ;
- la réaction d'hypersensibilité ne dépend pas de la présence d'IgE spécifiques [5]. Certaines molécules sont histaminolibératrices, elles activent les PNB par d'autres récepteurs. C'est le cas par exemple des opiacés, de la vancomycine ou des curarisants à forte concentration [18].

7. Comparaison des méthodes de détection de l'activation « in vitro ex vivo » des basophiles

L'activation du PNB peut être mis en évidence par différentes méthodes. Le test de dégranulation des PNB (TDBH) a été progressivement abandonné par manque de fiabilité. Ces cellules étant rares, le nombre de PNB comptés au microscope était souvent insuffisant.

Ce biais n'existe pas en cytométrie, plusieurs centaines de PNB peuvent être comptés. De plus, les cellules activées sont directement détectées, ce qui présente un avantage sur le TDBH et sur le test d'histaminolibération qui ignore l'état des PNB. En effet la libération de l'histamine peut être la conséquence d'une activation, d'une mauvaise conservation du prélèvement ou d'une toxicité d'une molécule. Cela est important lorsqu'on teste un médicament à forte concentration.

L'utilisation du sCD63 comme marqueur d'activation des PNB a constitué un réel progrès. Néanmoins la sensibilité de ce marqueur restait un peu en retrait par rapport au test cutané. Le sCD203c aurait une sensibilité supérieure, il permet de détecter deux fois plus de basophiles activés, et par conséquent le nombre de patients allergiques détectés par la cytométrie augmenterait ([15] et Tableau 4). Si le sCD203c semble un bon marqueur d'activation, en revanche son taux d'expression est trop faible sur les basophiles non activés de certains patients [15]. Il ne peut donc être utilisé pour cibler tous les basophiles et cela est en contradiction avec des travaux récents [14]. D'autres marqueurs comme les anticorps anti-IgE ou anti-Fc ϵ RI doivent être utilisés conjointement, pour une bonne identification des PNB.

8. Les inconvénients et les limites de la cytométrie de flux

L'achat et l'entretien d'un cytomètre de flux sont coûteux. Mais la polyvalence de cet équipement en routine en immunologie (immunophénotypage des lymphocytes, CD4/CD8 et autres marqueurs, typage HLA), en hématologie (immunophénotypage des leucémies, taux des réticulocytes ou des plaquettes réticulées, étude des glycoprotéines plaquettaires), en oncologie (cycle cellulaire, contenu en ADN) permettent d'amortir son coût.

Dans le diagnostic d'une allergie, cette méthode n'est pas exempte d'écueils dont certains sont communs aux tests cellulaires et d'autres spécifiques de la cytométrie. Pour pouvoir activer les basophiles, l'allergène doit posséder au moins deux épitopes distincts pour pouvoir créer un pontage entre deux molécules d'IgE fixées sur les Fc ϵ RI. Les allergènes qui ne remplissent pas cette condition ne peuvent être explorés. Certains allergènes, en particulier médicamenteux, peuvent se coupler in vivo à des protéines porteuses et de ce fait satisfaire à cette condition. L'albumine a été utilisée in vitro, mais les résultats restent peu convaincants.

À forte concentration l'allergène, surtout s'il s'agit d'un médicament, peut être toxique. Les marqueurs d'activation CD63 ou CD203C, stockés au niveau des granulations peuvent devenir accessibles aux anticorps monoclonaux, si la cellule devient perméable. Le signal qui en résulte sera alors semblable à celui observé après activation, bien que ces marqueurs n'aient pas été transloqués sur la membrane cellulaire.

Les amas de plaquettes, présents spontanément ou après activation des PNB (libération de PAF qui aggrège les plaquettes) constituent aussi une source d'erreur car ils peuvent exprimer les marqueurs d'activation des PNB (le CD63 a été décrit d'abord sur les plaquettes activées). D'autres leucocytes après activation, expriment aussi à des degrés divers ces marqueurs, d'où la nécessité d'un bon ciblage des PNB. C'est la raison pour laquelle nous utilisons l'anti-CD45, marqueur leucocytaire absent des plaquettes, et préférons fractionner les leucocytes sur gradient de Ficoll, plus long que les techniques sur sang total. Ces dernières ont l'avantage d'être plus rapides dans leur exécution, mais l'interprétation des résultats peut être plus délicate car le bruit de fond est plus élevé.

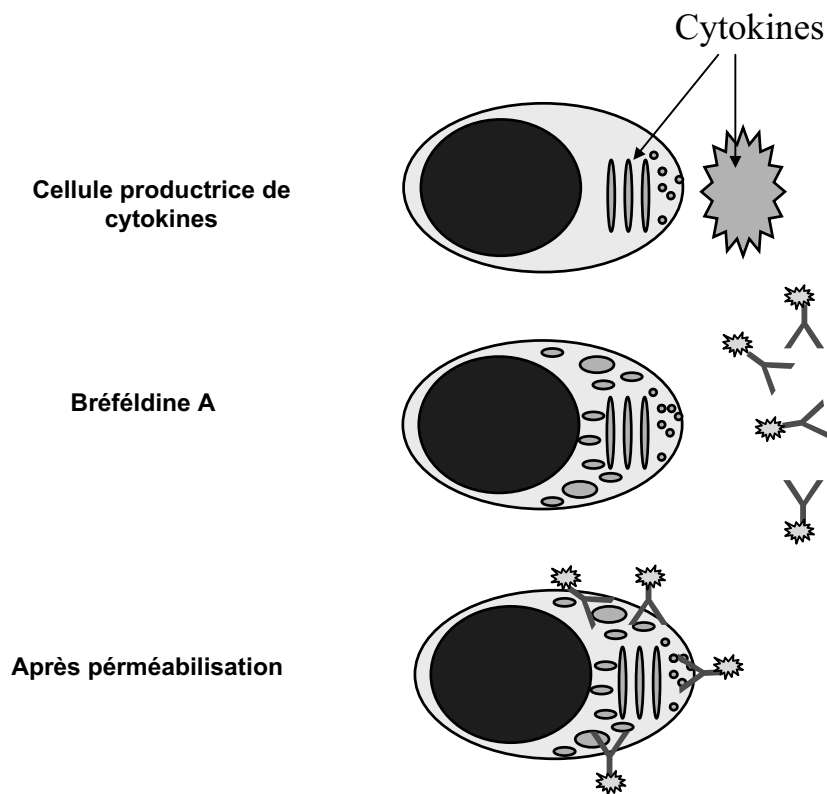


Fig. 4. Numération des cellules productrices de cytokines. Après activation les lymphocytes T et les PNB synthétisent et sécrètent des cytokines. Lorsque les cellules sont cultivées en présence de bréfédine A ou de monensine, les cytokines s'accumulent dans le cytoplasme. À ce stade les cytokines sont inaccessibles aux anticorps. Après perméabilisation des cellules, les anticorps pénètrent dans le cytoplasme et se fixent sur les cytokines.

Après un accident allergique on observe une diminution des PNB, mais la mise en évidence des PNB activés *in vivo* s'est révélée infructueuse, car il semble que les PNB activés ne circulent pas (ou pas assez longtemps) dans le sang périphérique. Ce point mérite d'être confirmé avec les nouveaux marqueurs qui sont disponibles.

9. Les nouvelles applications de la cytométrie de flux pour l'exploration de l'allergie : numération des cellules productrices de cytokines Th2

L'hypersensibilité immédiate n'est pas le seul mécanisme intervenant au cours des allergies médicamenteuses. L'immunité cellulaire est impliquée dans certaines toxidermies induites par les β -lactamines [19] ou par d'autres médicaments. On peut détecter ce type d'immunisation vis-à-vis d'un allergène par l'apparition de marqueurs d'activation sur les lymphocytes T ou par la production de cytokines. Après culture en présence du médicament, les lymphocytes sont incubés pendant quatre heures avec la bréfédine A ou avec la monensine, poisons agissant au niveau de l'appareil de Golgi. Les protéines, et les cytokines en particulier, ne sont plus sécrétées et s'accumulent dans le cytoplasme (Fig. 4). La perméabilisation de la cellule, permet ensuite la pénétration des anticorps et le marquage des cytokines intracytoplasmiques. La même technique est utilisée pour analyser la production de cytokines Th2, l'IL-4 ou l'IL-13 par les PNB [20].

Pour l'exploration d'une allergie *in vitro*, la cytométrie de flux a rendu accessible des tests cellulaires pratiqués jusque là par des laboratoires de recherche. Dans le bilan d'une allergie de type immédiat, les tests sur les basophiles sont un complément au dosage des IgE spécifiques et sans doute indispensables pour le diagnostic de l'allergie aux médicaments. Les tests d'activation des basophiles et de numération des cellules productrices de cytokines sont appelés à se développer.

Références

- [1] Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev* 2000;173:131–40.
- [2] Benoist C, Mathis D. Mast cells in auto-immune disease. *Nature* 2002;426:875–8.
- [3] Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:847–59.
- [4] Mécheri S. New insights into the immunoregulatory functions of mast cells. *Rev Fr allergol Immunol Cli* 2002;42:6–10.
- [5] de Weck AL, Sanz ML. Flow cytometric cellular allergen stimulation test (Fast/Flow-CAST). Technical and clinical evaluation of a new diagnostic test in allergy and pseudo-allergy. *ACI International* 2002; 14:204–15.
- [6] Abuaf N, Rajoely B, Ghazouani E, Levy D, Pecquet C, Chabane H, et al. Validation of a flow cytometric assay detecting *in vitro* basophil activation for the diagnosis of muscle relaxant allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:411–8.

- [7] Monneret G, Benoit Y, Debard AL, Gutowski MC, Topenot I, Bienvenu J. Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drug. *Clin Immunol* 2002;102:192–9.
- [8] Moneret-Vautrin D, Sainte-Laudy J, Kanny G, Frémont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;82:33–40.
- [9] Garcia-Aviles C, Sanchez –Lopez G, Sanz ML, Uasuf C, Dieguez I, Chazot M, et al. Flow cytometric allergen stimulation test (FAST) in the in vitro diagnosis of food allergy. *Allergy* 2000;55(Suppl 63):128.
- [10] Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiry M. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1166–71.
- [11] Sainte-Laudy J, Vallon C, Guérin JC. Diagnosis of latex allergy: comparison of histamine release and flow cytometric analysis of basophil activation. *Inflamm Res* 1996;45(Suppl 1):S35–6.
- [12] Sanz ML, Maselli JP, Gamboa PM, Garcia-Aviles C, Oehling A, Dieguez I, et al. Flow-cytometric basophil activation test. A review. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2002;12:143–54.
- [13] Pâris-Köhler A, Demoly P, Persi L, Lebel B, Bousquet J, Arnoux B. In vitro diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorimetric analysis of basophils (Basotest). *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:339–45.
- [14] Binder M, Fierlbeck G, King TP, Valent P, Bühring HJ. Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:160–8.
- [15] Boumiza R, Monneret G, Forissier MF, Savoye J, Gutowski MC, Powell WS, et al. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD 63.
- [16] Gane P, Pecquet C, Lamblin P, Abuaf N, Leynadier F, Rouger P. Flow cytometric evaluation of human basophils. *Cytometry* 1993;14:344–8.
- [17] Leynadier F, Luce H, Abrego A, Huguier M, Dry J, et al. Human basophil degranulation test in diagnosis of hydatidosis. *Br Med J* 1980;280:1251–2.
- [18] Abuaf N, Rajoely B, Pecquet C, Leynadier F. Les myorelaxants (MR) à forte concentration activent les basophiles des sujets non allergiques. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2001;41:132.
- [19] Pavodan E, Bauer T, Tongio MM, Kalbacher H, Weltzien HU. Penicilloyl peptides are recognized as T cell antigenic determinants in penicillin allergy. *Eur J Immunol* 1997;27:1303–7.
- [20] Devouassoux G, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD, Prussin C. Frequency and characterization of antigen-specific IL-4 and IL-13-producing basophils and T cells in peripheral blood of healthy and asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:811–9.