



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

REVUE FRANÇAISE
D'**Allergologie**

Revue française d'allergologie xxx (2013) xxx-xxx

Article original

Activation des polynucléaires (basophiles, neutrophiles et éosinophiles) par les allergènes alimentaires dans les allergies alimentaires IgE dépendantes de l'enfant

*Activation of polymorphonuclear leukocytes (basophils, neutrophils and eosinophils)
by food allergens in IgE-dependant food allergy in children*

A. Masson^{a,*}, C. Ménétrey^{a,b}, C. Bahans^{a,b}, J. Sainte-Laudy^c

^a Service de pédiatrie, hôpital Mère-Enfant, CHU de Limoges, 8, rue Dominique-Larrey, 87000 Limoges, France

^b Comité de l'HME pour la recherche clinique, CHREC, 87000 Limoges, France

^c Laboratoire d'immunologie, CHU de Dupuytren, 2, avenue Martin-Luther-King, 87000 Limoges, France

Reçu le 24 janvier 2013 ; accepté le 19 août 2013

Résumé

But de l'étude. – Étudier, dans une population pédiatrique présentant des signes cliniques et biologiques d'allergie alimentaire IgE dépendante, l'expression différentielle de marqueurs d'activation par les basophiles, les neutrophiles et les éosinophiles.

Patients et méthodes. – Analyse de l'activation cellulaire par cytométrie en flux (CMF) pour les allergènes les plus fréquents (arachide, lait, œuf, noix et crevette). Cette activation a été analysée avec plusieurs marqueurs : le CD63 et le CD11b pour les basophiles et le CD11b pour les éosinophiles et les neutrophiles.

Résultats. – Au total 55/79 enfants avaient une CMF positive pour au moins un allergène. L'expression du marqueur d'activation CD11b impliquait plus fréquemment l'ensemble des polynucléaires ($p = 0,0036$). L'expression du marqueur CD11b était plus fréquemment observée dans le groupe eczéma que dans le groupe urticaire ($p = 0,01$). Pour un seuil de positivité de 12 % CD63, il existait un lien significatif ($p < 0,001$) entre le TPO et l'expression du CD63 par les basophiles. L'expression du CD11b est plus fréquente pour les TPO négatifs ($p < 0,02$).

Conclusion. – Le CD11b est une intégrine non encore étudiée en tant que marqueur d'activation allergène dépendante pour les polynucléaires. Notre étude a montré que l'expression du marqueur CD11b par les éosinophiles et les neutrophiles peut-être le résultat d'une activation par l'allergène et IgE dépendante confirmée par la surexpression du marqueur CD11b. La relation inverse entre l'expression du CD63 et du CD11b dans l'urticaire et la dermatite atopique permet de faire l'hypothèse d'une éventuelle migration tissulaire des leucocytes et en particulier des basophiles.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Cytométrie en flux ; Allergie alimentaire ; Test d'activation des polynucléaires ; Basophiles ; Neutrophiles ; Éosinophiles ; CD11b ; CD63

Abstract

Aim of the study. – To analyze the differential expression of activation markers in basophils, neutrophils and eosinophils in a pediatric population with clinical and laboratory evidence of IgE-dependent food allergy.

Methods. – Cell activation by the most common food allergens (peanut, milk, egg, hazel nuts and shrimp) was analyzed by flow cytometry (FC) with multiple markers: CD63 and CD11b for basophils and eosinophils and CD11b for neutrophils.

Results. – Fifty-five of the 79 children included in the study had a positive FC result for at least one food allergen. The activation marker CD11b was expressed more often in all three of the polymorphonuclear cells ($p = 0.0036$). This marker was found more often in the eczema group than in the rash group ($p = 0.01$). For a threshold of 12% CD63 positivity, there was a significant relationship ($p < 0.001$) between the oral food challenge

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : alexmass13@gmail.com (A. Masson).

(OFC) test results and the expression of CD63 by basophils. The expression of CD11b was more frequent in subjects with a negative OFC ($p < 0.02$).

Conclusion. – CD11b integrin had not been investigated previously as a possible allergen-dependent activation marker for polymorphonuclear leukocytes. Our study showed that the expression of CD11b by eosinophils and neutrophils may be the result of activation by allergen, and that its IgE dependence was confirmed by overexpression of this marker. The inverse relationship between the expression of CD63 and CD11b in urticaria and atopic dermatitis suggests that they may be involved in the migration of leukocytes, basophils in particular, into affected tissues.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Food allergy; Children; Basophils; Neutrophils; Eosinophils; CD11b; CD63; Leukocyte activation; Flow cytometry

1. Introduction

L'allergie alimentaire se définit par une réaction clinique néfaste à un aliment et résulte d'une réponse immunitaire spécifique d'un allergène alimentaire donné [1]. Cette réponse d'hypersensibilité immunitaire peut être médiée par les IgE, réaction la plus généralement explorée, mais l'activation des autres cellules impliquées dans les hypersensibilités immunitaires (mastocytes, basophiles, éosinophiles et neutrophiles) [2] peut également être médiée par d'autres anticorps tels que les IgG et les IgA, l'anaphylaxie induite par les IgG ayant d'ailleurs été récemment décrite [3–5]. Jusqu'à présent la notion d'intervention des neutrophiles et des éosinophiles dans les hypersensibilités de type IV n'a été publiée que pour les médicaments. La prévalence des allergies alimentaires immédiates ne cesse d'augmenter depuis ces dernières années dans la population pédiatrique [6–8]. En France, la prévalence de l'allergie alimentaire chez l'enfant est de 4,7 %. Afin de confirmer ces allergies, les tests diagnostiques se sont multipliés et la prise en charge est aujourd'hui bien standardisée [7]. Le diagnostic allergologique repose sur l'association de signes cliniques, des prick-tests, du dosage des IgE spécifiques [1,9] et des tests cellulaires avec notamment le test d'activation des basophiles en allergologie. Ce dernier s'est développé depuis une quinzaine d'années [10–12]. Dans le cas de discordances entre les données cliniques et les autres paramètres du bilan allergologique, l'examen de référence est le Test de provocation oral en double aveugle (TPODA) [13]. Cependant, les tests utilisés en pratique sont réalisés en simple aveugle.

Jusqu'à présent, parmi les polynucléaires, seuls les basophiles étaient étudiés par cytométrie en flux dans un but diagnostique. Cependant, l'implication d'une activation des éosinophiles et/ou des neutrophiles est aujourd'hui souvent suspectée, y compris dans les hypersensibilités d'origine alimentaire [8,14,15]. L'expression du récepteur de haute affinité pour l'IgE sur ces cellules permettant en outre de faire l'hypothèse d'une activation IgE dépendante [16,17]. La présence de ce récepteur à la surface des cellules est inconstante mais le fait que sa présence soit démontrée permet d'en faire l'hypothèse.

Dans le cadre d'une étude pilote, nous avons analysé l'activation allergène dépendante des trois types de polynucléaires (basophiles, éosinophiles et neutrophiles) par cytométrie en flux dans une population d'enfants présentant des signes cliniques et biologiques d'hypersensibilité IgE dépendante et recherché une éventuelle corrélation entre les

manifestations cliniques initiales et l'activation de ces trois types cellulaires.

2. Matériel et méthode

2.1. Sélection des patients

Nous avons réalisé une étude rétrospective monocentrique sur une période de 1 an à l'hôpital de la Mère et de l'Enfant de Limoges (du 1/06/2010 au 5/07/2011). La population étudiée était composée d'enfants présentant des signes cliniques d'allergie alimentaire immédiate. Seuls les allergènes considérés comme les plus fréquents dans notre population ont été retenus : arachide, lait, œuf, noisette et crevette.

Du 1/06/2010 au 5/07/2011, 79 enfants ont été inclus dans cette étude : 46 garçons et 33 filles. La médiane d'âge était de 6 ans (2 mois–17 ans). Les patients ont été différenciés en fonction de leurs symptômes : asthme, eczéma, œdème laryngé, choc anaphylactique, urticaire, rhinoconjonctivite, syndrome oral et troubles digestifs.

2.2. Analyse cytométrique

L'analyse cytométrique des polynucléaires était basée sur la sélection des basophiles et des éosinophiles par l'expression à haute densité du marqueur CCR3 (récepteur de l'eotaxine) sur ces deux types cellulaires, sur l'élimination des cellules contaminantes par marquage par un anti-IgE et sur la quantification de l'activation des basophiles par l'expression du marqueur CD63 [18] et de l'activation des neutrophiles et des éosinophiles par l'expression du marqueur CD11b [19,20]. Le CD63 est exprimé de novo sur les basophiles activés tandis que le CD11b est exprimé sur la membrane des basophiles, des neutrophiles et des éosinophiles au repos et est sur-exprimé après activation.

Le sang total prélevé sur EDTA (25 µL dilué dans 50 µL de tampon d'activation contenant 2 ng/mL d'IL3) était mis en contact soit avec 25 µL de 4 dilutions successives de l'extrait glyciné de l'aliment testé (Extrait pour prick, laboratoire Stallergènes, France) soit avec 25 µL des témoins positifs (anti-IgE spécifique du domaine D2 0,5 µg/mL [Coulter, États-Unis]), fMLP 10⁻⁷ M (laboratoire Sigma, France), soit avec 25 µL de tampon d'activation seul (2 témoins négatifs permettant de quantifier l'activation spontanée). Le délai entre le recueil et l'analyse devait être de 4 h maximum. Les dilutions étaient réalisées en tampon d'activation. Le mélange des anticorps anti-

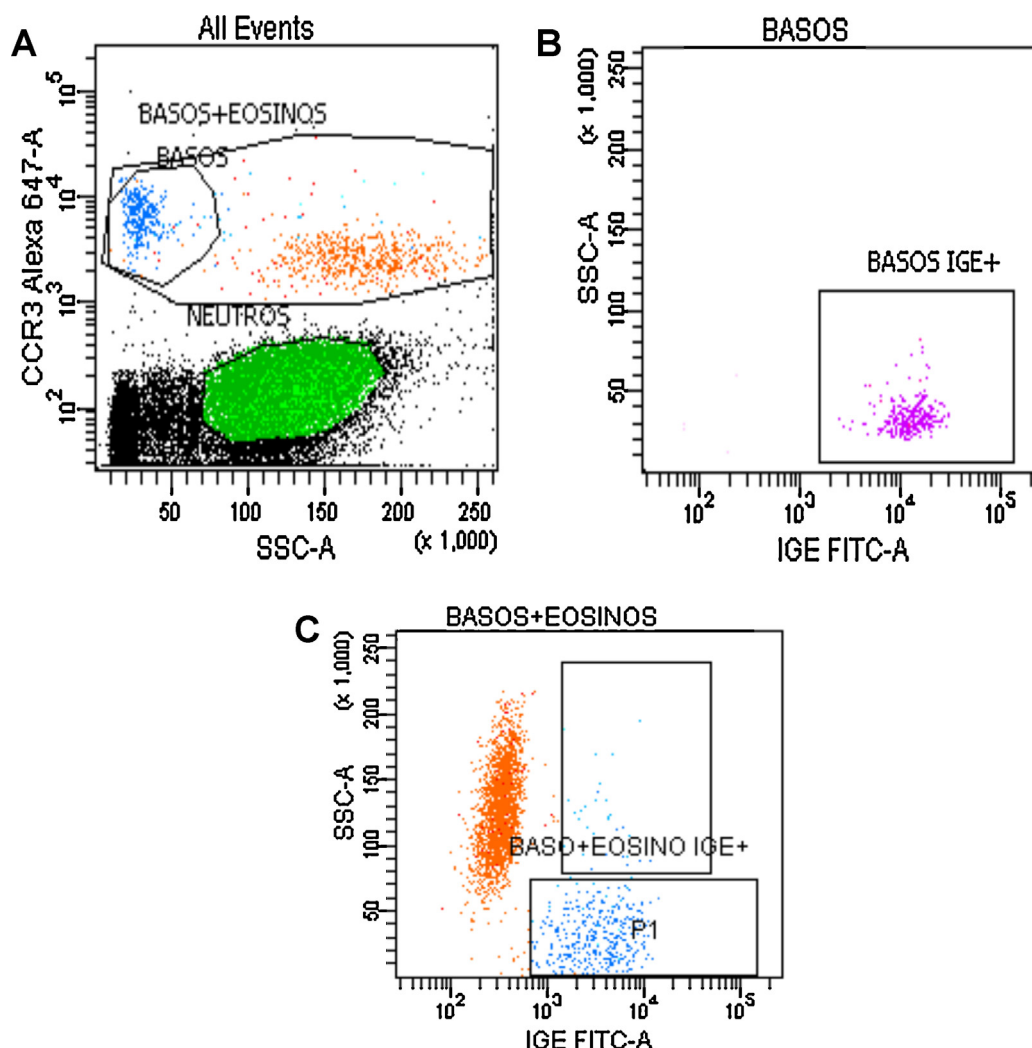


Fig. 1. Sélection des différentes populations cellulaires étudiées. Les basophiles et les éosinophiles correspondent aux deux populations CCR3+/SSC faible et fort (A) et les neutrophiles correspondent à la population CCR3-/SSC fort (B). Les basophiles CCR3+/SSC fort/IgE++ sont sélectionnés par marquage anti-IgE (C).

CD63 PE (Beckman, États-Unis) et anti-CCR3 Alexa 647 (Biolegend, États-Unis) était ajouté au milieu d'incubation préalablement à l'incubation à 37 °C (30 min au bain-marie). Après addition de 50 µL de tampon d'arrêt (contenant de l'EDTA) 10 µL d'un mélange d'anticorps contenant un anti-CD11b PC7 (BD Pharmingen, États-Unis) et un anti-IgE FITC (Interchim, France) étaient ajoutés. Les suspensions cellulaires étaient incubées 15 min à température ambiante et à l'obscurité. Les érythrocytes étaient lysés par addition de 1 mL de tampon de lyse (10 min à température ambiante). Après centrifugation (1800 t/min, 5 min) le culot cellulaire était repris par 350 µL de tampon EDTA. L'activation des basophiles était analysée par cytométrie en flux (cytomètre Canto[®], Beckton Dickinson, États-Unis) par expression du CD63 sur la population cellulaire (CCR3+, anti-IgE +), l'expérience ayant montré que des basophiles majoritairement CD63+ étaient observés dans la fenêtre « éosinophile » (résultats non publiés), l'activation des neutrophiles et des éosinophiles par expression de CD11b sur la population des polynucléaires du dot-plot taille/structure respectivement CCR3- et CCR3+ (Fig. 1).

Les résultats étaient exprimés en pourcentage de cellules CCR3+/IgE+/CD63+ (basophiles) situées dans la fenêtre CCR3+ et en pourcentage de cellules CCR3+/CD11b+ pour les éosinophiles et CCR3-/CD11b+ pour les neutrophiles situées dans la fenêtre polynucléaires du dot plot taille/structure (Fig. 2). Le logiciel utilisé était le logiciel FACS DIVA.

Le seuil de positivité déterminé par les études statistiques préalables des auteurs, et conforme à la littérature pour les basophiles, est de 5 % pour les basophiles et à 2 % pour les neutrophiles et les éosinophiles. Une étude complémentaire du seuil retenu pour les neutrophiles et les éosinophiles par rapport à des sujets non allergiques a été réalisée.

Les critères de validation retenus sont les suivants :

- comptage de plus de 300 basophiles, 1000 éosinophiles et 10 000 neutrophiles ;
- stimulation spontanée < 15 % CD63 ou CD11b ;
- stimulation des basophiles par l'anti-IgE > 15 %.

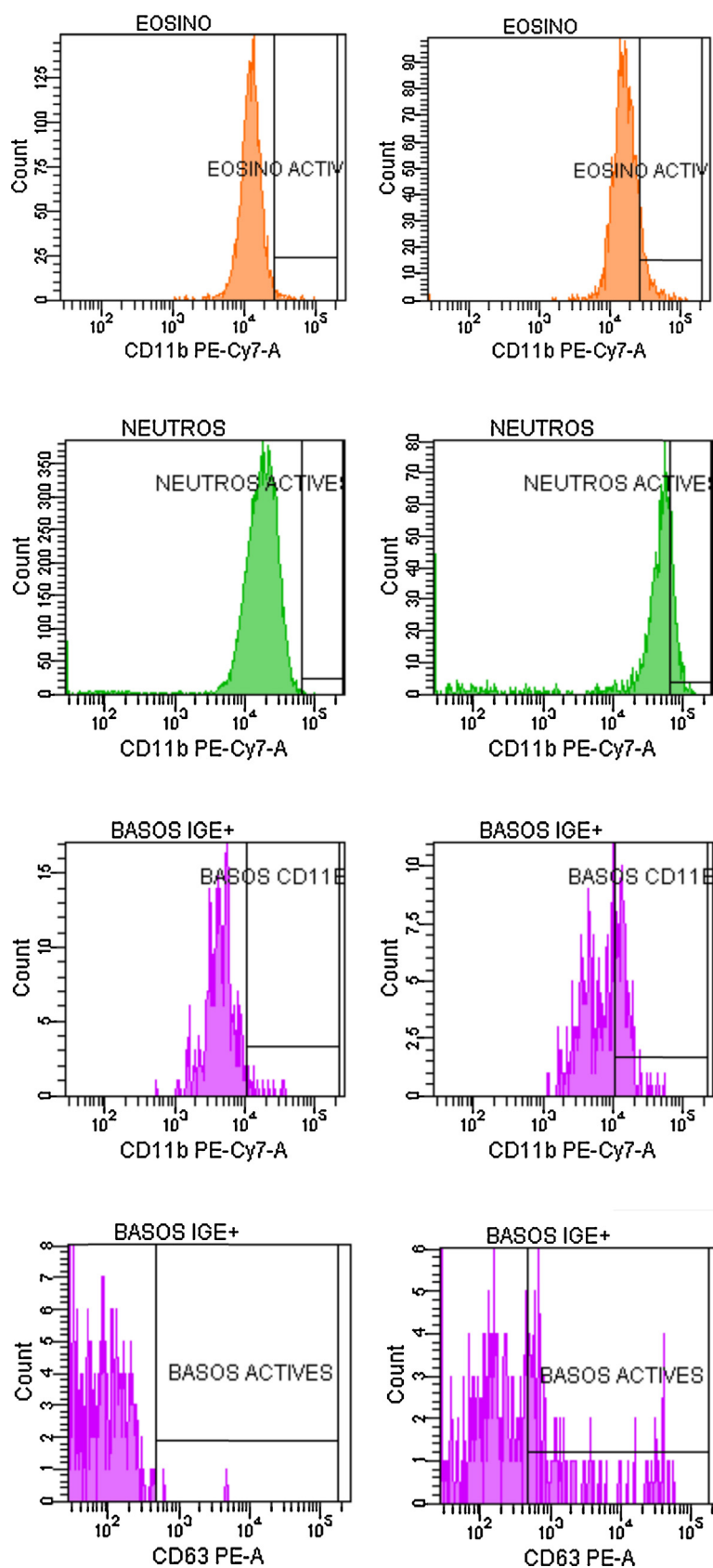


Fig. 2. Graphes représentant les trois types cellulaires étudiés, de haut en bas, les éosinophiles, les basophiles et les neutrophiles, à gauche avant (stimulation spontanée) et à droite après activation par le fMLP. L'expression de CD11b est caractérisée, pour les éosinophiles et les neutrophiles, par un déplacement global de la population, tandis que l'expression du CD63 sur les basophiles est bimodale.

Tableau 1

Résultats obtenus pour une population de 10 sujets contrôles et chez 10 sujets allergiques à l'arachide. Les valeurs correspondant aux stimulations par le Fmlp, l'anti-IgE et l'allergène (maximum d'activation) correspondent aux pourcentages d'expression du CD11b après déduction de la stimulation spontanée (T0). Significativité calculée par le test de Mann et Whitney.

	Contrôles				Allergiques			
	T0	Fmlp	Anti-IgE	Allergène	T0	Fmlp	Anti-IgE	Allergène
<i>Neutrophiles</i>								
Moyenne	0,76	29,89	0,12	0,24	3,06	65,96	5,20	11,28
Écart-type	0,74	25,60	0,07	0,25	3,46	21,11	4,31	4,04
Significativité					0,027	0,020	0,006	< 0,001
<i>Éosinophiles</i>								
Moyenne	1,39	5,48	0,34	0,86	3,10	13,67	2,97	7,90
Écart-type	0,74	5,51	0,27	0,44	1,78	8,99	1,92	4,80
Significativité					0,220	0,080	0,018	< 0,001

Un test positif correspond à une activation supérieure au seuil indiqué pour au moins deux dilutions successives de l'allergène testé.

3. Statistiques

Les résultats des variables quantitatives sont présentés sous forme de moyenne et écart-type, médiane et extrêmes, et ceux des variables qualitatives exprimés en pourcentages. La comparaison des données brutes a été réalisée par le test de Mann et Whitney et les comparaisons de pourcentages ont été réalisées à l'aide du test du χ^2 de Pearson ou du test exact de Fisher pour les petits effectifs.

Le seuil de significativité retenu pour l'ensemble des analyses est de 5 %.

4. Résultats

4.1. Études statistiques des seuils de positivité des neutrophiles et des éosinophiles

Les résultats obtenus chez 10 patients allergiques à l'arachide ont été comparés à ceux obtenus chez 10 patients non allergiques (histoire clinique, tests cutanés, IgE spécifiques, activation des basophiles négatifs). Les résultats (Tableau 1) montrent, d'une part, que l'expression du CD11b par les neutrophiles et les éosinophiles induite par l'allergène chez les patients non allergiques est systématiquement inférieure à 2 % et que, chez les allergiques, les réponses

à l'anti-IgE et à l'allergène sont significativement plus élevées pour le neutrophile et l'éosinophile, la réponse au Fmlp étant en outre significativement plus élevée pour le neutrophile.

4.2. Contrôles positifs (anti-RlgE et anti-IgE)

L'anti-IgE utilisé comme témoin positif a conduit à une expression du marqueur CD63 > 15 % par les basophiles dans 60/79 cas. Parmi ces 60 cas, une expression du marqueur CD11b > 5 % pour les basophiles et > 2 % pour les neutrophiles et les éosinophiles a été observée respectivement dans 65 %, 45 % et 40 % des cas.

Dans les 19 cas pour lesquels l'expression du CD63 par le basophile est < 15 %, une expression significative du CD11b a été observée par les basophiles, les neutrophiles et les éosinophiles dans respectivement 21 %, 21 % et 28 % des cas.

Dans notre étude, 34 % des éosinophiles et 28,6 % des neutrophiles étaient activables par l'anti-IgE.

4.3. Activation allergène dépendante

4.3.1. Analyse globale

Vingt-trois enfants ayant été testés pour plusieurs allergènes différents, le nombre de tests d'activation des polynucléaires (TAP) ($n = 113$) était supérieur au nombre de patients de l'étude ($n = 79$). Parmi ces 79 patients, 55 avaient un test positif pour au moins un allergène et pour au moins un type cellulaire soit 77 TAP positifs (Tableau 2).

Tableau 2

Répartition des résultats de l'analyse par cytométrie en flux (CMF) de l'activation des trois types cellulaires (le test est considéré positif lorsque l'activation d'un type cellulaire au moins est positive) et pour chaque allergène testé chez les enfants ayant un diagnostic bio-clinique d'allergie alimentaire positif.

	Total des tests	Nombre de test	Test négatif	Test in-interprétable	Test positif
Arachide	113 CMF (79 enfants)	39	3	5	31
Crevette		5	1	0	4
Œuf		23	8	2	13
Noisette		22	5	4	13
Lait		24	5	3	16
				Total positif	77

Tableau 3

Pourcentages de tests positifs, pour chaque type cellulaire analysé et pour l'ensemble des allergènes testés.

Activation des basophiles % (nb CMF)	94,8 % (73/77)	Marqueur d'activation CD63	94,5 % (69/73)
		Marqueur d'activation CD11b	54,8 % (40/73)
		Marqueurs d'activation CD63 et CD11b	49,3 % (36/73)
		Marqueur exclusif d'activation CD63	45,2 % (33/73)
		Marqueur exclusif d'activation CD11b	5,5 % (4/73)
Activation exclusive des basophiles % (nb CMF)	48 % (37/77)	Marqueur d'activation CD63	67,6 % (25/37)
		Marqueur d'activation CD11b	5,4 % (2/37)
		Marqueurs d'activation CD63 + CD11b	27 % (10/37)
Activation des trois types cellulaires % (nb CMF)	24,7 % (19/77)		
Activation exclusive des neutrophiles % (nb CMF)	2,6 % (2/77)		
Activation exclusive des éosinophiles % (nb CMF)	2,6 % (2/77)		

CMF : cytométrie en flux ; nb : nombre.

Parmi les 77 TAP positifs, 73 étaient positifs par activation des basophiles quelle que soit l'activation des éosinophiles et/ou des neutrophiles (52 enfants). Cette activation cellulaire était majoritairement représentée par une expression du marqueur CD63 (69 TAP, 50 enfants). La sensibilité calculée par rapport au TPO simple aveugle était de 92 %.

Lorsque le TAP était positif par expression sur les basophiles du marqueur CD11b (40 cytométries, 33 enfants), la réponse était, de même, majoritairement positive par activation des éosinophiles et/ou des neutrophiles ($p = 0,0036$). En effet, sur ces 40 TAP, 27 étaient positifs par activation des neutrophiles et/ou des éosinophiles (21 enfants, 63,6 %) et 13 cytométries n'étaient positives que par activation des basophiles (12 enfants, 36,4 %). Ces résultats sont représentés dans le [Tableau 3](#).

D'un point de vue clinique, les manifestations prépondérantes étaient l'urticaire et l'eczéma. Concernant l'urticaire, 18 enfants (22 TAP) n'avaient pas d'autres signes cliniques ([Tableau 4](#)). Pour l'eczéma, 11 enfants (17 TAP) n'avaient pas d'autres manifestations ([Tableau 5](#)). Une activation des trois types cellulaires était observée dans 3/22 cas dans le groupe urticaire et dans 7/17 cas dans le groupe dermatite atopique. Cette différence était significative (χ^2 , $p = 0,01$).

Lorsque l'activation impliquait les trois types cellulaires (19 TAP, 13 enfants), la réponse des basophiles était en CD63 et en CD11b dans 85 % des cas (16 TAP sur 19, 11 enfants). Pour 4 enfants (4 TAP) l'activation des basophiles ne s'exprimait que par le marqueur CD11b quelle que soit l'activation des éosinophiles ou des neutrophiles. Pour 3 enfants, cette activation était pour le lait et dans 1 cas la réponse était pour l'arachide. Il n'existait pas de spécificité clinique pour ces 4 enfants.

Pour 2 enfants (2 TAP), l'activation s'exprimait exclusivement par les basophiles en CD11b. Ces deux enfants n'étaient pas testés pour le même allergène (lait et arachide) et les signes cliniques étaient différents avec un enfant présentant une urticaire et l'autre un eczéma.

La réponse exclusive par l'activation des éosinophiles concernait 2 autres enfants. Il en était de même pour la réponse par l'activation des neutrophiles. Ces enfants ne présentaient pas de signes cliniques spécifiques tant pour les neutrophiles que pour les éosinophiles. Ces activations n'étaient pas spécifiques d'un allergène alimentaire.

Sur l'ensemble de la population, 30 TPO ont été réalisés. Parmi ces 30 TPO réalisés en simple aveugle 3 correspondaient à des syndromes oraux analysés séparément. Sur les 27 TPO, 9 étaient positifs et 18 négatifs. Le calcul du χ^2 par rapport aux résultats de la CMF montrait un lien significatif ($p < 0,001$) entre le TPO et l'expression du CD63 par les basophiles (7/9 tests positifs et 16/18 négatifs) pour un seuil de positivité de 12 % CD63. Les deux cas TPO négatif/CMF positive correspondaient pour l'un à un patient testé à l'œuf et ayant des IgE spécifiques > 100 kUA/L et une CMF à 17,4 %CD63, et pour le second à un patient testé pour le lait de vache avec une CMF à 71 % CD63 (ce patient étant également très positif en CD11b pour les trois types cellulaires).

Le χ^2 était par contre non significatif pour le CD11b et pour les trois types cellulaires pris séparément. Cependant, il existait un lien significatif inverse entre le TPO et l'expression du CD11b pour les trois types cellulaires ($p < 0,02$), l'expression du CD11b étant plus fréquente pour les TPO négatifs.

Dans le cas des trois syndromes oraux, le TPO était positif dans 1/3 cas. L'expression du CD63 était fortement positive dans 3/3 cas (54,8 %, 29,8 % et 69,9 %) ainsi que l'expression du CD11b dans 2/3 cas (29,7 % et 64,7 %). L'expression du CD11b était également positive dans 2/3 cas pour les neutrophiles et les éosinophiles.

4.3.2. Analyse spécifique par allergène

Les résultats de l'analyse de l'activation différentielle des marqueurs CD63 et CD11b allergène par allergène sur les trois types cellulaires étudiés par cytométrie en flux n'étaient pas significativement différents de ceux observés dans l'étude globale. Les sensibilités pour le marqueur CD63 calculées pour les différents allergènes étaient de 95 % (16/17) pour l'arachide, 100 % (7/7) pour le lait, 88,9 % (8/9) pour la noisette et 100 % (3/3) pour l'œuf. Par ailleurs, les différents types d'expression clinique n'étaient pas spécifiques d'un d'allergène donné.

Lorsque l'activation par l'allergène était positive pour les basophiles, l'anti-IgE était positif pour les basophiles dans 56,5 % des cas. Lorsque l'activation des éosinophiles était positive par l'allergène, l'anti-IgE activait les éosinophiles dans

Tableau 4

Résultats des différents paramètres cliniques et biologiques observés chez les enfants du groupe urticaire (U).

Clinique	Allergène	Pricks	IgE kUA/L	TPO	Basos %CD63	Basos %CD11b	Eosino %CD11b	Neutros %CD11b
U	Crevette	NF	> 100	NF	47,1	96	7	40
U	Lait	NF	Caséine < 0,1, alphalactalbumine 0,53, betalactoglobuline 5,82	NF	9,1	34,6	38,7	35,1
U	Arachide	NF	17	NF	13,4	6,7	Nég	Nég
U	Arachide	Pos	7,64	NF	11	Nég	Nég	Nég
U	Œuf	Pos	1,16	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
U	Arachide	Pos	1,5	NF	19,2	7	Nég	Nég
U	Arachide	NF	15,8	NF	49	Nég	8	Nég
U	Arachide	Pos	7,9	NF	45,1	Nég	Nég	2,4
U	Lait	NF	Alphalactalbumine neg, betalactoglobuline 4,94, caséine 0,73	NF	Nég	Nég	Nég	Nég
U	Œuf	Pos	Blanc 11,4	NF	Nég	Nég	Nég	Nég
U	Lait	NF	0,38	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
U	Arachide	Pos	0,7	NF	66,6	Nég	Nég	Nég
U	Noisette	Pos	0,25	NF	6	Nég	Nég	Nég
U	Lait	NF	Caséine 0,2, alphalactalbumine 8,26, betalactoglobuline 8,25	Pos	27,3	Nég	Nég	Nég
U	Noisette	NF	14	NF	16,3	Nég	Nég	Nég
U	Œuf	NF	Blanc 6,94	Pos	29,9	Nég	Nég	Nég
U	Lait	Pos	Caséine 0,82, alphalactalbumine 0,59, betalactoglobuline 0,66	Nég	71	63,5	28,9	33,6
U	Œuf	NF	NF	Pos	Nég	4,2	Nég	Nég
U	Lait	Nég	Caséine 1,99, betalactoglobuline 0,12 alphalactalbumine nég	Pos	26,9	Nég	3,6	Nég
U	Lait	NF	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
U	Arachide	NF	NF	Nég	8	7,2	Nég	Nég
U	Arachide	Pos	Nég	Nég	5,7	Nég	Nég	Nég

Basos : basophiles ; Neutros : neutrophiles ; Éosino : éosinophiles ; NF : non faits ; Pos : positif ; Nég : négatif.

42,8 % des cas. Pour les neutrophiles, lorsque l'activation par l'allergène était positive, l'anti-IgE activait les neutrophiles dans 46,7 % des cas.

5. Discussion

Dans le cas de la population d'enfants objet de cette étude, présentant des signes cliniques et biologiques d'allergie alimentaire IgE dépendante, l'activation des basophiles par expression du marqueur CD63 était fortement majoritaire, confirmant les données de la littérature, lesquelles placent la cytométrie en flux désormais comme un examen de référence dans le cadre du bilan d'allergie qu'elle soit alimentaire ou non [21]. Dans la littérature, l'expression du marqueur CD63 par les basophiles a une spécificité d'environ 95 % et une sensibilité d'environ 80 à 95 %, variable en fonction du type d'allergène [22–26]. Dans notre étude seule la sensibilité du test a pu être calculée. En effet, l'obtention des valeurs prédictives positives et négatives aurait nécessité l'inclusion

d'un groupe contrôle asymptotique et à IgE spécifiques négatives. Les caractéristiques de cette technique sont étroitement liées à l'utilisation optimale de contrôles de la réactivité des basophiles testés et la non prise en compte de l'hypo réactivité des basophiles détectée par un témoin anti-IgE peut expliquer les différences de sensibilités citées dans la littérature sachant que l'utilisation du fMLP est, dans ce cas, inutile. En immuno-allergologie alimentaire, la cytométrie en flux a été utilisée en tant que technique qualitative mais les travaux concernant le suivi du traitement de l'allergie par un anticorps monoclonal anti-IgE et des résultats obtenus dans le cadre du diagnostic de l'allergie aux curares et aux venins montrent que la cytométrie en flux peut également être considérée comme une technique quantitative. Nous avons ainsi observé une corrélation positive entre les doses seuils du test de provocation oral et la réactivité des basophiles dans le cadre de l'allergie à l'arachide [23]. Ainsi, dans le cas de l'hypersensibilité IgE dépendante, la cellule concernée est principalement le basophile, exprimant très majoritairement le

Tableau 5

Résultats des différents paramètres cliniques et biologiques observés chez les enfants du groupe dermatite atopique (DA).

Clinique	Allergène	Pricks	IgE kUA/L	TPO	Basos %CD63	Basos %CD11b	Éosino %CD11b	Neutros %CD11b
DA	Arachide	Pos	3,80	NF	50,6	52,5	27,2	34,8
DA	Lait	Pos	Caséine 23,4, alphasérumalbumine 7,62, betalactoglobuline 0,56	NF	73,6	52,5	39,9	41
DA	Noisette	Pos	40,7	NF	54	35,6	17,8	35,6
DA	Œuf	Pos	17,5	NF	73,6	57	30,1	37,8
DA	Œuf	Pos	4,91	Nég	6,6	6	2,3	Nég
DA	Lait	Nég	Alphasérumalbumine, betalactoglobuline, caseine Nég	Nég	Nég	Nég	3,8	9,3
DA	Arachide	NF	> 100	NF	Nég	16,1	Nég	Nég
DA	Arachide	Pos	8,55	Pos	39,2	Nég	Nég	Nég
DA	Crevette	NF	1,03	NF	8,6	Nég	Nég	Nég
DA	Arachide	Pos	16,5	NF	14,3	Nég	Nég	Nég
DA	Arachide	Nég	NF	Pos	27,4	Nég	Nég	Nég
DA	Noisette	Pos commercial nég en natif)	> 100	NF	12,2	27,8	Nég	Nég
DA	Arachide	NF	16	NF	44,8	Nég	Nég	Nég
DA	Arachide	Nég	26,9	NF	26,7	Nég	3,8	7,8
DA	Œuf	Pos	2,44	Nég	8,2	Nég	5,8	11,4
DA	Arachide	NF	18,7	NF	59,4	Nég	2	Nég
DA	Noisette	NF	> 100	NF	64,8	Nég	Nég	Nég

Basos : basophiles ; Neutros : neutrophiles ; Éosino : éosinophiles ; NF : non faits ; Pos : positif ; Nég : négatif.

CD63 par activation anti-RIgE, anti-IgE ou allergène dépendante. Dans la moitié des cas, l'expression du CD63 est accompagnée, pour les trois polynucléaires, d'une expression du CD11b, lequel est le seul marqueur d'activation positif dans un nombre marginal de cas. Pour deux enfants de l'étude, l'activation cellulaire n'a été retrouvée que grâce au marqueur CD11b présent sur les basophiles. Ce résultat est en accord avec la variabilité de la réponse du basophile humain à un stimulus activateur et l'intérêt éventuel de l'utilisation du marqueur CD11b en diagnostic allergologique doit être confirmé par d'autres études.

Sur le plan physiopathologique, l'expression du CD63 résultant de la fusion des granules intra cytoplasmiques avec la membrane des basophiles est parallèle à la libération des médiateurs pré-formés dont principalement l'histamine. L'intégrine CD11b joue un rôle majeur dans la migration tissulaire des polynucléaires et la présence tissulaire des basophiles est considérée comme un critère de sévérité. Dans cette étude, l'expression de ce marqueur par les trois types cellulaires était plus fréquemment observée dans le groupe présentant un eczéma. Une étude par allergène n'a pas pu être réalisée compte tenu du faible nombre de cas.

Cette étude a permis de montrer qu'il existait un lien significatif entre TPO et expression du CD63 par les basophiles au seuil clinique de 12 %. En revanche, aucune corrélation individuelle n'a été retrouvée entre le TPO et l'expression du

CD11b. Cependant, l'expression du CD11b était plus fréquente pour les TPO négatifs permettant de faire l'hypothèse de l'implication du CD11b, comme nous l'avons montré en comparant les populations urticaire et dermatite atopique, dans d'autres mécanismes que ceux de l'hypersensibilité immédiate.

Le rôle majeur du basophile dans l'immunité est aujourd'hui accepté. Le test d'activation des basophiles est reconnu dans la littérature comme un examen fiable. Cependant, les autres polynucléaires (éosinophiles et neutrophiles) sont susceptibles de libérer par activation des médiateurs aux puissants effets pharmacologiques et leur rôle dans les mécanismes allergiques IgE et non IgE dépendants n'est pas encore établi [27,28]. Bien que la présence de récepteurs de haute affinité pour l'IgE ait été démontrée précédemment [16], d'autres auteurs ont également montré que celle-ci peut-être inconstante. En effet, le rôle des polynucléaires neutrophiles via une activation IgG dépendante a été récemment démontré dans l'anaphylaxie [4,29]. Toutefois, dans notre étude portant sur une population d'enfants dont l'IgE dépendance de la réaction observée était démontrée, 34 % des éosinophiles et 28,6 % des neutrophiles sont activables par un anti-IgE. De plus, lorsque l'allergène spécifique induit une expression positive du marqueur CD11b, l'anti-IgE induit également une réponse positive, respectivement pour les neutrophiles et les éosinophiles, dans 46,7 % et 42,8 % des cas. Cette réactivité augmentée à l'anti-IgE pour le neutrophile et l'éosinophile et au Fmlp pour le

neutrophile a été également montrée par rapport à des sujets contrôles non allergiques. Ces résultats sont en faveur d'une composante IgE dans le mécanisme d'activation des neutrophiles et des éosinophiles par l'allergène dans le cas de l'allergie IgE dépendante.

L'objectif principal de notre étude était d'étudier l'activation allergène dépendante des éosinophiles et des neutrophiles, par rapport à l'activation des basophiles dans le cas de réactions alimentaires IgE dépendantes caractérisées. Dans la population testée, 4 enfants répondaient uniquement en neutrophiles ou en éosinophiles et ainsi, même dans le cas de réaction IgE dépendante, il pourrait être souhaitable de tester parallèlement à l'activation des basophiles, l'activation des éosinophiles et des neutrophiles. Ces deux types cellulaires exprimant le récepteur de haute affinité pour l'IgE, une activation IgE dépendante ne peut pas être exclue.

Ainsi, les neutrophiles et les éosinophiles pourraient être impliqués dans l'allergie alimentaire et l'étude de l'activation de ces cellules pourrait être intéressante dans le cas de pathologies intestinales digestives telles que les œsophagites et gastrites à éosinophiles pour lesquelles l'hypothèse d'une origine alimentaire a été fréquemment émise.

Cette étude pilote incite à étudier, par cytométrie en flux, l'activation allergène dépendante de l'ensemble des polynucléaires pour l'exploration des réactions allergiques. Elle a été réalisée dans le cadre des réactions IgE dépendantes et devrait être poursuivie dans le cadre des réactions alimentaires dites non IgE dépendantes, pour lesquelles un mécanisme impliquant les IgE ne peut être établi ni par les tests cutanés, ni par les IgE spécifiques.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Bidat E. Allergie alimentaire de l'enfant. *Arch Pediatr* 2006;13(10): 1349–53.
- [2] Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med* 2003;139(8):683–93.
- [3] Pleass RJ, Lang ML, Kerr MA, Woof JM. IgA is a more potent inducer of NADPH oxidase activation and degranulation in blood eosinophils than IgE. *Mol Immunol* 2007;44(6):1401–8.
- [4] Jonsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest* 2011;121(4):1484–96.
- [5] Iikura M, Yamaguchi M, Miyamasu M, Morita Y, Iwase T, et al. Secretory IgA-mediated basophil activation. II. Roles of GTP-binding regulatory proteins and phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264(2):575–9.
- [6] Lieberman JA, Sicherer SH. Diagnosis of food allergy: epicutaneous skin tests, in vitro tests, and oral food challenge. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010;11(1):58–64.
- [7] Moneret-Vautrin D. Épidémiologie de l'allergie alimentaire. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2008;48:171–8.
- [8] Nowak-Węgrzyn A. Future approaches to food allergy. *Pediatrics* 2003;111(6 Pt 3):1672–80.
- [9] Cianferoni A, Spergel JM. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol Int* 2009;58(4):457–66.
- [10] de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, et al. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;146(3):177–89.
- [11] Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, et al. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74(4):201–10.
- [12] Sainte-Laudy J, Vallon C, Guerin JC. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. *Allerg Immunol (Paris)* 1994;26(6):211–4.
- [13] Bousquet PJ, Rancé F, Deschildre A, de Blay F, Lefrant JY, Demoly P. Les conditions de sécurité pour la réalisation des tests de provocation en allergologie. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2007;47:323–32.
- [14] Lucendo AJ, Bellon T, Lucendo B. The role of mast cells in eosinophilic esophagitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2009;20(6):512–8.
- [15] Gonsalves N, Yang GY, Doerfler B, Ritz S, Ditto AM, et al. Elimination diet effectively treats eosinophilic esophagitis in adults; food reintroduction identifies causative factors. *Gastroenterology* 2012;142(7):1451–90 [quiz e14–5].
- [16] Gounni AS, Lamkhoui B, Koussih L, Ra C, Renzi PM, et al. Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma. *FASEB J* 2001;15(6):940–9.
- [17] Capron M, Capron A, Dombrowicz D. L'éosinophile, une cellule aux multiples facettes. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2002;42:213–8.
- [18] Sainte-Laudy J, Boumediene A, Touraine F, Orsel I, Brianchon C, et al. Use of both CD63 up regulation and IgE down regulation for the flow cytometric analysis of allergen induced basophil activation. Definition of an activation index. *Inflamm Res* 2007;56(7):291–6.
- [19] Yoon J, Ponikau JU, Lawrence CB, Kita H. Innate antifungal immunity of human eosinophils mediated by a beta 2 integrin, CD11b. *J Immunol* 2008;181(4):2907–15.
- [20] Orr Y, Taylor JM, Cartland S, Bannon PG, Geczy C, et al. Conformational activation of CD11b without shedding of L-selectin on circulating human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2007;82(5):1115–25.
- [21] Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G, Fremont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;82(1):33–40.
- [22] Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, Goldman M, Casimir G, et al. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clin Exp Allergy* 2009;39(8):1234–45.
- [23] Sainte-Laudy J, Ménétrey C, Brianchon C, Lenhardt-Roussie A, Cogné M. Évaluation de la cytométrie de 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.
- [24] Monneret G, Benoit Y, Debard AL, Gutowski MC, Topenot I, et al. Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs. *Clin Immunol* 2002;102(2):192–9.
- [25] 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(8):1166–71.
- [26] Sabato V, van Hengel AJ, De Knop KJ, Verweij MM, Hagendorens MM, et al. Human basophils: a unique biological instrument to detect the allergenicity of food. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011;21(3):179–84.
- [27] Gougerot-Pocidalo MA. Polynucléaires neutrophiles humains. *Rev Fr Lab* 2002;341.
- [28] Minai-Fleminger Y, Levi-Schaffer F. Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflamm Res* 2009;58(10):631–8.
- [29] Sainte-Laudy J, Laurence S, Brianchon C. Un cas d'hypersensibilité allergique non IgE dépendante à la farine de blé caractérisée par une activation allergène dépendante des neutrophiles et des éosinophiles. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2010;50:318.