



Article original

Mise au point d'un dosage automatisé des IgE spécifiques des allergènes
des pollens de cyprès et de genévrier par VIDAS StallergyMeasurement of specific IgE for Juniper
and Cypress pollen allergens by VIDAS StallergyN. Berjont^a, A. Didierlaurent^a, M. Lesénéchal^b, H. Bigot^b, K. Jain^a, M. Hrabina^a, P. Moingeon^{a,*}^a Stallergènes SA, 6, rue Alexis-de-Tocqueville, 92160 Antony, France^b Biomérieux, chemin de l'Orme, 69280 Marcy-l'Étoile, France

Reçu le 31 mars 2006 ; accepté le 18 juillet 2006

Résumé

But de l'étude. – Le pollen de cyprès est une cause majeure d'allergie dans les régions méditerranéennes. Dans le but d'améliorer le diagnostic in vitro de l'allergie aux pollens des Cupressacées, nous avons développé avec un extrait de *Juniperus ashei* un test semi-quantitatif de dosage des IgE spécifiques adapté à l'automate VIDAS.

Méthodes. – Le principe du test Stallergy® associe une méthode immunoenzymatique sandwich en deux étapes à une lecture finale en fluorescence (ELFA). Le réactif est composé d'un cône en plastic, dont la paroi interne est recouverte avec un extrait de *J. ashei*, qui sert à la fois de pipette et de phase solide, et d'une cartouche contenant tous les réactifs nécessaires à la réaction (tampon de lavage, conjugué, substrat).

Résultats. – Les coefficients de variation de la répétabilité de ce test sont inférieurs à 1,7 %, et ceux de la reproductibilité sont compris entre 1,6 et 9,5 %. La corrélation à une classe près avec le CAP System® Genévrier est de 80,7 % ($n = 57$). Pour 65 % des sérums, les classes sont identiques et pour 33 % des sérums, les résultats sont supérieurs en méthode VIDAS. La spécificité du test est confirmée par VIDAS inhibition. L'étude de la sensibilité, menée sur 82 patients allergiques au pollen de cyprès, montre une concordance de 97,6 % entre les résultats des dosages Stallergy® Genévrier avec ceux des tests de réactivité cutanée.

Conclusion. – Le test Stallergy® Genévrier permet le dosage des IgE spécifiques des allergènes de pollen de cyprès avec une sensibilité de détection au moins égale à celle du CAP System® Genévrier.

© 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Study objective. – Cypress pollen is a significant cause of allergies in the Mediterranean area. In order to improve the in vitro diagnosis to cypress sensitization, we used a *Juniperus ashei* extract to develop a new semi-quantitative test for the measurement of IgE specific to juniper and cypress pollen allergens based on the VIDAS automated system.

Methods. – The VIDAS Stallergy® assay combines a two-step enzyme immunoassay sandwich method with a final fluorescence detection. The reagent comprises the Solid Phase Receptacle (SPR) coated with a *J. ashei* extract, which serves as a solid phase as well as a pipetting device during the assay and a strip that contains all the ready-to-use reagents.

Results. – The precision study shows coefficients of variation lower than 1.7% for intra-assay variability and between 1.6 and 9.5 for inter assays variability. Correlation with the CAP system® method shows an 80.7% agreement to the nearest class ($N = 57$). For 65% of sera class results are similar with the two techniques, and for 33% of sera, class results are higher with the VIDAS method. Test specificity is confirmed by VIDAS inhibition experiments. A sensitivity study performed using 82 clinically recognized cypress allergic patients shows that 97.6% of the patients are detected with the VIDAS Stallergy® Juniper reagent.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : pmoingeon@stallergenes.fr (P. Moingeon).

Conclusion. – The Juniper Stallergy® test allows to measure specific IgEs to cypress pollen, with a sensitivity of detection at least similar to the CAP system® method.

© 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Cypres ; Genévrier ; IgE spécifiques ; Stallergy VIDAS

Keywords: Cypress; Juniper; Specific IgE; Stallergy VIDAS

1. Introduction

Depuis l'introduction massive des arbres de la famille des Cupressacées dans les régions méditerranéennes pour leur qualité ornementale, l'allergie au pollen de cyprès est devenue une cause majeure de rhinoconjonctivite et d'asthme [1–3]. L'implication du pollen de cyprès dans ces allergies a été longtemps sous-estimée [4] du fait du caractère hivernal de la pollinisation et du manque d'efficacité des extraits de diagnostic cyprès [5, 6].

L'identification des sources d'allergènes impliqués est essentielle pour le diagnostic, la prévention et l'immunothérapie de l'allergie. À cet égard, le dosage des IgE spécifiques par des techniques fiables et simples à mettre en œuvre constitue une démonstration complémentaire aux tests cutanés de la sensibilisation de l'organisme à un allergène [7,8]. Dans ce contexte, nous avons développé un nouveau test diagnostic sérologique : le Stallergy® Genévrier (ST6).

Bien que destiné à dépister une allergie au cyprès, nous avons sélectionné l'extrait de Genévrier (*Juniperus ashei*) afin d'élaborer un test de détection in vitro d'IgE spécifiques. En effet, les Cupressées (cyprès) et les Juniperées (genévrier) appartiennent à la famille des Cupressacées [9], et présentent de nombreuses réactions croisées liées à des compositions allergéniques très proches [9–11]. De plus, différentes études ont démontré que l'extrait de pollen de *J. ashei* est plus puissant que les extraits de pollen de cyprès (*Cupressus sempervirens* et *Cupressus arizonica*), en raison notamment d'une plus forte concentration d'allergène majeur Jun a 1(11).

La présente étude a été conduite en vue :

- de confirmer la pertinence de l'utilisation du pollen de *J. ashei* pour la fabrication d'un nouveau test VIDAS Stallergy® permettant le diagnostic des allergies aux Cupressacées ;
- d'évaluer les performances de ce test en comparaison avec le CAP System® Pharmacia et un test de réactivité cutanée.

2. Matériels et méthodes

2.1. Sérums de sujets allergiques et de sujets sains

Pour l'étude de comparaison des techniques VIDAS Stallergy® et CAP System®, 57 sérums, provenant de l'Établissement français du sang de Rungis, ont été dans un premier temps sélectionnés sur la base des résultats obtenus par la technique CAP System® de façon à identifier des sérums négatifs et positifs. Les sérums ont été conservés à –20 °C avant d'être dosés.

Pour l'étude de spécificité, 100 sérums frais non sélectionnés, provenant de l'Établissement français du sang de Lyon, ont été testés. Ils ont été dosés à l'aide du test Stallergy® Genévrier (ST6) et les échantillons positifs ont été dosés en CAP System® Genévrier (t6).

Dans le cadre de l'étude de sensibilité du dosage, les sérums utilisés provenaient de 82 patients âgés de 18 à 60 ans présentant des symptômes de rhinoconjonctivite associés ou non à un asthme modéré durant la saison pollinique du cyprès, ainsi que des tests cutanés positifs au cyprès et/ou au genévrier. Ces sérums ont été dosés en IgE spécifiques cyprès par la technique CAP System® (t23) et en IgE spécifiques genévrier par les techniques CAP System® (t6) et VIDAS Stallergy® (ST6).

Cinq sérums humains positifs aux Cupressacées (PLASMA-LAB) ont été poolés pour les expériences d'immunoblotting et de VIDAS inhibition.

2.2. Dosage automatisé des IgE spécifiques

Le dosage des IgE spécifiques a été fait en parallèle par la technique VIDAS et par la technique CAP System®. Le VIDAS® est un automate multiparamétrique d'immunoanalyse associant une méthode immunoenzymatique à une lecture finale en fluorescence (ELFA). Chaque test utilise un cône à usage unique dont la paroi interne est recouverte avec un extrait de pollen de genévrier (*J. ashei*) et une cartouche contenant tous les réactifs nécessaires à la réalisation du dosage (conjugué, tampon de lavage, substrat). Toutes les étapes du dosage sont réalisées automatiquement par l'instrument [7,8]. Après dilution, l'échantillon est aspiré et refoulé plusieurs fois à l'intérieur du cône. Le cône se déplace ensuite dans le puits contenant l'anti-IgE humaine marquée à la phosphatase alcaline (conjugué). Ces opérations permettent aux IgE spécifiques présentes dans l'échantillon, de se lier d'une part aux allergènes de pollen de genévrier fixés sur le cône, et d'autre part au conjugué, formant ainsi un sandwich. Les composés non fixés sont ensuite éliminés par lavage. Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-méthyl-ombelliféryl phosphate) est transformé par l'enzyme du conjugué en 4-méthyl-ombelliféron, dont la fluorescence émise est mesurée à 405 nm. La valeur du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration des IgE présente dans l'échantillon. Les résultats, obtenus au bout de 90 minutes, sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport à une courbe de calibration mémorisée et réajustée tous les 14 jours à l'aide d'un calibrateur. Ils sont exprimés en classe et en kUI/l (classe 0 : < 0,35, classe 1 : 0,35–0,70, classe 2 : 0,70–3,5, classe 3 : 3,5–17,5, classe 4 : 17,5–35, classe 5 : > 35 kUI/l).

Les dosages CAP System[®] ont été réalisés par un laboratoire de biologie médicale selon les recommandations du fabricant (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

2.3. Extraits allergéniques

Pour la réalisation des tests cutanés, les pollens de *C. sempervirens*, *C. arizonica* et *J. ashei* ont été extraits au 1/20 (p/v) en tampon bicarbonate d'ammonium 4 g/l pendant 24 heures à +4 °C. Après centrifugation, les surnageants ont été ultrafiltrés sur membrane de 1000 d, filtrés stérilement et lyophilisés. Les solutions utilisées pour les prick-tests ont été obtenues en reconstituant ces lyophilisats avec un soluté glycérosalin phénolé.

Pour les expériences d'immunoblotting et de VIDAS inhibition, les extraits allergéniques (*C. sempervirens*, *C. arizonica*, *J. ashei*, *Dactylis glomerata* L., *Olea europaea* L., et *Betula pendula*) et d'acarien (*Dermatophagoides pteronyssinus*) ont été préparés comme précédemment, et conservés à -20 °C avant d'être utilisés. La concentration protéique des extraits a été déterminée selon la technique de Bradford (Biorad Protein Assay Kit).

2.4. SDS-PAGE et immunoblotting

Les extraits de pollen de *C. sempervirens*, *C. arizonica*, *J. ashei* et de *D. Pteronyssinus* ont été chauffés en tampon de Laemmli contenant 1 % de SDS et 5 % de β -mercaptoéthanol. Pour chaque extrait, 0,7 μ g de protéine ont été déposés sur un gel de polyacrylamide à 12,5 % (Exel-gel, GE Healthcare). L'électrophorèse a été conduite à 600 V pendant une heure 20 minutes à l'aide d'un Multiphor (GE Healthcare) parallèlement à des marqueurs de faibles poids moléculaires (GE Healthcare). Les protéines ainsi séparées par SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane PVDF (PALL Corporation) de porosité 0,45 μ m et colorées transitoirement avec du rouge Ponceau-S afin de vérifier leur transfert sur la membrane. Après blocage des sites avec du lait dégraissé en poudre à 1 % en TBS (tris 20 mM, NaCl 500 mM pH 7,5), la membrane a été incubée une nuit à température ambiante avec le pool de sérums positifs aux Cupressacées dilué au 1/7. La révélation a été faite par incubation de la membrane avec une IgG de lapin anti-IgE humaine diluée au 1/1000 (Dakocytomation) pendant une heure et demi à température ambiante, puis avec une IgG de chèvre anti-IgG de lapin couplée à la peroxydase diluée au 1/10000 pendant une heure et demi à température ambiante et enfin avec le substrat West pico (Pierce). Le signal chimi-luminescent a été détecté avec une caméra ultrasensible Chemi-Smart 3000 (Vilbert Lourmat) et son intensité a été mesurée par densitométrie à l'aide du logiciel Bio-1D associé à la caméra.

2.5. VIDAS inhibition

Les expériences de VIDAS inhibition ont été réalisées pour comparer la capacité de différents extraits à inhiber la fixation

des IgE d'un pool de sérums positifs au Cupressacées sur le cône sensibilisé par un extrait de pollen de genévrier (*J. ashei*). Le pool de sérums dilué au 1/5 (200 μ l) a été pré-incubé pendant une heure et demi à +37 °C avec 50 μ l de chacun des extraits de pollen de *C. sempervirens*, *C. arizonica*, *J. ashei*, *D. glomerata* L., *Olea europaea* L., *Betula pendula* et de *D. Pteronyssinus* à des concentrations allant de 0,003 à 1111 μ g/ml, avant d'être testé par la méthode VIDAS Stallergy[®] Genévrier (ST6). Les valeurs des concentrations permettant d'obtenir une inhibition de 50 % du signal (CI₅₀) ont été déterminées graphiquement à partir des courbes d'inhibition.

2.6. Tests cutanés

Les tests cutanés (prick-tests) ont été réalisés en piquant au travers d'une goutte d'extrait déposée sur l'avant-bras dégraissé des patients avec un dispositif permettant une pénétration standardisée et reproductible de l'extrait dans l'épiderme (Stallerpoint[®], Stallergènes). Les 82 patients allergiques au cyprès ont été testés avec les extraits cités ci-dessus, ainsi qu'avec des témoins positifs (phosphate de codéine 9 % et chlorhydrate d'histamine 10 mg/ml) et un témoin négatif (soluté glycérosalin phénolé). Les tests cutanés ont été considérés comme positifs lorsque le diamètre de la papule mesurée après 20 minutes était supérieur ou égal à 4 mm.

2.7. Tests de dilution

Des sérums ($n = 16$), dont la concentration en IgE spécifiques varie de 1,45 à > 35 UI/ml, ont été dilués de deux en deux dans un pool de sérums négatifs. Un point de la gamme de calibration IgE (36 UI/ml) a été dilué de la même façon, mais en sérum de cheval. Afin de vérifier une éventuelle interférence du diluant, un sérum (26 UI/ml) a été dilué dans les deux diluants. Les sérums et le calibrateur purs et dilués ont ensuite été dosés au cours de la même série en VIDAS, avec des cônes Genévrier pour les sérums et des cônes anti-IgE pour le calibrateur. Pour chaque dilution réalisée le rapport (O/P) entre la valeur observée (O) corrigée par le facteur de dilution [2] et la valeur pure (P) a été déterminé.

3. Résultats

3.1. Mise au point des cônes VIDAS *J. ashei*

Le but de ce réactif étant de détecter l'allergie au cyprès, nous avons dans un premier temps utilisé la matière première cyprès pour la fabrication des cônes. Les cônes fabriqués à partir de ces matières premières de faible activité allergénique donnaient des signaux faibles avec des échantillons positifs (résultats non montrés). Des essais préliminaires avec le pollen de genévrier (*J. ashei*) ayant établi que cette matière première était plus facile à extraire, nous avons comparé des matières premières des pollens de cyprès (*C. sempervirens* et

C. arizonica) et de genévrier (*J. ashei*) par immunoempreinte après SDS-PAGE en condition réductrice : ces extraits montrent des profils allergéniques similaires avec une bande majoritaire commune de poids moléculaire d'environ 43 kDa (Fig. 1a). La mesure de l'intensité des bandes par densitométrie (Fig. 1b) a montré que la capacité de fixation des IgE du pool

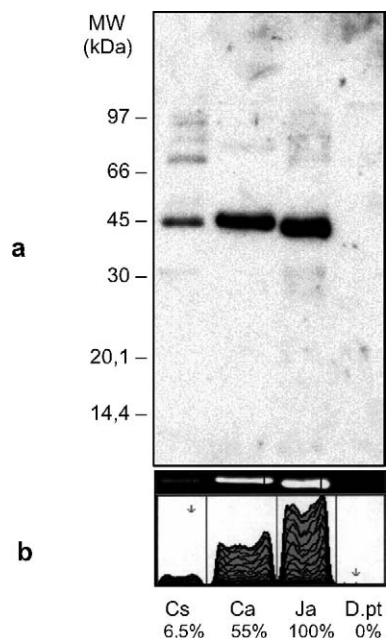


Fig. 1. Immunoempreinte d'extraits de Cupressacées.

de sérums Cupressacées par l'extrait de *J. ashei* était 15 fois plus forte que celle de l'extrait *C. sempervirens* et 1,8 fois plus forte que celle de l'extrait de *C. arizonica*, mettant ainsi en évidence une plus grande réactivité avec les IgE.

Les expériences de VIDAS inhibition (Fig. 2) avec un pool de sérums Cupressacées ont confirmé que les extraits de pollen de *C. sempervirens*, *C. arizonica* et de *J. ashei* inhibent la fixation des IgE sur la phase solide préparée à partir d'un extrait de *J. ashei*. Pour obtenir une inhibition de 50 % du signal, une concentration de 0,19 µg/ml d'extrait de pollen de *J. ashei* était requise, ce qui était respectivement, 10 et 20 fois moins que les concentrations inhibitrices 50 % obtenues avec les extraits de pollens de *C. arizonica* (1,9 µg/ml) et de *C. sempervirens* (4,2 µg/ml). Aucune inhibition n'a été observée avec des extraits contrôles d'acariens, de pollens d'olivier, de dactyle ou de bouleau.

3.2. Étude de la précision du test

La répétabilité de ce test a été étudiée en dosant 30 fois deux sérums au cours d'une même série. La reproductibilité a été évaluée en dosant 16 fois au cours de 16 séries différentes cinq sérums répartis sur toute la gamme de concentrations en IgE. Les coefficients de variation intrasérie sont inférieurs à 1,7 % et ceux entre différentes séries compris entre 1,6 et 9,5 % (Tableau 1) confirmant la bonne répétabilité et la reproductibilité du test Stallergy® Genévrier.

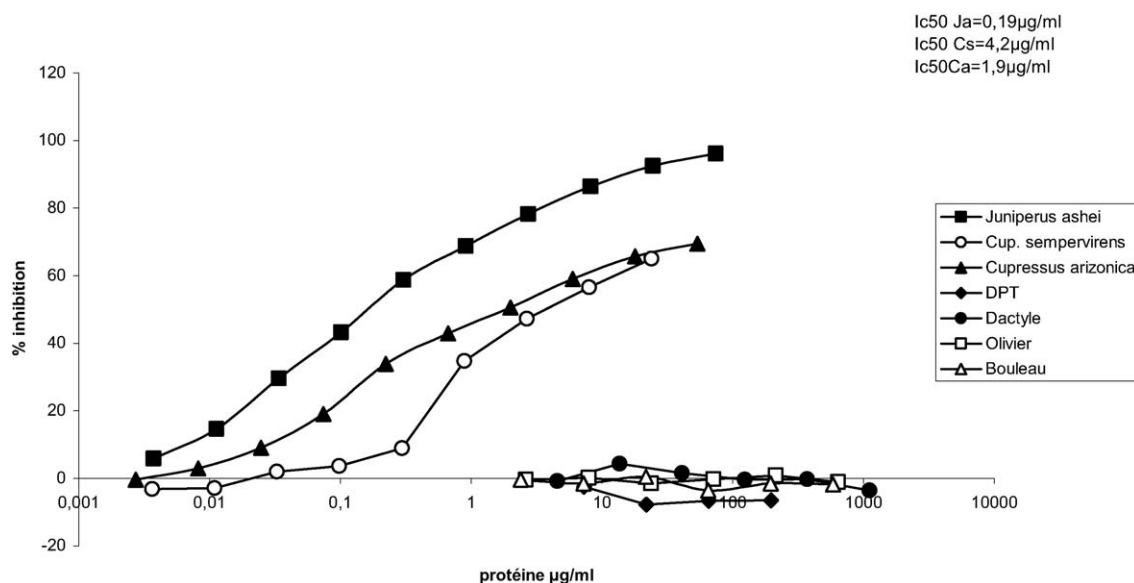


Fig. 2. VIDAS Inhibition.

Tableau 1
Étude de la reproductibilité et la répétabilité du test Stallergy Genévrier

	Reproductibilité					Répétabilité	
	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 3	Sérum 4	Sérum 5	Sérum 2	Sérum 4
Nombre	16	16	16	16	16	30	30
Moyenne (kU/l)	1,29	9,85	10,79	20,81	22,06	9,05	20,8
C.V (%)	3	3,4	1,6	9,5	7,7	1,3	1,7

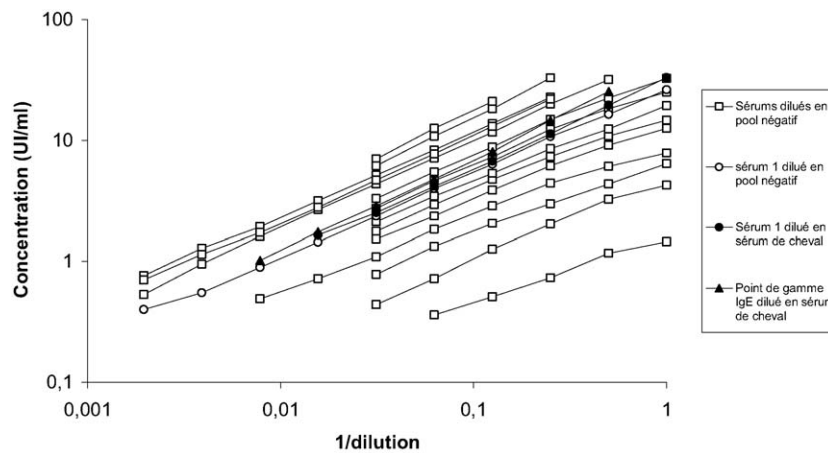


Fig. 3. Courbes de dilutions.

3.3. Test de dilution

La linéarité de ce test a été étudiée en diluant des sérums ($n = 16$) de taux variables et un calibrateur au 1/2 dans un pool de sérums négatifs et/ou dans un sérum de cheval. Les résultats obtenus (Fig. 3) montrent un bon parallélisme entre les courbes de dilution des sérums et de la gamme. Les dilutions (au nombre total de 80) donnent un écart moyen de +28 % par rapport à la valeur attendue avec (un écart-type de ± 11 %).

3.4. Comparaison avec la technique CAP System®

Nous avons ensuite comparé le nouveau test VIDAS Stallergy® Genévrier avec une technique établie, le CAP System® Genévrier, en évaluant en parallèle 57 sérums par les deux méthodes. Les valeurs en classe pour les deux techniques montrent une concordance de 80,7 % à une classe près (Tableau 2). Pour 37 sérums (65 %) les classes sont identiques et pour 19 sérums (33 %) les résultats sont supérieurs d'une ou deux classes en technique VIDAS®. Quatre des six sérums

Tableau 2
Comparaison du VIDAS Stallergy® Genévrier (ST6) avec le Cap System® Genévrier (t6)

CAP t6	5					1
(Genévrier)	4					2
	3		1	3		7
	2		5	2		
	1	1	2			
	0	27	2	4		
Classe	0	1	2	3	4	5
	VIDAS ST6 (Genévrier)					

Tableau 3
Comparaison des résultats des dosages d'IgE spécifiques Genévrier et Cyprès avec les tests cutanés

		VIDAS Genévrier		CAP Genévrier		CAP Cyprès	
		+ (> 0,35 kUI/ml)	- (< 0,35 kUI/ml)	+ (> 0,35 kUI/ml)	- (< 0,35 kUI/ml)	+ (> 0,35 kUI/ml)	- (< 0,35 kUI/ml)
Test cutané Cyprès	+	80	2	79	3	62	20
et/ou Genévrier	(papule > 4 mm)						
(prick-test)	-	0	0	0	0	0	0
	(papule < 4 mm)						

trouvés positifs en VIDAS et négatifs en CAP ont été testés par inhibition (les deux autres sérums étant en quantité insuffisante) : deux sérums (0,51 et 0,70 UI/ml) deviennent négatifs lorsqu'ils ont été pré-incubés avec un extrait de *J. ashei* avant d'être dosé, un sérum (0,37 UI/ml) devient négatif du fait de la dilution et un sérum (0,42 UI/ml) n'est pas inhibé.

Pour vérifier la spécificité du dosage, 100 échantillons de sérums de sujets non sélectionnés ont été testés en VIDAS Stallergy® Genévrier. Un total de dix sérums a été trouvé positif (classe > 1). Ces dix échantillons sont également positifs en CAP System® Genévrier. Le pourcentage de corrélation à une classe près entre VIDAS Stallergy® et CAP System®, calculé à partir de cet échantillonnage est de 100 %.

3.5. Étude de la sensibilité du test

Pour établir la sensibilité du test, une comparaison des dosages d'IgE a été effectuée avec des tests de réactivité cutanée (Tableau 3). La comparaison du VIDAS Stallergy® Genévrier avec les tests cutanés montre une bonne sensibilité de 97,6 %, tout comme celle du CAP System® Genévrier qui est de 96,3 %. Celle du CAP System® Cyprès est beaucoup plus faible (75,6 %). À noter, parmi les deux sérums discordants VIDAS Stallergy®-test cutané, que l'un est aussi négatif en CAP System®. Ces deux sérums, ainsi que les deux autres discordants CAP System®-test cutané sont aussi négatifs en blot (données non montrées).

La comparaison des résultats des dosages en CAP System® t6 et en VIDAS Stallergy® ST6 montre une concordance de 91,4 % pour les sérums de sujets allergiques (Tableau 4). Il

Tableau 4
Comparaison du VIDAS Stallergy® Génévrier (ST6) avec le Cap System® Génévrier (t6) sur les sérums des patients allergiques au cyprès

CAP t6	5					1	6
(Génévrier)	4				1	3	8
	3				18	20	5
	2	1			14		
	1			2			
	0	1	1	1			
Classe	0	1	2	3	4	5	
	VIDAS ST6 (Génévrier)						

est à noter que pour 51 sérums (62 %), les concentrations d'IgE sont plus élevées en VIDAS Stallergy®. Sur la base de ces résultats, il apparaît que la sensibilité du VIDAS Stallergy® Génévrier est au moins égale à celle du CAP System® Génévrier et bien meilleure que celle du CAP System® Cyprès.

4. Discussion

Le dosage des IgE spécifiques contribue au diagnostic de l'allergie, notamment quand il est difficile à déterminer par l'examen clinique ou par les tests cutanés l'allergène incriminé [12–14]. Dans cette étude, nous avons évalué les performances analytiques d'un nouveau dosage d'IgE spécifiques d'allergènes de Cupressacées.

Des études préliminaires de mise au point de ce nouveau test ont montré qu'il était préférable d'utiliser le pollen de génévrier (*J. ashei*) pour fabriquer les cônes VIDAS, plutôt que le pollen de cyprès. En effet, ces espèces botaniques très proches présentent en immunoempreinte des profils allergéniques similaires avec une bande majoritaire à environ 43 kD. Il a été montré que cette bande contenait l'allergène majeur Jun a 1 pour l'extrait de *J. ashei*, Cup a 1 pour l'extrait de *C. arizonica* et Cup s 1 pour l'extrait de *C. sempervirens* [18, 22, 23]. Cette protéine est majoritairement reconnue par les IgE de sérums de patient allergiques au pollen de cyprès [1, 21, 23]. Nous avons vérifié par VIDAS inhibition la forte réactivité croisée entre les pollens de cyprès et de génévrier [11, 24], montrant ainsi dans notre système de dosage, que les cônes sensibilisés avec un extrait de pollen de génévrier sont reconnus spécifiquement par les IgE de patients allergiques au cyprès. En accord avec d'autres études [6, 11, 24], ces expériences mettent en évidence une réactivité allergénique plus importante pour l'extrait de génévrier, permettant ainsi une amélioration de la sensibilité du dosage lorsque l'extrait de génévrier est utilisé pour la charge des cônes VIDAS. Notre groupe avait déjà montré l'intérêt de l'utilisation de l'extrait de *J. ashei* pour le diagnostic in vivo [18] et l'immunothérapie [19, 20] de l'allergie au pollen de cyprès chez des patients du sud de la France n'ayant jamais été en contact avec du *J. ashei*. En effet, *J. ashei* est responsable d'allergie aux États-Unis [17], mais en Europe, il n'est présent que dans la région des Balkans.

Les résultats du test de reproductibilité et répétabilité adaptés à l'automate VIDAS sont conformes aux recommandations publiées par le National Committee for Clinical Laboratory

Standards (NCCLS) [15], avec des coefficients de variation intrasérie et intersérie inférieurs respectivement à 10 et 15 %.

L'épreuve de dilution montre un écart de +28 % par rapport à la valeur attendue. Le parallélisme obtenu entre les courbes de dilution des sérums et du point de calibration lors de l'étude de la linéarité, indique une absence de l'effet de la matrice, et montre la capacité du test à analyser différents échantillons par rapport à un système de calibration commun à différents allergènes.

Les études de comparaison avec le CAP System® montrent une concordance à une classe de 80,7 % pour les sérums sélectionnés sur leur résultat CAP System®, de 93 % pour les sérums de sujets cliniquement allergiques au cyprès et de 100 % pour les sérums positifs tout-venant, soit de 87,9 % sur l'ensemble des trois études. Pour de nombreux sérums (33 % des sérums de l'étude de corrélation et 62 % des sérums de sujets allergiques) les taux d'IgE mesurés sont plus élevés en VIDAS Stallergy®, ce qui ne constitue pas un problème en soi puisqu'il n'existe pas de standard international pour le dosage des IgE spécifiques. Parmi les six sérums discordants CAP-VIDAS, l'épreuve d'inhibition (qui n'a pu être réalisée que sur quatre sérums) montre qu'un seul sérum (classe 1) n'est pas inhibé. Afin de confirmer que le VIDAS Stallergy® ne donne pas de résultats faussement positifs par rapport au CAP, une étude de spécificité a été menée sur une population non sélectionnée prélevée dans la région de Lyon en décembre 2004. Le taux de 10 % d'échantillons positifs obtenu en VIDAS Stallergy® Génévrier est tout à fait cohérent avec les études épidémiologiques réalisées dans le sud de la France [16], qui rapportent une prévalence de 2 à 10 % de patients présentant des symptômes cliniques et des tests cutanés positifs au pollen de cyprès. Aucun de ces échantillons n'ayant été trouvés négatifs en CAP System®, on peut conclure à une bonne spécificité du test VIDAS Stallergy® Génévrier (comparativement aux résultats CAP). Ces données sont confirmées par les résultats d'inhibition spécifique de la fixation des IgE sur les cônes VIDAS par des extraits de Cupressacées, mais pas par des extraits d'allergènes irrelevantes (*D. Pteronyssinus*, pollen sde Dactyle, Olivier, Bouleau).

La corrélation clinicobiologique est excellente pour le test VIDAS Stallergy® ST6 (97,6 %) et pour le test CAP System® Génévrier (96,3 %). Elle est moins bonne pour le test CAP System® Cyprès (75,6 %), bien que les patients soient allergiques aux Cyprès, espèces présentes dans le sud de la France, contrairement au Génévrier.

5. Conclusion

Le test VIDAS Stallergy® Génévrier est un test semi-quantitatif spécifique et sensible permettant le dosage des IgE spécifiques du génévrier, mais aussi du cyprès. Bien que le pollen de *J. ashei* soit absent de l'environnement en Europe du centre et du sud, et en France en particulier, l'évaluation clinicobiologique révèle qu'il constitue un bon extrait pour l'élaboration de tests diagnostic de l'allergie au cyprès in vitro.

Références

- [1] Di Felice G, Caiaffa MF, Bariletto G, et al. Allergens of *Arizonica* Cypress (*Cupressus arizonica*) pollen extract and identification of the allergenic components. *Allergy Clin Immunol* 1994;94:545–55.
- [2] Panzani R, Centanni G, Brunel M. Increase of respiratory allergy to the pollens of cypresses in the south of France. *Annal Allergy* 1986;56:460–3.
- [3] Calleja M, Farrera I. Le Cyprès : un nouveau fléau pour la région Rhône-Alpes?. *Allergy Immunol* 2003;35:92–6.
- [4] Mari A, Di Felice G, Afferni C, Barletta B, Tinghino R, Pini C. Cypress allergy: an underestimated pollinosis. *Allergy* 1997;52:355–6.
- [5] Bousquet J, Knani J, Ferrando R. Heterogeneity of atopy. I. Clinical and immunologic characteristic of patients allergic to cypress pollen. *Allergy* 1993;48:183–8.
- [6] Mari A, Di Felice G, Afferni C, Barletta B, Tinghino R, Sallustro F, et al. Assessment of skin prick-test and serum specific IgE detection in the diagnosis of Cupressaceae pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:21–31.
- [7] Felden F, Croizier A. Vidas Stallertest: clinicobiological evaluation of a new global test for respiratory allergy. *Pathol Biol* 1998;46:819–23.
- [8] Sohn MH, Lee SY, Lee KE, Kim KE. Comparison of Vidas Stallertest and Pharmacia CAP assays for detection of specific IgE antibodies in allergic children. *Ann Clin Lab Sci* 2005;35:318–22.
- [9] Di Felice G, Barletta B, Tinghino R, Sallustro F, Pini C. Cupressaceae pollinosis: identification, purification and cloning of relevant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:280–9.
- [10] Yoo TJ, Spitz E, McGerity JL. Conifer pollen allergy: studies of immunogenicity and cross antigenicity of conifer pollens in rabbit and man. *Annal Allergy* 1975;34:87–93.
- [11] André C, Dumur JP, Hrabina M, Lefèvre E, Sicard H. *Juniperus ashei*: the gold standard of the Cupressaceae. *Allergy Immunol* 2000;32:104–6.
- [12] Ahlsted S. Understanding the usefulness of specific IgE tests in allergy. *Clin Exp Allergy* 2002;32:11–6.
- [13] Söderström L, Kober A, Ahlsted S, de Groot H, Lange CE, Paganelli R, et al. A further evaluation of the clinical use of specific IgE antibody testing in allergic diseases. *Allergy* 2003;58:921–8.
- [14] Yunginger JW, Ahlsted A, Eggleston PA, Homburger HA, Nelson HS, Ownby DR, et al. Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:1077–84.
- [15] Division of clinical Laboratory devices, Office of Device Evaluation. In: Review criteria for the assessment of allergen-specific immunoglobulin E (IgE) in vitro diagnosis devices using immunological methods. Washington: Public Health Service.; 2000. p. 1–18.
- [16] Charpin D, Calleja M, Lahoz C, Pichot C, Waisel Y. Allergy to cypress pollen. *Allergy* 2005;60:293–301.
- [17] Ramirez DA. The natural history of mountain cedar pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73:88–93.
- [18] Hrabina M, Dumur JP, Sicard H, Viatte A, André C. Diagnosis of cypress pollen allergy: in vivo and in vitro standardisation of a *Juniperus ashei* pollen extract. *Allergy* 2003;58:808–13.
- [19] Charpin D, Dron-Gonzales M, Fardeau F, Massabi-Bouchat YP, Hugues B, Fabre C, et al. Clinical efficacy of *Juniperus ashei* specific immunotherapy in European cypress rhinoconjunctivitis: a double-blind placebo controlled study. *Allergy* 2003;58(suppl.74):4 (Abstr.).
- [20] Vervloet Y, Birnbaum J, Laurent P, Hugues B, Fardeau MF, Massabi-Bouchat YP, et al. Safety and clinical efficacy of rush sublingual *Juniperus ashei* immunotherapy. *Allergy* 2003;58(suppl.):228 (Abstr.).
- [21] Ford SA, Baldo BA, Panzani R, Bass D. Cypress (*Cupressus sempervirens*) pollen allergens: identification by protein blotting and improved detection of specific IgE antibodies. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;95:178–83.
- [22] Iacovacci P, Afferni C, Barletta B. *Juniperus oxycedrus*: a new allergenic pollen from the Cupressaceae family. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:755–61.
- [23] Mistrello G, Roncarolo D, Zanoni D, Zanotta S, Amato S, Falagiani P, et al. Allergenic relevance of *Cupressus arizonica* pollen extract and biological characterization of allergoid. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:296–304.
- [24] Barletta B, Afferni C, Tinghino R, Mari A, Di Felice G, Pini C. Cross-reactivity between *Cupressus arizonica* and *Cupressus sempervirens* pollen extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:797–804.