



Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com



journal homepage: <http://france.elsevier.com/direct/IMMBIO/>



STRATÉGIES D'EXPLORATIONS FONCTIONNELLES ET DE SUIVI THÉRAPEUTIQUE

Le dosage des IgE totales dans les larmes par la technique ultrasensible « 0-100 » sur l'Immunocap®100 (Phadia) et son intérêt dans le diagnostic étiologique des atteintes allergiques de la surface oculaire

Measurement of total IgE in tears by ultrasensible technique '0-100' on the Immunocap®100 (Phadia): Interest for the etiologic diagnosis of the eye surface allergic achievements

L. Batellier^{a,*}, C. Moens^a, C. Poilane^a, C. Mavier^b,
P. Goldschmidt^a, C. Chaumeil^a

^a Laboratoire de biologie, centre hospitalier national d'ophtalmologie des Quinze-Vingts,
28, rue de Charenton, 75012 Paris, France

^b Phadia S.A.S., B.P. 610, 78056 Saint-Quentin-en-Yvelines cedex, France

Reçu le 9 janvier 2008 ; accepté le 14 février 2008

Disponible sur Internet le 16 avril 2008

MOTS CLÉS

IgE totale ;
Larme ;
Immunocap®100 ;
Allergie ;
Conjonctivite

Résumé Les atteintes allergiques de la surface oculaire sont en constante augmentation et représentent un motif fréquent de consultation en ophtalmologie. Le dosage des IgE totales dans les larmes peut être effectué par la nouvelle technique ultrasensible « 0-100 » sur Immunocap®100 (Phadia) dont la précision et la corrélation avec la technique précédente ont été évaluées. Le dosage de l'albumine dans le sérum et les larmes permet l'estimation de la fraction filtrée des IgE lacrymales à travers la barrière hémato-lacrurale. Le calcul du rapport IgE lacrymales dosées/filtrées permet de mettre en évidence une sécrétion locale d'IgE totales, signe d'une sensibilisation locale à un ou plusieurs allergènes.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : l.batellier@quinze-vingts.fr (L. Batellier).

KEYWORDS

Total IgE;
Tear;
Immunocap®100;
Allergy;
Conjunctivitis

Si le diagnostic des conjunctivites saisonnières aiguës est le plus souvent posé à partir des arguments cliniques, de l'interrogatoire et du bilan allergologique classique, la recherche d'une sécrétion locale d'IgE au niveau de la surface oculaire peut apporter une aide diagnostique dans certains cas cliniques moins évocateurs comme les conjunctivites perannuelles ou plus sévères comme les kératoconjunctivites vernales et atopiques.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary The allergic conjunctivitis and keratoconjunctivitis are in constant increase and represent a frequent reason for medical visit in ophthalmology. Total IgE in tears can be measured by a new ultrasensible technique "0-100" on the Immunocap®100 (Phadia). Precision and correlation with the previous technique are evaluated. The serum and tear albumin measurement allows one to quantify the permeability of the barrier and thus the amount of filtered tear total IgE. The ratio between the measured and the filtered lacrimal IgE highlights a local secretion of IgE, sign of a local conjunctival sensitivity to one or more allergens.

If the diagnosis of seasonal allergic conjunctivitis is generally based on the clinical arguments and allergological anamnesis, the search for a local secretion of total IgE can bring a diagnostic help in certain less evocative clinical cases like perennial conjunctivitis or in more severe cases like vernal and atopic keratoconjunctivitis.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

La prévalence des maladies allergiques a doublé au cours des 15 dernières années et leur retentissement économique est important en termes de santé publique [2]. L'Organisation mondiale de la Santé classe les maladies allergiques au quatrième rang des maladies chroniques. L'ophtalmologie ne déroge pas à la règle, les conjunctivites et kératoconjunctivites allergiques sont en augmentation constante et toucheraient 20% de la population dans les pays industrialisés avec une atteinte des enfants de plus en plus jeunes [6].

Les atteintes de la surface oculaire d'origine allergique

La surface cornéoconjunctivale est la muqueuse de l'organisme la plus exposée aux agressions extérieures : poussières, polluants atmosphériques physiques et chimiques, agents infectieux, allergènes, etc. Elle est protégée du milieu extérieur par le film lacrymal dont la stabilité est garantie par l'intégrité des épithéliums conjonctivaux et cornéens.

La réaction allergique, avec la libération de médiateurs cytotoxiques, entraîne une inflammation, une souffrance cellulaire et une instabilité du film lacrymal. Cela aboutit à un cercle vicieux où allergie, inflammation et sécheresse au niveau de la surface oculaire sont étroitement intriquées, avec les difficultés de diagnostic étiologique qui en découlent.

Les signes cliniques des atteintes allergiques de la surface oculaire peuvent aller de la conjunctivite simple à l'atteinte conjonctivale compliquée de kératite plus ou moins sévère et/ou de blépharite et/ou de syndrome sec, certaines formes engageant le pronostic fonctionnel visuel.

Les atteintes allergiques de la surface oculaire recouvrent classiquement cinq entités ophtalmologiques faisant intervenir des réactions IgE médiées d'hypersensibilité immédiate de type I :

- les conjunctivites saisonnières aiguës, associées généralement à une rhinite et déclenchées le plus souvent par des allergènes aéroportés comme les pollens ;
- les conjunctivites perannuelles pour lesquelles le bilan allergénique s'oriente vers des allergènes à expression pérenne comme la poussière de maison, les acariens, les moisissures ou les phanères d'animaux ;
- les kératoconjunctivites vernales ou printanières, débutant avant l'âge de dix ans et se compliquant d'atteintes cornéennes, sources de séquelles éventuelles et de pathologies iatrogènes liées aux corticoïdes (glaucome, cataracte) ;
- les kératoconjunctivites atopiques chez le sujet adulte atteint de dermatite atopique qui présentent les mêmes complications que la forme vernale ;
- les conjunctivites gigantoméniébrales qui concernent surtout les sujets porteurs de lentilles de contact souples, de prothèses ou de sutures cornéennes.

Les deux premiers groupes représentent les deux tiers des conjunctivites allergiques. Leur symptomatologie est en général modérée et localisée uniquement à la conjonctive. Les kératoconjunctivites vernales et atopiques sont beaucoup plus rares dans les pays occidentaux, mais nettement plus sévères. La conjunctivite gigantoméniébrale présente une similitude clinique avec la forme vernale, mais les atteintes cornéennes sont rares.

La recherche d'une sécrétion locale d'IgE au niveau de la surface oculaire

Les conjunctivites représentent un motif fréquent de consultation en ophtalmologie et leur étiologie doit en être précisée afin d'adapter un traitement spécifique. Le diagnostic de conjunctivite ou de kératoconjunctivite allergique s'appuie sur les arguments cliniques, l'interrogatoire et le bilan allergologique standard qui comprend le dosage des IgE spécifiques sériques et/ou les tests cutanés, prick-tests ou plus rarement patch-tests [4].

C'est suffisant devant les aspects typiques de conjonctivites saisonnières aiguës qui représentent les formes les plus fréquentes [3].

Mais, dans certaines situations, des examens biologiques complémentaires, en particulier la recherche d'une sécrétion locale d'IgE au niveau de la surface oculaire, peuvent être utiles pour confirmer l'étiologie allergique de la conjonctivite ou de la kératoconjonctivite :

- le dosage des IgE spécifiques sériques et les tests cutanés peuvent être pris en défaut dans les kératoconjonctivites vernoales où l'hyperproduction d'IgE est strictement oculaire dans 30 à 50 % des cas, les patients étant considérés sur le plan systémique comme non atopiques [2,6]. De plus, dans ce type de pathologie sévère du jeune enfant, poser un diagnostic dès le début de la maladie permet une meilleure prise en charge du patient sur le plan thérapeutique et psychologique ;
- dans les formes allergiques perannuelles, le passage à la chronicité aboutit à un tableau clinique peu évocateur et trouver l'étiologie de ces troubles polymorphes est souvent difficile, d'autant plus que la toxicité des collyres nécessaires pour traiter ces allergies peut également retentir sur le mécanisme physiopathologique en cours, renforçant l'inflammation et la sécheresse ;
- une conjonctivite folliculaire à *Chlamydiae* peut présenter un tableau clinique voisin d'une kératoconjonctivite vernoale débutante sans atteinte cornéenne ;
- les conjonctivites iatrogènes, induites par l'utilisation prolongée de certains topiques, constituent souvent de véritables pièges diagnostiques.

La recherche d'une sécrétion locale d'IgE totales au niveau de la surface oculaire permet d'objectiver une sensibilisation locale sans mise en évidence du ou des allergènes responsables. Elle comprend plusieurs étapes :

- le prélèvement de larmes ;
- le dosage des IgE totales sériques et lacrymales ;
- le dosage de l'albumine sérique et lacrymale ;
- l'estimation des IgE lacrymales filtrées ;
- le calcul du rapport IgE lacrymales dosées/filtrées.

Le prélèvement de larmes

Le prélèvement doit être effectué sans anesthésique local qui diminue la production de larmes.

Le sujet est assis. La paupière inférieure est légèrement tirée et le prélèvement est effectué par aspiration des larmes au niveau du cul de sac conjonctival inférieur avec une pipette de transfert stérile à usage unique.

Compte tenu du volume nécessaire aux différents dosages, une stimulation de la sécrétion lacrymale avec l'oignon est en général nécessaire. Les larmes des deux yeux sont recueillies séparément dans deux microtubes en polystyrène.

Elles sont centrifugées 15 minutes à 3500 t par minute pour éliminer sécrétions, maquillage, etc., puis conservées à +4 °C avant analyse. Elles sont ensuite congelées à -80 °C pour constituer une « larmothèque » et permettre d'éventuels dosages complémentaires.

Un prélèvement de sang est effectué en parallèle au prélèvement de larmes.

Certaines techniques de dosage d'IgE lacrymales utilisent des larmes directement collectées par capillarité sur une bandelette de nitrocellulose de type Schirmer. Si le prélèvement est plus facile et plus rapide, il présente des inconvénients majeurs : variabilité du volume prélevé d'un échantillon à l'autre et nécessité d'éluer les larmes pour toute technique quantitative, ce qui en diminue de façon importante la sensibilité analytique. Enfin et surtout, le dosage de l'albumine n'est pas effectué dans ces techniques effectuées à partir de bandelettes, ne rendant pas compte du degré de la transsudation des IgE sériques à travers la barrière hématoconjonctivale.

Le Dosage des IgE lacrymales par la nouvelle technique « 0-100 » sur l'Immunocap®100 (Phadia)

Les IgE totales lacrymales du sujet non allergique et sans pathologie inflammatoire de la surface oculaire sont très faibles, voire indétectables. Leur dosage nécessite donc une technique à la fois spécifique, sensible et précise, permettant de détecter de façon reproductible des taux d'IgE faibles, de l'ordre de 0,15 kU/L.

Nous avons dès 1999 adapté aux échantillons de larmes la méthode de dosage ultrasensible disponible sur l'Immunocap®100 (Phadia) en utilisant une gamme d'étalonnage « maison » allant de 0,10 à 100 kU/L [1]. En 2006, la société Phadia a mis en place pour la technique ultrasensible sur l'Immunocap®100 une gamme d'étalonnage dite « 0-100 » présentant une grande sensibilité (0,1 kU/L).

Au préalable de son utilisation pour le dosage des IgE totales dans ce milieu particulier que constituent les larmes, nous avons voulu vérifier que cette gamme présentait une excellente précision dans les faibles concentrations et montrait une bonne corrélation avec la méthode que nous avions auparavant validée et que nous utilisons jusqu'à cette date.

Étude de la précision

La précision a été mesurée par le dosage des IgE totales avec la nouvelle méthode sur quatre pools de larmes de faibles concentrations : inférieure à 0,1 ; 0,1 ; 0,2 et 0,45 kU/L.

Le dosage de chaque pool a été répété dix fois dans deux séries différentes et les coefficients de variation intra- et interséries ont été calculés.

Les valeurs du pool de concentration inférieure à 0,1 kU/L (seuil de détection) sont toutes comprises entre 0,01 et 0,02 kU/L.

Pour les trois autres pools à 0,1, 0,2 et 0,45 kU/L, les coefficients de variation intrasérie sont compris entre 2,5 et 5,4 % et les coefficients interséries entre 4,1 et 5,4 % (Tableau 1).

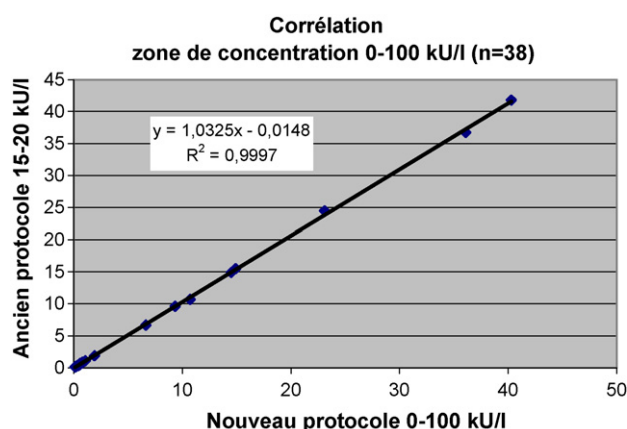
La nouvelle méthode de dosage « 0-100 » révèle donc une grande précision dans les faibles concentrations.

Étude de la corrélation

Pour l'étude de la corrélation entre l'ancienne et la nouvelle méthode, 38 échantillons de larmes de concentrations en IgE réparties de 0,1 à 50 kU/L ont été sélectionnés. Vingt-six de ces échantillons avaient une concentration en IgE

Tableau 1 Variations intraséries et interséries de trois pools de larmes à 0,1, 0,2 et 0,50 kU/l.

	Pool 1 0,1 kU/l série 1	Pool 1 0,1 kU/l série 2	Pool 2 0,2 kU/l série 1	Pool 2 0,2 kU/l série 2	Pool 3 0,45 kU/l série 1	Pool 3 0,45 kU/l série 2
Moyenne	0,12	0,12	0,23	0,23	0,47	0,49
CV intrasérie (%)	4,6	3,9	5,4	2,5	2,9	5,4
CV interséries (%)	5,4		4,1		4,5	

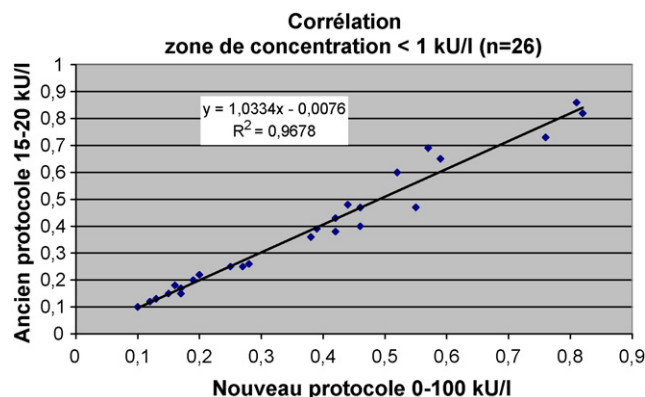
**Figure 1** Corrélation ancien protocole 15–20 versus nouveau protocole « 0-100 » sur 38 échantillons de larmes ayant un taux d'IgE totales compris entre 0,1 et 50 kU/l.

comprise entre 0,1 et 1 kU/l, taux qui représente des valeurs fréquemment observées dans les larmes.

Tous les échantillons ont été dosés par les deux méthodes et le calcul de la droite de régression et du coefficient de corrélation a été effectué.

La corrélation entre les deux méthodes est excellente ($R^2 = 0,99$ pour $n = 38$) (Fig. 1), y compris dans la zone de faibles concentrations 0,1–1 kU/l ($R^2 = 0,97$ pour $n = 26$) (Fig. 2).

L'excellente corrélation et la grande précision dans les faibles concentrations de cette nouvelle méthodologie nous permettent donc de l'utiliser en routine en toute confiance pour le dosage des IgE totales dans les larmes.

**Figure 2** Corrélation ancien protocole 15–20 versus nouveau protocole « 0-100 » sur les 26 échantillons de larmes ayant un taux d'IgE totales inférieur à 1 kU/l.

La recherche d'une sécrétion locale d'IgE totales au niveau lacrymal

Les IgE dosées dans les larmes ont plusieurs origines : une sécrétion locale depuis les cellules de la surface cornéoconjonctivale et une filtration à travers la barrière hémato-lacrymale. Pour permettre d'estimer la part des IgE filtrées, ce dosage doit être doublé de celui d'un marqueur endogène de la filtration à travers la barrière hémato-lacrymale. L'albumine n'est pas synthétisée par les glandes lacrymales et son dosage dans les larmes est donc le reflet du seul passage des protéines d'origine sérique.

Le dosage de l'albumine doit être effectué dans le sérum et dans les larmes par une technique sensible et adaptée à de petits volumes, telle que l'immunonéphélométrie. Normalement inférieur à 50 mg/l dans les larmes, son taux peut augmenter jusqu'à 10 g/l en cas d'inflammation très importante.

Ce dosage présente un autre intérêt, car il permet de tenir compte du rôle du prélèvement, à la fois complexe et contradictoire comprenant l'éventuelle dilution des protéines lacrymales dans les larmes dites réflexes recueillies après stimulation et, à contrario, l'augmentation possible du passage des protéines à travers la barrière hémato-lacrymale secondaire à une vasodilatation conjonctivale suite à une légère irritation de la muqueuse par le prélèvement.

Résultats et interprétation

La seule présence d'IgE totales dans les larmes ne suffit pas à affirmer l'existence d'une sensibilisation du sujet à un ou plusieurs allergènes. Pour une interprétation satisfaisante du résultat, il est important de différencier les IgE sécrétées localement des IgE lacrymales filtrées à travers la barrière hémato-lacrymale. En effet, au cours des réactions inflammatoires conjonctivales, la barrière hémato-lacrymale est altérée, laissant transsuder les protéines sériques dans les larmes à des taux fonctions du degré de l'inflammation et les IgE n'échappent pas à ce mécanisme.

Un coefficient de filtration des IgE C est donc calculé par le rapport égal à [albumine lacrymale/albumine sérique] corrigé par un facteur empirique qui prend en compte la différence de taille des IgE et de l'albumine [5].

Les IgE lacrymales d'origine sérique dites IgE filtrées sont calculées en multipliant les IgE sériques par ce coefficient.

La présence ou non d'une sécrétion locale d'IgE est déterminée par le rapport [IgE lacrymales dosées/IgE lacrymales filtrées]. Elle est considérée comme significative si le rapport est supérieur à 4. Entre 2 et 4, le rapport est rendu intermédiaire et non significatif pour toute valeur inférieure à 2.

ALLERGIE

SERUM

Analyse	Résultat	Unités	Valeurs de référence
Albumine	39.8	g/l	(35-50)
IgE totales	48.9	kU/l	(20-100)
Phadiatop	Négatif		
Phadiatop ratio	<1		

Si Ratio > 1 : résultat positif = présence d'IgE spécifiques vis à vis d'un ou plusieurs allergènes du mélange

LARMES

	LARMES ŒIL DROIT	LARMES ŒIL GAUCHE
Albumine (g/l)	0.250	3.725
IgE totales dosées (kU/l)	0.15	3.84
IgE filtrées (kU/l)	0.200	2.970
IgE dosées/filtrées	0.75	1.29

Conclusion

Nature : Larmes Origine : Œil Localisation : Droite

Rapport non significatif d'une sécrétion locale d'IgE (R<2)

Conclusion

Nature : Larmes Origine : Œil Localisation : Gauche

Rapport non significatif d'une sécrétion locale d'IgE (R<2)

Figure 3 Exemple de résultats d'une recherche de sécrétion locale d'IgE lacrymales totales.

Les résultats des IgE totales dosées, des IgE filtrées, de l'albumine sont rendus pour le sérum et pour chaque œil et le rapport est calculé et interprété. Le résultat présenté ici illustre l'importance du dosage de l'albumine lacrymale et de la détermination des IgE lacrymales filtrées: le dosage des IgE lacrymales et celui de l'albumine sont tous les deux 15 fois plus élevés au niveau de l'œil gauche, suite à un mécanisme inflammatoire important de ce côté, avec, en final, un rapport IgE dosées/IgE filtrées non significatif des deux côtés (Fig. 3).

Discussion

Les IgE lacrymales ne sont pas à rechercher dans les formes classiques de conjonctivite saisonnière aiguë, mais seulement dans les cas particulièrement récidivants et/ou sévères [6].

Leur dosage est utile dans une conjonctivite chronique isolée à symptomatologie peu évocatrice où la présence d'IgE totales lacrymales peut être le seul argument en faveur d'une origine allergique [2].

Dans les kératoconjunctivites vernoales, les IgE lacrymales sont beaucoup plus souvent positives que les tests systémiques (prick-tests ou IgE sériques) avec, dans 30 à 50% des cas, une hyperproduction d'IgE strictement oculaire, traduisant bien le fait que l'œil peut être un compar-

timent immunologiquement indépendant de l'organisme [6].

Les IgE totales lacrymales sont également fréquemment élevées dans les kératoconjunctivites atopiques.

Mais un taux d'IgE lacrymales inférieur à 0,15 kU/l ou un rapport non significatif ($R < 2$) ne permet pas d'exclure le diagnostic d'allergie, sachant que les IgE dosées dans les larmes sont celles qui ne sont pas fixées sur les mastocytes et que leur demi-vie est brève.

C'est pourquoi ce dosage est systématiquement associé à la recherche de polynucléaires éosinophiles dans les sécrétions, examen simple et peu coûteux qui consiste à observer au microscope optique un étalement des sécrétions conjonctivales prélevées dans le cul de sac et coloré au May-Grünwald-Giemsa. La présence de polynucléaires éosinophiles est le signe pathognomonique d'une manifestation allergique, leur absence ne permettant pas d'éliminer le diagnostic d'autant que leur apparition est souvent contemporaine de la phase tardive de la réaction allergique IgE dépendante.

De plus, la mise en évidence in vitro d'une sécrétion d'IgE au niveau de la surface oculaire permet seulement d'affirmer la sensibilisation du patient à un ou plusieurs allergènes sans pour autant constituer la preuve de leur responsabilité dans les symptômes observés.

Les IgE spécifiques peuvent être dosées selon le même principe technique utilisant la même gamme d'étalonnage

« 0-100 », sachant que le travail de validation technique qui a été effectué pour les IgE totales ne l'a pas été pour chacun des allergènes. De plus, le volume de larmes nécessaire à chaque dosage constitue un facteur limitant à leur dosage en routine.

D'autres examens biologiques complémentaires peuvent également être demandés en fonction de la symptomatologie : examen microbiologique, examen cytologique de l'empreinte conjonctivale, étude des protéines lacrymales, recherche de *chlamydiae* par technique PCR sur les produits de raclage des conjonctives, etc.

Tout résultat doit être interprété en fonction de la clinique, de l'interrogatoire, des résultats des autres examens biologiques et des tests cutanés. Une collaboration clinico-biologique est particulièrement utile dans ce contexte.

La particularité du prélèvement de larmes qui demande à la fois du temps et une certaine technicité, l'adaptation technique des dosages d'IgE et d'albumine, la complexité du rendu et de l'interprétation des résultats font que cet examen reste l'apanage de laboratoires spécialisés.

Le développement de nouvelles techniques de dosages sensibles, multiparamétriques et adaptés à de petits volumes d'échantillons devrait permettre l'élaboration de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques dans le cadre de l'allergo-ophtalmologie.

Conclusion

Le dosage des IgE totales lacrymales et la recherche d'une sécrétion locale d'IgE au niveau de la surface oculaire

sont utiles dans un bon nombre de situations cliniques pour confirmer l'étiologie allergique d'une conjonctivite ou d'une kératoconjonctivite. L'utilisation de la technique ultrasensible « 0-100 » sur l'appareil Immunocap®100 (Phadia) permet un dosage simple, sensible et précis des IgE totales lacrymales. La mise en évidence d'une sécrétion locale d'IgE au niveau de la surface oculaire permet de poser un diagnostic étiologique et de proposer une thérapeutique adaptée.

Références

- [1] Batellier L, Poilane C, Rault J, Chaumeil C, Scat Y. Dosage des IgE totales dans les larmes : adaptation d'une technique immunoenzymatique et intérêt de la recherche d'une synthèse locale d'IgE dans l'exploration des conjonctivites chroniques. *Ann Biol Clin* 1999;57:469-73.
- [2] Corbillon E, Rame JM. Indications du dosage des IgE spécifiques dans le diagnostic et le suivi des maladies allergiques. Dossier de la Haute Autorité de Santé, France, Mai 2005.
- [3] Doan S. Quand pratiquer un bilan allergologique en pathologie oculaire? *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2005;45: 222-5.
- [4] Fauquert JL, Jouaville L, Chiambaretta F. Exploration des conjonctivites allergiques : comment explorer? *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2007;47:224-7.
- [5] Liotet S, Warnet VN, Sainte-Laudy J, Arrata M, Hartmann C. Production locale dans les larmes d'immunoglobulines E au cours de manifestations conjonctivales allergiques. *J Fr Ophtalmol* 1982;5:401-6.
- [6] Pisella PJ, Fauquert JL et al. L'allergie oculaire, Rapport annuel, novembre 2007, *Bull Soc Ophtalmol Fr*, CVII, 1-328.