



ELSEVIER
MASSON

Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com



Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique xxx (2008) xxx–xxx

REVUE FRANÇAISE
D'ALLERGOLOGIE
ET D'IMMUNOLOGIE CLINIQUE

<http://france.elsevier.com/direct/REVCLI/>

Article original

Intérêt d'un nouveau protocole de cytométrie en flux appliqué au diagnostic et à la prévention des accidents peranesthésiques aux curares

Interest of a new flow cytometric protocol applied to diagnosis and prevention of per anaesthetic accidents induced by neuromuscular blockers

J. Sainte-Laudy^{a,*}, I. Orsel^b

^a Laboratoire d'immunologie, CHU Dupuytren, 2, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges cedex, France

^b Département d'anesthésie, CHU Dupuytren, 87042 Limoges cedex, France

Reçu le 30 mai 2008 ; accepté le 10 juin 2008

Résumé

But de l'étude. – Nous évaluons ici une technique utilisant deux marqueurs d'activation (CD63 et IgE) et une expression des résultats en index d'activation (IA) calculé par un algorithme dédié.

Matériel et méthodes. – Vingt-six patients allergiques et 23 témoins ayant reçu des curares ont été sélectionnés (histoire clinique, tests cutanés et/ou IgE spécifiques). Les curares ont été testés soit en mélange ($n = 26$), soit séparément en utilisant, soit les allergènes natifs ($n = 30$), soit les allergènes commercialisés pour cytométrie ($n = 9$). Les concentrations utilisées sont celles recommandées par la SFAR pour les IDR. Le protocole cytométrique utilisé est le protocole IgE/CD63, les résultats étant exprimés en pourcentage de CD63 et en index d'activation (IA), calculé par un algorithme spécifique incluant les moyennes d'intensité de fluorescence (MIF) des populations IgE++ et CD63+ et –.

Résultats. – Les curares testés ne montrent pas de toxicité pour les basophiles, y compris à des concentrations dix fois supérieures aux concentrations diagnostiques. Avec les allergènes natifs les sensibilités respectives pour le marqueur CD63 seul ou pour l'IA sont de 68 et 100 % pour les mélanges, 67 et 100 % pour les curares spécifiques. Avec les allergènes commerciaux, la sensibilité pour les curares spécifiques est de 47 et 100 %. La spécificité est de 100 % pour le CD63 seul et de 98 % pour l'IA. La liaison avec les tests cutanés (Khi^2 calculé pour la population des allergiques) est significative pour les deux marqueurs et pour les deux types d'allergènes. Enfin, la corrélation index/IgE spécifique n'est pas significative.

Conclusion. – Ce nouveau protocole cytométrique permet d'envisager une utilisation plus large de cette méthode en allergeoanesthésie.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Aim of the study: We tested here a new cytometric method based on the use of two activation markers (CD63 and IgE) and result's expression in activation index (AI).

Material and methods: Twenty-six allergic patients and 23 controls having received a neuromuscular blocker (NMB) have been selected on the basis of clinical history, skin tests and specific IgEs. NMB were tested mixed ($n = 26$) or alone (injectable form, ($n = 30$) and allergens commercialized for flow cytometry ($n = 9$). Concentrations used were the same than for IDR according to the recommendations of the French Society of Anaesthesia and Resuscitation (SFAR). The cytometric protocol used was the IgE/CD63 protocol, results being expressed in percentage CD63 and in AI calculated by a specific algorithm involving the mean fluorescence intensity (MFI) of the IgE+ and the CD63+ and – populations.

Results: In the technical described here NMB exhibited no toxicity even for concentrations 10 times higher than concentrations used for diagnosis. With the injectable form, the respective sensitivities observed for CD63 alone and the AI were 68 and 100% for the mixture of NMB and, 67 and

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : jean.sainte-laudy@chu-limoges.fr (J. Sainte-Laudy).

100% for the isolated NMB. With the NMB commercialized for flow cytometry, sensitivities were 47 and 100%. Specificities were 100% for CD63 alone and 98% for the AI. The link (χ^2) between skin tests and flow cytometry was significant for the two markers and the two allergen types. Correlation between AI and specific IgEs was not significant.

Conclusion: The new flow cytometric protocol described here has the necessary characteristics of a biological test which could be included in the pre-anaesthetic check up.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Choc peranesthésique ; Curares ; Allergie ; Cytométrie en flux ; IgE ; CD63

Keywords: Per anaesthetic shock; Muscle relaxants; Allergy; Flow cytometry; IgE; CD63

1. Introduction

Les curares sont responsables, en France, d'environ 54 % des accidents allergiques peranesthésiques [1] qualifiés aujourd'hui d'hypersensibilités allergiques IgE dépendantes (HSA-IgE) [2]. Devant un choc peranesthésique avec utilisation d'un curare, une HSA-IgE est habituellement établie par les tests cutanés, pratiqués avec les sept curares disponibles en France, le dosage des IgE spécifiques ammonium quaternaires, la tryptase et l'histamine plasmatiques.

Les sept curares doivent être testés car l'on observe des réactions croisées entre les curares dans 75 % des cas et tous les curares réagissent dans 15 % des cas [1,3,4]. Les pricks complétés, en cas de négativité, par les IDR, représentent le diagnostic de référence selon les recommandations de la Société française d'anesthésie réanimation (SFAR, <http://sfar.org>) et de l'Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (ANAES, 2001) en raison de leurs sensibilité et spécificité élevées (plus de 90 %). En complément de la recherche des IgE spécifiques ammonium quaternaires, les méthodes cellulaires (histaminolibération et plus récemment la cytométrie en flux) permettent de confirmer le diagnostic de HSA-IgE, mais sont surtout utiles en cas de discordance entre les tests de référence et la clinique ainsi que pour l'exploration des réactions croisées entre curares.

Parmi ces méthodes cellulaires in vitro, la cytométrie en flux a connu un réel essor depuis la description, dans les années 1990, du marqueur d'activation CD63 [5] appliqué au diagnostic allergologique en 1994 [6] et est considérée actuellement comme une des techniques les plus prometteuses [7].

Le CD63 ou gp53 ou *lysosome-associated membrane protein* (LAMP-3) est exprimé par différents types cellulaires dont les basophiles, les mastocytes, les macrophages et les plaquettes. Le CD63 est ancré dans les granules intracytoplasmiques et est très peu représenté sur la membrane externe des basophiles au repos tandis qu'il est exprimé avec une haute densité sur les basophiles activés [5,8]. L'expression du CD63 est plus proche de la dégranulation anaphylactique que l'expression d'autres marqueurs tel que le CD203c [8,9].

Ce marqueur a fait l'objet de très nombreuses études de validation biocliniques pour une large gamme d'allergènes, allant des inhalants au latex, aux venins et aux médicaments tels que les bêta-lactamines, les AINS. Les différents travaux aboutissent à des résultats semblables, à savoir une très bonne

spécificité (supérieure à 85 %) et à une sensibilité élevée pour les protéines (plus de 90 %) et moyenne (40 à 60 %) pour les médicaments [10,11].

Dans le cadre de l'exploration des réactions aux curares, les résultats sont généralement meilleurs (47 à 91,7 %), cette meilleure sensibilité étant probablement due à la nature bivalente de ces allergènes [12,13,14,15]. Les espoirs nés de l'utilisation du CD203c [14] ont été infirmés par d'autres auteurs [13].

Dans le but d'augmenter la sensibilité, nous avons associé au marqueur CD63 un deuxième marqueur d'activation, l'IgE membranaire, dont l'immunomodulation négative induite par la stimulation de la cascade d'activation est démontrée par des travaux antérieurs [16,17,18]. En effet, lors de l'activation du basophile, les phénomènes membranaires aboutissent à une baisse de la fluorescence moyenne des basophiles marqués par un anti-IgE conjugué à un marqueur fluorescent tel que l'isothiocyanate de fluoresceine (anti-IgE FITC). Une étude préliminaire [19] a, par ailleurs, confirmé l'intérêt de ce protocole associé au calcul d'un index d'activation (IA) pour les curares ainsi que pour les bêta-lactamines [20].

Nous comparons ici les résultats obtenus avec le même protocole cytométrique mais avec différents types d'allergènes, les curares étant testés, soit en mélange soit individuellement sous forme injectable ou sous forme commerciale optimisée pour la cytométrie en flux

2. Matériel et méthodes

2.1. Sélection des patients

Vingt-six patients âgés de 18 à 85 ans, 18 femmes et huit hommes, ayant présenté des chocs de grade I [1], grade II [2] grade III [20] grade IV [2] induits par le suxaméthonium [21], le *cis*-atracurium [2], le rocuronium [1], le vécuronium [1], l'atracurium [1] et ayant les caractéristiques d'une HSA aux curares (histoire clinique, tests cutanés et/ou IgE spécifiques) et 23 témoins âgés de 18 à 85 ans, 14 femmes et neuf hommes, ayant reçu un curare, mais ayant présenté une réaction peranesthésique non induite par un curare (AINS [1]), bêta-lactamines [7], latex [2], paracétamol [1], vancomycine [1] et d'étiologie non trouvée [11] avec IgE spécifiques ammonium quaternaires négatives et, pour trois d'entre eux, histamine et tryptase plasmatiques normales. Tous les sujets témoins ont des tests cutanés négatifs pour les curares.

Le délai entre le choc et le prélèvement sanguin pour la cytométrie en flux a toujours été inférieur à deux ans.

2.2. Tests cutanés

Ils ont été réalisés selon les recommandations de la SFAR, à savoir en prick, puis en IDR en cas de négativité.

2.3. Analyse de l'activation des basophiles par cytométrie en flux

La méthode utilisée a déjà été décrite [18] et elle correspond à la méthode FLOW-CAST (Buhlmann). En résumé, le sang total prélevé sur EDTA est analysé dans un délai maximum de 48 h (conservation à +4 °C). Les suspensions cellulaires enrichies en leucocytes sont obtenues par centrifugation (500 g, 15 minutes). La couche leucocytaire (*buffy-coat*) est prélevée en prenant le minimum d'hématies et est centrifugée (300 g, cinq minutes). Le surnageant est conservé en sérothèque (–20 °C) et le culot est repris par un tampon d'activation contenant une concentration optimale d'IL-3 (10 ng/ml). Après dix minutes à 37 °C (préactivation par l'IL-3), 50 µl de suspension cellulaire sont incubés avec soit 50 µl de tampon (contrôle négatif ou activation spontanée) ou avec l'agoniste choisi comme témoin positif (anti-IgE [monoclonal de spécificité D2 Immunotech, Marseille, 0,2 µg/ml] et le N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phénylalanine [FMLP, Sigma, 10-7M]) ou avec l'allergène dilué dans le tampon d'activation. Les curares sont dilués selon les recommandations de la SFAR pour les IDR sachant que l'atracurium et le *cis*-atracurium doivent être préparés extemporanément du fait de leur hydrolyse rapide. Les concentrations utilisées sont : suxaméthonium (1/500 et 1/2500), vécuronium, pancuronium (1/10 et 1/50), atracurium (1/100 et 1/5000), *cis*-atracurium (1/100 et 1/500), rocuronium (1/100 et 1/500) et mivacurium (1/1000 et 1/5000). Les curares sont également testés sous forme de mélange préparé par mélange d'un aliquot des différents curares (suxaméthonium (1/10), rocuronium (1/3), mivacurium (1/30) pancuronium et vécuronium purs). Du fait de leur hydrolyse rapide le traciurium (1/10) ou le *cis*-atracurium (pur) sont dilués extemporanément au 1/10 dans le mélange précédent. Ce mélange est conservé un mois à +4 °C. Le mélange est systématiquement testé pur, au 1/5 et au 1/25.

Après une incubation de 30 minutes à 37 °C, l'activation des basophiles est arrêtée par addition de 50 µl de tampon EDTA, les leucocytes sont marqués par un mélange de deux anticorps anti-IgE FITC et anti-CD63 PE et incubés dix minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les hématies sont lysées par un tampon chlorure d'ammonium (dix minutes à température ambiante) et après centrifugation (500 g, trois minutes), les leucocytes sont resuspendus dans le liquide de gaine (500 µl, Isoton, Coulter, États-Unis). L'analyse cytométrique est effectuée dans un délai de deux à 18 heures à 4 °C (C500 Coulter-Beckman). Le nombre de basophiles comptés doit être au minimum de 300 et les résultats sont exprimés en pourcentages de basophiles IgE++/CD63+. Déduction faite de

la stimulation spontanée, le seuil de positivité est de 4 %. Le test n'est interprété que si, la stimulation spontanée est inférieure à 15 %, le témoin positif est supérieur à 15 % et que le ratio test/contrôle négatif est supérieur à 2. Les résultats sont également exprimés en index d'activation (IA) impliquant les valeurs de la moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) des cellules IgE positives (MIF-IgE) et de l'ensemble des cellules IgE positives et CD63 positives et négatives (MIF-CD63) et calculé selon d'algorithme suivant :

index d'activation (IA) = y (IgE) X y' (CD63) ou y est égal à :

$$y = \frac{a - d}{(1 + (x/c)^b)} + d$$

Cette fonction logistique à quatre paramètres est définie par a = minimum, d = maximum, b = pente, c = abscisse du point d'inflexion et $x = (1 - A/B)$, A correspondant à la MIF du contrôle négatif et B à la MIF du test pour le CD63 et l'inverse pour l'IgE. Cet algorithme est basé sur le fait que l'activation des basophiles humains induit une expression du marqueur membranaire CD63 avec une haute densité et parallèlement une baisse de la fluorescence moyenne de la population IgE++. Les valeurs des MIF étant introduites dans le calcul sous forme de rapport, cet algorithme est indépendant des réactifs et du cytomètre utilisés.

2.4. Recherche des IgE ammonium quaternaires

La recherche des IgE spécifiques ammonium quaternaires est pratiquée par la technique PAPPC selon le protocole décrit [21,22].

2.5. Analyse statistique

La liaison entre deux variables est calculée par le $K\chi^2$, la significativité statistique des résultats quantitatifs est calculée par le test non paramétrique des rangs de Wilcoxon (logiciel XLStat®) et les paramètres sensibilité et de spécificité selon les méthodes déjà décrites [23].

3. Résultats

3.1. Concentrations optimales des curares

3.1.1. Essais de toxicité

Que ce soit pour les tests cutanés ou les techniques cellulaires in vitro, un problème constant est celui de la proximité entre les plages de concentrations activatrices et les plages de concentrations éventuellement toxiques. De plus, pour les curares, il n'y a pas ce consensus sur ce point. Nous avons testé, sur trois témoins, les quatre curares dont les dilutions recommandées pour les tests cutanés sont supérieures au 1/100 (à savoir, le suxaméthonium, le rocuronium, le mivacurium et l'atracurium) à des concentrations dix fois supérieures aux concentrations limites recommandées pour les IDR. Dans les conditions techniques décrites, ces quatre curares ne montrent pas de toxicité (aucun résultat supérieur au seuil de

positivité), que l'activation soit mesurée par le CD63 seul ou par l'index d'activation.

3.1.2. Concentrations optimales activatrices

Le nombre de cas n'étant suffisant que pour le suxaméthonium, nous avons comparé, pour cet allergène, la réactivité du basophile pour les deux concentrations (C1 et C2) systématiquement testées. L'expression du CD63 est respectivement de 22 ± 24 % et de 23 ± 26 % pour les allergènes natifs ($n = 12$) et de $6 \pm 6,8$ % et de $8,6 \pm 9,5$ % ($n = 9$) pour les allergènes Buhlmann et l'index d'activation de 322 ± 614 et de 585 ± 1309 pour les allergènes natifs et de 960 ± 1213 et 1988 ± 2021 pour les allergènes Buhlmann. La différence entre les résultats correspondant aux deux concentrations testées n'est pas significative. Le test d'activation des basophiles n'est positif que pour une seule dilution dans 22 % des cas pour le marqueur CD63 et dans 44 % des cas pour l'IA.

3.2. Mélanges de curares

Les mélanges de curares ont été testés chez 11 patients allergiques et chez 15 témoins. L'expression du marqueur CD63 seul est, respectivement pour les deux concentrations C1 et C2 de $0,54 \pm 1,35$ et $0,44 \pm 1,10$ (activation spontanée déduite) pour les sujets témoins et de $26,3 \pm 27,6$ et $24,2 \pm 29,1$ pour les allergiques. La sensibilité du mélange de curares est de 67 % avec un seuil à 4 % et sa spécificité de 100 %. De même pour l'IA, $2,7 \pm 0,9$ et $3,2 \pm 1,3$ pour les témoins et 771 ± 1753 et 399 ± 875 pour les allergiques avec un seuil de 16. Dans ces conditions la sensibilité et la spécificité sont de 100 %.

3.3. Curares individuels

3.3.1. Spécificité

Nous avons comparé, pour les deux modes d'expression des résultats les allergènes natifs et les allergènes Buhlmann. Pour les sujets témoins ($n = 12$, 82 tests), les pourcentages des CD63 sont, respectivement pour les deux concentrations C1 et C2, de $0,29 \pm 1,35$ et de $0,2 \pm 1,46$ (spécificité de 100 % pour un seuil de 4 %). De même, les IA sont de $4 \pm 5,9$ et de $3 \pm 2,2$ (spécificité de 98 % pour un seuil de 16)

3.3.2. Sensibilité

Nous avons évalué la sensibilité de la méthode vis-à-vis du curare responsable du choc.

Pour les allergènes natifs testés aux concentrations C1 et C2 ($n = 16$) l'expression du CD63 est de $18,3 \pm 22,8$ % et de $19,3 \pm 24,5$ % (sensibilité de 68 % pour un seuil de 4 %) et les valeurs de l'IA sont de 830 ± 2235 et de 836 ± 1833 avec une sensibilité de 100 % pour un seuil de 16.

Pour les allergènes Buhlmann ($n = 9$), l'expression du CD63 est de $6 \pm 8,6$ % et de $6,8 \pm 9,5$ % (sensibilité de 47 %) et l'IA est de 1960 ± 1988 et de 1213 ± 2021 (sensibilité de 100 %). Les valeurs des sensibilités et des spécificités sont résumées dans le Tableau 1. De plus, la corrélation entre les IgE spécifiques mesurées par la méthode PAPPC et les résultats de

Tableau 1
Valeurs des sensibilités (sujets allergiques) et des spécificités (sujets témoins) pour les différents allergènes testés et pour les deux modes d'expression des résultats de l'analyse cytométrique

		Mélanges sujets $n = 15$				Mélanges sujets témoins $n = 82$				Détail sujets allergiques				Allergènes Buhlmann $n = 9$			
		Mélanges		sujets		Mélanges		sujets		allergiques		Détail		Allergènes natifs $n = 16$		C1	
		C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Pourcentage de CD63	Résultats	$0,54 \pm 1,4$	$0,44 \pm 1,10$	$26,3 \pm 27,6$	$24,2 \pm 29,1$	$0,29 \pm 1,35$	$0,2 \pm 1,46$	$18,3 \pm 22,8$	$19,3 \pm 24,5$	$6 \pm 8,6$	$6,8 \pm 9,5$						
	Se/Sp	100 %		67 %		100 %		68 %						47 %			
Index	Résultats	$2,7 \pm 0,9$	$3,2 \pm 1,3$	771 ± 1753	399 ± 875	$4 \pm 5,9$	$3 \pm 2,2$	830 ± 2235	836 ± 1833	1960 ± 1988	1213 ± 2021						
	Se/Sp	100 %		100 %		98 %		100 %						100 %			

la cytométrie en flux exprimés en index n'est pas significative ($R^2 = 0,0095$).

3.3.3. Liaison avec les tests cutanés

Le test de liaison (Khi^2) entre les tests cutanés et la cytométrie en flux a été calculé pour la population de patients allergiques. Que ce soit avec les allergènes natifs (90 tests) ou avec les allergènes Buhlmann, (49 tests) le Khi^2 est significatif (respectivement, $p < 0,001$ et $p < 0,01$ pour le CD63 et $p < 0,001$ et $p < 0,02$ pour l'IA).

La comparaison des tests cytométriques exprimés en index et correspondant soit à des pricks positifs soit à des IDR positives montre que les résultats exprimés en index correspondant aux pricks sont significativement plus élevés ($3171,6 \pm 3560,6$, $p < 0,001$) (que ceux correspondant aux IDR positives ($118,9 \pm 261,3$). Nous avons étudié, pour le suxaméthonium, les réactions croisées entre les cinq curares testés systématiquement en parallèle du suxaméthonium (atracurium, pancuronium, rocuronium, vécuronium et mivacurium). Pour les résultats exprimés en pourcentages CD63, les fréquences de positivité sont respectivement de 14 %, 7 %, 14 %, 7 % et 7 %, et les résultats quantitatifs moyens de $0,9 \pm 2,6$ %, $4,7 \pm 18$ %, $9,8 \pm 27,6$ %, $8,5 \pm 25,9$ % et $0,12 \pm 2,7$ % (suxaméthonium = $16,6 \pm 16,7$ %).

Pour les résultats exprimés en index, les fréquences de positivité sont respectivement de 32 %, 32 %, 24 %, 16 %, 8 % et les résultats quantitatifs moyens de 43 ± 163 , 468 ± 1744 , 445 ± 1687 , 434 ± 1692 , 10 ± 22 (suxaméthonium = 755 ± 1570).

Que les résultats soient exprimés en pourcentage CD63 ou en index, les réactions croisées observées vis à vis de suxaméthonium concernent principalement quantitativement les aminostéroïdes (pancuronium, vécuronium, rocuronium), conformément aux données de la littérature.

4. Discussion et conclusion

Les résultats obtenus par cytométrie en flux dépendent étroitement, d'une part du choix des marqueurs de sélection et d'activation, ici respectivement l'IgE et le CD63 et, d'autre part, de la nature et de la concentration des allergènes utilisés. Les marqueurs que nous avons utilisés pour cette étude ont été largement validés, non seulement pour les curares, mais aussi pour d'autres médicaments (AINS et bêta-lactamines) et des protéines (pneumallergènes, aliments, latex et venins). Le principal facteur limitant de ce protocole cytométrique est la présence d'une éventuelle faible densité membranaire d'IgE (observée principalement chez le nourrisson) en relation avec une faible concentration d'IgE totales circulantes. En effet, dans ce cas, la population de basophiles peut être difficile à sélectionner du fait d'un recouvrement partiel de la population IgE ++ avec la population de cellules autofluorescentes. Des protocoles de nouvelle génération sont actuellement à l'étude et permettront de palier à ces difficultés.

Pour cette étude les curares ont été utilisés soit sous forme de mélange, soit séparément sous forme native ou commercialement disponible pour cytométrie en flux. Aux dilutions

recommandées pour les IDR par la SFAR, les spécificités observées sont très élevées pour les trois types d'allergènes tandis que les sensibilités sont moyennes (47 à 68 %), conformément aux données de la littérature, pour les résultats exprimés en pourcentage CD63. Elles sont, en revanche, très élevées pour les résultats exprimés en index d'activation. L'utilisation d'un marqueur d'activation plus précoce (IgE) et le calcul d'un index par un algorithme dédié permet ainsi d'augmenter très sensiblement, à spécificité égale, la sensibilité de la méthode cytométrique IgE/CD63. Par ailleurs, à des concentrations dix fois supérieures aux dilutions non réactives par IDR, le suxaméthonium, le rocuronium, le mivacurium et l'atracurium ne montrent pas de toxicité pour le basophile humain dans les conditions techniques décrites.

Une autre limitation de cette méthode est l'existence de sujets non-répondeurs caractérisés par une réponse faible (CD63 inférieur à 15 %) vis à vis de l'anti-IgE ou de l'anti-récepteur $\text{Fc}\epsilon\text{R1}$. Dans la grande majorité des cas ces basophiles répondent au fMLP ce qui confirme que cet agoniste ne permet pas de sélectionner les sujets non répondeurs. Des travaux récents montrent un rôle central des tyrosines-kinases (lyn et syk) impliquées dans les phases précoces de la cascade d'activation dépendant de l'activation de la voie IgE dépendante. Il a été démontré que syk est absente et la concentration de lyn insuffisante chez les non-répondeurs, le mRNA étant détectable à une concentration normale. La préactivation par l'IL-3 peut, au moins partiellement convertir les non répondeurs en répondeurs. Dans le cas d'une réponse faible ou d'une absence de réponse à l'anti-IgE ou à l'anti-récepteur, soit le test est négatif et il est alors ininterprétable soit il est positif et est considéré comme tel, le témoin positif n'ayant pas une valeur absolue. Quatre patients allergiques de notre étude ont montré ainsi une réponse CD63 inférieure à 15 % (13,2 %, 9,1 %, 7,4 % et 12,6 %), les résultats vis à vis des allergènes spécifiques étant toutefois positifs, deux en pourcentages de CD63 et en index d'activation, deux en index d'activation seul).

Les tests de liaison (Khi^2) significatifs observés, pour les sujets allergiques, entre les tests cutanés et les résultats de la cytométrie en flux ainsi que les résultats des réactions croisées observées entre le suxaméthonium et les autres curares testés montrent que les deux méthodes étudient bien, in vivo et in vitro, le même mécanisme.

Des études sur des populations plus importantes seront nécessaires afin de préciser les caractéristiques de cette méthode cytométrique et de calculer les valeurs prédictives positives et négatives. De plus, la majorité des accidents inclus dans cette étude ayant été induits par le suxaméthonium, il conviendra également de vérifier si les résultats obtenus avec aminostéroïdes et les benzyloquinones sont superposables. Une étude européenne sera initiée en 2008 afin de répondre à ces différentes questions.

Les tests de liaison (Khi^2) calculés, pour les sujets allergiques, entre les tests cutanés et les résultats de la cytométrie, montrent l>IDR, l'expression du marqueur CD63 pouvant être considéré, ainsi que nous l'avons observé pour d'autres familles de médicaments (résultats non publiés), comme un critère de gravité.

Du fait des sensibilités et des spécificités élevées observées dans cette étude, ces résultats valident l'utilisation de la cytométrie pour le diagnostic des hypersensibilités IgE dépendantes aux curares et pour la recherche d'un curare négatif, chez un allergique aux curares, conjointement avec les tests cutanés.

Références

- [1] Mertes PM, Laxenaire MC. Anaphylactic and anaphylactoid reactions occurring during anaesthesia in France. Seventh epidemiologic survey (january 23001–december 2002). *Ann Fr Anaesth Reanim* 2004;23(12): 1133–43.
- [2] Johansson SGO, Hourihane JO'B, Bousquet J, et al. EAACI (the European Academy of Allergy and Clinical Immunology) nomenclature task force. A revised nomenclature of allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001;56:813–24.
- [3] Laxenaire MC, Mertes PM. Anaphylaxis during anaesthesia. Results of a two-years survey in France. *Br J Anaesth* 2001;87(4):549–58.
- [4] Mertes PM, Laxenaire MC. Allergy and anaphylaxis in anaesthesia. *Minerva Anaesthesiol* 2004;70(5):285–91.
- [5] Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88(3 Pt 1):328–38.
- [6] 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.
- [7] Demoly P, Arnoux B. Exploration biologique des allergies médicamenteuses. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2004;44:450–5.
- [8] Hennersdorf S, Florian A, Jakob. et al. Identification of CD13, CD107a and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation. *Cell Research* 2005;15(5):325–35.
- [9] Lambert C, Guilloux L, Dzviga C, Gourgaud-Massias C, Genin C. Flow cytometry versus histamine release analysis of in vitro basophil degranulation in allergy to Hymenoptera venom. *Cytometry B Clin Cytom* 2003;52(1):13–9.
- [10] Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck JS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004;34(3):332–9.
- [11] Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens M, Schuerwegh AJ, et al. Flow assisted allergy diagnosis. Current applications and future perspectives. *Allergy* 2006;61:1028–39.
- [12] Abuaf N, Rajoely B, Ghazouani E, Levy DA, Pecquet C, Chabane H, et al. Validation of a flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of muscle relaxants allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(2 Pt 1):411–8.
- [13] Sudheer PS, Hall JE, Read GF, Rowbortom AW, Williams PE. Flow cytometric investigation of peri-anaesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c. *Anaesthesia* 2005;60(3):251–6.
- [14] Monneret G, Benoit Y, Debarb AL, Gutowski MC, Topenot I, Bienvenu J. Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxants drugs. *Clin Immunol* 2002;102(2):192–9.
- [15] Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Mertens CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Flow assisted diagnostic management of anaphylaxis from rocuronium bromide. *Allergy* 2006;61:935–9.
- [16] Gane P, Pecquet C, Lambin P, Abuaf N, et al. Flow cytometric evaluation of human basophils. *Cytometry* 1993;14:344–8.
- [17] Gane P, Pecquet C, Crespeau H, et al. Flow cytometric monitoring of allergen induced basophil activation. *Cytometry* 1995;19:361–5.
- [18] Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, et al. 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.
- [19] Sainte-Laudy J, Boumediene A, Touraine F, Orsel I, Cogné M. Analysis of IgE down regulation in allergen induced basophil activation. Application to the diagnosis of muscle relaxant allergic hypersensitivity by flow cytometry. *Inflamm Res* 2006;S21–2.
- [20] Sainte-Laudy J, Boumediene A, Touraine F, Orsel I, Brianchon C, Bonnaud F, et al. Use of both CD63 upregulation and IgE downregulation for the flow cytometric analysis of allergen induced basophil activation. Definition of an activation index. *Inflamm Res* 2007;56:291–6.
- [21] Harle DG, Baldo BA, Fischer MM. Detection of IgE antibodies to suxamethonium after anaphylactoid reactions during anaesthesia. *The Lancet* 1984;28:930–2.
- [22] Guilloux L, Ricard-Blum S, Ville G, et al. A new radioimmunoassay using a commercially available solid support for the detection of IgE antibodies against muscle relaxants. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90: 153–9.
- [23] Bousquet PJ, Daures JP, Demoly P. Principes, caractéristiques et interprétation des tests de diagnostic et de dépistage. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2005;45:314–9.