

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2012

THESE N°

ACTIVATION DES POLYNUCLEAIRES
DANS L'ALLERGIE ALIMENTAIRE IgE
DEPENDANTE DE L'ENFANT

Thèse

pour le diplôme d'état de docteur en médecine

présentée et soutenue publiquement le 3 février 2012

par

Alexandra MASSON

née le 13 décembre 1984, à Limoges (87)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur Anne LIENHARDT-ROUSSIE.....	Présidente du jury
Madame le Docteur Céline MENETREY	Directrice de thèse
Monsieur le Docteur Jean SAINTE-LAUDY	Directeur de thèse
Monsieur le Professeur Vincent GUIGONIS	Juge
Monsieur le Professeur Michel COGNE.....	Juge
Madame le Docteur Marie-Thérèse ANTONINI	Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2012

THESE N°

**ACTIVATION DES POLYNUCLEAIRES
DANS L'ALLERGIE ALIMENTAIRE IgE
DEPENDANTE DE L'ENFANT**

Thèse

pour le diplôme d'état de docteur en médecine

présentée et soutenue publiquement le 3 février 2012

par

Alexandra MASSON

née le 13 décembre 1984, à Limoges (87)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur Anne LIENHARDT-ROUSSIE.....	Présidente du jury
Madame le Docteur Céline MENETREY	Directrice de thèse
Monsieur le Docteur Jean SAINTE-LAUDY	Directeur de thèse
Monsieur le Professeur Vincent GUIGONIS	Juge
Monsieur le Professeur Michel COGNE.....	Juge
Madame le Docteur Marie-Thérèse ANTONINI	Membre invité

Liste du corps enseignant de la faculté de médecine

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur VALLEIX Denis

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur LASKAR Marc
Monsieur le Professeur MOREAU Jean-Jacques
Monsieur le Professeur PREUX Pierre-Marie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

* C.S = Chef de Service

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
ALDIGIER Jean-Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (C.S)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BEDANE Christophe (C.S)	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe (C.S)	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre (C.S)	RADIOThERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (C.S)	PSYCHIATRIE ADULTES
COGNE Michel (C.S)	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre (Sur 31/08/2014)	UROLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COURATIER Philippe (C.S)	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel (C.S)	MEDECINE ET SANTE DU TRAVAIL
DUMAS Jean-Philippe (C.S)	UROLOGIE
DUMONT Daniel (Sur 31/08/2012)	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FEISS Pierre (Sur 31.08.2013)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
FEUILLARD Jean (C.S)	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
FUNALOT Benoît	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
GAINANT Alain (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François (C.S)	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne (C.S)	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEMATOLOGIE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MAUBON Antoine (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
MELLONI Boris (C.S)	PNEUMOLOGIE
MERLE Louis (C.S)	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
MONTEIL Jacques (C.S)	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE

MOREAU Jean-Jacques (C.S)
MOULIES Dominique (C.S) (**Sur. 31.08.2013**)
MOUNAYER Charbel
NATHAN-DENIZOT Nathalie (C.S)
PARAF François
PLOY Marie-Cécile (C.S)
PREUX Pierre-Marie
ROBERT Pierre-Yves
SALLE Jean-Yves (C.S)
SAUTEREAU Denis (C.S)
STURTZ Franck (C.S)
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre
TREVES Richard
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)
VALLAT Jean-Michel (C.S) (**Sur 31/08/2014**)
VALLEIX Denis (C.S)
VERGNENEGRE Alain (C.S)
VIDAL Elisabeth (C.S)
VIGNON Philippe
VIROT Patrice (C.S)
WEINBRECK Pierre (C.S)
YARDIN Catherine (C.S)

NEUROCHIRURGIE
CHIRURGIE INFANTILE
RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
OPHTALMOLOGIE
MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
GASTRO-ENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
RHUMATOLOGIE
CANCEROLOGIE
NEUROLOGIE
ANATOMIE CHIRURGIE GENERALE
EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE et PREVENTION
MEDECINE INTERNE
REANIMATION MEDICALE
CARDIOLOGIE
MALADIES INFECTIEUSES
CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel
ANTONINI Marie-Thérèse (C.S)
BOURTHOMIEU Sylvie
BOUEILLE Bernard
CHABLE Hélène
DURAND-FONTANIER Sylvaine
ESCLAIRE Françoise
FUNALOT Benoît
HANTZ Sébastien
LAROCHE Marie-Laure
LE GUYADER Alexandre
MARIN Benoît
MOUNIER Marcelle
PICARD Nicolas
QUELVEN-BERTIN Isabelle
TERRO Faraj
VERGNE-SALLE Pascale
VINCENT François

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
PHYSIOLOGIE
CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE
PARASITOLOGIE - MYCOLOGIE
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
ANATOMIE & CHIRURGIE DIGESTIVE
BIOLOGIE CELLULAIRE
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PHARMACOLOGIE CLINIQUE
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE
PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
BIOLOGIE CELLULAIRE
THERAPEUTIQUE
PHYSIOLOGIE

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

CAIRE François

NEUROCHIRURGIE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie

ANGLAIS

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

BUCHON Daniel
BUISSON Jean-Gabriel

MEDECINE GÉNÉRALE
MEDECINE GENERALE

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

DUMOITIER Nathalie
MENARD Dominique
PREVOST Martine

MEDECINE GENERALE
MEDECINE GENERALE
MEDECINE GENERALE

REMERCIEMENTS

AUX MEMBRES DU JURY,

Madame le Professeur Anne LIENHARDT-ROUSSIE, *Professeur des Universités de Pédiatrie. Praticien Hospitalier. Chef de service. Hôpital de la Mère et de l'Enfant, Limoges.*

Pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. Pour votre soutien et vos conseils depuis le début de mon internat. Pour votre aide pour mon stage hors filière. Pour votre enseignement et votre disponibilité.

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Madame le Docteur Céline MENETREY, *Praticien Hospitalier de Pédiatrie. Hôpital de la Mère et de l'Enfant, Limoges.*

Pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse. Pour m'avoir fait découvrir le monde de l'allergologie et toute sa complexité. Pour votre confiance pour ce travail et pour les consultations de pneumologie. Pour m'avoir confortée dans la direction de la pneumologie pédiatrique.

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Jean SAINTE-LAUDY, *Praticien Hospitalier Attaché d'Immunologie. Hôpital Dupuytren, Limoges.*

Pour ce sujet de thèse passionnant. Pour votre expérience et vos connaissances impressionnantes. Pour votre disponibilité, votre enseignement et vos remarques constructives. Pour votre patience face à mes nombreuses questions.

Veillez trouver ici l'expression de ma plus grande considération.

Monsieur le Professeur Vincent GUIGONIS, *Professeur des Universités de Pédiatrie. Praticien Hospitalier. Hôpital de la Mère et de l'Enfant, Limoges.*

Pour vos grandes qualités humaines et professionnelles qui sont pour moi un exemple. Pour votre disponibilité, votre écoute et vos conseils. Pour votre enseignement quotidien. Pour vos réponses à mes innombrables questions.

Veillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect.

Monsieur le Professeur Michel COGNE, *Professeur des Universités d'Immunologie. Praticien Hospitalier. Chef de service. Hôpital Dupuytren, Limoges.*

Pour avoir accepté de juger mon travail.

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Madame le Docteur Marie-Thérèse ANTONINI, *Maître de conférence des Universités de Physiologie. Praticien Hospitalier. Chef de service. Hôpital Dupuytren, Limoges.*

Pour votre accueil chaleureux au sein de votre équipe. Pour votre dynamisme et votre disponibilité. Pour votre enseignement et vos conseils.

Veillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Soyez assurés de ma profonde gratitude.

JE REMERCIE EGALEMENT,

Claire BAHANS, la plus patiente des attachés de recherche clinique. Pour votre aide précieuse et votre grande disponibilité.

Delphine et François, techniciens du laboratoire d'immunologie, pour leur disponibilité, leur aide et leur bonne humeur. Pour m'avoir éclairée dans ce monde inconnu de la cytométrie en flux.

Virginie, secrétaire de pédiatrie, pour ton aide pour obtenir l'ensemble des dossiers de ma thèse.

A MA FAMILLE ET MES AMIS,

A MAMAN,

Pour ton amour et ton soutien. Je ne pourrais jamais te remercier assez pour tout ce que tu fais pour moi. Pour ta confiance en moi depuis mes débuts en médecine. J'espère qu'aujourd'hui tu es fier de moi.

A MA GRAND-MERE JEANNE,

Tu es partie trop vite mais tu aurais été fier de moi.

A MON PERE.

A Alexandra. Pour ton immense soutien dans les bons et surtout les mauvais moments. Pour tous ces souvenirs depuis notre premier jour d'internat. Pour tes encouragements tout au long de ce travail. Pour notre amitié.

A Julie. Pour ton soutien. Pour nos soirées de travail et de détente. Pour ta spontanéité et ta ponctualité.

A mes amis internes expatriés à Limoges. Aurélie, Antoine, Ahmed, Benjamin, Dorothee, Jean-Baptiste, Loïc, Mickael, Philippe et Rémi. Pour cette année au bureau de l'internat et pour toutes ces soirées. Pour vos encouragements.

A tous les internes de pédiatrie. Laure, Charlotte, Marion, Amélie, Anne-Sophie, Elsa et Nabil. Pour votre esprit d'équipe et votre soutien. Pour les soirées potins et mojitos entre filles (pardon Nabil !).

A toutes les anciennes internes de pédiatrie. Cécile, Laurène, Sophie, Marie-Lucile, Florence, Julie, Fanny, Marie et Marianne. Pour vos encouragements et votre amitié. Pour m'avoir épaulée lors de mes débuts et m'avoir fait partager votre expérience.

A l'ensemble des internes de Brive. Pour ces six mois de coupure. Pour ces soirées inoubliables qui resteront à Brive.

A mes amis de Limoges. Cécile, Thomas, Claire, Tiphaine, Anne-Sophie, Eva, Axel, Emilie, Fanny, Emmanuelle et Gaëtane. Pour vos encouragements et votre présence.

A mes amis qui sont plus loin mais qui me sont chers. Aymeric, Marco, Marion, Arnaud et Lucile. Pour votre fidélité et votre soutien.

A mes amis de lycée. Carole, Stéphane, Maud, Carine, Allan, Mathieu, Hélène, Alfred, Pierre et Caroline. Pour m'avoir soutenue durant ces études qui vous ont paru si longues.

A celles et ceux dont le nom n'apparaît pas mais qui m'ont accompagnée et soutenue tout au long de mon parcours.

AUX EQUIPES DE PEDIATRIE DE LIMOGES ET DE BRIVE,

A tous les pédiatres,

Cécile, Jeanne, Christophe, Caroline, Clothilde, Sophie, Antoine, Fabienne, Anne C., Philippe, Carmen, Elena, Séverine, Véronique, Abdel et Christine. Pour leur accompagnement et leur formation tout au long de mon internat.

A toutes les équipes de pédiatrie (PG, Néonatal, Réa, Hématologie, Urgences et Consult),

Pour votre soutien lors de mes débuts et pour avoir contribué au bon déroulement de mon internat.

A Sylvie,

Pour ta disponibilité, ton écoute et ton soutien.

A toutes les secrétaires,

Pour leur efficacité et leur gentillesse.

A L'EQUIPE DES EFR,

Delphine, Chouchou, Sylvie, Nathalie, Marinette, Annie, Laetitia, François Vincent, François Lemaire et Thibault. Pour votre accueil, votre bonne humeur et votre gentillesse.

A L'EQUIPE DE L'ENDOSCOPIE BRONCHIQUE,

Monsieur Demonet, Sandra et Christelle. Pour leur patience, leur gentillesse pour m'avoir appris les bases de l'endoscopie bronchique.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	2
LISTE DES TABLEAUX	3
LISTE DES ABREVIATIONS	4
I. INTRODUCTION	6
II. GENERALITES.....	8
A. L'allergie alimentaire.....	8
B. Les polynucléaires	10
1. Le basophile	10
2. L'éosinophile	13
3. Le neutrophile	14
4. Le récepteur de haute affinité des IgE : FcεR1	16
5. Le récepteur CD11b.....	17
C. La cytométrie en flux (CMF).....	18
III. MATERIEL ET METHODE	21
IV. STATISTIQUES	30
V. RESULTATS	31
A. Tous allergènes confondus.....	32
B. Allergène par allergène	35
C. Les témoins	38
VI. DISCUSSION	41
A. La cytométrie en flux et la clinique	41
B. Le test d'activation des basophiles.....	42
C. L'activation des éosinophiles et des neutrophiles.....	44
D. L'étude des témoins.....	46
VII. CONCLUSION.....	47
REFERENCES	48
ANNEXES.....	53

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Basophile en coloration de May-Grünwald-Giemsa [43]	11
Figure 2 Basophile en microscopie électronique [43]	11
Figure 3 Eosinophile en coloration de May-Grünwald-Giemsa [48]	13
Figure 4 Eosinophile en microscopie électronique [48]	13
Figure 5 Neutrophile en coloration de May-Grünwald-Giemsa [53]	15
Figure 6 Neutrophile en microscopie électronique [53]	15
Figure 7 Récepteur de haute affinité pour l'IgE [35]	16
Figure 8 Agrégation des récepteurs IgE par l'allergène [35]	17
Figure 9 Longueurs d'onde [63]	18
Figure 10 Fonctionnement d'un cytomètre en flux [63]	19
Figure 11 Longueurs d'onde d'excitation et d'émission des fluorochromes [63]	20
Figure 12 Cytomètre BD FACS Canto II	23
Figure 13 Histogramme	24
Figure 14 Cytogramme	24
Figure 15 Tri des cellules selon leur taille (FSC-A) et leur structure (SSC-A)	25
Figure 16 Tri des cellules par leur structure (SSC-A) et le marqueur CCR3	25
Figure 17 Tri des basophiles avec le récepteur IgE et la structure (SSC-A)	26
Figure 18 Etude des basophiles par le marqueur CD63	26
Figure 19 Etude des basophiles par le marqueur CD11b	26
Figure 20 Etude des neutrophiles par le marqueur CD11b	27
Figure 21 Tri des basophiles et des éosinophiles selon leur structure et le récepteur IgE	27
Figure 22 Activation des basophiles en CD11b	28
Figure 23 Activation des basophiles en CD63	28
Figure 24 Etude des éosinophiles par le marqueur CD11b	28
Figure 25 Activation cellulaire chez les enfants avec une urticaire	33
Figure 26 Activation cellulaire chez les enfants avec un eczéma	34
Figure 27 Corrélation entre la réponse pour le témoin anti-IgE et celle pour l'allergène	39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Tests positifs par activation des trois types cellulaires pour tous les allergènes 32

Tableau 2 Répartition des signes cliniques 33

Tableau 3 Activation des trois types cellulaires par allergène (% (nombre de CMF)) 36

Tableau 4 Tests "vrais positifs" pour les trois types cellulaires et par allergène (% (nombre de CMF))..... 37

Tableau 5 Activation cellulaire pour les témoins positifs (% (nombre de CMF)) 39

Tableau 6 Mauvais et non-répondeurs en témoins positifs (% (nombre de CMF)) 40

LISTE DES ABREVIATIONS

IgE	Immunoglobuline E
TPO	Test de Provocation Orale
FcεR1	Récepteur de haute affinité pour l'IgE
CMF	Cytométrie en flux
CD	Cluster de différenciation
fMLP	Formyl-Met-Leu-Phe
CICBAA	Centre d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
IL	Interleukine
PAF	Platelet Activating Factor
LAMP-3	Lysosome-Associated-Membrane-Protein 3
CCR	Récepteur des Chimokines CC
MIP 1α	Macrophage Inflammatory Protein 1
RANTES	Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
MBP	Major Basic Protein
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EDN	Eosinophil Derived Neurotoxin
EPO	Eosinophil Peroxydase

ICAM-1	Intra-Cellular Molecular Adhesion I
MPO	Myéloperoxydase
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
FS	Forward Scatter
SS	Side Scatter
PMT	Photomultiplicateur
PAT	Polynuclear Activation Test

I. INTRODUCTION

L'allergie alimentaire se définit par une réaction clinique adverse à un aliment et résulte d'une réponse immunitaire spécifique à un allergène alimentaire [1, 2]. Cette réponse peut être IgE-médiée ou non [3]. La prévalence des allergies alimentaires de type IgE dépendantes, ne cesse d'augmenter depuis ces dernières années dans la population pédiatrique [4-8]. En France, la prévalence de l'allergie alimentaire chez l'enfant est de 4,7% [9]. Les réactions cliniques aux allergènes sont variables et les manifestations sévères d'anaphylaxie s'accroissent [6, 10, 11]. Les allergènes les plus souvent rencontrés en France chez l'enfant sont l'arachide, l'œuf, le lait et les fruits à coque [1, 6]. Afin de confirmer ces allergies, les tests diagnostiques se sont multipliés et la prise en charge est bien standardisée [8]. Le diagnostic allergologique repose sur l'association de signes cliniques, des prick-tests et du dosage des immunoglobulines de type E spécifiques (IgE) [1, 12, 13]. Dans le cas où tous ces éléments seraient insuffisants, l'examen de référence pour confirmer ou infirmer l'allergie IgE dépendante est le Test de Provocation Oral (TPO) [12].

Il existe d'autres moyens notamment immunologiques, pouvant aider dans la prise en charge et le suivi des patients allergiques [14, 15]. L'hypersensibilité immédiate dans l'allergie alimentaire s'exprime par des voies différentes d'activation cellulaire [7] et la voie IgE dépendante est la plus classique. Elle s'exprime par le biais de récepteurs de haute affinité pour l'IgE (FcεR1) exprimés à la surface de cellules cibles de l'allergie (mastocytes tissulaires et basophiles circulants) qui sont également présents sur la membrane des neutrophiles et des éosinophiles [16, 17]. Les IgE sont des anticorps physiologiques mais, dans certaines conditions, ils sont impliqués dans des mécanismes d'activation des cellules cibles avec libération de médiateurs aux propriétés pharmacologiques extrêmement puissantes.

Depuis les années 1970, le principe de la cytométrie en flux (CMF) a fait son apparition et a été appliqué, dans les années 1980, au diagnostic allergologique. En effet, l'activation des basophiles *in vitro* permet de reproduire cette réaction d'hypersensibilité cellulaire en mettant en contact les basophiles et l'allergène incriminé. Les basophiles sont des cellules du sang circulant pouvant être étudiées en CMF. Ainsi, depuis une quinzaine

d'années, le test d'activation des basophiles en allergologie s'est développé grâce à la cytométrie en flux et la description de marqueurs d'activation membranaire tels que le CD63 [18-20].

Jusqu'à présent parmi les polynucléaires, seuls les basophiles étaient étudiés en cytométrie en flux dans un but diagnostique [21]. Cependant, les éosinophiles et les neutrophiles sont des cellules du sang circulant susceptibles de s'activer en présence de l'antigène sensibilisant, qui possèdent des récepteurs pour de nombreuses immunoglobulines dont l'IgE et qui libèrent également, par activation, de nombreux médiateurs. Depuis quelques années, l'hypothèse de l'implication des éosinophiles et des neutrophiles dans les réactions d'hypersensibilité se précise et la démonstration de leur activation a été établie [22]. Nous disposons actuellement d'anticorps monoclonaux permettant la différenciation et l'analyse de l'activation par cytométrie en flux de ces trois types cellulaires [23].

Dans le cadre de ce travail nous avons testé les réponses des trois types de polynucléaires (basophiles, éosinophiles et neutrophiles) dans une population d'enfants présentant des signes cliniques d'hypersensibilité IgE dépendante. Plusieurs réactivités ont été étudiées : d'une part, celle à un témoin anti-IgE permettant de tester la voie IgE-médiée, d'autre part, celle à un témoin fMLP (formyl-Met-Leu-Phe) permettant de tester la réactivité non IgE dépendante. Enfin, l'activation allergène dépendante a été étudiée (arachide, œuf, lait, crevette...). Pour cette dernière, le mécanisme d'action ne peut être défini avec certitude pour les neutrophiles et les éosinophiles, la voie IgE dépendante étant habituellement reconnue pour les basophiles.

Le but principal de ce travail était de mettre en évidence, chez des enfants présentant une allergie alimentaire IgE dépendante, une éventuelle corrélation entre les manifestations cliniques initiales de ces réactions d'hypersensibilité immédiate et l'expression différentielle des marqueurs d'activation sur les types cellulaires étudiés.

II. GENERALITES

A. L'allergie alimentaire

En France, la prévalence des allergies alimentaires a augmenté depuis les cinq dernières années [1]. En 2006, cette prévalence chez l'enfant en France était de 4,7% [1, 6, 9]. Ce sont les manifestations anaphylactiques qui ont le plus augmenté en France : augmentation de 28% de 2001 à 2006 [6]. En 2008, les données françaises du CICBAA (Centre d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire) [24] montraient que les allergènes les plus fréquents chez l'enfant étaient le lait, l'œuf, l'arachide et les fruits à coque [6]. Selon l'âge de l'enfant, les principaux allergènes alimentaires sont différents [6].

Les premiers signes cliniques de l'allergie alimentaire IgE dépendante ont été décrits dans les années 1980 par Moneret-Vautrin *et al.* [25]. Les symptômes typiques de l'allergie comprennent des signes cutanés, le choc anaphylactique, des signes respiratoires, des signes digestifs, la rhinoconjonctivite et le syndrome oral [26]. Parmi les signes cutanés, la dermatite atopique est la manifestation principale de l'allergie alimentaire et la plus précoce [2, 24, 26, 27]. L'urticaire fait partie également des signes cutanés fréquents (40% de 3 à 6 ans) [26] tout comme l'angio-œdème. L'anaphylaxie aigüe est de plus en plus rencontrée en pédiatrie [11, 26]. Les manifestations respiratoires correspondent le plus souvent à un bronchospasme [28]. Lorsque le bronchospasme est associé à d'autres symptômes non respiratoires il fait partie de la définition de l'anaphylaxie. L'asthme est un facteur de risque d'allergie alimentaire sévère [29]. Inversement, l'allergie alimentaire est un facteur de risque d'asthme aigu grave [11, 28]. Les symptômes d'asthme sont présents surtout chez les enfants âgés de 3 à 15 ans et représentent moins de 20% des manifestations cliniques. Les signes digestifs sont des manifestations peu fréquentes de l'allergie alimentaire IgE-médiée (moins de 10% tout âge confondu) [24]. La rhinoconjonctivite dans le cadre de l'allergie alimentaire est rare. Le syndrome oral est plus fréquent chez l'adulte que chez l'enfant et les aliments qui en sont responsables sont différents [24].

Dans le cadre des hypersensibilités alimentaires IgE-médiées, le diagnostic repose sur une association de signes cliniques et biologiques. La méthode de référence reste néanmoins le Test de Provocation Orale en double aveugle (TPO) [4, 12, 30]. Cependant, lorsque l'histoire clinique, les tests cutanés et le dosage des IgE spécifiques sont concordants avec une

origine alimentaire, le diagnostic d'allergie peut être retenu et le TPO n'est pas nécessaire [13]. Malgré tout, il pourra dans certains cas être réalisé pour connaître le seuil de tolérance à cet aliment [12]. Ce test doit être réalisé dans des conditions de sécurité particulières dans un service hospitalier proche d'une unité de soins intensifs [31].

L'ensemble de ces manifestations cliniques est dû à des réactions immunologiques complexes. Les mécanismes immuno-allergiques peuvent être IgE-médiés ou non IgE-médiés [3, 7, 10, 32]. Dans la majorité des cas, l'allergie alimentaire se définit par une réaction d'hypersensibilité IgE dépendante aux protéines alimentaires [1] qui se déroule en deux étapes : la sensibilisation et le déclenchement [33]. Lors du premier contact avec l'allergène celui-ci est dégradé et présenté par l'intermédiaire des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) aux lymphocytes Th2. Ces lymphocytes produisent des cytokines (IL-4, IL-13) qui induisent la prolifération et la différenciation des lymphocytes B. Des IgE spécifiques sont ensuite sécrétées par les lymphocytes B et vont sensibiliser les cellules sur lesquelles les récepteurs IgE sont présents (mastocytes, basophiles, éosinophiles, neutrophiles et cellules de Langerhans) [34]. Lors d'un deuxième contact avec l'allergène celui-ci va induire le pontage d'au moins deux IgE membranaires voisines et aboutir à l'activation des cellules [35]. Cette activation induit, pour les mastocytes et partiellement pour les basophiles, la libération de médiateurs préformés dont le principal est l'histamine et néoformés dont les leucotriènes, les prostaglandines et le PAF (Platelet Activating Factor). Toutes ces molécules libérées sont responsables des manifestations cliniques d'allergie [35, 36]. Même si la synthèse anormale d'IgE spécifiques d'un allergène alimentaire donné sert de définition à ces réactions d'hypersensibilité, la présence d'IgE spécifiques circulantes seule ne permet pas d'établir un diagnostic d'allergie IgE dépendante. En effet, celle-ci est essentiellement le résultat d'activations cellulaires multiples impliquant des mécanismes complexes. La présence d'IgE spécifiques circulantes ne signe qu'une sensibilisation immunologique qu'il faut bien distinguer de l'allergie clinique.

Il existe également des allergies alimentaires non IgE-médiées qui sont moins bien définies mais en augmentation croissante [37]. Il faut différencier les hypersensibilités immunologiques (non toxiques) des hypersensibilités non immunologiques (toxiques) liées à la consommation d'un produit toxique pouvant induire une libération de médiateurs préformés non spécifiques ou à des toxines bactériennes. Parmi les allergies alimentaires, 10% seraient non IgE-médiées c'est-à-dire résultant potentiellement de mécanismes multiples impliquant

d'autres types cellulaires que les mastocytes et les basophiles comme les neutrophiles et les éosinophiles (apparus récemment dans la classification de Gell et Coombs [38] réactualisée par W. Pichler pour les médicaments [22] (annexe 1)) et d'autres anticorps (IgG et IgA).

B. Les polynucléaires

Chez l'homme, l'étude de l'activation cellulaire porte préférentiellement, pour des raisons pratiques évidentes, sur les cellules sanguines. L'activation des mastocytes (cellules tissulaires) est étudiée par les tests cutanés. Les mécanismes d'activation des polynucléaires (basophiles, éosinophiles et neutrophiles) sont rapides (généralement moins de 30 minutes suivant le contact avec l'allergène) et la cytométrie en flux est aujourd'hui une technique de choix car elle permet de différencier l'activation de chaque type cellulaire par analyse de marqueurs spécifiques extra et intra cellulaires. L'étude des réactions retardées alimentaires (>24h) telles que celles pouvant être induites par une activation lymphocytaire n'est pas réalisée dans ce travail.

1. Le basophile

- *Différenciation cellulaire et aspects morphologiques*

Le rôle majeur du basophile dans la réaction IgE dépendante est aujourd'hui reconnu [39, 40]. Cette cellule a été découverte en 1879 par Paul Ehrlich [41]. Les basophiles sont peu nombreux dans le sang circulant et représentent moins de 1% des leucocytes [42]. Leur différenciation s'effectue à partir des progéniteurs hématopoïétiques CD34+. L'interleukine 3 (IL-3) permet d'orienter la différenciation de ces précurseurs vers le basophile. Un basophile est une cellule ronde de 10 à 14 μm de diamètre avec un noyau polylobé (figures 1 et 2) [43]. Le cytoplasme comprend des granules qui lors du pontage des IgE de surface avec l'antigène sont soumis à une migration transcytoplasmique et fusionnent avec la membrane cytoplasmique.

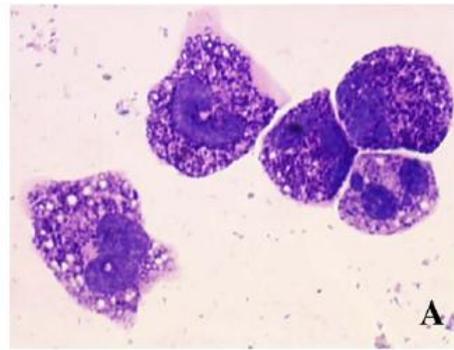


Figure 1 Basophile en coloration de May-Grünwald- Giemsa [43]

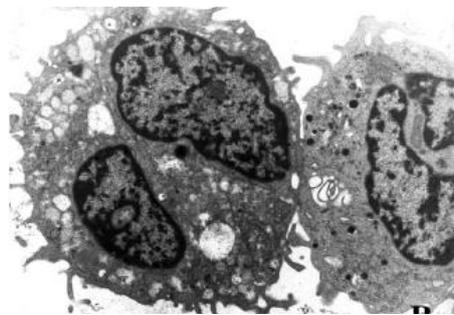


Figure 2 Basophile en microscopie électronique [43]

- ***Les principales molécules produites***

Le contenu des granules est alors libéré à l'extérieur de la cellule et l'histamine est le principal médiateur préformé. Des molécules néoformées, telles que les dérivés de l'acide arachidonique, sont externalisées [44]. Parmi les marqueurs intracellulaires, les granules intracytoplasmiques expriment le CD63. Le CD63 ou gp63 ou Lysosome-Associated-Membrane-Protein (LAMP)-3 est exprimé par différents types cellulaires : basophiles, mastocytes, macrophages et plaquettes. A l'état basal, il est ancré dans la membrane des granules intracytoplasmiques et est très faiblement exprimé à la surface de la cellule [21]. Dans les basophiles activés, ces granules fusionnent avec la membrane et le CD63 est exprimé à la surface cellulaire [43-45]. Cette expression est le reflet de la libération d'histamine et est plus lente que la surexpression du CD203c. Lors de la stimulation antigénique, après agrégation des récepteurs FcεR1, les basophiles produisent de l'interleukine 4 (IL-4). Le basophile humain représente le principal réservoir d'IL4 et, ainsi, est aujourd'hui considéré comme une cellule essentielle de la réaction d'hypersensibilité IgE dépendante. Cette production survient dans les 4h suivant l'activation antigénique. Le basophile produit également de l'interleukine 13 (IL-13). Ces deux cytokines ont un rôle majeur dans la réponse inflammatoire. L'IL-4 joue un rôle surtout dans l'initiation de la réponse allergique tandis que

l'IL-13 permet le maintien et l'amplification de la réponse inflammatoire allergique. Ces interleukines sont des molécules néoformées lors de la stimulation antigénique [39].

- ***Les principaux récepteurs de surface***

Le récepteur de haute affinité pour l'IgE (FcεR1) n'est pas caractéristique des basophiles mais son expression membranaire est particulièrement élevée [17, 35].

Le basophile exprime également le CD40 ligand qui lors de son interaction avec le CD40 des cellules B permet la production des IgE spécifiques [39].

Des β-2 intégrines sont présentes sur le basophile (telles que le CD11b) dont l'expression augmente après pontage des IgE membranaires. Le CD11b est une adhésine ayant un rôle important dans la mobilisation des cellules et notamment leur migration vers le site inflammatoire [46].

Enfin, le basophile exprime les récepteurs CCR1, 2, 3, et 4 qui sont des chimokines. CCR1 et CCR2 sont des récepteurs pour le MIP-1α (Macrophage Inflammatory Protein 1), RANTES (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted) et le MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1). Quant au récepteur CCR3, il reconnaît exclusivement l'éotaxine [47]. L'ensemble de ces molécules se fixant sur les récepteurs CCR est appelé les CC chimokines et sont impliquées dans l'activité chimiotactique du basophile, sa dégranulation et la libération d'histamine [39, 47]. Le basophile exprime également le CD203c et représente la seule cellule circulante exprimant ce marqueur. Contrairement au CD63, non exprimé sur le basophile au repos et fortement exprimé sur le basophile activé, le CD203c n'est que surexprimé lors de l'activation du basophile [45]. Le CD203c, initialement détecté dans l'utérus, la prostate et certains carcinomes du colon, a été mis en évidence à la surface des basophiles et des mastocytes [21]. Sa rôle dans le fonctionnement du basophile et de l'allergie est inconnu. En revanche, l'activation des basophiles, en particulier par un allergène, induit une surexpression rapide du CD203c.

Les récepteurs pour les IgG sont aussi présents sur le basophile et pourraient avoir un rôle immunomodulateur au cours de l'immunothérapie spécifique [21]. Les récepteurs pour les IgA n'ont pas été décrits sur le basophile humain.

2. L'éosinophile

- ***Différenciation cellulaire et aspects morphologiques***

De même que pour le basophile, l'éosinophile a été découvert il y a plus de 100 ans par Paul Ehrlich. L'éosinophile est une cellule de 12 à 17 μm de diamètre rare dans le sang (1 à 3%) et qui se localise essentiellement dans les tissus (figures 3 et 4) [48, 49]. Ses fonctions sont multiples. La différenciation des éosinophiles s'effectue à partir d'un progéniteur de la moelle osseuse portant à sa surface le récepteur CD34+ [50]. Cette différenciation a lieu sous l'effet de l'IL-3, le GM-CSF et surtout l'interleukine 5 (IL-5).

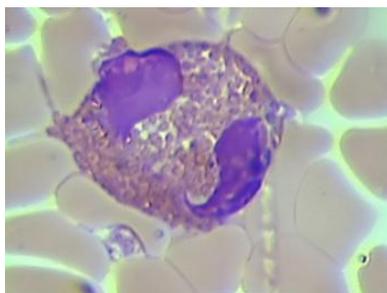


Figure 3 Eosinophile en coloration de May-Grünwald-Giemsa [48]

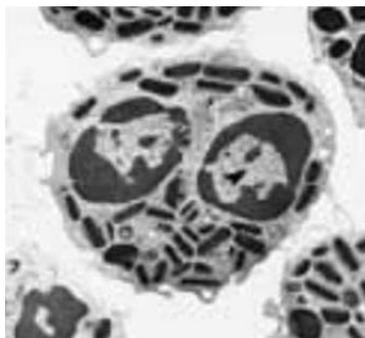


Figure 4 Eosinophile en microscopie électronique [48]

- ***Les principales molécules produites***

L'éosinophile peut produire de nombreux médiateurs intracellulaires. On constate ainsi la production de radicaux libres, de cytokines, de chimokines, de facteurs de croissance et de protéines contenues dans les granules. Parmi les cytokines pro-inflammatoires l'IL-2,

l'IL-4, l'IL-6 et le TNF α sont préformés par l'éosinophile et stockés dans les granules. Les protéines contenues dans les granules ont toutes des fonctions cytotoxiques. Les principales sont le MBP (Major Basic Protein), l'ECP (Eosinophil Cationic Protein), l'EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin) et l'EPO (Eosinophil Peroxydase) [42, 48].

- ***Les principaux récepteurs de surface***

De nombreuses molécules de surface sont exprimées par l'éosinophile. On note des molécules d'adhésion telles que des sélectines (L-sélectines) et des intégrines. Parmi les intégrines, on retrouve le CD11b ayant pour ligand ICAM-1 (Intra-Cellular Molecular Adhesion I) [48].

L'éosinophile possède des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines A, E et G. L'IgE permet la dégranulation des éosinophiles grâce à sa fixation sur le récepteur Fc ϵ R1. Cette interaction explique le rôle de l'éosinophile dans les réactions allergiques. Afin d'interagir avec l'environnement extracellulaire, l'éosinophile possède de nombreux récepteurs de cytokines (telles que IL-3, IL-5 et GM-CSF) [48].

Le recrutement de l'éosinophile sur le site inflammatoire se fait par l'intermédiaire de cytokines mais surtout par les chimokines. Par conséquent, l'éosinophile possède des récepteurs pour ces chimokines tels que CCR3 interagissant avec l'éotaxine et RANTES qu'il produit également [47].

Ainsi à travers tous ces récepteurs et toutes ces molécules formées, les principales fonctions de l'éosinophile sont multiples : cytotoxiques, pro-inflammatoires et immunomodulatrices.

3. Le neutrophile

- ***Différenciation cellulaire et aspects morphologiques***

Le polynucléaire neutrophile est la première barrière de défense contre les agents pathogènes mais permet également la régulation de la réponse immunitaire par la production de nombreux médiateurs (GM-CSF, IL-5) [51, 52]. La formation des neutrophiles représente la moitié de l'activité de la moelle osseuse. Cependant, compte tenu de leur demi-vie courte,

peu de neutrophiles sont dans le sang circulant [53]. Tout comme le basophile et l'éosinophile, ils dérivent d'une cellule souche hématopoïétique. La taille d'un neutrophile est d'environ 12 à 14 μm de diamètre avec un noyau multilobé (figures 5 et 6) [53].

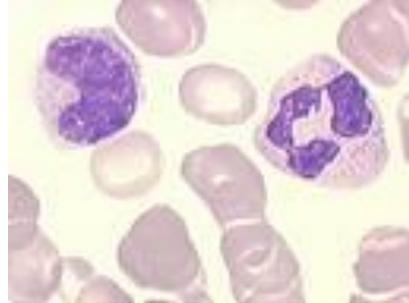


Figure 5 Neutrophile en coloration de May-Grünwald-Giemsa [53]

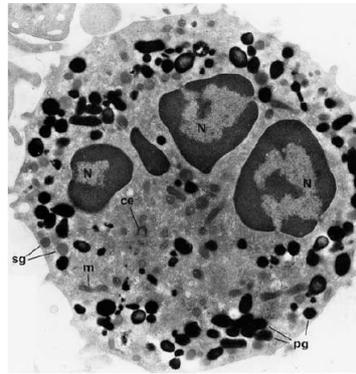


Figure 6 Neutrophile en microscopie électronique [53]

- ***Les principales molécules produites***

La particularité de cette cellule est d'être compartimentée : chaque compartiment possède un marqueur spécifique. Les granulations azurophiles sont caractérisées par la myéloperoxydase (MPO), les granulations spécifiques par la lactoferrine et le CD11b et les vésicules sécrétoires par le CD35 [51].

Comme les autres leucocytes déjà décrits, il se produit une libération du contenu des granules dans le milieu extracellulaire et la fusion de certaines molécules avec la membrane lors de son activation.

- **Les principaux récepteurs de surface**

Une des fonctions majeures de cette cellule est la migration vers le site inflammatoire. Des molécules d'adhésion telles que les L-sélectines sont présentes à la surface des neutrophiles et permettent leur migration. Une fois au contact du site inflammatoire les neutrophiles ont un pouvoir important de phagocytose [51].

Le neutrophile possède également le récepteur FcεR1 permettant son implication dans les mécanismes allergiques IgE-médiés [51].

4. Le récepteur de haute affinité des IgE : FcεR1

Toutes ces cellules ont en commun un récepteur : le récepteur FcεR1 (figure 7) [16, 17, 41, 54]. C'est le récepteur de haute affinité pour les IgE permettant l'agrégation de l'antigène sur la surface membranaire et l'activation cellulaire par la production de nombreux médiateurs [35].

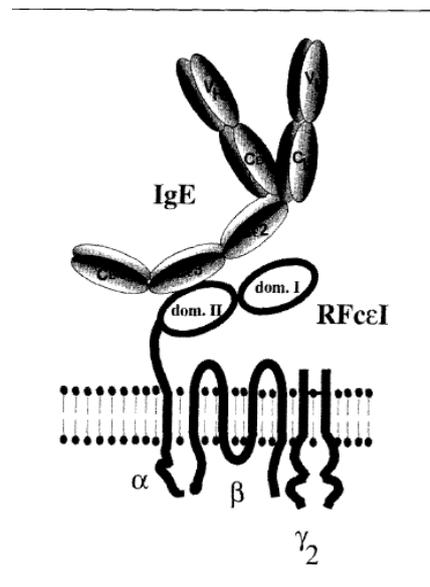


Figure 7 Récepteur de haute affinité pour l'IgE [35]

Ces récepteurs sont des molécules multimériques composées de 4 sous-unités et appartenant à la famille des immunorécepteurs. La sous-unité α permet la liaison avec l'IgE tandis que la sous-unité β et les deux sous-unités γ participent à la transduction du signal. Cette transduction s'effectue par les motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based

Activation Motif). Lors de la présence de l'allergène, pour activer les récepteurs, celui-ci doit ponter au moins deux récepteurs (figure 8) [35].

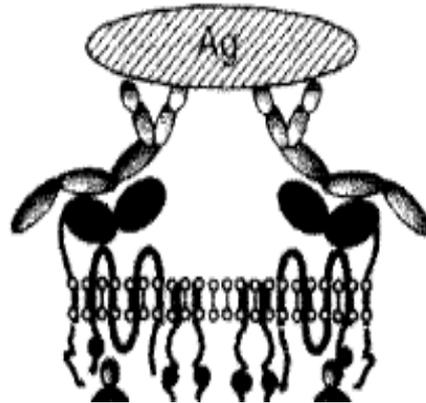


Figure 8 Agrégation des récepteurs IgE par l'allergène [35]

La densité des récepteurs IgE n'est pas la même sur tous les types cellulaires. Ainsi les basophiles ont une densité plus importante de récepteurs FcεR1 (300 à 500 000/cellule) [55] que les éosinophiles ou les neutrophiles.

5. Le récepteur CD11b

Le CD11b est une adhésine présente à la surface des éosinophiles, des neutrophiles mais également des basophiles. Pour les éosinophiles et les neutrophiles, sa fonction principale sert à la migration des cellules vers le site inflammatoire [56]. C'est en partie par cette adhésine que l'on comprend la présence des neutrophiles et des éosinophiles dans les tissus où siège une réaction inflammatoire [57]. En effet, le CD11b permet la migration de ces cellules par diapédèse et le recrutement, sur le site de la réaction inflammatoire, de cellules susceptibles de rétablir l'homéostasie locale. Cependant, ces cellules ont également un rôle pro-inflammatoire tels que les neutrophiles, les éosinophiles et même les basophiles dont la présence est, pour les réactions IgE dépendantes, un critère de sévérité.

L'ensemble de ces propriétés cellulaires permet de définir les marqueurs de sélection et d'activation nécessaires à la mise au point des protocoles de cytométrie en flux.

C. La cytométrie en flux (CMF)

La CMF a connu un développement important depuis des années 1970 avec les chercheurs de Los Alamos et de Stanford [58]. Depuis les premiers essais, cette technique s'est améliorée avec, entre autres, le développement permanent des fluorochromes. Elle permet l'analyse quantitative et qualitative de plusieurs paramètres sur des cellules en milieu liquide [21]. En allergologie, la cytométrie en flux permet l'analyse de l'activation *in vitro* des polynucléaires en présence de l'allergène sensibilisant. L'étude de l'activation cellulaire en CMF se fait en cinq étapes [23, 45, 59-62].

Dans un premier temps, les cellules sont amenées au centre d'une buse par un système fluïdique. Ensuite, elles passent les une derrière les autres afin d'être excitées par un ou plusieurs faisceaux lumineux monochromatiques. De façon systématique les cytomètres ont un laser émettant à la longueur d'onde de 488 nm. Parfois, les cytomètres les plus complexes disposent de deux ou trois lasers. Dans le cadre de notre étude, le cytomètre utilisé a deux lasers : un à 488 nm (bleu) et un à 633 nm (rouge). Cela permet d'étendre la plage des longueurs d'onde mesurées par le cytomètre (figure 9) [63].

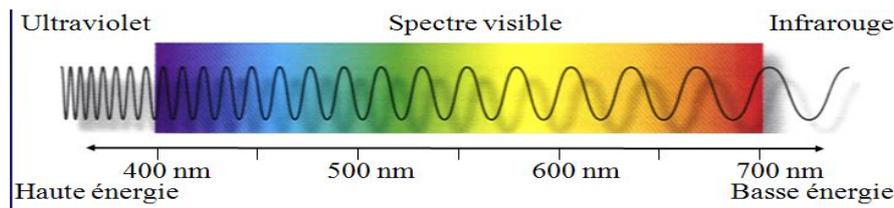


Figure 9 Longueurs d'onde [63]

Les cellules diffractent le rayon laser en le traversant. La lumière émise dans différentes directions permet d'analyser les cellules. La lumière diffractée dans l'axe du rayon laser permet une analyse de la taille de la cellule (FS = Forward Scatter) ; celle diffractée à 90° permet l'image de la structure des cellules (SS= Side Scatter). Puis, la lumière diffractée à 90° est analysée à l'aide de miroirs dichroïques ou filtres qui absorbent ou transmettent certaines longueurs d'onde. Ensuite, celles qui sont absorbées sont transmises vers un photomultiplicateur (PMT) pour la transformation du signal. Enfin, les données sont analysées par un ordinateur. Le fonctionnement du cytomètre est rapporté sur la figure 10.

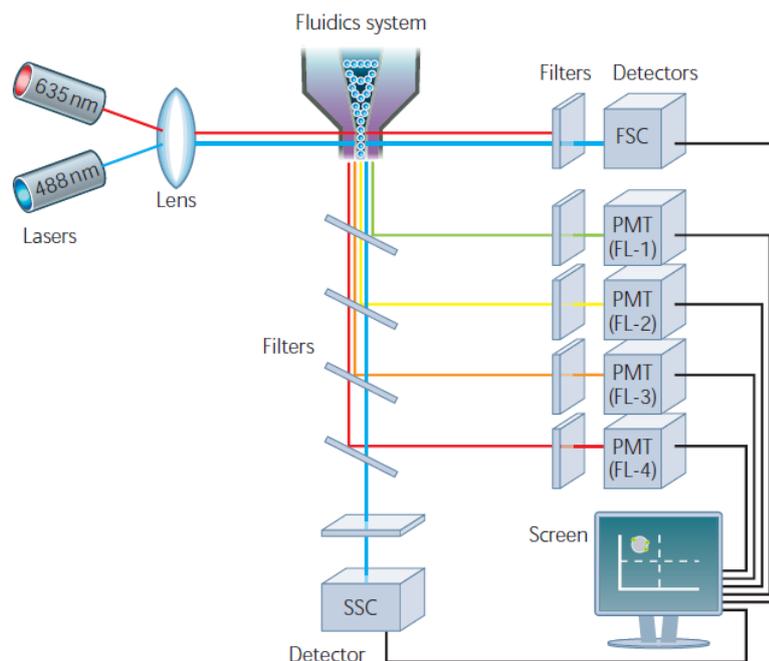


Figure 10 Fonctionnement d'un cytomètre en flux [63]

L'étude des marqueurs de ces cellules triées se fait par fluorescence avec deux méthodes. La méthode directe consiste à utiliser un anticorps spécifique de la cible choisie directement marqué par un fluorochrome et à mesurer sa fluorescence après incubation avec la suspension cellulaire à étudier [23, 59]. La méthode indirecte consiste en l'utilisation d'un anticorps secondaire marqué reconnaissant l'anticorps primaire spécifique de la cible choisie.

Les fluorochromes sont des molécules capables d'absorber l'énergie lumineuse et d'émettre des photons de fluorescence d'énergie plus basse (une longueur d'onde plus grande). Chaque fluorochrome dispose d'une longueur d'onde d'excitation et d'une longueur d'onde d'émission. Un fluorochrome est détecté par un canal unique de fluorescence (soit une seule couleur). Les miroirs dichroïques permettent cette spécificité de détection. Cependant, l'utilisation de plusieurs fluorochromes multiplie les longueurs d'onde d'émission et le risque de chevauchement de celles-ci. Les fluorochromes les plus utilisés sont la fluoresceine (FITC, émission verte), la phycoérythrine (PE, émission orange), les cyanines (Cy3, Cy5, Cy7, émission rouge) et les alexas (figure 11) [23]. Par conséquent, il existe un système électronique intégré au cytomètre permettant de soustraire la superposition de deux signaux de fluorescence. Cela permet la correction des chevauchements des spectres d'émissions des divers fluorochromes. L'utilisation de deux lasers permet également de limiter les phénomènes de chevauchement.

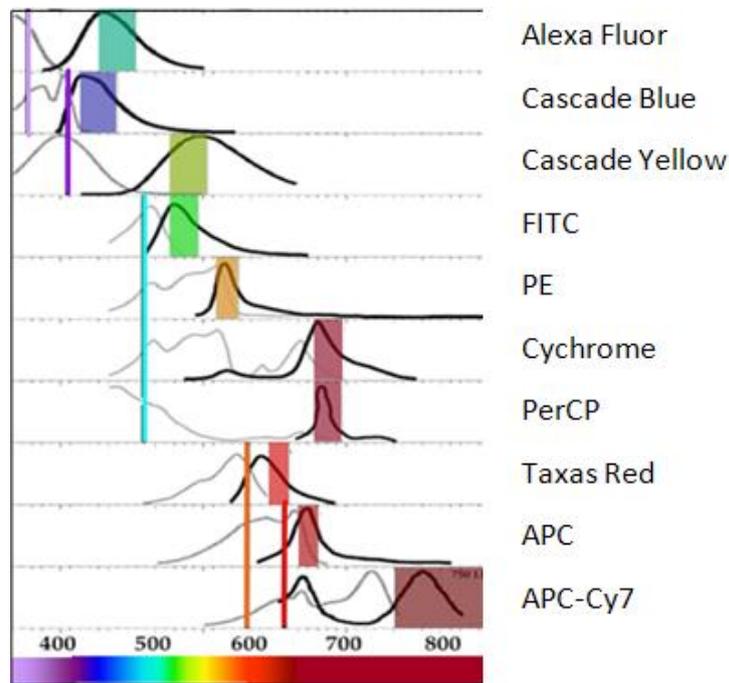


Figure 11 Longueurs d'onde d'excitation et d'émission des fluorochromes [63]

Par la suite, la totalité de la lumière diffusée ou mise en évidence par fluorescence doit être transformée en un signal électrique afin d'être mesurée. Ce signal est obtenu par des photomultiplicateurs puis converti en une valeur digitale enregistrable sur un ordinateur. Ces valeurs sont présentées sous deux formes graphiques : les histogrammes monoparamétriques où l'axe des abscisses représente l'intensité de fluorescence du signal et l'axe des ordonnées le nombre de cellules ; et les histogrammes bi paramétriques encore appelés cytogrammes (dot-plot) représentant deux signaux de façon simultanée.

III. MATERIEL ET METHODE

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 d'étude était composée d'enfants qui présentaient des signes cliniques d'allergie alimentaire IgE-médiées. Seuls les allergènes considérés comme les plus fréquents dans notre population ont été retenus : arachide, lait, œuf, noisette et crevette. Lors du bilan d'allergie alimentaire, les enfants avaient une CMF. L'ensemble des CMF réalisées en pédiatrie dans le cadre du bilan d'allergie alimentaire a été analysé.

Afin d'étudier la réponse cellulaire immédiate dans l'allergie alimentaire, les trois types de polynucléaires ont été testés pour un même allergène alimentaire (PAT test : Polynuclear Activation Test). Pour cela, les allergènes utilisés provenaient d'extraits commerciaux (Stallergènes®). Ces échantillons ont ensuite été analysés par cytométrie en flux. Pour étudier chaque type cellulaire, il était nécessaire de disposer de marqueurs d'activation et de marqueurs de sélection.

La sélection des basophiles et des éosinophiles a été faite avec le marqueur CCR3. En effet, le CCR3 est majoritairement exprimé, dans le sang humain, par les éosinophiles et les basophiles, mais est exprimé également à plus faible densité, par les lymphocytes Th1 et Th2 [64]. Ainsi par cytométrie en flux, grâce à l'analyse de la structure de la cellule et à la présence ou non du marqueur CCR3, nous avons pu séparer les trois populations.

Pour l'activation des cellules plusieurs marqueurs ont été utilisés.

Trois marqueurs principaux exprimés à la surface des basophiles ont été testés : le CD63, le CD11b et l'anti-IgE. Pour cette étude, l'activation du basophile a été mesurée par l'expression membranaire du CD63 et/ou du CD11b, l'IgE étant utilisée comme marqueur de sélection. Le CD11b est présent sur les basophiles mais n'a jamais été étudié en tant que marqueur d'activation. Dans cette étude, le CD11b a été retenu également comme marqueur d'activation des basophiles. L'activation des basophiles a été testée par deux marqueurs : le CD63, marqueur reconnu dans la littérature, et le CD11b.

Pour les neutrophiles et les éosinophiles, le marqueur d'activation était le CD11b, présent à faible densité sur les cellules au repos. Cette expression augmente lors de l'activation de la cellule.

Le protocole utilisé comprenait les étapes techniques suivantes :

Première étape : Préparation des dilutions des allergènes et des témoins positifs et négatifs. Pour chaque patient la procédure comprenait deux tubes témoins négatifs, deux tubes témoins positifs et trois tubes par allergène. Les témoins négatifs étaient constitués avec du tampon seul (RPMI). Les témoins positifs étaient le fMLP (formyl-Met-Leu-Phe) et l'anti-IgE. Le fMLP correspond à un peptide bactérien capable d'activer tout type cellulaire et est non spécifique d'une réaction IgE dépendante. L'anti-IgE permettait de tester la réactivité de la cellule induite par l'agrégation des récepteurs IgE, fonction du nombre d'IgE fixées sur leurs récepteurs membranaires. Le fMLP était dilué au $1/50^{\text{ème}}$ (10^{-7} M/l) et l'anti-IgE au $1/500^{\text{ème}}$ (0,1 µg/ml) dans du RPMI. Trois dilutions successives ont été testées pour chaque allergène dans le RPMI : 1/500 (C1), 1/2500 (C2) et 1/12500 (C3). Les allergènes utilisés étaient des antigènes standardisés du laboratoire Stallergènes® également utilisés pour les prick-tests. Tout au long de l'étude, les allergènes ont été les mêmes et les allergènes natifs n'ont jamais été utilisés.

Deuxième étape : Une fois toutes les dilutions terminées, les tubes ont été préparés pour la stimulation des polynucléaires. Chaque tube recevait 50µl de RPMI. Dans les tubes témoins correspondants, 25µl de témoin étaient ajoutés. Dans les tubes allergènes, 25µl de la dilution étaient introduits. Puis, tous les tubes ont reçu 25µl de sang. Le sang total était prélevé sur un tube EDTA (conservé à +4°C) et les analyses étaient réalisées dans les 48h après le prélèvement.

Troisième étape : Addition des anticorps marqués à la dilution du $1/40^{\text{ème}}$. Les deux premiers anticorps ajoutés étaient dirigés contre le CCR3 et le CD63. Ces anticorps étaient les suivants : anti-CD63-PE (Beckman Coulter®) et anti-CCR3 Alexa 647 (Biolegend®).

Quatrième étape : Incubation des tubes pendant 30 minutes à 37° au bain marie. Pour arrêter les réactions cellulaires, 50µl de solution EDTA étaient ajoutés. Puis, les deux autres anticorps marqués étaient versés, également dilués au $1/40^{\text{ème}}$. Il s'agissait d'anticorps dirigés contre le CD11b et les IgE : anti-CD11b PC7 (BD Pharmingen®) et anti-IgE FITC (Interchim®). L'anti-IgE FITC n'avait pas le même rôle que l'anti-IgE du témoin positif. L'anti-IgE FITC était ajouté à la fin du protocole, à concentration saturante et après addition d'EDTA qui inhibait la réaction d'activation (celle-ci étant essentiellement calcium

dépendante). L'anti-IgE, utilisé comme témoin positif, était ajouté au milieu d'incubation en parallèle aux allergènes en présence de calcium, à 37°C et à faible concentration (0.2µg/ml). Dans ces conditions il n'y avait pas d'interférence entre les deux anti-IgE, le premier étant un anticorps de marquage et le second un anticorps activateur.

Cinquième étape : Incubation des tubes 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Enfin, afin d'éliminer les hématies interférant avec la lecture, un tampon de lyse était utilisé (10 min) et les cellules restantes étaient centrifugées 5 minutes à 1800 tours/min. Une fois le surnageant retiré, il ne restait que les leucocytes activés ou non. Afin de les mettre en suspension dans le tube pour pouvoir les étudier, 300 µl de PBS étaient ajoutés.

Sixième étape : Analyse cytométrique. Le cytomètre est associé à un ordinateur permettant d'étudier et de retraiter les résultats. Celui utilisé pour notre étude était le BD FACS Canto II (figure 12) qui possédait deux lasers (488 et 633 nm). Pour chaque patient les résultats étaient relus par une seule personne pour s'assurer d'une analyse uniforme des données. Ensuite, les résultats étaient extraits vers un fichier Excel.



Figure 12 Cytomètre BD FACS Canto II

Plusieurs données ont été étudiées pour analyser l'activation cellulaire. Les résultats étaient exprimés sous différentes formes : histogrammes (figure 13) et cytogrammes ou dot-plot (figure 14). A partir de ces deux types de graphiques, les données pouvaient être converties en données numériques pour être comparées entre elles.

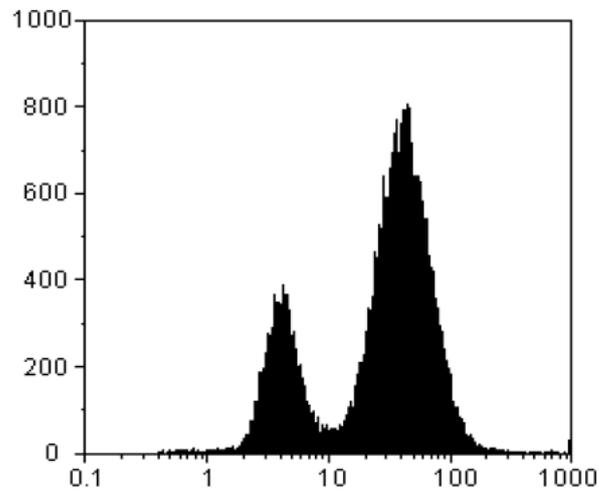


Figure 13 Histogramme

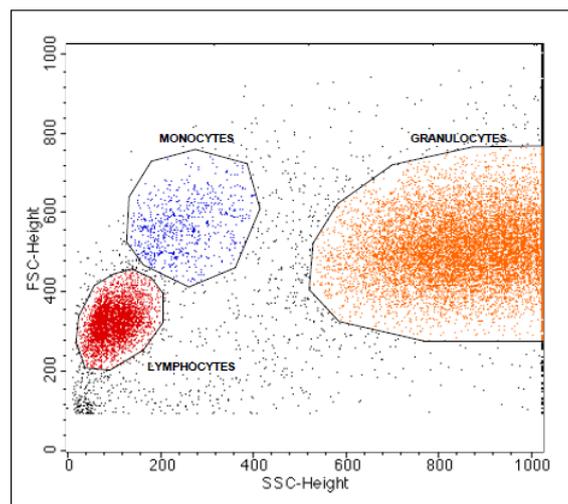


Figure 14 Cytogramme

Pour chaque tube dix graphiques étaient obtenus permettant l'analyse de plusieurs données (annexe 2).

Tout d'abord, un dot-plot permettait de trier les cellules en fonction de leur structure (SSC-A) et de leur taille (FSC-A) : monocytes, basophiles, neutrophiles et éosinophiles (figure 15). Le dot-plot taille/structure initial ne fait apparaître que les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes. Les basophiles (en bleu) et les éosinophiles (en orange) sont surajoutés après tri par des anticorps spécifiques.

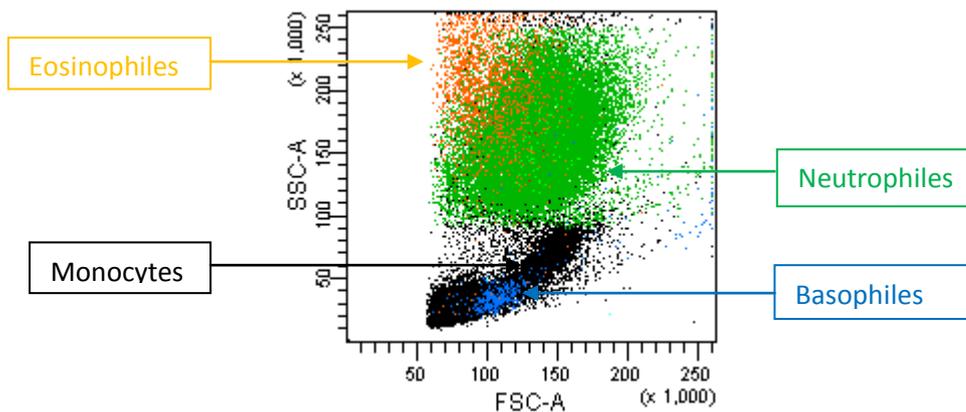


Figure 15 Tri des cellules selon leur taille (FSC-A) et leur structure (SSC-A)

Un autre dot-plot séparait les différents types cellulaires en fonction de leur structure (SSC-A) et de la présence ou non du marqueur CCR3 (anti-CCR3 Alexa 647-A) (figure 16). A partir de ce graphique les populations que l'on pouvait étudier plus spécifiquement étaient sélectionnées par des fenêtres (« gate ») et analysées par d'autres graphiques.

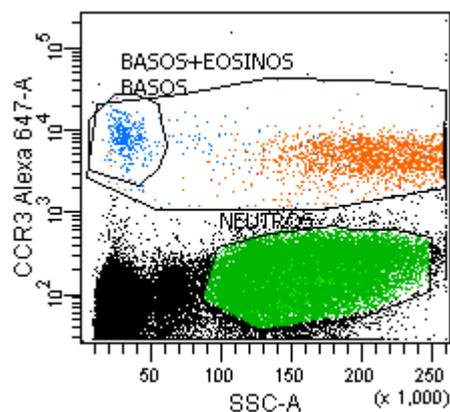


Figure 16 Tri des cellules par leur structure (SSC-A) et le marqueur CCR3

A partir de la fenêtre basophiles (« basos »), grâce à la structure des cellules et à l'anti-IgE FITC, les basophiles avec récepteur IgE étaient isolés dans une fenêtre « basos IgE+ » (figure 17).

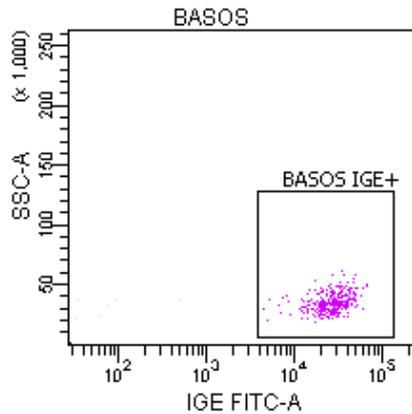


Figure 17 Tri des basophiles avec le récepteur IgE et la structure (SSC-A)

Grâce à ce dot plot deux histogrammes étaient obtenus : l'un pour l'étude du CD63 (« basos activés ») et l'autre pour l'étude du CD11b à la surface des basophiles (« basos CD11b+ ») (figures 18 et 19).

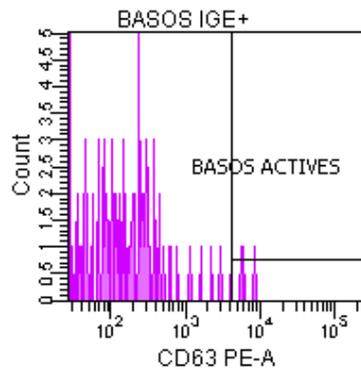


Figure 18 Etude des basophiles par le marqueur CD63

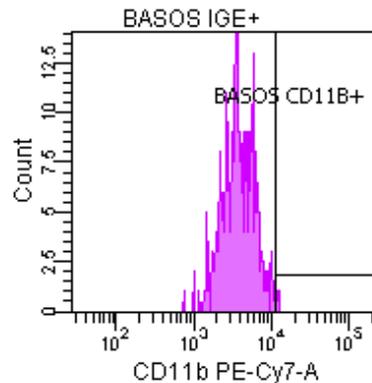


Figure 19 Etude des basophiles par le marqueur CD11b

A partir de la fenêtre des neutrophiles, un histogramme était obtenu et permettait l'analyse du CD11b à la surface des neutrophiles (« neutros activés ») (figure 20).

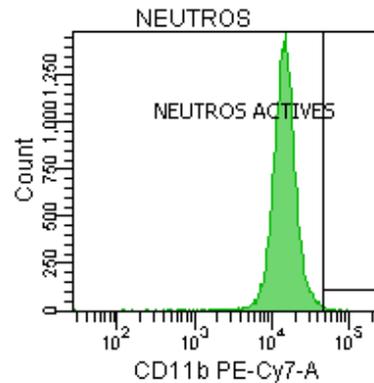


Figure 20 Etude des neutrophiles par le marqueur CD11b

Enfin, la fenêtre « baso+éosino » permettait d'obtenir un autre dot plot en séparant l'ensemble des basophiles et des éosinophiles à l'aide de l'anti-IgE FITC (figure 21). Les basophiles étaient alors rassemblés dans une fenêtre appelée « baso+éosino IgE+ ». Cette fenêtre permettait l'étude des marqueurs CD63 et CD11b sur l'ensemble des basophiles (figures 22 et 23). En effet, la fenêtre « baso+éosino » permettait d'étudier des basophiles ayant une structure proche de celle des éosinophiles avec une densité d'IgE membranaire très supérieure à celle des autres leucocytes. Dans une étude antérieure (Sainte-Laudy, données personnelles non publiées), il avait été montré que les cellules ayant une structure proche des éosinophiles étaient bien des basophiles activés par marquage anti-CD203c et anti-CD63. La fenêtre « baso+éosino IgE+ » était l'association de deux fenêtres qui contenaient des basophiles : « baso+éosino » et « baso P1 ».

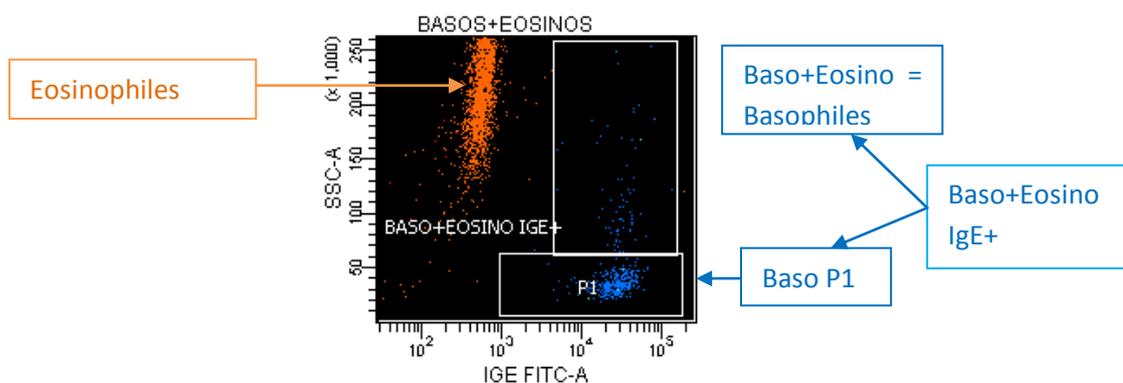


Figure 21 Tri des basophiles et des éosinophiles selon leur structure et le récepteur IgE

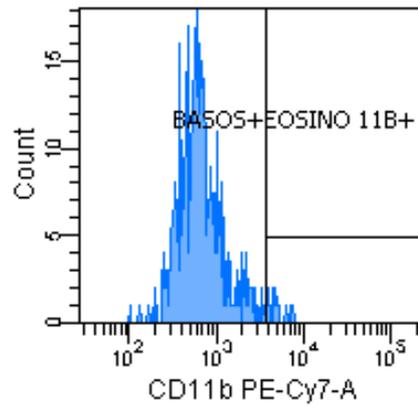


Figure 22 Activation des basophiles en CD11b

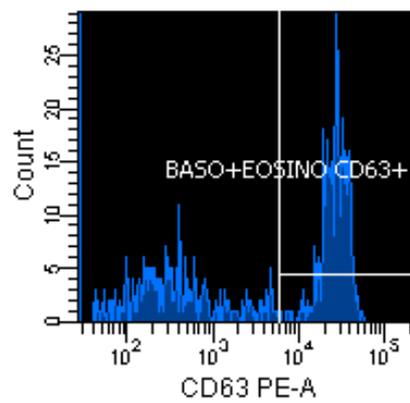


Figure 23 Activation des basophiles en CD63

Enfin, l'activation des éosinophiles en CD11b était analysée sur un autre histogramme (« éosino activés ») (figure 24).

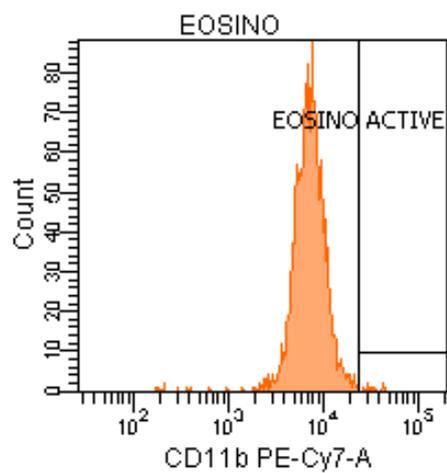


Figure 24 Etude des éosinophiles par le marqueur CD11b

Les histogrammes obtenus pour les tubes témoins négatifs permettaient de définir les seuils de positivité d'un test. Ainsi, les tubes analysés après les témoins négatifs (témoins positifs et allergènes) avaient une valeur de positivité de référence. Deux situations étaient possibles : soit le marqueur étudié était déjà présent à la surface de la cellule, comme le CD11b, soit le marqueur n'était présent que lorsque la cellule était activée, comme le CD63. Dans le cas où le marqueur était exprimé à la surface de la cellule, les histogrammes ne présentaient qu'un seul pic d'activation. En effet, sur le témoin négatif un pic était présent pour le marqueur CD11b au repos et celui-ci se déplaçait vers la droite lorsque la cellule était activée. Dans le cas où le marqueur ne s'exprimait que lors de l'activation de la cellule, les histogrammes avaient deux pics d'activation. Un premier qui traduisait l'absence d'activation de la cellule au repos et un deuxième à droite du premier lorsque la cellule était activée (annexe 2).

Cependant, cette analyse était une première analyse graphique pouvant être faite de manière rapide mais il fallait ensuite étudier les données numériques pour chaque tube. Chaque histogramme permettait d'obtenir un pourcentage de cellules activées pour le paramètre étudié. Ainsi, les résultats étaient exprimés en pourcentage d'expression membranaire des marqueurs CD63 et CD11b.

L'ensemble de ces données numériques permettait d'étudier le mode d'activation cellulaire. Cependant, pour être validé un test devait remplir plusieurs critères. Tout d'abord, le nombre de polynucléaires basophiles comptés par le cytomètre devait, pour des raisons statistiques, être supérieur ou égal à 300.

Ensuite, les témoins devaient remplir certaines conditions. Pour les trois types cellulaires, les témoins négatifs devaient être inférieurs à 15% pour que le test soit considéré comme valide. Une activation spontanée supérieure à 15% en CD63 pouvait interférer avec l'analyse statistique de l'activation spécifique allergénique. Pour le CD63, et pour le basophile, les critères de positivité sont bien établis dans la littérature. Un test était positif si le résultat d'une dilution pour un allergène était supérieur de 5% par rapport à la moyenne des témoins négatifs et si le résultat de la dilution divisé par la moyenne des témoins négatifs était supérieur à deux. Si le résultat de la dilution était inférieur à 5% alors il était considéré comme négatif. Les mêmes critères ont été pris pour l'activation des basophiles par le marqueur CD11b.

Pour les éosinophiles et les neutrophiles, le cut-off calculé à partir de séries de témoins négatifs, a été établi, pour des raisons statistiques et du fait du nombre beaucoup plus élevé de cellules comptées, à 2% au dessus de la moyenne des témoins négatifs.

Enfin, en cas de négativité vis-à-vis d'un allergène donné, le test était considéré comme ininterprétable si le témoin positif en anti-IgE et/ou fMLP était inférieur à 5% au-dessus de la moyenne des témoins négatifs. De plus, un témoin positif compris entre 5 et 15% au dessus de la moyenne des témoins négatifs était en faveur de basophiles mauvais répondeurs et, dans ce cas, la réponse induite par l'allergène pouvait être sous estimée. En revanche, le test était considéré comme interprétable, quelle que soit la valeur des témoins positifs en cas de réactivité significative des basophiles testés vis-à-vis de l'allergène spécifique.

Parmi tous les prélèvements analysés, seules les cytométries en flux positives étaient retenues pour la corrélation clinique ultérieure. Cela correspondait à celles qui avaient au moins une valeur au dessus du seuil pour une dilution d'allergène et pour un type cellulaire. Les CMF considérées comme « vraies positives » étaient celles qui avaient au moins deux dilutions successives pour un même allergène supérieures au seuil.

L'activation des basophiles a été analysée par l'immuno-modulation des marqueurs CD63 et CD11b et l'activation des neutrophiles et des éosinophiles par l'immuno-modulation du marqueur CD11b. Ensuite, ces données immunologiques ont été corrélées aux données cliniques. Pour toutes les CMF positives, les dossiers cliniques des enfants ont été relus. Pour l'allergène testé, on notait les manifestations cliniques qu'avait présentées l'enfant initialement. Les patients ont été différenciés en fonction de leurs symptômes : asthme, eczéma, œdème laryngé, choc anaphylactique, urticaire, rhinoconjonctivite, syndrome oral et troubles digestifs.

IV. STATISTIQUES

Une analyse descriptive des données recueillies a été réalisée.

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. Les comparaisons de pourcentage ont été réalisées à l'aide du test du Chi² de Pearson ou du test exact de Fisher pour les petits effectifs.

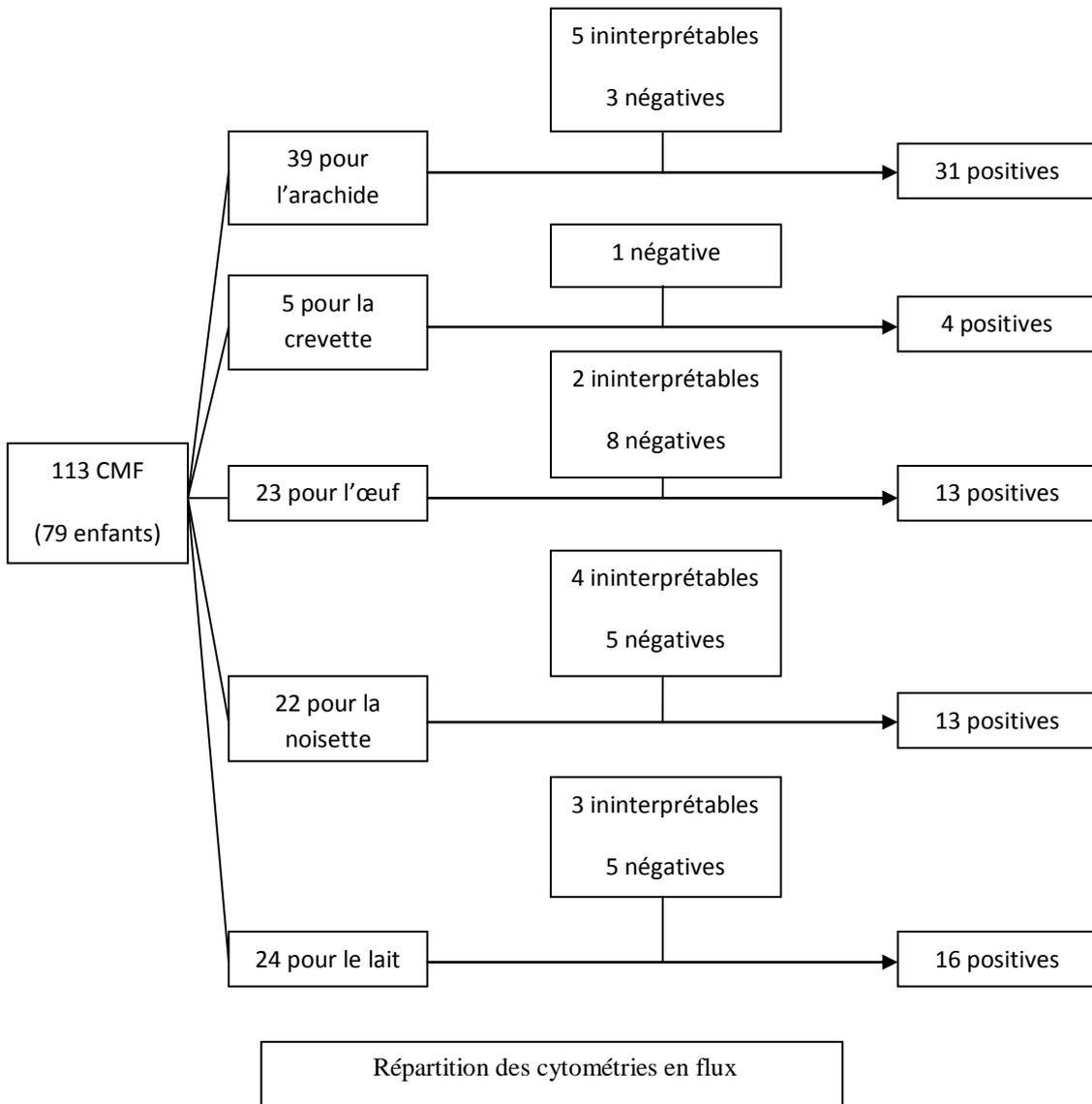
Le seuil de significativité retenu pour l'ensemble des analyses est de 5%.

V. RESULTATS

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.

Un total de 23 enfants était testé pour plusieurs allergènes. Le nombre d'enfant et le nombre de cytométries étaient par conséquent différents. Pendant cette période et pour les allergènes étudiés, 113 cytométries (79 patients) ont été réalisées. Parmi ces 79 patients, 55 avaient un test positif pour au moins allergène et pour au moins un type cellulaire soit 77 cytométries en flux positives.

Au total, 16 enfants (29%) présentaient une polyallergie. Plus de la moitié était représentée par l'arachide et la noisette (5 enfants) et le lait et l'œuf (5 autres enfants).



L'analyse des résultats a été faite dans un premier temps en combinant tous les allergènes puis allergène par allergène. Les données ont été étudiées sur le plan immunologique et sur le plan clinique.

A. Tous allergènes confondus

Parmi les 77 cytométries positives, 73 étaient positives 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 cytométries, 50 enfants).

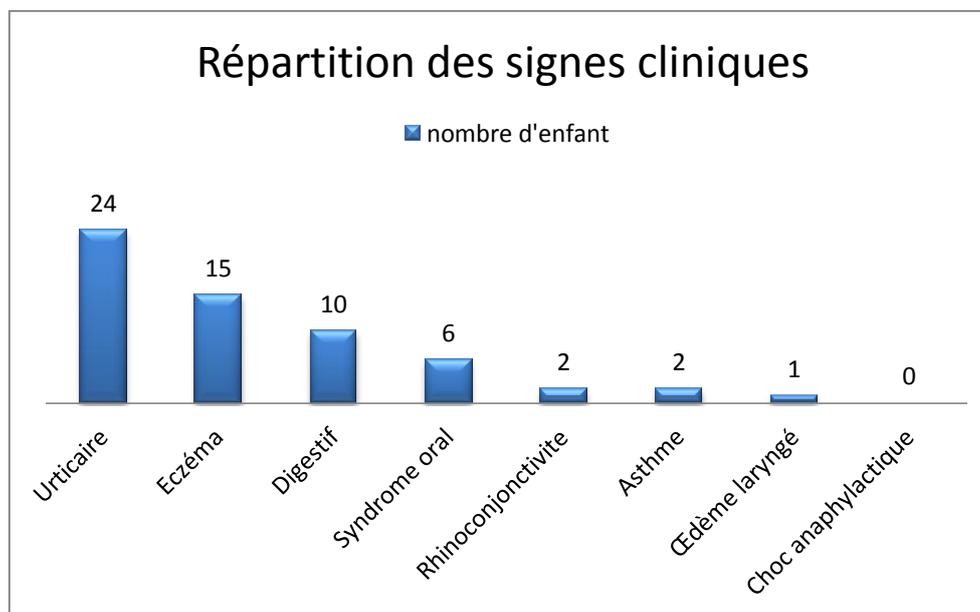
Lorsque la cytométrie était positive par activation des basophiles par le marqueur CD11b (40 cytométries, 33 enfants), la réponse était, de même, majoritairement positive par activation des éosinophiles et/ou des neutrophiles ($p=0,0036$). En effet, sur ces 40 cytométries, 27 étaient positives par activation 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%). Parmi ces 12 enfants, 7 avaient une allergie à l'arachide. La moitié d'entre eux avait comme signe clinique d'allergie une urticaire. Concernant les enfants avec une activation du marqueur CD11b, 10 avaient un eczéma. Ces résultats sont dans le tableau 1.

Tableau 1 Tests positifs par activation des trois types cellulaires pour tous les allergènes

Activation des basophiles % (nb CMF)	94,8% (73/77)	Activation par le CD63	94,5% (69/73)
		Activation par le CD11b	54,8% (40/73)
		Activation par le CD63 et CD11b	49,3% (36/73)
		Activation exclusive par le CD63	45,2% (33/73)
		Activation exclusive par le CD11b	5,5% (4/73)
Activation exclusive des basophiles % (nb CMF)	48% (37/77)	Activation par le CD63	67,6% (25/37)
		Activation par le CD11b	5,4% (2/37)
		Activation par le 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)	
Activation des neutrophiles % (nb CMF)		39% (30/77)	
Activation des éosinophiles % (nb CMF)		36,4% (28/77)	

D'un point de vue clinique, les manifestations prépondérantes étaient l'urticaire et l'eczéma (tableau 2). Parmi les 10 enfants avec des manifestations digestives, 5 présentaient également de l'urticaire. Trois enfants avaient un syndrome oral sans autre signes cliniques.

Tableau 2 Répartition des signes cliniques



Concernant l'urticaire, 18 enfants (22 cytométries) n'avaient pas d'autres signes cliniques. Pour l'eczéma, 11 enfants (17 cytométries) n'avaient pas d'autres manifestations. Pour ces deux présentations cliniques, leur type d'activation en cytométrie en flux était différent. L'activation cellulaire dans le cas de l'urticaire impliquait essentiellement le basophile par le marqueur CD63 (8 cytométries) tandis que dans l'eczéma les trois types cellulaires étaient activés par le CD11b (8 cytométries) (figures 25 et 26). La comparaison de l'expression de ces deux marqueurs dans l'urticaire et l'eczéma n'était pas significativement différente.

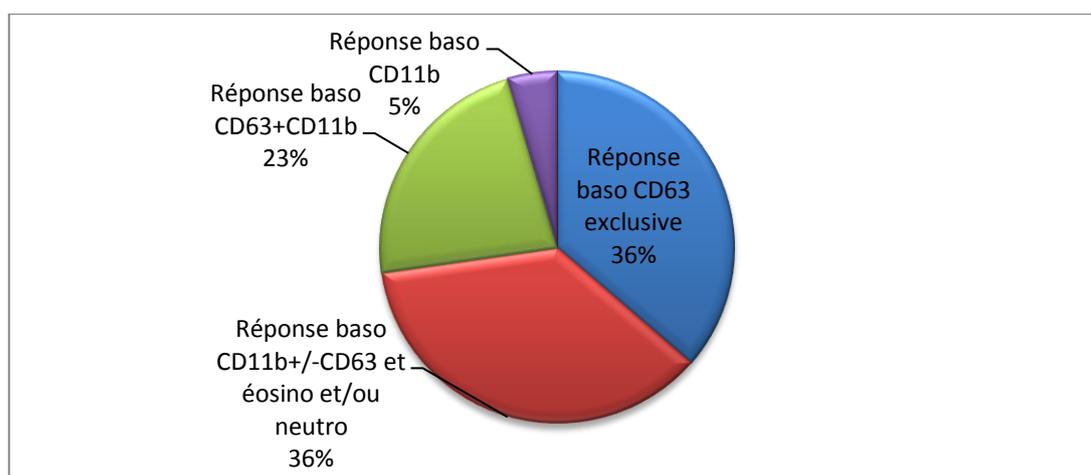


Figure 25 Activation cellulaire chez les enfants avec une urticaire

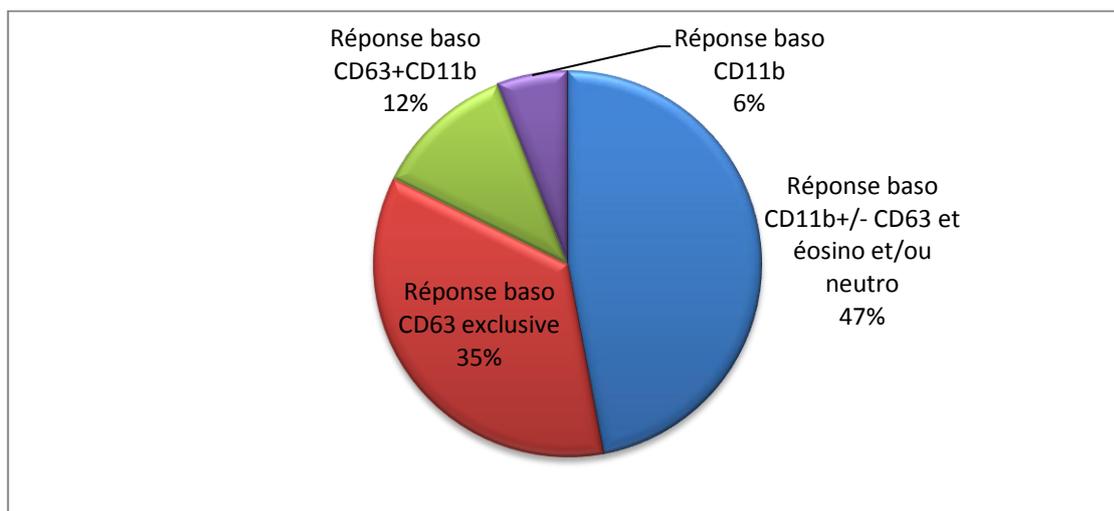


Figure 26 Activation cellulaire chez les enfants avec un eczéma

Lorsque l'activation impliquait les trois types cellulaires (19 cytométries, 13 enfants), la réponse des basophiles était en CD63 et en CD11b dans 85% des cas (16 cytométries sur 19, 11 enfants) (tableau 1). Parmi les 13 enfants avec une activation des trois types cellulaires, 5 présentaient un eczéma seul ou associé à d'autres signes cliniques.

Cependant, pour 4 enfants (4 cytométries) l'activation des basophiles ne s'exprimait que par le marqueur CD11b quelle que soit l'activation des éosinophiles ou des neutrophiles (tableau 1). 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 cytométries) l'activation s'exprimait exclusivement par les basophiles en CD11b (tableau 1). 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 (tableau 1). 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.

Parmi les basophiles de la « fenêtre P1 », les marqueurs CD63 et CD11b ont été étudiés pour 19 patients (28 cytométries). Il s'agissait d'étudier la proportion de basophiles n'ayant pas une structure proche des éosinophiles qui présentait le marqueur CD11b. Au total,

19 enfants ont été analysés pour ces deux marqueurs dans cette fenêtre pour plusieurs allergènes. Cette population d'enfants représentait 28 cytométries : 12 pour l'arachide, 7 pour le lait, 5 pour l'œuf et 4 pour la noisette. Sur ces 28 cytométries, 26 étaient positives par activation des basophiles en CD11b et parmi ces dernières, 23 présentaient le marqueur CD63. La réponse en CD11b était élevée. En effet, parmi les 26 cytométries positives pour le marqueur CD11b, les taux d'activation cellulaires étaient supérieurs à 30% au dessus de la moyenne des témoins négatifs pour 8 enfants ce qui témoigne d'une importante activation cellulaire. Les manifestations cliniques de ces 8 enfants étaient digestives dans un tiers des cas (3 enfants) et à type d'eczéma dans 3 cas également (3 enfants).

Les enfants qui présentaient une sensibilisation sans manifestation clinique à un allergène étaient au nombre de 7 : 4 pour l'arachide, 1 pour la noisette, 1 pour l'œuf et 1 pour la crevette. Parmi les 4 patients pour l'arachide, la sensibilisation a été retrouvée pour deux patients dans le cadre d'un bilan de toux. Pour les deux autres enfants, il s'agissait d'une sensibilisation mise en évidence dans le cadre d'un bilan d'allergie à l'œuf. Pour la sensibilisation à la crevette, elle a été recherchée dans le cadre d'un bilan d'eczéma. Pour la noisette, il s'agissait d'un enfant allergique à la pistache chez qui une allergie aux fruits à coque avait été recherchée. Enfin, pour la sensibilisation à l'œuf, elle a été retrouvée dans un bilan d'allergie au lait. D'un point de vue immunologique ces enfants n'avaient pas de stimulation prépondérante en basophiles, éosinophiles ou neutrophiles.

B. Allergène par allergène

Les aspects immunologiques et cliniques ont également été étudiés allergène par allergène. Les tests étaient considérés comme positifs par activation des polynucléaires si au moins une dilution était positive (tableau 3).

Tableau 3 Activation des trois types cellulaires par allergène (% (nombre de CMF))

	Activation des basophiles ou éosinophiles ou neutrophiles	Activation exclusive des basophiles	Activation des basophiles quelle que soit la réponse des neutrophiles et des éosinophiles	Activation exclusive des éosinophiles	Activation exclusive des neutrophiles
Arachide	56,4% (31/55)	51,6% (16/31) Réponse en CD11b 6,2% (1/16)	96,8% (30/31) Réponse en CD63+CD11b 56,7% (17/30)	3,2% (1/31)	0%
Crevette	7,3% (4/55)	50% (2/4) Réponse en CD11b aucune	75% (3/4) Réponse en CD63+CD11b 33,3% (1/3)	25% (1/4)	25% (1/4)
Lait	29% (16/55)	37,5% (6/16) Réponse en CD11b 16,6% (1/6)	93,7% (15/16) Réponse en CD63+CD11b 40% (6/15)	43,7% (7/16)	56,3% (9/16)
Noisette	23,6% (13/55)	46,1% (6/13) Réponse en CD11b aucune	92,3% (12/13) Réponse en CD63+CD11b 66,7% (8/12)	38,5% (5/13)	46,1% (6/13)
Œuf	23,6% (13/55)	53,9% (7/13) Réponse en CD11b aucune	100% (13/13) Réponse en CD63+CD11b 30,8% (4/13)	23% (3/13)	30,8% (4/13)

- L'arachide : parmi les 55 enfants, 31 avaient une cytométrie positive pour l'arachide. Un tiers des enfants présentait une urticaire. Au total, 12 de ces enfants étaient polyallergiques. L'enfant qui possédait une réponse exclusivement en CD11b présentait un eczéma. L'activation exclusive des éosinophiles et des neutrophiles pour cet allergène est très faible : 1 cas pour les éosinophiles et aucun pour les neutrophiles.
- La crevette : 4 enfants ont présenté une cytométrie en flux positive à la crevette. Aucune manifestation clinique n'était prédominante dans ce groupe d'enfant.
- Le lait : les cytométries étaient positives pour 16 enfants. L'urticaire était présente chez 10 enfants.
- La noisette : 13 enfants avaient une réaction à la noisette. Aucune manifestation clinique n'était spécifique de cet allergène. Parmi ces enfants, 8 avaient une polyallergie.

- L'œuf : tout comme pour la noisette, 13 enfants avaient un test positif pour l'œuf. L'eczéma était la manifestation clinique pour 6 enfants. Dix de ces enfants avaient une polyallergie.

La proportion de tests « vrais positifs » (deux dilutions successives positives) a été analysée pour chaque type cellulaire (tableau 4).

Dans 68% des cas les tests étaient des « vrais positifs » pour les basophiles. Pour les éosinophiles cette réponse était de 59% et de 61% pour les neutrophiles.

Tableau 4 Tests "vrais positifs" pour les trois types cellulaires et par allergène (% (nombre de CMF))

		Basophiles	Eosinophiles	Neutrophiles
Arachide	Dilution 1 et 2	86,7% (26/30)	50% (6/12)	40% (4/10)
	Dilution 2 et 3	76,7% (23/30)	50% (6/12)	40% (4/10)
Crevette	Dilution 1 et 2	100% (3/3)	0%	100% (1/1)
	Dilution 2 et 3	33,3% (1/3)	100% (1/1)	100% (1/1)
Lait	Dilution 1 et 2	60% (9/15)	71% (5/7)	44,4% (4/9)
	Dilution 2 et 3	77,7% (7/9)	57% (4/7)	55,5% (5/9)
Noisette	Dilution 1 et 2	83,3% (10/12)	40% (2/5)	50% (3/6)
	Dilution 2 et 3	41,7% (5/12)	60% (3/5)	33,3% (2/6)
Œuf	Dilution 1 et 2	69,2% (9/13)	66,6% (2/3)	100% (4/4)
	Dilution 2 et 3	53,8% (7/13)	100% (3/3)	50% (2/4)

C. Les témoins

Tous ces tests n'ont pu être interprétés que grâce à la validité de l'interprétation des témoins positifs et négatifs.

Concernant les témoins négatifs, seuls deux enfants (un pour l'arachide et un pour le lait) ont été exclus de l'étude car ils présentaient une activité spontanée de leurs témoins négatifs.

Concernant les témoins positifs, 83 cytométries ont pu être analysées pour chaque témoin positif sur les 79 patients. En effet, 4 enfants ont eu deux témoins positifs car deux allergènes différents ont été testés à deux moments distincts.

Sur l'ensemble des cytométries et pour tout type cellulaire (basophiles, éosinophiles et neutrophiles), l'activation par le fMLP était meilleure que par l'anti-IgE de façon significative ($p=0,01$).

Concernant l'activation des basophiles, elle était plus importante par l'anti-IgE ($p=0,00039$) que par le fMLP. Cette réponse par l'anti-IgE s'exprimait par l'intermédiaire du CD63 dans 96% des cas avec une réponse par le CD63 et le CD11b dans 47% des cas. Pour l'activation des basophiles par le fMLP, elle concernait le marqueur CD63 dans 93% des cas et les deux marqueurs dans 61%.

La réponse des éosinophiles (quelle que soit celle des basophiles et des neutrophiles) par l'anti-IgE et le fMLP n'était pas statistiquement différente ($p=0,97$).

Concernant l'activation des neutrophiles par le fMLP, elle est meilleure que celle par l'anti-IgE ($p=1,33 \cdot 10^{-11}$).

La réponse pour le témoin positif fMLP était statistiquement plus importante pour l'activation des neutrophiles que pour celle des éosinophiles ($p=5 \cdot 10^{-11}$).

L'ensemble de ces résultats est rapporté dans le tableau 5.

Tableau 5 Activation cellulaire pour les témoins positifs (% (nombre de CMF))

	anti-IgE			fMLP				
Activation des basophiles ou éosinophiles ou neutrophiles	67,5% (56/83)			85,5% (71/83)				
Activation des basophiles	91,1% (51/56)	Activation en CD63+CD11b	Activation en CD63	Activation en CD11b	62% (44/71)	Activation en CD63+CD11b	Activation en CD63	Activation en CD11b
		47% (24/51)	96% (49/51)	51% (26/51)		61,4% (27/44)	93,2% (41/44)	68,2% (30/44)
Activation des éosinophiles	34% (19/56)			35,2% (25/71)				
Activation des neutrophiles	28,6% (16/56)			88,7% (63/71)				

En plus de la réactivité des témoins, ce travail a permis d’observer si, lorsqu’une cytométrie était positive pour un allergène en un type cellulaire, le témoin anti-IgE de cette cytométrie l’était également (figure 27). Cette corrélation était prépondérante pour les basophiles. Il n’a pas pu être mis en évidence de manifestation clinique spécifique lorsqu’il n’existait pas de corrélation entre l’allergène et le témoin.

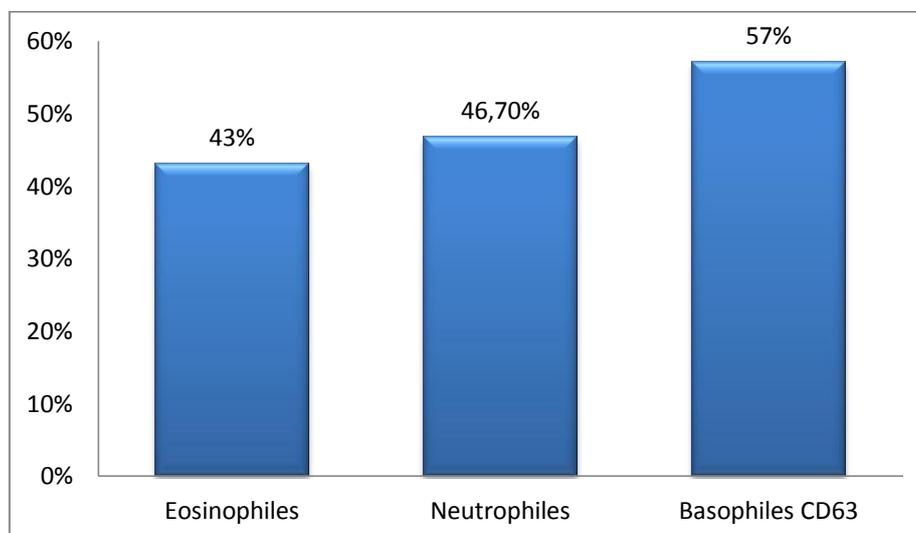


Figure 27 Corrélation entre la réponse pour le témoin anti-IgE et celle pour l’allergène

L'étude des témoins positifs pour l'anti-IgE et pour le fMLP a permis de définir le taux de non et de mauvais répondeurs pour les basophiles (tableau 6). Les basophiles étaient mauvais répondeurs pour l'anti-IgE dans 20% des cas pour les deux marqueurs (CD63 et CD11b).

Tableau 6 Mauvais et non-répondeurs en témoins positifs (% (nombre de CMF))

	anti-IgE	fMLP	anti-IgE et fMLP
Mauvais répondeur pour les basophiles CD63	43,5% (30/69)	46,4% (32/69)	27,5% (19/69)
Mauvais répondeur pour les basophiles CD11b	50% (20/40)	42,5% (17/40)	40% (16/40)
Non répondeur pour les basophiles CD63	20,3% (14/69)	23,2% (16/69)	7,2% (5/69)
Non répondeur pour les basophiles CD11b	37,5% (15/40)	30% (12/40)	22,5% (9/40)

Enfin, les seuils de réponse pour les basophiles ont été choisis en fonction des seuils décrits dans la littérature. Pour ce qui est des seuils des tests positifs pour les éosinophiles et les neutrophiles ils n'étaient pas publiés dans la littérature. Ainsi, un test a été considéré comme positif, pour les éosinophiles ou les neutrophiles, si son résultat se situait à deux écarts-type au-dessus de la moyenne des témoins négatifs. Au cours de notre étude, ce seuil a été vérifié sur des résultats de tests négatifs. Pour les neutrophiles et les éosinophiles, le seuil de 2% correspondait à un résultat de 2 écarts-type au-dessus de la moyenne des témoins négatifs.

VI. DISCUSSION

A. La cytométrie en flux et la clinique

Selon les différentes présentations cliniques et selon l'allergène, il n'a pas été montré de profil d'activation cellulaire spécifique permettant de privilégier l'étude d'un polynucléaire par rapport à un autre. Cependant, quelques particularités immunologiques ont pu être mises en évidence. En effet, l'activation du basophile exclusivement en CD63 est essentiellement associée à des manifestations d'urticaire. En revanche, lorsque l'activation cellulaire implique les basophiles CD11b et les autres polynucléaires (éosinophiles et neutrophiles), les signes cliniques sont dans un tiers des cas de l'eczéma. Ce type de réponse immunitaire a été montré sur l'ensemble de notre échantillon mais n'a pas pu être mis en évidence pour un allergène compte tenu d'un faible nombre d'enfants. Ces résultats ne permettent pas de préciser de manière significative dans quelle situation clinique il prévaut d'étudier l'activation par le CD63 ou par le CD11b. Des études sur de plus larges effectifs permettraient peut être de pouvoir mettre en évidence dans quelles conditions précises utiliser l'un ou l'autre de ces marqueurs.

Pour l'arachide, l'activation exclusive des éosinophiles et/ou des neutrophiles était moins importante que pour les autres allergènes. Dans notre étude, l'arachide semble activer de façon prédominante les basophiles. Cependant, ces résultats sont sur un petit échantillon et seraient à confirmer par d'autres études.

Dans la littérature, la CMF a une spécificité d'environ 95% et une sensibilité d'environ 80% [14, 65-68]. En combinant ce test à des tests de meilleure sensibilité (IgE spécifiques et prick-tests) [12] on obtiendrait une meilleure valeur prédictive du bilan allergologique. La cytométrie en flux, couplée à d'autres examens et à l'histoire clinique, permettrait de différencier les enfants allergiques et non allergiques [14]. De même, dans certaines situations, la cytométrie en flux pourrait dispenser de la réalisation d'un Test de Provocation Orale (TPO). En effet, le test de référence (TPO) n'est pas sans risque clinique et est également coûteux en temps et en moyen [31, 69]. La méthode d'activation *in vitro* serait alors une bonne alternative.

Ce test permettrait aussi de définir le meilleur moment pour réaliser un TPO en combinant le résultat avec ceux des prick-tests et des IgE spécifiques. En effet, par exemple,

l'allergie aux protéines de lait de vache s'estompe en grandissant [70]. Ainsi, une cytométrie en flux négative pour cet allergène couplée à une diminution du taux d'IgE spécifiques autoriserait la réalisation d'un test de réintroduction ne comportant plus de risque [71]. La cytométrie en flux aurait à la fois un rôle clinique en limitant les risques de la réalisation d'un TPO et économique en limitant le nombre de TPO.

Cependant, pour l'instant, la cytométrie en flux confirme ou non l'activation cellulaire en présence de l'allergène. Les résultats sont soit positifs soit négatifs mais ne permettent pas de définir des degrés de sévérité de l'allergie. Afin de savoir quand réaliser des TPO pour envisager une induction de tolérance, d'autres études seraient nécessaires pour graduer la réponse positive d'une cytométrie en flux.

B. Le test d'activation des basophiles

Dans notre population d'étude, avec des signes cliniques d'allergie alimentaire IgE-médiée, l'activation des basophiles est fortement majoritaire. En effet, dans 95% des cas cette activation est présente avec l'expression du marqueur CD63. L'activation prépondérante des basophiles avec la présence du marqueur CD63 confirme les données de la littérature qui placent la cytométrie en flux désormais comme un examen fréquent dans le cadre du bilan d'allergie qu'elle soit alimentaire ou non [21, 72].

Le test d'activation des basophiles, et *a fortiori* la cytométrie en flux, est plus spécifique que les IgE spécifiques [19]. En effet, les allergènes sont constitués d'une partie protéique et d'une partie sucrée appelée Cross reactive Carbohydrate Determinants (CCD). De façon générale, il est établi qu'une allergie alimentaire IgE dépendante se traduit par une réaction clinique en rapport avec l'interaction de la partie protéique de l'allergène et le récepteur IgE spécifique. Parfois, c'est la partie sucrée d'un allergène qui se fixe sur une IgE non spécifique de cet allergène. Le résultat positif en IgE correspond à un faux positif. Il ne s'agit alors donc pas d'une allergie. Le test d'activation des basophiles permettrait de s'affranchir de ces erreurs en prenant en compte la conformation tridimensionnelle de l'allergène [73].

Contrairement à d'autres études, le marqueur CD203c n'a pas été utilisé dans ce travail pour l'activation des basophiles [74]. En effet, ce marqueur est exprimé sur la

membrane des basophiles au repos et son signal augmente lors de l'activation des cellules. Il permet la détection et l'activation des basophiles. Cependant, la différenciation des cellules CD203c négatives et positives est parfois difficile. En effet, le pic de fluorescence du CD203c est moins discriminant que celui du CD63 qui est un marqueur absent sur les cellules au repos et présent lors de leur activation [21] permettant ainsi l'observation d'une courbe bi-modale. De plus, il existe un parallélisme entre l'activation des basophiles par le CD63 et la libération de médiateurs de l'allergie. La fusion des granules intracytoplasmiques avec la membrane cellulaire s'accompagne de libération de médiateurs de l'allergie notamment l'histamine [75]. Pour le CD203c, il n'existe pas de parallélisme avec la libération de médiateurs. Ainsi, le CD63 est un meilleur marqueur d'activation des basophiles. Par conséquent, le marqueur CD203c, bien que décrit dans certaines études, n'a pas été utilisé pour ce travail. Compte tenu de la validité du marqueur CD63 pour l'activation des basophiles, l'absence d'utilisation du marqueur CD203c n'est pas une limite à cette étude.

Dans notre étude, la sélection et l'activation des basophiles ont donc été réalisées grâce au couple anti-IgE et CD63. Dans la littérature, aucune étude n'a étudié l'activation du basophile par le marqueur CD11b. Actuellement, le test d'activation des basophiles ne se fait qu'à l'aide du marqueur CD63. Les résultats de notre travail montrent que l'activation des basophiles par le marqueur CD63 est associée, dans la majorité des cas, à une activation concomitante de cette cellule par le marqueur CD11b. Cependant, si les basophiles peuvent exprimer le marqueur CD11b ils le font parfois de façon exclusive. Pour deux enfants de l'étude, l'activation cellulaire n'a été retrouvée que grâce au marqueur CD11b présent sur les basophiles. La population d'étude est trop petite pour pouvoir spécifier dans quelles situations cliniques ou pour quels allergènes il faudrait étudier le marqueur CD11b en cas de négativité des autres tests. Cependant, cela pourrait alors signifier qu'un test négatif en basophile CD63 ne permettrait pas d'exclure définitivement une allergie IgE-médiée.

D'autre part, dans une étude antérieure, il a été montré que des basophiles activés étaient présents en dehors de la fenêtre « basos P1 ». En effet, les basophiles hors P1 présentent à leur surface les marqueurs CD203c et CD63. (Sainte-Laudy, données personnelles non publiées). Cependant, ces basophiles sont reconnus par le cytomètre comme des cellules ayant une structure proche des éosinophiles avec à leur surface une densité plus importante de récepteurs IgE. Pour que ces cellules soient reconnues comme des éosinophiles il faut que leur structure interne ait été modifiée. Par conséquent, l'activation des basophiles dans les fenêtres « basos P1 » et « baso+éosino » n'est peut être pas la même et la seule étude

de la fenêtre « baso P1 » ne serait pas suffisante pour étudier l'activation des basophiles. Ainsi, il faudrait étudier l'activation différentielle des cellules entre les fenêtres « baso P1 » et « baso+éosino ».

La présence du CD11b sur le basophile explique certaines propriétés immunologiques de cette cellule. Le CD11b est une adhésine permettant la diapédèse des cellules [57]. Ainsi, au-delà de son rôle de marqueur d'activation cellulaire, le CD11b permettrait aux basophiles, qui sont des cellules sanguines, de se déplacer vers les sites d'inflammation tissulaires. En effet, le basophile est retrouvé fréquemment dans des prélèvements tissulaires dans les manifestations allergologiques rhinosinusiennes et digestives [76]. Le chimiotactisme ne serait donc pas le seul moyen de déplacement des basophiles et l'adhésine CD11b contribuerait également à la mobilité de ces cellules.

Deux marqueurs d'activation sont, par conséquent, présents sur les basophiles : le CD63 dont la détection à la surface des basophiles est directement liée à la libération de médiateurs de l'allergie et le CD11b qui est impliqué dans la migration des basophiles. L'augmentation du CD11b à la surface des basophiles n'est pas nécessairement liée à la libération de médiateurs. Ces deux marqueurs ont une réponse différentielle et leurs fonctions ne sont pas strictement identiques. L'étude du marqueur CD11b est complémentaire de celle du CD63.

Enfin, lorsque le CD11b est surexprimé sur les basophiles l'ensemble des polynucléaires s'activent : l'activation du CD11b sur les basophiles traduit par conséquent, dans la majorité des cas, une activation de l'ensemble des polynucléaires.

C. L'activation des éosinophiles et des neutrophiles

Les basophiles sont les cellules prépondérantes dans l'allergie alimentaire. Le test d'activation des basophiles est reconnu dans la littérature comme un examen fiable [21]. Cependant, les autres polynucléaires (éosinophiles et neutrophiles) ont également un rôle dans les mécanismes allergiques. En effet, le rôle des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles a été récemment incriminé dans des manifestations allergiques comme l'anaphylaxie [77, 78]. Jusqu'à présent, dans la littérature, il était montré que les éosinophiles et les neutrophiles

produisaient des médiateurs de l'inflammation mais l'activation de ces cellules n'avait pas été mise en évidence [49, 51].

C'est la raison pour laquelle, en plus de l'activation des basophiles, celle des éosinophiles et des neutrophiles a été testée dans notre étude par l'expression du marqueur CD11b. Parmi notre échantillon, 4 enfants répondaient uniquement en neutrophiles ou en éosinophiles. Ainsi, l'étude de l'activation des éosinophiles et des neutrophiles par le marqueur CD11b a permis de dépister des allergies alimentaires ne s'exprimant pas par l'activation des basophiles. L'allergène alimentaire peut donc également induire une activation d'autres polynucléaires que les seuls basophiles. L'intérêt de l'utilisation de ce marqueur est d'améliorer les résultats du test d'activation des basophiles en étudiant également une autre voie d'activation par les autres polynucléaires (éosinophiles et neutrophiles).

Ce travail a permis d'analyser l'activation cellulaire des éosinophiles et des neutrophiles sur une population d'enfants présentant des manifestations allergiques IgE-médiées. La corrélation entre les résultats de l'activation cellulaire par l'allergène et celle par le témoin positif anti-IgE permet de confirmer que ces deux types cellulaires possèdent des récepteurs IgE. En effet, lorsqu'en présence de l'allergène, il existe une réponse par les éosinophiles ou les neutrophiles la réponse positive par le témoin anti-IgE est de 40%. Compte tenu de la discordance entre la réponse par l'allergène et celle par le témoin anti-IgE, l'activation des éosinophiles et des neutrophiles ne semble pas être uniquement médiée par les récepteurs IgE. En effet, la densité des récepteurs IgE est plus faible sur ces deux types cellulaires que sur les basophiles [17]. Par conséquent, le pontage de deux IgE par l'allergène pour l'activation de la cellule est plus difficile. Ces résultats semblent donc évoquer une possible autre voie d'activation des polynucléaires éosinophiles et neutrophiles. En dehors des récepteurs IgE, ces cellules possèdent des récepteurs IgG et IgA qui pourraient jouer un rôle dans l'activation cellulaire dans l'allergie alimentaire. Afin d'étudier ces possibles voies d'activation il faudrait faire un travail sur l'activation non IgE-médiée.

Ainsi, l'allergie alimentaire peut se définir comme une coopération cellulaire entre les trois types de polynucléaires (basophiles, éosinophiles et neutrophiles). La coopération entre les basophiles et les mastocytes est actuellement la plus reconnue mais l'implication d'autres cellules comme les neutrophiles et les éosinophiles est de plus en plus souvent rapportée dans la littérature. L'étude de l'activation de l'ensemble des polynucléaires dans les manifestations d'allergie alimentaire IgE dépendante semblent nécessaires. Ces trois types de cellules sont

impliqués dans la majorité des pathologies inflammatoires humaines et selon l'expression de marqueurs et la libération de médiateurs les réactions cliniques associées sont variables.

D. L'étude des témoins

Dans notre étude, 20% des polynucléaires basophiles ne sont pas activés par le témoin positif anti-IgE pour le CD63. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature [14, 18, 21]. Les basophiles mauvais répondeurs pour le témoin anti-IgE en CD63 représentent également 20%. Les basophiles mauvais répondeurs sont définis par des seuils d'activation compris entre 5 et 15% au dessus de la valeur du témoin négatif. En effet, il est défini des seuils de réponse en témoins positifs. Un seuil d'activation compris entre 0 et 5% correspond à une réponse négative, au-delà de 15% le test est positif mais pour une réponse comprise entre 5 et 15% il est difficile de pouvoir conclure sur le résultat (Sainte-Laudy, données personnelles non publiées). La validité du témoin anti-IgE rend difficile l'interprétation d'un résultat négatif pour un allergène avec un témoin positif anti-IgE également négatif. Les seuils d'activation des basophiles pour le marqueur CD11b ont été extrapolés à partir de ceux du marqueur CD63 mais ne peuvent être comparés à aucune étude.

Le but de cette étude était de tester l'activation des polynucléaires dans une population d'enfants présentant des signes cliniques d'allergie alimentaire IgE dépendante. Cependant, l'étude de l'activation par le témoin anti-IgE montre qu'il existe une discordance entre le taux d'activation pour le témoin anti-IgE et pour l'allergène. En effet, dans 40% des cas les éosinophiles ou les neutrophiles ne sont pas activés par le témoin positif anti-IgE. Deux hypothèses semblent alors possibles pour l'expliquer. La première hypothèse pourrait être qualifiée d'IgE dépendante. En effet, pour qu'une activation soit présente l'antigène doit ponter deux IgE. Ainsi, pour que la cellule soit activée par l'allergène mais pas par le témoin, il est possible que la distance entre les deux épitopes ne soit pas la même pour la fixation de l'allergène et celle pour le témoin positif. La deuxième hypothèse serait non IgE dépendante. Cela suggérerait que, dans l'allergie alimentaire, il existe d'autres voies d'activation par d'autres récepteurs que l'IgE tels que les récepteurs IgA ou IgG. D'autres études permettant d'étudier ces deux voies seraient à développer.

VII. CONCLUSION

Un nouveau marqueur d'activation des basophiles a été mis en évidence par cette étude : le CD11b. En plus de sa fonction activatrice, ce marqueur est impliqué dans la migration des basophiles vers le site inflammatoire et explique leur présence dans des prélèvements tissulaires dans certaines manifestations allergologiques.

Ce marqueur CD11b est également présent à la surface des éosinophiles et des neutrophiles. Ce travail confirme, par l'augmentation de l'expression du CD11b, que l'allergène alimentaire est capable d'induire l'activation des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles.

De plus, notre étude montre que l'activation des éosinophiles et des neutrophiles n'est pas uniquement médiée par les récepteurs IgE et que d'autres récepteurs tels que les IgG et/ou les IgA pourraient être impliqués dans l'allergie alimentaire.

Parmi les trois types cellulaires étudiés dans ce travail, les basophiles ne sont vraisemblablement pas les seules cellules impliquées dans les manifestations cliniques IgE dépendantes. L'allergie alimentaire apparaît comme une coopération cellulaire en réponse à un allergène. La cytométrie en flux permet l'exploration concomitante de l'activation de ces trois types cellulaires par expression des différents marqueurs membranaires.

D'un point de vue clinique, il n'a pas été montré de relation entre certains symptômes cliniques et un profil immunologique particulier. De même, il n'existe pas de corrélation entre un allergène et un profil immunologique. Cependant, la cytométrie en flux permettrait dans certains cas de s'affranchir du TPO. Dans le cas d'une discordance lors d'un bilan allergologique entre l'histoire clinique et les examens complémentaires (prick-test et/ou IgE spécifiques), la cytométrie en flux peut être un paramètre important.

D'autres études sur de plus grands échantillons permettraient d'approfondir le lien entre les symptômes cliniques et un profil immunologique. D'autres études permettraient également d'étudier les autres voies d'activation possibles de l'allergie alimentaire.

REFERENCES

1. Bidat E., Allergie alimentaire de l'enfant. Arch Pediatr, 2006; 13, 10, p.1349-1353.
2. Rance F., Kanny G., Dutau G., et al., Aspects cliniques de l'allergie alimentaire. Rev Fr Allergol Immunol Clin 1998; 38, 10, p.900-905.
3. Greenhawt M., Oral food challenges in children: review and future perspectives. Curr Allergy Asthma Rep, 2011, 6, p.465-472.
4. Fleischer D. M., Bock S. A., Spears G. C., et al., Oral food challenges in children with a diagnosis of food allergy. J Pediatr, 2011 158, 4, p.578-583 e571.
5. Kanny G., Moneret-Vautrin D. A., Flabbee J., et al., Population study of food allergy in France. J Allergy Clin Immunol, 2001; 108, 1, p.133-140.
6. Moneret-Vautrin D.-A., Epidémiologie de l'allergie alimentaire. Rev Fr Allergol Immunol Clin, 2008; 48, p.171-178.
7. Nowak-Wegrzyn A., Future approaches to food allergy. Pediatrics, 2003; 111, 6 Pt 3, p.1672-1680.
8. Lieberman J. A., Sicherer S. H., Diagnosis of food allergy: epicutaneous skin tests, in vitro tests, and oral food challenge. Curr Allergy Asthma Rep, 2010; 11, 1, p.58-64.
9. Rance F., Grandmottet X., Grandjean H., Prevalence and main characteristics of schoolchildren diagnosed with food allergies in France. Clin Exp Allergy, 2005; 35, 2, p.167-172.
10. Cianferoni A., Spergel J. M., Food allergy: review, classification and diagnosis. Allergol Int, 2009; 58, 4, p.457-466.
11. Dutau G., Rancé F., L'anaphylaxie de l'enfant et de l'adolescent en 2010 : recommandations. Rev Fr Allergol Immunol Clin, 2010; 50, p.540-545.
12. Villard-Truc F., Gomez S-A., Deschildre A., et al, Test de provocation par voie orale aux aliments chez l'enfant. Quand, pour qui et comment ? Sélection des patients. Rev Fr Allergol Immunol Clin, 2006; 46, p.610-624.
13. Rancé F., Comment se passer du test de provocation orale en cas d'allergie alimentaire ? Rev Fr Allergol Immunol Clin, 2010; 50, p.222-225.
14. Ocmant A., Mulier S., Hanssens L., et al., Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. Clin Exp Allergy, 2009; 39, 8, p.1234-1245.
15. Debleds V., Lagarde C., Mesure par cytométrie en flux de l'activation *in vitro* des basophiles par des allergènes. Revue Française des laboratoires, 2005; 370,
16. Mora J., Riggs E. K., Fu J., et al., Expression of the high affinity IgE receptor by neutrophils of individuals with allergic asthma is both minimal and insensitive to regulation by serum IgE. Clin Immunol, 2009; 132, 1, p.132-140.
17. Sihra B. S., Kon O. M., Grant J. A., et al., Expression of high-affinity IgE receptors (Fc epsilon RI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: relationship to total serum IgE concentrations. J Allergy Clin Immunol, 1997; 99, 5, p.699-706.

18. de Weck A. L., Sanz M. L., Gamboa P. M., et al., Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008; 146, 3, p.177-189.
19. Ebo D. G., Bridts C. H., Hagendorens M. M., et al., Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008; 74, 4, p.201-210.
20. Sainte-Laudy J., Vallon C., Guerin J. C., Analyse membranaire de l'expression du CD63 comme marqueur d'activation des basophiles. Applications au diagnostic allergologique. *Allerg Immunol (Paris)*, 1994; 26, 6, p.211-214.
21. Beauvillain C., Drouet M., Renier G., Le test d'activation des basophiles. *Revue Francophone des laboratoires*, 2008; 404,
22. Pichler W. J., Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med*, 2003; 139, 8, p.683-693.
23. El Hentati F., Lobagiu C., Lambert C., Cytométrie et ses applications en immunologie clinique. *Revue Francophone des laboratoires*, 2009; 410,
24. CICBAA Centre d'Investigations Cliniques et Biologiques de l'Allergie Alimentaire. Données du CICBAA. [cited Décembre 2011]; Available from: http://www.cicbaa.com/pages_fr/donnees/index.html.
25. Dutau G., Rancé F., Histoire de l'allergie alimentaire : des précurseurs à l'histoire contemporaine. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2006; 46, p.312-323.
26. Rancé F., Bidat E., Allergie alimentaire chez l'enfant. 2000, Paris: Médecine et Enfance. 210 p.
27. Mailhol C., Giordano-Labadie F., Ammoury A., et al, Dermatite atopique de l'enfant : quand penser à l'allergie alimentaire ? *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2010; 50, p.S14-S20.
28. Dutau G., Rancé F., Epidémiologie de l'asthme et des allergies alimentaires. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2011; 51, p.248-254.
29. Dutau G., Rancé F., Facteurs de risque de l'allergie alimentaire sévère. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2007; 47, p.102-109.
30. Deschildre A., Bonnel C., Thumerelle C., et al, Quelles sont les indications d'un test de provocation orale ? *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2007; 47, p.190-192.
31. Bousquet P-J., Rancé F., Deschildre A, et al, Les conditions de sécurité pour la réalisation des tests de provocation en allergologie. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2007; 47, p.323-332.
32. Sampson H. A., Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 103, 6, p.981-989.
33. Wang J., Sampson H. A., Food allergy. *J Clin Invest*, 2011; 121, 3, p.827-835.
34. Dupont Ch., Mécanismes physiopathologiques de l'allergie alimentaire. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 1997; 37, p.1046-1051.
35. Blank U., David B., Agrégation des récepteurs IgE et activation membranaire. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 1998; 38, p.878-885.
36. Stone K. D., Prussin C., Metcalfe D. D., IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 2010; 125, 2 Suppl 2, p.S73-80.

37. Nemni A., Grimfeld A., Just J., L'allergie alimentaire chez l'enfant. Dossier thérapeutique en médecine générale, 2006; 31.
38. Roitt, Brostoff, Male, Immunologie. De Boeck Université ed. 1997. 406 pages.
39. Devouassoux G., Le polynucléaire basophile, clé de la réaction allergique. Modulations par les chimokines. Rev Mal Respir, 2000; 17, 3, p.629-640.
40. Falcone F. H., Haas H., Gibbs B. F., The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. Blood, 2000; 96, 13, p.4028-4038.
41. Devouassoux G., Le basophile humain et la réponse immunitaire. Rev Fr Allergol Immunol Clin, 2004; 44, p.1-8.
42. Bochner B. S., Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. J Allergy Clin Immunol, 2000; 106, 5 Suppl, p.S292-302.
43. Arock M., Similitudes et différences entre les mastocytes et le polynucléaire basophile. Rev Fr Allergol Immunol Clin, 2005; 44, p.23-36.
44. Valent P., Basophil activation antigens: molecular mechanisms and clinical implications. The Open Allergy Journal, 2010; 3, p.52-59.
45. Ebo D. G., Hagendorens M. M., Bridts C. H., et al., In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? Clin Exp Allergy, 2004; 34, 3, p.332-339.
46. Georgakopoulos T., Moss S. T., Kanagasundaram V., Integrin CD11c contributes to monocyte adhesion with CD11b in a differential manner and requires Src family kinase activity. Mol Immunol, 2008; 45, 13, p.3671-3681.
47. Uguccioni M., Mackay C. R., Ochensberger B., et al., High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. J Clin Invest, 1997; 100, 5, p.1137-1143.
48. Decot V., Capron M., Le polynucléaire éosinophile : structure et fonctions. Presse Med, 2006; 35, 1 Pt 2, p.113-124.
49. Minai-Fleminger Y., Levi-Schaffer F., Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. Inflamm Res, 2009; 58, 10, p.631-638.
50. Couissinier-Paris P., Etude de l'activation du polynucléaire éosinophile. Presse Med, 2006; 35, 1 Pt 2, p.125-134.
51. Gougerot-Pocidallo M-A., Polynucléaires neutrophiles humains. Revue Française des laboratoires, 2002; 341,
52. Gounni A. S., Lamkhioued B., Koussih L., et al., Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma. FASEB J, 2001; 15, 6, p.940-949.
53. Holgate, Church, Allergologie. De Boeck Université ed. 1995. 314 pages.
54. MacGlashan D. Jr., IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils. Curr Opin Immunol, 2008; 20, 6, p.717-723.
55. Prin L., Mastocytes, basophiles, éosinophiles analyse des marqueurs biologiques. Rev Fr Allergol Immunol Clin, 1996; 36, p.889-896.
56. Monneret G., Boumiza R., Gravel S., et al., Effects of prostaglandin D(2) and 5-lipoxygenase products on the expression of CD203c and CD11b by basophils. J Pharmacol Exp Ther, 2005; 312, 2, p.627-634.

57. Anderson S. I., Hotchin N. A., Nash G. B., Role of the cytoskeleton in rapid activation of CD11b/CD18 function and its subsequent downregulation in neutrophils. *J Cell Sci*, 2000; 113 (Pt 15), p.2737-2745.
58. Coulter Beckman. History of Flow Cytometry. [cited Décembre 2011]; Available from: www.beckmancoulter.com.
59. Abuaf N., Rajoely B., Gaouar H., et al, Contribution de la cytométrie de flux au diagnostic d'allergie. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2004; 44, p.37-44.
60. Sabbah A., Sainte-Laudy J., Flow cytometry applied to the analysis of lymphocyte and basophil activation. *ACI International*, 1996, p.116-119.
61. Ebo D. G., Sainte-Laudy J., Bridts C. H., et al., Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy*, 2006; 61, 9, p.1028-1039.
62. Sainte-Laudy J., Boumediene A., Touraine F., 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, p.291-296.
63. Rahman Misha. Introduction to flow cytometry. 2006 [cited Décembre 2011]; Available from: www.ab-direct.com.
64. Hausmann O. V., Gentinetta T., Fux M., et al., Robust expression of CCR3 as a single basophil selection marker in flow cytometry. *Allergy*, 2011; 66, 1, p.85-91.
65. Sainte-Laudy J., Ménétrey C., Brianchon C., et al, Evaluation 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 Immunol Clin*, 2009; 49, p.454-461.
66. Monneret G., Benoit Y., Debard A. L., et al., Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs. *Clin Immunol*, 2002; 102, 2, p.192-199.
67. 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, 8, p.1166-1171.
68. Sabato V., van Hengel A. J., De Knop K. J., et al., Human basophils: a unique biological instrument to detect the allergenicity of food. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2011; 21, 3, p.179-184.
69. Santos C., Deschildre A., Paty E., Test de provocation par voie orale aux aliments chez l'enfant. Quand, pou qui et comment ? Réalisation. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2006; 46, p.659-669.
70. Juchet A., Chabbert-Broué A., Micheau P., Evolution naturelle de l'allergie alimentaire chez l'enfant. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2003; 43, p.186-191.
71. Rubio A., Vivinus-Nebot M., Bourrier T., et al., Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy*, 2011; 66, 1, p.92-100.
72. Moneret-Vautrin D. A., Sainte-Laudy J., Kanny G., et al., Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1999; 82, 1, p.33-40.
73. Bonnin V., Tridon A., Jacquemot N., et al, Prévalence des IgE anti-CCD chez des patients sensibilisés à l'arachide. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 2006; 21, p.33-37.

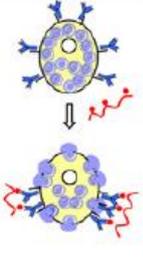
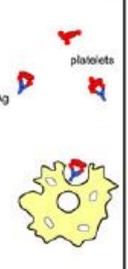
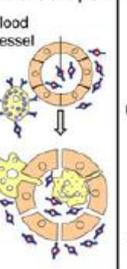
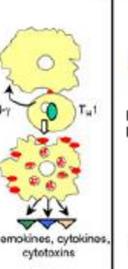
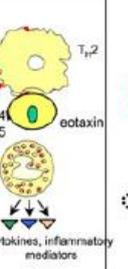
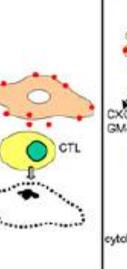
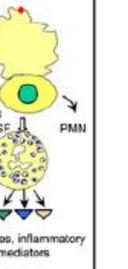
-
74. Sainte-Laudy J., Belon P., Use of four different flow cytometric protocols for the analysis of human basophil activation. Application to the study of the biological activity of high dilutions of histamine. *Inflamm Res*, 2006; 55 Suppl 1, p.S23-24.
 75. Kleine-Tebbe J., Erdmann S., Knol E. F., et al., Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives. *Int Arch Allergy Immunol*, 2006; 141, 1, p.79-90.
 76. Pawankar R., Mori S., Ozu C., et al., Overview on the pathomechanisms of allergic rhinitis. *Asia Pac Allergy*, 2011; 1, 3, p.157-167.
 77. Jonsson F., Mancardi D. A., Kita Y., et al., Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest*, 121, 4, p.1484-1496.
 78. Sainte-Laudy J., Sagot L., Brianchon C., Un cas d'hypersensibilité allergique non IgE dépendante a la farine de blé caractérisée par une activation allergène dépendante des neutrophiles et des éosinophiles. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2010; 50, p.318.

ANNEXES

Annexe 1 :

Classification de W. Pichler [22]

Antibody mediated hypersensitivity reactions (I-III) and delayed type hypersensitivity reactions (IV a-d)

	Type I	Type II	Type III	Type IV a	Type IV b c	Type IV	Type IV d
Immune reactant	IgE	IgG	IgG	IFN γ , TNF α (T $_H$ 1 cells)	IL-5, IL-4/IL-13 (T $_H$ 2 cells)	Perforin/ GranzymeB (CTL)	CXCL-8, IL-17 (?), GM-CSF (T-cells)
Antigen	Soluble antigen	Cell- or matrix-associated antigen	Soluble antigen	Antigen presented by cells or direct T cell stimulation	Antigen presented by cells or direct T cell stimulation	Cell-associated antigen or direct T cell stimulation	Soluble antigen presented by cells or direct T cell stimulation
Effector	Mast-cell activation	FcR $^+$ cells (phagocytes, NK cells)	FcR $^+$ cells Complement	Macrophage activation	Eosinophils	T cells	Neutrophils
							
Example of hypersensitivity reaction	Allergic rhinitis, asthma, systemic anaphylaxis	Some drug allergies (e.g., penicillin)	Serum sickness, Arthus reaction	Tuberculin reaction, contact dermatitis (with IVc)	Chronic asthma, chronic allergic rhinitis, Maculopapular exanthema with eosinophilia	Contact dermatitis, Maculopapular and bullous exanthema, hepatitis	AGEP, Behçet disease

Annexe 2 :

Résultat d'une cytométrie en flux :

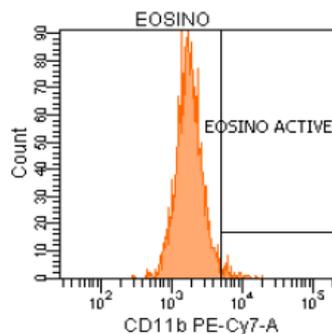
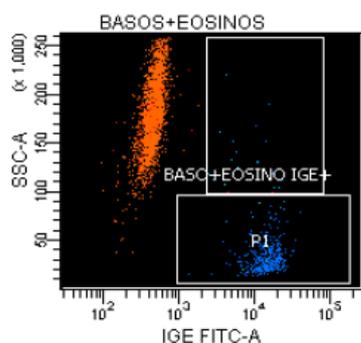
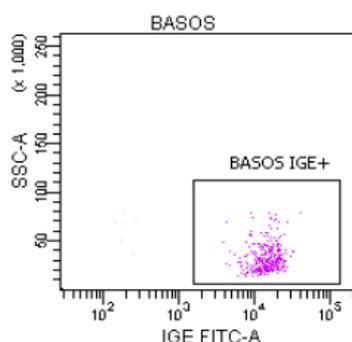
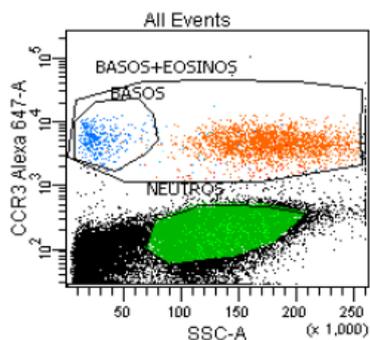
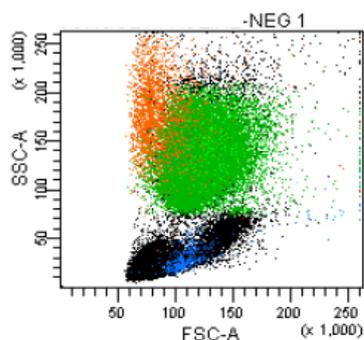
- Témoin négatif

CHRU DUPUYTREN - LABORATOIRE IMMUNOLOGIE

Specimen Name:
 Tube Name: NEG 1
 Record Date: Nov 2, 2011 1:05:41 PM
Activation des polynucléaires

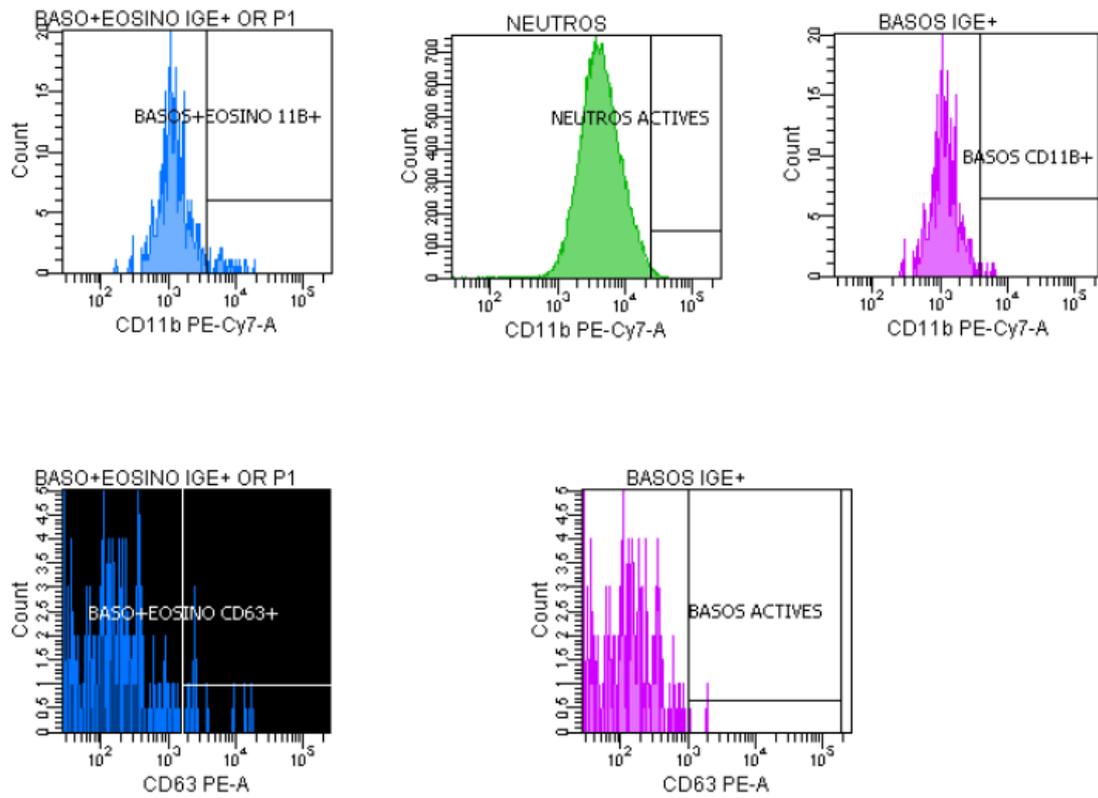
Tube: NEG 1

Population	#Events
All Events	57,528
BASOS	359
BASOS IGE+	351
BASOS ACTIVES	2
BASOS CD11B+	4
NEUTROS	32,853
NEUTROS ACTIVES	199
BASO+EOSINO	2,623
BASO+EOSINO IGE+	21
P1	363
BASO+EOSINO IGE+ OR P1	384
BASO+EOSINO 11B+	22
BASO+EOSINO CD63+	10
EOSINO	2,239
EOSINO ACTIVE	47



- Témoin négatif (suite)

CHRU DUPUYTREN - LABORATOIRE IMMUNOLOGIE

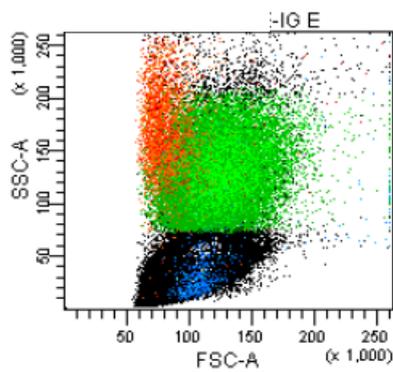


- Témoin positif anti-IgE

CHRU DUPUYTREN - LABORATOIRE IMMUNOLOGIE

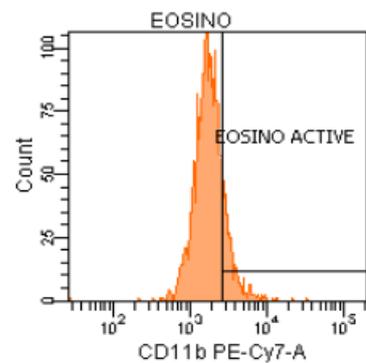
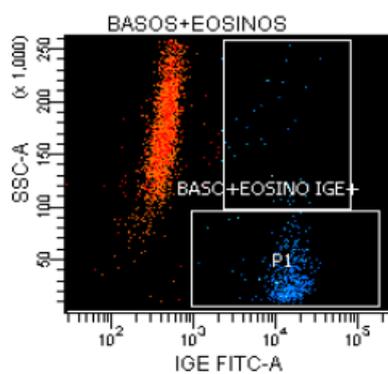
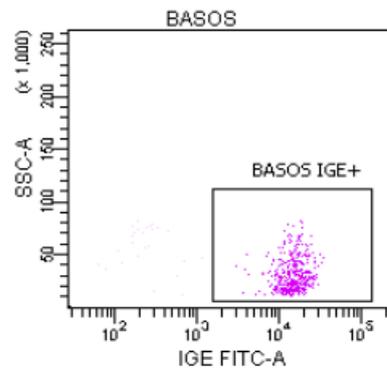
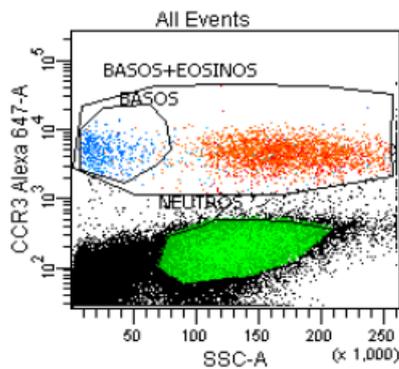
Specimen Name: _____
 Tube Name: IG E
 Record Date: Nov 2, 2011 1:14:18 PM

Activation des polynucléaires



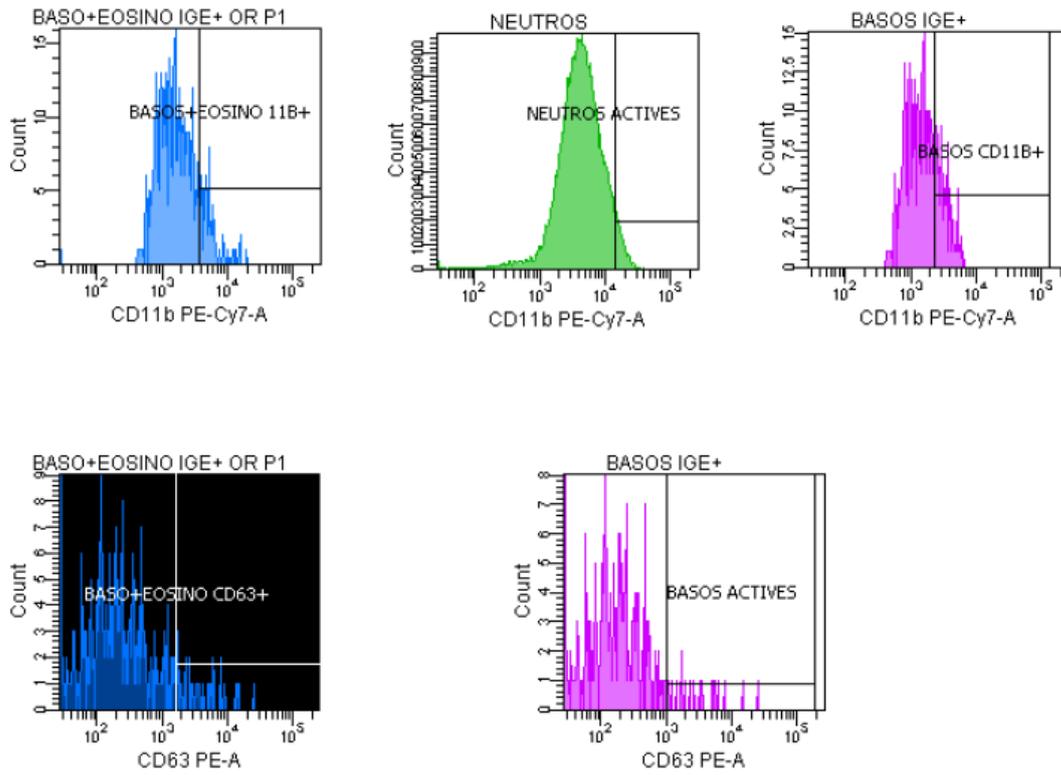
Tube: IG E

Population	#Events
All Events	82,767
BASOS	459
BASOS IGE+	434
BASOS ACTIVES	19
BASOS CD11B+	114
NEUTROS	45,054
NEUTROS ACTIVES	2,200
BASO+EOSINOS	3,163
BASO+EOSINO IGE+	40
P1	468
BASO+EOSINO IGE+ OR P1	508
BASOS+EOSINO 11B+	82
BASO+EOSINO CD63+	32
EOSINO	2,655
EOSINO ACTIVE	440



- Témoin positif anti-IgE (suite)

CHRU DUPUYTREN - LABORATOIRE IMMUNOLOGIE



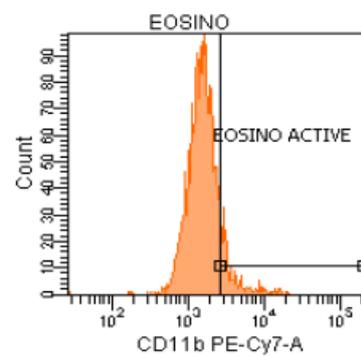
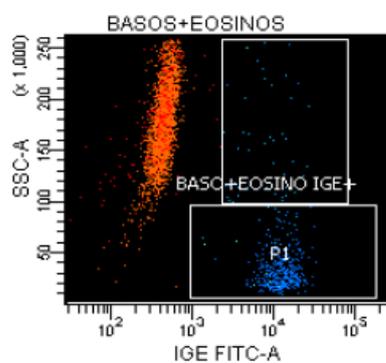
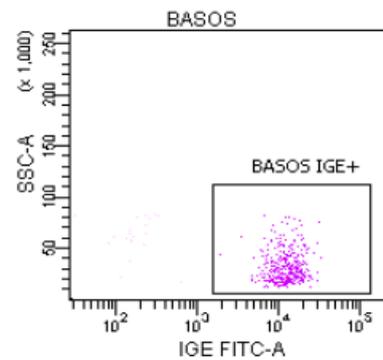
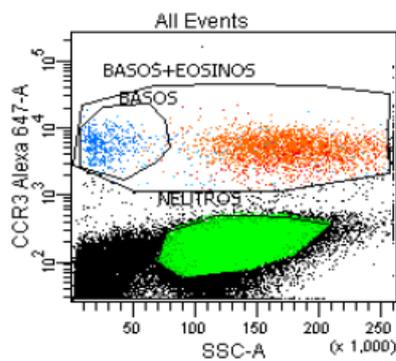
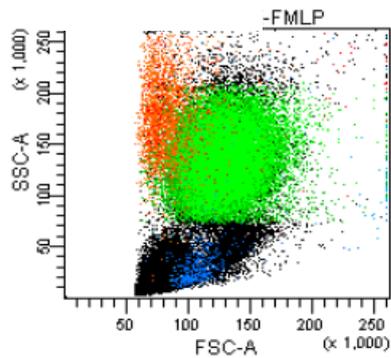
- Témoin positif fMLP

CHRU DUPUYTREN - LABORATOIRE IMMUNOLOGIE

Specimen Name:
 Tube Name: FMLP
 Record Date: Nov 2, 2011 1:11:00 PM
Activation des polynucléaires

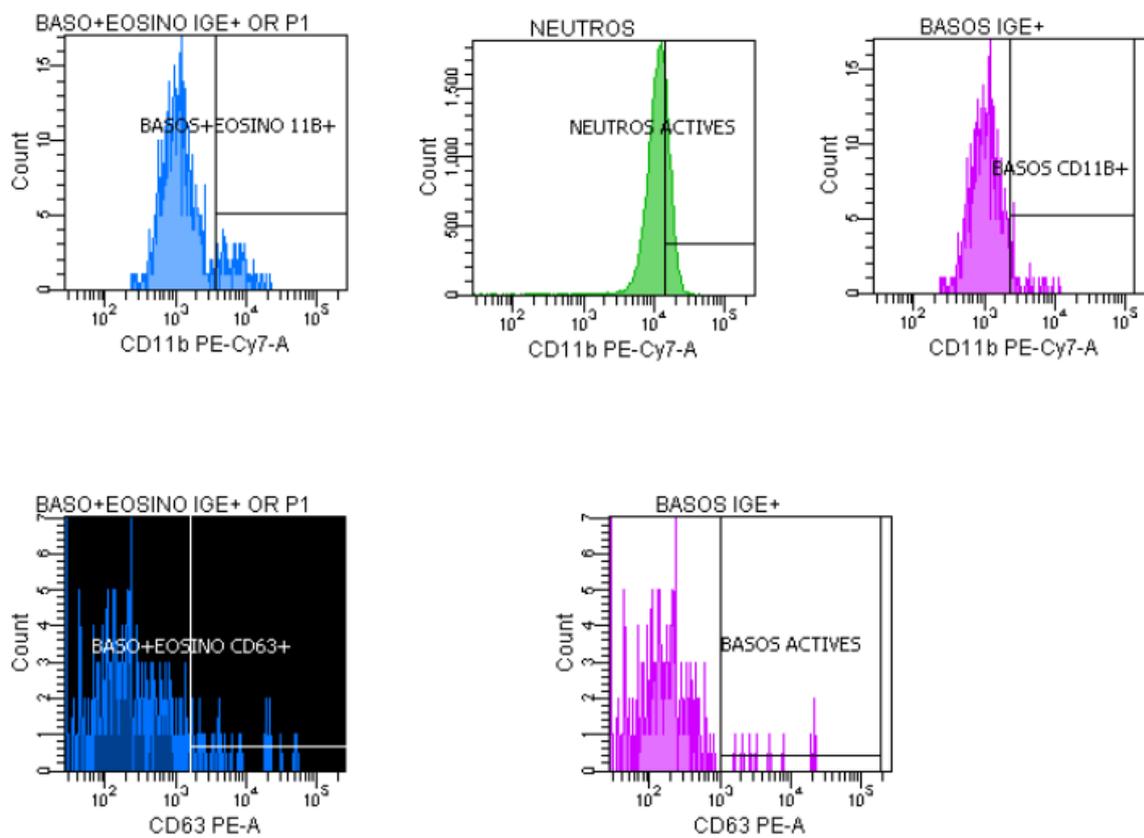
Tube: FMLP

Population	#Events
All Events	76,187
BASOS	411
BASOS IGE+	391
BASOS ACTIVES	10
BASOS CD11B+	27
NEUTROS	41,269
NEUTROS ACTIVES	12,062
BASOS+EOSINOS	2,936
BASO+EOSINO IGE+	47
P1	417
BASO+EOSINO IGE+ OR P1	464
BASOS+EOSINO 11B+	63
BASO+EOSINO CD63+	31
EOSINO	2,472
EOSINO ACTIVE	277



- Témoin positif fMLP (suite)

CHRU DUPUYTREN - LABORATOIRE IMMUNOLOGIE



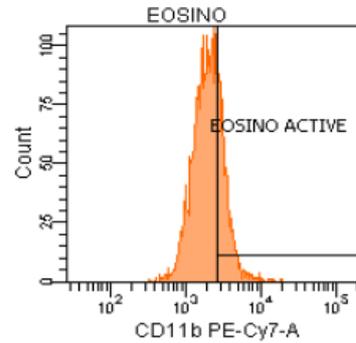
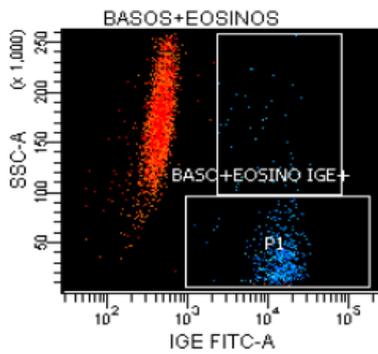
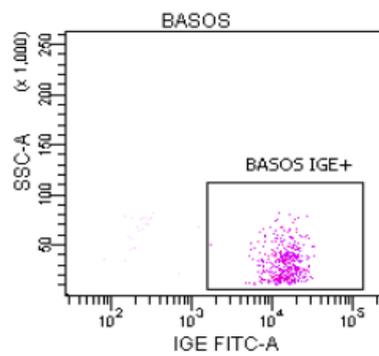
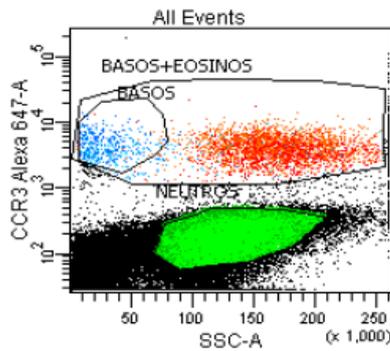
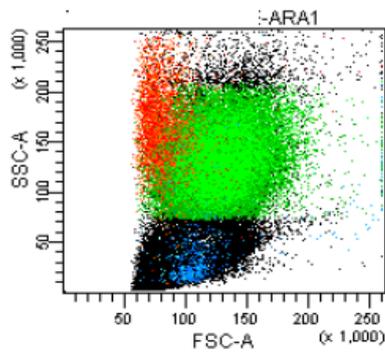
- Dilution arachide

CHRU DUPUYTREN - LABORATOIRE IMMUNOLOGIE

Specimen Name: E
 Tube Name: ARA1
 Record Date: Nov 2, 2011 1:17:43 PM
Activation des polynucléaires

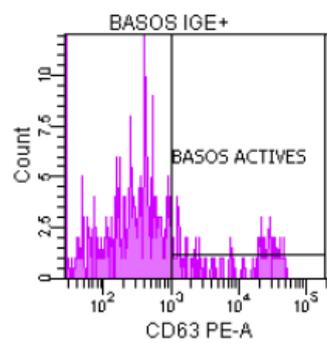
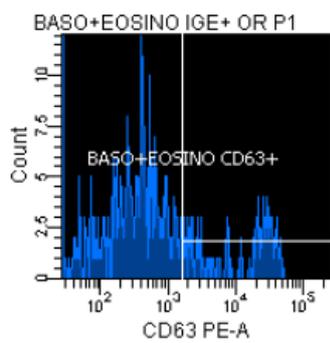
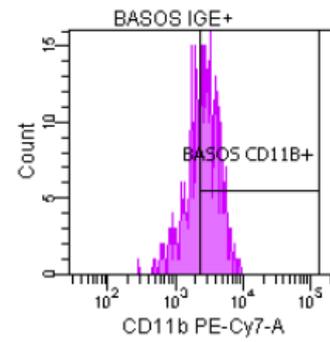
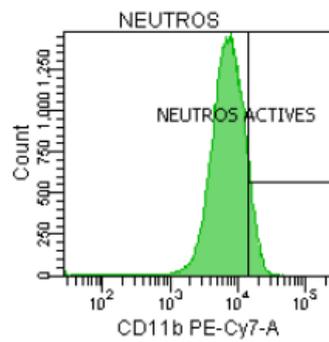
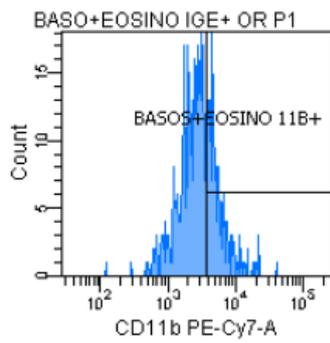
Tube: ARA1

Population	#Events
All Events	99,687
BASOS	469
BASOS IGE+	447
BASOS ACTIVES	88
BASOS CD11B+	268
NEUTROS	54,594
NEUTROS ACTIVES	5,731
BASOS+EOSINOS	3,629
BASO+EOSINO IGE+	46
P1	514
BASO+EOSINO IGE+ OR P1	560
BASOS+EOSINO 11B+	189
BASO+EOSINO CD63+	119
EOSINO	3,069
EOSINO ACTIVE	852



- Dilution arachide (suite)

CHRU DUPUYTREN - LABORATOIRE IMMUNOLOGIE



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

ACTIVATION DES POLYNUCLEAIRES DANS L'ALLERGIE ALIMENTAIRE IgE DEPENDANTE DE L'ENFANT

Objectif : Mettre en évidence en pédiatrie une corrélation entre les manifestations cliniques initiales d'allergie alimentaire IgE dépendante et l'expression différentielle des marqueurs d'activation sur les polynucléaires.

Matériel et méthode : Les cytométries en flux (CMF) réalisées en pédiatrie lors d'un bilan d'allergie alimentaire IgE-médiée pour les allergènes les plus fréquents ont été étudiées. L'activation des polynucléaires a été analysée avec plusieurs marqueurs : le CD63 et le CD11b pour les basophiles et le CD11b pour les éosinophiles et les neutrophiles.

Résultats : 79 enfants ont été inclus et 55 avaient une CMF positive pour au moins un allergène. L'activation des basophiles était prédominante en CD63. Quand cette activation était par le CD11b l'ensemble des polynucléaires était activé ($p=0,0036$). L'activation cellulaire implique plus particulièrement le CD63 dans l'urticaire et le CD11b dans l'eczéma (différence non significative). Pour 2 enfants l'activation pour les basophiles était exclusivement par le CD11b. Les éosinophiles de même que les neutrophiles étaient activés par l'allergène dans 40% des cas. L'activation des éosinophiles et/ou des neutrophiles par l'anti-IgE n'était observée que dans 40% des cas.

Conclusion : Le CD11b est un marqueur d'activation et de migration des basophiles ce qui n'avait jamais été étudié pour ce polynucléaire. Dans notre étude, l'activation des éosinophiles et des neutrophiles dans l'allergie alimentaire est confirmée par la surexpression du marqueur CD11b. Pour ces cellules, la voie IgE dépendante ne semble pas être la seule (rôle des IgA et/ou IgG ?). L'allergie alimentaire apparaît comme une coopération cellulaire de l'ensemble des polynucléaires en réponse à un allergène. Aucune corrélation entre des symptômes cliniques et un profil immunologique n'a été mise en évidence.

Mots clés : allergie alimentaire, IgE, cytométrie en flux, polynucléaires.

POLYNUCLEAR ACTIVATION IN IgE-MEDIATED FOOD ALLERGY IN CHILDREN

Aim of the study: Comparison of clinical symptoms in IgE-mediated food allergy in children and the expression of activation markers on the basophils, neutrophils and eosinophils (PMNs).

Method: In 79 children having an IgE-mediated food allergy diagnosed, PMNs activation induced by the main food allergens was analyzed by flow cytometry using, as activation markers, CD63 and CD11b for basophils and CD11b for eosinophils and neutrophils.

Results: A significant expression of CD63 or CD11b was observed in 55 cases for at least one allergen involving the CD63 marker in 94, 5% of the cases. All PMNs were activated when basophils were activated by CD11b ($p=0,0036$). CD63 was particularly involved in urticaria and CD11b in eczema (difference not significant). CD11b upregulation alone on basophils was only observed for two children. Eosinophils and neutrophils were activated by the allergen and by the anti-IgE in 40% of the cases.

Conclusion: CD11b is an activation marker which has never been used for the analysis of basophil activation. Eosinophils and neutrophils activation was confirmed by CD11b upregulation. For these cells, an IgE mediated mechanism is probably not the only one (involvement of IgA and/or IgG?). Food allergens, according to this study, seem to be capable of inducing multiple cellular activation inducing mast cells and basophils but also neutrophils and eosinophils. No correlation between the clinical symptoms and an immune response was observed in these cases of IgE mediated reactions.

Keywords: food allergy, IgE, flow cytometry, polynuclears.