HAL open science

Évaluation du test d'activation des basophiles comme outil diagnostique dans l'allergie à l'arachide, à la noisette et aux protéines de lait de vache en pédiatrie

Marion Raveau

To cite this version:

Marion Raveau. Évaluation du test d'activation des basophiles comme outil diagnostique dans l'allergie à l'arachide, à la noisette et aux protéines de lait de vache en pédiatrie. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03586163

HAL Id: dumas-03586163

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03586163v1

Submitted on 23 Feb 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE

UFR DE MÉDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMÉDICALES

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

RAVEAU Marion

Présentée et soutenue publiquement le 9 Avril 2021

EVALUATION DU TEST D'ACTIVATION DES BASOPHILES COMME OUTIL DIAGNOSTIQUE DE L'ALLERGIE A L'ARACHIDE, A LA NOISETTE ET AUX PROTEINES DE LAIT DE VACHE EN PEDIATRIE.

Directeur de thèse : Monsieur BONNET Benjamin, Docteur, Praticien hospitalier – Service d'Immunologie CHU Clermont-Ferrand

Président du jury : Monsieur EVRARD Bertrand, Professeur, UFR de Médecine et des Professions paramédicales de Clermont-Ferrand

Membres du jury :
- Madame MICHAUD Elodie, Docteur, Praticien hospitalier, Pédiatrie CHU Clermont-Ferrand

- Monsieur FAUQUERT Jean-Luc, Docteur, Praticien hospitalier, Pédiatrie CHU Clermont-Ferrand

UFR DE MÉDECINE
ET DES PROFESSIONS PARAMÉDICALES
Université Clermont Auvergne

N°

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE

UFR DE MÉDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMÉDICALES

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

RAVEAU Marion

Présentée et soutenue publiquement le 9 Avril 2021

EVALUATION DU TEST D'ACTIVATION DES BASOPHILES COMME OUTIL DIAGNOSTIQUE DE L'ALLERGIE A L'ARACHIDE, A LA NOISETTE ET AUX PROTEINES DE LAIT DE VACHE EN PEDIATRIE.

Directeur de thèse : Monsieur BONNET Benjamin, Docteur, Praticien hospitalier – Service d'Immunologie CHU Clermont-Ferrand

Président du jury : Monsieur EVRARD Bertrand, Professeur, UFR de Médecine et des Professions paramédicales de Clermont-Ferrand

Membres du jury :
- Madame MICHAUD Elodie, Docteur, Praticien hospitalier, Pédiatrie CHU Clermont-Ferrand

- Monsieur FAUQUERT Jean-Luc, Docteur, Praticien hospitalier, Pédiatrie CHU Clermont-Ferrand

UFR DE MÉDECINE
ET DES PROFESSIONS PARAMÉDICALES
Université Clermont Auvergne

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

PRESIDENTS HONORAIRES	: **JOYON** Louis
UNIVERSITE D'AUVERGNE	: **DOLY** Michel
	: **TURPIN** Dominique
	: **VEYRE** Annie
	: **DULBECCO** Philippe
	: **ESCHALIER** Alain
PRESIDENTS HONORAIRES	: **CABANES** Pierre
UNIVERSITE BLAISE PASCAL	: **FONTAINE** Jacques
	: **BOUTIN** Christian
	: **MONTEIL** Jean-Marc
	: **ODOUARD** Albert
	: **LAVIGNOTTE** Nadine
PRESIDENT DE L'UNIVERSITE et	
PRESIDENT DU CONSEIL ACADEMIQUE PLENIER	: **BERNARD** Mathias
PRESIDENT DU CONSEIL ACADEMIQUE RESTREINT	: **DEQUIEDT** Vianney
VICE-PRESIDENTE DU CONSEIL D'ADMINISTRATION	: **FOGLI** Anne
VICE-PRESIDENT DE LA COMMISSION DE LA RECHERCHE	: **HENRARD** Pierre VICE
PRESIDENTE DE LA COMMISSION DE LA FORMATION ET DE LA VIE UNIVERSITAIRE	: **PEYRARD** Françoise
DIRECTEUR GENERAL DES SERVICES	: **PAQUIS** François

UFR DE MEDECINE

ET DES PROFESSIONS PARAMEDICALES

DOYENS HONORAIRES	: **DETEIX** Patrice
	: **CHAZAL** Jean
DOYEN	: **CLAVELOU** Pierre
RESPONSABLE ADMINISTRATIVE	: **ROBERT** Gaëlle

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. BACIN Franck - BEGUE René-Jean - BEYTOUT Jean - BOMMELAER Gilles - BOUCHER Daniel - BUSSIERE Jean-Louis - CANO Noël - CASSAGNES Jean - CATILINA Pierre - CHABANNES Jacques - CHAZAL Jean - CHIPPONI Jacques - CHOLLET Philippe - CITRON Bernard - COUDERT Jean - DASTUGUE Bernard - DAUPLAT Jacques - DECHELOTTE Pierre - DEMEOCQ François - DE RIBEROLLES Charles - DETEIX Patrice - ESCANDE Georges - Mme FONCK Yvette - MM. GENTOU Claude - Mme GLANDDIER Phyllis - MM. IRTHUM Bernard - JACQUETIN Bernard - Mme LAVARENNE Jeanine - MM. LAVERAN Henri - LESOURD Bruno - LEVAI Jean-Paul - MAGE Gérard - MARCHEIX Jean- Claude - MICHEL Jean-Luc - MONDIE Jean-Michel - PHILIPPE Pierre - PLAGNE Robert - PLANCHE Roger - PONSONNAILLE Jean - REY Michel - Mme RIGAL Danièle - MM. ROZAN Raymond - SCHOEFFLER Pierre - SIROT Jacques - RIBAL Jean-Pierre - SOUTEYRAND Pierre - TANGUY Alain - TERVER Sylvain - THIEBLOT Philippe - TOURNILHAC Michel - VANNEUVILLE Guy - VIALLET Jean-François - Mlle VEYRE Annie

PROFESSEURS EMERITES :

MM. AUMAITRE Olivier - BOITEUX Jean-Paul - CHAMOUX Alain - DUBRAY Claude - ESCHALIER Alain - KEMENY Jean-Louis – LABBE André - Mme LAFEUILLE Hélène - MM. LEMERY Didier - LUSSON Jean-René

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. VAGO Philippe	Histologie-Embryologie Cytogénétique
M. AVAN Paul	Biophysique et Traitement de l'Image
M. DURIF Franck	Neurologie
M. BOIRE Jean-Yves	Biostatistiques, Informatique Médicale et Technologies de Communication
M. BOYER Louis	Radiologie et Imagerie Médicale option Clinique
M. POULY Jean-Luc	Gynécologie et Obstétrique
M. CANIS Michel	Gynécologie-Obstétrique
Mme PENAULT-LLORCA Frédérique	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M. BAZIN Jean-Etienne	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale
M. BIGNON Yves Jean	Cancérologie option Biologique
M. BOIRIE Yves	Nutrition Humaine
M. CLAVELOU Pierre	Neurologie
M. GILAIN Laurent	O.R.L.
M. LEMAIRE Jean-Jacques	Neurochirurgie
M. CAMILLERI Lionel	Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
M. DAPOIGNY Michel	Gastro-Entérologie
M. LLORCA Pierre-Michel	Psychiatrie d'Adultes

M. PEZET Denis	Chirurgie Digestive
M. SOUWEINE Bertrand	Réanimation Médicale
M. BOISGARD Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme DUCLOS Martine	Physiologie
M. SCHMIDT Jeannot	Médecine d'Urgence
M. BERGER Marc	Hématologie
M. GARCIER Jean-Marc	Anatomie-Radiologie et Imagerie Médicale
M. ROSSET Eugénio	Chirurgie Vasculaire
M. SOUBRIER Martin	Rhumatologie
M. ABERGEL Armando	Hépatologie
Mle BARTHELEMY Isabelle	Chirurgie Maxillo-Faciale
M. RUIVARD Marc	Médecine Interne

1ère CLASSE

M. CAILLAUD Denis	Pneumo-phtisiologie
M. VERRELLE Pierre	Radiothérapie option Clinique
M. D'INCAN Michel	Dermatologie -Vénéréologie
Mme JALENQUES Isabelle	Psychiatrie d'Adultes
M.GERBAUD Laurent	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
M. TAUVERON Igor	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
M. MOM Thierry	Oto-Rhino-Laryngologie
M. RICHARD Rudy	Physiologie
M. SAPIN-DEFOUR Vincent	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. BAY Jacques-Olivier	Cancérologie
M. COUDEYRE Emmanuel	Médecine Physique et de Réadaptation
Mme GODFRAIND Catherine	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M. LAURICHESSE Henri	Maladies Infectieuses et Tropicales
M. TOURNILHAC Olivier	Hématologie
M. CHIAMBARETTA Frédéric	Ophtalmologie
FILAIRE Marc	Anatomie – Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
M. GALLOT Denis	Gynécologie-Obstétrique
M. GUY Laurent	Urologie
M. TRAORE Ousmane	Hygiène Hospitalière
M. ANDRE Marc	Médecine Interne
M. BONNET Richard	Bactériologie, Virologie
M. CACHIN Florent	Biophysique et Médecine Nucléaire
M. COSTES Frédéric	Physiologie
M. FUTIER Emmanuel	Anesthésiologie-Réanimation
Mme HENG Anne-Elisabeth	Néphrologie
M. MOTREFF Pascal	Cardiologie
Mme PICKERING Gisèle	Pharmacologie Clinique
M. RABISCHONG Benoît	Gynécologie Obstétrique
M. CHABROT Pascal	Radiologie et Imagerie Médicale
M. DESCAMPS Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
Mme HENQUELL Cécile	Bactériologie Virologie
M. POMEL Christophe	Cancérologie – Chirurgie Générale

2ème CLASSE

Mme CREVEAUX Isabelle	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. FAICT Thierry	Médecine Légale et Droit de la Santé
Mme KANOLD LASTAWIECKA Justyna	Pédiatrie
M. TCHIRKOV Andréï	Cytologie et Histologie
M. CORNELIS François	Génétique
M. LESENS Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
M. AUTHIER Nicolas	Pharmacologie Médicale
M. BROUSSE Georges	Psychiatrie Adultes/Addictologie
M. BUC Emmanuel	Chirurgie Digestive
M. LAUTRETTE Alexandre	Néphrologie Réanimation Médicale
Mme BRUGNON Florence	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction
M. ESCHALIER Romain	Cardiologie
M. MERLIN Etienne	Pédiatrie
Mme TOURNADRE Anne	Rhumatologie
M. DURANDO Xavier	Cancérologie
M. DUTHEIL Frédéric	Médecine et Santé au Travail
Mme FANTINI Maria Livia	Neurologie
M. SAKKA Laurent	Anatomie – Neurochirurgie
M. BOURDEL Nicolas	Gynécologie-Obstétrique
M. GUIEZE Romain	Hématologie
M. POINCLOUX Laurent	Gastroentérologie
M. SOUTEYRAND Géraud	Cardiologie
M. EVRARD Bertrand	Immunologie
M. POIRIER Philippe	Parasitologie et Mycologie
Mme PHAM DANG Nathalie	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
Mme SARRET Catherine	Pédiatrie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

1ère CLASSE

M. CLEMENT Gilles	Médecine Générale
M. VORILHON Philippe	Médecine Générale

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

2ème CLASSE

Mme MALPUECH-BRUGERE Corinne	Nutrition Humaine

PROFESSEURS ASSOCIES DES UNIVERSITES

Mme BOTTET-MAULOUBIER Anne	Médecine Générale
M. CAMBON Benoît	Médecine Générale
M. TANGUY Gilles	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

HORS CLASSE

Mme CHAMBON Martine	Bactériologie Virologie
Mme BOUTELOUP Corinne	Nutrition
Mme FOGLI Anne	Biochimie Biologie Moléculaire
Mle GOUAS Laetitia	Cytologie et Histologie, Cytogénétique

1ère CLASSE

M. MORVAN Daniel	Biophysique et Traitement de l'Image
Mle GOUMY Carole	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
M. MARCEAU Geoffroy	Biochimie Biologie Moléculaire
Mme MINET-QUINARD Régine	Biochimie Biologie Moléculaire
M. ROBIN Frédéric	Bactériologie
Mle VERONESE Lauren	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
M. DELMAS Julien	Bactériologie
Mle MIRAND Audrey	Bactériologie Virologie
M.OUCHCHANE Lemlih	Biostatistiques, Informatique Médicale et Technologies de Communication
M. LIBERT Frédéric	Pharmacologie Médicale
Mle COSTE Karen	Pédiatrie
Mle AUMERAN Claire	Hygiène Hospitalière
Mme CASSAGNES Lucie	Radiologie et Imagerie Médicale
M. LEBRETON Aurélien	Hématologie
M. BUISSON Anthony	Gastroentérologie
M. BOUVIER Damien	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. MAQDASY Salwan	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques
Mme NOURRISSON Céline	Parasitologie - Mycologie
Mme PONS Hanaë	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction

2ème CLASSE

M.	JABAUDON-GANDET Matthieu	Anesthésiologie – Réanimation Chirurgicale
M.	COLL Guillaume	Neurochirurgie
M.	GODET Thomas	Anesthésiologie-Réanimation et Médecine Péri-Opératoire
M.	LACHAL Jonathan	Pédopsychiatrie
M.	MOUSTAFA Farès	Médecine d'Urgence

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

1ère CLASSE

Mme VAILLANT-ROUSSEL Hélène	Médecine Générale

2ème CLASSE

Mme LAPORTE Catherine	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

HORS CLASSE

M. BLANCHON Loïc	Biochimie Biologie Moléculaire
M. MARCHAND Fabien	Pharmacologie Médicale
Mme VAURS-BARRIERE Catherine	Biochimie Biologie Moléculaire

CLASSE NORMALE

M.	BAILLY Jean-Luc	Bactériologie Virologie
Mle	AUBEL Corinne	Oncologie Moléculaire
Mle	GUILLET Christelle	Nutrition Humaine
M.	BIDET Yannick	Oncogénétique
M.	DALMASSO Guillaume	Bactériologie
M.	PIZON Frank	Santé Publique
M.	SOLER Cédric	Biochimie Biologie Moléculaire
M.	GIRAUDET Fabrice	Biophysique et Traitement de l'Image
M.	LOLIGNIER Stéphane	Neurosciences – Neuropharmacologie

Mme	MARTEIL Gaëlle	Biologie de la Reproduction
M.	PINEL Alexandre	Nutrition Humaine

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DES UNIVERSITES

M.	BERNARD Pierre	Médecine Générale
Mme	ESCHALIER Bénédicte	Médecine Générale
Mme	RICHARD Amélie	Médecine Générale
M.	TESSIERES Frédéric	Médecine Générale
Mme	ROUGE Laure	Médecine Générale

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury,

- **Professeur Bertrand EVRARD**
  Pour l'honneur que vous me faites de présider ce jury, pour vos conseils avisés et pour l'intérêt porté à ce travail.

- **Docteur Benjamin BONNET**
  Je tiens à te remercier particulièrement pour le temps consacré à encadrer cette thèse, pour ton aide, ta disponibilité et ta bienveillance. Pour tout ce temps passé à analyser cette énorme base de données en étant toujours de bonne humeur. J'ai beaucoup apprécié travailler en ta compagnie. Merci d'avoir toujours été là pour me soutenir et me conseiller.

- **Docteur Elodie MICHAUD**
  Pour le temps consacré à l'élaboration du questionnaire de recueil de données, pour toutes nos discussions et tes conseils qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse. Au-delà de ce travail, je te remercie pour m'avoir fait découvrir le domaine de l'allergie alimentaire et aidé à trouver ma voie. Merci pour ta disponibilité, pour les bons moments passés en ta compagnie et pour m'avoir soutenu dans les moments difficiles.

- **Docteur Jean Luc FAUQUERT**
  Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et pour l'intérêt porté à ce travail.

Je ne manquerai pas de remercie Marine GODIGNON dont le sujet de thèse a précédé le mien et m'a beaucoup aidé.

Je remercie Laura, Patsy, Louisa, Julie, avec qui j'ai partagé mes études et notamment ces années de thèse.

Un grand merci Justine, pour tout le soutien que tu m'as apporté. Merci pour tes relectures et corrections. Merci de m'avoir fait découvrir tata Sissy, pour ta bonne humeur, tes chansons, pour nos sorties et pour celles qui suivront.

Je remercie Camille, Aurélie, Charlotte, Brice et Nora mes chers co-internes d'allergologie.

Je remercie également mes amies ex-Tourangelles (Claire, Lucie, Gaiane) qui malgré la distance ont réussi à maintenir le lien d'amitié.

Mes derniers remerciements vont aux membres de ma famille, qui m'ont soutenu et surtout supporté dans tout ce que j'ai entrepris. Merci pour tout ce que vous faites pour moi, je vous serais éternellement reconnaissante.

Table des matières

Remerciements 11
Table des matières 12
Liste des abréviations 14
Listes des tableaux et figures 16
Introduction 18
1 Hypersensibilité allergique alimentaire : physiopathologie 18
2 Epidémiologie 19
3 Méthodes diagnostiques et problématique 20
3.1 Interrogatoire – Skin Prick Test – IgEs – allergènes moléculaires 20
3.1.1 Arachide 21
3.1.2 Noisette 21
3.1.3 Protéines de lait de vache 22
3.2 Test de provocation oral 22
3.3 Test d'activation des basophiles 26
Evaluation of the Basophil activation test as a tool for diagnosing allergy to peanut, hazelnut and cow's milk protein in pediatric population. 32
1 Introduction 33
2 Material and method 35
2.1 Study Population 35
2.2 Determination of allergen-specific IgE and Skin Prick Test 35
2.3 Oral food challenge 36
2.4 Basophil activation test 36
2.5 Statistical analysis 38
3 Results 38
3.1 Peanut 40
3.1.1 Patient characteristics 40
3.1.2 BAT is associated to the reactivity of patients during oral peanut challenge 40
3.1.3 Positive patients BAT and OFC analysis 44
3.1.4 Analysis of patients with discordant BAT and OFC 48
3.2 Hazelnut 53
3.2.1 Patient characteristics 53
3.2.2 BAT is associated to the reactivity of patients during oral hazelnut challenge 53
3.2.3 Positive patients BAT and OFC analysis 55

3.2.4 Patients analysis with discordant BAT and OFC 61
3.3 Cow's milk 63
3.3.1 Patient characteristics 63
3.3.2 BAT can predict the tolerance during OFC 63
3.3.3 Analysis of patients with discordant BAT and OFC 67
4 Discussion 69
Conclusion 74
Supplemental Table 78
Bibliographie 81
Serment d'Hippocrate : Conseil national de l'ordre des médecins 85
Serment d'Hippocrate 86

Liste des abréviations

Ara h (1, 2, 3, 6, 8, 9) = Arachis hypogaea n° (1, 2, 3, 6, 8, 9)

AUC = Aire sous la courbe (area under the curve)

Bet v 1 = Betula verrucosa n° 1

Bos d (4, 5, 8) = Bos domesticus n° (4, 5, 8)

CD = Cluster de Différenciation

CHU = Centre hospitalier universitaire

Cor a (1, 8, 9, 14) = Corylus avellana n° (1, 8, 9, 14)

CMPA = Cow's milk protein allergy

DBPCFC = Double-blind placebo-controlled food challenge

EC50 = Concentration d'allergène minimale entrainant la dégranulation de 50% des basophiles activés

ED50 = Effective dose for 50 percent of the group (dose efficace médiane)

EDTA = acide éthylène-diamine-tétra-acétique

f2 = extrait global de protéines de lait de vache

f13 = extrait global d'arachide

f17 = extrait global de noisette

FcεRI = récepteur de haute affinité aux IgE

FMLP = N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

g = gramme

hp = Hazelnut protein

Ig = Immunoglobuline

IgEs = Immunoglobuline de type E spécifique d'un allergène (en anglais sIgE)

J.-C = Jésus-Christ

kUA/L = kilo Unité Arbitraire par litre

LAB = Long-acting bronchodilator

LTP = Lipid Transfer Protein (protéine de transfert des lipides)

mg = milligramme

min = Minute

mL = Millilitre

ng = Nanogramme

pp = Peanut protein

PBS = tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)

PR-10 = Pathogenesis-Related protein-10

ROC = courbe ROC (receiver operating characteristic)

RPMI = Roswell Park Memorial Institute

SSC = Side Scatter

SPT = Skin Prick Test

TAB (BAT en anglais) = Test d'activation des basophiles

Th2 = (lymphocytes) T helper de type 2

TPO (OFC en anglais) = Test de provocation par voie oral (oral food challenge)

OIT = Oral Immunotherapy

VPP (PPV en anglais) = valeur prédictive positive (positive predictive value)

VPN (NPV en anglais) = valeur prédictive négative (negative predictive value)

Listes des tableaux et figures

Table

Table I: Echelle de grade clinique selon Astier pour évaluer les symptômes lors d'un test de provocation oral 25
Table II: Demographic and clinical features of the entire population studied according to allergens 39
Table III: Comparison of diagnostic parameters of peanut allergy according to the outcome of OFC 41
Table IV: Optimal cut-off values based on peanut OFC results. 43
Table V: Threshold values of BAT parameters computed with a maximal positive predictive value predicting reactive peanut OFC 43
Table VI : Comparison of two threshold dose groups in peanut allergy 45
Table VII: Optimal cut off points predicting low cumulative threshold dose, in peanut allergy 47
Table VIII: Threshold values of BAT parameters computed with a maximal positive predictive value discriminating peanut-allergic patients reacting to low dose of peanut protein 47
Table IX: Patient characteristics according to severity of peanut OFC reaction 49
Table X: Optimal cut off points predicting severity of peanut OFC reaction 49
Table XI: Analysis of Peanut allergic patients with discordant BAT+/ OFC- 52
Table XII: Comparison of diagnostic parameters of hazelnut allergy according to the outcome of OFC 54
Table XIII: Optimal cut-off values for the parameters of BAT, based on hazelnut OFC results 56
Table XIV: Comparison of two threshold dose groups 56
Table XV: Optimal cut off points predicting low cumulative threshold dose, in hazelnut allergy 58
Table XVI: Patient characteristics according to severity of oral hazelnut challenge reaction 60
Table XVII: Optimal cut off point predicting severity of OFC reaction in hazelnut allergy 62
Table XVIII: BAT threshold predicting severity of OFC reaction with maximal VPP in hazelnut allergy 62
Table XIX: Analysis of patient characteristics with discordant results 62
Table XX: Analysis in cow's milk protein allergy 64
Table XXI: Optimal cut off to predict tolerance to OFC in CMPA 66
Table XXII: Threshold of BAT parameters to predict tolerance with maximal NPV 66
Table XXIII: Analysis of CMPA BAT and OFC discordance 68

Supplemental Table I: Discordance analysis in function of BAT indication, in peanut allergy 79
Supplemental Table II: Comparison of two threshold dose groups in hazelnut allergy 80

Figures

Figure 1: Test d'activation des basophiles. 26
Figure 2: Représentation schématique du TAB 27
Figure 3: Réponse des basophiles à différentes concentration d'allergène. 29
Figure 4: Receiver operating characteristic curve of BAT parameters discriminating reactive peanut-allergic patient during OFC. 41
Figure 5: Peanut OFC-Threshold dose and BAT parameters are closely related in the OFC/BAT-positive group. 43
Figure 6: Receiver operating characteristic curve of BAT parameters discriminating peanut-allergic patients reacting to low or high cumulative dose of peanut proteins. 45
Figure 7: Peanut BAT parameters were correlated to the clinical grade based on the Astier scale. 47
Figure 8: Analysis of BAT parameters in discordant patient 51
Figure 9: Receiver operating characteristic curve analysis showing that BAT is associated to the reactivity of patients during OFC. 54
Figure 10: Hazelnut OFC-Threshold dose and BAT CDmax and AUC were closely related in the OFC/BAT-positive group. 56
Figure 11: Receiver operating characteristic curve of BAT parameters discriminating hazelnut-allergic patients reacting to low or high cumulative dose of hazelnut proteins. 58
Figure 12: Hazelnut BAT parameters were correlated to the clinical grade based on the Astier scale. 58
Figure 13: Receiver operating characteristic curve representative of predictive marker of severity of hazelnut challenge reaction 60
Figure 14: Receiver operating characteristic curve of BAT parameters discriminating tolerant patient to cow's milk protein during OFC. 66

Introduction

1 Hypersensibilité allergique alimentaire : physiopathologie

L'allergie alimentaire est définie comme une réaction anormale du système immunitaire après exposition à une protéine alimentaire non pathogène. C'est le manque de tolérance immunologique aux allergènes alimentaires qui conduit à ces allergies (1). Il existe deux types d'allergies alimentaires définies par leur mécanisme immunologique : l'hypersensibilité immédiate ou l'hypersensibilité retardée. Dans cette étude, nous allons nous concentrer sur les hypersensibilités immédiates.

L'hypersensibilité de type 1, ou encore hypersensibilité immédiate, selon la classification de Gell et Coombs est caractérisée par une déviation des réponses immunitaires vers une réponse de type T helper de type 2 (Th2), responsable de la synthèse d'Immunoglobuline (Ig) de type E (IgE) spécifiques (IgEs) de l'allergène en cause (1). Ces IgE sont capables de se fixer sur les mastocytes tissulaires et sur les basophiles du sang circulant via le récepteur de haute affinité FcεRI. Il s'agit là de la première phase de l'allergie IgE-dépendante. La seconde phase, ou phase de déclenchement, correspond à la reconnaissance de l'allergène par ces IgEs préalablement fixées sur les basophiles, induisant leur dégranulation et provoquant les aspects cliniques de l'allergie (contraction des muscles lisses, augmentation de la perméabilité vasculaire et vasodilatation) (2). Les causes de cette immunodéviation Th2 sont multifactorielles et polygéniques et seraient en partie liées à une altération du microbiote digestif (3). Il est maintenant bien décrit que l'ingestion, l'inhalation ou le simple contact avec l'allergène peut induire des symptômes plus ou moins sévères chez des patients préalablement sensibilisés (4). En général ils sont immédiats ou apparaissent en moins de 4 heures.

2 Epidémiologie

Les découvertes dans le domaine de l'allergologie alimentaires n'ont cessé de croître depuis les premiers écrits des empereurs chinois Shen Nong (~ 2735 avant J.-C) et Huang Di (2698-2598 avant J.-C) (5,6). Il s'agit d'un véritable problème de santé publique touchant 10 % de la population et dont la prévalence semble augmenter au cours du temps (7–9). Les aliments les plus souvent en cause sont l'arachide, les fruits à coques, les protéines de lait de vache, l'œuf de poule, les poissons, les crustacés, le blé et le soja.

En effet, l'allergie à l'arachide est la cause alimentaire la plus fréquente de réaction allergique sévère chez l'enfant. Elle affecterait entre 1 à 3 % des enfants et dure en général toute la vie (7,10) **.**

L'allergie à la noisette est l'allergie aux fruits à coque la plus courante en Europe, sa prévalence est d'environ 0.2 %. Elle est plus fréquente chez les enfants de moins de cinq ans (7,11,12). Il y a principalement deux formes d'allergie à la noisette : une peu sévère donnant des symptômes locaux, liée au pollen de bouleau et une forme responsable de réactions sévères.

L'allergie aux protéines de lait de vache fait, quant à elle, partie des allergies les plus fréquentes en début de vie, avec une prévalence estimée dans les pays développés entre 0.5 et 3 % à l'âge de 1 an, même si ces chiffres ont tendance à varier en fonction des études. Cette allergie disparait spontanément dans la majorité des cas (13).

C'est pour l'ensemble de ces considérations épidémiologiques, mais aussi, car il s'agit d'une problématique diagnostique, que nous avons choisi d'orienter ce travail sur les allergies à l'arachide, à la noisette et aux protéines de lait de vache.

3 Méthodes diagnostiques et problématique

3.1 Interrogatoire – Skin Prick Test – IgEs – allergènes moléculaires

Le diagnostic d'allergie alimentaire repose sur un faisceau d'arguments : tout d'abord l'histoire clinique du patient puis sur différents tests mettant en évidence la sensibilisation allergique en objectivant la présence d'IgE spécifiques de l'allergène suspecté (14). Lors d'un interrogatoire approfondi, il est recherché la présence d'un terrain atopique (asthme, eczéma, rhino-conjonctivite), l'historique clinique avec l'aliment suspect, le détail des symptômes et la présence de facteurs aggravants tels que l'activité physique, l'ingestion d'alcool ou un contexte infectieux. (9,15,16)

Au fil des années, des méthodes de diagnostic ont été développées pour confirmer la sensibilisation à un allergène alimentaire, telles que la réalisation de tests cutanés (Skin Prick Test - SPT) et la quantification des IgEs de l'allergène (6,15).

Le SPT consiste en l'introduction d'un allergène dans l'épiderme, avec une lancette, en utilisant des extraits (globaux fournis par un laboratoire ou natifs). Une papule ou une éruption cutanée indique une sensibilisation à l'allergène étudié. De nombreux auteurs rapportent que plus la taille de la papule du SPT ou le taux de IgEs est élevé, plus la probabilité de présenter des symptômes allergiques est grande (17).

En plus des tests cutanés, nous pouvons réaliser des explorations biologiques *« in vitro »* avec le dosage quantitatif des IgEs. Il nous est alors possible de doser les IgEs d'un extrait global par exemple f13 qui correspond à l'arachide, f17 à la noisette et f2 aux protéines de lait de vache. La recherche d'IgEs dirigées contre un extrait global ne permet pas de savoir contre quelle protéine le patient est sensibilisé. Depuis quelques années, le développement de l'allergologie moléculaire a permis de solutionner en partie ce problème. En effet, cela a permis l'analyse fine des allergènes, en isolant chaque protéine allergisante d'un extrait

global. Ainsi, un aliment contient plusieurs composants moléculaires allergéniques que l'on peut classer par familles en fonction de leur conformation (18–21). En fonction du profil de sensibilisation retrouvé chez le patient, l'allergologie moléculaire peut aider à expliquer les réactivités croisées entre les allergènes et à améliorer la précision du diagnostic.

3.1.1 Arachide

En ce qui concerne l'allergie à l'arachide, il est actuellement possible de doser les IgEs dirigées contre 6 protéines, disponibles dans le commerce : Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 8 et Ara h 9, qui peuvent aider à estimer la sévérité de l'allergie (10).

Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 et Ara h 6 sont des protéines de stockage des graines, qui ne sont pas détruites par la chaleur ou la digestion, entrainant donc des réactions plus sévères. Dans certaines études, les IgEs dirigées contre Ara h 2 sont considérées comme le marqueur le plus prédictif de l'allergie clinique (18). Ara h 8 est une protéine appartement à la famille des PR-10, détruite par la chaleur, et responsable de réactions moins sévères, par une sensibilisation croisée au pollen de bouleau par l'allergène moléculaire Bet v 1. Ara h 9 appartient à la famille des protéines de transfert des lipides (LTP Lipid Transfer Protein) donnant des réactions sévères, et est généralement associé à l'allergie à la pêche dans la région méditerranéenne (10).

3.1.2 Noisette

Les allergènes majeurs de la noisette sont les protéines de stockage des graines, Cor a 9 (globuline 11S) et Cor a 14 (albumine 2S), et les protéines à réactivité croisée, Cor a 8 (LTP) et Cor a 1 (PR-10). Dans la littérature, on peut retrouver que le dosage des anticorps dirigés contre l'extrait global de noisette a une faible valeur prédictive de la réactivité clinique en

raison de la réactivité croisée avec le pollen de bouleau (en effet l'extrait est enrichi en protéines Cor a 1), par contre Cor a 9 et 14 peuvent être utiles pour prédire la réactivité clinique à la noisette et notamment un risque de réaction plus sévère (19,20,22).

3.1.3 Protéines de lait de vache

Les allergènes majeurs du lait de vache sont la caséine (Bos d 8), la bêta-lactoglobuline (Bos d 5), et l'alpha-lactoglobuline (Bos d 4) (23).

La caséine est très résistante à la chaleur, tandis que la bêta-lactoglobuline et l'alpha-lactoglobuline sont plus facilement détruites par la chaleur et la digestion. La caséine sert de marqueur de sévérité et la persistance de sa positivité évoque le fait que l'allergie va perdurer dans le temps.

Il est important de comprendre que la présence d'IgEs indique une sensibilisation aux aliments suspects, mais pas nécessairement une allergie. En effet il peut y avoir une réactivité croisée entre différents allergènes. Lorsqu'il existe une discordance entre les signes cliniques présentés par le patient d'une part et les tests cutanés et biologiques d'autre part, il est possible de réaliser un test de provocation oral alimentaire (TPO – OFC en anglais) pour aider au diagnostic.

3.2 Test de provocation oral

Ce test est considéré comme la référence en matière de diagnostic des allergies alimentaires IgE-médiées et non IgE-médiées. Il est généralement réalisé selon différentes indications : pour établir un diagnostic, pour identifier le seuil de réactivité ou pour suivre l'évolution d'une allergie alimentaire en cours d'induction de tolérance orale (24). En 2012, un

consensus a été publié sur la standardisation de ce test par l'American Academy of Allergy & Immunology et l'European Academy of Allergy and Clinical Immunology (25).

Le TPO peut être réalisé en ouvert, en simple aveugle ou en double aveugle. Dans le TPO ouvert, le médecin et le patient (et les membres de la famille) savent quel est l'aliment testé. C'est le test le plus simple et le plus fréquemment utilisé. Il y a cependant un biais, car le patient peut présenter des symptômes subjectifs à composante psychogène (24). Dans le TPO en simple aveugle, seul le médecin connaît la composition de l'aliment administré. Dans le test en double aveugle avec placebo (= Double-blind placebo-controlled food challenge (DBPCFC)), ni le médecin ni le patient ne savent à quoi correspond l'aliment à ingérer (placebo ou aliment suspect). Le DBPCFC est considéré comme le gold-standard pour le diagnostic des allergies alimentaires, cependant, il est peu utilisé en pratique courante compte tenu de la difficulté de réalisation, mais plutôt pour la recherche, ou pour confirmer un test ouvert ou en simple aveugle lorsqu'il est ambigu.

Le principe de ce test réside dans l'ingestion progressive de l'aliment concerné, en commençant par une faible dose jusqu'à une dose cumulée considérée comme la dose journalière typique ingérée par jour. Le médecin vient d'abord procéder à un interrogatoire reprenant les antécédents médicaux, l'histoire allergique, le régime d'éviction et la prise de traitement, à la recherche d'une contre-indication au test. Concernant le traitement, il s'agit principalement de vérifier l'absence de prise récente (<7 jours) de corticoïdes ou d'un antihistaminique. Il faut également tenir compte du fait que l'aspirine, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, l'alcool et les antiacides peuvent agir comme des facteurs qui augmentent la réactivité chez les patients sensibles (26). La prise de bêtabloquants est également recherchée, car ce médicament pourrait interférer avec les traitements nécessaires en cas de réaction au cours du test (24).

Un examen clinique est ensuite effectué. Si l'enfant présente des signes d'infection ou de décompensation d'une pathologie chronique ou une maladie atopique exacerbée, telle que l'asthme, la dermatite atopique, l'urticaire ou la rhinite allergique, le test est reporté (26). Un formulaire de consentement rempli par les parents ou le patient lui-même, si l'âge le permet, est collecté. Enfin, le patient est informé du déroulement du test et des risques éventuels.

Cependant, c'est un test contraignant nécessitant des ressources et du personnel médical formé, qui est également pourvoyeur d'anxiété pour le patient, ses proches et les soignants, et est potentiellement à risque de provoquer une réaction sévère, y compris l'anaphylaxie (15,26). De plus, son interprétation reste parfois délicate.

Différents schémas en termes de dosage, de temps d'administration et d'augmentation de dose peuvent être appliqués pour réaliser un TPO dans une allergie alimentaire IgE-médiée. Le modèle le plus souvent utilisé est celui proposé dans le consensus de 2012 (25). Il se compose de sept doses croissantes de nourriture avec augmentation progressive de la quantité de protéines : 3 – 10 – 30 – 100 – 300 – 1000 – 3000 mg. Cependant, les protocoles varient en fonction de l'histoire clinique du patient, l'augmentation des doses sera plus progressive dans le cas d'un patient avec un antécédent de réaction sévère. L'intervalle de temps entre les doses varie généralement de 15 à 30 minutes, selon le type de protocole utilisé dans les études (25).

Les patients peuvent généralement être libérés après une période d'observation d'au moins 2 heures, à condition qu'aucune réaction ne se produise. Si le patient présente des symptômes cliniques importants, une période allant jusqu'à 4 heures d'observation est nécessaire et s'il présente une réaction allergique systémique sévère, il doit être gardé en observation à l'hôpital pendant la nuit avec un traitement approprié.

Le grade clinique de la réaction est défini à partir de l'échelle d'Astier, de 0 à 5 (27), comme indiqué dans le tableau (Table 1).

Grades	Symptômes
0	Aucun symptôme
1	- Douleurs abdominales spontanément résolutives, - Rhino-conjonctivite, - Rash ou urticaire avec moins de 10 papules
2	Un organe touché : - Douleurs abdominales nécessitant un traitement, - Urticaire généralisée, - Angioedème sans atteinte laryngée, - Toux ou chute du débit expiratoire de pointe de 20 %
3	Deux organes touchés
4	Trois organes touchés ou crise asthme nécessitant un traitement ou œdème laryngé ou hypotension artérielle
5	Symptômes cardio-respiratoires nécessitant une hospitalisation en soins intensifs

Table I: Echelle de grade clinique selon Astier pour évaluer les symptômes lors d'un test de provocation oral

En cas de réaction, il est nécessaire d'arrêter rapidement la réaction et d'éviter la progression de sa sévérité. Le traitement par antihistaminiques, corticoïdes, et/ou salbutamol est généralement appliqué en présence de réactions systémiques locales ou légères à modérées. En cas de réaction systémique, l'administration intramusculaire d'adrénaline avec une dose de 0,01 mg/kg jusqu'à un maximum de 0,5 mg est effectuée (24,26).

Afin de tester les patients en toute sécurité, de nouvelles méthodes de diagnostic sont actuellement en cours de développement. Une technique a été mise en œuvre pour

reproduire *in vitro* la réaction d'hypersensibilité allergique se déroulant *in vivo*. Il s'agit du test d'activation des basophiles (TAB).

3.3 Test d'activation des basophiles

Le Test d'Activation des Basophiles (TAB) est un test fonctionnel qui reproduit les réactions d'hypersensibilité qui se produisent chez le patient allergique. Il se déroule *in vitro* à partir d'une simple prise de sang, ce qui efface les inconvénients du TPO. Le principe de ce test consiste à mettre en contact les cellules présentes dans le sang du patient avec l'allergène suspecté afin de provoquer, si l'individu est sensibilisé, une dégranulation des basophiles (Figure 1). Il doit être réalisé dans les 4 heures suivant le prélèvement sanguin pour maximiser la viabilité et la fonctionnalité des basophiles (28).

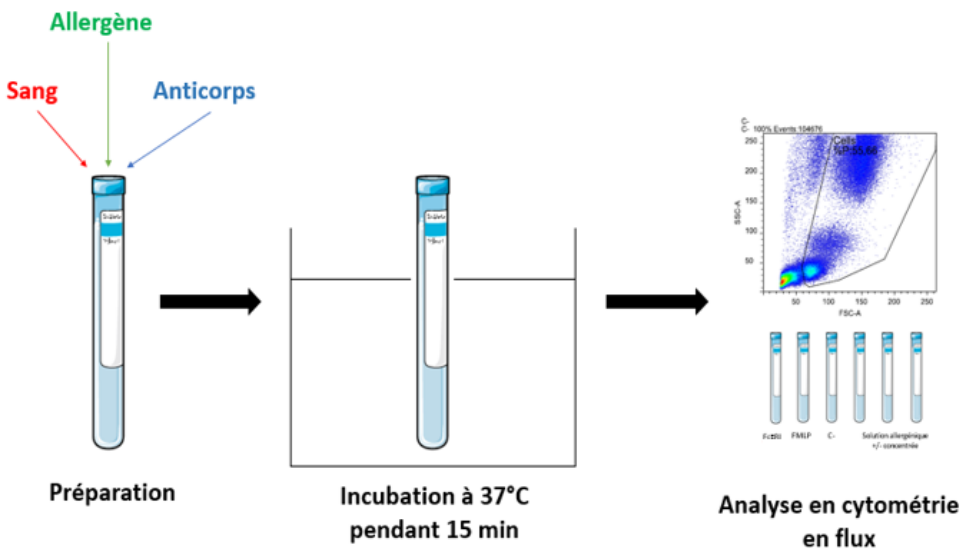

Figure 1: Test d'activation des basophiles.
Mise en contact des basophiles présents dans le sang total du patient avec un extrait allergènique et des anticorps anti-CD63 et anti-CD203c. Le mélange est incubé à 37°C pendant 15 min puis les cellules sont analysées par cytométrie en flux.

Si les basophiles portent à leur surface des IgEs dirigées contre l'allergène, ces dernières induisent un pontage de deux IgEs adjacentes, induisant un rapprochement des récepteurs FcεRI, déclenchant ainsi l'activation cellulaire. L'activation des basophiles induit la libération des médiateurs préformés (dont l'histamine) et un changement phénotypique avec une augmentation de l'expression à leur surface de nombreux marqueurs et notamment le CD63 et CD203c (Figure 2) (28–32).

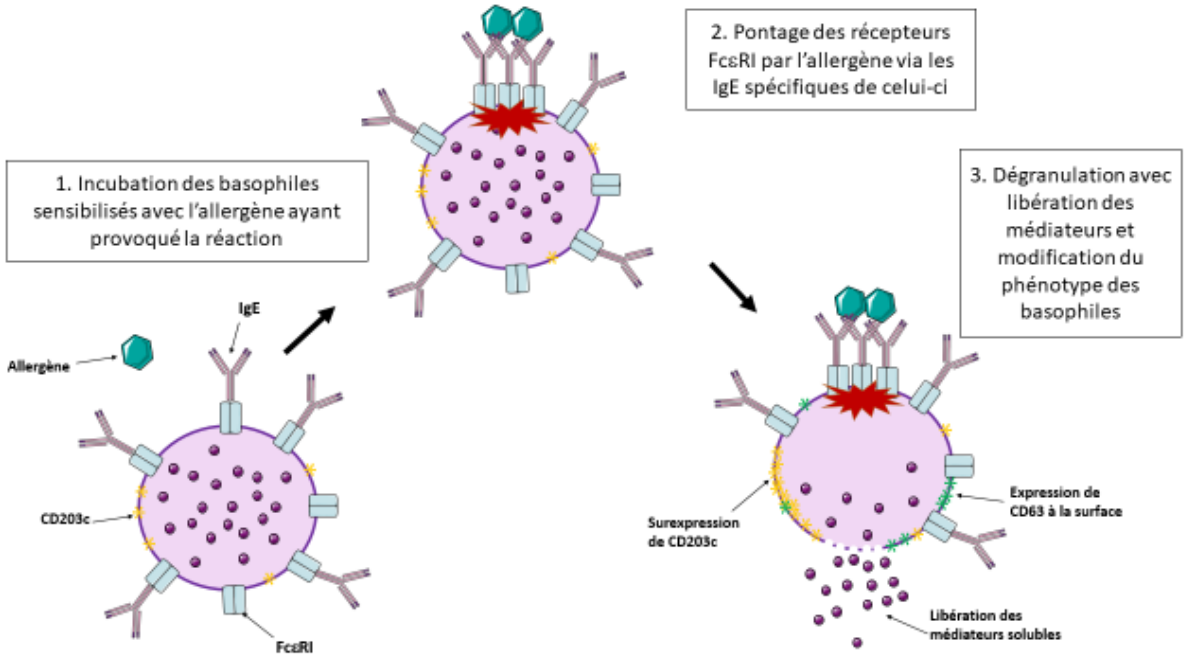

Figure 2: Représentation schématique du TAB
Les basophiles du patient sont incubés en présence de l'allergène. Ils présentent à leur surface une faible expression constitutive en CD203c (1). S'ils portent à leur surface des IgE spécifiques de cet allergène, celui-ci va provoquer un pontage des IgE ainsi que le rapprochement de leurs récepteurs : les FcεRI (2). Il s'en suit, la libération des médiateurs préformés, la surexpression de CD203c à la surface des basophiles et l'expression de CD63.

Cette augmentation d'expression est analysée par cytométrie en flux. Environ 500 basophiles sont comptés. Les cellules sont d'abord classées en fonction de leur taille et de leur granulosité puis en fonction de la fluorescence émise. Malheureusement les procédures de ce test ne sont actuellement pas standardisées.

En pratique, un témoin négatif et deux témoins positifs sont utilisés pour évaluer la dégranulation de base et vérifier la réactivité des basophiles. En effet, environ 5 à 10 % des individus ont des basophiles non répondeurs, avec une absence d'augmentation des marqueurs CD63 ou CD203c selon un mécanisme IgE-médié, en réponse à une stimulation allergénique, mais une activation par une autre voie non-IgE médiée est possible (28,33). Pour les témoins positifs sont utilisés : un anticorps anti-FcεRI, hautement spécifique qui se lie au récepteur de haute affinité reconnaissant l'IgE et FMLP ou N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, non spécifique et non médié par les IgE. Le témoin négatif, constitué d'un tampon de stimulation, représente le bruit de fond, sa valeur doit être inférieur à 5 % d'activation de basophiles. Si la valeur est supérieure, cela mettra en évidence une dégranulation non spécifique. Le témoin positif anti-FcεRI doit être supérieur à 15 % de basophiles activés, pour considérer le test comme fonctionnel (34,35) ; en deçà, il sera considéré comme ininterprétable.

Lors du TAB, plusieurs concentrations d'allergène sont testées, permettant d'obtenir une dose-réponse en fonction de la concentration d'allergène. En effet, chez les patients allergiques, l'activation des basophiles induite par l'allergène peut être représentée par une courbe en forme de cloche suivi d'un plateau (32,33) (Figure 3).

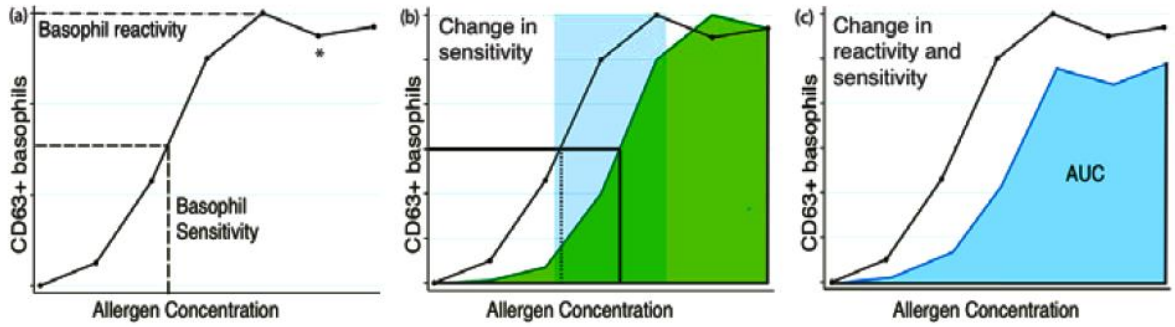

Figure 3: Réponse des basophiles à différentes concentration d'allergène.
(a) La réactivité des basophiles est la dose à partir de laquelle la réponse maximale se produit (CDmax). (b) La sensibilité des basophiles est la concentration d'allergène à laquelle la moitié de la réponse maximale se produit (EC50). (c) L'aire sous la courbe (AUC) dose-réponse correspond à la surface présente entre la courbe et l'axe des abscisses (concentration d'allergène). Cette valeur permet de mesurer la réponse des basophiles en combinant la réactivité et la sensibilité des basophiles D'après Hoffman et al (36).

La réactivité des basophiles peut-être déterminée, à partir de la courbe dose-réponse, en utilisant le pourcentage de basophiles activé selon CD63 (%CD63+ basophils, en anglais) ou en utilisant le CDmax qui est défini comme l'activation maximale et correspond à la proportion maximale de basophiles activés (CD63 ou CD203c) à n'importe quelle concentration d'allergène (28,32).

La sensibilité des basophiles peut-être exprimée à partir de l'EC50, correspondant à la concentration d'allergène minimale entrainant la dégranulation de 50 % des basophiles activés ou à partir du CDsens, obtenu en multipliant par 100 l'inverse de l'EC50.

(CDsens = 1 / EC50 * 100) (28,32,35–37). Plus la valeur du CDsens est élevée, plus la sensibilité des basophiles à l'allergène est élevée.

Un autre paramètre est également étudié, il s'agit de l'aire sous la courbe (AUC) dose-réponse qui correspond à la surface présente entre la courbe et l'axe des abscisses. Cette valeur permet de mesurer la réponse des basophiles en combinant la réactivité et la sensibilité des basophiles tout au long des dilutions (28,32,38).

De nombreuses études ont évalué l'utilité du TAB et sa place dans la stratégie diagnostique de l'allergie alimentaire. Différents aliments ont été testés, mais le plus largement étudié est l'arachide. Ces études ont montré que le TAB est une méthode plus précise pour différentier les patients allergiques des patients tolérants vis-à-vis d'un allergène, avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité (30,39–41). Santos *et al*. ont montré que par ses excellentes valeur prédictive positive (VPP = 95 %) et valeur prédictive négative (VPN = 98 %), le TAB est un outil plus fiable que le SPT ou le dosage des IgEs et permettrait de se dispenser de 66 % des TPO chez des enfants allergiques à l'arachide à partir d'une valeur seuil optimale qu'ils ont défini à partir du pourcentage de basophiles activés (CD63+) à la concentration d'allergène de 100 ng/mL (39).

Dans la littérature on peut également retrouver des études évaluant la capacité du TAB à prédire la sévérité de la réaction lors du TPO, avec la mise en évidence d'une corrélation entre les résultats des TAB, la dose réactogène et la sévérité de la réaction lors du TPO, dans l'allergie à l'arachide (42–45). De plus, Santos *et al.* ce sont également intéressés à l'utilisation du TAB dans la surveillance de l'évolution d'une acquisition de tolérance lors d'une induction de tolérance oral (32) et ont montré son utilité dans cette indication.

Par ailleurs, dans la littérature, des résultats similaires ont été obtenus dans le cadre de l'allergie à la noisette montrant que le TAB est un outil utile pour déterminer le statut allergique d'un patient (46–48). Brandström *et al.* ont montré que le CDsens est un bon marqueur pour améliorer la précision du diagnostic d'allergie à la noisette (48). On peut également lire que le TAB est un outil plus performant dans le diagnostic comparativement au dosages des IgEs dans l'allergie à l'arachide et à la noisette (46,47).

En ce qui concerne l'allergie aux protéines de lait de vache, des études ont mis en avant que le TAB pourrait être un outil précieux, associé aux SPT et au dosage des IgEs, pour

déterminer la nécessité de réaliser un TPO (40,49,50) et il permettrait également de prédire la sévérité de l'allergie (49). De même que pour l'arachide, des études ce sont intéressées au suivi de l'évolution de l'acquisition de tolérance induite par une induction de tolérance oral aux protéines de lait de vache grâce à l'utilisation du TAB (51,52).

L'ensemble de ces études montre que la puissance du TAB, comme outil diagnostique, est déjà reconnue. Néanmoins la définition des seuils des différents paramètres du TAB : CDmax, CDsens et AUC, utilisables en routine hospitalière afin d'éviter des TPO, a quant à elle moins été étudiée.

L'objectif initial de cette étude est de déterminer la place du TAB vis-à-vis des autres outils diagnostiques de l'allergie alimentaire en comparant ses différents marqueurs à l'issue du TPO réalisé le même jour. Puis de définir les seuils réactogènes les plus optimaux du TAB afin de prédire le résultat du TPO. Enfin d'évaluer la capacité du TAB à prédire la dose réactogène ainsi que la sévérité des réactions potentielles dans l'allergie à l'arachide et à la noisette et la capacité du TAB à prédire la tolérance dans l'allergie aux protéines de lait de vache.

Nous nous concentrerons initialement sur l'allergie à l'arachide afin de montrer que le TAB a la capacité de prédire l'issu du TPO. Puis plus finement nous déterminerons les seuils optimaux permettant de prédire la réactivité lors du TPO. Nous déterminerons ensuite s'il existe une association entre les paramètres du TAB et (1) la dose réactogène d'une part ou (2) la sévérité de la réaction lors du TPO d'autre part. Nous prendrons ensuite le temps d'étudier les discordances. Nous ferons de même pour l'allergie à la noisette. Enfin nous terminerons par l'étude du TAB dans l'allergie aux protéines de lait de vache en analysant conjointement les résultats des TAB et les dossiers cliniques des patients, puis nous déterminerons les meilleurs seuils permettant de prédire la tolérance lors du TPO.

Evaluation of the Basophil activation test as a tool for diagnosing allergy to peanut, hazelnut and cow's milk protein in pediatric population.

Raveau M.[1], Michaud E. [3,4], Fauquert J-L. [3,4], Evrard B.[1,2], Bonnet B.[1,2]

1. Service d'Immunologie, CHU Gabriel Montpied, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France
2. Université Clermont Auvergne, UFR Médecine, UMR 1019, UNH, Ecrein, Laboratoire d'Immunologie, 63000, Clermont-Ferrand, France
3. Unité d'allergologie de l'enfant, CHU Estaing, Pôle pédiatrique, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France
4. INSERM CIC 1405, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

Keywords: Basophil activation test, Oral food challenge, CDsens, AUC, CDmax, peanut whole extract, Ara h 2, hazelnut whole extract, cow's milk whole extract, CD63, CD203c.

Conflicts of Interest and Source of Funding: None to declare

Correspondence to: Bonnet Benjamin, Service d'Immunologie, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France, b_bonnet@chu-clermontferrand.fr

1 Introduction

Food allergy is defined as an abnormal reaction of the immune system after exposure to a non-pathogenic food protein. It is the lack of immunological tolerance to food allergens that leads to food allergies (1). It is an important public health concern that affects adults and children and may be increasing in prevalence (7–9).

The diagnosis is based on the questioning of the patient and the performance of prick skin test (SPT) and biological tests (dosage of specific immunoglobulin E (sIgE)) (14). However, diagnosis can be difficult then it is necessary to carry out an oral food challenge.

Double-blind placebo-controlled food challenge (DBPCFC) is the gold standard for diagnosis of IgE-mediated food allergy. It allows to define the severity and the reactogenic dose. The principle of this test lies in the gradual ingestion of the food concerned, starting with a low dose up to a cumulative dose considered to be the typical daily dose ingested per day. However, it takes resources and trained medical staff, and presents the risk of developing allergic reactions, including anaphylaxis (15).

In order to test patients safely, new diagnostic methods are currently under development. A technique has been implemented to reproduce *in vitro* the allergic hypersensitivity reaction taking place *in vivo*. This is the Basophil Activation Test (BAT).

The principle consists of bringing the cells present in the patient's blood into contact with the suspected allergen in order to cause, if the individual is sensitized, a degranulation of the basophils. Indeed, if basophils carry sIgE of the allergen on their surface, the latter induces a bridging of two adjacent sIgE, inducing a rapprochement of the FcεRI receptors, thus triggering cell activation. Activation of the basophils induces a phenotypic change with an increase in the expression on their surface of the CD63 and CD203c markers. This increase in expression is analyzed by flow cytometry.

Numerous studies have evaluated the utility of BAT and its place in the diagnosis strategy for food allergy. These studies have shown that BAT is a more accurate method of differentiating peanut allergic patients from tolerant patients, with good sensitivity and specificity (30,39–41).

In the literature, we can also find studies assessing the ability of BAT to predict the severity of the reaction during OFC, with the demonstration of a correlation between the results of BAT, the reactogenic dose and the severity of the reaction during OFC, in peanut allergy (42–45).

In addition, in the literature, similar results have been sought in the context of hazelnut and cow's milk protein allergy (CMPA) showing that the BAT is a useful tool in determining the allergic status of a patient (40,46–50).

However, definitions of BAT cut off easily available in daily clinical practice are still lacking.

The initial objective is to determine the place of BAT with other diagnostic tools for food allergy by comparing its different markers after OFC performed on the same day. Then, to define the most optimal reactogenic thresholds of the BAT in order to predict the result of the OFC. Finally, to evaluate the ability of the BAT to predict the severity of potential reactions as well as the reactogenic dose in peanut and hazelnut allergy and the ability of the BAT to predict tolerance in CMPA.

2 Material and method

2.1 Study Population

This was a retrospective study performed in patients in whom peanut allergy, hazelnut allergy or CMPA had been suspected. Subjects were recruited from February 2018 to October 2020 at the department of Pediatric, Clermont-Ferrand Hospital. We included all children who had been addressed for a peanut, hazelnut or cow's milk OFC for following reasons: to establish a definite diagnosis in the event of a clinical-biological discordance, to identify the threshold of reactivity in allergic patients or to follow the evolution of a food allergy in the course of induction of tolerance in patients with confirmed allergy.

All patients underwent clinical evaluation, SPT, sIgE to peanut, hazelnut or cow's milk and their components, tryptase and basophil activation test at the same day of OFC. Some sIgE values and SPT have been measured during a previous consultation.

2.2 Determination of allergen-specific IgE and Skin Prick Test

Quantifications of plasma tryptase, sIgE to food allergen (peanut, cow's milk and hazelnut), and their allergenic components were performed with ImmunoCAP (Phadia 250, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Specific IgE antibodies > 0.1 kUA/L were considered as positive.

SPT was performed using peanut extract and hazelnut extract (ALK-Abelló, Madrid, Spain) and native extract of cow's milk. Allergen (peanut, cow's milk and hazelnut) sensitization was defined by a wheal size of SPT of 3 mm or more.

2.3 Oral food challenge

OFC was carried out openly in a standardized way; doses gradually increase every 30 minutes from 100 mg to 20 g (28-5600 mg of peanut protein (pp) / 17-3400 mg of hazelnut protein (hp)) of peanut or hazelnut and from 1mL to 150 mL of cow's milk until the occurrence of clinical allergic reaction.

However, the protocols vary depending on the clinical history of the patient; the increase in doses will be more gradual in the case of a patient with a history of severe reaction.

An OFC was considered positive when the patient presented objective symptom defined by the Astier scale (27), from 0 to 5, with 0 for the absence of reactions and 5 for most severe symptoms.

For peanut and hazelnut allergy, the patients were stratified into 2 score severity groups for analysis: mild-to-moderate allergic reaction (grade 1 and 2) and severe allergic reaction (grade 3 and 4) during an OFC. Patients were also stratified into 2 cumulative threshold dose groups, based on the dose distribution that are predicted to elicit objective allergic symptoms in 50% of the allergic population (53–56) : low cumulative threshold dose group (i.e. < 1000 mg of peanut or 200 mg pp ; < 450 mg of hazelnut or 80.6 mg of hp) and a high cumulative threshold dose group of allergic reaction (i.e. > 1000 mg of peanut or 200 mg pp; > 450 of hazelnut or 80.6 mg of hp).

2.4 Basophil activation test

BAT were performed, the same day of the OFC, on whole blood using the Flow Cast® and B-CCR® kit (Bühlmann Laboratories, Switzerland) according to the supplier's instructions. 50 µl of EDTA whole blood was stimulated for 15 minutes at 37 °C with 50 µl of increasing concentrations of allergen extract and its major allergen (except for hazelnut). Six allergen's

concentrations had been tested in 10-fold series dilution ranging from 21 ng/mL to 2,1 pg/mL for peanut whole extract, hazelnut whole extract, cow's milk whole extract, casein (Bühlmann) and ranging from 4.5 ng/mL to 0.45 pg/mL for Ara h 2 (Bühlmann) .

Monoclonal antibody recognizing the high-affinity IgE binding receptor (FcεRI) and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) were used as positive controls. For the negative control, the allergen solution is replaced by the same volume of buffer alone.

Before erythrocyte lysis, cells were stained with CD63-FITC, CD203c-PEcy5.5 and CCR3-PE. Basophils were gated based on SSClow/CCR3+ window on the negative control, and activated basophils on CCR3/CD63+ window on the positive control. Cells were acquired on an LSR II (Becton Dickinson). At least 500 basophils were analyzed using Flowlogic software (version 7.3, Miltenyi Biotec, Germany). Dead cells and doublets cells were excluded by an FSC/SSC gate and an SSC-A/SSC-H gate, respectively. Basophils activation was expressed as the percentage of CD63 positive basophils (%CD63+) among SSClow/CCR3+ cells. The cut-off value for positive basophil activation in this study was set to >15% CD63 basophils (34,35). Patients with a basal activation of basophils > 5% in the negative control, were excluded.

The reactivity of the basophils was determined, from the dose-response curve, using the CDmax which is defined as the maximum activation and corresponds to the maximum proportion of activated basophils with the expression of CD63 at any concentration of allergen (28,32).

The sensitivity of basophils was studied by using the CDsens, obtained by multiplying by 100 the inverse of the EC50, corresponding to the minimum allergen concentration causing degranulation of 50% of the basophils (28,32,35,37).

Also, area under the dose-response curve (AUC), was studied. This value makes it possible to measure the response of the basophils by combining the reactivity and the sensitivity of the basophils throughout the dilutions (28,32,38).

2.5 Statistical analysis

Statistical analyses and graphical presentations were conducted with GraphPad Prism version 8.0 software (Graph-Pad Software). The population was expressed as numbers and percentages for categorical variables. For quantitative variables, the results were expressed in terms of median and interquartile range. Statistical analysis of continuous variables was performed with one-way Mann–Whitney U test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. The Receiver Operating Characteristics (ROC) curve analysis, done with pROC package using R (Version 3.3.2; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), was adopted to identify the optimal cut-off values of BAT CDmax, BAT CDsens and BAT AUC for prediction of a reactive OFC, threshold dose or severity of clinical reaction during OFC. The optimal cut-off points were determined by Youden's index. The relationship between the threshold dose or clinical grade of reaction and BAT parameters was performed for peanut and hazelnut with Pearson correlation.

3 Results

One hundred eighty-five patients were retrospectively recruited from February 2018 to October 2020 at the department of Pediatric, Clermont-Ferrand Hospital: 108 to peanut allergy, 27 to hazelnut allergy and 50 to CMPA.

	Peanut (n= 98)	Hazelnut (n= 26)	Cow's milk (n= 27)
Demographic			
Males – n (%)	64 (65.3)	16 (61.5)	18 (66.7)
Median Age (IQR) – Years	9 [6 – 13]	8 [6 – 10]	1 [1 – 2]
Allergy profil			
Monosensitization – n (%)	63 (64.3)	3 (11.5)	8 (29.6)
Tree nuts sensitization – n (%)	20 (20.4)	14 (55.8)	3 (11.1)
Almond – n (%)	4 (20.0)	2 (14.3)	0 (0.0)
Walnut – n (%)	11 (55.0)	6 (42.9)	0 (0.0)
Hazelnut – n (%)	9 (45.0)	-	1 (33.3)
Cashew – n (%)	14 (70.0)	9 (64.3)	1 (33.3)
Pistachio – n (%)	13 (65.0)	10 (71.4)	1 (33.3)
Pecan nut – n (%)	8 (40.0)	8 (57.1)	0 (0.0)
Legumes sensitization – n (%)	12 (12.2)	7 (26.9)	3 (11.1)
Peanut – n (%)	-	5 (71.4)	3 (100.0)
Lentil – n (%)	8 (66.7)	2 (28.6)	0 (0.0)
Soybean – n (%)	5 (41.7)	2 (28.6)	0 (0.0)
Chickpeas – n (%)	0 (0.0)	1 (14.3)	0 (0.0)
Peas – n (%)	6 (50.0)	1 (14.3)	0 (0.0)
Beans – n (%)	1 (8.30)	2 (28.6)	0 (0.0)
Lupine – n (%)	2 (16.7)	2 (28.6)	0 (0.0)
Other sensitizations – n (%)	20 (20.4)*	5 (19.2)**	19 (70.4)***
Anaphylaxis – n (%)	16 (16.3)	2 (7.8)	1 (3.7)
Grade of the princeps reaction – n (%)			
0 – n (%)	21 (21.4)	12 (46.2)	5 (18.5)
1 – n (%)	47 (48.0)	11 (42.3)	12 (44.4)
2 – n (%)	14 (14.3)	1 (3.8)	9 (33.3)
3 – n (%)	13 (13.30)	0 (0.0)	0 (0.0)
4 – n (%)	3 (3.1)	2 (7.7)	1 (3.7)
Medical History			
Asthma – n (%)	52 (53.0)	9 (34.6)	5 (18.5)
Treatment			
Inhaled corticosteroids – n (%)	12 (23.1)	2 (22.2)	1 (3.7)
Inhaled corticosteroids + LAB – n (%)	9 (17.3)	2 (22.2)	0 (0.0)
Anti-leukotrienes – n (%)	11 (21.2)	3 (33.3)	1 (3.7)
Omalizumab – n (%)	1 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Rhino conjunctivitis – n (%)	53 (54.1)	14 (53.8)	4 (14.8)
Pneumallergen			
Mites – n (%)	5 (9.4)	2 (14.3)	0 (0.0)
Pollens – n (%)	47 (88.7)	11 (78.6)	4 (100.0)
Animal dander – n (%)	10 (18.9)	2 (14.3)	1 (25.5)
Eczema – n (%)	58 (59.2)	12 (46.2)	20 (74.1)
Number of OFC/BAT			
1 – n (%)	91 (92.9)	26 (100)	27 (100.0)
2 – n (%)	6 (6.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
3 – n (%)	1 (1.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
Indication			
Diagnosis – n (%)	23 (23.5)	14 (53.8)	18 (66.7)
Threshold – n (%)	63 (64.3)	11 (42.3)	7 (25.9)
Tolerance induction – n (%)	12 (12.2)	1 (3.8)	2 (7.4)

Table II: Demographic and clinical features of the entire population studied according to allergens

LAB: long-acting bronchodilator; OFC: oral food challenge; BAT: basophils activation test

* Egg, kiwi, raw apple, banana, apricot, avocado, sesame, carrot, shrimp, mustard, goat's milk, salmon, pineapple, mango

** Egg, lychee, *sesame, mustard, raw fruits, passion fruit, chestnut*

**** Goat's milk, sheep's milk, egg, lamb, kiwi, spinach, beef, veal, fish, wheat, mustard*

3.1 Peanut

3.1.1 Patient characteristics

During the study period, 108 patients with peanut OFC and available BAT were considered for inclusion. The demographic and biological characteristics of these patients are presented in Table 2. Of these, 8 patients with an uninterpretable BAT, one with an uninterpretable OFC (refusal by the child to ingest the dose of peanut) and one patient with a BAT to an allergen other than the culprit allergen were excluded.

In the remaining 98 children with an OFC and BAT, 64 were boys. The median age was 9 (IQR 6-13) years old. Sixty four percent of these patients were monosensitized to peanuts, 20.4% were sensitized to nuts, 12.2% to other legumes and 20.4% to other foods like egg, kiwi, raw apple, banana, apricot, avocado, sesame, carrot, shrimp, mustard, goat's milk, salmon, pineapple, mango. Among them, 16.3% presented anaphylaxis during the princeps reaction, and the vast majority of patients presented low-grade reactions, according to the Astier scale. The majority of patients were atopic.

3.1.2 BAT is associated to the reactivity of patients during oral peanut challenge

To investigate the ability of BAT to appreciate the reactivity of patients during OFC, we performed analysis on OFC positive patients (n= 63) compared to OFC negative patients (n= 35). The 63 patients with positive OFC had significantly higher clinical-biological markers than the 35 patients with negative OFC (peanut SPT ($p < 0.0196$), f13-sIgE ($p < 0.0001$), Ara h 1-sIgE ($p = 0.0048$), Ara h 2-sIgE ($p < 0.0001$), Ara h 3-sIgE ($p = 0.0299$) and Ara h 6-sIgE ($p = 0.0003$), and the final tryptase ($p = 0.0033$)). There was no significant difference for

	Peanut (n= 98)		
Allergy tests	OFC + (n= 63)	OFC – (n= 35)	p
Skin Prick Test			
Median Histamine (IQR) - mm	6 [4.5 – 7.5]	6.5 [5.3 – 10.0]	**<0.0196**
Median Peanut (IQR) - mm	10 [7.0 – 13.0]	3 [0.0 – 6.0]	**<0.0001**
sIgE			
Median Peanut f13 (IQR) – kUA/L	25.7 [4.7 – 78.2]	1.1 [0.3 – 5.1]	**<0.0001**
Median Ara h 1 (IQR) – kUA/L	5.2 [0.1 – 36.0]	0.1 [0.1 – 0.4]	**0.0048**
Median Ara h 2 (IQR) – kUA/L	12.7 [2.1 – 47.5]	0.3 [0.1 – 1.3]	**<0.0001**
Median Ara h 3 (IQR) – kUA/L	0.2 [0.1 – 4.9]	0.1 [0.1 – 0.3]	**0.0299**
Median Ara h 6 (IQR) – kUA/L	0.2 [0.1 – 4.9]	0.1 [0.1 – 0.2]	**0.0003**
Median Ara h 8 (IQR) – kUA/L	0.1 [0.1– 0.6]	0.1 [0.1 – 0.4]	0.3607
Median Ara h 9 (IQR) – kUA/L	0.1 [0.1 – 0.5]	0.1 [0.1 – 0.2]	0.0800
Tryptase			
Median Basal (IQR) – µg/L	3.3 [2.7 – 4.2]	3.3 [2.7 – 4.4]	0.3876
Median Final (IQR) – µg/L	4.9 [3.6 – 6.4]	3.5 [2.6 – 4.5]	**0.0033**
BAT			
BAT to peanut – CDmax (% CD63+ basophils)	84.8 [66.8 – 91.4]	6.0 [3.7 – 6.4]	**<0.0001**
BAT to peanut – AUC	1443.9 [820.7 – 1767.1]	101.2 [47.3 – 279.3]	**<0.0001**
BAT to peanut – CDsens	110.7 [22.5 – 642.2]	69.1 [11.4 – 1727.4]	0.4440
BAT to Ara h 2 – CDmax (% CD63+ basophils)	83.4 [46.1 – 91.4]	5.1 [3.4 – 22.9]	**<0.0001**
BAT to Ara h 2 – AUC	294.8 [163.4 – 357.9]	15.6 [9.2 – 55.0]	**<0.0001**
BAT to Ara h 2 – CDsens	1230.6 [361.3 – 3522.1]	423.6 [83.4 – 6307.6]	0.2896

Table III: Comparison of diagnostic parameters of peanut allergy according to the outcome of OFC

Basal tryptase was assayed before initiating OFC and final tryptase was assayed 1 hour after the reaction or at the end of the monitoring time.

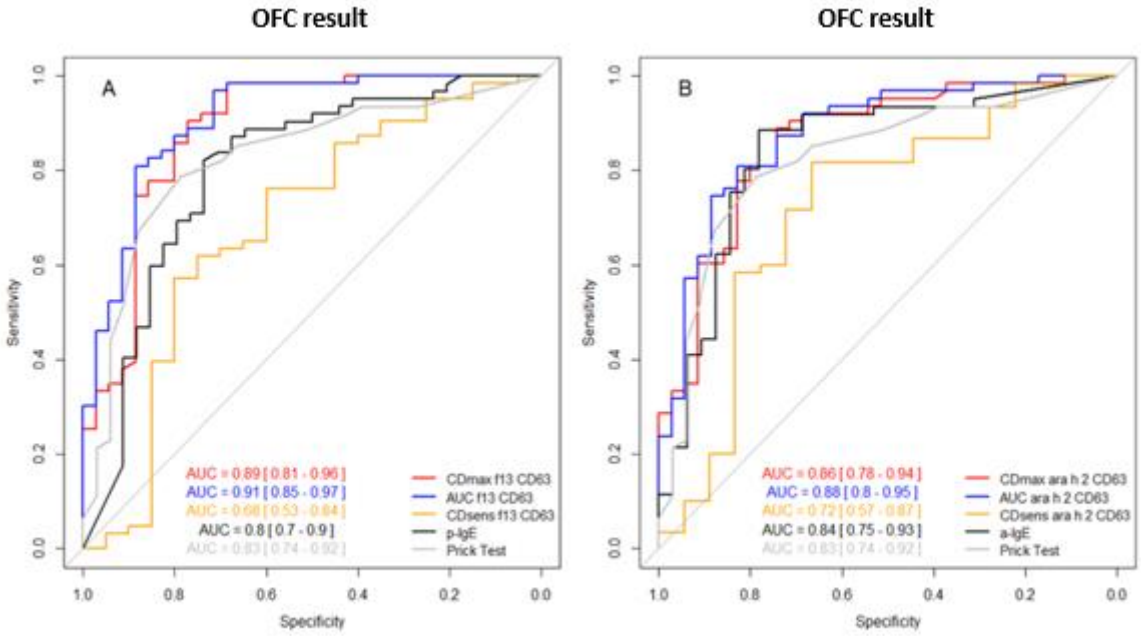

Figure 4: Receiver operating characteristic curve of BAT parameters discriminating reactive peanut-allergic patient during OFC.

p-IgE: peanut sIgE; a-IgE: Ara h 2 sIgE

f13-AUC (AUC = 0.91) and f13-CDmax (AUC = 0.89) are the most reliable markers for predicting the outcome of OFC, followed by Ara h 2-AUC (AUC = 0.88), Ara h 2-CDmax (AUC = 0.86).

Ara h 8-sIgE and Ara h 9-sIgE (Table 3).

For BAT parameters, f13-CDmax (%CD63+ basophils) and Ara h 2-CDmax, as well as f13- and Ara h 2-AUC were significantly higher in positive OFC group. Nevertheless, there was no significant difference according to f13- or Ara h 2-CDsens (Table 3).

The performance of BAT to predict patients reactivity during OFC was then computed by ROC curve analysis for peanut whole extract (Figure 4A) and its component Ara h 2 (Figure 4B) and compared to the performance of SPT and sIgE. CDmax and AUC for peanut whole extract as well as for Ara h 2 provided the best area under the ROC curve compared to sIgE or SPT (Figure 4A and 4B). The optimal cut-off point provided for these two parameters, according to Youden's method, were associated with an excellent positive predictive value (PPV) and a very good negative predictive value (NPV). Interestingly, optimal cut-off points for BAT CDmax (25.7%) and AUC (703.2) to peanut whole extract provided more accurate PPV and NPV compared to optimal cut-off points for BAT CDmax (17.3%) and AUC (86.4) to Ara h 2 (Table 4).

Nevertheless, in order to better define the place of the BAT in peanut allergy management in daily clinical practice, we determined thresholds for the three parameters of the BAT (CDmax, AUC and CDsens) making it possible to predict OFC results with a positive predictive value of 100%: respectively (Table 5). f13- or Ara h 2-CDmax and AUC reach a 100% PPV and could therefore be use in daily clinical practice as robust threshold to avoid predictable OFC.

Taken together, these data confirm the BAT is closely related to OFC results, and could represent therefore a valuable surrogate marker for children with peanut allergy.

Allergen	Allergy Tests	Optimal cut-off	Sp (%)	Se (%)	NPV (%)	PPV (%)
Peanut	BAT to peanut – CDmax (% CD63+ basophils)	25.7	77	91	82	88
	BAT to peanut – AUC	703.2	89	81	72	93
	BAT to peanut – CDsens	94.8	80	57	37	90
	SPT (mm)	6.5	79	79	67	87
	p-sIgE (kUA/L)	3.2	74	82	69	85
Ara h 2	BAT to Ara h 2 - CDmax (% CD63+ basophils)	17.3	74	89	79	86
	BAT to Ara h 2 – AUC	86.4	83	81	71	89
	BAT to Ara h 2 – CDsens	272.8	67	82	52	89
	Ara h 2 -sIgE (kUA/L)	1.3	78	89	78	89

Table IV: Optimal cut-off values based on peanut OFC results.

p-sIgE, peanut-sIgE; Sp, specificity; Se, sensitivity; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value

Allergen	Allergy Tests	Threshold	Sp (%)	Se (%)	NPV (%)	PPV (%)
Peanut	BAT to peanut (% CD63+ basophils) - CDmax	91.5	100	25.4	42.7	100
	BAT to peanut - AUC	1752.0	100	30.2	44.3	100
	BAT to peanut - CDsens	94.8	80	57.0	37.0	90
Ara h 2	BAT to Ara h 2 (% CD63+ basophils) - CDmax	90.5	100	28.5	43.8	100
	BAT to Ara h 2 - AUC	360.8	100	23.8	42.2	100
	BAT to Ara h 2 - CDsens	691.8	83.3	58.3	38	92

Table V: Threshold values of BAT parameters computed with a maximal positive predictive value predicting reactive peanut OFC

Sp, specificity; Se, sensitivity; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value

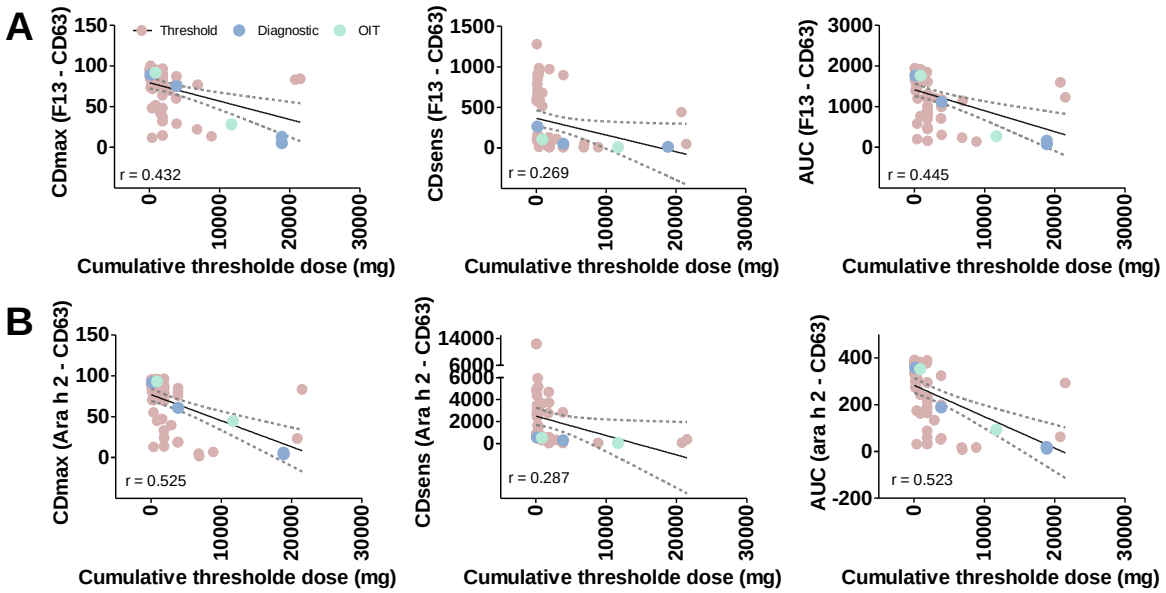

Figure 5: Peanut OFC-Threshold dose and BAT parameters are closely related in the OFC/BAT-positive group.

Patients were distinguished according to the BAT-indication (diagnosis, threshold and oral tolerance induction (OTI)). Strong linear correlation between the 3 parameters of BAT (CDmax, CDsens and AUC) for f13 (A) and Ara h 2 (B) and the cumulative threshold dose were observed.

3.1.3 Positive patients BAT and OFC analysis

3.1.3.1 Parameters associated with the cumulative threshold dose during OFC

We next wanted to study the relationship between the cumulative threshold dose and BAT parameters in the OFC/BAT-positive group (n= 63). Pearson correlation showed that CDmax and AUC were strongly associated with the threshold dose during OFC, whatever the stimulation condition (f13 or Ara h 2) ($r > 0.4$ for all, Figure 5). Interestingly, BAT using stimulation with Ara h 2 provided a stronger association with the threshold dose than BAT using f13 stimulation (Figure 5). CDsens (using f13 or Ara h 2 stimulation) was also associated to the threshold dose but in a lower extent ($r = 0.27$ and 0.29, respectively).

In order to determine the threshold values of the BAT, predictive of a relevant reactogenic dose in clinical practice, we stratified the patients into 2 cumulative threshold dose groups: low cumulative threshold dose group (i.e. < 1000 mg of peanut or 200 mg pp) and a high cumulative threshold dose group of allergic reaction (i.e. > 1000 mg of peanut or 200 mg pp) (Table 6).

The low cumulative threshold dose group presented higher peanut-sIgE (p-sIgE), Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 -sIgE levels than the high cumulative threshold dose group ($p = 0.0001$ for all parameters) (Table 6). For BAT markers associated with low threshold dose, higher f13- and Ara h 2-CDmax, AUC and CDsens were associated with highly allergic patients ($p < 0.0002$) (Table 6). The performance of BAT to predict threshold dose during OFC were then computed by ROC curve analysis for peanut whole extract (Figure 6A) and its component Ara h 2 (Figure 6B) and compared to the performance of SPT and sIgE. f13- and Ara h 2-CDmax and AUC, as well as p-sIgE and Ara h 2-sIgE, provided the best area under the ROC curve compared to SPT

Peanut with positive BAT/OFC (n= 63)	Threshold dose		
Allergy tests	**< 1000 mg n= 34**	**> 1000 mg n= 29**	**p**
Skin Prick Test			
Median Histamine (IQR) - mm	5.0 (4.0 – 7.0)	6.0 (5.0 – 10.0)	0,0572
Median Peanut (IQR) - mm	10.0 (7.0 – 15.0)	9.5 (7.0 – 13.0)	0,1728
sIgE			
Median Peanut f13 (IQR) – kUA/L	69.6 (52.7 – 100.0)	4.4 (1.9 – 9.9)	**0.0001**
Median Ara h 1 (IQR) – kUA/L	25.9 (6.0 – 52.9)	0.1 (0.1 – 0.7)	**0.0001**
Median Ara h 2 (IQR) – kUA/L	45.7 (17.0 – 66.1)	2.2 (1.2 – 4.9)	**0.0001**
Median Ara h 3 (IQR) – kUA/L	13.5 (0.3 – 17.2)	0.1 (0.1 – 0.2)	**0.0001**
Median Ara h 6 (IQR) – kUA/L	34.0 (11.1 – 41.3)	1.3 (1.2 – 2.7)	0,0116
Median Ara h 8 (IQR) – kUA/L	0.1 (0.1 – 0.1)	0.1 (0.1 – 1.5)	0,1637
Median Ara h 9 (IQR) – kUA/L	0.1 (0.1 – 0.1)	0.1 (0.1 – 0.1)	0,1171
Tryptase			
Median Basal (IQR) – µg/L	3.4 (2.7 – 4.2)	3.3 (2.7 – 3.8)	0,4615
Median Final (IQR) – µg/L	5.0 (3.8 – 6.5)	4.7 (3.6 – 6.4)	0,3356
BAT			
BAT to peanut (% CD63+ basophils) - CDmax	90.2 (85.2 – 93.0)	59.6 (32.1 – 82.7)	**0.0001**
BAT to peanut - AUC	1762.2 (1652.4 – 1819.0)	897.4 (453.4 – 1189.2)	**0.0001**
BAT to peanut - CDsens	581.3 (122.3 – 767.6)	20.2 (11.6 – 87.4)	**0.0001**
BAT to Ara h 2 (% CD63+ basophils) - CDmax	89.9 (82.8 – 92.3)	47.1 (19.0 – 80.0)	**0.0001**
BAT to Ara h 2 - AUC	348.9 (314.6 – 324.0)	164.9 (51.6 – 222.0)	**0.0001**
BAT to Ara h 2 - CDsens	2769.0 (823.5 – 4174.5)	340.4 (69.6 – 2254.6)	**0,0002**

Table VI : Comparison of two threshold dose groups in peanut allergy

Stratification of patients into 2 cumulative threshold dose groups: low cumulative threshold dose group (i.e. < 1000 mg of peanut or 200 mg pp) and a high cumulative threshold dose group of allergic reaction (i.e. > 1000 mg of peanut or 200 mg pp).

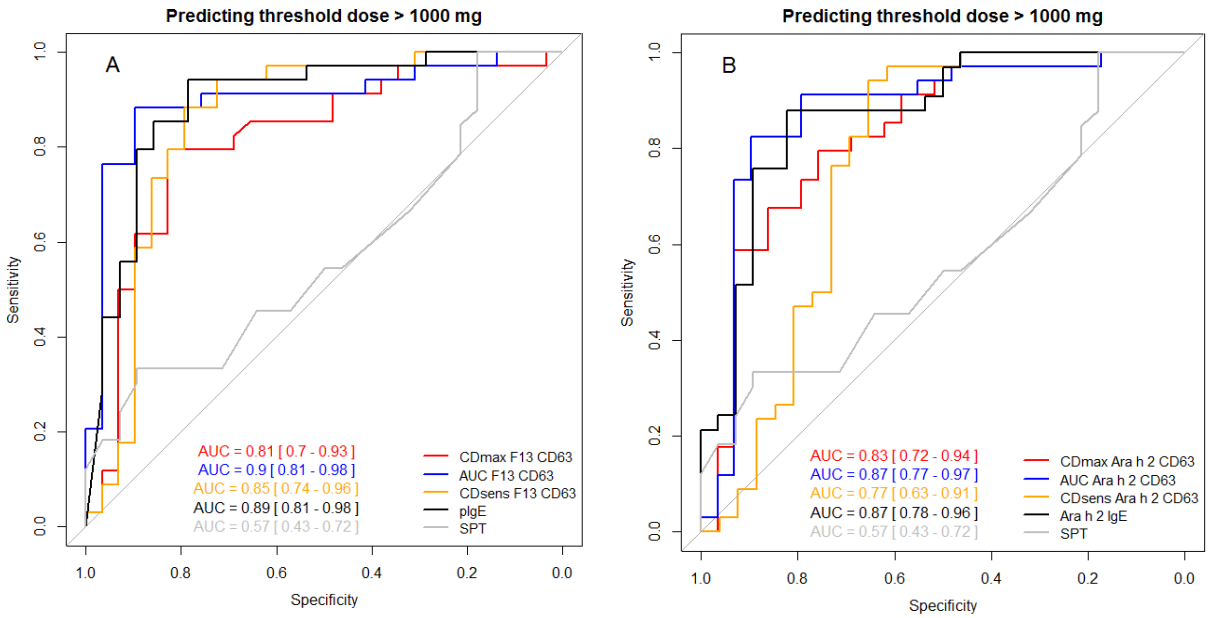

Figure 6: Receiver operating characteristic curve of BAT parameters discriminating peanut-allergic patients reacting to low or high cumulative dose of peanut proteins.

pIgE: peanut sIgE; SPT: skin prick test

Analysis performance of BAT computed by ROC curve analysis for peanut whole extract (A) and its component Ara h 2 (B) and compared to the performance of SPT and sIgE, to predict threshold dose during OFC. f13- and Ara h 2-CDmax and AUC, as well as p-sIgE and Ara h 2-sIgE, provided the best area under the ROC curve compared to SPT.

(Figure 6A and 6B). The optimal cut-off points provided for these two BAT parameters, according to Youden's method, were associated with an excellent positive predictive value and a very good negative predictive value. Interestingly, optimal cut-off points for BAT CDmax (84.5%) and AUC (1351.3) to peanut whole extract provided more accurate PPV and NPV compared to optimal cut-off points for BAT CDmax (80.2%) and AUC (296.8) to Ara h 2 (Table 7).

Again, we determined threshold values for the 3 parameters of the BAT (CDmax, AUC and CDsens) making it possible to predict reactogenic dose in OFC with a positive predictive value of 100% (Table 8), in order to help physicians in their daily clinical practice. Only BAT f13-AUC provided a 100% PPV with 1855.6 defined as threshold (Table 8) but BAT Ara h 2-AUC also provided a very high PPV of 93% with 324.6 defined as threshold (Table 8).

3.1.3.2 Parameters associated with the severity of the allergic reaction during OFC

We next aimed to correlate biological parameters, including BAT parameters, with the severity of allergic reactions, in the OFC/BAT-positive group (n= 63). Based on the Astier scale, patients were classified according to the severity of the allergic reaction triggered during OFC into 4 groups of severity from 1 (minor symptom) up to 5 (cardiorespiratory signs). CDmax and AUC after f13 and Ara h 2 stimulation were well associated to the severity of clinical signs presented during OFC (Figure 7).

Then, patients were stratified into 2 severity groups for analysis: mild-to-moderate allergic reaction (grade I and II) and severe allergic reaction (grade III and IV) during an OFC, in order to determine the threshold values of the BAT, predicting the severity. Surprisingly, the

Allergen	Allergy Tests	Optimal cut-off	Sp (%)	Se (%)	NPV (%)	PPV (%)
Peanut	BAT to peanut (% CD63+ basophils) - CDmax	84.5	82.8	79.4	77.4	84.4
	BAT to peanut - AUC	1351.3	89.7	88.2	86.7	90.9
	BAT to peanut - CDsens	94.5	79.3	88.2	85.2	83.3
	SPT (mm)	13.5	89.3	33.3	53.2	78.6
	p-sIgE (kUA/L)	11.1	78.6	94.1	91.7	84.2
Ara h 2	BAT to Ara h 2 (% CD63+ basophils) - CDmax	80.2	75.9	79.4	75.9	79.4
	BAT to Ara h 2 - AUC	296.8	89.7	82.4	81.3	90.3
	BAT to Ara h 2 - CDsens	509.3	65.4	94.1	89.5	78.0
	Ara h 2 -sIgE (kUA/L)	7.3	82.1	87.9	85.2	85.3

Table VII: Optimal cut off points predicting low cumulative threshold dose, in peanut allergy

Allergen	Allergy Tests	Threshold	Sp (%)	Se (%)	NPV (%)	PPV (%)
Peanut	BAT to peanut (% CD63+ basophils) - CDmax	90.5	93.1	50.0	61.4	89.5
	BAT to peanut - AUC	1855.6	100	20.6	51.8	100
	BAT to peanut - CDsens	133.0	86.2	73.5	73.5	86.2
Ara h 2	BAT to Ara h 2 (% CD63+ basophils) - CDmax	87.7	93.1	58.8	65.9	91
	BAT to Ara h 2 - AUC	324.6	93.1	75.5	75.0	92.6
	BAT to Ara h 2 - CDsens	768.8	73.1	76.5	70.4	78.8

Table VIII: Threshold values of BAT parameters computed with a maximal positive predictive value discriminating peanut-allergic patients reacting to low dose of peanut protein

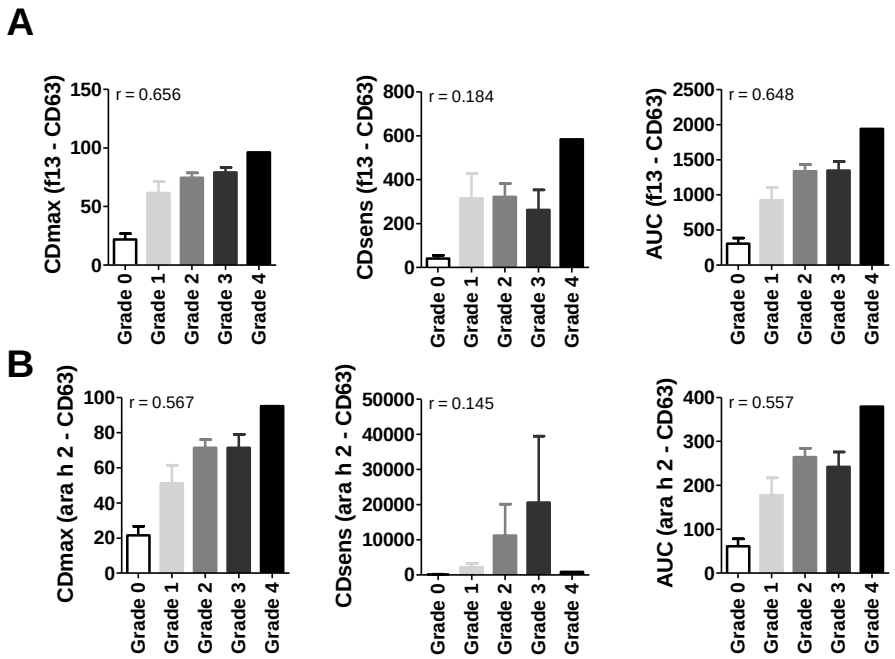

Figure 7: Peanut BAT parameters were correlated to the clinical grade based on the Astier scale.
Peanut BAT results are represented according to the clinical grade during OFC showing (A) f13 and (B) Ara h 2 CDmax, CDsens and AUC. Pearson correlations are shown. CDmax and AUC after f13 and Ara h 2 stimulation were well associated to the severity of clinical signs presented during OFC.

severe allergic reaction group presented no more sIgE than the mild-to-moderate allergic group (Table 9). Also, no difference was found in BAT parameters between the 2 groups. The performance of BAT to predict the severity of allergic reaction during OFC were then computed by ROC curve analysis for peanut whole extract and its component Ara h 2 (Table 10) and showed for all BAT parameters an AUC under the ROC curve below 0.6, suggesting that none of BAT parameters could predict the severity of allergic reaction (Table 10).

3.1.4 Analysis of patients with discordant BAT and OFC

In our cohort of peanut allergic patients with reliable OFC and BAT, all OFC positive patients demonstrated a positive BAT (n= 63), and no child with negative BAT reacted during the OFC. Nevertheless, 19 patients (19.4%) presented discordant OFC negative and BAT positive (OFC-/BAT+) results: 4 with an indication for the diagnosis, 6 with an indication to determine the threshold dose and 9 in patients undergoing peanut oral tolerance induction.

By comparing the different BAT parameters (CDmax, CDsens, AUC) for the global peanut extract (f13), as well as for the major allergen Ara h 2, in 63 patients with concordant OFC+/BAT+ results and 19 patients with OFC-/BAT+, we demonstrated, a marked decrease in BAT results in OFC-/BAT+ patients (Figure 8A and 8B and supplemental Table 1). These observations suggest very weakly positive BAT in discordant patients. We next re-analyzed data of those discordant patients OFC-/BAT+, and found that 9 patients had been classified as BAT-positive just because of a weakly positive BAT for CD203c, BAT using CD63 were negative. They could therefore be re-interpreted as being negative.

Peanut with positive BAT/OFC (n= 63)	Severity group		
Allergy tests	**Mild-to-moderate n= 49**	**Severe n= 14**	**p**
Skin Prick Test			
Median Histamine (IQR) - mm	6.0 [4.3 – 8.0]	5.0 [5.0 – 5.0]	0.0520
Median Peanut (IQR) - mm	11.5 [7.0 – 14.3]	8.0 [6.0 – 8.0]	**0.0211**
sIgE			
Median Peanut f13 (IQR) – kUA/L	28.9 [4.7– 79.3]	14.6 [6.6 – 69.9]	0.4131
Median Ara h 1 (IQR) – kUA/L	4.8 [0.1 – 35.0]	5.2 [0.4 – 44.7]	0.3646
Median Ara h 2 (IQR) – kUA/L	13.1 [2.1 – 54.7]	12.6 [2.3 – 46.8]	0.4859
Median Ara h 3 (IQR) – kUA/L	0.2 [0.1 – 5.0]	0.2 [0.1 – 4.9]	0.3591
Median Ara h 6 (IQR) – kUA/L	4.7 [1.2 – 26.2]	3.3 [2.5 – 17.6]	0.3729
Median Ara h 8 (IQR) – kUA/L	0.1 [0.1 – 0.1]	0.6 [0.1 – 2.9]	**0.0365**
Median Ara h 9 (IQR) – kUA/L	0.1 [0.1 – 0.1]	0.1 [0.1 – 0.6]	0.2312
Tryptase			
Median Basal (IQR) – µg/L	3.3 [2.7 – 4.4]	3.4 [2.5 – 3.7]	0.2729
Median Final (IQR) – µg/L	4.7 [3.6 – 5.8]	6.5 [4.4 – 7.2]	0.0638
BAT			
BAT to peanut (% CD63+ basophils) - CDmax	84.2 [60.0 – 91.7]	85.7 [76.7 – 89.7]	0.2927
BAT to peanut - AUC	1395.7 [767.3 – 1766.2]	1476.2 [1085.6 – 1797.1]	0.2360
BAT to peanut - CDsens	110.7 [20.2 – 690.9]	106.7 [50.9 – 566.6]	0.4181
BAT to Ara h 2 (% CD63+ basophils) - CDmax	82.3 [44.5 – 91.3]	84.6 [63.2 – 91.2]	0.2955
BAT to Ara h 2 - AUC	294.8 [133.1 – 357.0]	285.5 [189.5 – 358.6]	0.4311
BAT to Ara h 2 - CDsens	1314.2 [349.3 – 3657.6]	1193.2 [551.6 – 3121.0]	0.4965

Table IX: Patient characteristics according to severity of peanut OFC reaction

Allergen	Allergy Tests	Optimal cut-off point	AUC ROC curve	Sp (%)	Se (%)	NPV (%)	PPV (%)
Peanut	BAT to peanut (% CD63+ basophils) - CDmax	45.1	0.55	22.4	100	100	26.9
	BAT to peanut - AUC	531.0	0.56	20.4	100	100	26.4
	BAT to peanut - CDsens	684.9	0.52	26.5	92.9	92.9	26.5
	SPT (mm)	10.5	0.69	54.2	92.3	96.3	35.3
	p-sIgE (kUA/L)	16.1	0.52	60.4	57.1	82.9	29.6
Ara h 2	BAT to Ara h 2 (% CD63+ basophils) - CDmax	94.9	0.55	95.9	21.4	81.0	60.0
	BAT to Ara h 2 - AUC	304.9	0.48	49.0	64.3	82.8	26.5
	BAT to Ara h 2 - CDsens	4744.5	0.50	21.7	92.9	90.9	26.5
	Ara h 2 -sIgE (kUA/L)	3.5	0.50	68.8	46.2	82.5	28.6

Table X: Optimal cut off points predicting severity of peanut OFC reaction

If we analyze more precisely the data of the 10 remaining discordant patients (CDmax > 15%), we can highlight 2 different profiles (Table 11): on the one hand those for which the BAT was weakly positive with OFC interpreted as negative and those for which the BAT was positive with a negative OFC but whose result was concluded without having ingested the maximum dose of peanut (OFC stopped too early).

Indeed if we consider the doses > 17g as OFC having reached a sufficiently substantial dose, we can isolate 3 patients. Among these 3 patients, patient n° 1 has very weakly positive CDmax values (16.9% in f13 and 13% therefore negative in Ara h 2), whereas patients n° 2 and n° 14 have high CDmax values and one could assume that their reactivity threshold is very high. These 2 patients would require further exploration.

The other 7 patients had OFC indications for reactogenic threshold determination or assessment of their reactogenic threshold during oral immunotherapy (OIT), meaning that OFC protocols were adapted. The doses were therefore not increased (maximum dose = 13.5g).

Interestingly, we applied the optimal cut off values predicting the reactivity to OFC, defined previously (ie 25.7% for f13-CDmax, 703.2 for f13-AUC, 17.3% for Ara h 2-CDmax and 272.8 for Ara h 2-AUC). 2 patients (n ° 7 and 12) are below all of its thresholds. For the other 5 the CDmax are high, the patient n °11 is below the AUC threshold for the 2 allergens. Two patients (n° 5 and 15) are below a single threshold: Ara h 2-AUC. We can assume that these patients did not ingest enough peanuts to be able to conclude and are possibly false negative OFC. So in fact 63% of the discordant patients are not really. These observations reinforce the idea that BAT is a very sensitive and specific method of diagnosing food allergy to peanuts.

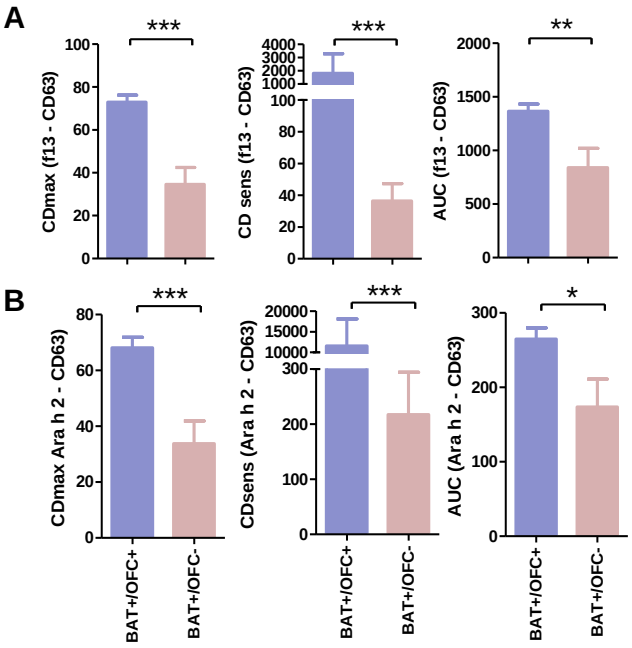

Figure 8: Analysis of BAT parameters in discordant patient

Comparison of BAT parameters (CDmax, CDsens, AUC) between patients with concordant and discordant data, for (A) the global peanut extract (f13), and for (B) the major allergen Ara h 2. 63 patients with concordant OFC+/BAT+ data and 19 patients with OFC-/BAT+ data were analyzed with one-way Mann–Whitney U test. Values of BAT+/OFC- were weaker than values of BAT+/OFC+.

Patient	OFC indication	Threshold dose (mg)	Cumulative threshold dose (mg)	f13				Ara h 2			
				sIgE	CDmax	AUC	CDsens	sIgE	CDmax	AUC	CDsens
1	Threshold	10000	18500	1	16,9	275,117128	69,07340994	1,2	13	39,47258199	265,8114472
2	OTI	5000	17000	1,08	54,6	551,267808	9,294019691	0,67	42,5	84,5481261	45,53818755
5	OTI	2000	6400	100	89,16	1372,196914	55,40051114	63,4	77,61	221,0722644	158,5110516
7	OTI	1500	4450	7,09	23,3	283,40312	11,99353035	0,18	7	23,010894	-
10	Threshold	2000	7500	56	87,5	1555,191768	80,09483228	26	87,4	343,871961	678,8156649
11	Threshold	3000	6880	1,02	66,1	697,300136	9,763672474	1,27	76,4	164,6919191	49,64894834
12	Threshold	2000	3880	0,19	15,35	156,6486792	9,393006027	0,49	1,58	4,49449689	-
13	OTI	3000	7200	37,3	91,2	1742,09932	94,6055173	19,3	90,3	359,1259398	640,7665788
14	OTI	7500	23000	3,01	55,5	598,453544	9,977643455	2,09	73,1	159,9178737	50,53691435
15	OTI	4000	13500	100	89,5	1151,907848	14,98534317	93,8	89,2	253,8719561	151,3075254
3	Threshold	5000	11870	1,31	4	74,4718	-	1,89	7,3	18,59651115	-
4	OTI	10000	29000	0,67	11,31	136,696508	11,69932729	0,31	16,03	43,13740317	85,18216384
6	Diagnosis	10000	18350	0,1	5,9	116,06712	-	0,1	5	17,11628625	-
8	Diagnosis	10000	18870	0,3	5,4	92,067976	-	0,23	3,9	15,15963885	-
9	OTI	10000	21750	5,69	10,4	137,004816	15,42089985	1,25	32,3	66,752943	47,27257285
16	OTI	10000	29500	0,24	7,2	101,194704	1419,138091	0,1	6,7	18,89883615	-
17	Threshold	10000	18850	1,31	11,06	130,7506512	10,81519535	0,26	5,05	18,49781559	-
18	Diagnosis	5000	8350	0,49	8,85	122,3418664	18,80888764	0,1	3,53	9,182729895	-
19	Diagnosis	10000	18850	1,88	2,5	34,966048	-	0,82	3,6	9,1192479	63,62257133

Table XI: Analysis of Peanut allergic patients with discordant BAT+/ OFC-

OTI, oral immunotherapy

Grey data correspond to patients CDmax-CD63 < 15%

3.2 Hazelnut

3.2.1 Patient characteristics

During the study period, twenty-seven patients with peanut OFC and available BAT were considered for inclusion. The demographic and biological characteristics of these patients are presented in Table 2. Of these, one was excluded because of an uninterpretable BAT.

In the remaining 26 children, 16 (61.5%) were boys. The median age was 8 (IQR 6-10) years old. Twelve percent of these patients were monosensitized to hazelnut, 55.8% were sensitized to other nuts. Among them, 7.8% presented anaphylaxis during the princeps reaction, the vast majority of patients presented low-grade reactions, according to the Astier scale, and were atopic.

3.2.2 BAT is associated to the reactivity of patients during oral hazelnut challenge

To investigate the ability of BAT to appreciate the reactivity of patient during OFC, we performed analysis on OFC positive patients (n= 18) compared to OFC negative patients (n= 8). Symptoms were mild to moderate (grade 1-2) in fifteen (83.3%) of the reacting children. Three (16.7%) had severe reaction (grade 3-4) (Table 2).

The 18 patients with positive OFC had significantly higher clinical-biological markers than the 8 patients with negative OFC (hazelnut SPT ($p < 0.0003$), Cor a 14 sIgE ($p < 0.0198$), and the final tryptase ($p = 0.0241$)). There was no significant difference for hazelnut whole extract f17, Cor a 1, Cor a 8, Cor a 9-sIgE (Table 12). For BAT parameters, f17-CDmax (%CD63+ basophils), AUC, as well as CDsens were significantly higher in positive OFC group (Table 12).

Allergy tests		Hazelnut (n= 26)		
		OFC + (n= 18)	OFC – (n= 8)	p
Skin Prick Test				
	Median Histamine (IQR) - mm	7.0 (5.0 – 10.0)	5.0 (5.0 – 6.0)	0.0859
	Median hazelnut (IQR) - mm	7.0 (5.0 – 8.0)	0.5 (0.0 – 3.0)	**0.0003**
sIgE				
	Median hazelnut f17 (IQR) – kUA/L	11.0 (1.1 – 21.5)	4.8 (0.1 – 43.2)	0.2419
	Median Cor a 1 (IQR) – kUA/L	0.1 (0.1 – 22.2)	0.1 (0.1 – 24.8)	0.4877
	Median Cor a 8 (IQR) – kUA/L	0.1 (0.1 – 0.1)	0.1 (0.1 – 0.2)	0.4349
	Median Cor a 9 (IQR) – kUA/L	0.3 (0.1 – 0.8)	0.3 (0.1 – 0.4)	0.2571
	Median Cor a 14 (IQR) – kUA/L	1.7 (0.5 – 2.6)	0.15 (0.1 – 0.6)	**0.0198**
Tryptase				
	Median Basal (IQR) – µg/L	4.1 (3.4 – 4.7)	3.2 (2.3 – 4.6)	0.0956
	Median Final (IQR) – µg/L	4.8 (4.3 – 6.1)	3.3 (2.5 – 4.5)	**0.0241**
BAT				
	BAT to f17 – CDmax (% CD63+ basophils)	78.1 (37.8 – 86.4)	4.8 (3.2 – 8.0)	**0.0006**
	BAT to f17 – AUC	1035.0 (481.5 – 1303.2)	87.2 (45.0 – 112.1)	**0.0012**
	BAT to f17 – CDsens	49.0 (14.7 – 92.4)	9.6 (9.5 – 9.7)	**0.0395**

Table XII: Comparison of diagnostic parameters of hazelnut allergy according to the outcome of OFC

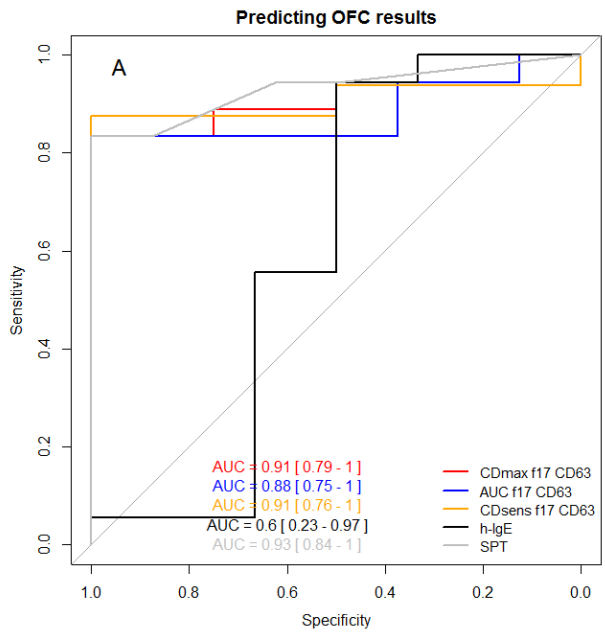

Figure 9: Receiver operating characteristic curve analysis showing that BAT is associated to the reactivity of patients during OFC.

h-sIgE: hazelnut sIgE; SPT: skin prick test

The most reliable diagnostic marker to predict the outcome of OFC were CDmax, CDsens and AUC of the BAT.

As for peanut, the performance of BAT to predict patient's reactivity during OFC was then computed by ROC curve analysis for hazelnut whole extract (Figure 9) and compared to the performance of SPT and sIgE. Hazelnut-CDmax, CDsens and AUC as well as SPT provided the best area under the ROC curve compared to hazelnut sIgE (Figure 9). The optimal cut-off point provided for these parameters, according to Youden's method, were associated with the maximal PPV (100%) and a very good NPV (72.7%), except for CDsens (50%) (Table 13). However, we will remain cautious about the interpretation of the results on the CDsens marker in front of the few interpretable data (2 values for negative OFC versus 16 for positive OFC) (Table 13).

Taken together, these data confirm the BAT is closely related to OFC results, and could represent therefore a valuable surrogate marker for children with hazelnut allergy.

3.2.3 Positive patients BAT and OFC analysis

3.2.3.1 Parameters associated with the cumulative threshold dose during OFC

We next wanted to study the relationship between the threshold dose and BAT parameters in the OFC/BAT-positive group (n= 26). Pearson correlation showed that CDmax and AUC were strongly associated with the threshold dose during OFC ($r > 0.4$, Figure 10), conversely to CDsens which showed no correlation (Figure 10).

More anecdotally, as for peanut, we wanted to determine if BAT parameters were able to discriminate hazelnut-allergic patients to low dose of hazelnut proteins. Initially, we stratified the patients into 2 cumulative threshold dose groups: low cumulative threshold dose group (i.e. < 450 mg of hazelnut or 80.6 mg hp) and a high cumulative threshold dose group

Allergen	Allergy Tests	Optimal cut-off	Sp (%)	Se (%)	NPV (%)	PPV
Hazelnut	BAT to hazelnut (% CD63+ basophils) - CDmax	27.7	100	83.3	72.7	100
	BAT to hazelnut - AUC	283.5	100	83.3	72.7	100
	BAT to hazelnut - CDsens	10.7	100	87.5	50	100
	SPT (mm)	4.5	100	83.3	72.7	100
	h-sIgE (kUA/L)	0.3	50	94.4	75	85

Table XIII: Optimal cut-off values for the parameters of BAT, based on hazelnut OFC results

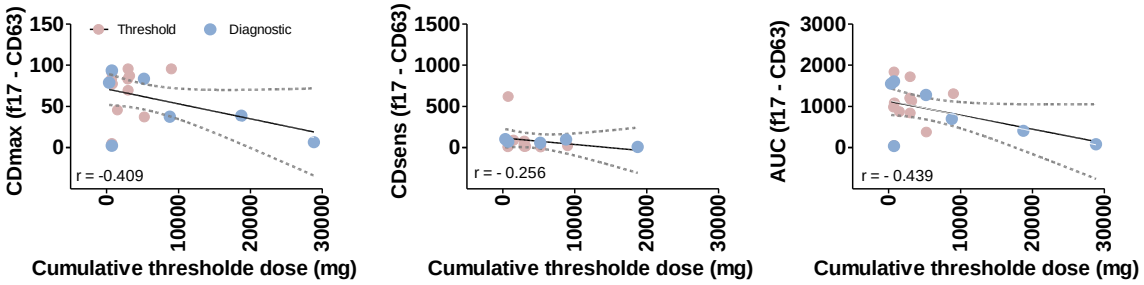

Figure 10: Hazelnut OFC-Threshold dose and BAT CDmax and AUC were closely related in the OFC/BAT-positive group.

Patients were distinguished according to the BAT-indication (diagnostic and threshold). Strong linear correlation with the cumulative threshold dose were observed for CDmax and AUC

Hazelnut with positive BAT/OFC (n= 18)	Threshold dose		
Allergy tests	< 1635 mg hp n= 16	> 1635 mg hp n= 2	p
Skin Prick Test			
Median Histamine (IQR) – mm	7.5 (5.8 – 10.0)	3.0 (3.0 – 3.0)	**0,0120**
Median hazelnut (IQR) - mm	7.0 (5.0 – 8.3)	6.5 (5.8 – 7.3)	0,4688
sIgE			
Median hazelnut f17 (IQR) – kUA/L	13.3 (1.7 – 23.3)	0.38 (0.25 – 0.50)	**0,0425**
Median Cor a 1 (IQR) – kUA/L	3.7 (0.1 – 25.6)	0.1 (0.1 – 0.1)	0,1690
Median Cor a 8 (IQR) – kUA/L	0.1 (0.1 – 0.2)	0.1 (0.1 – 0.1)	0,2471
Median Cor a 9 (IQR) – kUA/L	0.4 (0.1 – 1.1)	0.18 (0.14 – 0.21)	0,2483
Median Cor a 14 (IQR) – kUA/L	2.0 (0.6 – 5.6)	0.60 (0.33 – 0.78)	0,2028
Tryptase			
Median Basal (IQR) – µg/L	4.2 (3.4 – 4.9)	3.3 (2.8 – 3.7)	0,3030
Median Final (IQR) – µg/L	4.9 (4.4 – 6.2)	3.2 (2.8 – 3.6)	0,2389
BAT			
BAT to f17 (% CD63+ basophils) - CDmax	66.7 (43.6 – 88.2)	22.7 (14.7 – 30.8)	**0,0374**
BAT to f17 - AUC	1037.1 (806.0 – 1371.3)	245.6 (163.9 – 327.3)	**0,0321**
BAT to f17 - CDsens	48.9 (17.1 – 88.2)	328.4 (169.0 – 487.8)	0,0623

Table XIV: Comparison of two threshold dose groups

hp, hazelnut protein

Stratification of patients into 2 cumulative threshold dose groups: low cumulative threshold dose group (i.e. threshold = 1635 mg of hazelnut or 9000 mg hp).

of allergic reaction (i.e. > 450 mg of hazelnut or 80.6 mg hp) (supplemental Table 2). By analyzing ROC curve and due to a small effective, we showed that none optimal cutoff point were associated to a reliable PPV.

So, in a second step, we stratified the patients into 2 other cumulative threshold dose groups: low cumulative threshold dose group (i.e. < 9000 mg of hazelnut or 1635 mg hp) and a high cumulative threshold dose group of allergic reaction (i.e. > 9000 mg of hazelnut or 1635 mg pp) (Table 14). This threshold dose was defined from the literature (55,56) and corresponds to the dose at which patients are considered tolerant.

The low cumulative threshold dose group presented higher f17-sIgE levels than the high cumulative threshold dose group ($p = 0.0425$) (Table 14). For BAT markers associated with low threshold dose, higher CDmax and AUC were associated with highly allergic patients (Table 14). The performance of BAT to predict threshold dose during OFC were then computed by ROC curve analysis (Figure 11) and compared to the performance of SPT and sIgE. CDmax and AUC, as well as f17-sIgE provided the best area under the ROC curve compared to SPT (Figure 11). The optimal cut-off points provided for these two BAT parameters, according to Youden's method, were associated with a maximal PPV (100%) (Table 15).

3.2.3.2 Parameters associated with the severity of the allergic reaction during OFC

As for peanut, we next aimed to correlate biological parameters, including BAT parameters, with the severity of allergic reactions, in the OFC/BAT-positive group (n= 18). Based on the Astier scale, patients were, first, classified according to the severity of the allergic reaction triggered during OFC into 4 groups of severity from 1 (minor symptom) up to 5

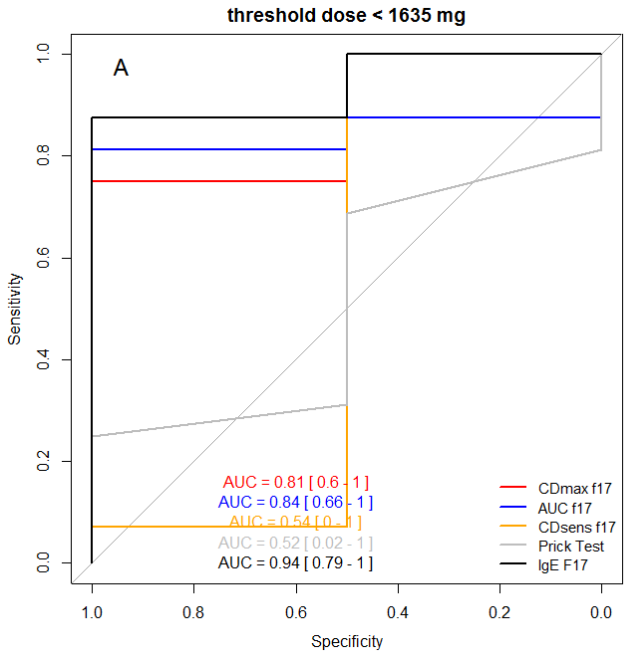

Figure 11: Receiver operating characteristic curve of BAT parameters discriminating hazelnut-allergic patients reacting to low or high cumulative dose of hazelnut proteins.
f17- CDmax, AUC, and sIgE provided the best area under the ROC curve compared to SPT and f17-CDsens.

Allergen	Allergy Tests	Optimal cut-off	Sp (%)	Se (%)	NPV(%)	PPV (%)
Hazelnut	BAT to hazelnut (% CD63+ basophils) - CDmax	42.2	100	75	33.3	100
	BAT to hazelnut - AUC	554.1	100	81.3	40	100
	BAT to hazelnut - CDsens	633.9	50	100	100	93.3
	SPT (mm)	8.5	100	25	14.3	100
	h-sIgE (kUA/L)	0.85	100	88	50	100

Table XV: Optimal cut off points predicting low cumulative threshold dose, in hazelnut allergy

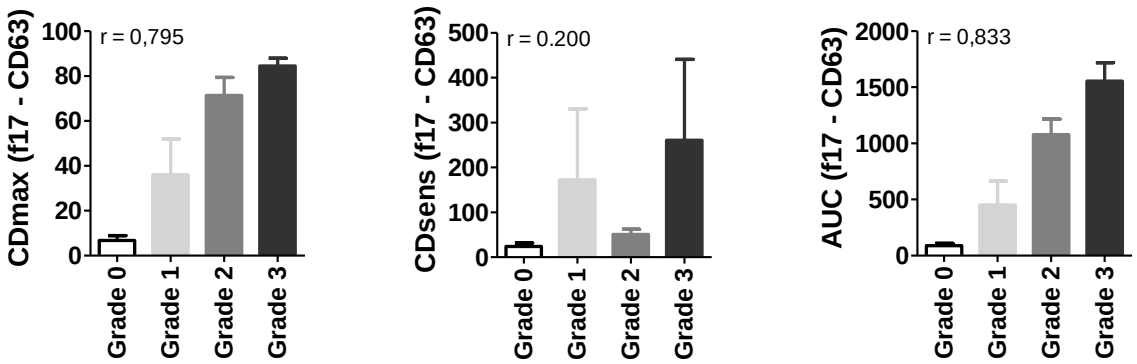

Figure 12: Hazelnut BAT parameters were correlated to the clinical grade based on the Astier scale.
Hazelnut BAT results are represented according to the clinical grade during OFC, with Pearson correlation.
f17- CDmax and AUC were well associated to the severity of clinical signs presented during OFC.

(cardiorespiratory signs). CDmax and AUC were strongly associated to the severity of clinical signs presented during OFC, conversely to CDsens (Figure 12).

Then, patients were stratified into 2 severity groups for analysis: mild-to-moderate allergic reaction (grade 1 and 2) and severe allergic reaction (grade 3 and 4) during an OFC, in order to determine the threshold values of the BAT, predicting the severity. The severe allergic reaction group presented no more sIgE than the mild-to-moderate allergic group (Table 16). f17-AUC and final tryptase were well associated to the severity of clinical signs presented during OFC. No difference was found in CDmax and CDsens between the 2 groups (Table 16).

The performance of BAT to predict the severity of allergic reaction during OFC were then computed by ROC curve analysis for hazelnut whole extract (figure 14) and showed that AUC and CDsens were the most reliable markers to predict the severity of allergic reaction of hazelnut.

The optimal cut-off points provided for all parameters, according to Youden's method, were associated with an excellent negative predictive value but a low PPV (Table 17). We therefore determined threshold values for the 3 parameters of the BAT (CDmax, AUC and CDsens) making it possible to predict reactogenic dose in OFC with a maximal PPV (Table 18), in order to help physicians in their daily clinical practice. Only BAT f17-AUC provided a 100% PPV with 1780.3 defined as threshold (Table 18), f17-CDsens provided only a 67% PPV. Only AUC could therefore be used in practice. Nevertheless, these data deserve to be verified on a larger cohort.

Hazelnut with positive BAT/OFC (n= 18)	Severity group		
Allergy tests	**Mild-to-moderate n= 15**	**Severe n= 3**	**p**
Skin Prick Test			
Median Histamine (IQR) - mm	6.5 (7.2 – 9.5)	8.0 (8.0 – 9.0)	0,1550
Median hazelnut (IQR) - mm	7.0 (5.0 – 7.5)	8.0 (4.0 – 9.0)	0,4288
sIgE			
Median hazelnut f17 (IQR) – kUA/L	9.7 (1.1 – 24.5)	12.2 (8.5 – 18.1)	0,4764
Median Cor a 1 (IQR) – kUA/L	0.1 (0.1 – 26.3)	0.1 (0.1 – 4.3)	0,2578
Median Cor a 8 (IQR) – kUA/L	0.1 (0.1 – 0.1)	0.2 (0.2 – 0.2)	0,1261
Median Cor a 9 (IQR) – kUA/L	0.3 (0.1 – 0.7)	0.6 (0.4 – 6.1)	0,1671
Median Cor a 14 (IQR) – kUA/L	1.6 (0.3 – 2.4)	14.1 (7.4 – 17.0)	0,1419
Tryptase			
Median Basal (IQR) – µg/L	4.1 (3.4 – 4.4)	5.3 (4.3 – 5.7)	0,2203
Median Final (IQR) – µg/L	4.8 (4.1 – 5.0)	6.2 (6.2 – 9.5)	**0,0218**
BAT			
BAT to f17 (% CD63+ basophils) - CDmax	69.6 (37.4 – 85.5)	83.5 (81.2 – 87.3)	0,1716
BAT to f17 - AUC	874.9 (393.8 – 1165.9)	1551 (1415.0 – 1695.0)	**0,0220**
BAT to f17 - CDsens	25.6 (12.2 – 81.3)	102.8 (80.9 – 361.8)	0,0532

Table XVI: Patient characteristics according to severity of oral hazelnut challenge reaction

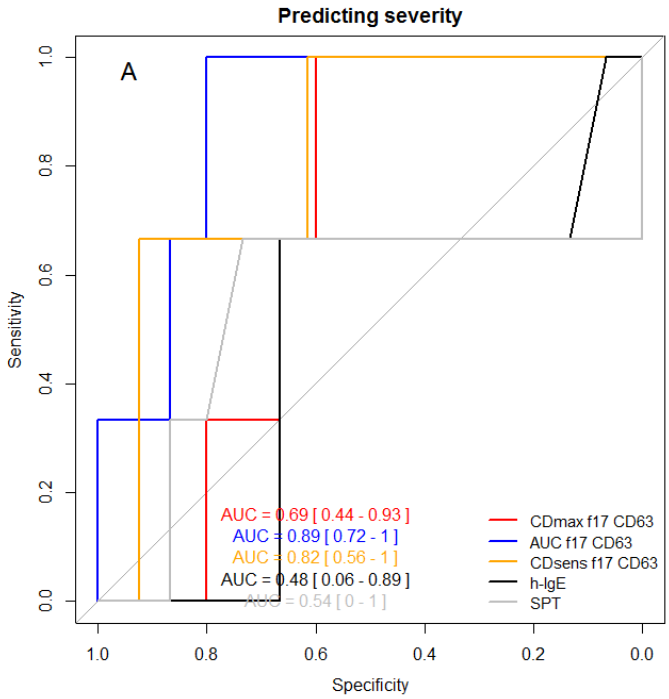

Figure 13: Receiver operating characteristic curve representative of predictive marker of severity of hazelnut challenge reaction

h-IgE: hazelnut sIgE; SPT: skin prick test

Analysis performance of BAT computed by ROC curve analysis for hazelnut whole extract compared to the performance of SPT and sIgE, predict reactivity during OFC. f17- AUC and CDsens provided the best area under the ROC curve compared to SPT and sIgE.

3.2.4 Patients analysis with discordant BAT and OFC

In the 26 children with an OFC and BAT, 24 (92.3%) presented concordant OFC and BAT results: 16 with a positive OFC and BAT, and 8 with a negative OFC and BAT. Two children presented a negative BAT and a positive OFC.

Among those 2 discordances (Table 19), the first patient was naive about hazelnut. He presented during the OFC, after ingestion of 400 mg of hazelnut (ie 750 mg in cumulative dose), a grade 1 reaction of the type of angioedema (eyelid edema). Interestingly, his SPT was 7 mm, his f17 sIgE at 1.07 kUA/L and Cor a 1, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 14-sIgE were negative (< 0.1). The second patient was monosensitized to hazelnut. He presented, after ingestion of the maximal dose (20000 mg of hazelnut) oral and ear rash. His SPT was 5 mm, his f17 sIgE at 0.12 kUA/L and Cor a 1, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 14-sIgE were negatives (< 0.1).

We can suppose that these patients presented no-specific cutaneous reaction: for the first patient a DBPCFC is necessary, to conclude. The second patient is probably not allergic to hazelnut.

Allergen	Allergy Tests	Optimal cut-off	Sp (%)	Se (%)	NPV(%)	PPV (%)
Hazelnut	BAT to hazelnut (% CD63+ basophils) - CDmax	78.1	60	100	100	33.3
	BAT to hazelnut - AUC	1239.8	80	100	100	50
	BAT to hazelnut - CDsens	48.9	61.5	100	100	38
	SPT (mm)	7.5	73.3	66.7	91.7	33.3
	h-sIgE (kUA/L)	15.5	66.7	66.7	90.9	28.6

Table XVII: Optimal cut off point predicting severity of OFC reaction in hazelnut allergy

Allergen	Allergy Tests	Threshold	Sp (%)	Se (%)	NPV (%)	PPV (%)
Hazelnut	BAT to hazelnut (% CD63+ basophils) - CDmax	78.1	60	100	100	33.3
	BAT to hazelnut - AUC	1780.3	100	33	88	100
	BAT to hazelnut - CDsens	100.4	92.3	67	92.3	66.7

Table XVIII: BAT threshold predicting severity of OFC reaction with maximal VPP in hazelnut allergy

Patient	OFC indication	Threshold dose (mg)	Cumulative threshold dose (mg)	f17			
				sIgE	CDmax	AUC	CDsens
Patient 1	Diagnosis	400	750	1.07	2.4	65,004368	-
Patient 2	Diagnosis	20000	28850	0.12	6.6	126,60336	647,1893491

Table XIX: Analysis of patient characteristics with discordant results

3.3 Cow's milk

3.3.1 Patient characteristics

Fifty patients with cow's milk OFC and available BAT were considered for inclusion. The demographic and biological characteristics of these patients are presented in Table 2. Of these, 23 were excluded because of an uninterpretable BAT: 17 for an activation of the basophils in the negative control and 6 because of the absence of degranulation of the basophils in the positive control (FcεRI mAbs). By carefully analyzing data, excluded patients were in more severe allergic conditions than included patient as shown by a higher SPT, tryptase and sIgE (Table 20), especially beta-lactoglobuline nBos d 5, which allows us hypothesize that a cross-reactivity of nBos d 5 and BAT buffer containing albumin, bringing answers that can explain uninterpretable BAT.

In the remaining 27 children with a reliable OFC and BAT, 18 were boys. The median age was 1 (IQR 1-2) years old. 70.4% of these patients were polysensitized especially to goat's milk and sheep's milk. Among them, 3.7% presented anaphylaxis during the princeps reaction, and 44.4% presented grade 1 during the princeps reaction, according to the Astier scale.

3.3.2 BAT can predict the tolerance during OFC

Unlike previous analyzes for peanut and hazelnut, rather than studying the ability of BAT to predict reactivity during OFC, we were interested in the ability of BAT to predict tolerance in CMPA.

Allergy Tests	Total Cow's Milk allergic patients			Cow's milk allergy with interpretable BAT		
	Uninterpretable BAT (n= 23)	Interpretable BAT (n= 27)	P	OFC+ (n= 4)	OFC- (n= 23)	p
Skin Prick test						
SPT (mm)	4.5 (2.0 – 10.8)	0 (0 – 6)	**0,0098**	2.0 (1.0 – 4.5)	0 (0 – 6.0)	0,4176
IgE						
f2-sIgE (KU/L)	15.0 (1.4 – 99.3)	0.8 (0.2 – 1.2)	**0,0004**	2.4 (1.2 – 7.6)	0.6 (0.2 – 1.1)	0,2609
f78-sIgE (KU/L)	4.9 (0.82 – 67.4)	0.1 (0.1 – 1.0)	**0,0002**	2.9 (1.5 – 8.1)	0.1 (0.1 – 0.7)	0,1117
Alpha-lactalbumine-sIgE (KU/L)	2.4 (0.3 – 15.9)	0.1 (0.1 – 0.5)	**0,0001**	1.5 (0.8 – 1.9)	0.1 (0.1 – 0.3)	0,0733
Beta-lactoglobuline-sIgE (KU/L)	2.1 (0.36 – 6.8)	0.3 (0.1 – 1.1)	**0,0037**	1.2 (0.7 – 2.0)	0.3 (0.1 – 0.7)	0,2118
tryptase						
Median Basal (IQR) – µg/L	3.8 (3.2 – 5.6)	3.9 (2.6 – 4.8)	0,2356	3.9 (3.2 – 5.1)	3.9 (2.7 – 4.7)	0,3935
Median Final (IQR) – µg/L	4.8 (3.2 – 6.7)	3.8 (3.0 – 5.2)	0,0574	3.4 (3.3 – 4.6)	3.9 (2.9 – 5.1)	0,4692
BAT						
BAT to f2 (% CD63+ basophils) - CDmax	nd	3.9 (2.2 – 6.6)	-	22.3 (12.8 – 30.3)	3.8 (2.1 – 5.4)	0,0568
BAT to f2 - AUC	nd	66.9 (40.1 – 112.2)	-	255.9 (139.9 – 383.2)	63.2 (40.4 – 99.4)	0,2089
BAT to f2 - CDsens	nd	36.7 (15.7 – 73.3)	-	14.1 (12.4 – 15.7)	71.7 (63.8 – 82.7)	**0,0500**
BAT to f78 (% CD63+ basophils) - CDmax	nd	4.3 (2.7 – 6.4)	-	8.2 (6.0 – 13.2)	4.3 (2.5 – 5.8)	0,0766
BAT to f78 - AUC	nd	77.9 (48.3 – 102.6)	-	101.4 (73.3 – 155.2)	74.5 (48.6 – 117.6)	0,2814
BAT to f78 - CDsens	nd	14.1 (11.4 – 50.4)	-	11.87 (11.4 – 12.8)	32.8 (14.1 – 50.4)	0,2667

Table XX: Analysis in cow's milk protein allergy

f2-sIgE, cow's milk protein global extract sIgE; f78-sIgE, casein sIgE; nd, not determined

2 comparisons on all the diagnostic parameters: on the left, between BAT uninterpretable versus BAT interpretable, on the right, between patient with a positive OFC and patient with negative OFC.

To investigate the ability of BAT to appreciate the tolerance of patient during OFC, we performed analysis on OFC positive patients (n= 4) compared to OFC negative patients (n= 23) (Table 20). We can see that the values of the different parameters (SPT, sIgE, f2- and f78-CDmax and AUC) are higher in patients with positive OFC, close to the significance for CDmax and alpha-lactalbuline-sIgE. Regarding the values of CDsens, we will remain cautious on the interpretation given their unreliability, with our method, in the case of BAT with values of CDmax (%CD63+ basophils) < 15%.

The performance of BAT to predict tolerance during OFC was then computed by ROC curve analysis for cow's milk whole extract (Figure 14A) and casein (Figure 14B) compared to the performance of SPT and sIgE. f2- and f78-CDmax, CDsens and AUC provided the best area under the ROC compared to SPT and f78-sIgE (Figure 14). The optimal cut-off point provided for these parameters, according to Youden's method, were associated with a very good PPV and an excellent NPV (Table 21).

To help physicians in their daily clinical practice, we determined thresholds for the 3 parameters of the BAT (CDmax, AUC and CDsens) making it possible to predict the tolerance with a negative predictive value of 100% (Table 22). All BAT parameters reached a 100% NPV (Table 22).

These data lead us to think that the BAT could represent a good predictive marker of tolerance and thus be a valuable tool in the diagnostic process.

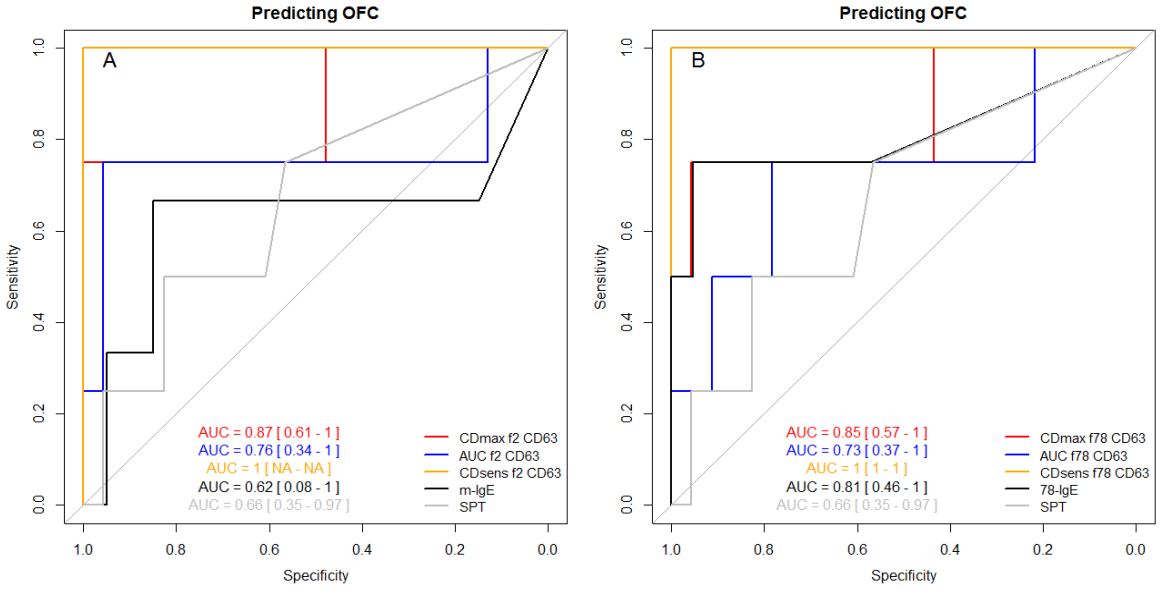

Figure 14: Receiver operating characteristic curve of BAT parameters discriminating tolerant patient to cow's milk protein during OFC.

m-IgE: cow's milk sIgE; f78-IgE: Casein sIgE; SPT: skin prick test

ROC curve analysis for cow's milk whole extract (Figure 14A) and casein (Figure 14B) compared to the performance of SPT and sIgE. f2- and f78-CDmax, CDsens and AUC provided the best area under the ROC compared to SPT and f78-sIgE

Allergen	Allergy Tests	Optimal cut-off	Sp (%)	Se (%)	NPV (%)	PPV (%)
f2	BAT to f2 (% CD63+ basophils) - CDmax	16.6	100	75.0	95.8	100
	BAT to f2 - AUC	221.4	95.7	75.0	95.7	75
	BAT to f2 - CDsens	71.1	100	100	100	100
	SPT (mm)	6.5	82.6	50.0	90.5	33.3
	f2-sIgE (kUA/L)	1.8	85.0	66.7	94.4	40
f78	BAT to f78 (% CD63+ basophils) - CDmax	8.1	95.7	75.0	95.7	75.0
	BAT to f78 - AUC	95.6	78.3	75.0	94.7	37.5
	BAT to f78 - CDsens	14.1	100	100	100	100
	f78 -sIgE (kUA/L)	2.9	95.2	75.0	95.2	75.0

Table XXI: Optimal cut off to predict tolerance to OFC in CMPA

Allergen	Allergy Tests	Threshold	Sp (%)	Se (%)	NPV (%)	PPV (%)
f2	BAT to f2 (% CD63+ basophils) - CDmax	3.1	47.8	100	100	25.0
	BAT to f2 - AUC	23.7	13.0	100	100	16.7
	BAT to f2 - CDsens	71.7	100	100	100	100
f78	BAT to f78 (% CD63+ basophils) - CDmax	3.6	43.5	100	100	23.5
	BAT to f78 - AUC	40.8	21.7	100	100	18.2
	BAT to f78 - CDsens	14.1	100	100	100	100

Table XXII: Threshold of BAT parameters to predict tolerance with maximal NPV

3.3.3 Analysis of patients with discordant BAT and OFC

In the 27 children with an OFC and BAT, 3 (11%) presented discordant OFC and BAT results: 1 with an indication of diagnosis, 2 with an indication to determine the threshold dose. The patient with positive OFC and negative BAT is known to have enterocolitis syndrome induced by cow's milk protein. For the other two patients who had a positive BAT and a negative OFC, we can see that the BAT is actually very weak positive on a single marker CD203c. These BAT are negative on the CD63 marker (Table 23).

In view of this information we can conclude that there is in reality no discordance and that the BAT is a test presenting an excellent NPV and therefore capable of predicting tolerance in children.

Patient	OFC indication	Threshold dose (mL)	Cum threshold dose (mL)	f2				f78			
				sIgE	CDmax	AUC	CDsens	sIgE	CDmax	AUC	CDsens
Patient 1: BAT + / OFC -	Diagnosis	80	174.5	Nd	2,9	58,4328	-	0,7	5,8	87,974952	89285,7143
Patient 2: BAT + / OFC -	Threshold	40	95.0	0,45	10,8	170,1810	87,4125874	0,1	4,2	61,9788	-
Patient 3: BAT - / OFC +	Threshold	14	19.6	0,1	3,3	23,8702	-	0,1	3,7	45,074328	12,8205

Table XXIII: Analysis of CMPA BAT and OFC discordance

Nd, not determined

CDmax was considered negative if the value was < 15 %

4 Discussion

The use of the OFC to conclude with a diagnosis of certainty is usual. Indeed, the tests used so far (SPT, IgEs) are not infallibles and it is therefore necessary to continue the explorations. These OFCs are sources of anxiety and potentially dangerous. In addition, their interpretation remains sometimes subjective and delicate. BAT was set up in this context.

Our study evaluated diagnostic performance of the BAT. It is the first study to evaluate it performance in 3 food allergens (peanut, hazelnut and cow's milk protein). The main objective of this study was to determine whether the BAT could distinguish between allergic and non-allergic patient and determine its place in the diagnostic strategy. The percentage of CD63 expression was used as the main outcome parameter.

In our cohort of pediatric patients, the BAT demonstrated the ability to predict the allergic clinical status in peanut, hazelnut and cow's milk protein sensitized patients.
Regarding peanut, in agreement with the literature (30,39–41), we have shown that the BAT is a reliable tool to differentiate allergic patients from tolerant patients, with good sensitivity and good specificity. CDmax and AUC for peanut whole extract as well as for Ara h 2 seem to be the best predictive markers.

Santos *et al.* have shown that by its excellent PPV (95%) and NPV (98%), the BAT is a more reliable tool than the SPT or the sIgE assay and would make it possible to dispense with 66% of OFC in children allergic to peanut from an optimal threshold value that they defined from the percentage of basophils activated in CD63 at the allergen concentration of 100 ng/mL (39).

In our study, in order to better define the place of the BAT in peanut allergy management in daily clinical practice, we determined thresholds for the three parameters of

the BAT (CDmax, AUC and CDsens), according to Youden's method, making it possible to predict OFC results with a positive predictive value of 100%. Interestingly, by using 91.5 as threshold for BAT f13-CDmax providing 100% PPV, one can observed that 16.3% of OFC were not necessary required. It would then have been possible to avoid the reaction during OFC in: 4 grade 1 reactions, 9 grade 2 reactions, 2 grade 3 reactions, and 1 grade 4 reaction. The number of preventable OFC increases to 19.4% by using 1752 as threshold for BAT f13-AUC (3 grade 1, 12 grade 2, 3 grade 3, and 1 grade 4); and to 21.4% if both threshold had been considered together (4 grade 1, 13 grade 2, 3 grade 3, and 1 grade 4) (data not shown). However, these results should be qualified according to the indication for carrying out the OFC. In fact, in our study, the children who had an OFC in view of defining the threshold reactogenic dose were subsequently able to initiate an induction of tolerance and therefore the OFC was far from useless.

Several studies have demonstrated the usefulness of the BAT to predict the cumulative threshold dose during an OFC, in peanut allergy (43,45). However, the results are not always similar. In their study Glaumann *et al.* (35) did not show a correlation between the reactogenic dose and the severity of the reaction. In our study, Pearson correlation showed that CDmax and AUC were strongly associated with the threshold dose during OFC, whatever the stimulation condition (f13 or Ara h 2) ($r > 0.4$). Unlike our study, Santos *et al*. showed that CDsens was more discriminative in predicting the threshold dose (43).

By using BAT f13-AUC threshold (= 1855.6), we were able to predict reactivity to a very low reactogenic dose during OFC in 7 patients (11%) (1 grade 4, 2 grades 3, 3 grades 2 and 1 grade 1), rinsing up to 27 (42.9%) patients by using BAT Ara h 2-AUC threshold. As expected with threshold provided 93% PPV.

These data highlight that very simple and easily accessible parameters, such as the BAT AUC threshold, could be used to adapt the OFC protocol in highly allergic patients, which has never been described before.

In the literature, we can also find studies studying the ability of BAT to predict the severity of the reaction during OFC, with the demonstration of a correlation between the results of BAT, the reactogenic dose and the severity of the reaction during OFC, in peanut allergy (42–45). In addition, Santos *et al*. were also interested in the use of BAT in monitoring the development of tolerance acquisition during oral tolerance induction (32).

In the literature, similar results have been sought in the context of hazelnut allergy showing that the BAT is a useful tool to determine the allergic status of a patient (46–48). Here, we showed that the 3 parameters of the BAT are predictive of the reactivity during the OFC. Brandström *et al.* (48) have shown that CDsens is a good marker to improve the accuracy of the diagnosis of hazelnut allergy. Unfortunately, our small population did not allow a reliable conclusion on this parameter. However, we were able to define BAT thresholds on 2 of these parameters: CDmax and AUC with a 100% PPV. Interestingly, by using 27.7 as threshold for f17-CDmax providing 100% PPV, one can observe that 57.7% of OFC were not necessary required. The number of preventable OFC was similar by using 283.5 as threshold for BAT f17-AUC (data not shown). These results are to be modulated according to the indication of the OFC. Indeed, as for peanuts, these results should be qualified depending on the indication for OFC and the patient's willingness to initiate oral tolerance induction. In our study, all the children who achieved a threshold-targeted OFC then started induction of oral tolerance to hazelnut. If we are more specifically interested in patients with an indication

aimed at making the diagnosis, we can observe that 36% of diagnosis-OFC were not necessary required. This result is similar by using BAT f17-AUC.

This makes it possible to put the BAT back into the diagnostic strategy, especially as we can also read that the BAT is a more powerful tool in the diagnosis compared to the assays of sIgE in peanut and hazelnut allergy (46,47).

With regard to cow's milk protein allergy, studies have shown that BAT could be a valuable tool, combined with SPT and sIgE assay, to determine the need for an OFC (40,49,50) and it would also predict the severity of the allergy (49). As with peanuts, studies are interested in monitoring the evolution of the acquisition of tolerance induced by an induction of oral tolerance to cow's milk proteins (51,52) showing the importance and utility of the BAT. Indeed, cow’s milk is the most common and important food allergen in children for growth and development. For this allergen, an important number of uninterpretable BAT limited our study because of an activation of the basophil in the negative control for the majority of these patients. After studying the clinical and biological data of the excluded patients, it turns out that the majority of these patients reacted to small quantities of milk and are considered to be very allergic, allowing the hypothesis of a cross-reactivity between the albumin contained in the BAT stimulation buffer and the level of sensitization of patients to milk albumin. This hypothesis will be reassessed in a future study. Rubio *et al*. showed that the concordance between BAT and oral challenge was excellent with a correlation factor u of 0.767 (40). As in our study, they found a very good NPV (96%). According to them, the BAT is a good complementary tool to assess the need to carry out the OFC.

On the contrary, in their study, Ruinemans-Koert *et al.* (50) explained that the BAT seems to be safe, reliable and cost-effective to diagnose and follow up patients with an IgE-

mediated cow's milk allergy. So for non-IgE sensitized patients reporting mild symptoms to cow's milk DBPCFC is not necessary. Instead, they propose to consider a double-blind extended (time) challenge test at home.

The strengths of our study is that it shows that the BAT has a primordial place in the diagnostic strategy in patients allergic to peanut or to hazelnut. We were able to determine the most reliable parameters of the BAT (PPV 100%). For milk, we obtained very good results showing a NPV of 100%. It is then possible to avoid unnecessary OFC in tolerant children.

However, this study has also weaknesses: OFC were carried out openly, and the low proportion of patients allergic to hazelnut and those allergic to cow's milk proteins.
In addition, standardization of BAT practices between the different centers is probably necessary *(39)*, in order to definitively use the BAT threshold in clinical practice.

Additional prospective studies to investigate the ability of the BAT to reduce OFC are required.

Conclusion

Les allergies à l'arachide, à la noisette et aux protéines de lait de vache, véritables problèmes de santé publique, sont parmi les allergies alimentaires les plus fréquentes chez les enfants et peuvent être responsables de réactions sévères. Le diagnostic positif précis repose sur différents tests dont le TPO qui permet la mise en évidence d'un seuil quantitatif d'allergène induisant une réaction clinique. Cependant, il est contraignant pour les équipes médicales et les patients, pourvoyeurs d'anxiété pour ces derniers et leurs proches, et potentiellement à risque de provoquer une réaction sévère. Dans ce contexte est apparu un test biologique fonctionnel : le TAB, qui permet de déterminer l'équivalent d'un seuil réactogène *in vitro*.

L'objectif initial de ce travail était de déterminer la place du TAB vis-à-vis des autres outils diagnostiques utilisés puis de définir les seuils réactogènes optimaux du TAB afin de prédire la positivité ou non du résultat, la dose réactogène ainsi que la sévérité des réactions potentielles lors du TPO. Le but étant d'apporter une aide dans la pratique clinique quotidienne des allergologues.

Pour cela nous avons réalisé chez 108 enfants allergiques à l'arachide, 27 à la noisette et 50 aux protéines de lait de vache des TAB en parallèle des TPO réalisés à l'hôpital de jour de pédiatrie, en étudiant les réponses aux extraits globaux (f13, f17 et f2) et à leurs allergènes majeurs (Ara h 2 ou caséine) selon une cascade de concentrations d'allergène successivement dilués 6 fois. Nous avons en particulier utilisé une méthode développée dans le service d'Immunologie, basée sur l'exploitation des données obtenues à partir de l'expression du marqueur CD63, et permettant le calcul automatisé des paramètres du TAB (CDsens, AUC et CDmax).

Concernant l'allergie à l'arachide, nous avons démontré à partir de l'analyse de courbes ROC que les marqueurs CDmax et AUC du TAB sont les marqueurs les plus fiables pour prédire l'issue du TPO, tant pour l'extrait global f13 que pour Ara h 2. A partir de cela, nous avons déterminé des seuils optimaux pour ces paramètres avec 100% de VPP et démontré que 21% des TPO auraient pu être évités (dont certains ayant entrainés des réactions sévères) via l'utilisation de ces seuils, mettant en évidence la place potentielle du TAB dans le diagnostic.

S'intéressant ensuite aux patients avec TAB+/TPO+ (n= 63), nous avons démontré que les données du TAB sont corrélées à la dose réactogène d'une part et à la sévérité des réactions cliniques d'autre part. Afin d'établir des seuils du TAB utiles pour la pratique clinique, nous avons ensuite analysé les données des patients classés en 2 groupes différents, ceux ayant réagi à une faible dose cumulée *versus* ceux ayant réagi à une forte dose cumulée (la dose de 200 mg de protéine d'arachide ayant été choisie correspond à la dose cumulée réactogène entraînant théoriquement une réaction lors du TPO chez 50% des patients = ED50). Nous avons ainsi démontré que la survenue d'une réaction en deçà de l'ED50 pouvait être anticipée par l'analyse des paramètres du TAB chez les patients allergiques avec pour les seuils choisis une très bonne VPP (entre 84 et 91%) et une très bonne VPN (entre 80 et 87%). En revanche la classification des patients selon la sévérité des symptômes au TPO (*mild to moderate* versus *severe*), puis la comparaison avec les résultats des TAB n'a pas permis d'établir des seuils de prédiction avec des valeurs de VPP ou VPN suffisamment élevées pour le TAB puisse être utilisé pour anticiper la gravité des réactions induites.

Dans un second temps, nous avons ré-analysé les données des 19 patients discordants (TAB+/TPO-). 9 de ces patients avaient des TAB négatifs sur le marqueur CD63 et très faiblement positifs en CD203c. Ils pourraient donc être ré-interprétés comme étant négatifs. Parmi les 10 discordants restants 2 populations se distinguent : d'abord ceux qui ont atteint

une dose cumulée d'arachide conséquente (>17 g) (n= 3, avec 1 patient présentant un TAB faiblement positif et 2 vrais discordants) pour lesquels des investigations complémentaires seraient nécessaires et ceux pour lesquels le TPO a été arrêté précocement (n= 7), et donc vraisemblablement avant que ne se déclenche une authentique réponse clinique allergique.

Concernant les 27 patients allergiques à la noisette, l'analyse des données a démontré que tous les marqueurs du TAB (CDmax, CDsens et AUC) pourraient être des marqueurs fiables pour prédire la réactivité lors TPO. Les seuils quantitatifs limites déterminés pour ces paramètres, sur une population de 26 enfants, permettent d'anticiper un TPO positif avec une excellente VPP. De plus, parmi les patients ayant réagi lors du TPO (n= 8), nous avons montré que le TAB semblait être un bon moyen pour prédire une réaction en dessous d'une dose réactogène seuil (fixée à partir de l'ED50 à 80.6 mg de protéines) et la sévérité clinique des réactions observées lors du TPO. Basé sur un effectif réduit, ces résultats nécessitent cependant d'être confirmés sur une plus grande cohorte.

Pour l'allergie aux protéines de lait de vache, l'analyse a été limitée par le nombre important de TAB ininterprétables, pour des raisons techniques que nous avons identifiées, entraînant l'exclusion de 23 patients (46 %). Après étude des données des patients exclus, il s'avère que la majorité de ces patients ont réagi à de faibles quantités de lait et sont considérés comme très allergiques. Il sera nécessaire d'optimiser notre protocole de TAB chez ces patients. Néanmoins, l'analyse des données des 27 patients avec TAB interprétable, a permis de définir des seuils optimaux des différents paramètres du TAB permettant de différencier les enfants allergiques et tolérants avec une excellente VPN. Nous resterons néanmoins prudents sur ces conclusions basées sur un effectif réduit (n= 27).

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats montrent l'intérêt du TAB qui permet de prédire l'issue du TPO, la dose réactogène et la sévérité. Cela fait de ce test un très bon outil

complémentaire dans le diagnostic des allergies à l'arachide, à la noisette et aux protéines de lait de vache. En outre il pourrait permettre de réduire les TPO considérés comme inutiles (car négatifs) et ceux dangereux pour le patient.

Le Doyen de l'UFR de Médecine,
Pierre CLAVELOU

Le Président du Jury,
Bertrand EVRARD

Professeur Bertrand EVRARD
Chef de Service
PU - PH
(RPPS 10004031745)
Service d'Immunologie Biologique - Centre de Biologie - 3ème étage
C.H.U. G. Montpied - 58 rue Montalembert
63003 CLERMONT-FERRAND CEDEX 1
Tél. : 04 73 75 06 62 - Fax : 04 73 75 06 37

Supplemental Table

	Diagnosis			Immunotherapy oral			Threshold		
Allergy Tests	**BAT+/OFC+ (n= 4)**	**BAT+/OFC- (n= 4)**	**p**	**BAT+/OFC+ (n= 2)**	**BAT+/OFC- (n= 9)**	**p**	**BAT+/OFC+ (n= 57)**	**BAT+/OFC- (n= 6)**	**p**
Skin Prick test									
SPT (mm)	11.0 (9.5 – 12.0)	4.0 (0.8 – 8.8)	0.1547	3.5 (1.8 – 5.3)	4.0 (4.0 – 6.0)	-	10.0 (7.0 – 13.5)	7.0 (6.0 – 10.0)	0.2556
IgE									
P-sIgE (KUA/L)	4.3 (0.2 – 9.2)	0.4 (0.3 – 0.8)	0.3429	58.5 (37.8 – 79.3)	5.7 (1.1 – 37.3)	-	41.6 (4.7 – 79.3)	1.2 (1.0 – 1.3)	**0.0022**
Ara h 1-sIgE (KUA/L)	0.1 (0.1 – 0.2)	0.1 (0.1 – 0.1)	-	52.1 (28.1 – 76.0)	0.3 (0.1 – 18.2)	-	5.7 (0.1 – 36.3)	0.1 (0.1 – 0.3)	**0.0185**
Ara h 2-sIgE (KUA/L)	0.9 (0.1 – 3.4)	0.2 (0.1 – 0.4)	0.2298	52.3 (28.5 – 76.2)	1.3 (0.3 – 19.3)	-	14.0 (2.3 – 50.3)	1.2 (0.7 – 1.7)	**0.0040**
Ara h 3-sIgE (KUA/L)	0.1 (0.1 – 0.1)	0.1 (0.1 – 0.1)	-	32.6 (16.4 – 48.8)	0.1 (0.1 – 2.3)	-	0.2 (0.1 – 5.1)	0.2 (0.1 – 0.3)	0.1222
Ara h 8-sIgE (KUA/L)	2.7 (2.7 – 2.7)	0.1 (0.1 – 0.1)	-	26.9 (13.5 – 40.2)	0.1 (0.1 – 0.1)	-	0.1 (0.1 – 0.5)	0.4 (0.1 – 0.8)	**0.0479**
Ara h 9-sIgE (KUA/L)	7.0 (3.6 – 10.5)	0.1 (0.1 – 0.1)	-	0.1 (0.1 – 0.1)	0.1 (0.1 – 0.1)	-	0.1 (0.1 – 0.1)	0.2 (0.1 – 0.3)	0.0392
BAT									
BAT to peanut – Cdmax (% CD63+ basophils)	44.1 (10.9 – 78.7)	5.7 (4.7 – 6.6)	0.1000	59.9 (43.9 – 75.8)	54.6 (11.3 – 89.2)	-	85.1 (71.7 – 91.7)	16.1 (12.1 – 53.8)	**0.0031**
BAT to peanut – AUC	641.7 (141.5 – 1279.9)	104.1 (77.8 – 117.6)	0.1000	1017.3 (644.7 – 1389.9)	551.3 (137.0 – 1151.9)	-	1508.5 (897.4 – 1787.2)	215.9 (137.2 – 591.8)	**0.0015**
BAT to peanut – Cdsens	157.7 (41.7 – 3366.9)	96163.3 (48091.0 – 144235.5)	-	56.5 (32.7 – 80.3)	15.0 (11.7 – 55.4)	-	118.5 (24.9 – 669.9)	39.9 (10.0 – 77.3)	0.0570
BAT to Ara h 2 – Cdmax (% CD63+ basophils)	33.4 (5.3 – 68.7)	3.8 (3.6 – 4.2)	**0.0286**	68.8 (56.7 – 81.0)	42.5 (16.0 – 77.6)	-	84.2 (55.2 – 91.3)	10.2 (5.6 – 60.6)	**0.0077**
BAT to Ara h 2 – AUC	104.0 (17.0 – 231.4)	12.2 (9.2 – 15.7)	0.0571	222.6 (157.6 – 287.5)	84.6 (43.1 – 221.1)	-	298.9 (173.1 – 362.5)	29.0 (18.5 – 133.4)	**0.0063**
BAT to Ara h 2 – Cdsens	5694.2 (489.9 – 25250.5)	243.6 (153.6 – 333.6)	-	282.2 (165.0 – 399.4)	118.2 (49.7 – 279.1)	-	1574.8 (367.4 – 3483.0)	678.8 (265.8 – 6307.6)	0.4837

Supplemental Table I: Discordance analysis in function of BAT indication, in peanut allergy

Analysis of the different parameters of allergy diagnostic tools for the global peanut extract (f13), as well as for the major allergen Ara h 2, in 63 patients with concordant OFC+/BAT+ results and 19 patients with OFC-/BAT+, based on indication of OFC.

Hazelnut with positive BAT/OFC (n= 18)	Threshold dose	
Allergy tests	**< 80.6 mg *hp* n = 1**	**> 80.6 mg *hp* n = 17**
Skin Prick Test		
Median Histamine (IQR) – mm	8	7.0 (5.0 – 10.0)
Median hazelnut (IQR) - mm	10	7.0 (5.0 – 8.0)
sIgE		
Median hazelnut f17 (IQR) – kUA/L	0.32	12.2 (1.1 – 22.1)
Median Cor a 1 (IQR) – kUA/L	0.1	0.1 (0.1 – 24.9)
Median Cor a 8 (IQR) – kUA/L	0.1	0.1 (0.1 – 0.2)
Median Cor a 9 (IQR) – kUA/L	0.18	0.3 (0.1 – 1.0)
Median Cor a 14 (IQR) – kUA/L	0.6	1.8 (0.4 – 2.7)
Tryptase		
Median Basal (IQR) – µg/L	5.3	4.1 (3.3 – 4.4)
Median Final (IQR) – µg/L	6.2	4.8 (4.2 – 5.8)
BAT		
BAT to f17 (% CD63+ basophils) - CDmax	78.9	77.4 (37.5 – 87.2)
BAT to f17 - AUC	1551.0	984.9 (409.0 – 1278.9)
BAT to f17 - CDsens	102.8	39.0 (13.9 – 85.9)

Supplemental Table II: Comparison of two threshold dose groups in hazelnut allergy

Stratification of patients into 2 cumulative threshold dose groups: low cumulative threshold dose group (i.e. 80.6 mg of hazelnut) and a high cumulative threshold dose group of allergic reaction.

Bibliographie

1. Barni S, Liccioli G, Sarti L, Giovannini M, Novembre E, Mori F. Immunoglobulin E (IgE)-Mediated Food Allergy in Children: Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, and Management. Medicina (Kaunas). 4 mars 2020;56(3).

2. Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. Nat Rev Immunol. déc 2016;16(12):751-65.

3. Björkstén B. Diverse microbial exposure - consequences for vaccine development. Vaccine. 19 juin 2012;30(29):4336-40.

4. Khayath N, de Blay F. Chapitre 1 - Épidémiologie des allergies alimentaires. In: Just J, Deschildre A, Beaudouin E, éditeurs. Allergies Alimentaires [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2017 [cité 6 nov 2020]. p. 3-11. Disponible sur: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782294749315000013

5. Cohen SG. Food allergens: landmarks along a historic trail. J Allergy Clin Immunol. juin 2008;121(6):1521-4, 1524.e1.

6. Sampson HA. Food allergy: Past, present and future. Allergol Int. oct 2016;65(4):363-9.

7. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. J Allergy Clin Immunol. 2018;141(1):41-58.

8. Lopes JP, Sicherer S. Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and treatment. Curr Opin Immunol. oct 2020;66:57-64.

9. NIAID-Sponsored Expert Panel, Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. J Allergy Clin Immunol. déc 2010;126(6 Suppl):S1-58.

10. Abrams EM, Chan ES, Sicherer S. Peanut Allergy: New Advances and Ongoing Controversies. Pediatrics. mai 2020;145(5).

11. Calamelli E, Trozzo A, Di Blasi E, Serra L, Bottau P. Hazelnut Allergy. Medicina (Kaunas). 14 janv 2021;57(1).

12. McWilliam V, Koplin J, Lodge C, Tang M, Dharmage S, Allen K. The Prevalence of Tree Nut Allergy: A Systematic Review. Curr Allergy Asthma Rep. sept 2015;15(9):54.

13. Flom JD, Sicherer SH. Epidemiology of Cow's Milk Allergy. Nutrients. 10 mai 2019;11(5).

14. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. Pediatr Allergy Immunol. mai 2016;27 Suppl 23:1-250.

15. Sato S, Yanagida N, Ebisawa M. How to diagnose food allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol. juin 2018;18(3):214-21.

16. Ebisawa M, Ito K, Fujisawa T, Committee for Japanese Pediatric Guideline for Food Allergy, The Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology, The Japanese Society of Allergology. Japanese guidelines for food allergy 2017. Allergol Int. avr 2017;66(2):248-64.

17. Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. J Allergy Clin Immunol. oct 1997;100(4):444-51.

18. Keet CA, Johnson K, Savage JH, Hamilton RG, Wood RA. Evaluation of Ara h2 IgE thresholds in the diagnosis of peanut allergy in a clinical population. J Allergy Clin Immunol Pract. janv 2013;1(1):101-3.

19. Masthoff LJN, Mattsson L, Zuidmeer-Jongejan L, Lidholm J, Andersson K, Akkerdaas JH, et al. Sensitization to Cor a 9 and Cor a 14 is highly specific for a hazelnut allergy with objective symptoms in Dutch children and adults. J Allergy Clin Immunol. août 2013;132(2):393-9.

20. Beyer K, Grabenhenrich L, Härtl M, Beder A, Kalb B, Ziegert M, et al. Predictive values of component-specific IgE for the outcome of peanut and hazelnut food challenges in children. Allergy. janv 2015;70(1):90-8.

21. Dang TD, Tang M, Choo S, Licciardi PV, Koplin JJ, Martin PE, et al. Increasing the accuracy of peanut allergy diagnosis by using Ara h 2. J Allergy Clin Immunol. avr 2012;129(4):1056-63.

22. Valcour A, Lidholm J, Borres MP, Hamilton RG. Sensitization profiles to hazelnut allergens across the United States. Annals of Allergy, Asthma & Immunology. 1 janv 2019;122(1):111-116.e1.

23. Sato S, Ogura K, Takahashi K, Sato Y, Yanagida N, Ebisawa M. Usefulness of antigen-specific IgE probability curves derived from the 3gAllergy assay in diagnosing egg, cow's milk, and wheat allergies. Allergol Int. avr 2017;66(2):296-301.

24. Calvani M, Bianchi A, Reginelli C, Peresso M, Testa A. Oral Food Challenge. Medicina (Kaunas) [Internet]. 27 sept 2019 [cité 17 janv 2021];55(10). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6843825/

25. Sampson HA, Gerth van Wijk R, Bindslev-Jensen C, Sicherer S, Teuber SS, Burks AW, et al. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology-European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. J Allergy Clin Immunol. déc 2012;130(6):1260-74.

26. Perry TT, Matsui EC, Conover-Walker MK, Wood RA. Risk of oral food challenges. J Allergy Clin Immunol. nov 2004;114(5):1164-8.

27. Astier C, Morisset M, Roitel O, Codreanu F, Jacquenet S, Franck P, et al. Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. J Allergy Clin Immunol. juill 2006;118(1):250-6.

28. Hemmings O, Kwok M, McKendry R, Santos AF. Basophil Activation Test: Old and New Applications in Allergy. Curr Allergy Asthma Rep. 15 nov 2018;18(12):77.

29. Abuaf N, Rostane H, Rajoely B, Gaouar H, Autegarden JE, Leynadier F, et al. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. Clin Exp Allergy. juin 2008;38(6):921-8.

30. Santos AF, Shreffler WG. Road map for the clinical application of the basophil activation test in food allergy. Clin Exp Allergy. sept 2017;47(9):1115-24.

31. MacGlashan D. Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. Clin Exp Allergy. sept 2010;40(9):1365-77.

32. Santos AF, Lack G. Basophil activation test: food challenge in a test tube or specialist research tool? Clin Transl Allergy [Internet]. 15 mars 2016 [cité 23 mars 2021];6. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4791855/

33. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. Cytometry B Clin Cytom. juill 2008;74(4):201-10.

34. Reier-Nilsen T, Michelsen MM, Lødrup Carlsen KC, Carlsen K-H, Mowinckel P, Nygaard UC, et al. Predicting reactivity threshold in children with anaphylaxis to peanut. Clin Exp Allergy. avr 2018;48(4):415-23.

35. Glaumann S, Nopp A, Johansson SGO, Rudengren M, Borres MP, Nilsson C. Basophil allergen threshold sensitivity, CD-sens, IgE-sensitization and DBPCFC in peanut-sensitized children. Allergy. févr 2012;67(2):242-7.

36. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. Allergy. nov 2015;70(11):1393-405.

37. Johansson SGO, Nopp A, van Hage M, Olofsson N, Lundahl J, Wehlin L, et al. Passive IgE-sensitization by blood transfusion. Allergy. sept 2005;60(9):1192-9.

38. Patil SU, Shreffler WG. Immunology in the Clinic Review Series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation. Clin Exp Immunol. janv 2012;167(1):59-66.

39. Santos AF, Douiri A, Bécares N, Wu S-Y, Stephens A, Radulovic S, et al. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. J Allergy Clin Immunol. sept 2014;134(3):645-52.

40. Rubio A, Vivinus-Nébot M, Bourrier T, Saggio B, Albertini M, Bernard A. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. Allergy. janv 2011;66(1):92-100.

41. Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, Goldman M, Casimir G, Mascart F, et al. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. Clin Exp Allergy. août 2009;39(8):1234-45.

42. Song Y, Wang J, Leung N, Wang LX, Lisann L, Sicherer SH, et al. Correlations between basophil activation, allergen-specific IgE with outcome and severity of oral food challenges. Ann Allergy Asthma Immunol. avr 2015;114(4):319-26.

43. Santos AF, Du Toit G, Douiri A, Radulovic S, Stephens A, Turcanu V, et al. Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. J Allergy Clin Immunol. janv 2015;135(1):179-86.

44. Chinthrajah RS, Purington N, Andorf S, Rosa JS, Mukai K, Hamilton R, et al. Development of a Tool Predicting Severity of Allergic Reaction During Peanut Challenge. Ann Allergy Asthma Immunol. juill 2018;121(1):69-76.e2.

45. Cottel N, Saf S, Bourgoin-Heck M, Lambert N, Amat F, Poncet P, et al. Two Different Composite Markers Predict Severity and Threshold Dose in Peanut Allergy. J Allergy Clin Immunol Pract. janv 2021;9(1):275-282.e1.

46. Lötzsch B, Dölle S, Vieths S, Worm M. Exploratory analysis of CD63 and CD203c expression in basophils from hazelnut sensitized and allergic individuals. Clin Transl Allergy. 2016;6:45.

47. Duan L, Celik A, Hoang JA, Schmidthaler K, So D, Yin X, et al. Basophil activation test shows high accuracy in the diagnosis of peanut and tree nut allergy: The Markers of Nut Allergy Study. Allergy. 9 déc 2020;

48. Brandström J, Nopp A, Johansson SGO, Lilja G, Sundqvist A-C, Borres MP, et al. Basophil allergen threshold sensitivity and component-resolved diagnostics improve hazelnut allergy diagnosis. Clin Exp Allergy. sept 2015;45(9):1412-8.

49. Kim YH, Kim YS, Park Y, Kim SY, Kim KW, Kim HS, et al. Investigation of Basophil Activation Test for Diagnosing Milk and Egg Allergy in Younger Children. J Clin Med. 5 déc 2020;9(12).

50. Ruinemans-Koerts J, Schmidt-Hieltjes Y, Jansen A, Savelkoul HFJ, Plaisier A, van Setten P. The Basophil Activation Test reduces the need for a food challenge test in children suspected of IgE-mediated cow's milk allergy. Clin Exp Allergy. 2019;49(3):350-6.

51. Chirumbolo S. Basophil activation test in oral desensitization to cow's milk allergy. United European Gastroenterol J. oct 2016;4(5):714-5.

52. Nucera E, Pecora V, Buonomo A, Rizzi A, Aruanno A, Pascolini L, et al. Utility of Basophil Activation Test for monitoring the acquisition of clinical tolerance after oral desensitization to cow's milk: Pilot study. United European Gastroenterol J. juin 2015;3(3):272-6.

53. PALISADE Group of Clinical Investigators, Vickery BP, Vereda A, Casale TB, Beyer K, du Toit G, et al. AR101 Oral Immunotherapy for Peanut Allergy. N Engl J Med. 22 nov 2018;379(21):1991-2001.

54. Blumchen K, Trendelenburg V, Ahrens F, Gruebl A, Hamelmann E, Hansen G, et al. Efficacy, Safety, and Quality of Life in a Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Low-Dose Peanut Oral Immunotherapy in Children with Peanut Allergy. J Allergy Clin Immunol Pract. févr 2019;7(2):479-491.e10.

55. Blom WM, Vlieg-Boerstra BJ, Kruizinga AG, van der Heide S, Houben GF, Dubois AEJ. Threshold dose distributions for 5 major allergenic foods in children. J Allergy Clin Immunol. janv 2013;131(1):172-9.

56. Houben GF, Baumert JL, Blom WM, Kruizinga AG, Meima MY, Remington BC, et al. Full range of population Eliciting Dose values for 14 priority allergenic foods and recommendations for use in risk characterization. Food and Chemical Toxicology. 1 déc 2020;146:111831.

Serment d'Hippocrate : Conseil national de l'ordre des médecins

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

Serment d’Hippocrate

En présence des Maîtres de cette FACULTE et de mes chers 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 donnerai mes soins gratuits à l'indigent et je n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans 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 le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes MAÎTRES, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les HOMMES m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'OPPROBRE et méprisé de mes confrères si j'y manque.

EVALUATION DU TEST D'ACTIVATION DES BASOPHILES COMME OUTIL DIAGNOSTIQUE DANS L'ALLERGIE A L'ARACHIDE, A LA NOISETTE ET AUX PROTEINES DE LAIT DE VACHE EN PEDIATRIE

Résumé :

CONTEXTE : Les allergies à l'arachide, à la noisette et aux protéines de lait de vache sont parmi les plus fréquentes chez les enfants et peuvent être responsables de réactions sévères. Le diagnostic positif précis repose sur différents tests dont le test de provocation oral (TPO), pourvoyeur potentiellement de réactions graves chez le patient. Dans ce contexte est apparu une alternative, le test d'activation des basophiles (TAB), qui permet de déterminer l'équivalent d'un seuil réactogène *in vitro* sur une simple prise de sang.

OBJECTIF : L'objectif initial est de déterminer la place du TAB vis-à-vis des autres outils diagnostiques de l'allergie alimentaire en comparant ses différents marqueurs (CDmax, le CDsens et l'AUC) au résultat du TPO pratiqué le même jour. Puis de définir les seuils réactogènes optimaux du TAB, afin de prédire le résultat du TPO, la dose réactogène ainsi que la sévérité des réactions cliniques potentielles.

METHODE : Nous avons analysé les données des TAB en parallèle des TPO réalisés à l'hôpital de jour de pédiatrie, en nous basant uniquement sur l'analyse du marqueur CD63, chez 108 enfants allergiques à l'arachide, 27 à la noisette et 50 aux protéines de lait de vache. Des seuils quantitatifs optimaux ont été définis pour le CDmax, le CDsens et l'AUC, en utilisant la méthode de Youden.

RESULTATS : Concernant l'allergie à l'arachide, 10 patients ont été exclus en raison d'un TAB ininterprétable. Parmi les 98 enfants inclus, nous avons trouvé 80.6 % de concordance entre les résultats du TAB et du TPO dans le diagnostic de l'allergie à l'arachide. L'analyse des courbes ROC des paramètres du TAB a montré que le CDmax et l'AUC après stimulation par f13 ou Ara h 2 semblaient être les meilleurs marqueurs associés à une réactivité lors du TPO avec une excellente valeur prédictive positive et une très bonne valeur prédictive négative. Nous avons également démontré que la survenue d'une réaction en deçà d'une dose réactogène seuil fixée à 200 mg de protéine d'arachide (correspondant à l'ED50) pouvait être anticipée par l'analyse des données du TAB chez les patients allergiques. Néanmoins, bien qu'une corrélation entre le TAB et le grade de la réaction lors du TPO ait été observée, l'analyse des patients selon l'intensité des symptômes survenus lors du TPO n'a pas permis d'identifier de marqueurs prédictifs de la gravité des réactions.

Concernant l'allergie à la noisette, nous avons montré que les 3 marqueurs du TAB (CDmax, AUC et CDsens) semblaient être des marqueurs fiables pour prédire la réactivité lors du TPO. Les seuils quantitatifs optimaux ont tous atteint une VPP de 100 %. De façon intéressante, nous avons montré que le TAB semblait être un bon moyen pour prédire une réaction en dessous d'une dose réactogène seuil (fixée à partir de l'ED50 à 80.6 mg de protéines) et la sévérité clinique des réactions observées lors du TPO.

Pour l'allergie aux protéines de lait de vache, l'analyse a été limitée par le nombre important de TAB ininterprétables, pour des raisons techniques que nous avons identifiées, entraînant l'exclusion de 23 patients (46%). Nous avons montré que le TAB permettait de mettre en évidence de façon fiable les patients non (ou plus) allergique grâce à la définition de seuils optimaux déterminés à partir de courbes ROC, avec une excellente valeur prédictive négative pour l'ensemble des marqueurs du TAB (CDmax (95.8 %), AUC (95.7 %), CDsens (100 %)).

CONCLUSION : L'ensemble de ces résultats apportent des éléments objectifs laissant penser que le TAB est un outil complémentaire intéressant dans le diagnostic des allergies à l'arachide, à la noisette et aux protéines de lait de vache, permettant notamment d'éviter la réalisation de TPO inutiles chez des patients tolérants envers l'allergène et une adaptation personnalisée des protocoles de TPO dans le cas des allergies sévères pour éviter les risques liés à ce test.

Mots-clés : Test d'activation des basophiles, test de provocation oral, arachide, noisette, protéines de lait de vache, CDmax, CDsens, AUC, CD63.