



HAL
open science

Évaluation de l'intérêt du test d'activation des basophiles comme outil de diagnostic de l'allergie à l'arachide et aux protéines de lait de vache

Marine Godignon

► **To cite this version:**

Marine Godignon. Évaluation de l'intérêt du test d'activation des basophiles comme outil de diagnostic de l'allergie à l'arachide et aux protéines de lait de vache. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-03642496

HAL Id: dumas-03642496

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03642496>

Submitted on 15 Apr 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.

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE
UFR DE MÉDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMÉDICALES

MEMOIRE POUR LE DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES :
DE BIOLOGIE MEDICALE

Tenant lieu de

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

GODIGNON Marine

Présentée et soutenue publiquement le 07 Novembre 2019

**EVALUATION DE L'INTERET DU TEST D'ACTIVATION DES BASOPHILES COMME
OUTIL DE DIAGNOSTIC DE L'ALLERGIE A L'ARACHIDE ET AUX PROTEINES DE
LAIT DE VACHE**

Directeur de thèse :

Monsieur Bonnet Benjamin, Assistant Hospitalo-Universitaire, UFR de Médecine et des Professions paramédicales de Clermont-Ferrand – 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 Gueirard Pascale, Professeur, UFR de Pharmacie Clermont-Ferrand
- Madame Michaud Elodie, Praticien hospitalier, CHU Clermont-Ferrand

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE
UFR DE MÉDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMÉDICALES

MEMOIRE POUR LE DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES :
DE BIOLOGIE MEDICALE

Tenant lieu de

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

GODIGNON Marine

Présentée et soutenue publiquement le 07 Novembre 2019

**EVALUATION DE L'INTERET DU TEST D'ACTIVATION DES BASOPHILES COMME
OUTIL DE DIAGNOSTIC DE L'ALLERGIE A L'ARACHIDE ET AUX PROTEINES DE
LAIT DE VACHE**

Directeur de thèse :

Monsieur Bonnet Benjamin, Assistant Hospitalo-Universitaire, UFR de Médecine et des Professions paramédicales de Clermont-Ferrand – 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 Gueirard Pascale, Professeur, UFR de Pharmacie Clermont-Ferrand
- Madame Michaud Elodie, Praticien hospitalier, CHU Clermont-Ferrand



UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

PRESIDENTS HONORAIRES
UNIVERSITE D'AUVERGNE

: **JOYON** Louis
: **DOLY** Michel
: **TURPIN** Dominique
: **VEYRE** Annie
: **DULBECCO** Philippe
: **ESCHALIER** Alain

PRESIDENTS HONORAIRES
UNIVERSITE BLAISE PASCAL

: **CABANES** Pierre
: **FONTAINE** Jacques
: **BOUTIN** Christian
: **MONTEIL** Jean-Marc
: **ODOUARD** Albert
: **LAVIGNOTTE** Nadine

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE et
PRESIDENT DU CONSEIL ACADEMIQUE PLENIER
PRESIDENT DU CONSEIL ACADEMIQUE RESTREINT
VICE-PRESIDENT DU CONSEIL D'ADMINISTRATION
VICE-PRESIDENT DE LA COMMISSION DE LA RECHERCHE
VICE PRESIDENTE DE LA COMMISSION DE LA
FORMATION ET DE LA VIE UNIVERSITAIRE
DIRECTEUR GENERAL DES SERVICES

: **BERNARD** Mathias
: **DEQUIEDT** Vianney
: **WILLIAMS** Benjamin
: **HENRARD** Pierre

: **PEYRARD** Françoise
: **PAQUIS** François



UFR DE MEDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMEDICALES

DOYENS HONORAIRES

: **DETEIX** Patrice
: **CHAZAL** Jean

DOYEN
RESPONSABLE ADMINISTRATIVE

: **CLAVELOU** Pierre
: **ROBERT** Gaëlle

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. BACIN Franck - BEGUE René-Jean - BOUCHER Daniel - BOURGES Michel - BUSSIÈRE Jean-Louis - CANO Noël - CASSAGNES Jean - CATILINA Pierre - CHABANNES Jacques - CHAZAL Jean - CHIPPONI Jacques - CHOLLET Philippe - COUDERT Jean - DASTUGUE Bernard - DEMEOCQ François - DE RIBEROLLES Charles - ESCANDE Georges - Mme FONCK Yvette - MM. GENTOU Claude - GLANDDIER Gérard - Mmes GLANDDIER Phyllis - LAVARENNE Jeanine - MM. LAVERAN Henri - LEVAI Jean-Paul - MAGE Gérard - MALPUECH Georges - MARCHEIX Jean-Claude - MICHEL Jean-Luc - Mme MOINADE Simone - MM. MOLINA Claude - MONDIE Jean-Michel - PERI Georges - PETIT Georges - PHILIPPE Pierre - PLAGNE Robert - PLANCHE Roger - PONSONNAILLE Jean - RAYNAUD Elie - REY Michel - Mme RIGAL Danièle - MM. RISTORI Jean-Michel - ROZAN Raymond - SCHOEFFLER Pierre - SIROT Jacques - SOUTEYRAND Pierre - TANGUY Alain - TERVER Sylvain - THIEBLOT Philippe - TOURNILHAC Michel - VANNEUVILLE Guy - VIALLET Jean-François - Mle VEYRE Annie

PROFESSEURS EMERITES :

MM. - BEYTOUT Jean - BOITEUX Jean-Paul - BOMMELAER Gilles - CHAMOIX Alain - DAUPLAT Jacques - DETEIX Patrice - ESCHALIER Alain - IRTHUM Bernard - JACQUETIN Bernard - KEMENY Jean-Louis - Mme LAFEUILLE Hélène - MM. LEMERY Didier - LESOURD Bruno - LUSSON Jean-René - RIBAL Jean-Pierre

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

PROFESSEURS DE CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. VAGO Philippe	Histologie-Embryologie Cytogénétique
M. AUMAITRE Olivier	Médecine Interne
M. LABBE André	Pédiatrie
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. DUBRAY Claude	Pharmacologie Clinique
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
M.	CONSTANTIN Jean-Michel	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale
Mme	DUCLOS Martine	Physiologie
M.	SCHMIDT Jeannot	Thérapeutique

PROFESSEURS DE
1ère CLASSE

M.	DECHELOTTE Pierre	Anatomie et Cytologie Pathologique
M.	CAILLAUD Denis	Pneumo-physiologie
M.	VERRELLE Pierre	Radiothérapie option Clinique
M.	CITRON Bernard	Cardiologie et Maladies Vasculaires
M.	D'INCAN Michel	Dermatologie -Vénérologie
Mme	JALENQUES Isabelle	Psychiatrie d'Adultes
Mlle	BARTHELEMY Isabelle	Chirurgie Maxillo-Faciale
M.	GARCIER Jean-Marc	Anatomie-Radiologie et Imagerie Médicale
M.	GERBAUD Laurent	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
M.	SOUBRIER Martin	Rhumatologie
M.	TAUVERON Igor	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
M.	MOM Thierry	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	RICHARD Ruddy	Physiologie
M.	RUIVARD Marc	Médecine Interne
M.	SAPIN Vincent	Biochimie et Biologie Moléculaire
M.	BAY Jacques-Olivier	Cancérologie
M.	BERGER Marc	Hématologie
M.	COUDEYRE Emmanuel	Médecine Physique et de Réadaptation
Mme	GODFRAIND Catherine	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M.	ROSSET Eugénio	Chirurgie Vasculaire
M.	ABERGEL Armando	Hépatologie
M.	LAURICHESSE Henri	Maladies Infectieuses et Tropicales
M.	TOURNILHAC Olivier	Hématologie
M.	CHIAMBARETTA Frédéric	Ophthalmologie
M.	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

**PROFESSEURS DE
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 Andréi	Cytologie et Histologie
M. CORNELIS François	Génétique
M. DESCAMPS Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
M. POMEL Christophe	Cancérologie – Chirurgie Générale
M. CANAVESE Federico	Chirurgie Infantile
M. LESENS Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
M. RABISCHONG Benoît	Gynécologie Obstétrique
M. AUTHIER Nicolas	Pharmacologie Médicale
M. BROUSSE Georges	Psychiatrie Adultes/Addictologie
M. BUC Emmanuel	Chirurgie Digestive
M. CHABROT Pascal	Radiologie et Imagerie Médicale
M. LAUTRETTE Alexandre	Néphrologie Réanimation Médicale
M. AZARNOUSH Kasra	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
Mme BRUGNON Florence	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction
Mme HENQUELL Cécile	Bactériologie Virologie
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

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M. CLEMENT Gilles	Médecine Générale
Mme MALPUECH-BRUGERE Corinne	Nutrition Humaine
M. VORILHON Philippe	Médecine Générale

PROFESSEURS ASSOCIES DES UNIVERSITES

Mme BOTTET-MAULOUBIER Anne
M. CAMBON Benoît

Médecine Générale
Médecine Générale

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES -
PRATICIENS HOSPITALIERS**

***MAITRES DE CONFERENCES
HORS CLASSE***

Mme CHAMBON Martine
Mme BOUTELOUP Corinne

Bactériologie Virologie
Nutrition

***MAITRES DE CONFERENCES DE
1ère CLASSE***

M. MORVAN Daniel
Mlle GOUMY Carole
Mme FOGLI Anne
Mlle GOUAS Laetitia
M. MARCEAU Geoffroy
Mme MINET-QUINARD Régine
M. ROBIN Frédéric
Mlle VERONESE Lauren
M. DELMAS Julien
Mlle MIRAND Audrey
M. OUCHCHANE Lemlih

Biophysique et Traitement de l'Image
Cytologie et Histologie, Cytogénétique
Biochimie Biologie Moléculaire
Cytologie et Histologie, Cytogénétique
Biochimie Biologie Moléculaire
Biochimie Biologie Moléculaire
Bactériologie
Cytologie et Histologie, Cytogénétique
Bactériologie
Bactériologie Virologie
Biostatistiques, Informatique Médicale
et Technologies de Communication

M. LIBERT Frédéric
Mlle COSTE Karen
M. EVRARD Bertrand
Mlle AUMERAN Claire
M. POIRIER Philippe
Mme CASSAGNES Lucie
M. LEBRETON Aurélien

Pharmacologie Médicale
Pédiatrie
Immunologie
Hygiène Hospitalière
Parasitologie et Mycologie
Radiologie et Imagerie Médicale
Hématologie

***MAITRES DE CONFERENCES DE
2ème CLASSE***

Mme PONS Hanaë
M. JABAUDON-GANDET Matthieu
M. BOUVIER Damien
M. BUISSON Anthony
M. COLL Guillaume
Mme SARRET Catherine

Biologie et Médecine du Développement
et de la Reproduction
Anesthésiologie – Réanimation Chirurgicale
Biochimie et Biologie Moléculaire
Gastroentérologie
Neurochirurgie
Pédiatrie

M. MASDASY Salwan	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques
Mme NOURRISSON Céline	Parasitologie - Mycologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme BONHOMME Brigitte	Biophysique et Traitement de l'Image
Mme VAURS-BARRIERE Catherine	Biochimie Biologie Moléculaire
M. BAILLY Jean-Luc	Bactériologie Virologie
Mle AUBEL Corinne	Oncologie Moléculaire
M. BLANCHON Loïc	Biochimie Biologie Moléculaire
Mle GUILLET Christelle	Nutrition Humaine
M. BIDEY Yannick	Oncogénétique
M. MARCHAND Fabien	Pharmacologie Médicale
M. DALMASSO Guillaume	Bactériologie
M. SOLER Cédric	Biochimie Biologie Moléculaire
M. GIRAUDET Fabrice	Biophysique et Traitement de l'Image
Mme VAILLANT-ROUSSEL Hélène	Médecine Générale
Mme LAPORTE Catherine	Médecine Générale
M. LOLIGNIER Stéphane	Neurosciences – Neuropharmacologie
Mme MARTEIL Gaëlle	Biologie de la Reproduction
M. PINEL Alexandre	Nutrition Humaine

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DES UNIVERSITES

M. TANGUY Gilles	Médecine Générale
M. BERNARD Pierre	Médecine Générale
Mme ESCHALIER Bénédicte	Médecine Générale
Mme RICHARD Amélie	Médecine Générale

PROFESSEURS des UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS(HDR)

Mme SAUTOU Valérie (pharmacien)

M. WALRAND Stéphane

PROFESSEURS des UNIVERSITES (HDR)

Mme ALRIC Monique

Mme FORESTIER Christiane (pharmacien)

Mme BARTHOMEUF Chantal (pharmacien)

M. GAUMET Vincent

M. BEYSSAC Eric (pharmacien)

Mme GUEIRARD Pascale (pharmacien)

Mme CALDEFIE-CHEZET Florence (pharmacien)

Mme LIVRELLI Valérie (pharmacien)

M. CARDOT Jean-Michel (pharmacien)

M. MAUNIT Benoît

M. CHAVIGNON Olivier

Mme RANCHON-COLE Isabelle (pharmacien)

M. CHEZAL Jean-Michel

Mme SAUVANT-ROCHAT Marie-Pierre (pharmacien)

M. COUDERT Pascal (pharmacien)

Mme TERRAIL Laurence (pharmacien)

Mme COURTEIX Christine

Mme VENNAT Brigitte (pharmacien)

MAITRES DE CONFERENCES

Mme ALBA DELGADO Cristina

M. GONCALVES-MENDES Nicolas

Mme ARCHIMBAUD Christine (pharmacien)

Mme HENNEQUIN-ROBIN Claire (pharmacien)

M. AUZELOUX Philippe (pharmacien)

Mme LAINE Emmanuelle

M. BALAYSSAC David (HDR) (pharmacien)

Mme MAISONIAL Aurélie

M. BALESTRINO Damien (HDR)

M. MALLET Christophe

Mme BEGOU Melina (pharmacien)

Mme MIQUEL Sylvie

Mme BLANQUET-DIOT Stéphanie (HDR)

M. MOREAU Emmanuel (HDR)

M. BONNET Jean-Louis

Mme PEYRODE Caroline (pharmacien)

Mme BOYER Anne (pharmacien)

Mme QUINTANA DA INES Mercedes

M. CIA David

M. ROMOND Pierre-Charles (pharmacien)

Mme CIVIALE Marie-Ange (HDR) (pharmacien)

M. ROSSARY Adrien (HDR) (pharmacien)

M. CLUZEL Jacques (HDR)

M. ROUZAIER Paul (pharmacien)

Mme COLLIN Aurore (pharmacien)

Mme SAPIN Anne-Françoise (pharmacien)

Mme COUDERT Catherine (HDR) (pharmacien)

Mme SAVANOVITCH Chantal

M. DEBITON Eric

M. SENEJOUX François (pharmacien)

Mme DECOMBAT Caroline (pharmacien)

M. SION Benoit (pharmacien)

Mme DELORT Laetitia (HDR)

M. TALVAS Jérémie

M. DOLY Stéphane

Mme TY Nancy (pharmacien)

Mme FARGES Marie-Chantal

Mme VAREILLE Marjolaine

Mme FELGINES Catherine (HDR) (pharmacien)

Mme VIVIER Magali (pharmacien)

Mme GALMIER Marie-Josèphe (HDR) (pharmacien)

Mme WEBER Valérie

M. GARRAIT Ghislain (HDR)

M. WERSINGER Eric

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIES

Mme BEDHOMME Sabrina (pharmacien)

Mme LAFARGE Elodie (pharmacien)

Mme BERNARD Lise (pharmacien)

Mme PESTRE Odile (pharmacien)

Mme VAN LANDER Axelle

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

M. CHENNELL Philip (pharmacien)

Remerciements

A mon président de thèse

Monsieur le Professeur Bertrand Evrard, Président du jury

Vous trouverez à travers ces lignes l'expression de mes remerciements les plus sincères ; pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans votre service, pour votre écoute, vos conseils, votre vision experte et votre bienveillance.

A mon jury de thèse

Madame le Professeur Pascale Gueirard

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de l'intérêt que vous lui porterez. Recevez ici toute ma considération.

Madame le Docteur Elodie Michaud

Je tiens sincèrement à vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée dans la réalisation de ce travail et pour m'avoir permis d'assister à des consultations à vos côtés. Je vous remercie également pour votre disponibilité et l'aide que vous m'avez apporté pour répondre à mes questions.

Monsieur le Docteur Benjamin Bonnet, Directeur de thèse

Je voulais vraiment te remercier pour toute la patience et la bienveillance que tu as eue à mon égard. Je n'aurai jamais réussi à venir à bout de ce travail de thèse sans le temps que tu as passé à m'encadrer et à me conseiller. Je te remercie pour ta bonne humeur toujours constante en toutes circonstances et ta sérénité face aux difficultés, ce fut un grand plaisir de travailler à tes côtés dans ces conditions. J'ai appris beaucoup de chose grâce à toi, notamment à fermer des fenêtres sous la tempête.

A tous ceux qui ont participé

A Bruno Pereira et Céline Lambert, pour votre disponibilité, votre implication et vos conseils avisés afin de donner un sens à toutes ces données brutes.

A Elodie Michaud et Carole Egron, pour leurs investissements dans l'inclusion des patients de cette étude et leur disponibilité pour répondre à mes questions.

Aux internes du service d'Immunologie, merci d'avoir réalisé avec soin toutes les manipulations essentielles à mon travail

A tous les techniciens du service d'Immunologie, pour leur bonne humeur et leur aide dans la réalisation des manipulations réalisées lors de cette étude. Le semestre passé à vos côtés était très enrichissant.

A Mayeul Vieux-Rochas, pour ta gentillesse et pour avoir collecté les premiers résultats de cette étude.

A mes proches

A mes parents, qui m'ont toujours soutenue malgré les difficultés rencontrées et qui m'ont permis d'avancer plus sereinement. Merci pour votre amour inconditionnel et votre patience.

A ma petite sœur, Mathilde, que je n'ai pas eu l'impression de voir grandir durant ces dix années d'études mais qui me rend fière aujourd'hui de la jeune femme qu'elle est devenue.

A ma jumelle, Maud, sans qui je n'aurais pas tenu durant toutes ces années difficiles que ce soit dans le milieu professionnel ou dans ma vie privée. T'avoir à mes côtés durant cet internat a été essentiel. Je te remercie pour tout l'amour et le soutien que tu m'as offert.

A mon beau-frère, Jérémy, qui n'a jamais cessé de me faire rire depuis le premier jour où on s'est rencontré. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée et pour la bienveillance que tu m'as témoignée durant toutes ces années.

A mes amis, qui m'ont fait passer un externat et un internat beaucoup plus joyeux et qui ont rempli ma vie d'amour et de souvenirs. Je pense à Isaure et Lauren mais aussi Ismail, Vincent, Charlette et Gwen. Aujourd'hui encore nous sommes tous proches malgré la distance et j'espère que cette amitié perdurera.

A mon ami, Julien qui m'a plus que soutenue pendant mon externat et mon internat. Je n'oublierai jamais notre rencontre à Noël durant une garde mouvementée. J'ai pu ainsi te rencontrer et gagner une très belle amitié. Je suis contente qu'on se suive dans la même ville pour continuer à se voir et à construire encore pleins de souvenirs.

A mes co-internes, Eugénie, Laurie, Charlotte, Justine, Thomas, Charles et à tous mes autres co-internes qui ont su faire de ces quatre années d'internat un souvenir heureux. Je n'aurai pas pu avoir un groupe de co-internes plus agréable que vous. Merci d'avoir été à mes côtés. Grâce à vous l'internat est presque passé rapidement.

A mes chefs du service de Virologie, qui m'ont énormément soutenue et encouragée durant les deux semestres passés dans ce service. Ce fût un réel plaisir de travailler à vos côtés et un grand enrichissement tant professionnel que personnel.

Pour finir, merci à toi Anas mon amour. Tu n'as jamais cessé de me soutenir malgré toutes les difficultés et la distance. Merci d'avoir cru en moi et en nous. Enfin réunis dans la même ville, une nouvelle vie nous attend.

Sommaire

<i>Remerciements</i>	9
<i>Sommaire</i>	11
<i>Table des figures (Article)</i>	13
<i>Table des table (Article)</i>	13
<i>Table des tableaux</i>	13
<i>Liste des abréviations</i>	14
INTRODUCTION	17
PREMIERE PARTIE :	24
TEST D'ACTIVATION DES BASOPHILES A L'ARACHIDE (format article)	24
<i>Evaluation of the basophil activation test in the diagnosis of peanut allergy in children</i>	25
ABSTRACT	26
INTRODUCTION	28
MATERIALS & METHODS	31
Study population	31
Determination of allergen-specific IgE	31
Open food challenge.....	31
Basophil activation test	32
Statistical analysis	33
RESULTS	34
Study Population	34
Validation of a new BAT 6-points calculation method.....	35
CDmax and AUC seemed to be superior to CDsens in discriminating between OFC positive and OFC negative patients and predicting severity of allergic reactions.	36
Focus on BAT positive / OFC negative patients.....	37
Receiver operating characteristic curves analysis demonstrates that the combination of AUC using CD63 and AUC using CD203c after stimulation with f13 or Ara h 2 allow to determine BAT threshold.	38
DISCUSSION	40
CONCLUSION	44
REFERENCES	45
TABLES	47
FIGURES	52
DEUXIEME PARTIE : TEST D'ACTIVATION DES BASOPHILES AUX PROTEINES DE LAIT DE VACHE	58

INTRODUCTION	59
RESULTATS	61
Conclusion deuxième partie	65
<i>CONCLUSION GENERALE</i>	66
<i>REFERENCES</i>	71
<i>SERMENTS</i>	73
SERMENT D'HIPPOCRATE : Conseil national de l'ordre des médecins	74
SERMENT D'HIPPOCRATE.....	75

Table des figures (Article)

Figure 1 : Validation of a new BAT 6-points calculation method.....	52
Figure 2 : Peanut BAT CDmax and AUC were well correlated to the OFC threshold dose and clinical grade.....	55
Figure 3 : ROC curve analysis for AUC BAT results.....	56

Table des tables (Article)

Table 1 : Characteristics of the patients evaluated with peanut allergy	48
Table 2 : Characteristics of BAT+ / OFC - patients	49
Table 3 : Optimal cut-offs for BAT parameters to peanut with the largest area under the ROC curve.	50

Table des tableaux

Tableau 1 : Evaluation de la sévérité clinique lors du test de provocation par voie orale: Echelle d'Astier en 6 grades de sévérité allant de 0 à 5	20
Tableau 2 : Caractéristiques des patients évalués lors d'un TPO dans le cadre d'une suspicion d'allergie aux protéines de lait de vache.	61
Tableau 3 : Dosages des IgE spécifiques majoritairement retrouvées chez les 10 patients avec une activation des basophiles dans le contrôle négatif (patient 1 à 10).	63

Liste des abréviations

APVL: allergie aux protéines de lait de vache

AUC: aire sous la courbe (area under the curve)

BAT: test d'activation des basophiles (basophil activation test)

CMF: cytométrie en flux

EAACI: Académie européenne d'allergie et d'immunologie clinique (European Academy of Allergy and Clinical Immunology)

EC50: correspond à la dose d'allergène minimale engendrant la dégranulation de 50 % des basophiles

EDTA: Acide Ethylène-diamine-tétracétique

FA: allergie alimentaire (food allergy)

FcERI : récepteur de haute affinité aux IgE

FSC : Forward Scatter

g: gramme

IgE: immunoglobuline de type E

IL-3 : interleukine de type 3

ITO: immunothérapie par voie orale

kUA/L: unité de masse protéine IgE par litre

µg/L: microgramme par litre

LAMP: lysosome-associated membrane proteins

mL: millilitre

mg: milligramme

ng: nanogramme

NPV: valeur prédictive négative (negative predictive value)

OFC: test de provocation par voie orale (oral food challenge)

OIT: immunotherapy par voie orale (oral immunotherapy)

PA: allergie à l'arachide (peanut allergy)

PBS: tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)

pg : picogramme

PPV: valeur predictive positive (positive predictive value)

ROC: courbe ROC (receiver operating characteristic)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SSC: Side Scatter

TPO: test de provocation par voie orale

VPP: valeur prédictive positive

VPN: valeur prédictive négative

Preamble: Dans cette thèse, une première partie au format article concernant les tests d'activation des basophiles dans le cadre des allergies alimentaire à l'arachide sera développée, puis dans une deuxième partie en français l'étude des tests d'activation des basophiles aux protéines de lait de vache sera examinée. Seule la première partie sur l'arachide a été l'objet de données exploitées.

INTRODUCTION

L'allergie résulte d'un dérèglement du système immunitaire responsable d'une perte de tolérance à des substances, *a priori* inoffensives, et rencontrées dans la vie quotidienne : les allergènes. Lorsque des réponses adaptatives se font de façon exagérée ou inappropriée et provoquent des lésions tissulaires, on parle d'hypersensibilité.

Les hypersensibilités sont classées, selon l'EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology), en hypersensibilités allergiques ou non allergiques. Parmi les hypersensibilités allergiques, les réactions IgE médiées nous intéressent plus particulièrement ici. Notamment, l'allergie alimentaire, objet de cette étude, fait partie de l'hypersensibilité immédiate. Cette dernière correspond à la présence d'anticorps circulants : des immunoglobulines (Ig) de type E (IgE) capables de se fixer sur les mastocytes tissulaires et sur les basophiles du sang circulant via le récepteur de haute affinité FcεRI. Ces IgE sont à l'état libre dans le sang circulant, mais c'est la partie fixée sur les cellules qui est responsable des symptômes allergiques. La fixation des IgE à la surface des mastocytes et des basophiles en réagissant avec l'allergène correspondant déclenche l'activation et la dégranulation de ces cellules permettant la libération de médiateurs chimiques de l'allergie (histamine, tryptase, prostaglandines, leucotriènes...). Ces derniers sont à l'origine des manifestations cliniques allergiques qui dans ce cas apparaissent très rapidement après l'exposition à l'allergène, environ 10 à 20 minutes mais pouvant apparaître plus tardivement (jusqu'à 2 heures). Deux phases sont nécessaires : une première, dite de sensibilisation, au cours de laquelle le système immunitaire produit des IgE spécifiques lors du premier contact avec un allergène donné. Cette dernière étant asymptomatique. Lors d'un deuxième contact avec ce même allergène, une deuxième phase effectrice s'opère. Elle correspond à la reconnaissance

de l'allergène engendrant l'activation des mastocytes et des basophiles et la libération des médiateurs précédemment décrits.

L'allergie alimentaire notamment chez l'enfant constitue un problème de Santé Publique. En effet, environ 4.7 % de la population pédiatrique serait touchée (1). Les aliments responsables de trois quart des allergies alimentaires concernent l'arachide, le lait de vache, l'œuf, le poisson et les fruits à coque. En fonction de l'âge les allergies varient : 85 % des enfants ayant été diagnostiqués allergiques au lait de vache ne le sont plus après 3 ans (2,3), cependant d'autres allergènes tels que l'arachide et la noisette restent dangereux pour l'enfant même après 3 ans. L'allergie à l'arachide est la cause alimentaire la plus fréquente de réaction allergique sévère chez l'enfant.

Le diagnostic de l'allergie alimentaire est basé sur un faisceau d'arguments notamment sur l'histoire clinique mais également par des tests validés. Le test cutané ou prick test qui présente l'avantage d'être simple rapide et très spécifique. Cependant, si un test négatif permet d'exclure une allergie alimentaire, un test positif témoigne d'une simple sensibilisation. Une autre limite est la nécessité d'arrêter un traitement antihistaminique plusieurs jours avant le test. Le dosage des IgE spécifiques peut aussi être utile dans la démarche diagnostique. Des progrès considérables en matière d'allergie ont été faits avec l'arrivée des IgE recombinants sur le marché. Néanmoins, même s'il présente l'avantage d'être spécifique et sans risque pour le patient, comme pour le prick test un taux élevé d'IgE témoigne d'une simple sensibilisation. Des réactions croisées peuvent également avoir lieu entre différents allergènes ce qui conduit à nuancer l'interprétation des dosages. Ainsi, lorsqu'il est difficile de déterminer s'il s'agit d'une sensibilisation ou d'une allergie, le test de provocation par voie orale (TPO) peut s'avérer pertinent. Ce gold standard dans le diagnostic d'allergie alimentaire nécessite une structure médicale et un personnel soignant compétent

pour réagir efficacement en cas de réaction allergique potentiellement sévère chez le patient. L'allergène est administré par paliers, à doses croissantes, par voie orale dans le but d'objectiver ou non une réaction clinique en réponse à l'administration de l'allergène suspecté, dont la gravité est déterminée sur l'échelle d'Astier comprenant 5 stades cliniques (Tableau 1). Les doses données et le délai entre chaque prise se définit au cas par cas, le plus souvent selon l'histoire clinique du patient avec un aliment en particulier ainsi que les dosages biologiques des allergènes. Parfois, une histoire clinique d'allergie alimentaire avec une enquête allergologique négative nécessite la réalisation d'un TPO. Il permet ainsi de poser ou d'infirmier le diagnostic d'allergie alimentaire mais aussi de déterminer une dose seuil déclenchante pour l'aliment concerné. La tolérance à un aliment chez un enfant connu allergique peut également être évaluée pendant ce test. Ainsi, cela permet d'éviter une éviction inutile (4). Cependant, même si ce test se montre efficace pour établir le diagnostic et la dose réactogène à un allergène donné, ce test se révèle très anxiogène pour l'enfant et ses parents. De plus, les résultats du TPO dépendent également de la réaction psychologique de l'enfant face à la réalisation du TPO, l'appréhension et l'effet « blouse blanche » peuvent perturber la réalisation du test. L'enfant peut refuser de poursuivre le test de peur de faire une réaction allergique ou peut somatiser des symptômes (douleurs abdominales, nausées) qui seront difficiles à objectiver par le médecin. Aussi, il nécessite l'arrêt des traitements antihistaminiques plusieurs jours avant la réalisation de celui-ci.

Grade	Symptômes
0	Aucun symptôme
1	Douleur abdominale spontanément résolutive, rhinoconjonctivite, rash ou urticaire avec moins de 10 papules
2	Un organe touché (douleur abdominale nécessitant un traitement, urticaire généralisée, angioedème, toux ou baisse du débit expiratoire de pointe)
3	Deux organes touchés
4	Trois organes touchés ou asthme ou œdème laryngé ou hypotension artérielle
5	Symptômes respiratoires ou cardiaques nécessitant une hospitalisation en soins continus

Tableau 1 : Evaluation de la sévérité clinique lors du test de provocation par voie orale : échelle d'Astier en 6 grades de sévérité allant de 0 à 5.

C'est pourquoi l'émergence d'une nouvelle technique pouvant remplacer ce test a été mise au point : le test d'activation des basophiles (TAB). La première utilisation du TAB pour diagnostiquer une allergie alimentaire a été réalisée par Moneret-Vautrin en 1999 (5). En effet, il s'agit d'un test fonctionnel qui reproduit *in vitro* ce qui se passe *in vivo* pour le patient lors d'un TPO. Les indications du TAB sont multiples, notamment lors qu'il existe un risque accru de réactions allergiques sévères lors du TPO, s'il existe une discordance entre les résultats du prick test et du dosage des IgE avec l'histoire clinique ou s'il n'existe pas de dosage d'IgE disponible pour l'allergène suspecté comme c'est le cas pour certains médicaments. Des études actuelles s'intéressent également au TAB dans le cadre de suivi des patients en cours d'immunothérapie par voie orale (ITO) pour s'assurer d'une désensibilisation efficace. Cet autre aspect permettrait également de diminuer les TPO dans le cadre de protocole de suivi des patients en ITO (6).

Contrairement au TPO ce test ne nécessite qu'une simple prise de sang sans arrêt préalable des traitements antihistaminiques et aucune réaction allergique n'en découle. Le TAB se base sur le développement de la cytométrie en flux (CMF) et la présence de marqueurs au

niveau des basophiles permettant de les détecter et de suivre leur activation. En effet, deux marqueurs sont souvent étudiés : le CD63 et le CD203c qui ont des profils d'expression différents. Le CD63 appartient à la famille LAMP et s'exprime de façon bimodale, présent dans la membrane intracellulaire des granules sécrétoires du basophile, à l'état quiescent il ne s'exprime pas (7). Mais lors de l'activation du FcεRI, le CD63 s'exprime à la surface des PNB (8). Il est exprimé de façon constitutive à la surface du PNB et lors de l'activation cette expression est augmentée.

Ainsi, l'étude de ces deux marqueurs semble judicieuse pour suivre la dégranulation des PNB lors de la réaction d'hypersensibilité type I. L'étude de la régulation du CD63 et CD203c peut s'effectuer grâce à différents paramètres du TAB, notamment le CDmax, correspondant au pourcentage maximal de basophiles activés quelle que soit la concentration d'allergène testée mais aussi le CDsens qui correspond à la dose d'allergène minimale engendrant 50 % de dégranulation (EC50) des basophiles. Il est défini par $CDsens = (1/EC50) * 100$. Enfin, l'AUC (aire sous la courbe) peut être utilisée comme outil de suivi de l'évolution de l'activation des basophiles au cours des différentes dilutions d'allergène.

Dans une étude, Santos *et al.* montrent que les données du TAB permettent de distinguer les patients allergiques des patients tolérants à l'arachide, basé sur les résultats du TPO ou de la consommation d'allergène (9). Ceci a été associé à une bonne sensibilité (97.6 %), une bonne spécificité (96 %), une bonne valeur prédictive positive (VPP = 95.3 %) et une bonne valeur prédictive négative (VPN = 98%). Néanmoins, seuls le CDmax CD63 avec une stimulation par f13 à 100 ng/mL ou l'index de stimulation de CD203c (% de basophiles CD203+ stimulés par 100 ng/mL de f13 / % de basophiles CD203+ dans le contrôle négatif) ont été rapportés. C'est dans une autre étude, portant sur 124 enfants réalisant un TPO à l'arachide, que Santos *et al.* ont introduit le CDsens comme biomarqueur de l'allergie (10).

En effet, dans cette étude, ils ont identifié que la réactivité des basophiles > 1.3 (mesurée par le % de basophiles CD63+ stimulés par une concentration de f13 à 100 ng/mL rapportée au % de basophiles CD63+ stimulés par l'Anti-IgE) et la sensibilité des basophiles à l'allergène > 84 (mesurée par le CDsens CD63 (f13)) étaient des biomarqueurs de la gravité des réactions cliniques et du seuil de réaction allergique lors du TPO, respectivement. Néanmoins, ces données semblent contradictoires puisque dans une autre étude, les auteurs n'ont pas démontré de lien entre les données du TAB et la sévérité clinique des symptômes lors du TPO. Ils ont démontré uniquement un lien entre les données du TAB et la dose réactogène lors du TPO, ne permettant pas la diminution du recours au TPO (11). Une limite à ces études réside dans la méthode de calcul du CDsens puisque son calcul s'est basé sur le choix de 3 concentrations d'allergène parmi les 6 testées lors du TAB constituant ainsi une approche du CDsens et pouvant potentiellement induire des biais d'interprétation. Dans ces études, seul l'extrait global f13 a été testé. L'allergène moléculaire Ara h 2 pourtant prometteur en ce qui concerne les dosages des IgE spécifiques n'a pas été étudié dans ce contexte. En effet, peu d'étude se sont intéressées à l'Ara h 2 dans le cadre de la réalisation des TAB mais il ne s'agissait pas d'études visant à montrer la supériorité du TAB en vue de remplacer le TPO mais de mettre en évidence la capacité du TAB à différencier les patients sensibilisés à l'arachide de ceux allergiques (12).

Aussi se pose la question de l'utilité de la réalisation d'un TAB dans la prise en charge diagnostic du patient notamment face à l'augmentation du nombre de TPO nécessaire au diagnostic d'allergie alimentaire et les conséquences psychologiques pour l'enfant et les risques cliniques encourus.

Dans un souci de répondre aux besoins des pédiatres encadrant les TPO dans notre centre, nous avons mis au point une nouvelle méthode d'analyse des TAB basée sur l'exploitation

des résultats obtenus avec les 6 concentrations d'allergène testées. Ainsi, nous nous sommes intéressés à mieux définir la place d'un tel TAB et de ses différents paramètres (CDsens, CDmax, AUC) dans la prise en charge diagnostic des enfants ayant une suspicion d'allergie principalement à l'arachide ou aux protéines de lait de vache. L'objectif principal de ce travail de thèse est de valider l'utilisation en routine de ce TAB afin de diminuer considérablement le recours au TPO. Les dossiers cliniques de tous les patients inclus dans l'étude ont été étudiés afin de prendre en compte l'histoire clinique mais aussi la réaction de l'enfant pendant le TPO. Ceci a été confronté aux données du TAB, réalisé systématiquement en parallèle du TPO. De plus, la mise au point d'une nouvelle méthode de calcul du Cdsens et de l'AUC sera réalisée afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité du TAB. L'objectif secondaire sera de déterminer un seuil de réactivité des PNB afin de potentiellement prédire la dose d'allergène à laquelle le patient déclenchera une réaction allergique. Dans une deuxième partie, nous parlerons des résultats obtenus concernant l'étude du TAB aux protéines de lait de vache en nuancant les résultats en raison d'un effectif de patient faible.

**PREMIERE PARTIE: TEST D'ACTIVATION DES
BASOPHILES A L'ARACHIDE (format article)**

Evaluation of the basophil activation test in the diagnosis of peanut allergy in children

Godignon M¹, Bonnet B^{1,2}, Michaud E^{3,4}, Pereira B⁵, Céline Lambert⁵, Evrard B^{1,2}

1. Service d'Immunologie, CHU Gabriel-Montpied, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France.
2. UFR Médecine, UMR1019 UNH, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France
3. Unité d'allergologie de l'enfant, CHU Estaing, Pole pédiatrique, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France.
4. INSERM CIC 1405, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France
5. Unité de Biostatistiques, Direction de la Recherche Clinique et Innovation (DRCI), CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France.

Keywords : BAT, CDsens, AUC, CDmax, peanut whole extract, Ara h 2, CD63, CD203c.

RUNNING TITLE : TAB as a tool for diagnosis peanut allergy in children population

Conflicts of Interest and Source of Funding: None to declare

Correspondence to : Evrard Bertrand, CHU Clermont-Ferrand, Service d'Immunologie, Clermont Ferrand, F-63000, France, bevrard@chu-clermontferrand.fr

ABSTRACT

Background: Determining the threshold dose and the severity of a potential clinical reaction is necessary. The benefit of the BAT in this context was assessed by using a new 6-concentration allergen determination method and its results compared to those obtained during OFC.

Objective: This study's primary objective was to compare basophils activation test (BAT) results based on a 6-concentration allergen calculation method (using R software) and oral food challenge (OFC) results in order to evaluate the BAT as a tool for diagnosis peanut allergy. The secondary goal was to determine BAT expression markers threshold causing reactions in children during OFC in order to replace the OFC by the BAT.

Methods: A prospective study was carried out during the child's hospitalisation in a day hospital for OFC. All children were analyzed based on their BAT and OFC results. CDmax, CDsens and area under the curve (AUC) were monitored by flow cytometry after peanut whole extract (f13) or peanut molecular component Ara h 2 stimulation according to the expression of CD63 or CD203c.

Results: 55 patients were enrolled in the study and performed OFC and BAT. One BAT non-responder patient were excluded. 3 others patients were also excluded due to activation of basophils during BAT in negative control. Thus 51 peanut BAT were analysed including 31 patients with positive OFC and 20 with negative OFC.

We showed that CDsens to f13 or Ara h 2 calculated by our “R” method were closely comparable to those obtained by a method elsewhere published using a Pearson’s correlation with $r = 0.82$ and $r = 0.83$, respectively. By using this new method, we showed that CDsens and AUC to f13 or Ara h 2 were significantly increased in patients with positive OFC compared to patients with negative OFC, either for CD63 or CD203 ($p < 0.0001$). Furthermore, AUC were statistically correlated with threshold dose and the severity of allergic reaction during OFC.

We next determined an optimal cutpoint of BAT AUC to f13 or Ara h 2 using CD203c or CD63 and showed that BAT AUC to f13 using CD63 and BAT AUC to Ara h 2 using CD63 seemed to be the more relevant BAT parameters in predicating OFC results.

Conclusion : Basophil reactivity was associated with OFC results, the threshold of allergic reactions and with clinical grade during OFC. BAT thus shows its interest and performance in the diagnosis of peanut allergy. It also makes it possible to assess the clinical severity of consuming a certain amount of peanut without going through OFC, when BAT is positive.

AUC seems to be the best markers for predicting threshold dose during OFC for peanut-allergic patients, as well as to differentiate allergic patients from only sensitized patients. Peanut BAT would therefore be an excellent alternative to OFC, considerably decreasing the number of potentially dangerous OFC for children.

INTRODUCTION

Food allergy (FA) affects about 4.7% of the paediatric population (1) and become an important public health concern. Peanut allergy (PA) is a common disease, with prevalence rates within the Pediatric population ranking from 1 % to 3 % (2). PA is often severe and lifelong allergy(3).

Peanut allergy is the food allergy with the most severe clinical reactions. Thus, the consumption of a minimal amount of peanut in an allergic child can have serious consequences, up to and including death(4,5). The current management consists of the strict avoidance of peanut. However, in the industrial world peanut is present in a wide variety of food, even if it is traces of peanut the risk is present. Thus, the eviction of peanut requires the child and his entourage to be highly involved and vigilant with regard to the child's nutrition.

Peanut allergy is often severe and lifelong allergy, which can have detrimental effects on quality of life and trigger anxiety (3).

The diagnosis of food allergy is based on a set of arguments including the clinical history of the patient and different types of tests objectivising the allergic sensitization by the demonstration of specific IgE (prick test type skin tests, serum assays of specific IgE ...) (6,7). Nevertheless, these tests are sometimes in default and the use of oral food challenge (OFC) is often necessary. These OFC are considered as the gold standard and are now the only tests that allow, theoretically, the diagnosis and the follow-up of allergic patients, thanks to the detection of a peanut threshold dose inducing a reaction in the patient. However, they are very restrictive, sometimes difficult to interpret and potentially anaphylactic shock

related to the re-administration of increasing doses of the allergen (8). Recently, the emergence of basophil activation tests (BAT) as a diagnostic tool has led to hope to improve the management of patients. BAT is a functional test designed to reproduce in vitro the allergic hypersensitivity reaction taking place in vivo. It thus makes it possible to determine the equivalent of a reactive threshold in vitro. A simple blood test on EDTA tube allows to perform the test, thus avoiding the risk of oral reintroduction. Several studies have suggested that BAT is a useful tool for the diagnosis of food allergies, with sensitivity ranging from 77 to 98 % and specificity 75–100 % (9–11). However, even if these studies give promising results for BAT, the calculation methods for biomarkers were different. In the study by Santos *et al.* the analysis of the results concerning the regulation of CDsens only concerns three concentrations of allergens out of the six tested during the BAT (12). As a consequence, the calculation does not take into account all the values obtained. We developed a new BAT parameters determination method using R software based on the 6 allergens concentrations tested. By using this new approach, we hypothesized that patients with peanut allergy have greater basophil reactivity which can reliably differentiate between allergic patients, non-allergic patients and sensitized patients.

The main objective of this work is to validate the routine use this BAT approach in order to considerably reduce the use of OFC. The clinical records of all patients included in the study were reviewed to take into account the clinical history but also the child's response during the OFC. This was compared with the data from the BAT, which was systematically carried out in parallel with the OFC. In addition, this new method for calculating BAT CDsens and BAT AUC will be carried out in order to improve the sensitivity and specificity of the BAT.

It is important to determine the allergen threshold dose that leads to the highest reactivity of basophils, it would reflect the minimum amount of peanut that can cause an allergic

reaction in real life. That's why, the secondary objective was to determine a threshold value for CDmax, CDsens and AUC to predict the outcome of the OFC. Knowledge of this value would thus prevent a serious allergic reaction in children.

MATERIALS & METHODS

Study population

Subjects were prospectively recruited from February 2018 to May 2019 at the department of Pediatric, Clermont-Ferrand Hospital. Based on their clinical reactions after ingesting peanut, patients with a history of severe allergic reactions to peanuts for which an open food challenge (OFC) is performed were consecutively enrolled, in order to confirm their allergy. All patients underwent clinical evaluation, sIgE to peanut and its components, and basophil activation test at the same day of OFC.

Determination of allergen-specific IgE

Quantifications of sIgE to peanut, and its allergenic components (Ara h 2...) were performed with ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden). Specific IgE antibodies > 0.35 kUA/L were considered positive.

Open food challenge

OFC are standardized, generally doses increase gradually every 30 minutes (0.1 g, 0.2 g, 1 g, 2 g, 5 g, 20 g) until eventually appear signs of allergic reactions.

However, the protocols vary according to the clinical history of the patient, if in the case of a patient with a slight suspicion of allergy the doses increase rapidly, in the case of a strong suspicion with antecedent of severe reaction the doses follow a much more progressive growth (0.05 g, 0.1 g, 0.2 g, 0.5 g, 1 g, 2 g, 5 g, 10 g) or even (0.01 g, 0.02 g, 0.05 g, 0.1 g, 0.2 g, 0.5 g, 1 g, 2 g).

The establishment of the clinical grade is based on Astier scale from 0 to 5, with 0 for the absence of reactions and 5 for most severe symptoms. We included all children regardless of the outcome of their OFC.

Basophil activation test

BAT were performed on whole blood using the Flow Cast® and B-CCR® kit (Bühlmann, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Briefly, Heparinized whole blood was stimulated for 15 min at 37 °C with increasing concentrations of peanut extract (6 concentration tested in 10-fold dilution ranging from 20.8 to 0.00208 ng/mL, Bühlmann) and its major allergen Ara h 2 (6 concentration tested in 10-fold dilution ranging from 4.17 ng/mL to 0.417 pg/mL, Bühlmann). Monoclonal antibody recognizing the high-affinity IgE binding receptor (FcεRI) and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine were used as positive controls. Before erythrocyte lysis, cells were stained with CD63-FITC, CD203c-PEcy5.5 and CCR3-PE. Basophils were gated as SSCLow/CCR3+, and among these, the CD63+ cells were termed activated basophils. Cells were acquired on an LSR II (Becton Dickinson). At least 300 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 % CD63 positive basophils (% CD63+) or % CD203c positive basophils (% CD203c+) among SSCLow/CCR3+ cells.

CDmax has been defined as the maximal activation and corresponds to the maximum proportion of activated basophils (CD63 or CD203c) at any concentration of allergen (13).

The cut-off value for positive basophil activation in this study was set to >15 % CD63 and CD203c basophils (14).

To determine the basophil allergen threshold sensitivity we use CDsens which corresponds to the allergen concentration eliciting half of the maximal basophil activation. CDsens is obtained by multiplying by 100 the inverse of the EC50. EC50 corresponding to the lowest allergen dose leading to 50% of the maximum activation of basophil (15). ($CDsens = 1/EC50 * 100$). CDsens was obtained by linear interpolation, using R software (version 3.3.3). CDsens would also reflect the severity of the allergic reaction (13). We set up a CDsens and AUC determination method using R software based on the 6 allergens concentrations tested and we compared data with recognized methods of BAT results elsewhere published (12,13). We hypothesized that patients with severe allergic reactions during OFC will have a CDmax for CD63 and for CD203c higher than those who have less reacted during the test. The last parameter studied is the area under the curve (AUC) determined for f13 or Ara h 2 stimulation using R software, which allows the evolution of the activation of basophils to be monitored throughout the dilutions. This one associates both reactivity and sensitivity (10).

Statistical analysis

Data analysis was performed using the statistical package (version 15, StataCorp, College Station, USA). Association between variables were analyzed by Pearson's correlation test, and continuous variables were compared between groups by the Mann-Whitney U test. Analysis of receiver operating characteristic (ROC) curves was performed for f13 - BAT and Ara h 2-BAT to calculate the area under curve (AUC) to obtain the most accurate measurement. Differences were considered statistically significant at $P < .05$.

RESULTS

Study Population

In total 55 patients were enrolled. 3 patients were excluded due to an activation of basophils in negative control during the BAT. 1 non-responder was detected for peanut BAT and has been also excluded. Thus, 51 peanut BAT were analysed. The median age was 10 years (range 3-16 years) and 60.8 % were male. The demographic characteristics and results of the bioassays leading to BAT of the included patients are summarized in Table 1.

All patients undergo OFC and biological tests for a history of severe peanut allergy. 31 patients had a positive peanut OFC (60.8 %) and 20 patients had a negative peanut OFC (39.2 %). Two groups were formed based on the outcome of the OFC. The median of sIgE level to f13 and Ara h 2 from patients with negative OFC were respectively 1.03 kUA/L (range 0.1-100 kUA/L), and 0.36 kUA/L (range 0.1-63.4 kUA/L), whereas the median of sIgE level from patients with positive OFC were significantly higher with 54.3 kUA/L (range 0.1-100 kUA/L) for f13 and 28.5 kUA/L (range 0.1-100 kUA/L) for Ara h 2. The median peak level of tryptase was higher for patients with positive OFC was 5.35 µg/L, ranging from 2.2 to 11.9 µg/L compared to patients with negative OFC 3.8 µg/L, ranging from 1.2 to 16 µg/L. Also, the median of threshold dose during OFC was significantly higher for patients with positive OFC (870 mg, ranging from 80 to 21500 mg) compared to patients with negative OFC (1865 mg, ranging from 6400 to 21880 mg). The 51 patients who conducted an OFC were sampled on the same day to perform a BAT in order to compare the results obtained between the two tests.

Validation of a new BAT 6-points calculation method.

We, first, wanted to validate our BAT CDsens determination method using R software based on the 6 allergens concentrations tested.

Interestingly, on the 51 patients tested in BAT, 38 patients had a positive BAT results (74.5 %) and 13 were negative (25.5 %). We evaluated CDsens result in 20 patients after f13 or Ara h 2 stimulation (based on the expression of CD63 or CD203c) calculated by our “R method” and compared them to those obtained by a method elsewhere published using a Pearson’s correlation. We showed that the two methods give comparable results for CDsens (f13-CD63) and CDsens (f13-CD203c) with Pearson’s coefficient $r = 0.82$ and $r = 0.83$ respectively (Figure 1A). Using Bland-Altman diagram, we showed that the two methods give only one deviant point for CDsens (f13-CD63) and one deviant point for CDsens (f13-CD203c) (Figure 1A). One of these points corresponded to a very allergic patient in OIT protocol, moreover this patient was part of the 7 discordant patients (BAT + / OFC-). The second one was a patient with a strongly negative BAT and no allergic reaction during OFC (Figure 1 A).

Same results were obtained for CDsens to Ara h 2 using CD63 and CDsens to Ara h 2 using CD203c with Pearson’s correlation $r = 0.77$ and $r = 0.77$ respectively (data not shown).

We next wanted to show that BAT parameters determined by our “R” method could discriminate patient with positive or negative OFC.

Interestingly, AUC analysed after f13 or Ara h 2 stimulation based on the expression of CD63 or CD203c, were significantly higher, in patients with a positive OFC compared to patients with a negative OFC (AUC (f13-CD63), AUC(f13-CD203c), AUC (Ara h 2 -CD63) and AUC (Ara h 2 -CD203c), $p < 0.001$, Figure 1 B). Same analysis were performed for CDsens after f13 or Ara h 2 stimulation using CD63 or CD203c and, surprisingly, all CDsens analysed were higher, but

not significant, in patients with a positive OFC compared to patients with a negative OFC, except for CDsens (f13-CD203c) which was significantly increased ($p < 0.0001$) (Figure 1 B). Also, patients who conducted a positive OFC have significantly higher CDmax compared to patients with a negative OFC, for all parameters tested (CDmax (f13-CD63) CDmax (f13-CD203c) CDmax (Ara h 2 -CD63) and CDmax (Ara h 2 -CD203c), $p < 0.001$, Figure 1 B).

Altogether, these data showed that this new approach to determining BAT parameters is validated and allows discriminating patients with positive OFC from those with negative OFC.

CDmax and AUC seemed to be superior to CDsens in discriminating between OFC positive and OFC negative patients and predicting severity of allergic reactions.

We next wanted to study the relationship between the threshold dose or the severity of clinical reaction during OFC and BAT parameters. To test this issue, 3 groups were detailed by isolating patients with positive BAT results and negative OFC ($n=7$), patients with positive BAT results and positive OFC ($n=31$) and patients with negative BAT results and negative OFC ($n=13$). Thus, we were able to analyze the correlation between BAT results and the eliciting dose during OFC.

Regarding the existing association between the threshold dose and the BAT parameters, the correlation of Pearson showed that CDmax and AUC were strongly associated with the threshold dose during OFC, whatever the stimulation condition (f13 or Ara h 2) and the analysis of CD63 or CD203c, ($r > 0.6$ for all, Figure2A).

Regarding CDsens, no association was found with the threshold dose either after f13 or Ara h 2 stimulation based on the expression of CD63 or CD203c (data not shown).

We next studied the relationship existing between BAT parameters and severity of allergic reactions during the OFC. Based on the Astier scale, patients were classified according to the severity of the allergic reaction triggered during OFC into 5 group of severity from 0 (no symptom) up to 5 (cardiorespiratory signs).

CDmax and AUC after f13 and Ara h 2 stimulation using CD63 and CD203c were strongly associated to the severity of clinical signs presented during OFC. ($r > 0.75$ for all, Figure 2B).

Regarding BAT parameters using CD203c, similar results were obtained either after f13 or Ara h 2 stimulation with CDmax and AUC, strongly relation with the severity clinical signs during OFC was observed. ($r > 0.66$ for all, Figure 2B).

Surprisingly, CDsens seemed to be not associated to the severity of clinical reaction during OFC either using CD63 or CD203c and whatever the stimulation condition (f13 or Ara h 2) ($r < 0.6$ for all, figure 2B).

This is mainly due to a higher CDsens observed in patient with a clinical grade = 0 than in patient with a clinical grade > 1.

Altogether, these data showed that AUC and CDmax were closely related to the threshold dose and the severity of allergic reactions during the OFC.

Focus on BAT positive / OFC negative patients

Mainly, a discrepancy was observed for 7 patients because they described a positive BAT results whereas they have been classified in OFC negative group. Five of them were undergoing OIT protocol. However, all patients had a significant increase in serum tryptase level after OFC compared to before OFC with a median increase of 35.9 %, ranging from 8.1 % to 100 %. Interestingly one patient had a 100% increase in tryptase level but only received

6400 mg at the OFC. Also 3 patients had presented a clinical reaction at the end of the OFC test, but not significant to be retained (Table 2).

Interestingly, among these BAT+/OFC- patients, threshold dose were very high except for one patient for whom the cumulative dose was 6400 mg, suggesting that BAT is more sensitive than OFC (threshold dose ranging from 6400 to 29000 mg with a median of 20800 mg) (Figure 2A).

Receiver operating characteristic curves analysis demonstrates that the combination of AUC using CD63 and AUC using CD203c after stimulation with f13 or Ara h 2 allow to determine BAT threshold.

Receiver operating characteristic curves were used to compare the performance of the different BAT parameters in the diagnosis of peanut allergy according to the OFC results (Figure 3). Regarding the analysis based on the expression of CD63, BAT AUC to peanut whole extract (f13) (AUC 0.944, 95 % confidence interval 0.876 – 1.000, $p < 0.001$) had the largest AUC compared with BAT CDmax (AUC 0.940, 95 % confidence interval 0.869 – 1.000, $p < 0.001$) or BAT CDsens (AUC 0.577, 95 % confidence interval 0.367 – 0.786, $p = 0.39$).

In the same way, analysis based on the expression of CD203c showed that the BAT AUC to f13 (AUC 0.940, 95 % confidence interval 0.870 – 1.000, $p < 0.001$) had the largest AUC compared with BAT CDmax (AUC 0.908, 95 % confidence interval 0.821 – 0.995, $p < 0.001$) or BAT CDsens (AUC 0.748, 95 % confidence interval 0.559 – 0.937, $p = 0.006$). Interestingly, combination of BAT AUC to f13 using CD63 and BAT AUC to f13 using CD203c showed an optimized ROC curve compared with BAT AUC using CD63 or BAT AUC using CD203c alone (Figure 3 and Table 3). Based on this analysis, an empirical optimal cut-point for BAT AUC was determined to predict the positive or negative result of the OFC. The Empirical optimal

cutpoint of 696.5 for BAT AUC to f13 using CD63 revealed the best diagnostic performance with 93.5 % sensitivity, 90 % specificity, 93.5 % positive predictive value (PPV), and 90 % negative predictive value (NPV) altogether with The Empirical optimal cutpoint of 386.4 for BAT AUC to f13 using CD203c with 93.5 % sensitivity, 85 % specificity, 90.6 % positive predictive value (PPV), and 89.5 % negative predictive value (NPV) (Table 3). Interestingly, comparable results were obtained after Ara h 2 stimulation (Figure 3 and Table 3).

DISCUSSION

The diagnosis of food allergy most relies on the clinical history of allergy and IgEs assay.

However, these tests do not distinguish between sensitized patients and patients at risk of developing a clinical reaction. Several studies report that peanut BAT is very specific, a positive BAT would reflect a positive OFC and therefore a proven allergy to a specific allergen (12,13). In a peanut study, thanks to BAT, authors noted a reduced use of OFC by 67 % (9). BAT using CD63 is the best clinically validated test (16), but BAT using CD203c has been shown to be a reliable test (17). To estimate the optimal benefit that could be obtained from the BAT, we investigated three BAT markers, CDmax, CDsens and AUC, and compared them to the results obtained during the OFC. Measurement of CD63 and CD203c up-regulation on basophil represents a valuable aid for the diagnosis and care of the child. In our study we found an excellent correlation between OFC results and two BAT markers: CDmax and AUC to f13 or Ara h 2 based on the expression of CD63 or CD203c (Figure 2).

Ying Song *et al.* showed that BAT was a predictive indicator of the clinical response to ingestion of the suspected food and therefore showed an excellent correlation of BAT with OFC severity scores (18). It seemed to be a predictor factor of clinical reactivity to peanut allergen but also tree nuts, sesame, fish and shrimp (18). In a study including 96 children with exclusively positive OFC, T. Reier-Nielson *et al.* showed association between CDmax using CD63 and threshold dose during OFC but not with clinical severity reaction (14). The significant correlation between basophil activation test given by CDmax and threshold dose reaction was also found in other studies (10,15).

To solve the problem of cross-reactions for the determination of specific IgE antibodies, a study was conducted on the regulation of CD63 in the context of mugwort pollen-related peach allergy. The results showed that BAT with CDmax using CD63 to Pru p 3 was more

effective than IgE s assays in diagnosing allergy and predicting clinical severity (19). Another study showed the superiority of BAT over sIgE in predicting the outcome of OFC (18).

In the present study, we found an excellent BAT sensitivity and specificity, meaning that a positive BAT indicates an allergic reaction to a specific allergen. This finding was also found in other studies, which concluded that a positive BAT confirming the diagnosis of IgE-mediated food allergy (16,17,20).

Our results concerning the CDsens are not in agreement with those obtained in another study. Indeed, authors highlight a correlation between CDsens and OFC results underlining as well as a negative CDsens excluding a peanut allergy, either for f13 and Ara h 2 (21), which we have not been able to demonstrate. This contradictory result can mainly be explained by the method used for CDsens calculation. To determine CDsens, several author use a manual selection of 3 points on the BAT curve and therefore leads to an approach of CDsens (21,22). Here we used a 6-points based automatic method to determine CDsens instead of 3-point method. Importantly we showed that this 6-points method give comparable result for CDsens than the 3-point one elsewhere published for allergic patients (Figure 1) (12).

Surprisingly, we showed that patients with negative BAT (and negative OFC) with very low activation percentages ($CD_{max} < 5\%$) have very high CDsens which can be directly explained by our 6-point method. A low activation resulted in a flat curve and therefore the inverse of half of the maximum activation tends towards a high value. These results may probably distorted the statistics concerning the comparison with the negativity or positivity of the OFC. Nevertheless, CDsens determined by this new method is strongly associated to severe allergic reaction (grade 1 to 4). But for asymptomatic patients (grade 0), it was found to be a poor indicator of severity due to very high values (Figure 2B).

These data suggest that BAT could be a useful tool in the diagnosis of peanut allergy and could predict the severity of the allergic reaction to peanut consumption. Nevertheless, the results of BAT must be combined with the patient's clinical history and eventually with other biological analyses (sIgE) to be correctly interpreted.

Regarding the 7 patients who had a positive BAT but a negative OFC, we observed that one patient was treated by ITO and had a 100 % increase in tryptase levels (from 4.4 to 8.8 µg/L), and the OFC ended after a cumulative dose of only 6.4 g of peanut. It is also possible that if the cumulative dose had been increased, the patient might have shown signs of an allergic reaction suggesting that BAT is more sensitive than OFC. For the other patients, there was also an improvement in tryptase levels and positive sIgE. In addition, BAT was only positive for the pure allergen concentration, which is also in favour of a more sensitive test than the OFC.

A limitation is that results may vary depending on the BAT protocols used by each laboratory. It would therefore be necessary to standardise the protocols and allergen extracts used. There are still limits to this test, in particular the reduced time after the blood sample is taken to perform the analysis but also the fact that for some patients it is impossible to stimulate their basophils. We talk about non-responders patients. In our study we had only 1 non-responder patient (1.8 %), according to different studies the rate found is between 5-10 % (20). For non-responders patients, the use of OFC is therefore indispensable.

Our study confirms the usefulness of BAT in the diagnosis of peanut allergy. The establishment of limit thresholds for AUC with an excellent PPV (93.5 %) and NPV (90 %) would make it possible to predict the results of the OFC. The number of OFC could therefore be considerably reduced in the event of a positive BAT. BAT will offer a diagnostic benefit

but also for monitoring food allergy (10,23). Here two markers, CDmax and AUC, showed their interest in peanut allergy. It would be interesting to carry out a study with a larger number of people in order to confirm data.

CONCLUSION

The decision to perform an OFC is not without risk, the possibility of avoiding the patient to undergo one has led to the development of an alternative technique. Without an appropriate diagnostic workup, the risk of both over and underdiagnosis is increased and does not allow for appropriate care to be provided. Identifying patients at high risk of a severe reaction to food is an essential element in ensuring appropriate management in order to avoid an allergic reaction and possibly propose a tolerance induction protocol. BAT has shown its interest in several studies for several allergens, including food allergy, venom hypersensitivity(24), drugs (25) and pollen allergy (26).

The sensitivity and specificity obtained in our study demonstrates the potential of BAT to diagnose mediated IgE allergy to peanut. BAT is useful in determining the severity of peanut allergy. The interpretation of BAT requires taking the patient's history as a whole and its interpretation could be done via the monitoring of CDmax and AUC. In addition, it is interesting to note that unlike OFC, BAT does not require the stopping of antihistamine treatment (10).

BAT also has other interests besides the diagnosis of IgE-mediated allergic reaction. Indeed, it can be a tool for allergy monitoring as part of a tolerance induction protocol. In the near future, BAT could perhaps replace OFC, the gold standard for the diagnosis of food allergy, when the patient's clinical history is in favour of a food allergy.

REFERENCES

1. MONERET-VAUTRIN DA. Épidémiologie de l'allergie alimentaire. 3e Congrès francophone d'allergologie, 9,10,11 avril 2008, Paris. 2008;48(3):171-8.
2. Fisher HR, Keet CA, Lack G, du Toit G. Preventing Peanut Allergy: Where Are We Now? *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. févr 2019;7(2):367-73.
3. King RM, Knibb RC, Hourihane JO. A Study to Assess the Quality of Life in Children with Peanut Allergy, their Parents and Siblings. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. févr 2006;117(2):S269.
4. Blumchen K, Beder A, Beschorner J, Ahrens F, Gruebl A, Hamelmann E, et al. Modified oral food challenge used with sensitization biomarkers provides more real-life clinical thresholds for peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. août 2014;134(2):390-398.e4.
5. Patil SP, Wang J, Song Y, Noone S, Yang N, Wallenstein S, et al. Clinical safety of Food Allergy Herbal Formula-2 (FAHF-2) and inhibitory effect on basophils from patients with food allergy: Extended phase I study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. déc 2011;128(6):1259-1265.e2.
6. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy*. août 2014;69(8):1008-25.
7. M.Worm,I. Reese, B. Ballmer-Weber, et al. M.Worm,I. Reese, B. Ballmer-Weber, et al. Guidelines on the management of IgE-mediated food allergies: S2k-Guidelines of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI) in collaboration with the German Medical Association of Allergologists (AeDA), the German Professional Association of Pediatricians (BVKJ), the German Allergy and Asthma Association (DAAB), German Dermatological Society (DDG), the German Society for Nutrition (DGE), the German Society for Gastroenterology, Digestive and Metabolic Diseases (DGVS), the German Society for Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery, the German Society for Pediatric and Adolescent Medicine (DGKJ), the German Society for Pediatric Allergology and Environmental Medicine (GPA), the German Society for Pneumology (DGP), the German Society for Pediatric. *Allergo J Int*. 2015;(24):256-93.
8. Yanagida N, Sato S, Asaumi T, Ogura K, Ebisawa M. Risk Factors for Severe Reactions during Double-Blind Placebo-Controlled Food Challenges. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017;172(3):173-82.
9. 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.
10. 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.
11. 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. *Clinical & Experimental Allergy*. août 2009;39(8):1234-45.

12. 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.
13. Santos AF, Lack G. Basophil activation test: food challenge in a test tube or specialist research tool? *Clin Transl Allergy*. déc 2016;6(1):10.
14. 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. *Clinical & Experimental Allergy*. avr 2018;48(4):415-23.
15. 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. *Clinical & Experimental Allergy*. sept 2015;45(9):1412-8.
16. de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, et al. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146(3):177-89.
17. Ciepela O, Zwiazek J, Zawadzka-Krajewska A, Kotula I, Kulus M, Demkow U. Basophil activation test based on the expression of CD203c in the diagnostics of cow milk allergy in children. *Eur J Med Res*. 4 nov 2010;15 Suppl 2:21-6.
18. 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. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. avr 2015;114(4):319-26.
19. Santos AF, Shreffler WG. Road map for the clinical application of the basophil activation test in food allergy. *Clinical & Experimental Allergy*. sept 2017;47(9):1115-24.
20. 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.
21. Glaumann S, Nopp A, Johansson SGO, Rudengren M, Borres MP, Nilsson C. Basophil allergen threshold sensitivity, CDsens, IgE-sensitization and DBPCFC in peanut-sensitized children: CDsens, IgE-ab and peanut allergy. *Allergy*. févr 2012;67(2):242-7.
22. Chapuis A, Thevenot J, Coutant F, Messaoudi K, Michaud E, Pereira B, et al. Ara h 2 basophil activation test does not predict clinical reactivity to peanut. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. sept 2018;6(5):1772-1774.e1.
23. Santos AF, Lack G. Basophil activation test: food challenge in a test tube or specialist research tool? *Clinical and Translational Allergy* [Internet]. déc 2016 [cité 3 juin 2019];6(1). Disponible sur: <http://www.ctajournal.com/content/6/1/10>
24. Sturm GJ, Bohm E, Trummer M, Weiglhofer I, Heinemann A, Aberer W. The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study. *Allergy*. oct 2004;59(10):1110-7.
25. Laguna JJ, Bogas G, Salas M, Mayorga C, Dionicio J, Gonzalez-Mendiola R, et al. The Basophil Activation Test Can Be of Value for Diagnosing Immediate Allergic Reactions to Omeprazole. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. sept 2018;6(5):1628-1636.e2.
26. Ogulur I, Kiykim A, Baris S, Ozen A, Yuce EG, Karakoc-Aydiner E. Basophil activation test for inhalant allergens in pediatric patients with allergic rhinitis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. juin 2017;97:197-201.

TABLES:

Table 1 : Characteristics of the patients evaluated with peanut allergy: demography and measurements of IgE leading to BAT, tryptase level monitoring, as well as the threshold dose during OFC. Values are expressed as median (range) or numbers (percentages). BAT, Basophil activation test.OFC, Oral food challenge

Characteristics		OFC total n=51	OFC negative n=20	OFC positive n=31
Age (y)		10 (3-16)	8 (3-15)	11,5 (5-16)
Males		31 (60,8)	11 (57,9)	20 (62,5)
sIgE (kUA/L)	f13	15,2 (0,1-100)	1,03 (0,1-100)	54,3 (0,1-100)
	Ara h 2	10,2 (0,1-100)	0,36 (0,1-63,4)	28,5 (0,1-100)
Basal serum tryptase (µg/L)		3,4 (1,1-14,8)	3,4 (1,1-14,8)	3,35 (1-6,3)
Peak level of serum tryptase (µg/L)		4,6 (1,2-16)	3,8 (1,2-16)	5,35 (2,2-11,9)
Threshold dose during OFC (mg)		3850 (80-21880)	1865(6400-21880)	870 (80-21500)

Table 2 : Characteristics of BAT+ / OFC - patients: demography and measurements of IgE leading to BAT, tryptase level monitoring, as well as the threshold dose during OFC. Values are expressed as median (range) or numbers (percentages). The last column on the right represents the 7 discordant patients who had a positive BAT but with a negative OFC. These patients were included in the number of negative OFC. BAT, Basophil activation test. OFC, Oral food challenge.

Characteristics		OFC total n=51	OFC negative n=20	OFC positive n=31	OFC-/BAT+ n=7
Age (y)		10 (3-16)	8 (3-15)	11,5 (5-16)	11 (4-13)
Males		31 (60,8)	11 (57,9)	20 (62,5)	3 (42,9)
sIgE (kUA/L)	f13	15,2 (0,1-100)	1,03 (0,1-100)	54,3 (0,1-100)	3,5 (0,67-100)
	Ara h 2	10,2 (0,1-100)	0,36 (0,1-63,4)	28,5 (0,1-100)	1,57 (0,31-63,4)
Basal serum tryptase (µg/L)		3,4 (1,1-14,8)	3,4 (1,1-14,8)	3,35 (1-6,3)	4,2 (2,2-14,8)
Peak level of serum tryptase (µg/L)		4,6 (1,2-16)	3,8 (1,2-16)	5,35 (2,2-11,9)	5,5 (2,4-16)
Threshold dose during OFC (mg)		3850 (80-21880)	1865(6400-21880)	870 (80-21500)	20800 (6400-29000)

Table 3 : Optimal cut-offs for BAT parameters to peanut with the largest area under the ROC curve. BAT, Basophil activation test. AUC, Area under the ROC curve. EOT, Empirical optimal cutpoint. Se, Sensitivity. Sp, Specificity. PPV, Positive predictive value. NPV, negative predictive value.

	f13						Ara h 2					
	AUC	EOC	Se (%)	Sp (%)	PPV (%)	NPV (%)	AUC	EOC	Se (%)	Sp (%)	PPV (%)	NPV (%)
CDmax CD63	0.94	57.29	93.5	90	93.5	90	0.93	55.90	90.3	95	96.6	86.4
CDmax CD203C	0.90	29.73	87.1	85	90	81	0.84	28.37	83.9	85	89.7	77.3
CDsens CD63	0.58	81.73	60	37.5	64.3	33.33	0.63	268.98	82.8	53.3	77.4	61.5
CDsens CD203c	0.75	45.73	90.3	68.8	84.8	78.6	0.83	420.50	80.6	78.6	89.3	64.7
AUC CD63	0.94	696.47	93.5	90	93.5	90	0.92	696.47	93.5	90	93.5	90
AUC CD203c	0.94	386.43	93.5	85	90.6	89.5	0.89	386.43	93.5	85	90.6	89.5

FIGURES :

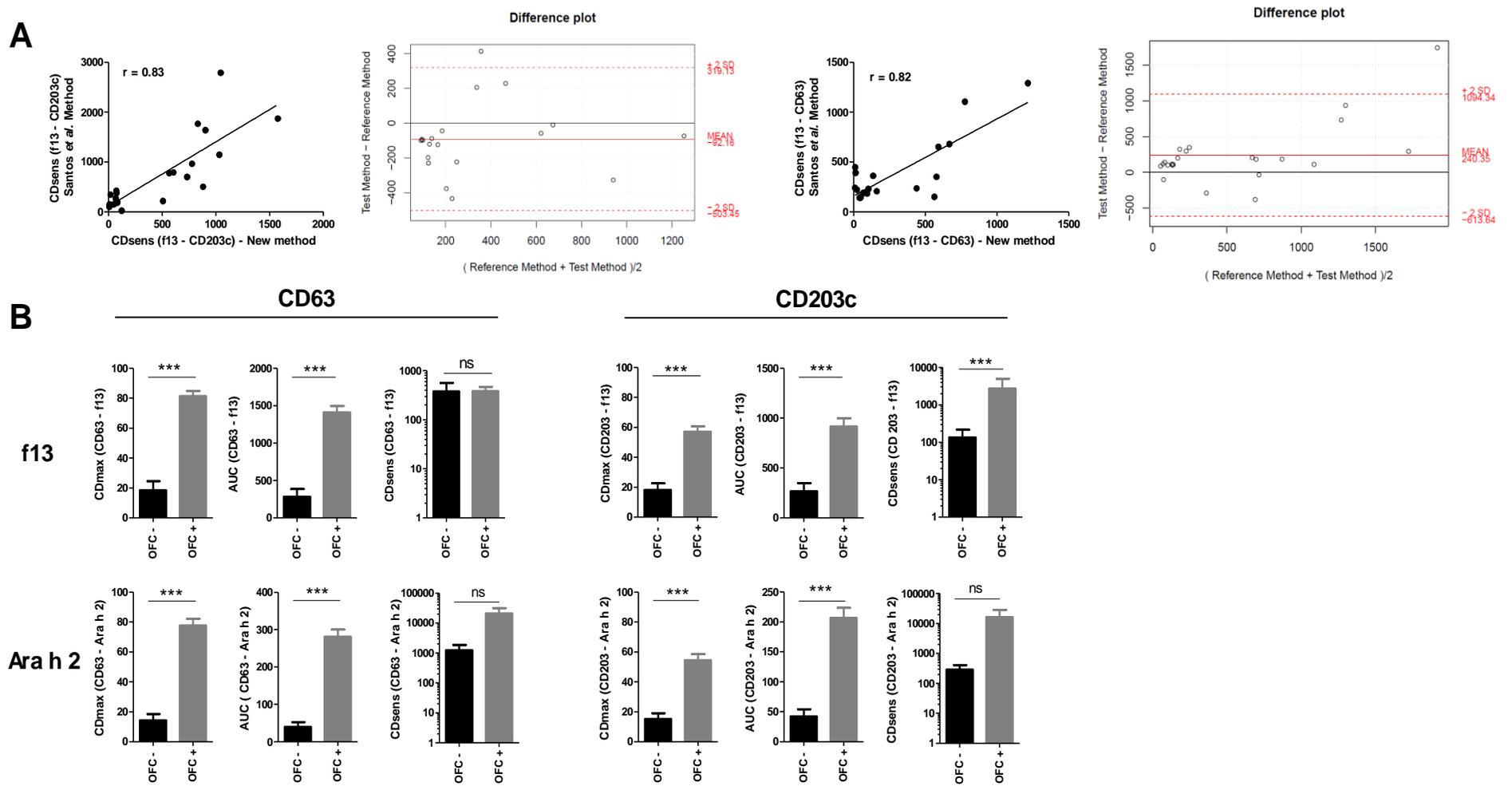


Figure 1 : Validation of a new BAT 6-points calculation method.

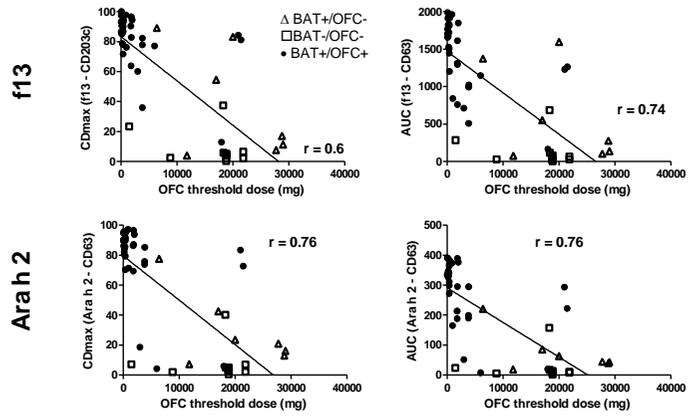
Legend Figure 1:

(A) Pearson correlation of BAT f13 – CD63 CDsens (left panel) or BAT f13 – CD203c CDsens (Right panel) according two different calculation methods. On the y-axis: CDsens determination according to Santos *et al.* method, taking into account 3 out of 6 allergen concentrations tested. On the x-axis: CDsens determination based on the analysis of the 6 allergen concentration. Pearson coefficient are represented. **(B)** f13 BAT results showing CD63 CDmax, CDsens and AUC according to the OFC results (upper left panel) ; f13 BAT results showing CD203c CDmax, CDsens and AUC according to the OFC results (upper right panel) ; Ara h 2 BAT results showing CD63 CDmax, CDsens and AUC according to the OFC results (lower left panel) ; Ara h 2 BAT results showing CD203c CDmax, CDsens and AUC according to the OFC results (lower right panel)

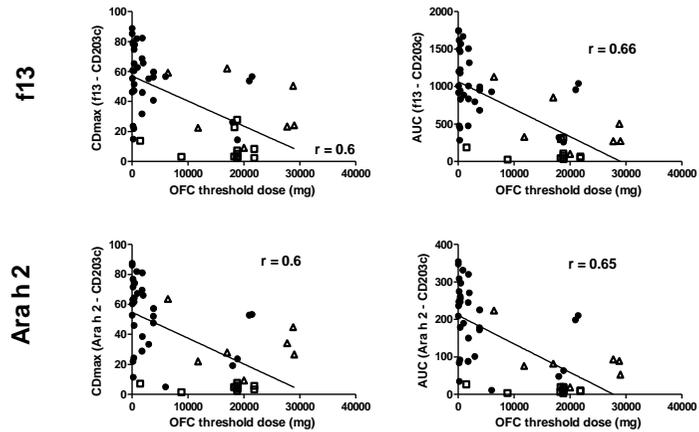
***p< .001 for the comparison between group (unpaired t test), ns: non significant

A

CD63



CD203c



B

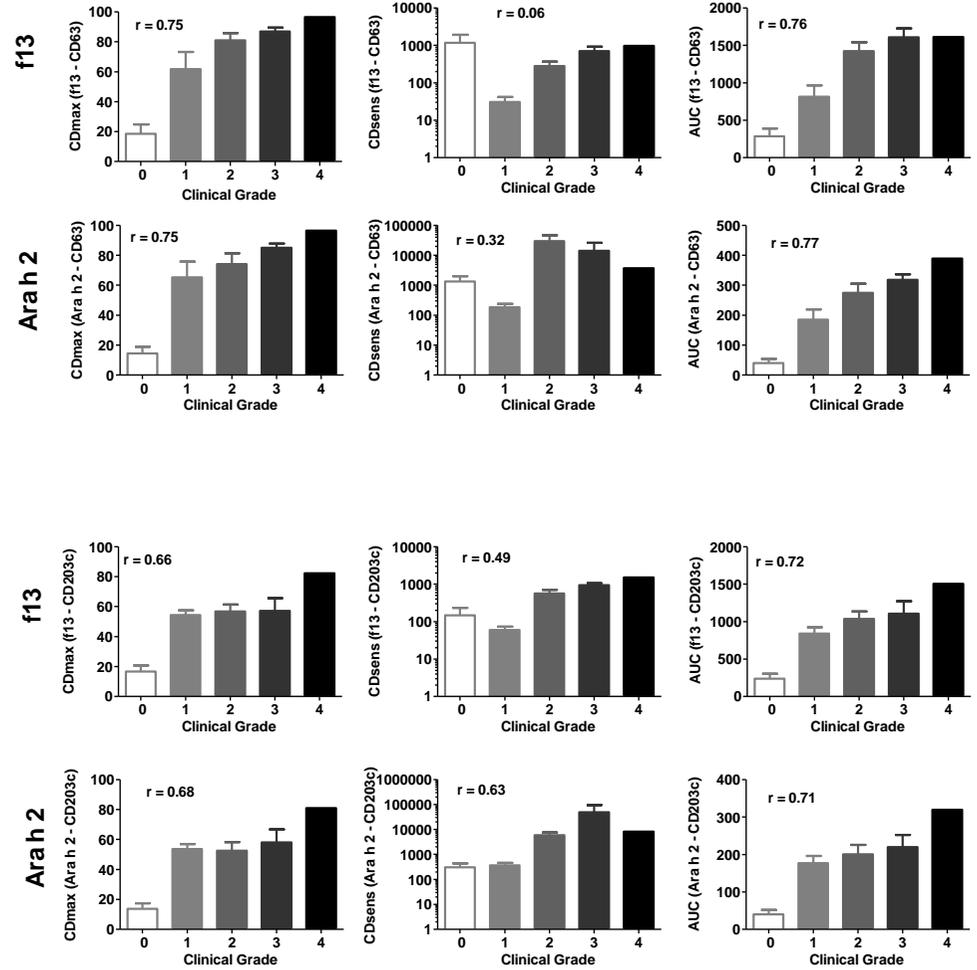


Figure 2 : Peanut BAT CDmax and AUC were well correlated to the OFC threshold dose and clinical Grade

Legend Figure 2:

Pearson's correlation of peanut BAT result showing **(A)** f13 CDmax (%) and AUC or Ara h 2 CDmax (%) and AUC according to the threshold dose during OFC for CD63 marker (upper panel) or for CD203c marker (lower panel). Three different groups have been identified as follow: white triangle represent patients with positive BAT results and negative OFC; Withe square represent patients with negative BAT results and negative OFC; Black circle represent patients with positive BAT results and positive OFC. Pearson coefficients are indicated for each parameters. **(B)** Peanut BAT results are represented according to the clinical grade during OFC showing f13 and Ara h 2 CDmax, CDsens and AUC for CD63 (upper panel) or for CD203c (lower panel). Each value represents the mean \pm SEM.

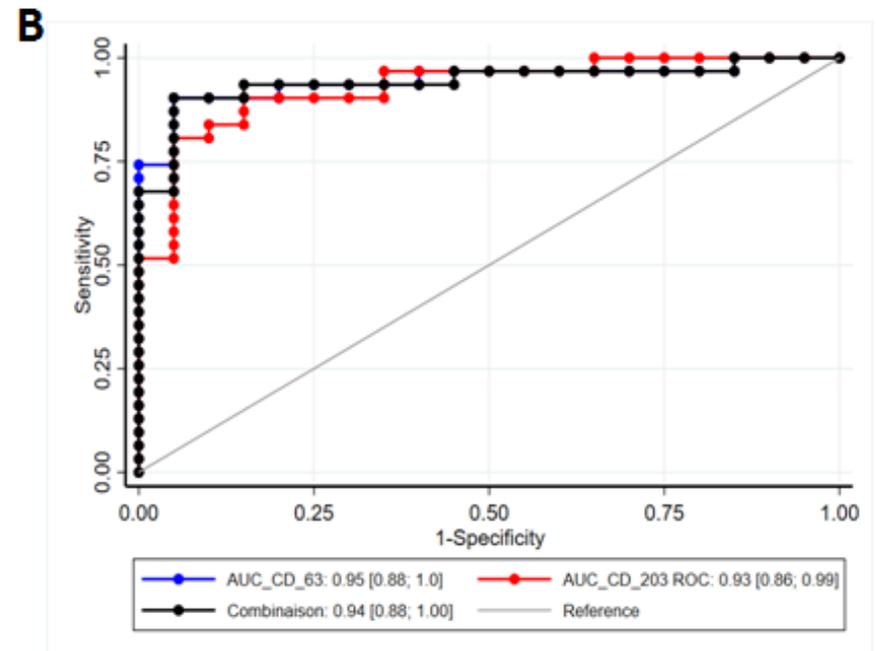
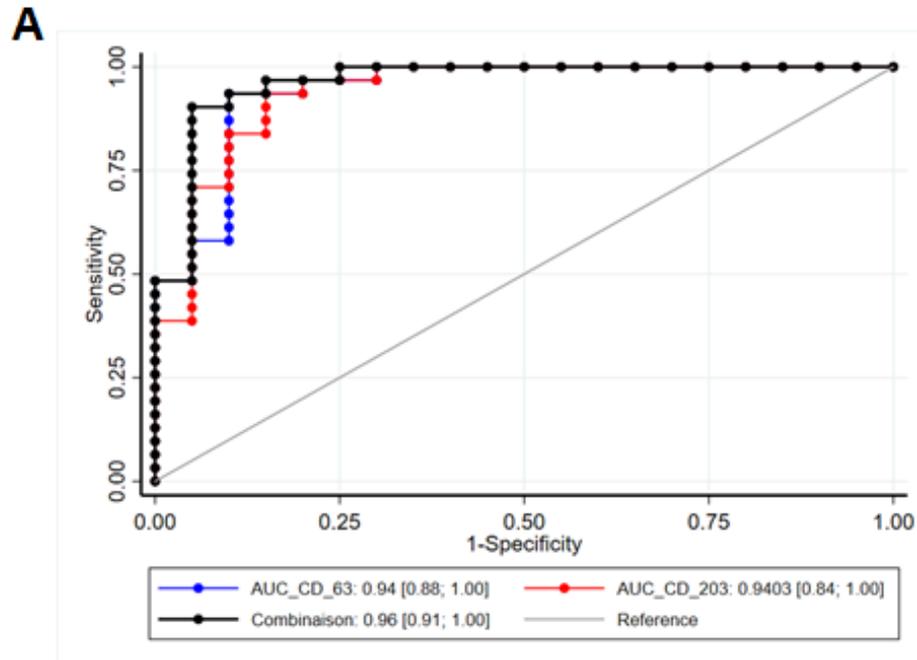


Figure 3 : ROC curve analysis for AUC BAT results

Legend Figure 3:

ROC curve analysis for AUC CD63 BAT results, AUC CD203c BAT results and combination of both for **(A)** f13 and **(B)** Ara h 2 in predicting peanut allergy. **(A)** Combination of BAT AUC (f13 – CD63) and BAT AUC (f13 - CD203c) had the largest area under ROC curve (AUC 0.96, 95 % CI 0.91–1.000, P < .001) compared with BAT AUC CD63 (AUC 0.94, 95 % CI 0.88–1.000, P < .001) or BAT AUC 203c (AUC 0.94, 95 % CI 0.84–1.000, P < .001) alone **(B)** Combination of BAT AUC (Ara h 2 – CD63) and BAT AUC (Ara h 2 - CD203c) had the largest area under ROC curve (AUC 0.94, 95 % CI 0.88–1.000, P < .001) compared with BAT AUC 203c (AUC 0.93, 95 % CI 0.86–0.99, P < .001) alone. BAT AUC CD63 (AUC 0.95, 95 % CI 0.88–1.000, P < .001).

DEUXIEME PARTIE : TEST D'ACTIVATION DES BASOPHILES AUX PROTEINES DE LAIT DE VACHE

INTRODUCTION

L'allergie aux protéines de lait de vache (APLV) est la première à apparaître chez l'enfant, principalement chez le nourrisson. Elle est la 4^e cause d'allergie alimentaire chez l'enfant. Selon une étude européenne EuroPrevall menée sur environ 12 000 enfants avec confirmation du diagnostic par un TPO, l'APLV concerne 0,74 % des enfants de moins de 2 ans (13). Elle présente un très bon pronostic puisqu'elle disparaît pour 75 % des enfants à 3 ans. La clinique peut être très variée : signes cutanés (urticaire, angio œdème), digestifs (diarrhées, vomissements) ou respiratoires (rhinite, conjonctivite). Si les manifestations digestives et cutanées prédominent chez les jeunes enfants, ce sont les atteintes respiratoires et cutanéomuqueuses les plus fréquemment retrouvées chez les enfants de plus de 12 mois.

La démarche diagnostique consiste à réaliser dans un premier temps les tests cutanés et le dosage des IgE spécifiques lorsque l'histoire clinique est en faveur d'une APLV. Si ces tests sont négatifs, un TPO est réalisé pour confirmer ou non une allergie IgE-médiée. Mais si ces tests sont positifs alors une éviction pendant 6 mois ou jusqu'à l'âge de 9-12 mois est préconisée, à l'issue de laquelle un TPO est effectué (13).

Ainsi, les mêmes problématiques se posent concernant le TPO et la balance bénéfices/risques de réaliser cet examen. Le TAB semble dès lors être un outil pertinent pour palier au risque de réactions allergiques pendant le TPO. L'intérêt du TAB dans le diagnostic de l'APLV a été étudié et a montré sa pertinence à cet égard (14). Une étude a démontré que le suivi des TAB basé sur l'analyse du CD63 était efficace dans la surveillance de l'acquisition de la tolérance clinique induite lors de l'immunothérapie orale (15).

La prise en charge de l'APLV consiste en l'éviction dans l'alimentation de tous les produits comportant des protéines de lait de vache. Si ce régime évite l'inflammation induite par ce type d'allergène, il représente un risque pour l'état nutritionnel et la croissance staturo-pondérale de l'enfant. Ainsi, il est nécessaire de poser un diagnostic certain de l'APVL pour éviter d'une part de passer à côté d'un patient allergique avec les risques de réactions allergiques qui en découlent mais aussi pour ne pas faire subir un régime d'éviction chez un enfant qui n'en n'avait pas besoin.

Ainsi nous avons réalisé chez 20 enfants (tableau 2) ayant une indication au TPO au lait, des TAB après restimulation des basophiles par l'extrait global de lait de vache (f2) et par l'allergène moléculaire la caséine (nBosd8 (f78)). L'exploitation des résultats a été faite avec la même méthode de détermination des CDsens, AUC et CDmax, basée sur 6 concentrations d'allergène, que celle utilisée pour l'arachide. Le cut-off retenu pour retenir un TAB positif était également à 15 % d'activation pour les marqueurs CDmax CD63 et CDmax CD203c. Nous nous sommes intéressés à comparer les résultats obtenus avec ceux du TPO.

RESULTATS

Vingt patients avec une suspicion d'allergie aux protéines de lait de vache ayant eu un TPO ont été inclus pour réaliser un TAB le même jour. Les caractéristiques démographiques de ces patients sont résumées dans le tableau 2.

Caractéristiques	TPO totaux n=20	TPO négatifs n=10	TPO positifs n=10
Age(y)	3 (1-9)	3 (1-9)	6 (1-7)
Masculin	15 (75)	7 (70)	8 (80)
IgE spécifiques (kUA/L)	f2 11 (0,17-100)	1,24 (0,45-12,8)	79,8 (0,17-100)
	f78 3,28 (0,1-100)	0,76 (0,1-1,63)	26,3 (0,1-100)
Tryptase basale(µg/L)	3,5 (1,5-6,3)	4,2 (2,2-5,3)	3,3(1,5-6,3)
Tryptase choc (µg/L)	4 (2,1-6,6)	4,5 (2,6-6,1)	3,6 (2,1-6,6)
Dose réactogène (mL)	95 (3-346)	155,5 (74,5-346)	34 (3-101)

Tableau 2 : Caractéristiques des patients évalués lors d'un TPO dans le cadre d'une suspicion d'allergie aux protéines de lait de vache. Démographie et dosages des IgE spécifiques, cinétique du dosage des tryptases et dose réactogène lors du TPO. Valeurs exprimées en médiane (intervalle) et en nombre (pourcentage) ; TPO, Test de provocation par voie orale

Dix enfants ont eu un TPO positif et 10, un TPO négatif. 3 ont été exclus car le contrôle positif du test s'est relevé négatif. De façon très intéressante, sur les 20 inclus, 10 ont eu une activation des basophiles dans le contrôle positif lors du TAB rendant leur interprétation difficile.

Des recherches ont été effectuées pour comprendre les raisons de l'activation des basophiles dans le contrôle négatif. La notion d'urticaire chronique chez le patient pourrait être à l'origine de ce phénomène. En effet, l'urticaire chronique résulterait d'un phénomène

immunologique secondaire à la présence d'un anticorps anti FcERI et serait alors responsable de la dégranulation permanente des basophiles et des mastocytes (16).

Cependant, après l'étude rigoureuse des 10 dossiers cliniques des patients concernés, aucun antécédent d'urticaire chronique n'avait été relaté. Ainsi, dans notre étude cette hypothèse n'était pas retenue. Le dosage des Ac anti FcERI n'est pas réalisé en routine cependant il serait intéressant de le faire pour réfuter objectivement cette hypothèse.

Une deuxième hypothèse résidait dans la composition du tampon de stimulation. En effet, ce dernier contiendrait de l'albumine et il serait dès lors possible que celle-ci croise avec les IgE des patients concernés par l'activation des basophiles dans le contrôle négatif.

Ainsi, nous avons réalisé les dosages des IgE spécifiques dirigées contre 12 albumines différentes tels que les IgE alpha lactalbumine (nBos d4, nBos d5, f232, f323, nCan f3, nFel d2, nSus s, o215, f27, nBos d6, c74 et alb 2s). Les 10 patients présentaient une sensibilisation contre au moins une de ces albumines, néanmoins majoritairement la sensibilisation portait sur 2 albumines (nBos d4 et nBos d5) avec des titres d'IgE importants (nBos d4: 7.23 (0.1-44.7 kUA/L), nBos d5: 3.93 (0.1-14.3 kUA/L)) (Tableau 3).

Nous avons parallèlement effectué les mêmes dosages chez 5 patients pour lesquels des TAB étaient exploitables. Bien qu'il existe une sensibilisation pour 2 de ces patients, les titres d'IgE pour les 2 albumines précédemment évoquées étaient nettement inférieurs aux 10 patients avec une activation des basophiles dans le contrôle négatif (nBos d4: 0.1 (0.1-1.59 kUA/L), nBos d5: 0.1 (0.1-0.18 kUA/L)) (Tableau 3).

Catégorie	IgE spécifiques		
	Patient	nBos d4 (kUA/L)	nBos d5 (kUA/L)
TAB avec activation des basophiles dans le contrôle négatif	1	44,7	14,3
	2	3,3	5,67
	3	6,8	4,67
	4	11,1	5,67
	5	82,6	0,59
	6	0,93	0,59
	7	15,9	3,19
	8	<0,1	<0,1
	9	0,97	8,07
	10	7,71	0,7
TAB exploitables chez des patients allergiques au lait de vache	11	<0,1	<0,1
	12	<0,1	<0,1
	13	0,3	0,18
	14	1,59	0,15
	15	<0,1	<0,1

Tableau 3 : Dosages des IgE spécifiques majoritairement retrouvées chez les 10 patients avec une activation des basophiles dans le contrôle négatif (patient 1 à 10). Les patients (11 à 15) correspondaient à des patients avec des TAB exploitables, les mêmes dosages des IgE spécifiques ont été réalisés. TAB, Test d'activation des basophiles.

Ainsi, il paraît possible que cette activation des basophiles dans le contrôle négatif résulte d'une réaction croisée entre l'albumine contenue dans le tampon de stimulation de notre TAB et celles présentes dans le sang du patient. Il serait dès lors intéressant de développer un nouveau tampon de stimulation dépourvu d'albumine. Nous avons essayé d'utiliser un tampon à base de PBS (phosphate buffered saline) cependant aucune activation des basophiles dans le contrôle positif n'a eu lieu. L'hypothèse émise concernait la nécessité

d'une préactivation des basophiles via l'IL-3 mais le rôle de IL-3 dans la régulation du CD63 et CD203c n'est pas clair selon la littérature (17). De ce fait, de nouveaux essais sont à prévoir avec cette fois un tampon de stimulation à base de RPMI supplémenté avec de l'IL-3 à différentes concentrations allant de 2 à 10 ng/mL.

Malgré tout, nous avons analysé les données des 7 patients avec un TAB exploitable. La corrélation entre le résultat final du TPO, positif ou négatif, et les différents paramètres du TAB n'a pu être étudiée car nous ne disposions d'aucune valeur pour le groupe TPO positif. En effet, les 10 patients exclus en raison d'une activation des basophiles dans le contrôle négatif, appartenaient tous au groupe TPO positif.

En ce qui concerne la corrélation entre la dose réactogène et les résultats du TAB, le coefficient de corrélation de Pearson montrait que le CDmax (f2-CD63), le CDmax (f2-CD203c), le CDmax (f78-CD63), le CDmax (f78-CD203c), l'AUC (f2-CD63), l'AUC (f2-CD203c) et l'AUC (f78-CD203c) étaient corrélés à la dose réactogène durant le TAB ($r > 0.6$ pour tous). L'analyse des CDsens pour le f2 et le f78 et l'AUC f78 ne montrait aucune corrélation avec la dose réactogène que ce soit pour le CD63 ou le CD203c. Néanmoins, ces résultats sont à nuancer en raison du faible effectif étudié.

Une étude récente a mis en évidence la pertinence du TAB dans le diagnostic de l'allergie aux protéines de lait de vache. Il serait donc intéressant de poursuivre notre étude avec un plus grand nombre de patients (14).

Conclusion deuxième partie

L'histoire clinique de l'enfant et les dosages des IgE spécifiques donnent des arguments en faveur ou non d'une APLV, les allergènes moléculaires représentent une avancée dans la démarche diagnostique. En effet, selon une étude, la caséine serait un bon marqueur dans le suivi et le pronostic des APLV (18). Cependant ils ne permettent pas de poser le diagnostic d'APLV mais seulement d'une sensibilisation aux protéines de lait de vache.

Diagnostiquer correctement un enfant avec une APLV est essentiel pour organiser une prise en charge adaptée. Les manifestations cliniques de l'APLV sont variées et concernent principalement les nourrissons et jeunes enfants, le TAB peut leur être proposé à cet âge, dans notre étude des enfants de 1 an ont effectué ce test.

Bien que nous ayons peu de patients, l'exploitation des données du TAB semble intéressante pour prédire les résultats du TPO. En effet, nous avons montré que le CDmax et l'AUC représentaient des marqueurs fiables pour prédire la sévérité de la réaction allergique suite à la consommation de protéines de lait de vache. Il serait intéressant de poursuivre cette étude sur un effectif plus important. De façon surprenante, 50 % des patients présentent des activations des basophiles dans le contrôle négatif. Ces résultats *a priori* négatifs, nous ont fortement encouragés à étudier en détails ces patients et nous avons montré que 100 % de ces patients étaient sensibilisés à une albumine, interférant très probablement avec le tampon de stimulation du kit des TAB. Ainsi nous proposons de tester très prochainement un nouveau tampon fait maison, dépourvu d'albumine, afin de remédier à cette problématique.

CONCLUSION GENERALE

La prévalence des allergies est en constante augmentation ces dernières années, notamment les formes alimentaires chez les enfants. Ainsi, ce type d'allergies pédiatriques est devenu un enjeu de santé publique majeur. Parmi elle, l'allergie à l'arachide est la plus fréquente chez les enfants de plus de deux ans. Contrairement à l'ALPV, il s'agit d'une allergie persistant le plus souvent à l'âge adulte et induisant un risque élevé de choc anaphylactique, à l'origine chaque année d'un nombre important de décès à l'échelle mondiale. Le diagnostic de l'allergie alimentaire est basé sur un faisceau d'arguments comprenant notamment l'histoire clinique du patient et différents types de tests objectivant la sensibilisation allergique par la mise en évidence d'IgE spécifiques (tests cutanés de type prick-tests, dosages sériques des IgE spécifiques...). Néanmoins, ces tests sont parfois pris en défaut et le recours au test de provocation par voie orale (TPO) est souvent nécessaire. Ces TPO sont considérés comme le gold standard et constituent aujourd'hui les seuls tests permettant, théoriquement, le diagnostic de certitude et le suivi des patients allergiques, grâce à la mise en évidence d'un seuil d'arachide induisant une réaction chez le patient. Néanmoins, ils sont très contraignants, parfois difficiles d'interprétation et potentiellement pourvoyeurs de chocs anaphylactiques liés à la réadministration de doses croissantes de l'allergène. Depuis peu, l'émergence des tests d'activation des basophiles (TAB) comme outil diagnostique a permis d'espérer l'amélioration de la prise en charge des patients. Le TAB est un test fonctionnel ayant pour but de reproduire *in vitro* la réaction d'hypersensibilité allergique se déroulant *in vivo*. Il permet ainsi de déterminer l'équivalent d'un seuil réactogène *in vitro*. Une simple prise de sang sur tube EDTA permet de réaliser le test, évitant ainsi le risque de la réintroduction orale.

Afin de démontrer l'utilité des TAB, nous avons réalisé chez 51 enfants allergiques à l'arachide et 20 enfants allergiques aux protéines de lait de vache des TAB (en testant 6

concentrations d'allergène dilués en cascade) en parallèle des TPO réalisés à l'hôpital de jour de pédiatrie (Dr E. Michaud). Nous avons notamment mis au point une méthode de calcul automatisée (utilisant le logiciel « R ») des paramètres du TAB (CDsens, AUC et CDmax) basée sur l'exploitation des données obtenues avec les 6 concentrations d'allergène testées, ce qui, à notre connaissance, n'avait jamais été fait auparavant. En comparant avec les méthodes reconnues d'exploitation des résultats des TAB publiées par Santos *et al.*, nous avons pu valider cette technique puis l'utiliser dans le reste de l'étude.

S'intéressant d'abord à l'allergie à l'arachide, elle a ainsi démontré d'une part que le CDmax et l'AUC constituaient deux marqueurs d'intérêt du TAB fortement corrélés à la dose réactogène lors du TPO et, d'autre part, que les trois marqueurs étaient fortement corrélés à la sévérité des réactions cliniques observées lors de ce même TPO. De façon intéressante, l'analyse des courbes ROC obtenues montre que l'interprétation conjointe de l'AUC (f13-CD63) et de l'AUC (f13-CD203c) chez les patients permet d'obtenir les meilleurs résultats (AUC 0.96, 95% IC 0.87 – 1.0, $p < 0.001$). Nous avons ainsi pu déterminer des seuils quantitatifs limites pour l'AUC, avec un Optimal Cut Point permettant de prédire les résultats du TPO avec une excellente valeur prédictive positive (93.5 %) et une excellente valeur prédictive négative (90%).

Dans un second temps, l'analyse des données des 20 patients allergiques au lait a été réalisée. De façon surprenante, 50 % d'entre eux avaient des activations spontanées des basophiles dans le contrôle négatif (tampon de culture), rendant non interprétable les données de l'ensemble du test. Ce résultat *a priori* négatif, nous a en pratique grandement éclairé quant à la technique en elle-même puisque nous avons investigué les différentes causes pouvant expliquer cela. Après avoir écarté chez l'ensemble des patients la présence d'une urticaire chronique associée à la positivité d'un auto-anticorps anti-FcεRI, nous avons

émis et vérifié l'hypothèse selon laquelle les patients seraient sensibilisés contre une albumine quelconque et auraient ainsi produit des IgE spécifiques pouvant engendrer des réactions croisées avec l'albumine potentiellement présente dans le tampon de culture. En effet, l'albumine bovine (ou BSA) est un réactif très classique en culture cellulaire. Bien que la composition réelle du tampon ne nous ait pas été communiquée par le fournisseur, nous avons testé les IgE spécifiques dirigées contre 12 albumines différentes chez tous les patients présentant une activation spontanée. La totalité des patients testés présentaient une sensibilisation marquée contre au moins une de ces albumines, comparée à un groupe de contrôle issu de la population initiale dont les TAB étaient interprétables et qui, à l'inverse, ne présentaient pas ou très peu d'IgE spécifiques anti-albumine. Cela nous a permis d'adapter notre protocole, en optant pour un tampon de culture dépourvu d'albumine pour la réalisation des TAB chez les enfants atteints d'ALPV. Sur le faible effectif de patients restant interprétables (hors activation dans le contrôle négatif), nous avons montré que le CDmax et l'AUC représentaient des marqueurs fiables pour prédire la sévérité de la réaction allergique suite à la consommation de protéines de lait de vache. Nous allons maintenant réaliser de nouveaux TAB au lait, avec un protocole optimisé, afin de vérifier si ces données se confirment sur un plus grand échantillon.

Cela nous a permis d'adapter notre protocole, en optant pour un tampon de culture dépourvu d'albumine pour la réalisation des TAB chez les enfants atteints d'ALPV. Sur le faible effectif de patients restant interprétables, nous avons montré que le CDmax et l'AUC représentaient des marqueurs fiables pour prédire la sévérité de la réaction allergique suite à la consommation de protéines de lait de vache. Nous allons maintenant réaliser de nouveaux TAB au lait, avec un protocole optimisé, afin de vérifier si ces données se confirment sur un plus grand échantillon.

Les résultats obtenus apportent des éléments objectifs laissant penser que le TAB pourrait être un complément précieux au TPO chez les enfants lors du diagnostic d'allergie à l'arachide, voire à terme il pourrait le remplacer dans certaines situations comme les enfants à risque de réactions sévères.

Dr B. Evrard

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



REFERENCES

1. MONERET-VAUTRIN DA. Épidémiologie de l'allergie alimentaire. 3e Congrès francophone d'allergologie, 9,10,11 avril 2008, Paris. 2008;48(3):171-8.
2. Sainte-Laudy J, Ménétrey C, Brianchon C, Lienhardt-Roussie A, Cogné M. Évaluation de la cytométrie en flux par rapport aux tests de provocation en simple insu pour le diagnostic de l'allergie alimentaire chez l'enfant. *Revue Française d'Allergologie*. oct 2009;49(6):454-61.
3. Høst A, Halken S, Jacobsen HP, Christensen AE, Herskind AM, Plesner K. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002;13(s15):23-8.
4. Kattan JD, Sicherer SH. Optimizing the Diagnosis of Food Allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. févr 2015;35(1):61-76.
5. Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G, Frémont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. janv 1999;82(1):33-40.
6. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy*. août 2014;69(8):1008-25.
7. MacGlashan DW. Basophil activation testing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. oct 2013;132(4):777-87.
8. MacGlashan D. Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes: Basophil activation markers and mode of degranulation. *Clinical & Experimental Allergy*. 13 juill 2010;40(9):1365-77.
9. 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.
10. 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.
11. Blumchen K, Beder A, Beschorner J, Ahrens F, Gruebl A, Hamelmann E, et al. Modified oral food challenge used with sensitization biomarkers provides more real-life clinical thresholds for peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. août 2014;134(2):390-398.e4.
12. Mayorga C, Gomez F, Aranda A, Koppelman SJ, Diaz-Perales A, Blanca-López N, et al. Basophil response to peanut allergens in Mediterranean peanut-allergic patients. *Allergy*. juill 2014;69(7):964-8.
13. Jessica Ezria, Samuel Roethlisbergerb, Nicoletta Bianchic, Michela Tempia-Caliera Schäppid,, Jacqueline Wassenberge, Federica Angelinif. Recommandation pour la prise en charge du nourrisson avec allergie aux protéines du lait de vache. 2016;27.(4):24-8.
14. 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*. mars 2019;49(3):350-6.
15. 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 Gastroenterology Journal*. juin 2015;3(3):272-6.

16. Soria A, Francès C. Urticaires : diagnostic, prise en charge et traitement. *La Revue de Médecine Interne*. sept 2014;35(9):586-94.

17. Hamilton RG. Assessment of human allergic diseases. In: *Clinical Immunology* [Internet]. Elsevier; 2008 [cité 22 oct 2019]. p. 1471-84. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323044042101009>

18. Boyano-Martínez T, García-Ara C, Pedrosa M, Díaz-Pena JM, Quirce S. Accidental allergic reactions in children allergic to cow's milk proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. avr 2009;123(4):883-8.

SERMENTS

SERMEN 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 de l'intérêt du test d'activation des basophiles comme outil de diagnostic de l'allergie à l'arachide et aux protéines de lait de vache

Thèse en Médecine, Clermont Ferrand, 2019

Introduction: L'allergie alimentaire constitue un problème de Santé Publique. L'allergie à l'arachide et aux protéines de lait de vache sont fréquentes, la nécessité de poser un diagnostic fiable permet une prise en charge adaptée de l'enfant. L'altération de la qualité de vie pour l'enfant et sa famille ainsi que les risques encourus lors du test de provocation par voie orale (TPO), ont conduit les pédiatres à rechercher une méthode alternative moins risquée mais tout autant sensible et spécifique que le TPO. Ainsi, le test d'activation des basophiles (TAB) pourrait représenter une alternative au gold standard dans le diagnostic de l'allergie alimentaire, le TPO.

Objectifs : Nous avons élaboré une nouvelle méthode de calcul du CD_{sens} basée sur 6 concentrations d'allergène. Puis nous avons comparé les résultats obtenus à l'issu du TPO à ceux du TAB. Enfin, nous avons déterminé des valeurs seuils pour les différents paramètres du TAB afin de prévoir au mieux la réaction clinique de l'enfant lors de l'ingestion de l'allergène.

Méthodes : Nous avons analysé 51 TAB dans le cadre de l'allergie à l'arachide et 20 pour l'allergie aux protéines de lait de vache, l'ensemble de ces patients avait réalisé un TPO le même jour pour l'allergène suspecté.

Résultats : Dans le cadre de l'allergie à l'arachide, le CD_{max} et l'AUC après stimulation par f13 et Ara h 2 pour le CD63 et le CD203c se sont montrés très pertinents pour discriminer les patients allergiques des patients simplement sensibilisés. Ces deux marqueurs se sont révélés corrélés à la dose réactogène et à la sévérité clinique observée lors du TPO, contrairement au CD_{sens}.

Sept patients ont eu des résultats discordants (TAB+/TPO-), ces patients étaient pour la majorité en cours de protocole d'induction de tolérance par voie orale (ITO).

Concernant les TAB aux protéines de lait de vache, les résultats ont été plus difficilement exploitables. En effet, sur les 20 TAB réalisés seulement 10 ont pu être exploités, 10 avaient été exclus en raison d'une activation des basophiles dans le contrôle négatif. Le CD_{max} et l'AUC après stimulation par f2 et f78 pour le CD63 et CD203c ont montré une corrélation avec la dose réactogène.

Concernant l'activation des basophiles dans le contrôle négatif observée pour 10 patients, le dosage des IgE spécifiques dirigées contre 12 albumines différentes a été réalisé. Les 10 patients présentaient une sensibilisation contre au moins une de ces albumines.

Conclusion : Le TAB montre ainsi son intérêt dans le diagnostic de l'allergie à l'arachide par le suivi du CD_{max} ou l'AUC. Une mise en routine et une standardisation de ce test permettraient de diminuer considérablement le nombre de TPO.

Concernant les TAB aux protéines de lait de vache, la poursuite de cette étude sur une plus grande cohorte de patients serait nécessaire. Cependant, les premiers résultats obtenus montraient que le CD_{max} et l'AUC pourraient être des outils pertinents dans le cadre de l'allergie aux protéines de lait de vache. Il serait intéressant de mettre en place un nouveau protocole de TAB pour le lait de vache afin d'éviter l'activation des basophiles dans le contrôle négatif.

Mots clés : allergie alimentaire, test d'activation des basophiles, test de provocation par voie orale, arachide, protéines de lait de vache, CD_{max}, CD_{sens}, AUC, CD63, CD203c