

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER**  
**FACULTE DE SANTE**  
**DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2023

THESE : 2023 / TOU3 / 2069

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement  
par

Benjamin TROUCHE--ESTIVAL

*Analyse comparative et performance clinique de deux méthodes de dosage des IgE spécifiques : ImmunoCAP™ (Thermofisher) et NOVEOS (Hycor)*

Le 06 septembre 2023

Directeur de thèse : Pol André APOIL, Docteur

**JURY**

Président : Peggy GANDIA, Professeur  
1er assesseur : Laurent GUILLEMINAULT, Professeur  
2ème assesseur : Bénédicte PUISSANT, Docteur  
3ème assesseur : Pol André APOIL, Docteur

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
**du Département des Sciences Pharmaceutiques de la Faculté de santé**  
**au 20 février 2023**

**Professeurs Emérites**

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B. (Directrice-adjointe)	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Doyen-directeur)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique

## Maîtres de Conférences des Universités

### Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
Mme KELLER L.	Biochimie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

### Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C. (*)	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
Mme DERA EVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S	Biochimie
M. PILLOUX L.	Microbiologie
M. SAINTE-MARIE Y.	Chimie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A.	Pharmacie Galénique
(*)	Pharmacognosie
Mme VANSTEELANDT M.	Mathématiques
Mme WHITE-KONING M. (*)	

(\*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

### Assistants Hospitalo-Universitaires

M. AL SAATI A	Biochimie
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie clinique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
Mme STRUMIA M.	Pharmacie clinique
Mme DINTILHAC A.	Droit Pharmaceutique
Mme ROGOLOT L	Bio cellulaire, immuno

### Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

M	TABTI Redouane	Chimie thérapeutique
Mme	HAMZA Eya	Biochimie
Mme	MALLI Sophia	Pharmacie galénique

## Serment de Galien

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;
- De coopérer avec les autres professionnels de santé.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

# Remerciements

## Remerciements à mon jury

A ma présidente du jury, Madame le Professeur Peggy GANDIA, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier en Pharmacologie,

Je vous remercie d'avoir accepté de présider cette Thèse et d'avoir accepté de juger mon travail. Soyez assurée de toute ma reconnaissance et de tout mon respect.

A mon directeur de thèse, Monsieur le Docteur Pol André APOIL, Maître de Conférence des Universités, Praticien Hospitalier en Immunologie,

Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté de diriger ma Thèse. Je vous remercie d'avoir toujours pris le temps pour me guider et me conseiller tout au long de ces trois années. Les enseignements que j'ai tirés de votre encadrement continueront à guider mes efforts et à influencer positivement ma carrière. Votre soutien a été un cadeau précieux pour moi et je suis honoré d'avoir eu l'opportunité de travailler sous votre direction.

Monsieur le Monsieur le Professeur Laurent GUILLEMINAULT, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier en Pneumologie,

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger ce jury, de l'intérêt que vous portez à mon travail et de votre participation à la rédaction de l'article. Soyez assuré de ma gratitude.

Madame le Docteur Bénédicte PUISSANT, Maître de Conférence des Universités, Praticien Hospitalier en Immunologie,

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci pour vos enseignements, votre pédagogie, votre patience et votre gentillesse durant mes deux semestres en immunologie.

## **Remerciements aux personnes ayant contribué directement ou indirectement à ce travail :**

Aux Pr Antoine BLANCHER et Pr Yves RENAUDINEAU, respectivement chefs de service de mon premier et second stage au sein du laboratoire d'Immunologie du C.H.U. de Toulouse, je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour le soutien inestimable que vous m'avez accordé tout au long de mon parcours de thèse. Vos conseils éclairés, votre expertise et votre disponibilité ont grandement contribué à la réussite de notre travail.

Aux Dr Joana VITTE, Dr Julien GORET et Dr Caroline KLINGEBIEL, merci pour votre implication, votre disponibilité, votre bienveillance ainsi que vos nombreux conseils et relectures de cet article.

A tous les médecins allergologues et pneumo-allergologues du C.H.U. de Toulouse ayant participé à la rédaction de cet article : Pr Alain DIDIER, Dr Audrey MARTIN-BLONDEL, Dr Marine MICHELET, Dr Vianney GRUZELLE, Dr Claire MAILHOL. Je tiens à exprimer ma sincère gratitude envers vous pour votre contribution. Votre expertise a été un élément essentiel qui a grandement enrichi notre travail.

Merci également aux techniciennes d'allergologie, Anaïs DE LIMA CORREIA et Camille TAURUS qui ont grandement contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie enfin Roland CARBONNEL, Xavier JENTET et Nathalie BARBIER de Hycor France, sans qui cette étude n'aurait pas été possible.

## Remerciements à ma famille et mes amis

Je tiens à remercier avant tout ma famille, c'est-à-dire mon oncle, mon père, ma mère et ma sœur mais également ma grand-mère sans qui rien de tout ça ne serait possible. Je les remercie pour leur amour, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel en tout temps. Un paragraphe entier ne suffira pas à exprimer toute ma gratitude à votre égard.

Je remercie également ces amis de très longue date et que j'espère garder le reste de ma vie : Pierre, Robin et Anaïs mais également toi, Mélanie, merci d'avoir et d'être toujours présents dans les bons comme les mauvais moments et d'avoir cette capacité de me supporter (notamment dans les Escape).

- Pierre je te connais depuis cette fameuse baston à la maternelle (mentalement t'as pas beaucoup depuis), mais merci d'être toujours présent et pour toutes ces après-midis et ces soirées passés ensemble. Sache que si jamais tu as besoin, je serai là.
- Robin toi je te connais depuis la quatrième (t'as pas beaucoup voulu depuis non plus). Merci pour toutes ces conversations, pour toutes ces sorties, pour tes conseils, ton écoute et ta présence. Franchement t'es le sang de la veine !
- Anaïs la plus mature de nous tous (lol non). Tu es l'avant dernière arrivée du groupe, première fois que je t'ai vue c'était au Maguire's Pub au tout début de ma faculté, si je ne me trompe pas (et au pire pas grave). Je t'ai de suite bien aimé parce que t'avais kiffé mon rire (et oui je m'en souviens). T'as rien à envier aux 2 autres loustics. Par contre faut arrêter d'être malaisant comme ça, madame. Merci pour ta relecture et oui, c'est bon j'ai écrit ton nom correctement cette fois.
- Mélanie, tu es celle que j'ai connu le plus tardivement au TGS 2016 je crois. Malgré des débuts maladroits des deux côtés. Merci pour ces conversations et pour ton soutien également (désolé de ne pas pouvoir assister à ta thèse et de ne pas avoir pu être disponible pour venir à Dijon).

A Manon et à Mathieu ces deux amis formidables, camarades expatriés avec qui j'ai affiné la PACES et ces nombreuses années de pharmacie à Limoges. Le voyage en Corse était fabuleux et faudra recommencer. Manon si tu lis ceci un jour, sache que je suis super heureux que tu vives ta vie enfin pleinement et sache que tu pourras toujours compter sur moi (et je te dis au tout de l'année prochaine comme d'habitude) et toi Mathieu je suis content que tu te plaisés en Corse,

je te souhaite le meilleur en tout et pour tout et je te dis très bientôt (j'espère que d'ici tu auras appris à être discret).

A Marving, Alex, Nicolas V.M., Thomas, Arthur et Flavien, ces amis que l'on rencontre lors de pauses café et de soirées que l'on pense connaître mais qui arrivent tout de même à nous surprendre.

A Floriane, Alice et Eddy ces compagnons – frères d'armes du concours de l'internat, que dire de plus à part que ces années-là étaient juste les meilleures et que clairement ça me manque. Flo je t'ai totalement perdu de vue (comme on l'avait vu) mais je suis sûr que tu profites fond de ton internat et de la vie. Alice je te vois au minimum une fois par an à la soirée mousse, je sais que tu fais ce qu'il te plaît donc je te souhaite que cela perdure. Eddy par où commencer, déjà je pense que tu es une personne avec qui je ne vais pas perdre le contact car tu es un mec trop génial avec qui je partage beaucoup trop de délires donc je te dis juste à très vite.

Je remercie également « CES » groupes Messenger que l'on surnomme affectueusement « Les spammeurs de l'extrême » qui sont littéralement des antidépresseurs et qui sont composés des meilleures personnes que j'ai pu rencontrer lors de mon internat :

- Juju alias Miss Infectio ou Dr Maboule pour les intimes ; que dire à part j'adore ta joie de vivre et ton humour. Ton seul gros défaut : le contre-sens et les sorties d'autoroute soudaines. Oui, je n'ai toujours pas digéré de me faire réveiller par une confrontation frontale avec le siège de devant. Et pour info, je ne suis pas prêt à arrêter de t'embêter avec ça, tu es prévenue.
- Nicolas le sale gosse, toi je ne sais même pas où commencer, ni comment finir. Merci compère gobelin pour les pauses, les soirées, les franches rigolades et d'avoir été présent aux moments où j'en avais besoin. Je n'ai pas réussi à te noyer dans la piscine cette année mais on essaiera l'année prochaine. PS : rends le demi-neurone !!!
- Rima l'Antilope Blanche, merci pour tout : ton écoute, tes conseils et les pauses que l'on a faites ensemble. C'est avec toi que j'ai les meilleures conversations. Tu es l'une des personnes qui m'aident et m'aident aux moments où j'en avais besoin. Ne doute pas de toi car tu es l'une des personnes les plus incroyables que je connaisse.



(PS : Nico doit nous khalass des cafés, oui j'ai envie de le mettre dans la sauce et oui tu n'as que 6 lignes pour ton paragraphe).

- Bryan le Maître du Oué, merci pour ces parties de Padel e es que l'on a fait (gros regret que je ne puisse plus en faire à cause de mon genou). Continue à alimenter le chaos de ces groupes, j'adore. Tu m'as fait aliser que le monde est très petit finalement. Tu es peut-être le maître Excel mais n'oublie pas que je suis le maître Word donc méfie-toi.
- Floflo merci pour ton humour, ta bienveillance et ta gentillesse. Tu m'as sa suffisamment de fois la face pour que je le signale dans cette thèse. Merci pour ces anecdotes et ces punchlines incroyables. PS : j'ai toujours peur de ton regard d'assassin !!!
- Marion : merci pour ces discussions et ces fous rires que l'on a eu ensemble. Ne t'en fais pas, on ne ressent pratiquement pas ton côté basque sauf quand tu envoies des missiles à tête chercheuse dans la converse.
- Roxane alias Chatoune, tu ne t'en sors pas trop mal pour une Aveyronnaise par contre faut lutter contre ta dépendance envers Mr Grey et arrête de t'automettre dans la sauce, y a suffisamment de gens dans ce groupe qui le font à ta place.
- Camcam, tireuse lite professionnelle capable de mettre tous les gens de ce groupe en PLS et véritable terreur de tout vigile. Merci pour tous ces fous rires.
- Blandine à cette Toulousaine expatriée, non je ne te ferai pas un résumé ni de ces remerciements, ni de cette thèse.
- Sarah rien que le fait d'avoir ussi supporter autant de temps Juju est un exploit qui a le rite d'être signa Merci pour l'invit Limoges et pour cette super soi e mousse et continue à en mettre plein la tête à Nico.
- Matthieu alias le soldat battu, à ces apparitions- clairs de g nie. N'h site surtout pas cligner deux fois des yeux si tu es en danger.
- Antoine cet ing son fabuleux, merci de m'avoir fait couvrir ces incroyables sur les IA. J'adore ergie donc lâche rien !
- Vincent : ce compatriote albigeois, tu es l'homme du groupe qui a le plus de goût et de culture donc tiens bon ne te laisse pas corrompre par les autres.
- Joséphine à cette muteuse folle de catégorie supérieure, ta participation manque à l'appel.

Mais je n'oublie pas non plus ces personnes incroyables qui ont été présentes aux bons moments :

- Thibaut, tu es un des meilleurs co-internes et partenaires de baby que l'on puisse avoir, peut-être un peu trop fan des grands champions mais t'es pardonné vu que l'on a gagné le championnat cette année. PS : t'inquiète on arrivera à intégrer dans un jury de thèse (clin d'œil Rima et Nicolas) ;
- Laure, tu es une personne exceptionnelle car il en faut du courage pour supporter Thibaut mais aussi Mathieu comme chef. Ce sera toujours un plaisir de jouer avec toi au baby et on se fait une poutine quand tu veux.
- Sisi, pouvoir me supporter 3 semestres, ça fallait le faire. Tu es une co-interne géniale et je te souhaite beaucoup de succès face à l'avenir. Merci pour ton soutien considérable et je te dis au revoir très vite. #futuroscope je n'oublie pas.
- Maxime, franchement tu es une personne incroyablement humaine et avec qui tout le monde rêverait de travailler. Super cuistot, danseur de pole dance à tes heures et je n'oublie pas ce moment karaoké complètement improvisé mais génial (et en playback ce qui n'était pas plus mal pour les oreilles finalement). Je t'encourage de toutes mes forces pour tes futurs projets et je te dis au revoir à une prochaine soirée !
- Mehdi, bon c'est ton moment donc profite-en. Je trouve que tu es une personne incroyable avec le meilleur sens de l'humour au monde. On a beaucoup de centres d'intérêt en commun et plus le temps passe et plus j'en trouve d'autres. Juste ne rage pas trop face à ta défaite lors du tournoi de baby et n'oublie pas si tu cherches un stage en DJ...
- Fatma, malgré tes préjugés de notre première rencontre, sache que j'ai toujours trouvé que tu es une très belle personne. J'adore ta personnalité franche et sincère. Ne change jamais stp.
- Sa majesté Jess (oui je n'oublie pas ton ascendance royale), tout comme Fat j'adore ta franchise, ta classe naturelle, ta bienveillance et ton énergie (la vache, je n'avais jamais vu quelqu'un se déplacer autant en France en si peu de temps), ne change pas non plus !
- Vallou, tu es quelqu'un d'extraordinairement intelligent et une grande oratrice en plus d'être sérieuse, volontaire et appliquée. Je te remercie de tes relectures et de tes conseils tout au long de ces années et je te dis au revoir très vite pour d'autres soirées jeux endiablées !
- Louis, toi tu es vraiment l'OVNI de la biologie. Mais j'aime tout : ton énergie, ton univers, ta folie, ton humour et tes références de folie. Je n'irai pas plus loin sauf que je

te dis à la prochaine soirée pour plus de fous rires et de philosophie de comptoir (Les Gyozas !).

### **Remerciements à mes chers co-internes :**

Lors de ce 1er semestre en hématologie, je remercie tous mes co-internes malgré l'arête fracassante du COVID avec pour commencer, mes chers niveaux 2. Merci à ce fameux binôme de l'IUC que formaient Anaïs et Théo souvent accompagné de Hugo pour tous leurs enseignements fondamentaux qui me serviront pour le reste de mon métier mais également pour tous ces fou-rires. Merci aussi à Céline, Tristan, Sabine et Pauline qui ont su m'apprendre à être complètement autonome et qui m'ont appris les bases de la qualité. Merci également à Delphine qui a été juste l'interne qui m'a tout montré sur le fonctionnement de l'IFB dès mon arrivée et avec qui on a frôlé dès les premiers jours, à Pierre ce compagnon de TP incroyable malgré le fait que c'est un jeune et Pierre-Luc avec qui j'ai formé un super duo en période COVID et qui est l'une des personnes les plus chills que je connaisse.

Je remercie également Elie et Germain avec qui j'ai partagé plusieurs semestres (hématologie et biochimie) et qui sont des personnes incroyables. Merci les gars pour ces pauses café et ces délires partagés tout au long de ces semestres.

Je remercie également Yasmine. Oui je te mets à part car on est resté en stage ensemble sur toute la phase socle sans conflit ce qui est un bel exploit au final. Merci pour ta bienveillance, tes conseils, ces pauses café partagés et ta présence lors de toutes ces galères que l'on a vécu.

Lors de ce 2<sup>ème</sup> stage en biochimie, je remercie mes 2 niveaux 2 : Alizée et Thibaut J. qui m'ont appris le métier et qui ont fini de poser les bases sur le fonctionnement de la qualité. Je remercie aussi Yolla et Claire avec lesquelles j'ai eu un grand plaisir de travailler et avec qui j'ai passé de super moments. Yolla, je te dis à novembre étant que nouvelle chef. (Je ne vous oublie pas Yasmine, Elie et Germain mais vous avez déjà des paragraphes personnels).

Pour ce 3<sup>ème</sup> semestre en Immunologie, je remercie énormément Jean qui a été la personne qui m'a le plus formé, conseil et aide de cet internat. Merci pour tout Jean tu es une personne incroyable autant en termes d'humanité qu'au niveau professionnel et une véritable source d'inspiration. Je remercie également Apolline qui était en pharmacologie pour tous ces bons moments passés en pause et café et repas du midi.

Pour le dernier semestre de la phase socle (la bactério), je remercie énormément Julia qui a été notre seule niveau 2 de bactério et qui a dû gérer à elle seule notre formation à tous et la validation (ainsi que les astreintes et le téléphone en tout début du stage). Franchement respect, tu as géré de ouf ! Je remercie aussi les niveaux 2 de virologie, Laurie et Delphine, qui lors des 3 semaines de virologie m'ont montré et appris tout ce qu'elles savaient. Merci pour votre présence, votre bonne humeur. Merci également à ces co-internes de niveau 1 qui ont su rendre le stage agréable et amusant :

- Pauline S. tu es une personne très agréable avec ton univers farfelu que j'adore et qui m'a fait rire plus d'une fois ;
- Claudia tu es l'interne la plus hyperactive que je connaisse et non je te poserai plus de questions ;
- Marine merci pour ta personnalité, ton originalité incroyable. La salle des internes se souvient encore de ce karaoké/blindtest improvisé ;
- Maelys co-interne juste parfaite, on a réussi à survivre aux bacteks (ces détraqueurs) et à passer ce stage d'hygiène impeccable. Par contre tu as beau être imbattable au blindtest (réussir à trouver toutes les chansons malgré des sifflements catastrophiques franchement chapeau), on ne peut pas dire la même pour le baby ;
- Silvia (je ne dirais rien de plus d'autre sur toi mais t'es la best) ;
- Merci aussi à Lucie, Germain (qui étaient en parasito/myco) pour les pauses café légendaires mais aussi à Thibaut lorsque t'étais en pharmaco/tox (t'as écrit un paragraphe sur moi, n'abuse pas).

Pour le 2<sup>ème</sup> semestre en Hématologie, je remercie Anaïs, Alban (attention à ta tête et tes chevilles, je te le répète encore une fois) et Yolla les DJ de ce semestre pour leur disponibilité et les nombreux bons moments et fous rires que l'on a eu. Je remercie encore une fois très rapidement Thibaut et Germain de parfaits co-interne de niveau 2 mais également Mathilde que j'ai appris à connaître durant ce stage c'est-à-dire une personne irréprochable niveau boulot et sur qui on peut compter (accessoirement fan de rugby). Concernant ces petits nouveaux qui sont arrivés et que j'ai appris à former (et plus ou moins maltraiter) et qui je suis sûr seront de supers biologistes, je remercie :

- Clément alias agent 108, outre ta personnalité insupportable au possible, tes muscles hypertrophiés, le fait que tu sois un mauvais perdant (notamment au baby) et pire encore

que tu fasses des danses Fortnite, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi et de te transmettre le peu que je savais.

- Léa alias Pr OUSSET future PU-PH hémato, j'étais trop content d'avoir enfin une co-interne qui venait de la fac de Limoges comme moi. Alors en plus, quand j'ai vu le niveau et l'application que tu avais, ça m'a juste conforté dans la confiance que j'avais en toi (et ça m'a aussi mis une pression je ne te dis pas pour pas paraître débile).
- Lamia alias Tic et sa partenaire Silvia alias Tac, duo démoniaque, véritable terreur des niveaux 2. Lamia j'ai adoré les RCP que l'on a fait ensemble et tous ces goûters. J'espère que tu sauras respecter ces traditions quand tu passeras niveau 2 en hémato parce qu'après je sais que gèreras pour le reste.
- Sami, je kiffe ta personnalité ultrachill, ta façon de penser et de voir les choses complètement différentes des autres. J'ai adoré bosser avec toi et te former mais aussi ces moments passés à l'escalade et aux soirées. On refait ça quand tu veux.
- Claudia, (je suis toujours aussi impressionné par cette énergie débordante que tu as).
- Rima (au final tu étais l'interne avec qui j'ai passé le moins de temps ce semestre).

Pour le dernier stage fait en immuno, je remercie encore Sisi mais également Ophélie F. pour leur soutien mais aussi tous ces moments passés ensemble, ces discussions et histoires complètement loufoques.

Mais je n'oublie pas ces internes avec qui je n'ai pas eu la chance d'être en stage :

- Guigui, gros rageux du baby, sache que ces gardes à Purpan avec toi resteront à jamais dans ma mémoire entre la livraison de pizza et cette fichue alarme qui n'a jamais voulu s'arrêter.
- Alex, merci pour ces discussions enflammées sur toute cette culture geek que nous partageons et ton humour est incroyable (par contre j'ai appris que tu étais parti au Japon, je suis super jaloux de fou).
- Dodo merci pour ton humour incroyable et ta joie de vivre. Tu as été un super formateur au baby et un formidable adversaire (le meilleur sans aucun doute).
- Julien, merci pour toutes ces parties de échec et de padel ainsi que tous les documents biblio que tu m'as fournis.
- Mouaffak, rencontré la première fois au foot à Limoges et co-interne à Toulouse, la vie est quand même marrante, merci pour tous ces moments de fous rires.

- Joy, franchement tu es une des personnes que j'ai le plus aimé taquiner au baby à cause de tes réactions et de ton petit orgueil (ton boulet de canon qui s'est retourné contre toi, reste un de mes meilleurs souvenirs). Ne change pas.
- Nico R., pour un petit gars qui vient de Montpellier, que des belles qualités : une belle maîtrise du baby, un humour sans pareil, un mec sur qui on peut compter donc un gars trop cool au final, une de mes plus rencontres de cet internat.
- Gauthier, merci pour ta bonne humeur, ton humour incroyable ainsi que tes conseils pertinents. Ne change pas ton extravagance pour rien au monde.
- Pauline P. alias pp6, merci pour ton écoute, pour les différentes pauses que l'on a réalisées. Tu es une personne sur qui on peut compter humainement comme professionnellement.
- Ophélie, future co-interne d'EFS, je m'attends à mettre le service sens dessus dessous avec toi, je pense qu'ils ne sont pas prêts de nous oublier (PS : je n'ai toujours pas digéré ta grande participation au piège de mes 30ans, sache qu'il y aura vengeance).
- Suzanne et Pauline à ce duo avec qui on a découvert Lavour et ses habilitations pour les gardes. Un beau moment durant cet internat.
- Aux jumelles Thène merci pour vos conseils, votre soutien et votre sincérité.
- Anne-Marie et Christina, merci pour votre présence et pour m'avoir accompagné plus d'une fois pour les changements de garde.
- Linda et Houda, merci pour ces moments de discussions et de franches rigolades.
- Aux nouveaux petits internes qui je n'ai pas passé autant de temps que j'aurais souhaité, vous êtes géniaux et vous serez bien formés ici.

Je remercie tous les techniciens des différents services avec lesquels j'ai eu l'honneur et le plaisir de travailler. Merci beaucoup d'avoir pris le temps de me former, pour votre patience, votre énergie et votre bonne humeur.

Je remercie également tous les biologistes que j'ai rencontrés durant mon internat et qui m'ont transmis leur savoir et donné de leur temps.

Aux personnes que j'ai dû oublier, bon courage et bonne avancée.

Et pour terminer ces remerciements interminables, je souhaite à toutes les personnes que j'ai citées d'avoir une vie heureuse et de vivre tous leurs rêves sauf un car vous le méritez.

# Table des matières

Remerciements .....	5
Liste des figures .....	16
Liste des tableaux .....	18
Liste des abréviations .....	19
I. IgE et allergies.....	21
1. Historique .....	21
a. L'expérience de Küstner & Prausnitz.....	22
b. Mise en évidence des IgE .....	23
2. Démarche diagnostique et place du dosage des IgE spécifiques .....	25
3. Les allergènes en diagnostic allergologique.....	32
a. Définition.....	32
b. Apports des allergènes moléculaires au niveau biologique .....	36
4. Les différentes techniques de dosage des IgE spécifiques .....	40
a. Les tests de 1 <sup>ère</sup> génération .....	40
b. Les tests de 2 <sup>ème</sup> génération .....	46
c. Les tests de 3 <sup>ème</sup> génération .....	50
d. Les tests multiplex sur biopuces à allergènes .....	52
e. Les tests de 4 <sup>ème</sup> génération .....	58
II. Validation analytique du NOVEOS .....	63
1. Performances analytiques du NOVEOS .....	63
2. Performances de NOVEOS sur des échantillons des contrôles de qualité externe (EEQ) distribués par UKNeqas.....	64
III. Comparaison des performances analytiques et cliniques de NOVEOS et d'ImmunoCAP™ .....	70
1. Résumé.....	70
2. Analyses complémentaires réalisées en parallèle.....	72
IV. Conclusion.....	76
BIBLIOGRAPHIE .....	77
Annexes.....	87

## Liste des figures

Fig. 1 : Principe du test Prausnitz-Küstner

Fig. 2 : Exemple de Prick test et d'IDR

Fig. 3 : Algorithme capitulatif sur le diagnostic de l'allergie alimentaire

Fig. 4 : Schématisation de la production d'allergène recombinant

Fig. 5 : Principe du PRIST test

Fig. 6 : Principe du RAST test

Fig. 7 : Méthodologie de détection des IgE spécifique par le système ImmunoCAP™

Fig. 8 : Classification des différents taux d'IgE spécifiques sur Système Pharmacia CAP

Fig. 9 : Automates Phadia 100/200/250/2500/5000

Fig. 10 : Dosage des IgE par techniques ELISA (immuno-enzymatique), d'après ThermoFischer®

Fig. 11 : Présentation de l'automate IMMULITE 2000 (Siemens)

Fig. 12 : Méthodologie de détection des IgE spécifique par le système Immulite

Fig. 13 : Test ImmunoCAP™ ISAC

Fig. 14 : Test Alex

Fig. 15 : Présentation de l'automate IDS-iSYSids

Fig. 16 : Principe du dosage des IgE spécifiques par chimiluminescence de l'automate iSYS

Fig. 17 : Présentation de l'automate NOVEOS

Fig. 18 : Microbilles utilisées par l'automate NOVEOS

Fig. 19 : Principe du dosage par chimiluminescence utilisé par l'automate NOVEOS

Fig. 20 : Corrélation entre NOVEOS et PHADIA250 en 2020-2021

Fig. 21 : Bland-Altman: NOVEOS vs PHADIA250 ou UKNeqas « *all methods* »



Fig. 22 : NOVEOS comparé avec les UKNeqas « *All methods* » via Bland-Altman selon le type d'allergène

Fig. 23 : NOVEOS comparé avec PHADIA250 via une courbe de corrélation (gauche) et Bland-Altman (droite)

Fig. 24 : Courbes ROC globales pour ImmunoCAP™ (gauche) et NOVEOS (droite)

Fig. 25 : Analyse des cut-offs « optimum » des IgE spécifiques sur NOVEOS et ImmunoCAP™ par rapport à l'arachide

Fig. 26 : Analyse des discordances entre les allergies cliniques et les résultats de dosage des IgE spécifiques sur NOVEOS et ImmunoCAP™

## Liste des tableaux

Tab. 1 : Les différentes questions sur l'histoire allergique

Tab. 2 : Classification des réactions anaphylactiques

Tab. 3 : Indications du dosage des IgE spécifiques dans le diagnostic et le suivi des maladies allergiques

Tab. 4 : Familles biochimiques et allergènes

Tab. 5 Résumé des différentes méthodes de 1<sup>ère</sup> génération existantes pour les IgE totales et spécifiques

Tab. 6 : Principales caractéristiques des tests Alex et Isac

Tab. 7 : Résultat de l'étude sur la stabilité OVEOS

Tab. 8 : Résultat de l'étude inter-séries sur la reproductibilité du Noveos

Tab. 9 : Liste des allergènes étudiés en UKNeqas en 2020-2021

## Liste des abréviations

$\alpha$ -GAL	Anti-Galactose- $\alpha$ -1,3-galactose
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AM	Allergène Moléculaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AUC	Aire Sous la Courbe
BAC	BromoAcétylCellulose
CCD	Cross-reactive carbohydrate determinants
C.H.U.	Centre Hospitalo-Universitaire
CQI	Contrôle de Qualité Interne
C.V.	Coefficient de Variation
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
FAST	Fluoro-AllergoSorbent Test
IC	ImmunoCAP
IDR	IntraDermo Reaction Test
IDS	ImmunoDiagnostics Systems
Ig	Immunoglobuline
IgE	Immunoglobuline de type E
IgG	Immunoglobuline de type G
IgM	Immunoglobuline de type M
ISU-E	ISAC Specific Units IgE
ITS	Imm a cifique d'allergène
JACI	Journal of Allergy and Clinical Immunology
kDa	KiloDalton
kU <sub>A</sub> /L	KiloUnité Arbitraire par litre
kU/L	KiloUnité International par litre
LTP	Lipid Transfer Proteins
$\mu$ L	Microlitres
mg/ml	Milligrammes par millilitre
mm	Millimètres
N	NOVEOS
ng	Nanogramme
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OR	Odd-Ratio
ORL	OtoRhinoLaryngée
p	Degré de Significativité
PR-10	Pathogenesis Related-10
PRIST	Paper Radio-Immunsorbent Test
PRU	Phadebas RAST units
r	Coefficient de Corrélacion
RAST	Radio-Allergo-Sorbent Test
RCLAAR	Red Cell linked Antigen Antiglobin Reaction

RIA	RadioImmunoAssay
RIST	Radio-Immunosorbent Test
RR	Risque Relatif
S.D.	Déviations Standards
Se	Sensibilité
Sp	Spécificité
SPT	Specific Prick Test
TPO	Test de Provocation par voie Orale
UI	Unité Internationale
VPN	Valeur Prédictive Négative
VPP	Valeur Prédictive Positive
WAO	World Allergy Organization
WHO	World Helth Organisation

# I. IgE et allergies

## 1. Historique

L'allergie est une réaction d'hypersensibilité induite par un mécanisme immunologique.<sup>1</sup> Le mécanisme principal de cette réaction met en jeu des immunoglobulines d'isotype E (IgE) à la surface de cellules effectrices, principalement des mastocytes tissulaires. Le *cross-linking* des IgE à la surface des mastocytes par des antigènes, dénommés ici allergènes, peut entraîner la libération d'un contenu granulaire riche en amines vasoactives (*ex* : histamine) et en enzymes (*ex* : tryptase).

L'allergie induite par les IgE constitue un problème de santé publique à l'échelle mondiale. Des estimations réalisées par la *World Allergy Organization* (WAO) en 2013 indiquent, par exemple, que 40-50% des enfants d'âge scolaire sont sensibilisés au moins un allergène, ou que 240 – 500 millions d'individus souffrent d'allergies alimentaires sur l'ensemble de la population humaine.<sup>2</sup> La prévalence des allergies alimentaires en France a été mesurée à 3,5% en 2013.<sup>3</sup>

L'allergie est actuellement classée au 4<sup>ème</sup> rang des maladies chroniques selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), avec une progression continue dans les pays industrialisés depuis 50 ans et un doublement global au cours des 15 dernières années. Les maladies allergiques constituent donc un problème économique majeur au sein de la Santé Publique.<sup>2,4</sup>

Le premier cas décrit dans l'Histoire de la forme la plus grave de l'allergie, l'anaphylaxie, concerne le Pharaon *Menes* décédé il y a 45 siècles (*est.* 2641 av. JC, basée sur un document égyptien) à la suite d'une piqûre de guêpe.<sup>5</sup> La première description médicale du « Rhume des foins » apparaît au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, en Angleterre. Charles Harrison Blackley démontra que « *les inhalations de pollens produisaient toujours chez les patients des symptômes caractéristiques dont l'intensité était en relation directe avec la quantité de pollen en suspension dans l'air ; et que la chaleur, la lumière, la poussière, les substances odorantes ne suffisaient pas pour déterminer un accès de fièvre des foins* ». Il démontra l'action des pollens des graminées fleurissant en Angleterre en mai et juin, et, d'autre part, il prouva que ces graminées forment les 95% des pollens en suspension dans l'air les collectant par des cerfs-volants comportant des lames glycinées. De plus, il démontra que ces manifestations

saisonniers étaient particulièrement fréquentes parmi les classes londonniennes aisées et absentes chez les populations vivant en zone rurale (« *One very curious circumstance in connection with hay fever is that the persons who are **most subjected to the action of pollen belong to a class which furnishes the fewest cases of the disorder, namely, the farming class. This remarkable fact may be accounted for in two different ways: it may, on the one hand, be due to the absence of the predisposition which mental culture generates; or, on the other hand, it may be that in this disease there is a possibility of a patient being rendered unsusceptible to the action of pollens by continued exposure to its influence. Blackley C. 1873*** »). Il est aussi « l'inventeur » des tests cutanés et des tests de provocation dont il était son propre cobaye, et a été qualifié par ses pairs de « *one-man walking allergy laboratory* ». <sup>6-8</sup>

Le premier département d'immunologie a été fondé en 1919 à New York au *Cornell Medical College* et placé sous la direction de Robert A. Cooke. Avec son adjoint Arthur F. Coca (le fondateur du *Journal of Immunology*), ils développèrent une clinique d'allergologie avec un recrutement de patients asthmatiques, atteints de dermatites de contact, rhinites allergiques et de symptômes associés à une maladie sérique. Ils furent les premiers à proposer l'existence d'une prédisposition génétique aux maladies allergiques en créant le terme d'**atopie** pour désigner cette condition. Cette très forte interaction avec la clinique, que l'on retrouve chez certains allergologues autrichiens et allemands, allait permettre des progrès importants dans ce domaine. <sup>7,9</sup>

### **a. L'expérience de Küstner & Prausnitz**

En effet, deux médecins allemands de l'Institut d'hygiène de Breslau (actuellement Wrocław, en Pologne), Heinz Küstner et Carl Prausnitz ont mis au point ce que l'on appellera plus tard le transfert passif de l'immunité, ou test de Prausnitz-Küstner. Küstner était sujet aux crises d'urticaire quand il consommait de la morue cuite, mais pas lorsqu'il était exempt de la morue crue. De son côté, Prausnitz était allergique aux pollens, mais insensible à la morue. Prausnitz eut l'idée de chercher si l'allergie de Küstner pouvait lui être transmise par injection du sérum de ce dernier au niveau de son derme (partie profonde de la peau). Si l'hypothèse était correcte, l'injection au point de la première inoculation (en admettant que la goutte de sérum soit retenue dans le derme) d'extrait de morue devait induire une réponse allergique si le poisson était cuit, et non si le poisson était cru. Et c'est effectivement ce qui fut observé, avec une réponse locale

brutale (formation d'une bulle et inflammation). Prausnitz et Küstner appelèrent « réagine » la substance contenue dans le sérum et ayant causé la réponse allergique.<sup>7,9</sup>

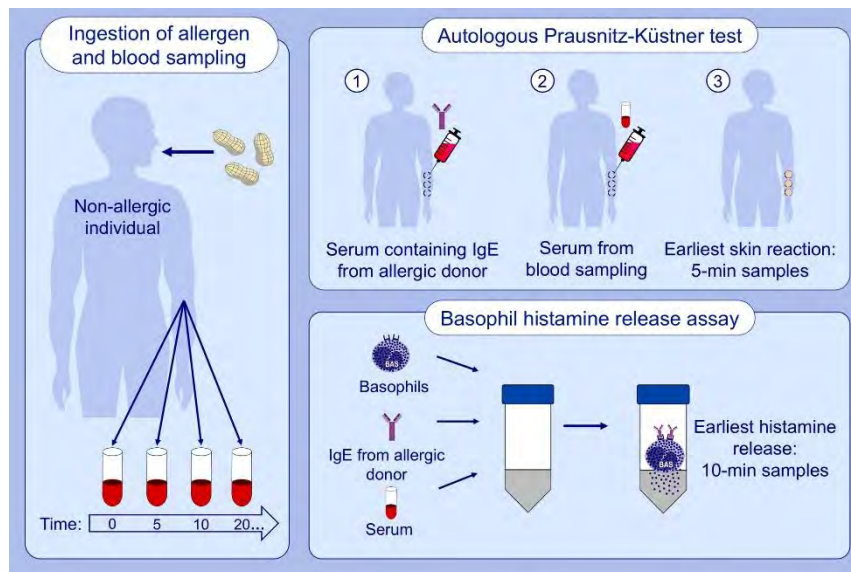


Fig. 1 : Principe du test Prausnitz-Küstner <sup>10</sup>

Le test de Küstner-Prausnitz a constitué jusque dans les années 1960 la méthode standard d'identification des allergènes responsables de symptômes d'allergie, puis a été abandonné, entre autres du fait du risque de transfert de virus (hépatites puis Virus de l'Immunodéficience Humaine). Il a été remplacé par la technique d'exposition à une batterie d'allergènes par voie transcutanée.<sup>9</sup>

Il fallut ensuite attendre 1966 pour que l'on montre que la « réagine » était un anticorps de la classe des IgE, qui, en interagissant avec l'antigène qui lui est propre, déclenche la libération d'histamine et la réaction allergique.

## b. Mise en évidence des IgE

Appelés préalablement « réagines », il aura fallu attendre 1966 pour qu'un couple de médecins : Dr Teruko Ishizaka et sa femme Dr Kimishige Ishizaka prouvent l'existence d'une nouvelle classe d'anticorps : les IgE, lorsqu'ils travaillaient à l'Institut de Recherche de l'Asthme et Hôpital de Denver en Amérique. A noter que les IgE ont été mises en évidence de façon simultanée par des travaux suédois.<sup>11</sup> En effet, lors de la survenue d'un patient souffrant d'un myélome qui produisait des protéines ayant une activité à réagine, la technique de

radioimmunoassay (RIA) a permis l'identification de la « réagine » comme une IgE spécifique d'allergène. Puis l'apparition d'un deuxième patient présentant un myélome à IgE a fourni plus de 30L d'Immunoglobuline (Ig) lors de ses plasmaphérèses qui ont servi à la production d'anticorps polyclonaux spécifiques de la chaîne lourde  $\epsilon$ . Ces différentes découvertes ont permis une véritable révolution dans la compréhension de l'allergie.<sup>12,13</sup>



## 2. Démarche diagnostique et place du dosage des IgE spécifiques

Le diagnostic d'une hypersensibilité alimentaire nécessite cinq phases complémentaires :

- l'histoire clinique ;
- les tests cutanés ;
- les dosages allergologiques *in vitro* (dont l'examen principal est celui des IgE spécifiques) ;
- l'éviction ;
- et les tests de provocations.

Un des principaux points du diagnostic et du traitement est l'identification de l'allergène en cause. Pour cela, on se base sur l'histoire clinique du patient. Cependant, cette étape est assez complexe en raison de la non-spécificité des symptômes cliniques et de la multiplicité des mécanismes et des causes. C'est pourquoi l'interrogation clinique est associée à un bilan allergologique qui peut être composé de tests cutanés et/ou de dosages des IgE dites spécifiques des réactions d'hypersensibilité IgE dépendantes. Les dosages IgE spécifiques s'adressent aux réactions à médiation IgE ou IgE dépendante. <sup>5,14-16</sup>

### i. L'anamnèse

L'histoire clinique joue un rôle primordial dans l'orientation de l'enquête allergologique. Les symptômes liés à une allergie alimentaire se manifestent généralement en moins de deux heures après la consommation de l'aliment incriminé. Cependant, lorsqu'il s'agit de dermatite atopique, le délai peut-être plus complexe à interpréter, car les lésions cutanées (dermatite atopique ou d'urticaire chronique) sont permanentes et une aggravation de l'eczéma peut survenir jusqu'à 24 heures après ingestion de l'aliment déclencheur. Mais il ne faut pas pour autant sous-estimer son rôle. En effet, cette enquête alimentaire, réalisable sur une période de sept jours, permet de dépister les fausses allergies alimentaires : un régime riche en histamine et en tyramine peut provoquer des symptômes similaires à ceux d'une allergie, notamment au niveau cutané.

De plus, l'enquête alimentaire permet de détecter les allergies dû à la consommation d'un allergène masqué (exemple : les macarons, aliment favori des fêtes, sont faits avec de la farine

d'amande ainsi un patient allergique l'amande fera une action allergique lors de la consommation de macarons). De même, lors de l'enquête alimentaire, si l'aliment incriminé est consommé sans provoquer de réaction allergique, alors l'allergie à cet aliment peut être écartée sans nécessiter d'autres explorations.<sup>5,14-17</sup>

<p><b>Symptoms</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Onset (first occurrence, acute complaints)</li> <li>● Duration</li> <li>● Timely course (circadian, yearly rhythm)</li> <li>● Intensity (severity)</li> <li>● Frequency of relapses</li> <li>● Response to therapy</li> <li>● Deterioration through therapy</li> <li>● Necessity of hospital admission</li> </ul> <p><b>Other diseases</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Personal history (atopy)</li> <li>● Family history (atopy)</li> <li>● Other conditions (gastroesophageal reflux, skin or airway diseases, drug or food reactions)</li> </ul> <p><b>Elicitors and situations</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Season of the year</li> <li>● Local conditions (indoor, outdoor)</li> <li>● Occupation</li> <li>● Holiday, leisure</li> <li>● Hobby</li> <li>● Drugs</li> <li>● Foods</li> <li>● Exercise</li> <li>● Stress, emotional burden</li> <li>● Infectious disease</li> <li>● UV radiation</li> <li>● Hormonal situation (menstruation, pregnancy)</li> </ul> <p><b>Living conditions</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Animal contact (also passive, "derivative")</li> <li>● Tobacco smoke (active, passive)</li> <li>● Housedust mite, mold exposure</li> <li>● Chemicals</li> <li>● Plants</li> <li>● Cosmetics</li> <li>● Sleeping dyspnea, snoring, mouth breathing</li> </ul>
---

Tab. 1 : Les différentes questions sur l'histoire allergique<sup>5</sup>

## ii. Les tests cutanés

L'étape suivante du diagnostic d'allergie alimentaire consiste en la réalisation de tests cutanés à lecture immédiate. Ils consistent à exposer les mastocytes dermiques à un ou plusieurs allergènes. Les mastocytes porteurs d'IgE spécifiques réagissent en libérant des médiateurs, ce qui entraîne la manifestation classique de Lewis : un œdème, un érythème et des

mangeaisons. En pratique, seul l'œdème (ou papule) est pris en compte pour interpréter le test, et il est mesuré en millimètre (mm).<sup>18</sup>

Les tests cutanés sont réalisés à l'aide de la technique du *prick-test*, une méthode simple, rapide et hautement spécifique. Pour effectuer ce test, une goutte d'allergène est déposée sur la peau, puis une piqûre est réalisée à travers la goutte de réactif. Les tests sont généralement effectués sur le bras ou le dos, avec un espacement de 3 cm entre eux. La lecture des résultats est effectuée dix à quinze minutes plus tard.

Les *prick-tests* peuvent être réalisés dès le premier mois de vie, après avoir vérifié la réactivité de la peau au phosphate de codéine 9 % et à l'histamine 10 mg/ml, mais en utilisant également un témoin négatif afin d'éliminer un éventuel dermographisme. Les tests cutanés sont réalisés après l'arrêt des traitements antihistaminiques, dans des délais variables en fonction de la molécule utilisée. On considère comme positif un test cutané dont le diamètre de l'induration est supérieur à 3 mm et supérieur à 50 % du témoin positif.

Les *prick-tests* présentent de nombreux avantages, tels que leur simplicité de réalisation, leur rapidité, leur facilité d'interprétation, leur caractère peu douloureux, leur coût peu élevé et la possibilité de réaliser un grand nombre de tests lors d'une même séance. Cependant, chez les enfants, il faut faire attention à leur reproductibilité modérée. Dans le cas où l'histoire clinique suggère fortement une allergie alimentaire malgré des résultats négatifs, il est donc recommandé de refaire les tests cutanés.

Les *patch tests*, également appelés tests épicutanés ou *atopy patch tests*, sont utilisés pour explorer l'hypersensibilité retardée. Ils provoquent une réaction eczémateuse sur la zone d'application du test. En pratique, les *patch tests* sont réalisés après l'arrêt des traitements antihistaminiques et corticoïdes (locaux et oraux), en appliquant l'allergène suspecté dans des cupules qui sont placées sur une zone exempte d'eczéma, en région médio-dorsale de chaque côté de la colonne vertébrale, puis fixées avec un sparadrap. Les cupules sont retirées 48 heures après l'application et la lecture est effectuée 24 heures plus tard. Les *Finn chambers* sont les cupules les plus couramment utilisées.

L'interprétation des *patch tests* est délicate, et le meilleur critère de positivité est la présence d'une induration et d'au moins 7 papules (la lecture d'un *atopy patch test* nécessite donc de palper la zone concernée). Les médecins français disposent d'un *atopy patch test* spécifique

pour le lait, préparé et facile à utiliser : le Diallertest®. Les résultats du Diallertest® semblent bien corrélés avec ceux de l'*atopy patch test* réalisé avec du lait et un *Finn chamber*.<sup>5,14-17</sup>

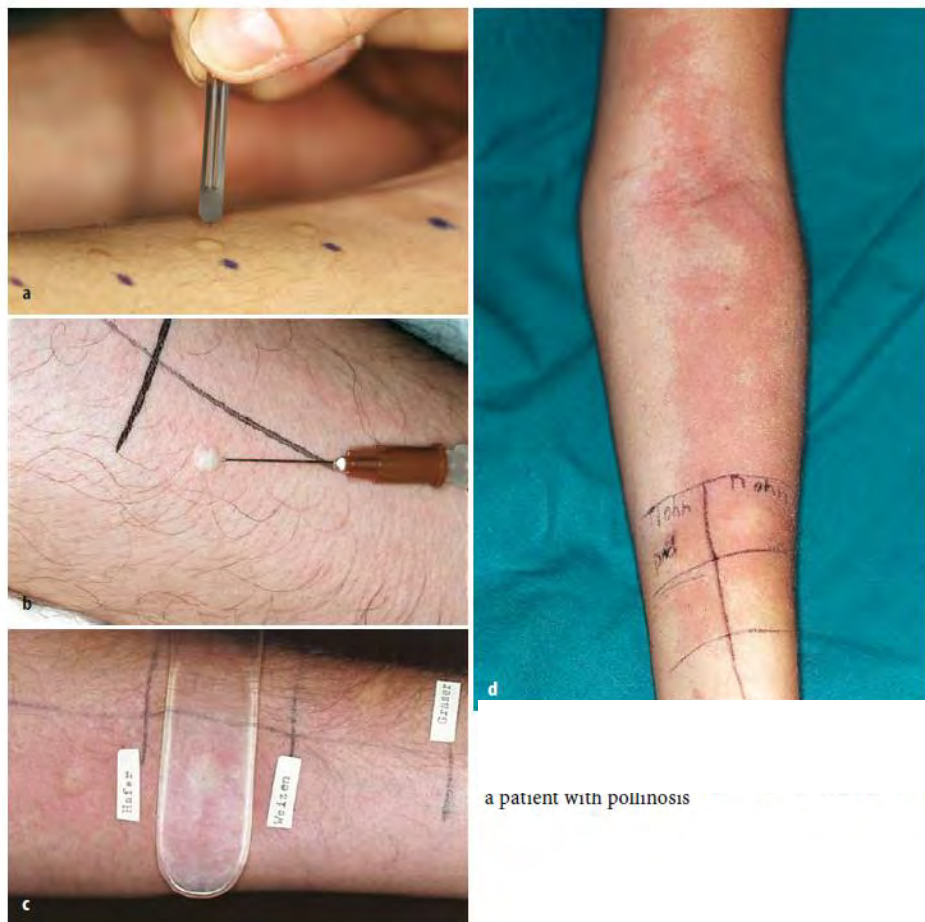


Fig. 2 : Exemple de *Prick test* et d'*Intradermo Reaction Test (IDR)* <sup>5</sup>

### iii. Les dosages IgE spécifiques

A l'inverse de nombreux autres examens biochimiques, il n'est pas nécessaire d'être jeun pour les effectuer. Ils permettent de valuer uniquement la sensibilisation d'un patient à un allergène donné et ne permettent en aucun cas de diagnostiquer une allergie. Pour certains allergènes tels que le lait, l'œuf, l'arachide et le poisson, le taux spécifique d'IgE mesuré via la technique CAP System® est corrélé à la positivité du test de provocation par voie orale. Cette corrélation permet de réduire la nécessité des tests de provocation. Cependant, il convient de noter que le taux seuil varie selon différents facteurs tels que la population étudiée, l'âge des enfants, les objectifs des études (diagnostic ou évaluation de la tolérance) et les symptômes présentés. De

plus, il est important de souligner que les valeurs prédictives ne sont que rarement de 100 %.<sup>5,14-</sup>

17

#### **iv. L'éviction alimentaire**

L'éviction alimentaire est basée sur les éléments cliniques, la positivité des tests cutanés et/ou des taux d'IgE spécifiques et/ou des résultats des *atopy patch tests*. Une particularité est le cas d'une dermatite atopique ou d'urticaire. En effet, si les symptômes s'améliorent/disparaissent après avoir exclu un aliment de l'alimentation pendant 4 semaines, cela suggère que cet aliment pourrait être à l'origine des manifestations. De même, si les symptômes réapparaissent après la réintroduction de l'aliment, cela renforce l'hypothèse d'une allergie à cet aliment.<sup>5,14-17</sup>

#### **v. Les tests de provocation par voie orale**

Le diagnostic d'allergie alimentaire est seulement ali par la alisation d'un test de provocation par voie orale (TPO). Ce dernier reproduit fidèlement l'évènement allergique en respectant le temps nécessaire, la quantité d'aliment consommé et les symptômes observés. Il permet de faire la distinction entre une simple sensibilisation (test positif sans signification clinique) et une véritable allergie alimentaire.<sup>19</sup>

Lors du TPO, l'aliment suspecté est administré par doses progressivement croissantes, toutes les 20 minutes, en l'absence de toute manifestation allergique. La dose maximale doit correspondre à la quantité d'aliment normalement ingérée à l'âge correspondant dans le régime alimentaire. Le choix de la progression dépend de l'histoire clinique et du type d'aliment étudié. La réponse au TPO est évaluée en fonction de la quantité d'aliment nécessaire pour déclencher les symptômes (dose déclenchante et dose cumulée provoquant une réaction) ainsi que le type de signes cliniques observés en réponse à l'aliment (voir Tab. 2).

(Not anaphylaxis)		ANAPHYLAXIS		
Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Symptom/sign(s) from 1 organ system present	Symptom/sign(s) from $\geq 2$ organ systems listed in grade 1	Any 1 (or more) of the following symptom/signs:	Any 1 (or more) of the following symptom/signs:	Any 1 (or more) of the following symptom/signs:
<b>Cutaneous</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Urticaria and/or erythema-warmth and/or pruritus, other than localized at the injection site</li> </ul> And/or <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tingling, or itching of the lips* or</li> <li>• Angioedema (not laryngeal)</li> </ul>		<b>Lower airway</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mild bronchospasm, e.g., cough, wheezing, shortness of breath which responds to treatment</li> </ul>	<b>Lower airway</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Severe bronchospasm e.g., not responding or worsening in spite of treatment</li> </ul>	<b>Lower or upper airway</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Respiratory failure</li> </ul>
Or	And/or	And/or	And/or	And/or
<b>Upper respiratory</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nasal symptoms (e.g., sneezing, rhinorrhea, nasal pruritus, and/or nasal congestion)</li> </ul> And/or <ul style="list-style-type: none"> <li>• Throat-clearing (itchy throat)*</li> </ul> And/or <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cough not related to bronchospasm</li> </ul>	<b>Gastrointestinal**</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Abdominal cramps and/or</li> <li>• Vomiting/diarrhea that do not meet criteria for anaphylaxis as listed in Table 2.</li> </ul>	<b>Gastrointestinal*</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Abdominal cramps and/or</li> <li>• Vomiting/diarrhea</li> </ul>	<b>Upper airway</b> Laryngeal edema with stridor	<b>Cardiovascular</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Collapse/hypotension</li> <li>• Loss of consciousness (vasovagal events excluded)</li> </ul>
Or		And/or		
<b>Conjunctival</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erythema, pruritus, or tearing</li> </ul>		<b>Uterine</b> cramps +/- uterine bleeding		
Or				
<b>Other</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nausea</li> <li>• Metallic taste</li> </ul>				

Tab. 2 : Classification des réactions anaphylactiques <sup>20</sup>

Ces informations permettent d'évaluer plus précisément le risque associé à la consommation accidentelle de l'aliment et orientent ainsi les mesures thérapeutiques à prendre : le degré d'éviction de l'aliment (mise en place d'une éviction alimentaire partielle ou stricte) ainsi que la composition de la trousse d'urgence (avec ou sans adrénaline). <sup>19</sup>

Le TPO doit toujours être réalisé dans un environnement hospitalier spécialisé, sous une étroite surveillance médicale. Étant potentiellement dangereux, il est contre-indiqué en cas de réaction anaphylactique aiguë suite à une allergie alimentaire. <sup>5,14-17</sup>

Le tableau 3 permet de résumer les caractéristiques des différents tests utilisés en allergologie et la figure 19 est l'algorithme du diagnostic de l'allergie alimentaire.

	Le test prouve un mécanisme IgE-dépendant	Le test permet de conclure à une		Le produit testé est			Robustesse (répétabilité, objectivité, normalisation)	Importance de la coréactivité
		IgE-réactivité	Allergie	Natif	Un extrait	Un allergène pur		
<i>Dénominations traditionnelles</i>		« sensibilisation »		« allergène »				réactivité « croisée »
IgE totales	non	non	non	non	non	non	oui	sans objet
« IgE spécifiques »	oui	oui	non	non	oui	oui (rare)	oui	oui ++
Immunoempreintes	oui	oui	non	non	oui	oui	± oui	oui (± limitée)
Tests cellulaires	oui (indirect)	oui	non	non	oui	Oui (haptènes)	± oui	oui
Tests cutanés (prick, IDR)	supposé (réactions immédiates)	oui	non	oui possible	Oui (le plus souvent)	Oui (recherche)	faible	oui
Tests cutanés (patches)	plutôt non (réactions retardées)	± non (réactivité cellulaire)	non (sauf dermite de contact)	oui	oui	oui (haptènes)	très faible	oui
Tests d'éviction/réintroduction	non	non	oui	oui	non	non	absente	possible (non maîtrisée)
Tests de provocation	non	non	oui	oui	oui	oui (haptènes)	très faible	sans incidence sur l'interprétation du test

Tab. 3 : Indications du dosage des IgE spécifiques dans le diagnostic et le suivi des maladies allergiques <sup>21</sup>

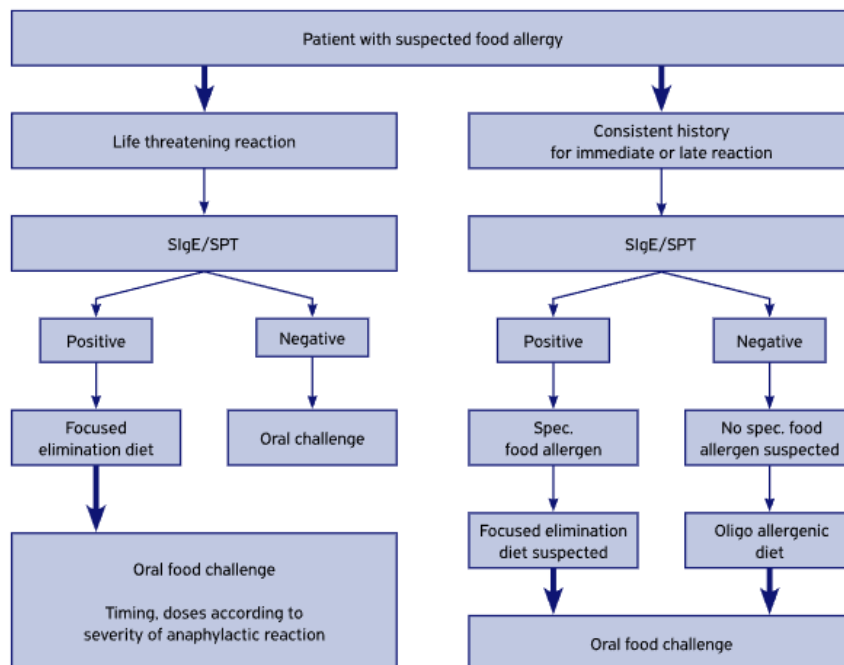


Fig. 3 : Algorithme capitulatif sur le diagnostic de l'allergie alimentaire <sup>22</sup>

### 3. Les allergènes en diagnostic allergologique

#### a. Définition

La définition d'allergène est : « toute substance, particule ou corps organique (atome, molécule, protéine) capable de provoquer une réaction allergique chez un sujet préalablement sensibilisé lorsqu'il est en contact (cutané, inhalation ou ingestion) ». <sup>17,23</sup> De manière générale, les allergènes à l'origine des allergies IgE médées sont des protéines, parfois des glycoprotéines, ayant un poids moléculaire compris entre 5 000 à 70 000 kDa.

Il existe différentes manières de classer les allergènes. En effet, on peut les classer selon leur origine, leur production, leur moyen de contact, le mécanisme de pathogénicité, la pathogénicité qu'ils provoquent ou encore selon la clinique que présente l'individu affecté. On peut ainsi définir :

- Les pneumallergènes qui sont des allergènes aéroportés qui touchent la sphère ORL et les bronches. On y retrouve des pollens, des poussières de moisissures, d'acariens ou de protéines d'animales.
- Et les trophallergènes qui sont des protéines pouvant se retrouver en aérosol et en aliment. Ces dernières proviennent de végétaux, de fruits, de viandes, d'œuf, de lait, de poissons ou encore de graines. <sup>5</sup>

On distingue également les extraits allergéniques qui sont obtenus par extraction aqueuse d'une source allergénique naturelle telle que les pollens, les aliments ou squames et phanères d'animaux ; des allergènes moléculaires qui sont des structures moléculaires synthétisés, parfois protéiques, capables de fixer des IgE.

#### i. Les extraits allergéniques

L'utilisation d'extraits en biologie présente un certain nombre de limites pour la recherche d'IgE spécifiques. En effet, ce sont des préparations complexes qui renferment des molécules allergéniques mais aussi des molécules non allergéniques, ce qui apporte un « bruit de fond » pouvant nuire à la sensibilité des tests diagnostiques. De ce fait, ils posent un problème de standardisation de par leur contenu en allergènes pouvant différer d'un lot à l'autre du fait de la variabilité de ces sources naturelles et de leur procédé de fabrication. En effet, l'extraction



aqueuse ne permet pas de recueillir les allergènes qui ne sont pas hydrosolubles (oléosines de l'arachide, par exemple), de même le chauffage (en particulier pour les extraits de plantes et de fruits) peuvent conduire à la dégradation d'allergènes fragiles expliquant ainsi des résultats faussement négatifs lors du dosage des IgE spécifiques. Une des solutions trouvées et encore utilisées actuellement est de surcharger certaines préparations d'extraits naturels à l'aide de protéines recombinantes (exemples : rHes b 5 pour l'extrait de latex naturellement pauvre en cet allergène ou encore rCor a 1 pour la noisette). Les extraits bruts peuvent également conduire à des résultats faussement positifs, à cause de réactions croisées ou par le biais de contamination d'allergènes (exemple : la présence d'acariens dans des extraits d'Epilium de chat ou le développement de moisissures dans des extraits de pollen).<sup>24,25</sup> Les extraits naturels posent donc des problèmes d'exactitude par ce manque de standardisation des préparations et ne permettent pas non plus de faire la différence entre une réaction croisée avec ou sans traduction clinique et une vraie co-sensibilisation à différentes sources allergéniques dans une population où le nombre de sujets polysensibilisés ne cesse de croître.<sup>26-28</sup>

Une autre cause principale d'apparition de faux-positif dans les extraits naturels sont les structures glucidiques des allergènes qui peuvent présenter de fortes homologues. Cela concerne notamment les pollens, les fruits, le latex et les venins. Ces dernières sont à l'origine de réactions croisées qui produisent des IgE dites *anti-cross-reactive carbohydrate determinants* (CCD). Environ 20 % des patients polysensibilisés aux pollens possèdent des IgE anti-CCD. Un moyen de contourner ces différents problèmes est l'utilisation d'allergènes recombinants parfaitement identifiés sur le plan moléculaire.<sup>26,29-31</sup>

## ii. Les allergènes moléculaires

En effet, dans les années 1980-1990, l'avènement de la biologie moléculaire, des techniques de génie génétique ainsi que le développement de méthodes analytiques et séparatives très performantes ont ouvert la voie de l'allergie moléculaire. Chaque allergène moléculaire (AM) est une molécule de structure peptidique connue, caractérisée à partir d'une source allergénique. Les AM sont désignés selon une nomenclature qui leur est propre : dans l'exemple de l'allergène « Asp f 1 » (mitogilline / ribotoxine) présent dans l'extrait d'*A. fumigatus*, les trois premières lettres font référence au genre (*Aspergillus*) et la quatrième lettre correspond à l'espèce (*fumigatus*). Il est ensuite suivi d'un chiffre correspondant généralement à l'ordre de découverte. Si l'allergène est recombinant (produit dans un organisme-hôte), la lettre « r » est

rajoutée en première position, la lettre désigne un AM « n » natif (purifié d'un extrait). Il existe enfin le suffixe « s » qui désigne des allergènes synthétiques, généralement des peptides correspondant à des épitopes linéaires reconnus par les IgE. Pour certains AM, des iso-allergènes (>67% d'identité d'acides aminés) et des variants (>90% d'identité) ont été identifiés et sont nommés par l'ajout de quatre chiffres (ex : 2 iso-allergènes de l'Ambroisie, Amb a 2.0101 or 2.0102).<sup>5,32</sup>

La caractérisation des AM permet aussi d'identifier des allergènes dits majeurs ou mineurs. Un allergène est dit « majeur » quand un allergène purifié déclenche une allergie chez 50% ou plus des patients testés et qu'il induit des IgE spécifiques, avec des tests cutanés immédiatement positifs, à une concentration très faible, chez au moins 90% des sujets ayant la maladie allergique en relation avec cet allergène. Le premier AM cloné en 1988 était Der p 1, allergène majeur présent dans les excréments d'acarien *Dermatophagoides pteronyssinus*. La connaissance du profil de sensibilisation d'un patient vis-à-vis des AM présent dans une ou plusieurs sources allergéniques peut permettre d'orienter l'immunité spécifique d'allergène (en abrégé : ITS, et anciennement appelée « désensibilisation »).<sup>14</sup>

Un grand nombre (>100) d'allergènes recombinants ou natifs purifiés qui reproduisent la complexité des épitopes reconnus par les IgE à la surface des allergènes naturels est aujourd'hui disponible. La liste des allergènes, leurs séquences, leurs fonctions biologiques et leur classification dans différentes familles peuvent être retrouvées sur des bases de données telles que Allergome (<http://www.allergome.org>) ou AllFam (<http://www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/>). Il faut souligner que seulement 5 % des familles protéiques des règnes végétal ou animal renferment des allergènes documentés. À ce jour, 1004 allergènes regroupés en 175 familles ont été identifiés (données AllFam du 4 février 2011).

La production d'allergène recombinant, telle que sur la figure 18, se déroule en plusieurs étapes. La première consiste en la sélection de l'organisme qui produit naturellement les allergènes. L'étape suivante consiste à en isoler les acides ribonucléiques (ARN) messagers (ARNm) afin d'obtenir une banque d'acide désoxyribonucléique (ADN) complémentaire (ADNc). Cette banque peut ensuite être criblée, soit en recherchant des séquences d'acides nucléiques homologues d'AM connus, soit en constituant une banque d'expression en organisme hôte, celle-ci étant ensuite exposée à des IgE de patients sensibilisés ou allergiques.

L'expression de l'allergène recombinant peut se faire soit sur un système procaryote, généralement des bactéries telles que *Escherichia coli*, soit dans des systèmes eucaryotes (généralement levures, cellules d'insectes). La étape suivante est d'extraire et de purifier l'allergène recombinant obtenu et enfin de le caractériser sur le plan physicochimique mais aussi immunologique. Ils nécessitent également d'être validés grâce à la spectrométrie de masse afin de pouvoir s'assurer de la ressemblance/différence des structures entre les allergènes naturels et leurs recombinants. La confirmation de l'identification et de la pertinence d'un AM nouvellement caractérisé requiert une immunovalidation à l'aide de sérums de sujets sensibilisés et/ou allergiques à l'allergène natif et des tests d'inhibition comparative validés soit avec des allergènes naturels, soit avec des allergènes recombinants.<sup>33</sup>

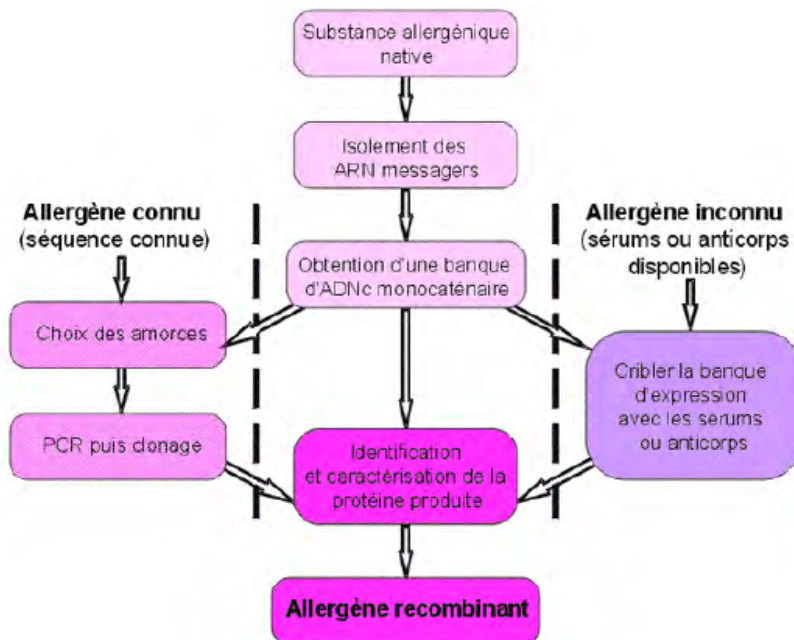


Fig. 4 : Schématisation de la production d'allergène recombinant<sup>34</sup>

Ainsi, les AM présentent le grand avantage de pouvoir être produits en grande quantité (ce qui n'est pas le cas des allergènes naturels) et de façon très reproductible de lot-à-lot.

Cependant, il existe des défauts à la production de ce type d'allergènes. En effet, les cellules de procaryotes où ils sont exprimés telles que *Escherichia coli* ne peuvent réaliser la glycosylation telle qu'elle existe dans de nombreuses protéines naturelles allergéniques végétales ou animales. Rarement, ce point peut limiter l'utilisation de ces AM si leur version « native » (telle

que se présente dans l'extrait allergénique) nécessite la présence de déterminants glucidiques, en plus d'épitopes peptidiques, pour être reconnus par les IgE. Ce phénomène a été identifié, par exemple, pour la hyaluronidase du venin d'abeille (Apm 1) et l'allergène majeur de l'armoise (Art v 1)<sup>35</sup>. De plus, d'autres absences de modifications post-translationnelles telles que la phosphorylation ou la formation de pont disulfures peuvent altérer le repliement (*folding*) et modifier la structure tridimensionnelle des protéines recombinantes par rapport à l'allergène originel, pouvant ainsi aboutir à la suppression de certains épitopes conformationnels.<sup>5,24,27-31,36</sup>

## b. Apports des allergènes moléculaires au niveau biologique

L'utilisation d'allergènes moléculaires présente de nombreux intérêts.

### i. Identification des familles biochimiques responsables des réactions croisées

Ces avancées ont permis la définition et l'identification des familles biochimiques principales responsables des réactions croisées. Il s'agit chez les plantes : des protéines de défense PR-10 (*pathogenesis related*), des *lipid transfer proteins* (LTP), des *thaumatin-like proteins*, des albumines 2S, des profilines et des polcalcines et chez les animaux : des tropomyosines, des parvalbumines ou encore des albumines. Ces dernières correspondent souvent à des panallergènes (voir tab. 4).

Allergènes d'origine végétale	
PR-10 ou Bet v 1-like ( <i>pathogenesis related</i> )	Bouleau (Bet v 1), noisette (Cor a 1), arachide (Ara h 8), soja (Gly m 4), céleri (Api g 1), pêche (Pru p 1), kiwi (Act d 8), pomme (Mal d 1), cerise (Pru av 1)...
LTP ( <i>lipid transfer proteins</i> , PR-14)	Pêche (Pru p 3), noisette (Cor a 8), arachide (Ara h 9), armoise (Art v 3), pariétaire (Par j 2), pomme (Mal d 3), cerise (Pru av 3)...
TLP (Thaumatococcus-like Proteins)	Pêche (Pru p 2), pomme (Mal d 2), kiwi (Act d 2), banane (Mus a 4)...
Albumines 2S	Arachide (Ara h 2, Ara h 6), noix du Brésil (Ber e 1), sésame (Ses i 1)...
Protéines 11S	Arachide (Ara h 3), noisette (Cor a 9), soja (Gly m 6), noix cajou (Ana o 2)
Protéines 7S	Arachide (Ara h 1), noisette (Cor a 11), soja (Gly m 5), lentille (Len c 1)...
Profilines	Bouleau (Bet v 2), phléole (Phl p 12), latex (Hev b 8), pêche (Pru p 4)...
Polcalcines	Bouleau (Bet v 4), phléole (Phl p 7), olivier (Ole e 3)...
Bêta expansines	Pollens de graminées (Phl p 1)...
Allergènes d'origine animale	
Tropomyosines	Crevette (Pen a 1), acariens (Der p 10), blatte (Bla g 7), anisakis (Ani s 3)...
Parvalbumines	Carpe (Cyp e 1), morue (Gad e 1)
Lipocalines	Chat (Fel d 4), chien (Can f 1, Can f 2), vache (Bos d 5), souris (Mus m 1)...
Albumines	Chat (Fel d 2), chien (Can f 3), vache (Bos d 6)...

Tab. 4 : Familles biochimiques et allergènes<sup>29</sup>

## ii. L'identification des marqueurs de sensibilisation

Un autre avantage majeur de l'emploi des allergènes moléculaires est l'identification des marqueurs de sensibilisation spécifique et initiale à une source allergénique. Une revue générale de ces marqueurs a été récemment publiée par Sastre<sup>37</sup>.

Comme exemple, on peut citer l'arachide qui possède comme allergènes moléculaires l'Ara h 1, 2, 3 et 6. Ces derniers sont des marqueurs d'une sensibilisation initiale avec un intérêt majeur pour Ara h 2.

Un autre exemple est la sensibilisation au latex. En effet, le dosage des extraits allergéniques naturels concluait à une sensibilisation chez des sujets qui ne présentaient pas de signes cliniques. Or les allergènes moléculaires rHev b 1, rHev b 3, rHev b 5 et rHev b 6.02 sont quant à eux bien associés à une allergie primaire au latex<sup>38</sup> et ne sont pas retrouvés chez des patients ne présentant pas des symptômes cliniques.

On peut également citer l'exemple du diagnostic de l'allergie au venin d'hyménoptères qui a permis la découverte d'allergènes majeurs spécifiques d'espèces comme Api m 1 (phospholipase A2) pour l'abeille, Pol d 5 pour la guêpe poliste, et Ves v 1 (phospholipase A1) et Ves v 5 (antigène 5) pour la guêpe vespula. Ces allergènes sont naturellement porteurs de résidus glucidiques, et réagissent donc avec les IgE anti-CCD, ce qui entraîne la détection de sensibilisation sans signification clinique. En conséquence, les versions « r » de ces AM, lesquelles ne présentent pas de résidus glycosylés, et ne sont donc pas reconnues par les IgE anti-CCD, sont utilisées pour détecter les IgE dirigées contre des épitopes peptidiques, lesquelles IgE sont associées à des manifestations cliniques. La recherche des IgE anti-CCD peut également se faire par le test broméline (Ana c 2) ou par le test MUXF3. Elle est particulièrement utile en cas de sensibilisation à des aliments végétaux, au latex chez un sujet allergique au pollen sans facteur de risque professionnel, chez des sujets positifs aux extraits des venins d'hyménoptères.

Un dernier point à souligner est la découverte récente de l'existence d'IgE anti-galactose- $\alpha$ -1,3-galactose ( $\alpha$ -gal).<sup>39</sup> Ces dernières sont capables de déclencher des réactions anaphylactiques graves notamment après administration de certains traitements comme l'anticorps (Ac) monoclonal cetuximab mais aussi des réactions retardées après consommation de viande de

bœuf, de porc ou d'agneau. L'apparition de ces IgE serait induite par des piqûres de tiques et l'on ignore pourquoi ces IgE, bien que dirigées contre un épitope glucidique, sont pathogènes.

### iii. La détermination de facteurs prédictifs de gravité

Un autre avantage est la détermination de facteurs prédictifs de gravité. La sévérité des réactions est différente selon les familles moléculaires auxquelles appartiennent les allergènes l'origine de la sensibilisation du patient.

D'une manière générale, les symptômes cliniques sont de plus en plus graves dans l'ordre des familles suivantes : CCD, profilines, PR-10 (Bet v 1-like), LTP et protéines de stockage. Cela est expliqué par la structure des protéines. En effet, les LTP qui sont la cause de réactions systémiques possèdent une structure tridimensionnelle très compacte avec des ponts disulfures intra- et interchaîne qui rendent ces protéines résistantes à la cuisson et aux enzymes digestives. D'une façon générale, plus un AM est thermostable et résistant aux enzymes digestives, plus la présence d'IgE dirigées contre cet AM est associée à un risque de réactions allergiques sévères. À l'inverse, les PR-10 qui sont responsables de syndromes oraux, sont beaucoup plus labiles. Les AM apportent donc une information essentielle sur le mode de sensibilisation et contribuent au développement d'une stratégie préventive en matière d'allergie alimentaire. En effet, dans l'exemple d'une allergie au lait de vache, l'utilisation d' $\alpha$ -lactalbumine recombinante constitue une aide au diagnostic d'allergie sévère.<sup>40</sup> De plus, dans les cas graves d'allergie au lait de vache, il est observé une plus large diversité de reconnaissance épitopique et une plus grande affinité des IgE pour des peptides issus des caséines et de la  $\beta$ -lactoglobuline l'aide d'une technologie *micro-array*.<sup>41</sup>

### iv. L'identification de marqueurs de persistance ou de guérison d'allergie

Les allergènes moléculaires fournissent des éléments nouveaux dans l'aide à la décision de réaliser un test de provocation par voie orale. Ainsi, la recherche des IgE spécifiques dirigées contre l'ovomucoïde est utile pour documenter une tolérance à l'œuf avec des concentrations d'IgE faibles  $< 1$  kUI/L associées à un faible risque de réaction à l'œuf cuit même si le sujet développe des réactions à l'œuf cru<sup>42</sup>. L'analyse du rapport IgG4 sur IgE spécifiques de

l'ovalbumine est proposée par certaines équipes comme un élément utile du suivi des ITS alimentaires ou aux venins d'hyménoptères.

Pour l'allergie à l'arachide, Nicolaou et al. ont montré que l'allergène Ara h 2 était le plus performant pour distinguer les enfants allergiques à l'arachide des enfants tolérants<sup>43</sup>.

## 4. Les différentes techniques de dosage des IgE spécifiques

La mesure des IgE a posé de nombreuses questions dont la recherche d'une corrélation entre leur production excessive et le terrain atopique. Cependant, leur très faible concentration sérique a limité l'utilisation, pour leur dosage, de « révélateurs » radioactifs ou enzymatiques initialement obtenus par l'immunisation d'animaux par des anticorps monoclonaux provenant de lignées exceptionnelles de myélomes producteurs d'IgE. L'antiserum doit contenir des anticorps dirigés contre la partie constante de la chaîne  $\epsilon$  à l'exclusion de tout anticorps anti-chaîne légère  $\kappa$  ou  $\lambda$ . La standardisation des résultats est obtenue grâce à l'utilisation d'une Unité Internationale (UI), pour laquelle 1 UI = 2,4 ng d'IgE humaine. Le sérum international de référence consiste en une préparation aliquote par l'OMS environ tous les 10 ans et dont des échantillons sont disponibles pour les laboratoires pharmaceutiques et d'autres établissements par la standardisation des résultats. La préparation OMS actuelle est désignée 11/234 et a été préparée en 2013.<sup>44</sup>

### a. Les tests de 1<sup>ère</sup> génération

#### i. Les IgE totales

Les premières méthodes de dosage des IgE sont totales et non spécifiques. Elles dérivent de l'immunodiffusion radiale. On peut citer la méthode d'Arbesman<sup>45</sup> qui nécessite un sérum anti-IgE marqué par l'iode radioactif et montre des anneaux de précipitation révélés par autoradiographie. Une deuxième est la méthode de Rowe<sup>46</sup>. Elle se décompose successivement par une réaction avec un sérum de mouton anti-IgE humain et par une révélation via un sérum de lapin antiglobuline de mouton marqué par l'iode radioactif. Enfin, une dernière méthode utilise l'immunofluorescence pour révéler l'anneau à partir du sérum de lapin contenant l'antiglobuline de fluorescéine : la méthode de Centifanto<sup>47</sup>.

Par la suite se sont développées des techniques basées sur la **radio-immunologie par compétition**, parmi lesquelles on peut citer la méthode de double anticorps (méthode de Gleich)<sup>48,49</sup> ou encore la méthode au bromoacétyl cellulose (BAC)<sup>50,51</sup> mais dont les principales sont :



- Le Radio-ImmunoSorbent Test (RIST) : concernant cette méthode, elle est basée sur la fixation d'anti-IgE sur des particules de Séphadex. En effet, on détermine la concentration sérique en IgE par compétition avec une quantité fixe d'IgE marquées vis-à-vis du complexe Séphadex-anti-IgE. Par la suite, via des quantités connues d'IgE on établit une courbe étalon sur laquelle sera évaluée la mesure de la radioactivité des particules de Séphadex du culot de centrifugation. Cependant, cette technique sera vite abandonnée à cause de la médiocrité de sa précision.<sup>52</sup>
- Le Paper Radio-Immunsorbent Test (PRIST) : le principe la rend plus précise que le RIST (rendu de résultat jusqu'à dix fois plus faibles)<sup>53,54</sup>. En effet, les anti-IgE sont fixés sur un disque de cellulose ce qui permet la liaison aux IgE sériques. Ainsi, les anti-IgE marqués vont se fixer proportionnellement au nombre de complexes cellulose-anti-IgE-IgE formés. Le résultat est rendu grâce à la comparaison avec des courbes étalons permettant de rendre des concentrations faibles pouvant être inférieures jusqu'à 2U/ml.

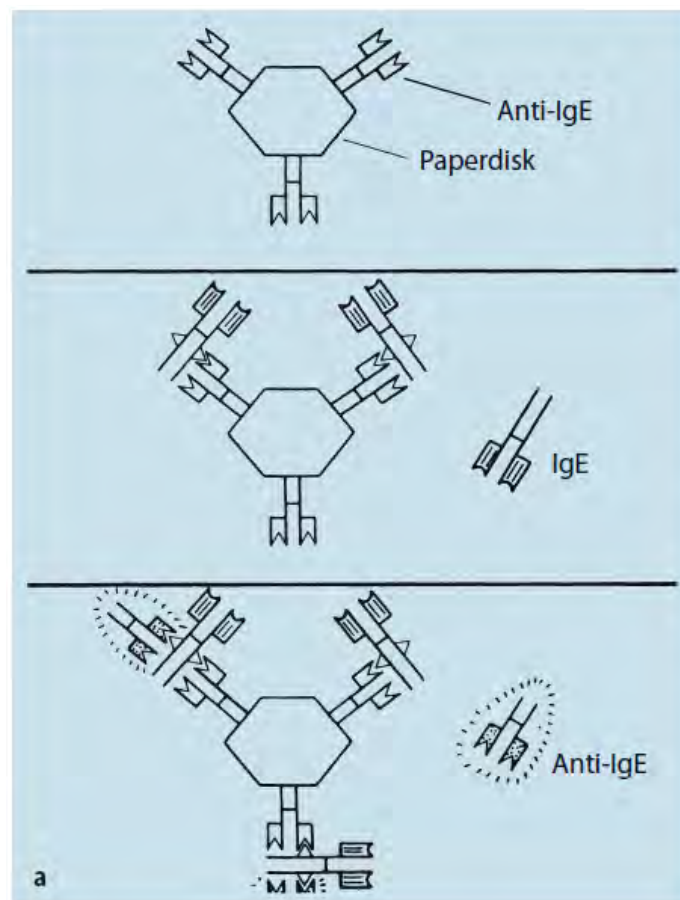


Fig. 5 : Principe du PRIST test <sup>5</sup>

Ces méthodes de dosages des IgE totales étaient toutes basées sur une approche radio-immunologie, nécessitant donc la possibilité de manipuler des radioisotopes dans des locaux adaptés.

En raison de ces difficultés d'accès, d'autres méthodes non-radioisotopiques ont été développées, la plupart d'entre elles basées sur l'immunoenzymologie. Parmi ces dernières, on retrouve :

- L'Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)<sup>55</sup> : cette technique est basée sur la compétition entre des IgE marquées via la phosphatase alcaline et des IgE sériques. Elle se déroule en trois étapes : dans un premier temps par simple contact, les anti-IgE sont fixés aux parois d'un tube plastique. On ajoute un mélange de sérum et d'IgE marquées et pour terminer après lavage, on insère le substrat spécifique de l'enzyme ce qui permettra de réaliser la lecture au spectrophotomètre. Ainsi, on peut évaluer les taux d'IgE obtenu par comparaison avec sa capacité s'oppose à la liaison d'IgE marquées par l'enzyme avec l'inhibition produite par les solutions de référence.
- L'immunodiffusion avec anti sérum la glucose oxydase ou la galactosidase : dans cette partie, les anticorps anti-IgE marqués par un glucose oxydase sont incorporés dans un gel d'agarose dont les puits reçoivent le sérum étudié. Pour éliminer les anti-IgE qui ne sont pas liés aux IgE, on réalise un lavage. On ajoute un anticorps dirigé contre les anti-IgE afin de donner et de révéler l'arc de précipitation. La révélation de l'enzyme par un substrat donne une réaction colorée permettant de mesurer ainsi les anneaux et donc de pouvoir les comparer avec des témoins. Une technique dérivée proposée par Weltman utilise la galactosidase comme enzyme de marquage dont la lecture est faite par colorimétrie. Ce principe rend la technique plus sensible et permet ainsi de doser 0,5 U/ml avec des disques de cellulose.<sup>56 57</sup>

L'immunoenzymologie sur « perles » magnétiques : basée sur la fixation des anti-IgE sur des billes magnétiques, elle permet de doser de très faibles quantités d'IgE. En effet, dans un premier temps, on incube les billes avec le sérum puis on réalise un lavage à l'aide d'un portoir aimant. Par la suite, on ajoute une solution anti-billes marquée par la phosphatase alcaline qui seront ensuite révélées lors de l'addition de substrats de

chromogènes. La quantité d'IgE dans le sérum sera calculée via l'intensité de la réaction enzymatique. Une variante existe où on met en présence du sérum, deux anticorps monoclonaux, l'un marqué par l'acide d'acridinium et l'autre lié à des microparticules magnétiques. Après incubation, lavage et séparation des billes, on libère des photons via l'ajout d'une solution oxydante en milieu alcalin. Ces derniers seront absorbés par un luminomètre.<sup>58</sup>

- Le Fluoro-AllergoSorbent Test (FAST) : le principe est basé sur la réaction entre les IgE du sérum avec deux anticorps anti-IgE humains : l'un est fixé sur une cupule de microfiltration et le deuxième marqué via la phosphatase alcaline. Ainsi, suite à l'élimination de l'anti-IgE marqué non lié et à l'ajout d'un substrat halogénique, la concentration de l'IgE pris en sandwich est proportionnelle à l'intensité de la luminescence lue sur un fluorimètre.<sup>59</sup>

## ii. Les IgE spécifiques

Le dosage des IgE spécifiques d'allergènes, la différence des dosages permettant de quantifier les IgE totales, nécessite à la fois de disposer des allergènes purifiés et de pouvoir détecter de très faibles quantités d'IgE spécifiques à cet allergène.

Les premières méthodes développées sont basées sur la recherche de différentes propriétés d'anticorps. Dans un premier temps, les méthodes se sont basées sur leurs propriétés agglutinantes. Pour cela, des particules inertes d'antigènes spécifiques étaient fixées à la surface d'une cellule (exemple : la pénicilline était fixée sur des hématies pour rechercher des IgG et des IgM anti-pénicilline).<sup>60</sup>

Par la suite, les anticorps cytotoxiques étaient recherchés dans le cadre des cytopénies médicamenteuses liées à une hypersensibilité de type II. On peut citer :

- L'inhibition de la contraction du caillot, le test d'agglutination ou la lyse plaquettaire qui permettent l'exploration des thrombocytopénies ;
- Le test de Coombs (l'antiglobuline de type direct ou indirect pour les anémies hémolytiques ;
- Ou encore la recherche des leuco-agglutinines pour l'exploration des agranulocytoses médicamenteuses.

Dans un troisième temps, ce sont les anticorps précipitants qui ont été mis en évidence pour les hypersensibilités de type III via l'immunodiffusion bidimensionnelle de type Ouchternoly, la microméthode de Scheidegger<sup>61</sup> et enfin via un simple test de précipitation (mise en évidence de précipitines chez des sujets en contact prolongé avec l'antigène).

Pour terminer, les méthodes les plus connues se sont basées sur les propriétés cytotropes des anticorps. En effet, l'intérêt de la recherche de ces derniers sur la surface des cellules capables de les fixer est justifié par les propriétés cytotropes des IgE et par certaines sous-classes d'Ig de type G (IgG) qui les représentent.

Ainsi, une des premières techniques proposées par Coombs est l'agglutination mixte ou *Red Cell Linked Antigen Antiglobin Reaction* (RCLAAR). Le principe se base sur la fixation de l'antigène sur des anticorps de lapin anti-hématies humaines. On ajoute ensuite le sérum patient dont les IgE vont se fixer sur le complexe antigène-anticorps. On obtient finalement une agglutination visible qui est rompue par l'action d'un sérum anti-IgE.<sup>62</sup>

Le principal test de 1<sup>ère</sup> génération qui a permis de doser les IgE spécifiques était le test radio-immunologique RAST (*Radio-AllergoSorbent Test*). Dans ce test, les allergènes sont fixés sur des disques de cellulose activés. Ainsi, sur la base d'une courbe de calibration établie avec des IgE spécifiques (pollen de bouleau selon la méthode WIDE<sup>63</sup>), on établirait des résultats semi-quantitatifs. En effet, les résultats sont comparés à cinq témoins standards et codifiés de 0 à 4. Une quantification plus précise utilise des unités PRU (Phadebas RAST units) selon les équivalences suivantes :

- Classe 0 inférieure à 0,35 PRU
- Classe 1 de 0,35 à 0,70 PRU
- Classe 2 de 0,70 à 3,5 PRU
- Classe 3 de 3,5 à 17,5 PRU
- Classe 4 supérieure à 17,5 PRU.

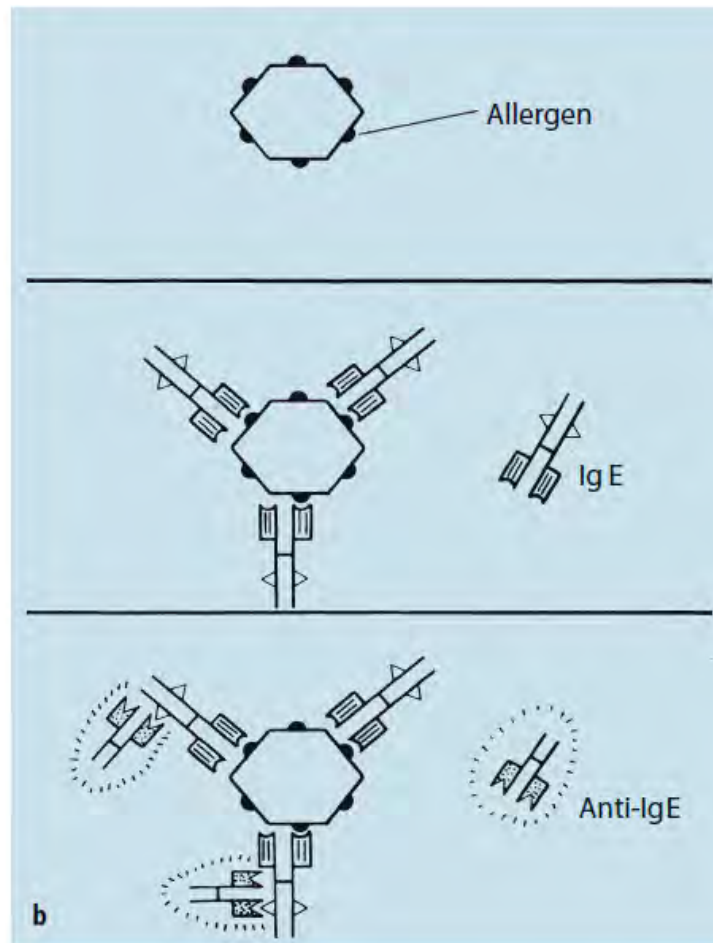


Fig. 6 : Principe du RAST test <sup>5</sup>

Il existe une dérivée de cette méthode mise au point par Gleich<sup>49</sup>. Elle utilise une phase solide dans laquelle l'allergène est covalentement fixé à la cellulose microcristalline. Ainsi, dix fois moins d'allergène et quatre fois moins de sérum anti-IgE sont utilisés. De plus, cela augmente la sensibilité (Se) du test par rapport à la méthode initiale.

Par la suite, se sont développés les tests enzymofluorimétriques (déjà décrits dans le paragraphe des IgE totales) comme la méthode FAST Plus® où l'anti-IgE humaine monoclonale est marquée par la phosphatase alcaline et l'unité internationale utilisée est différente des PRU du RAST. Mais aussi les tests Ala STAT® qui sont basés sur une méthode sandwich avec un anticorps spécifique en phase liquide. L'anti-IgE est marqué via la peroxydase et la lecture nécessite l'ajout d'un substrat.

Le dernier type de méthode caractérisant cette 1<sup>ère</sup> génération est celle utilisant des particules magnétiques. En effet, comme pour les IgE totales, il est possible de coupler un allergène avec des microparticules magnétiques. Ainsi, après la mise en contact avec un sérum et un lavage,

la séparation avec la phase solide est effectuée avec un tube aimanté. La lecture se fait par luminométrie après l'ajout d'un anti-IgE marqué par l'ester d'acridinium.

L'ensemble de ces tests de 1<sup>ère</sup> génération est résumé dans le tableau suivant.

Tests de IgE Totales	Tests de IgE spécifiques
<b>1) Immunodiffusion radiale</b>	<b>1) Anticorps agglutinants (Ac recherchés par agglutination passive)</b>
<b>2) Radio-immunologie par compétition</b>	<b>2) Anticorps cytotoxiques (Ac recherchés par test de lyse de cellules)</b>
Méthode des doubles anticorps	<b>3) Anticorps précipitants (Ac recherchés par précipitations)</b>
BAC	Immunodiffusion bidimensionnelle de type Ouchterlony
RIST	Microméthode immunoélectrophorétique de Scheidegger
PRIST	<b>4) Anticorps cytotropes (Ac recherchés sur la surface de cellules choisies)</b>
<b>3) Méthode Immunoenzymatique</b>	RCLAAR
ELISA	RAST
Immunodiffusion avec antisérum à la glucose oxydase ou à la galactosidase	Test enzymofluorimétrique (Ala STAT®)
Immunodiffusion sur perles magnétiques de polyacrylamide	Méthode utilisant des particules magnétiques

Tab. 5 : Résumé des différentes méthodes de 1<sup>ère</sup> génération existantes pour les IgE totales et spécifiques

## b. Les tests de 2ème génération

Par la suite, le CAP système® apparaît sur le marché<sup>64</sup>. Il se base sur le principe de la RIA sur phase solide. Cette dernière est généralement un polymère flexible hydrophile (mousse de cellulose) enfermé dans une capsule, d'où le nom de CAP, capable de fixer de plus grandes quantités d'allergène. La phase solide est similaire au disque papier. Cependant, il possède une structure en trois dimensions ce qui augmente sa surface et permet un contact plus rapproché entre les allergènes liés et le sérum contenant les anticorps IgE. Le nouveau système peut lier au moins trois fois plus de protéines que le disque papier et cinquante fois plus qu'une technique traditionnelle utilisant un tube coaté. L'équilibre pour obtenir la liaison entre l'allergène lié et les IgE du sérum est de l'ordre de vingt minutes. La liaison avec l'IgE spécifique est facilitée et la sensibilité supérieure à celle du RAST.<sup>64-69</sup>

Le système utilise des anticorps monoclonaux et polyclonaux I-labeled ou entraînant une fluorescence via une  $\beta$ -galactosidase (plus précisément, elle est due à la séparation du substrat fluorogénique 4-méthylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside). La méthode est totalement automatisée.

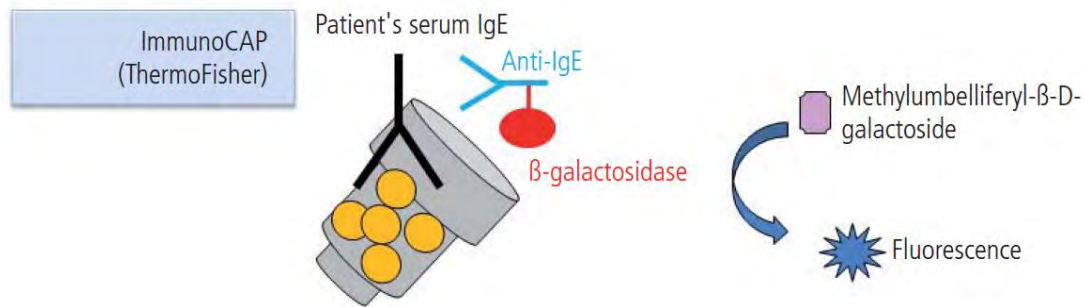


Fig. 7 : Méthodologie de détection des IgE spécifique par le système ImmunoCAP™

70

L'ImmunoCAP™ est aussi utilisé pour le dosage des IgE totales et dans ce cas, un anticorps anti-IgE humaines est lié au CAP de cellulose. Ce dosage est calibré selon le standard des IgE de l'OMS, ce qui permet d'exprimer les résultats quantitatifs en unités internationales kUI/L d'IgE spécifique. Dans le cas du dosage des IgE spécifiques, c'est alors l'allergène lui-même qui est fixé sur la cellulose du CAP, et les résultats sont exprimés en unités quantitatives appelées *Allergen-Specific IgE antibody Unit*, ou  $U_A/mL$  ( $kU_A/L$ ). Cette appellation indique que l'on mesure la fraction des IgE du sérum qui sont capables de se lier à l'allergène sur le CAP, dans les conditions (pH, osmolarité, etc.) de la mesure. Une seule méthode de calibration est utilisée, commune dans son principe aux dosages d'IgE totales et ceux d'IgE spécifiques. Cette « astuce » permet d'éviter le recours à une courbe de calibration des dosages d'IgE spécifiques pour chacun des allergènes que l'on veut étudier (des centaines d'allergènes = des centaines de courbes de calibration différentes, ce qui est impossible sur le plan pratique). L'instrumentation et le logiciel utilisés ont été développés pour le dosage des IgE spécifiques et totales. Il existe deux systèmes de calibration : de 0.35 à 100  $kU_A/L$  pour les IgE spécifiques et les taux bas d'IgE totales et de 2 à 2000 kUI/L pour les IgE totales. Le Cut-Off ainsi que l'interprétation (unité et classification) restent identique à celui du RAST de Phadebas. Le volume requis pour une analyse est de 40  $\mu L$  de sérum.<sup>71</sup>

class	specific IgE (kU/ L)	specific IgE ( $\mu$ g/ L) <sup>a</sup>	level of specific IgE <sup>b</sup>
0	<0.35	<0.84	absent or undetectable
1	0.35–0.70	0.84–1.68	low
2	0.70–3.5	1.68–8.4	moderate
3	3.5–17.5	8.4–42	high
4	17.5–50	42–120	very high
5	50–100	120–240	very high
6	>100	>240	very high

<sup>a</sup> 1 kU equals 2.4  $\mu$ g of IgE. <sup>b</sup> Tentative assignment of clinical relevance.

Fig. 8 : Classification des différents taux d'IgE spécifiques sur Système Pharmacia CAP<sup>67</sup>

Différentes études ont montré qu'il existait peu d'interférences (que ce soit avec un sérum icterique, hémolysé ou opalescent, la présence de facteurs rhumatoïdes ou encore que le patient soit sous traitement par omalizumab ou biotin).<sup>72-74</sup> Les réactivités avec les autres immunoglobulines sont rares (moins d'un cas sur deux millions) et on n'observe pas d'interférence avec les IgG spécifiques sur les six allergènes étudiés (*Dermatophagoides pteronyssinus*, les poils de chats, *Alternaria*, le pollen de graminées, le pollen d'olivier et le pollen de *Parietaria officinalis*).<sup>68</sup>

Ainsi, durant les dernières décennies, les méthodes immunoenzymatiques se sont banalisées et ont remplacé les méthodes fondées sur les radioisotopes réduisant ainsi la nécessité de matériels radioactifs.



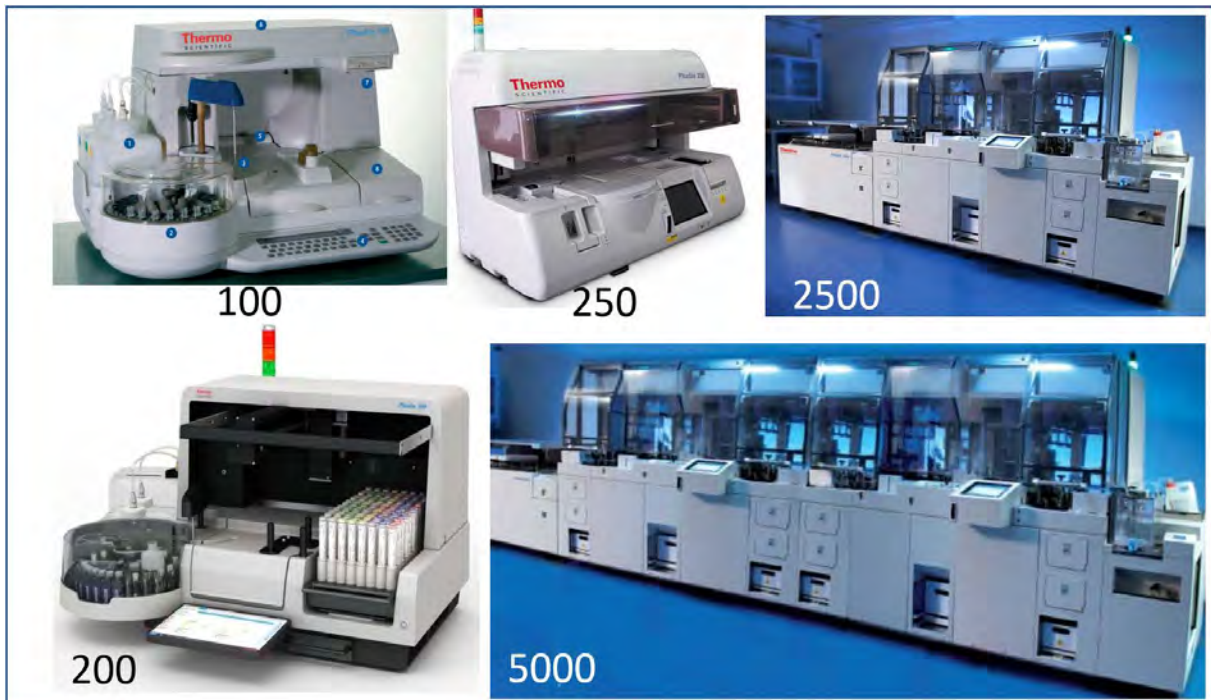


Fig. 9 : Automates Phadia 100/200/250/2500/5000

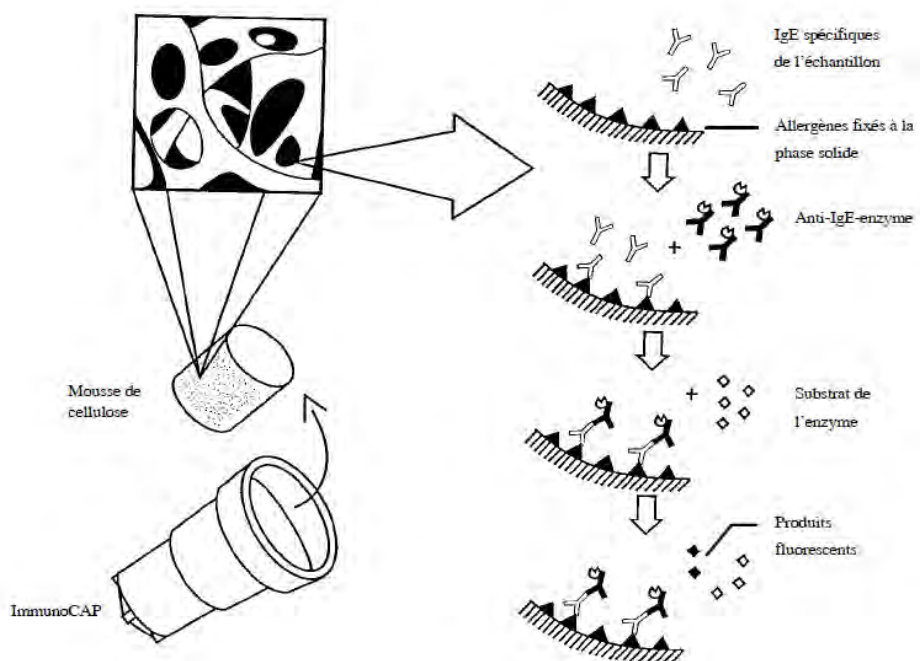


Fig. 10 : Dosage des IgE par techniques ELISA (immuno-enzymatique), d'après ThermoFischer® <sup>75</sup>

La technique possède un large éventail d'allergènes (n = 566 dont 460 extraits d'allergènes, 28 allergènes moléculaires dits natifs et 78 dits recombinants)<sup>72</sup> dont le dosage est facile d'utilisation et automatisé permettant de réduire la fréquence d'erreurs de manipulation.

Cependant, la méthode idéale devrait-êre libérée de toute réaction croisée avec les autres Ig mais aussi des liaisons non spécifiques des I d'autres allergènes.

### c. Les tests de 3<sup>ème</sup> génération

Le principal représentant de cette génération est l'automate IMMULITE 2000 produit par le laboratoire Siemens.



Fig. 11 : Présentation de l'automate IMMULITE 2000 (Siemens)<sup>76</sup>

Il nécessite 50  $\mu$ L de sérum par allergène. Son fonctionnement repose sur la détection de la chimiluminescence. En effet, les allergènes sont liés de manière covalentes sur les polymères solubles de polylysine biotinylés présents sur des billes de streptavidine de grand diamètre 6,35 mm (1/4 inches) formant la phase solide. Ainsi, après la mise en contact avec le sérum du

patient, les anticorps anti-IgE qui sont conjugués à une alcaline-phosphatase vont agir sur l'ester phosphate adamantyl-dioxetane ce qui permet l'émission d'un signal chiminoluminescent. La réaction débute par une étape, où allergène biotinylé, sérum et bille-avidine sont mis en présence, ce qui peut fausser la mesure si le sérum contient une concentration élevée en biotine (fréquemment utilisée comme complément alimentaire). La corrélation entre l'intensité du signal et les taux d'IgE spécifiques sont établis selon une courbe de calibration à sept points.<sup>70</sup>

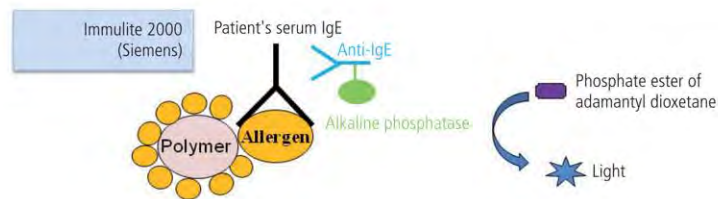


Fig. 12 : Méthodologie de détection des IgE spécifique par le système Immulite<sup>70</sup>

Il a comme principales caractéristiques: une quantification entre 0,1 à 100 kU/L avec une courbe de calibration incluant un calibrateur passant par 0,1 ; l'habilité de reporter les résultats quantitativement en kU/L (WHO 75/202), mais aussi dans des classes dites standards ou étendues ; une sensibilité de 0,2 kU/L ; l'utilisation d'allergènes en phase liquide, d'un lecteur de code de barre, et autre fonctions automatisées permettant de réduire les manipulations et les erreurs humaines ; pour un temps total d'analyse de 65 minutes. La courbe d'étalonnage est spécifique (Sp), stable et les recommandations du fournisseur demande un ajustement (soit une recalibration de deux points) seulement une fois toutes les deux semaines.<sup>77</sup> Il peut passer 200 tests par heure et a une stabilité à bord des réactifs de 90 jours.<sup>78</sup> Le panel d'allergènes disponible à ce jour est de 439 allergènes, dont 26 AM.<sup>72</sup>

Cependant, il présente des **inconvénients** : il existe une compétition possible avec la biotine dans le sérum<sup>76-82</sup>. D'autre part, de multiples études ont montré que les résultats produits par IMMULITE sont généralement plus élevés que ceux produits par ImmunoCAP™, bien que les deux méthodes utilisent la même unité (kU<sub>A</sub>/L).<sup>83</sup>

#### d. Les tests multiplex sur biopuces à allergènes

A la fin des années 1990 apparaissent les biopuces multi-allergéniques. Celles-ci sont devenues possible grâce à la fois à l'accroissement du nombre d'AM disponibles et aux technologies de biopuces protéiques (*microarray*). Elles permettent la détection simultanée d'IgE spécifiques dans le sérum de patients vis-à-vis d'un large panel d'allergènes. Le principe de ces techniques repose sur trois étapes : l'immobilisation des allergènes sur un même support, la mise en contact avec le sérum du patient et enfin la révélation à l'aide d'un anticorps marqué.<sup>84</sup>

La première technologie décrite en 2002 reposait sur l'immobilisation de 94 AM, natifs et recombinants sous forme de *microspot* sur une lame de verre.<sup>85</sup> Cette dernière était rendue réactive aux amines des molécules d'allergènes via du silane revêtu d'un polymère activé, permettant une fixation covalente des protéines et une accessibilité aux anticorps. La révélation des IgE fixées aux allergènes se faisait par un anticorps anti-IgE marqué avec un fluorochrome, après incubation avec le sérum du patient et des étapes de lavage. Après un dernier lavage, la fluorescence émise est lue à l'aide d'un scanneur, ce qui permet de déterminer à la fois la spécificité des IgE (via leur liaison sur des spots d'allergènes définis) et leur concentration, constituant au total le profil de sensibilisation à IgE du patient.<sup>85</sup>

##### i. Le test *Immuno Solid phase Allergen Chip* – ImmunoCAP™ ISAC (Phadia/ ThermoFisher)

La première biopuce multi-allergénique qui a été disponible sur le marché en France est le test ImmunoCAP™ Isac. Plusieurs versions de cette biopuce ont été successivement disponibles : ISAC 103 (2009-2011), 112 (2012-2015), 112i (2016-2019) puis actuellement E112i (2019-).

L'ISAC E112i comporte 112 allergènes moléculaires (aucun extrait) natifs ou recombinants qui sont fixés sous forme de spots de 200µm, présents en *triplicates* sur une lame de verre. La lame est couverte d'une fine couche d'un polymère au sein duquel les allergènes sont adsorbés et fixés de façon covalente. 50 à 200 **féto**grammes d'allergènes seulement sont présents sur chaque spot. Les lames comportent quatre sites réactionnels pour 4 patients étudiés simultanément. Chaque lot de lame comporte une étape de calibration au moyen d'un réactif constitué d'un sérum humain totalement déplété en IgE et contenant un mélange de 15 anticorps monoclonaux chimériques homme/souris de spécificités établies. Ces anticorps

monoclonaux ont une partie variable murine (spécifiques pour l'un des 15 AM ciblés par le réactif de calibration) attachée au segment Fc  $\epsilon$  des IgE humaines. Les concentrations de ces anticorps chimériques sont choisies et groupées en 4 niveaux afin de couvrir toute l'étendue de la gamme de mesure. La détection des IgE liées aux AM de l'ISAC (IgE d'un patient ou IgE chimériques du réactif de calibration) se fait au moyen d'une seconde incubation avec un anticorps murin anti-IgE humaine couplé à un marqueur fluorescent (alexafluor 532). Chaque spot d'allergène émet une fluorescence, mesurée par un scanner laser haute résolution, qui est représentée par la courbe de balayage et permet d'évaluer de manière semi-quantitative la quantité d'anticorps spécifiques de l'allergène. Le résultat est exprimé en unité arbitraire : ISU-E.<sup>86,87</sup>

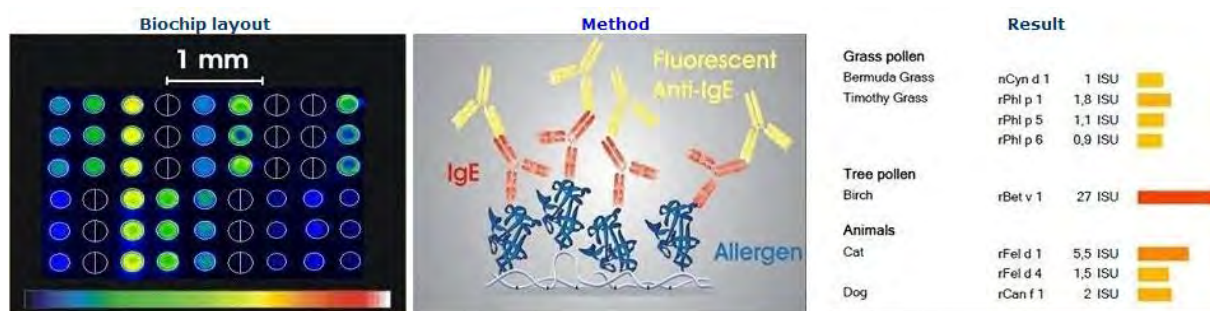
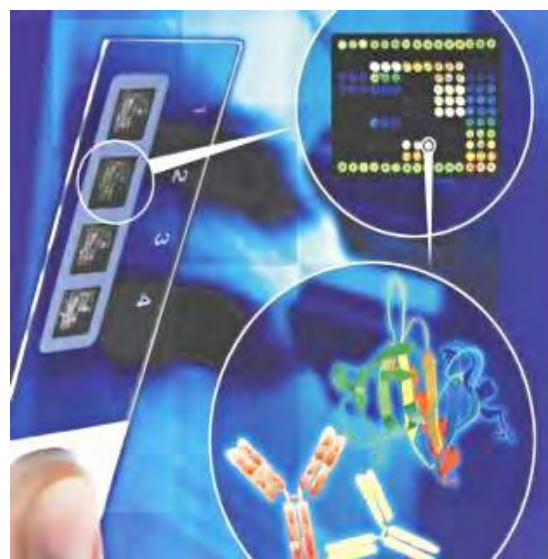


Fig. 13 : Test ImmunoCAP™ ISAC<sup>88,89</sup>

## ii. Le test ALergy Explorer ALEX (Macroarray Diagnostics - MADx)

Le test MADx ALEX est la biopuce mise le plus récemment sur le marché. Sa prise d'essai de sérum est plus faible : elle est de 30 µL et il combine l'utilisation d'un total de 300 allergènes dont 119 extraits combinés à 181 AM.<sup>90</sup> Sa technique est basée sur des nanobilles recouvertes d'allergènes (extraits ou moléculaires), lesquels leur sont liés de façon covalente. Puis les nanobilles recouvertes d'allergènes sont déposées sur une feuille de nitrocellulose sous forme de « spots » d'environ 1 mm de diamètre. Leur liaison à la nitrocellulose se fait par des interactions inter- et intramoléculaires et/ou atomiques qui sont propres aux nanoparticules. L'ensemble est enclos dans une cartouche rectangulaire de 60x20 mm dans laquelle se font les incubations successives. Lors de l'incubation avec le sérum d'un patient, il est possible d'ajouter un réactif contenant des résidus glucidiques de la broméline (MUXF3 et d'autres non précisés par MADx) fixés à l'albumine humaine. Ce réactif (= *CCD-blocker*) inhibe les IgE dirigées contre les épitopes glucidiques irrelevantes ou CCD. Pour rappel, ces réactivités anti-CCD peuvent positiver un résultat de dosage d'IgE spécifiques d'allergènes d'origine végétale, alors que ces IgE anti-CCD n'ont aucune pertinence clinique.

Un spot ALEX contient environ 2-20 ng d'allergènes. La réaction est colorimétrique : des anticorps monoclonaux murins anti-IgE sont couplés à la phosphatase alcaline et activent un substrat colorimétrique : le BCIP/NBT. Une caméra CCD (ici, *charge-coupled device*...) permet de capter cette coloration. Un calcul est alors réalisé via les données de talonnage spécifiques à chaque lot d'ALEX, normalisées par rapport à une courbe de référence. Ainsi, les résultats obtenus sont également semi-quantitatifs et exprimés en kUA/L. Les paramètres de courbe pour chaque lot sont ajustés à l'aide de tests de référence internes réalisés avec une préparation de sérum testée sur ImmunoCAP™. Les résultats Alex sont donc indirectement rattachés à la préparation de référence OMS 11/234 pour l'IgE totale. Ce test permet également d'évaluer la concentration en IgE totales au moyen de spots recouverts d'anticorps anti-IgE humaines (si un dosage des IgE totales est requis, il est cependant fortement conseillé de réaliser ce dosage par test unitaire).<sup>91</sup>

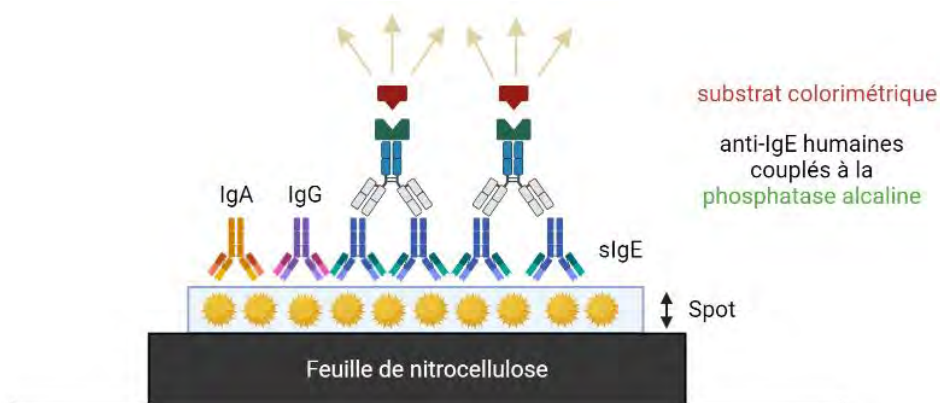


Fig. 14 : Test Alex<sup>92</sup>

### iii. Avantages et limites des biopuces multi-allergéniques

Comme toute technologie, cette dernière présente des avantages et des inconvénients. Le principal atout des micropuces est la détection d'IgE spécifiques des contre 112 à 300 d'allergènes à partir d'une faible quantité de sérum. Les résultats sont obtenus rapidement avec un temps de manipulation réduit et un coût réduit. Cependant leur interprétation est souvent plus longue et plus complexe qu'avec des tests unitaires. La réalisation d'une biopucequivaut en termes de coût en réactif à 15-30 tests unitaires. De même, les résultats obtenus permettent d'obtenir en une seule bande, ce que l'on nomme le **profil de sensibilisation** IgE d'un patient. Sur le plan pratique, le faible volume requis permet la manipulation et l'utilisation a par les

laboratoires d'allergologie de contrôles de qualité couvrant un nombre élevé d'allergènes des biopuces. A l'inverse, puisque l'industriel préparant les biopuces se doit de maintenir une qualité constante sur des centaines d'allergènes différents, les laboratoires exécutants sont à même de détecter des anomalies sur un ou plusieurs allergènes lors de l'utilisation de contrôles de qualité. Ces anomalies auraient été beaucoup plus difficiles à mettre en évidence au niveau de tests unitaires, principalement en raison du volume de sérum requis pour « évaluer » des centaines d'allergènes (ex : 12 000 µL pour 300 allergènes tests par ImmunoCAP™ !).

Parmi les limites des biopuces, on peut citer le fait que ces tests sont généralement moins sensibles que les tests unitaires existants pour mesurer les faibles concentrations d'IgE spécifiques. De même, la répétabilité intra-série et la reproductibilité (fidélité intermédiaire inter-séries) sont clairement inférieures aux performances des tests unitaires, en particulier pour les valeurs basses et moyennes d'IgE spécifiques. L'utilisation pour le rendu des résultats peut aussi poser quelques problèmes : l'ImmunoCAP™ ISAC utilise des unités propriétaires (*ISAC Specific Units IgE* ou ISU-E) qui ne peuvent être reliées à un talon de l'OMS. Pour cette raison, les résultats d'ISAC sont dits semi-quantitatifs, même si les valeurs d'ISU-E sont continues entre 0,1 et 100 ISU-E. Quant à ALEX, les résultats sont bien exprimés en kUA/L, mais la technologie utilisée entraîne une saturation précoce du signal à 50kUA/L (limites de rendu des résultats : 0,1 – 50 kUA/L), et en pratique, le plateau apparaît dès 40-45 kUA/L. Un autre point important est que, en pratique courante, les profils de sensibilisation des patients obtenus par biopuces requièrent souvent une confirmation par des tests unitaires des sensibilisations particulièrement « pertinentes » ou en contradiction avec le tableau clinique. De même des sensibilisations non recherchées et sans intérêt clinique peuvent-être révélées et rendent alors l'interprétation plus complexe (d'où, aussi, la nécessité de confirmations par tests unitaires).<sup>93</sup>

Un autre inconvénient malheureusement encore peu documenté est la possibilité de compétitions entre IgG et IgE de mêmes spécificités, particulièrement démontrée pour l'ISAC.<sup>94,95</sup> Cette compétition IgG / IgE peut entraîner une sous-estimation de la concentration des IgE spécifiques, voir même l'absence de détection de ces IgE (faux négatifs).

Les différentes caractéristiques des biopuces ISAC et Alex sont résumés dans le tableau 6.



Tableau 1. Principales caractéristiques des tests Alex et Isac.		
	Alex	ImmunoCAP Isac
Allergènes moléculaires	184	112
Extraits allergéniques	118	0
Quantité protéines/spot	2 à 20 ng	50 à 200 fg
Dosage IgE totales	Oui (3 à 2500kU/L)	Non
Blocage des CCD	Oui	Non
Volume prise essai	100 µL	30 µL
Mode de lecture	Colorimétrie, amplification enzymatique	Fluorescence sans amplification
Coût scanner	< 5 000 euros	> 30 000 euros
Minimum de test(s) par run	1	4
Nombre de spot(s) par allergène	1	3
Ajout d'allergènes	Aisée	Difficile
Coût du test	+	++
Praticabilité du test	+++	++

Tab. 6 : Principales caractéristiques des test Alex et Isac <sup>93</sup>

Actuellement, beaucoup de patients, en particulier pédiatriques, présentent des profils de sensibilisation de plus en plus étendus et complexes et ces profils requièrent l'utilisation de panels d'allergènes moléculaires pertinents sur le plan clinique. Pour ces patients, il est alors indispensable de recourir aux biopuces ou bien de réaliser un nombre élevé de dosages unitaires (un test = un allergène). Une problématique se pose alors : le volume de échantillon disponible.

En outre, les biopuces présentent des inconvénients qui leur sont propres (unités non standards, saturation du signal, risque de faux négatifs, coût d'accès) et ne peuvent à l'heure actuelle remplacer complètement les tests unitaires.

Tout cela amène à l'apparition de nouvelles méthodes de dosage d'IgE spécifiques et à l'avènement d'une quatrième génération d'automate.

## e. Les tests de 4<sup>ème</sup> génération

Ils sont représentés par les automates IDS-iSYS et le NOVEOS.



Fig. 15 : Présentation de l'automate IDS-iSYS<sup>96</sup>

L'automate iSYS est un automate d'immunologie produit par la société *ImmunoDiagnostics Systems* (IDS, Royaume-Uni) qui utilise la chimiluminescence et la spectrophotométrie pour différents dosages d'auto-immunité d'allergologie, d'hormonologie, et de sérologies infectieuses. Cet automate multiparamétrique utilise aussi la chimiluminescence pour la mise en évidence et le dosage d'IgE spécifiques d'extraits ou de molécules d'allergènes et le dosage des IgE totales. Il permet un chargement en système ouvert de 120 échantillons sérum de patients et 108 positions pour les sources allergéniques. La société IDS propose à ce jour 70 références de sources allergéniques et allergènes moléculaires et continue à enrichir ce panel.

Le principe du dosage de cet automate est le suivant (Fig. 16) :

- Le dosage s'effectue grâce à des microparticules magnétiques fluorescentes recouvertes de streptavidine, mesurées simultanément avec, d'une part, un « réactif de capture » (allergène biotinylé en forme liquide), et d'autre part, le sérum du patient.
- Les IgE spécifiques anti-allergène contenues dans le sérum se lient aux complexes microbilles avec les allergènes.

- Enfin, des immunoglobulines anti-IgE sont conjuguées à l'ester d'acridinium so-
- Après un lavage final, les RLU (unités de luminescence relatives) obtenues sont directement proportionnelle à la concentration d'analyte dans l'échantillon.

La concentration d'IgE spécifiques dans le sérum est déterminée à partir d'une courbe standard basée sur celle des IgE totales.

Le volume de la prise d'essai est de 25 à 50 µL de sérum selon les allergènes testés et le volume de dilution de 80 à 200 L selon le type de tube utilisé.

Les résultats d'IgE spécifiques sont exprimés en kUA/L et le domaine de mesure se situe entre 0,10 et 100 kUA/L.<sup>71,82,96-98</sup>

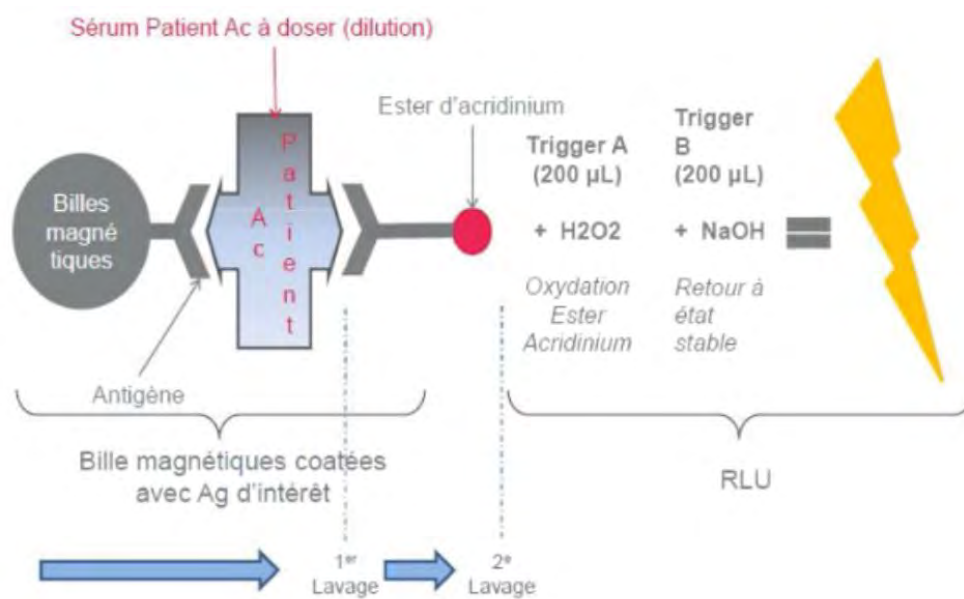


Fig. 16 : Principe du dosage des IgE spécifiques par chimiluminescence de l'automate iSYS<sup>82</sup>

Un deuxième automate récemment mis sur le marché et utilisant la chimiluminescence est le NOVEOS développé par la société Hycor (Garden Grove, CA, USA).



Fig. 17 : Pr sentation de l'automate NOVEOS

Sa technologie est basée sur des microbilles (1  $\mu\text{m}$ ) de polystyrène, paramagnétiques et fluorescentes couplées à la streptavidine par un bras espaceur de PEG (env. 20 nm), puis mises en contact avec des allergènes biotinylés eux-mêmes conservés en solution. <sup>99</sup>

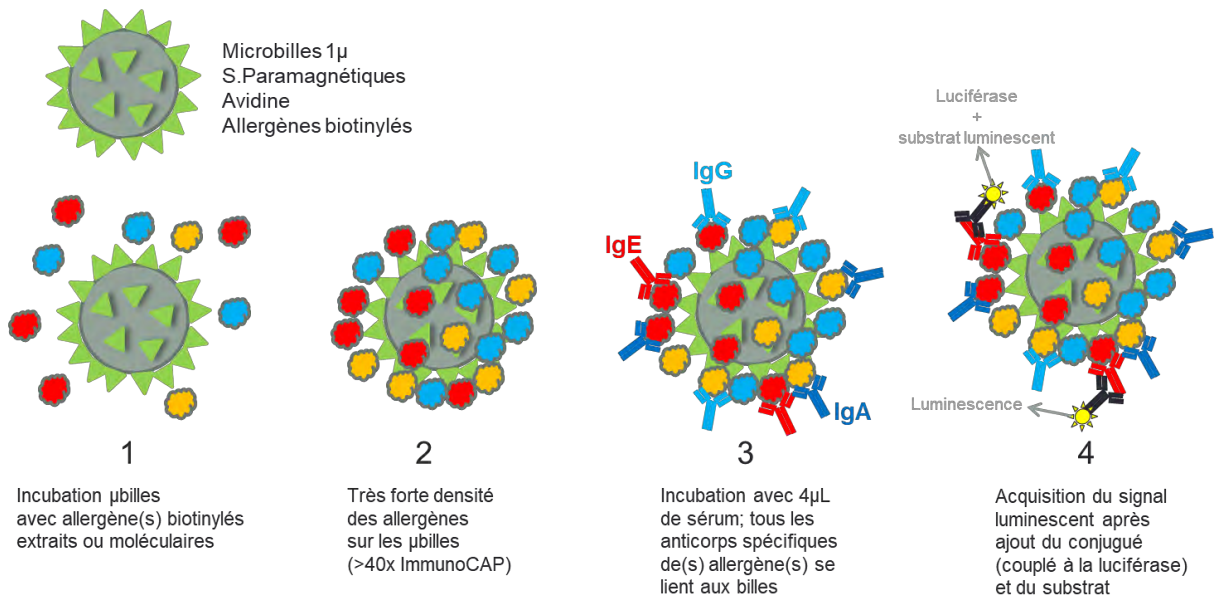


Fig. 18 : Microbilles utilisées par l'automate NOVEOS

La détection de la liaison via IgE est réalisée par chimioluminescence, après incubation avec un réactif anti-IgE humaines couplées avec une luciférase d'origine bactérienne.

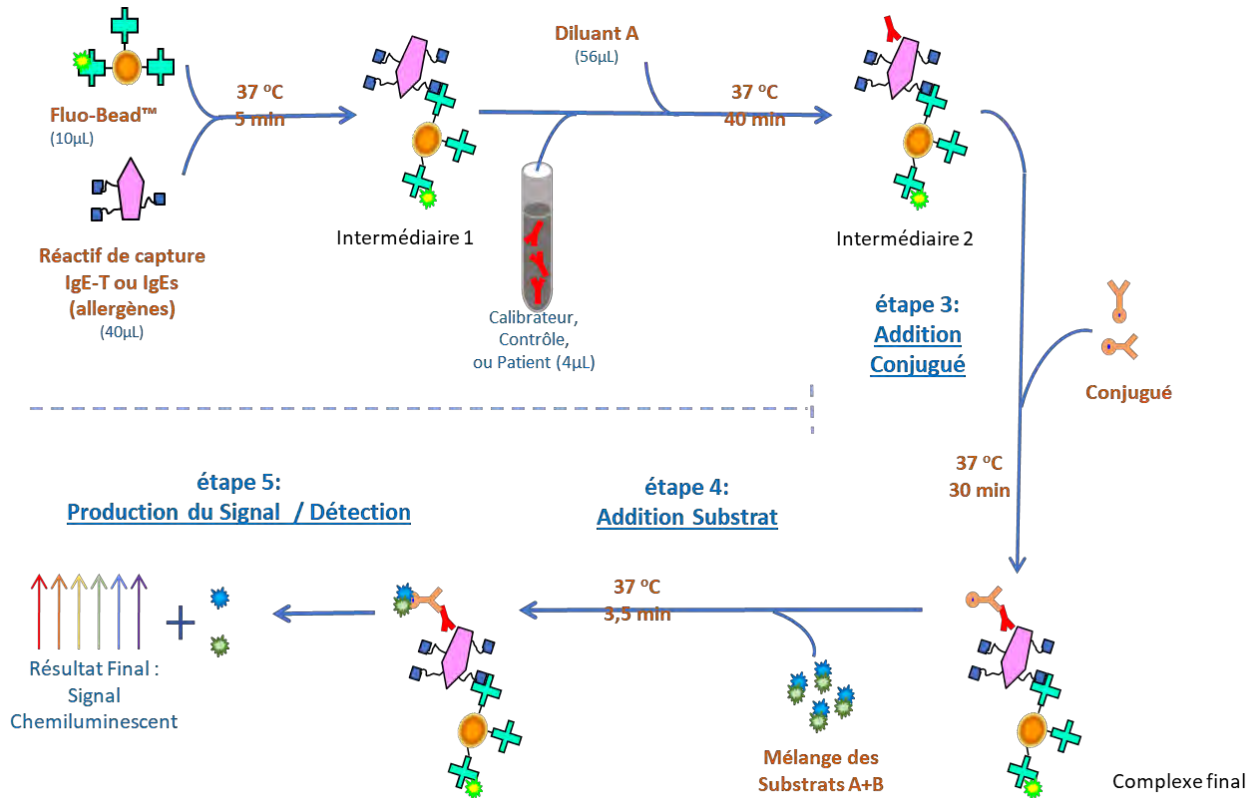


Fig. 19 : Principe du dosage par chimioluminescence utilisé par l'automate NOVEOS

Il nécessite une prise d'échantillon de 4 µL et est adapté aux grandes séries (capable de réaliser 1200 tests en 12 heures soit pour 50 tubes, une vingtaine d'allergènes pour chaque tube). Le système de calibration passe par les points 0 ; 0,17 ; 0,7 et est fait sur des concentrations d'IgE à 0,07 ; 0,35 ; 0,7 ; 3,5 ; 17,5 ; 100 kU<sub>A</sub>/L.

Les intérêts potentiels sont :

- Le volume d'échantillon très faible (1/10 de celui requis par ImmunoCAP™) ;
- L'absence probable d'interférence par IgG car la réaction IgE-allergènes est supposée se faire en présence d'un large excès d'allergène (*mais ce point est aussi valable pour les autres techniques hors biopuces*) ;

- L'absence d'interférence via la biotine chez les individus supplémentés, car la formation du complexe billes – allergènes se fait en amont du contact avec le échantillon de sérum.<sup>82</sup>

## II. Validation analytique du NOVEOS

### 1. Performances analytiques du NOVEOS

Ces travaux ont été réalisés au sein du laboratoire d'Immuno-Allergologie de l'Institut Français de Biologie du C.H.U. de Toulouse. Le laboratoire est certifié à la norme ISO 15189 par l'organisme de contrôle national (COFRAC) depuis 2017 pour la technique ImmunoCAP™ (automate PHADIA 250) et depuis 2022 pour l'automate NOVEOS. Le NOVEOS étant arrivé au laboratoire en novembre 2020, nous avons réalisé une étude sur sa répétabilité et sa reproductibilité.

Concernant les performances de NOVEOS en répétabilité, 24 à 31 dosages des IgE spécifiques de 8 extraits allergéniques différents ont été réalisés lors d'une série unique, à partir de 8 chantillons de sérum provenant d'autant de patients.

Nom	Source	Nombre de tests	Moyenne	Ecart-type	C.V. %
D001 / d1	acariens ( <i>D. pte.</i> )	31	3,48	0,18	5,10%
D002 / d2	acariens ( <i>D. far.</i> )	31	23,6	1,37	5,80%
E001 / e1	chat (phanères)	31	1,18	0,06	5,10%
G003 / g3	dactyle (pollen)	31	1,07	0,05	4,40%
G006 / g6	phléole (pollen)	30	1,4	0,07	5,10%
W009 / w9	plantain (pollen)	29	8,12	0,64	7,80%
F017 / f17	noisette	31	14,49	0,56	3,80%
F201 / f201	noix de pécan	24	0,19	0,01	7,00%
					<b>5,51%</b>

Tab.7 : Résultat de l'étude sur la répétabilité du NOVEOS<sup>100</sup>

La limite acceptée par le laboratoire est de 7,9%.<sup>100</sup> La répétabilité du NOVEOS est donc conforme.

Concernant, l'étude de la reproductibilité, une évaluation de la fidélité intermédiaire sur des Contrôles de Qualité Interne (CQI) NOVEOS via dosages d'IgE spécifiques anti-F013, D001, G006 et E001 a été réalisée sur 8 semaines. Les résultats proviennent de 12 ou 13 séquences de fonctionnement (12/13 jours différents, avec 2 dosages par série).

Echantillon	Allergène	Nombre de répétition	Moyenne	C.V. %	Cible (NOVEOS)
Contrôle positif NOVEOS	D001 (Acariens extrait)	26	22.83	5.44%	25.48
Contrôle positif NOVEOS	E001 (Phanères de chien, extrait)	24	7.57	7.04%	7.77
Contrôle positif NOVEOS	F013 (arachide, extrait)	24	12.53	6.58%	13.72
Contrôle positif NOVEOS	G006 (pollen de phléole, extrait)	24	7.49	4.74%	8.37

Tab.8 : Résultat de l'étude inter-séries sur la reproductibilité du Noveos<sup>101</sup>

Le Coefficient de Variation (C.V.) moyen obtenu est de 5,95%. Le C.V. limite accepté par le laboratoire est de 15-20%<sup>101</sup>, les résultats sont donc conformes.

A titre de comparaison les tableaux de répétabilité et de reproductibilité du PHADIA250 sont cités dans la partie Annexe (Annexe 1 et 2). Ces résultats nous ont permis de conclure que l'automate fonctionne parfaitement et que ses résultats sont valables.

## 2. Performances de NOVEOS sur des échantillons des contrôles de qualité externe (EEQ) distribués par UKNeqas

Le programme UK NEQAS est un consortium multidisciplinaire (immunologie et allergie, pathologie cellulaire, biochimie clinique, hématologie, transfusion et transplantation, génétique, virologie et microbiologie) de laboratoires externes d'évaluation de la qualité, principalement issus des différents *National Health Service* (NHS) d'Angleterre, d'Écosse, du Pays de Galles et d'Irlande du Nord.<sup>102</sup>

Le laboratoire reçoit 6 fois par an des échantillons préparés par UKNeqas, pour lesquels les IgE spécifiques pour 4 – 6 allergènes (extraits ou AM) doivent être mesurées *via* la technique utilisée dans le laboratoire participant. UKNeqas communique par la suite les valeurs moyennes obtenues par les laboratoires participants (normalement une centaine/distribution) ainsi que le *t*-test (significatif ou non) entre ces valeurs moyennes et les résultats produits par le laboratoire. Le laboratoire d'Immuno-Allergologie participe au programme UKNeqas depuis 2011, en utilisant la technique ImmunoCAP™.

En 2020, nous avons pu analyser 12 échantillons qui avaient été évalués par technique ImmunoCAP entre 2015 et 2020, dans le cadre des programmes UKNeqas « *Specific IgE* » et



« *Allergen Component* ». Ces échantillons avaient été conservés à -40°C après leur analyse dans le laboratoire. Parmi les allergènes de ces échantillons qui avaient été analysés par ImmunoCAP™, certains peuvent aussi être testés par technique NOVEOS. Les résultats obtenus par NOVEOS ont été comparés ceux obtenus par l'automate PHADIA250 (ImmunoCAP™) du laboratoire et également aux consensus calculés par UKNeqas basés sur l'ensemble des différentes méthodes de dosage des IgE utilisées par les laboratoires participants (ImmunoCAP™, SIEMENS Immulite, Hycor Hy288). Au total, 20 allergènes différents ont été testés, entre 1 et 3 fois chacun, pour un total de 42 mesures (voir Tab. 9).

Allergène (IgE spécifiques)	Source	Nature	Nombre de tests	Distributions UKNeqas:
F013	Arachide	Extrait	3	155-2; 156-2; 175-2
F232	Blanc d'œuf	Moléculaire	3	173-1; 202-1; 202-2
F233	Blanc d'œuf	Moléculaire	3	173-1; 202-1; 202-2
F423	Arachide	Moléculaire	3	175-1; 175-2; 202-2
G006	Phléole	Extrait	3	155-2; 175-2; 176-1
E005	Phanères de chien	Extrait	2	155-2; 176-2
F017	Noisette	Extrait	2	175-1; 175-2
F002	Lait de vache	Extrait	2	156-2; 176-2
F352	Arachide	Moléculaire	2	175-1; 202-2
F428	Noisette	Moléculaire	2	175-1; 202-2
F076	Lait de vache	Moléculaire	2	173-1; 202-1
F078	Lait de vache	Moléculaire	2	173-1; 202-1
K208	Blanc d'œuf	Moléculaire	2	173-1; 202-1
M006	A. alternata	Extrait	2	156-2; 175-1
T003	Pollen de bouleau	Extrait	2	175-2; 176-2
D001	Acariens	Extrait	1	175-1
F001	Blanc d'œuf	Extrait	1	156-2
F422	Arachide	Moléculaire	1	175-1
F443	Noix de cajou	Moléculaire	1	175-2
F077	Lait de vache	Moléculaire	1	173-1
K082	Latex	Extrait	1	155-2
T215	Pollen de bouleau	Moléculaire	1	202-2

Tab. 9 : Liste des allergènes étudiés en UKNeqas en 2020-2021

Dans un premier temps, nous avons réalisé une corrélation entre les résultats obtenus sur NOVEOS et Phadia 250 et réalisé un test statistique comparant les résultats de NOVEOS, de PHADIA 250 de Toulouse et les résultats moyennes obtenus sur l'ensemble des PHADIA du programme UKNeqas. La corrélation obtenue est bonne (0.89) et significative (voir Fig. 20).

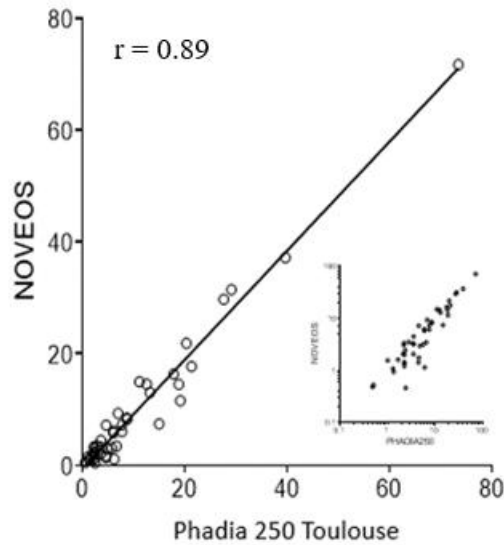


Fig. 20 : Corrélation entre NOVEOS et PHADIA250 en 2020-2021

Les valeurs indiquées sont en  $kU_A/L$ .  $r$  : corrélation de Spearman entre ImmunoCAP™ (PHADIA) et NOVEOS. Un encart présente les valeurs en échelle log-log afin de mieux visualiser les valeurs basses.

Afin d'étudier les discordances, nous avons réalisé deux diagrammes de corrélation selon la méthode de Bland-altman. Cette méthode de visualisation corrèle les valeurs moyennes aux différences obtenues avec les deux systèmes. Nous présentons d'une part la comparaison entre NOVEOS et l'automate PHADIA250 du laboratoire (diagramme de gauche), et d'autre part, la comparaison entre NOVEOS et les consensus des résultats rapportés par tous les laboratoires participants à UKNeqas (*UKNeqas All Methods*, diagramme de droite).

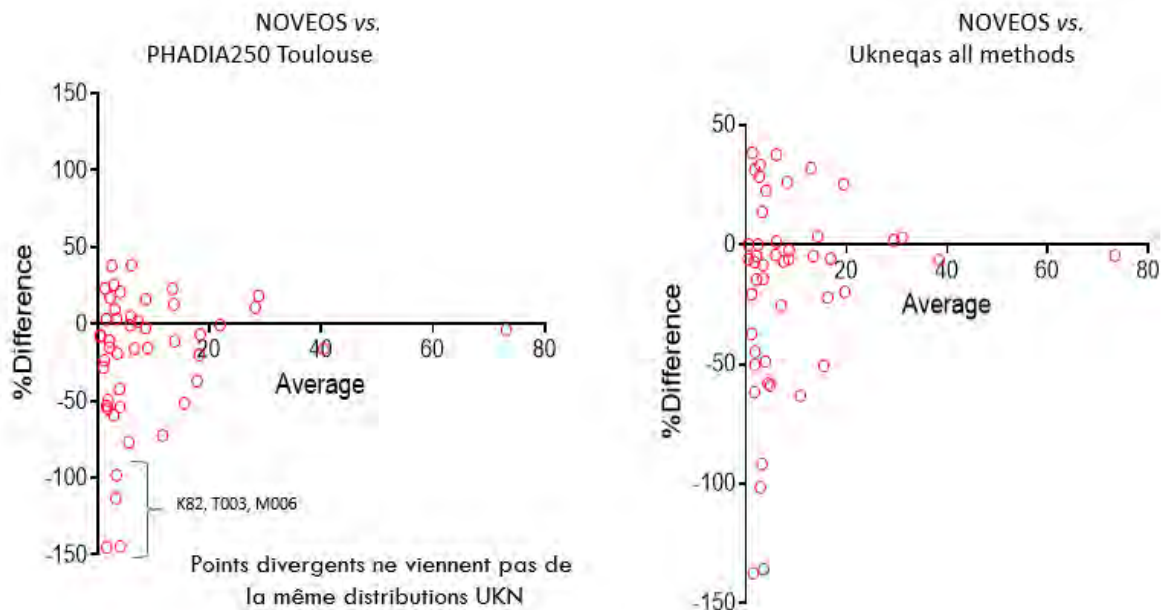


Fig. 21: Bland-Altman: NOVEOS vs PHADIA250 ou UKNeqas « *all methods* »

Gauche : NOVEOS versus ImmunoCAP™ du laboratoire (IFB Toulouse) ; Droite : NOVEOS versus consensus de toutes les méthodes utilisées par les laboratoires participants à UKNeqas (>100 laboratoires). Abcisses : valeurs moyennes NOVEOS/ImmunoCAP™ (kAU/L) ; Ordonnées : différences entre les deux méthodes exprimées en pourcentage de leur valeur moyenne.

Nos résultats indiquent que les résultats du NOVEOS sont constamment inférieurs à ceux obtenus *via* la méthode ImmunoCAP™ (au moins 75% des laboratoires participant au programme UKNeqas utilisent la méthode ImmunoCAP™).

Afin de déterminer si cette différence était plus prononcée pour certains types d'allergènes, nous avons réalisé une comparaison Bland-Altman plus approfondie en différenciant le type d'allergène (voir Fig. 22).

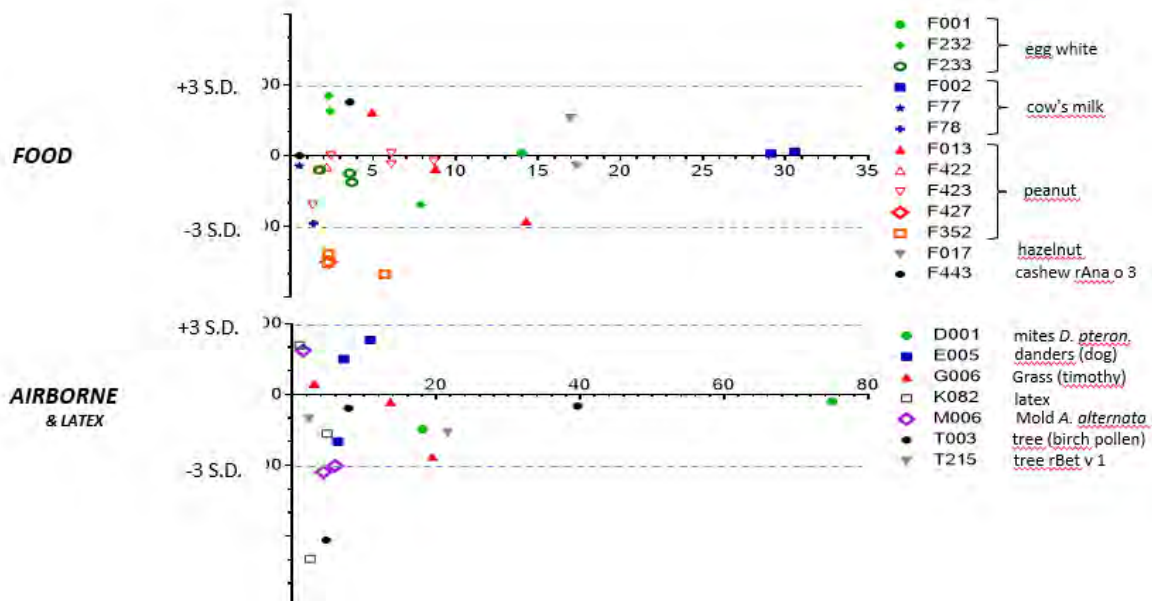


Fig. 22 : NOVEOS comparé avec les UKNeqas « *All methods* » via Bland-Altman selon le type d'allergène

Haut (*FOOD*) : allergènes alimentaires (extraits ou AM) ; Bas (*AIRBORNE & latex*) : allergènes respiratoires, plus extrait de latex (k82). Extraits testés : F001 (blanc d'œuf), F002 (lait de vache), F013 (arachide), F017 (noisette), D001 (acariens), E005 (poils et squames de chiens), G006 (phléole), K082 (latex), M006 (*A. alternata*), T003 (bouleau) ; AM testés : F232 (ovalbumine), F233 (ovomucoïde), F77 (lactoglobuline), F78 (caséine), F422 (rAra h 1, arachide 7S viciline), F423 (rAra h 2 albumine 2S), F427 (rAra h 9, arachide LTP), F352 (rAra h 8, arachide PR10), F443 (rAna o 3, noix de cajou albumine 2S), T215 (rBet v 1, PR10).

En moyenne, seulement 15% des résultats NOVEOS dépassent la limite de +/- 3 déviations standards (S.D.) par rapport à la valeur moyenne de tous les laboratoires participants (*All Methods*). Les résultats étant concordants, une inclusion de NOVEOS dans le programme UKNeqas a été demandée par la société HYCOR.

Pour terminer, parce que tous les échantillons que nous avons testés par NOVEOS avaient été congelés, nous avons vérifié que la congélation / décongélation des sérums n'induisait pas un biais dans notre analyse. Nous avons donc testé 19 sérums non congelés, par ImmunoCAP™ et NOVEOS (au total 28 dosages d'allergènes ont été réalisés par automate). Les allergènes testés sont D001 : acariens ; D002 : acariens ; E001 : poils et squames de chats ; F001 : blanc d'œuf ;

F013 : arachide ; F017 : noisette ; F201 ; G003 : dactyle ; G006 : phléole ; K082 : extrait de latex ; M006 : *A. alternata* ; T003 : bouleau ; T215 : rBet v 1, PR10. Nous avons obtenu une moyenne des biais de -25% (pour une concordance de 0.96).

Les valeurs obtenues avec NOVEOS partir chantillons non congelés sont toujours inférieures à celles obtenues avec ImmunoCAP. Notre conclusion est donc que les dosages que nous a ali s par NOVEOS n'on luenc s par la con chantillons.

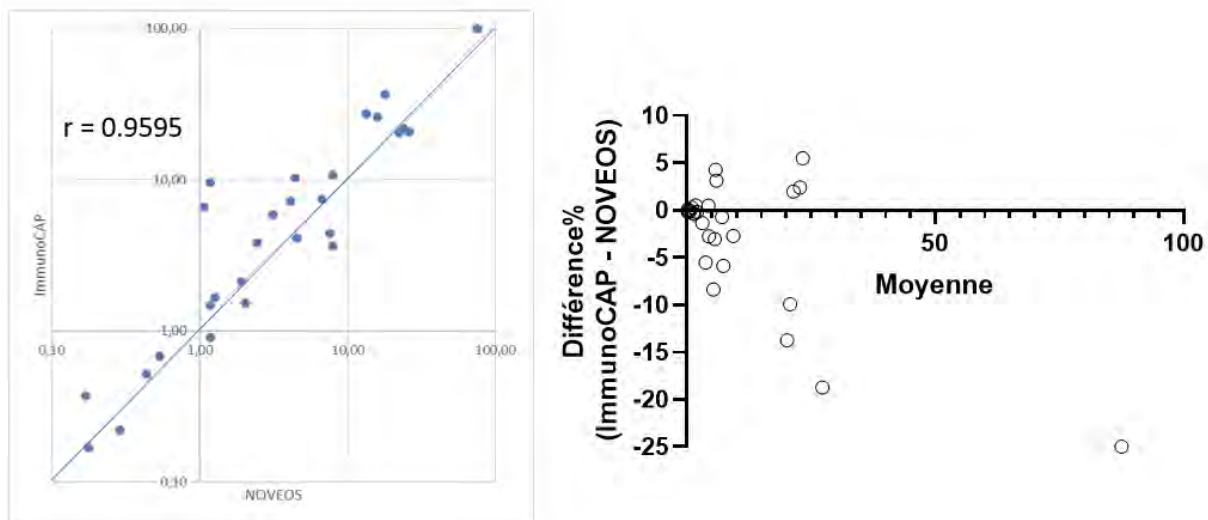


Fig. 23 : NOVEOS comparé avec PHADIA250 via une courbe de corrélation (gauche) et Bland-Altman (droite)

r : corrélation de Spearman ; les valeurs sont en  $kU_A/L$

### III. Comparaison des performances analytiques et cliniques de NOVEOS et d'ImmunoCAP™

#### 1. Résumé

Nous présentons les résultats de notre travail sous forme d'un article digi en langue Anglaise (Annexe N°3). Cet article a été en premier déposé sur la plateforme *pre-print* AUTHOREA (<https://www.authorea.com/doi/full/10.22541/au.167801243.30637264/v1>), et une version révisée de celui-ci est actuellement soumise à la revue *Journal of Allergy and Clinical Immunology (JACI) : In Practice*. Nous présentons et discutons ici la version AUTHOREA.

Cet article présente une étude comparative des performances analytiques et cliniques de deux méthodes de dosages des IgE spécifiques : ImmunoCAP™ sur automate PHADIA 250 (ThermoFisher) et NOVEOS sur l'automate du même nom (Hycor medical). Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur 289 patients, principalement pédiatriques (âge médian = 7 ans). Ces patients ont consulté au sein du C.H.U. de Toulouse pour une suspicion d'allergie alimentaire entre 2016 et 2022, dans un service d'Allergologie ou de Pneumo-Allergologie de l'hôpital des Enfants ou de l'hôpital Larrey. Les patients ont eu un prélèvement sanguin lors de la consultation initiale avec une prescription de dosage d'IgE spécifiques contre au moins des 10 allergènes alimentaires que nous avons choisi d'étudier. Ces dosages initiaux ont été faits sur automate PHADIA 250 par technique ImmunoCAP™. Les prélèvements ont ensuite été conservés à -40°C au sein du laboratoire d'Immuno-Allergologie avant d'être congelés et nouveaux pour les mêmes dosages d'IgE spécifiques, cette fois par méthode NOVEOS. Le statut « allergique » ou « non-allergique » de chaque patient, pour le diagnostic d'allergie alimentaire, a été établi soit sur la base d'un TPO, soit, lorsque ce dernier n'avait pas pu être réalisé, via l'anamnèse et/ou la notion d'un épisode anaphylactique documenté. Via cette méthode d'analyse, le pourcentage de patients allergiques variait de 34 % à 52 % selon l'aliment.

A noter que notre travail n'a pas nécessité de prélèvement sanguin spécifique : les dosages NOVEOS ont été faits sur des « résidus » sériques sur lesquels des analyses avaient été prescrites. En ce qui concerne le recueil des données cliniques, nous nous sommes basés sur les courriers (plateforme ORBIS) destinés aux patients et rédigés par les médecins prescripteurs.

Ces courriers informent les patients que les informations cliniques qui y sont inscrites peuvent être utilisées en vue de protocoles de recherche. L'ensemble des données clinico-biologiques des patients étudiés dans ce travail ont été codées de façon pseudo-anonyme sur fichiers cryptés et les analyses statistiques ont été faites sur des données totalement anonymisées.

Les allergènes alimentaires que nous avons étudiés sont : l'arachide (extrait f13 et rAra h 2 f423), le lait de vache (extrait f2 et la caséine f78), la noisette (extrait f17 et rCor a 1 f439), le blanc d'œuf (extrait f1 et ovomucoïde f233), le poisson (extrait f3) et la crevette (extrait f24). Au total, 570 dosages d'IgE spécifiques ont été réalisés en parallèle sur les deux plateformes. Certains des 289 patients étaient polysensibilisés (17%) et ont été étudiés pour plusieurs allergènes.

Lors de la comparaison des performances analytiques d'ImmunoCAP™ et de NOVEOS, les deux systèmes ont montré une corrélation élevée que ce soit pour les extraits d'allergènes ou les AM (respectivement,  $\rho = 0.92$  et  $0.96$  ; figure 1 de l'article). Cependant, le NOVEOS a donné des résultats inférieurs en moyenne de 15 % à ceux d'ImmunoCAP™.

Au niveau des performances cliniques, les deux méthodes ont montré des performances similaires pour la discrimination entre les personnes allergiques et non allergiques aux différents aliments. Cependant, NOVEOS s'est avéré plus discriminant que ImmunoCAP™ pour exclure les allergies chez les personnes sensibilisées ayant de faibles valeurs d'IgE (0,35-3,5 kUA/L) (cf. figure 2 de l'article).

Seuls 27 résultats d'IgE spécifiques sur 570 (4,7%) montraient une différence entre les deux systèmes d'au moins 2 classes d'IgE. La plupart de ces discordances ont été observées pour des allergènes tirés d'aliments végétaux (18 sur 27 discordances). Nous avons retenu l'hypothèse que la présence d'épitopes glucidiques végétaux, ou CCD soit l'origine de la plupart des discordances entre NOVEOS et ImmunoCAP™. Il est en effet possible que les épitopes glycosylés exprimés par les allergènes soient plus accessibles aux IgE lorsque ces allergènes sont fixés sur la cellulose d'un ImmunoCAP™, par rapport à leur accessibilité sur les microbilles NOVEOS.

Enfin, nous avons pu établir des valeurs optimales d'IgE spécifiques, en termes de sensibilité, spécificité, Valeur Prédictive Positive (VPP) et Valeur Prédictive Négative (VPN), pour chacun des 10 allergènes et chacune des deux plateformes. Cependant, nous soulignons que la détermination de seuils cliniques universels de concentrations d'IgE est difficile en raison des variations importantes d'une population à l'autre. Ainsi, l'établissement de seuils cliniques

"locaux" pour des populations spécifiques est essentiel pour une gestion appropriée des patients allergiques.

En conclusion, l'étude montre que les deux plateformes, NOVEOS et ImmunoCAP™, sont hautement corrélées et prédictives du diagnostic d'allergie ou de tolérance alimentaire pour les 10 allergènes étudiés. NOVEOS présente l'avantage d'exiger un volume d'échantillon de test plus faible par rapport à ImmunoCAP™ et a une meilleure capacité à identifier les patients à risque d'allergie par rapport à la sensibilisation asymptomatique. Cependant, des études supplémentaires avec d'autres allergènes (notamment les aéro-allergènes) et d'autres populations sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

## **2. Analyses complémentaires réalisées en parallèle**

En complément de l'article, d'autres analyses ont été réalisées.

1)- Nous avons généré, des courbes ROC afin de comparer l'efficacité clinique de l'ImmunoCAP™ et du NOVEOS sur l'ensemble des dosages d'IgE spécifiques en combinant les données des 10 allergènes alimentaires étudiés. La figure 24 montre ainsi que les deux plateformes présentent des performances similaires pour anticiper le risque d'allergie alimentaire. On note aussi que les AM sont légèrement plus performants que les extraits pour les deux plateformes (AUC = 0,86/0,87 pour extraits, versus AUC = 0,91 pour les AM).



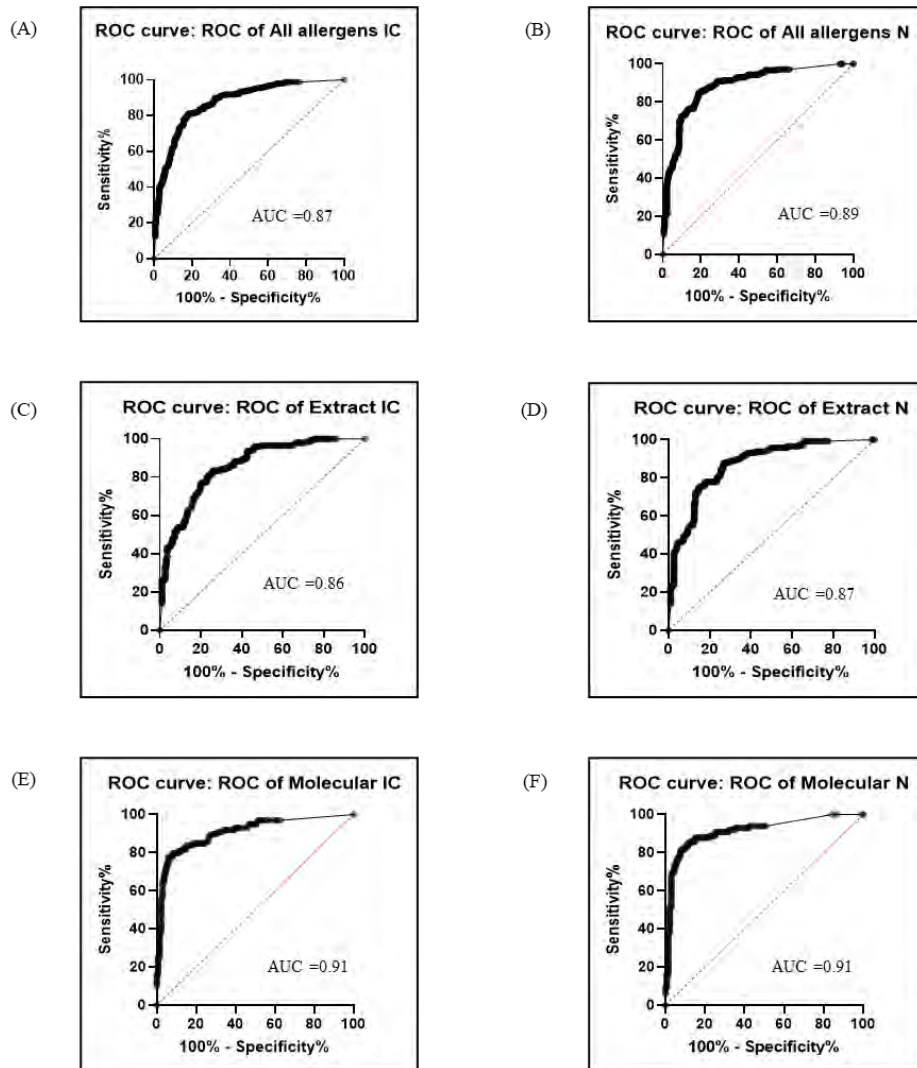


Fig. 24 : Courbes ROC globales pour ImmunoCAP™ (gauche) et NOVEOS (droite)

Tous les allergènes (ImmunoCAP : A ; NOVEOS : B) ; extraits : (ImmunoCAP : C ; NOVEOS : D) ; AM : (ImmunoCAP : E ; NOVEOS : F)

2)- Ensuite, nous avons de visualiser le fait que les dosages d'IgE spécifiques ne permettent pas de « prédire » le caractère allergique d'un individu, mais sont plutôt des indicateurs de la probabilité de présenter des symptômes si l'individu est exposé à l'allergène.

En nous inspirant d'une analyse de corrélation par d'autres équipes<sup>104</sup>, nous avons confronté des courbes de type ROC mais en séparant sensibilité (en rouge) et spécificité (en bleu) aux statuts cliniques (allergique / non-allergique) des patients qui consultent pour une suspicion d'allergie à l'arachide. Le point de croisement des courbes bleue et rouge correspond au « *Cut-Off*

optimal » pour l'allergène considéré. Au-dessus du graphique, les dosages d'IgE spécifiques sont présentés selon le résultat positif ou négatif du TPO. Tous ces patients avaient bénéficié d'un TPO à l'arachide pour terminer leur statut clinique. L'analyse a été faite pour l'extrait d'arachide et pour l'AM rAra h 2.

La figure 25 suggère bien que le dosage d'IgE spécifiques anti-aliment peut être assimilé à un bio-marqueur du risque de symptômes d'allergie.

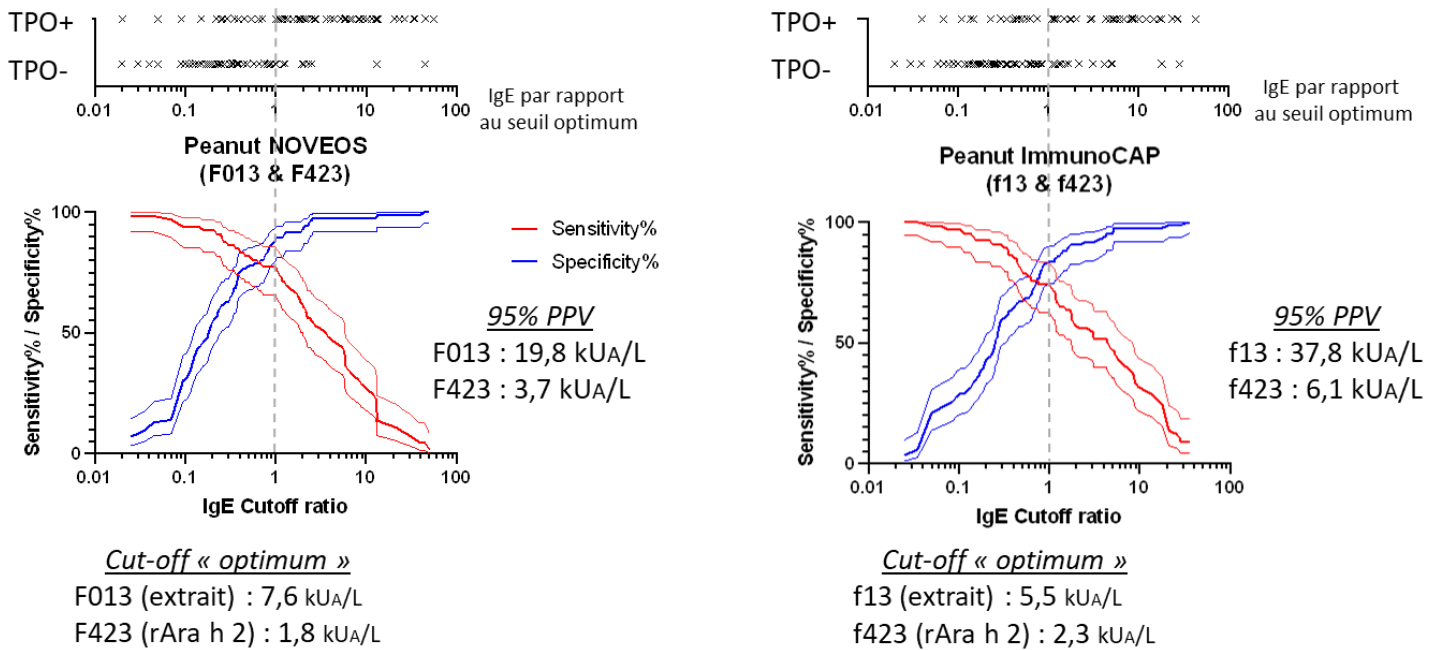


Fig. 25 : Analyse des cut-offs « optimum » des IgE spécifiques sur NOVEOS et ImmunoCAP™ par rapport à l'arachide

Les *cut-offs* (extrait d'arachide f13 et rAra h 2 ; NOVEOS et ImmunoCAP) ont été ajustés à la valeur « 1 » pour simplifier la lecture des graphes. Les valeurs individuelles de ces *cut-offs* sont indiquées pour une valeur prédictive positive de 95%.

3)- Enfin dans le cadre de l'analyse des discordances entre les deux méthodes, nous avons réalisé une analyse distincte de celle présentée sur la Figure N°2 de l'article. Nous avons sélectionné tous les résultats qui, pour au moins l'une (ou les deux) méthodes de dosage, étaient en désaccord avec le statut « allergique » ou « non-allergique » des patients. Par exemple, un résultat ImmunoCAP™ de dosage d'IgE spécifiques d'un allergène donné qui est supérieur au cut-off optimum pour cette méthode et ce, chez un patient non-allergique. Ou l'inverse, un

résultat NOVEOS inférieur au cut-off chez un patient allergique. Au total, 113 dosages correspondent à ces critères de discordance clinico-biologique.

Ces 113 résultats sont présentés sur un graphique (voir Fig. 26, ci-dessous) où toutes les valeurs mesurées pour différents allergènes sont exprimées par rapport au *cut-off* de chaque allergène (la valeur 1 est donnée au *cut-off*). Les extraits et les AM sont représentés de façon différente, ainsi que le statut allergique (orange) ou non (vert) des patients. Les effectifs des quatre catégories (vrai positif, vrai négatif, faux positif, faux négatif) sont indiqués dans des tableaux. On note que 22 patients sont correctement classés par ImmunoCAP™ contre 91 qui sont mal classés par la même méthode, tandis que 33 patients sont bien classés chez NOVEOS et 80 sont classés de façon incorrecte. Ces valeurs ne montrent pas de différence significative entre les deux méthodes.

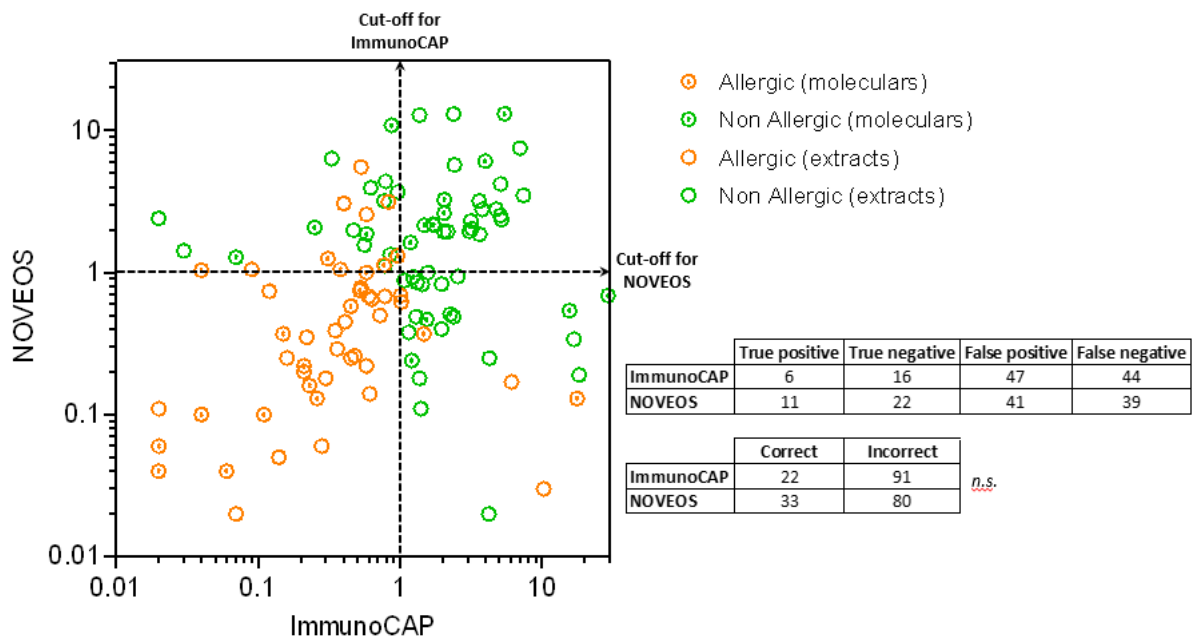


Fig. 26 : Analyse des discordances entre les allergies cliniques et les résultats de dosage des IgE spécifiques sur NOVEOS et ImmunoCAP™

## IV. Conclusion

A travers cette thèse, nous avons réalisé une comparaison technique mais également une comparaison de performance clinique entre l'ImmunoCAP™ et le NOVEOS. Pour cela, nous avons analysé le dosage des IgE spécifiques pour six aliments : l'arachide (extrait f13 et rAra h 2 f423), le lait de vache (extrait f2 et la caséine f78), la noisette (extrait f17 et rCor a 1 f439), le blanc d'œuf (extrait f1 et ovomucoïde f233), le poisson (extrait f3) et la crevette (extrait f24) sur 289 patients.

Nos résultats démontrent une excellente concordance analytique entre les deux automates avec des valeurs d'IgE mesurées généralement plus basses avec NOVEOS par rapport à ImmunoCAP™. Cette concordance devrait faciliter l'utilisation de NOVEOS en pratique courante, en particulier pour des praticiens habitués à analyser des résultats obtenus via ImmunoCAP™.

Au niveau clinique les deux automates sont tous deux de performances comparables, malgré le fait que la technologie NOVEOS identifie significativement mieux qu'ImmunoCAP™ les patients non allergiques lorsqu'ils ont des valeurs basses d'IgE spécifiques (classes 0 / 1 / 2). Les points les plus discordants entre l'ImmunoCAP et le NOVEOS concernent les extraits allergéniques, notamment ceux de l'arachide et de la noisette (quelques faux positifs avec ImmunoCAP™).

Au total, en raison des performances comparables des deux technologies, nous avons modifié le titre de l'article soumis à *JACI : In Practice* par rapport au titre présent sur l'article *pre-print* joint en annexe : *NOVEOS (Hycor) and ImmunoCAP™ have similar performances for diagnosing food allergies.*

Nous projetons de poursuivre notre étude en la complétant dans un premier temps avec des aéro-allergènes. De même, le catalogue des allergènes du NOVEOS est toujours en cours de formation et d'autres allergènes voire de nouvelles classes d'allergènes pourront être étudiés dans le futur.

# BIBLIOGRAPHIE

1. WHO (2002). Prevention of Allergy and Allergic Asthma. World Health Organization. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68361/WHO\\_NMH\\_MNC\\_CRA\\_03.2.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68361/WHO_NMH_MNC_CRA_03.2.pdf).
2. Ruby Pawankar, Giorgio Walter Canonica, Stephen T. Holgate, Richard F. Lockey, and Michael S. Blaiss (2013). WAO White Book on Allergy R. Pawankar, G. W. Canonica, S. T. Holgate, R. F. Lockey, and M. S. Blaiss, eds.
3. EAACI (2013). EAACI issues European Food Allergy & Anaphylaxis Public Declaration. EAACI. <https://www.eaaci.org/attachments/130207EAACIissuesEuropeanFoodAllergy%26AnaphylaxisPublicDeclaration.pdf>.
4. J. Flé (2018). Maladies allergiques liés à l'environnement intérieur et extérieur : clinique, diagnostic et traitement. Akos (Traité de Médecine).
5. Johannes Ring (2010). Allergy in Practice 10.1007/b137849.
6. Waite, K.J. (1995). Blackley and the Development of Hay Fever as a Disease of Civilization in the Nineteenth Century.
7. David, B. (2016). Histoire de l'anaphylaxie et de l'allergie. In 39ème jour du GAICRM - groupement d'allergologie et d'immunologie clinique du Rhône Moyen.
8. Julian Crane (2017). Charles Harrison Blackley: the man who put the hay in hay fever - Hektoen International. Hektoen International. <https://hekint.org/2017/01/28/charles-harrison-blackley-the-man-who-put-the-hay-in-hay-fever/>.
9. Universalis TEST DE PRAUSNITZ-KÜSTNER - Encyclopædia Universalis. Universalis. <https://www.universalis.fr/encyclopedie/test-de-prausnitz-kustner/>.
10. Toki, S., Goleniewska, K., Zhang, J., Zhou, W., Newcomb, Baohua Zhou, D.C., Kita, H., and Boyd, K.L. (2020). In This Issue: Graphical Abstracts. Allergy 75, 1537–1542. 10.1111/ALL.13900.
11. Johansson, S.G.O. (2016). The discovery of IgE. J Allergy Clin Immunol 137, 1671–1673. 10.1016/J.JACI.2016.04.004.
12. Saito, H., and Galli, S.J. (2019). Obituary for Teruko Ishizaka (1926–2019). Allergology International 68, 399–400. 10.1016/j.alit.2019.07.001.

13. Ishizaka, K. (2018). The Way We Walked with Immunology. *The Annual Review of Immunology*. 10.1146/annurev-immunol.
14. Roulou, H. (2013). LES ALLERGIES: DONNÉES GÉNÉRALES ET PROTOCOLE DIAGNOSTIQUE. Université Mohammed V -SOUISSI- Faculté de Médecine et de Pharmacie - RABAT 88.
15. Carsin, A., Agabriel-Parent, C., Cabon Boudard, I., and Dubus, J.-C. (2015). Démarche diagnostique en allergie alimentaire. *Archives de Pédiatrie* 22, 122–123.
16. Démarche diagnostique pour confirmer une allergie alimentaire <https://www.tousalecole.fr/sites/default/files/medias/integrascol/documents/Allergie%20alimentaire-demarche%20diagnostique.pdf>.
17. Matricardi, P.M., Kleine-Tebbe, J., Hoffmann, H.J., Valenta, R., Hilger, C., Hofmaier, S., Aalberse, R.C., Agache, I., Asero, R., Ballmer-Weber, B., et al. (2016). EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatric Allergy and Immunology* 27, 1–250. 10.1111/pai.12563.
18. Deruaz, C.A., von Feilitzen, A., Leimgruber, A., Bart, P.-A., and Spertini, F. (2005). Tests cutan en allergologie : si simple en apparence.... *Rev Med Suisse* 9, 997–1002.
19. Villard-Truc, F., Gomez, S.A., Deschildre, A., and Rancé, F. (2006). Test de provocation par voie orale aux aliments chez l'enfant. Quand, pour qui et comment? Sélection des patients. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 46, 610–624. 10.1016/J.ALLERG.2006.08.003.
20. Cardona, V., Ansoategui, I.J., Ebisawa, M., El-Gamal, Y., Fernandez Rivas, M., Fineman, S., Geller, M., Gonzalez-Estrada, A., Greenberger, P.A., Sanchez Borges, M., et al. (2020). World Allergy Organization Anaphylaxis Guidance 2020. *World Allergy Organization Journal* 13, 100472. 10.1016/J.WAOJOU.2020.100472.
21. Haute Autorité de Santé (HAS) (2015). Synthèse: Indications du dosage des IgE spécifiques dans le diagnostic et le suivi des maladies allergiques. HAS. [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/Dosage\\_IgE\\_synth.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/Dosage_IgE_synth.pdf).
22. Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Beyer, K., Bindslev-Jensen, C., Cardona, V., Dubois, A., Dutoit, G., Eigenmann, P., et al. (2014). EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: Diagnosis and management of food allergy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 69, 1008–1025. 10.1111/ALL.12429.

23. Sastre, J. (2010). Molecular diagnosis in allergy. *Clinical and Experimental Allergy* 40, 1442–1460. 10.1111/j.1365-2222.2010.03585.x.
24. Lundberg, M., Chen, Z., Rihs, H.-P., and Wrangsjö, K. Recombinant spiked allergen extract.
25. Matricardi, P.M., Kleine-Tebbe, J., Hoffmann, H.J., Valenta, R., Hilger, C., Hofmaier, S., Aalberse, R.C., Agache, I., Asero, R., Ballmer-Weber, B., et al. (2016). EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol* 27 Suppl 23, 1–250. 10.1111/PAI.12563.
26. Bienvenu, J., Rouzair, P., and Bienvenu, F. (2011). Les allergènes moléculaires : évolution ou révolution dans le diagnostic de l'allergie. *Rev Fr Allergol* 51, 186–191. 10.1016/J.REVAL.2011.02.008.
27. Pauli, G. (2007). Survol historique de la connaissance des allergènes. *AllerDATA*. <https://www.allerdata.com/spip.php?article19&lang=fr>.
28. David, B., and Pasteur, I. 40<sup>e</sup> journée du GAICRM-Symposium du 1<sup>er</sup> avril 2017- Rochegude Les allergènes : mythe ou réalité .
29. BELAID, B., GHARNAOUT, M., and DJIDJIK, R. (2019). Place des allergènes moléculaires en pratique courante en allergologie. *Algerian Journal of Allergology* 1, 11–15.
30. Vitte, J. (2018). Allergies de type I: allergènes aéroportés - Dosage d'IgE spécifiques.
31. Vitte, J., and Bienvenu, F. (2012). Allergènes moléculaires. *EMC - Biologie Médicale* 7, 1–8. 10.1016/S2211-9698(12)57796-4.
32. Spiric, J., Engin, A.M., Karas, M., and Reuter, A. (2015). Quality Control of Biomedicinal Allergen Products – Highly Complex Isoallergen Composition Challenges Standard MS Database Search and Requires Manual Data Analyses. *PLoS One* 10, e0142404. 10.1371/journal.pone.0142404.
33. Casset, A. (2011). Méthodes d'obtention d'un allergène recombinant. *Rev Fr Allergol* 51, 282–285. 10.1016/J.REVAL.2011.02.005.
34. Allergènes moléculaires et e-allergie. <http://e-allergie.fr/allergologie-g%C3%A9n%C3%A9rale/tests-cutan%C3%A9s/allerg%C3%A8nes-recombinants>.
35. Platts-Mills, T.A., Hilger, C., Jappe, U., van Hage, M., Gadermaier, G., Spillner, E., Lidholm, J., Keshavarz, B., Aalberse, R.C., van Ree, R., et al. (2021). Carbohydrate

- epitopes currently recognized as targets for IgE antibodies. *Allergy* 76, 2383–2394. 10.1111/all.14802.
36. Bienvenu, J., Rouzair, P., and Bienvenu, F. (2011). Les allergènes moléculaires : évolution ou révolution dans le diagnostic de l'allergie. *Rev Fr Allergol* 51, 186–191. 10.1016/J.REVAL.2011.02.008.
  37. Sastre, J., Sastre, J., Díaz, J., and Reyes, A. (2010). Molecular diagnosis in allergy. *Clinical & Experimental Allergy* 40, 1442–1460. 10.1111/J.1365-2222.2010.03585.X.
  38. Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., de Knop, K.J., Verweij, M.M., Bridts, C.H., de Clerck, L.S., Stevens, W.J., and Stevens, W.J. Component-resolved diagnosis from latex allergy by microarray. 10.1111/j.1365-2222.2009.03370.x.
  39. Chung, C.H., Mirakhur, B., Chan, E., Le, Q.-T., Berlin, J., Morse, M., Murphy, B.A., Satinover, S.M., Hosen, J., Mauro, D., et al. (2008). Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose- $\alpha$ -1,3-Galactose Antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 122, 1016–1022. 10.1016/J.JACI.2008.06.016.
  40. Hochwallner, H., Schulmeister, U., Swoboda, I., Focke-Tejkl, M., Civaj, V., Balic, N., Nystrand, M., Härlin, A., Thalhamer, J., Scheiblhofer, S., et al. (2010). Visualization of clustered IgE epitopes on alpha-lactalbumin. *J Allergy Clin Immunol* 125, 1016–1022. 10.1016/J.JACI.2010.03.007.
  41. Wang, J., Lin, J., Bardina, L., Goldis, M., Nowak-Wegrzyn, A., Shreffler, W.G., and Sampson, H.A. (2010). Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 125, 1016–1022. 10.1016/J.JACI.2009.12.017.
  42. Ando, H., Movérare, R., Kondo, Y., Tsuge, I., Tanaka, A., Borres, M.P., and Urisu, A. (2008). Utility of ovomucoid-specific IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 122, 583–588. 10.1016/J.JACI.2008.06.016.
  43. Nicolaou, N., Poorafshar, M., Murray, C., Simpson, A., Winell, H., Kerry, G., Härlin, A., Woodcock, A., Ahlstedt, S., and Custovic, A. (2010). Allergy or tolerance in children sensitized to peanut: prevalence and differentiation using component-resolved diagnostics. *J Allergy Clin Immunol* 125, 1016–1022. 10.1016/J.JACI.2009.10.008.
  44. Medicines & Healthcare products Regulatory Agency (2013). WHO International Standard Immunoglobulin E (UgE), human serum NIBSC code: 11/234 Instructions for use (Version 1.0, Dated 31/10/2013). NIBSC. <https://nibsc.org/documents/ifu/11-234.pdf>.



45. Arbesman, C.E., Ito, K., Wyrpych, J.I., and Wicher, K. (1972). Measurement of serum IgE by a one-step single radial radiodiffusion method. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 49, 72–80. 10.1016/0091-6749(72)90058-9.
46. Rowe, D.S., and Wood, C.B. (1970). The measurement of serum immunoglobulin E levels in healthy adults and children and in children with allergic asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 39, 1–5. 10.1159/000230328.
47. Centifanto, Y.M., and Kaufman, H.E. (1971). A Simplified Method for Measuring Human IgE. *The Journal of Immunology* 107.
48. Gleich, G.J., Averbeck, A.K., and Swedlund, H.A. (1971). Measurement of IgE in normal and allergic serum by radioimmunoassay. *J Lab Clin Med* 77, 690–698.
49. Gleich, G.J., Adolphson, C.R., and Yunginger, J.W. (1980). The mini-RAST: Comparison with other varieties of the radioallergosorbent test for the measurement of immunoglobulin E antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 65, 20–28. 10.1016/0091-6749(80)90172-4.
50. Polmar, S.H., Waldmann, T.A., and Terry, W.D. IgE in Immunodeficiency.
51. Bazaral, M., Orgel, H.A., and Hamburger, R.N. (1971). IgE levels in normal infants and mothers and an inheritance hypothesis. *J Immunol* 107, 794–801.
52. Wide, L., and Porath, J. (1966). Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies. *BBA - General Subjects* 130, 257–260. 10.1016/0304-4165(66)90032-8.
53. Ceska, M., and Lundkvist, U. (1972). A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry* 9, 1021–1030. 10.1016/0019-2791(72)90112-7.
54. Kjellman, N.-1 M., Johansson, S.G.O., and Roth, A. (1976). Serum IgE levels in healthy children quantified by a sandwich technique (PRIST\*).
55. Hoffman, D.R. (1973). Estimation of serum IgE by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Allergy Clin Immunol* 51, 303–307. 10.1016/0091-6749(73)90132-2.
56. Guesdon, J.L., and Avrameas, S. (1974). An immunoenzymatic method for measuring low concentrations of antigens by single radial diffusion. *Immunochemistry* 11, 595–598. 10.1016/0019-2791(74)90251-1.

57. Weltman, J.K., Frackelton, A.R., Szaro, R.P., and Rotman, B. (1976). A galactosidase immunosorbent test for human immunoglobulin E. *J Allergy Clin Immunol* 58, 426–431. 10.1016/0091-6749(76)90123-8.
58. Guesdon, J.L., Thierry, R., and Avraméas, S. (1978). Magnetic enzyme immunoassay for measuring human IgE. *J Allergy Clin Immunol* 61, 23–27. 10.1016/0091-6749(78)90469-4.
59. Sarmini, H., Robinet, D., Lesure, J., and Funes, A. (1985). Fluoro-allergo-sorbent test (IgE FAST): concepts et performances. undefined.
60. de Weck, A.L. (1964). Penicillin allergy: Its detection by an improved hæmagglutination technique. *Nature* 202, 975–977. 10.1038/202975A0.
61. SCHEIDEGGER, J.J. (1955). [A micro-method of immuno-electrophoresis]. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 7, 103–110.
62. Coombs, R.R., Hunter, A., Jonas, W.E., Bennich, H., Johansson, S.G., and Panzani, R. (1968). Detection of IgE(IgND) specific antibody (probably reagin) to castor-bean allergen by the red-cell-linked antigen-antiglobulin reaction. *Lancet* 1, 1115–1118. 10.1016/S0140-6736(68)90186-4.
63. Vervloet, D., Bongrand, P., and Charpin, J. (1978). Absolute determination of IgE antibodies to grass pollen allergens. *Allergy* 33, 203–210. 10.1111/J.1398-9995.1978.TB01535.X.
64. Sabbah A, and Langlois P. (1990). [The Pharmacia CAP system as a new measure of specific IgE. Application in the diagnosis of hypersensitivity to the venom of the *Vespula* wasp]. *Allerg Immunol (Paris)* 5, 173–181.
65. Kleine-Tebbe, J., Eickholt, M., Gatjen, M., Brunnee, T., O’connor, A., and Kunkel, G. (1992). Comparison between MAGIC LITE®- and CAP®-system: two automated specific IgE antibody assays.
66. Ewan, P.W., and Coote, D. (1990). Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the iEfraunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies.
67. Fall, B.I., Eberlein-König, B., Behrendt, H., Niessner, R., Ring, J., and Weller, M.G. (2003). Microarrays for the Screening of Allergen-Specific IgE in Human Serum. *Anal Chem* 75, 556–562. 10.1021/ac026016k.

68. Bousquet, J., Chanez, P., Chanal, I., and Michel, F.B. (1990). Comparison between RAST and Pharmacia CAP system: a new automated specific IgE assay. *J Allergy Clin Immunol* 85, 1039–1043. 10.1016/0091-6749(90)90048-9.
69. Liappis, N., and Starke, A. (1996). Comparaison du test Cap Pharmacia sxl et du test CMG Immunodot Top Screen pour le dépistage in vitro des allergies. *Revue Française des Laboratoires* 281, 52–54.
70. Goikoetxea, M., Sanz, M., García, B., Mayorga, C., Longo, N., Gamboa, P., Barber, D., Caballero Molina, T., de la Calle Toral, A., Escribano Mora, L., et al. (2013). Specific IgE Determination Techniques Recommendations for the Use of In Vitro Methods to Detect Specific Immunoglobulin E: Are They Comparable?
71. Goikoetxea, M., Sanz, M., García, B., Mayorga, C., Longo, N., Gamboa, P., Barber, D., Caballero Molina, T., de la Calle Toral, A., Escribano Mora, L., et al. (2013). Specific IgE Determination Techniques Recommendations for the Use of In Vitro Methods to Detect Specific Immunoglobulin E: Are They Comparable?
72. Ansoategui, I.J., Melioli, G., Canonica, G.W., Caraballo, L., Villa, E., Ebisawa, M., Passalacqua, G., Savi, E., Ebo, D., Gómez, R.M., et al. (2020). IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ J* 13, 100080. 10.1016/J.WAOJOU.2019.100080.
73. ThermoFisher Scientific Tests ImmunoCAP™ IgE Spécifiques | Thermo Fisher Scientific. ThermoFisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/phadia/wo/fr/our-solutions/immunocap-allergy-solutions/specific-ige-single-allergens.html>.
74. Jansson, R. (2006). ImmunoCAP™-reagent information for specific IgE.
75. Audet, C. (2016). Conception d'un dosage d'IgE spécifiques. ImmunoCAP. <https://slideplayer.fr/slide/9726626/>.
76. Babson, A.L. (2013). IMMULITE® 2000 and IMMULITE 2000 XPi. In *The Immunoassay Handbook* (Elsevier Ltd), pp. 575–578. 10.1016/B978-0-08-097037-0.00045-2.
77. Li, T.M., Chuang, T., Tse, S., Hovanec-Burns, D., Said, A., and Shami, E. (2004). Development and Validation of a Third Generation Allergen-Specific IgE Assay on the Continuous Random Access IMMULITE® 2000 Analyzer. *Ann Clin Lab Sci* 34, 67–74. 0091-7370/04/0100-0067.

78. Siemens IMMULITE 2000 XPI. Siemens Healthineers. <https://www.siemens-healthineers.com/fr-ma/immunoassay/systems/immulite-2000-xpi-immunoassay-system>.
79. DPC (2005). Total IgE For use on the IMMULITE ® and IMMULITE ® 1000 systems. IMMULITE.
80. al Hawi, Y., Nagao, M., Furuya, K., Sato, Y., Ito, S., Hori, H., Hirayama, M., and Fujisawa, T. (2021). Agreement between predictive, allergen-specific IgE values assessed by immunoCAP and IMMULITE 2000 3gAllergy™ assay systems for milk and wheat allergies. *Allergy Asthma Immunol Res* 13, 141–153. 10.4168/AAIR.2021.13.1.141.
81. Lee, Y.W., Sohn, J.H., Lee, J.H., Hong, C.S., and Park, J.W. (2009). Allergen-specific IgE measurement with the IMMULITE 2000 system: Intermethod comparison of detection performance for allergen-specific IgE antibodies from Korean allergic patients. *Clinica Chimica Acta* 401, 25–32. 10.1016/j.cca.2008.10.034.
82. Klingebiel, C., Philippe, R., Mathieu, P., Vitte, J., and Apoil, P.A. (2022). Les automates d'immuno-analyse pour la recherche et le dosage d'immunoglobulines E spécifiques unitaires. *Rev Fr Allergol*. 10.1016/J.REVAL.2022.03.014.
83. Szecsi, P.B., and Stender, S. (2013). Comparison of immunoglobulin E measurements on IMMULITE and ImmunoCAP in samples consisting of allergen-specific mouse-human chimeric monoclonal antibodies towards allergen extracts and four recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 162, 131–134. 10.1159/000353276.
84. Savoye, B., Berger, A.-E., Le Mauff, B., and Lambert, C. (2020). Apport de la biologie dans le diagnostic d'allergie immunitaire. *Revue Francophone des Laboratoires* 521, 38–45.
85. Hiller, R., Laffer, S., Harwanegg, C., Huber, M., Schmidt, W.M., Twardosz, A., Barletta, B., Becker, W.M., Blaser, K., Breiteneder, H., et al. (2002). Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment; Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *The FASEB Journal*. 10.1096/fj.01-0711fje.
86. Skrindo, I., Lupinek, C., Valenta, R., Hovland, V., Pahr, S., Baar, A., Carlsen, K.H., Mowinckel, P., Wickman, M., Melen, E., et al. (2015). The use of the MeDALL-chip to assess IgE sensitization: a new diagnostic tool for allergic disease? *Pediatr Allergy Immunol* 26, 239–246. 10.1111/PAI.12366.

87. Anto, J.M., Bousquet, J., Akdis, M., Auffray, C., Keil, T., Momas, I., Postma, D.S., Valenta, R., Wickman, M., Cambon-Thomsen, A., et al. (2017). Mechanisms of the Development of Allergy (MeDALL): Introducing novel concepts in allergy phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 139, 388–399. 10.1016/J.JACI.2016.12.940.
88. London Allergy & Immunology Centre - Global Network ISAC Test, ISAC Testing & ISAC Testing in London. Mesure par cytométrie en flux de l'activation in vitro des basophiles par des allergènes. <https://www.allergycliniclondon.co.uk/allergy-tests/isac-test/>.
89. CHU Vaudois Diagnostic in vitro multiparamétrique en allergologie - Service d'immunologie et allergie - CHUV. CHU Vaudois. <https://www.chuv.ch/fr/ial/ial-home/professionnels-de-la-sante/laboratoire-de-diagnostic/informations/allergie/diagnostic-en-allergologie>.
90. MADX eurofins (2019). ALEX ® Explorateur d'allergies Informations destinées aux professionnels de santé.
91. Williams, P., Önell, A., Baldracchini, F., Hui, V., Jolles, S., and El-Shanawany, T. (2016). Evaluation of a novel automated allergy microarray platform compared with three other allergy test methods. *Clin Exp Immunol* 184, 1–10. 10.1111/CEI.12721.
92. Omnia Health ALEX Allergy Explorer | MacroArray Diagnostics GmbH. Omnia Health. <https://www.omnia-health.com/product/alex-allergy-explorer>.
93. Garnier, L. (2020). Les biopuces multi-allergéniques. *Revue Francophone des Laboratoires* 2020, 46–51. 10.1016/S1773-035X(20)30127-1.
94. Wollmann, E., Lupinek, C., Kundi, M., Selb, R., Niederberger, V., and Valenta, R. (2015). Reduction in allergen-specific IgE binding as measured by microarray: A possible surrogate marker for effects of specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 136, 806. 10.1016/J.JACI.2015.02.034.
95. Sereme, Y., Casanovas, N., Michel, M., Martin-Blondel, A., Mankouri, F., Pinchemel, S., Chartier, C., Mezouar, S., Buffat, C., Chamayou, G., et al. (2021). IgG removal significantly enhances detection of microarray allergen-specific IgE reactivity in patients' serum. *Allergy* 76, 395–398. 10.1111/ALL.14536.
96. IDS-iSYS Multi-Discipline Automated System | IDS <https://www.idsplc.com/idsisyssystem/>.
97. IDS IDS-iSYS - achat. IDS. [https://www.ugap.fr/achat-public/ids-isys-achat\\_2141142.html](https://www.ugap.fr/achat-public/ids-isys-achat_2141142.html).

98. IDS-i10 and IDS-iSYS | EUROIMMUN  
<https://www.euroimmun.de/en/automation/chlia/ids-i10-and-ids-isys/>.
99. Hycor (2020). NOVEOS Customer Training new template FR. Hycor.
100. Lambert, C., Sarrat, A., Bienvenu, F., Brabant, S., Nicaise-Roland, P., Alyanakian, M.A., Apoil, P.A., Capron, C., Couderc, R., Evrard, B., et al. (2015). The importance of en ISO 15189 accreditation of allergen-specific IgE determination for reliable *in vitro* allergy diagnosis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 70, 180–186. 10.1111/ALL.12546.
101. Shum, M., Mathew, A., Nowakowski, M., Moallem, H.-M., Smith-Norowitz, T.A., Durkin, H.G., Joks, R.O., Qamar, N., Fishbein, A.B., Erickson, K.A., et al. (2015). Analytical Performance Characteristics, Quality Assurance and Clinical Utility of Immunological Assays for Human IgE Antibodies of Defined Allergen Specificities. (CLSI-ILA20-A3). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135, AB8. 10.1016/J.JACI.2014.12.961.
102. UK Neqas UK NEQAS | External Quality Assessment Services. UK Neqas.  
<https://ukneqas.org.uk/about-us/>.
103. Lambert, C., Sarrat, A., Bienvenu, F., Brabant, S., Nicaise-Roland, P., Alyanakian, M.-A., Apoil, P.-A., Capron, C., Couderc, R., Evrard, B., et al. (2015). The importance of EN ISO 15189 accreditation of allergen-specific IgE determination for reliable *in vitro* allergy diagnosis. *Allergy* 70, 180–186. 10.1111/all.12546.

## Annexes

*INTRA-SERIES REPETABILITY PHADIA 250*

Allergen	Number of tests	Mean	CV %
D1	21	0.73	3.9%
D1	20	13.67	2%
D1	20	55.03	4.90%
			<b>2.95%</b>

Annexe 1 : Tableau de répétabilité et de reproductibilité du PHADIA250 (ImmunoCAP™)

*INTER-SERIES REPRODUCTIBILITY PHADIA 250*

Allergen	Number of tests	Mean	CV %
E1	28	2.86	8.32%
T3	28	10.87	6.41%
D1	28	24.61	7.01%
			<b>7.25%</b>

Annexe 2 : Tableau de reproductibilité du PHADIA250 (ImmunoCAP™)

**Annexe 3 : Article actuellement mis en ligne sur AUTHOREA (en cours de  
soumission chez *JACI : In Practice*)**



# NOVEOS (Hycor) demonstrates better clinical performance than ImmunoCAP (Thermofisher) for food allergy diagnosis

POL ANDRE APOIL<sup>1</sup>, B. Trouche-Estival<sup>1</sup>, J. Vitte<sup>2</sup>, Audrey Martin-Blondel<sup>1</sup>, M. Michelet<sup>1</sup>, V. Gruzelle<sup>1</sup>, Alain Didier<sup>1</sup>, Laurent Guilleminault<sup>1</sup>, Claire Maillhol<sup>1</sup>, S. Martinez Rivera<sup>1</sup>, A. De Lima Correia<sup>1</sup>, C. Taurus<sup>1</sup>, A. Blancher<sup>1</sup>, Julien GORET<sup>3</sup>, and Caroline Klingebiel<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CHU de Toulouse

<sup>2</sup>Inserm UMR UA

<sup>3</sup>CHU de Bordeaux

<sup>4</sup>Synlab Provence

March 5, 2023

## Abstract

**Background:** The aim of this study was to compare the technical and clinical effectiveness of two platforms (Phadia ImmunoCAP and Hycor NOVEOS) for the measurement of IgE specific for 10 food allergens. **Methods:** 289 patients, as part of allergy diagnosis or of their follow-up were included and tested for IgE specific for six food allergen extracts (egg white, cow's milk, peanut, hazelnut, fish, shrimp) and four molecular allergens (Gal d 1, Bos d 8, Ara h 2, Cor a 14). Specific IgE measurements were carried out using the ImmunoCAP and NOVEOS methods. Food allergy diagnosis was established according to international guidelines. **Results:** A very good correlation ( $\rho > 0.9$ ) was present between the two platforms, while specific IgE concentrations measured with NOVEOS were consistently lower (mean -15%) than with ImmunoCAP. NOVEOS provided higher overall odd-ratios and relative risks for allergen extracts than ImmunoCAP, but the difference was not significant. When all ten allergens were considered, NOVEOS provided better ROC curves ( $p = 0.03$ ) and thus, had a better ability to establish the true value. Finally, we found that the most discordant results were observed with hazelnut and peanut extracts, and were related to cross-reactive carbohydrate determinants on these two ImmunoCAP. **Conclusions:** Specific IgE determination by either ImmunoCAP (odd-ratios of allergy = 25.1) or NOVEOS (odd-ratios of allergy = 33.0) is similarly highly informative on the risk of allergy in the selected population. The NOVEOS platform presents the advantage of being less affected by unwanted reactivity due to IgE specific for carbohydrate determinants, while requiring a ten-fold lower test sample volume.

## Introduction

Determination of specific IgE (sIgE) is one of the pillars on which allergy diagnosis stands, together with anamnesis, skin tests and allergen challenges (1, 2). IgE sensitization is commonly demonstrated *in vivo* by skin prick testing (SPT), or *in vitro* utilizing automated systems. IgE sensitization is commonly demonstrated *in vivo* by skin prick testing (SPT), or *in vitro* utilizing automated systems. Because IgE concentrations are very low in peripheral blood (3), very sensitive methods for sIgE measurement have been developed, such as ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden), which has been in use for more than 30 years and is currently considered as the reference method (4, 5). Accurate determination of sIgE concentrations is hampered by many factors such as variations in the composition of the allergenic sources (6), diversity of physico-chemical methods used to prepare allergen extracts, possible competition by non-IgE anti-allergen antibodies (7, 8), unwanted reactivity with clinically irrelevant cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) (9), and lack of result standardization (10). Initially developed to quantitate sIgE capable of binding

to allergenic extracts, which are complex mixtures of proteins, contemporary sIgE assays also measure sIgE to a variety of individual allergenic molecules, called molecular allergens (MA) (11). In daily practice, the impact of these tests has been restricted to the correct identification of allergen(s) responsible for clinical symptoms and to the estimation of the risk of severe reactions, deduced from the sensitization profile against MA (12-14). A commonly accepted rule is that, isolated from the clinical context, sIgE values cannot discriminate between sensitization and allergy. The capacity of sIgE values to “predict” the presence or absence of allergy symptoms as a function of the degree of sensitization is thus constrained by interindividual variations and the presence of co-factors (e.g. exercise, medication, concomitant infection, etc). Determination of useful sIgE threshold values, in particular for food allergens, was previously attempted in many studies using ImmunoCAP tests and demonstrated a general lack of agreement for these values (15).

In the last three years, new contenders, like NOVEOS (Hycor, Garden Grove, CA, USA), have started to propose new methods of sIgE measurement. NOVEOS uses biotinylated soluble allergens coupled to streptavidin-coated magnetic beads and thus, diverge from ImmunoCAP, which is based on allergens bound to a cellulose matrix and fluorescence signal. NOVEOS differs also from ImmunoCAP by requiring a lower test sample volume of 4  $\mu$ L, versus 40  $\mu$ L.

So far, only two reports have compared analytical performances of NOVEOS and ImmunoCAP, and only for airborne allergens. The first study compared sIgE results for 21 airborne allergens (9 extracts and 12 MA) on samples from 368 patients (16) and found a good overall correlation (Spearman’s rho: 0.65-0.96 for extracts; 0.79-0.98 for MA). The second report compared sIgE reactivity against two mixtures of airborne allergens, ImmunoCAP Phadiatop and NOVEOS SX01, on a cohort of 1314 pediatric samples. Spearman’s correlation between the data set of both methods was 0.84 (17).

However, comparison of the clinical performance of the two methods has not been addressed yet, and data for food allergens is lacking. The main objective of this study was to determine whether the theoretical technical advantages of NOVEOS technology can be translated into an equivalent or superior performance to that of ImmunoCAP, in a clinical setting of food allergy.

## Materials and methods

### *Patients and ethical considerations*

Patients (n=289) were recruited between 2017 and 2021 from paediatric or adult pulmonology and allergology departments in the Toulouse Teaching Hospital. All patients were attending for a suspicion of allergy to one or several foods. In all patients, food allergy diagnosis was established based on open oral food challenge (OFC) and/or anamnesis and the demonstration of sensitization to culprit foods. Blood samples were taken as part of routine allergy diagnosis or follow-up, in agreement with current EAACI and WAO guidelines (18, 19). The present study concerned only previously generated clinical and laboratory data and additional experiments with excess serum, and was thus categorized as a type 3b non-interventional research, Art. L1121-1 CSP under the French law. The study was approved by Research Ethics Committee (*Comité de Protection des Personnes*) Sud-Ouest et Outre-Mer II, for samples collected in Toulouse Teaching Hospital (sample collection declaration DC20162804). Sera from eight patients exhibiting MUXF3-positive sIgE without a history of food allergy, distinct from the 289 patients described above, were also selected.

### *Oral food challenges (OFC)*

Open (single-blind) food challenges were supervised by trained practitioners using recommended threshold cumulative doses (20). Due to risk of severe anaphylaxis or refusal, only 59% of patients were investigated with OFC (range: 32% for shrimp-allergic to 100% for peanut-allergic patients). A negative OFC was defined by the absence of allergy symptoms after consumption of a cumulative dose of tested food: egg white (>5 g of cooked egg), cow’s milk (>8.5 oz/254 mL of raw milk), peanut (>8.7 g of roasted peanut Eq to 2.2 g of protein), hazelnut (>8.7 g of roasted hazelnut Eq to 1.3 g of protein), fish (>50 g Eq to 12.5 g of protein) or shrimp (>39 g Eq to 7.5 g of protein). Ongoing oral immunotherapy (OIT) was not considered as an exclusion criterion, as 31% of patients were receiving OIT at time of inclusion.

### *Specific IgE measurements*

Specific IgE measurements were performed with both ImmunoCAP Phadia 250 (Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Uppsala, Sweden) and NOVEOS (Hycor, Garden Grove, CA, USA) systems, in full compliance with NF EN ISO 15189 standards (certification #8-1769). Following the initial determination by the ImmunoCAP method, samples were kept frozen at -40degC before testing with NOVEOS. For statistical analyses, sIgE values outside of the analyzers' ranges of measurement (ImmunoCAP: 0.10 - 100kU<sub>A</sub>/L; NOVEOS: 0.17 - 100 kU<sub>A</sub>/L) were adjusted to 0.10 or 0.17 kU<sub>A</sub>/L respectively for results below these values, or to 100 kU<sub>A</sub>/L for results >100 kU<sub>A</sub>/L. Some samples were tested after addition of a CCD-blocker reagent (ProGlyCan MUXF3-human serum albumin, Hamosan, Ilz, Austria) at a final concentration of 20 µg/mL.

### *Results analysis and statistics*

Analytical correlations and general agreement between NOVEOS and ImmunoCAP were calculated by using the Spearman's formula, Cohen's kappa index, and percentage of agreement (proportion of both true positive and true negative results). Clinical performance of specific IgE values was determined through odd-ratios (OR; Baptista-Pike's confidence intervals) and relative risks (RR; C.I. according to Koopman's asymptotic score) of presenting with allergy, and also through calculation of receiver operator curves (ROC), kappa index, and percentages of agreement. For these analyses, individuals were categorized for each allergen and technique into four groups: "true positives" (confirmed allergy and sIgE above the cut-off value for the relevant allergen), "true negatives" (confirmed tolerance and sIgE below the cut-off value for the relevant allergen), "false negative" (confirmed allergy and sIgE below the cut-off value for the relevant allergen), and "false positive" (confirmed tolerance and sIgE above the cut-off value). All statistical calculations were performed by using PRISM 9 (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Significance was set at  $p > 0.05$ . Optimal cut-off of sIgE values were calculated using Youden's index (21).

## **Results**

### **Patients characteristics**

The study population (183/289 were males; 63%) displayed a median age of 7 years, and 246/289 (85%) were aged 15 years or younger (Table 1). In all patients, the food allergy diagnosis was established on the basis of open OFC and/or anamnesis. The percentage of confirmation for suspected food allergy in the cohort ranged from 34% (egg white) to 52% (cow's milk). Confirmed allergy to multiple foods ( $n > 2$ ) was reported in 48/289 (17%) patients.

### **Comparison of analytical performance of ImmunoCAP and NOVEOS**

Prior to analysing the clinical performance of the two methods, we compared ImmunoCAP and NOVEOS sIgE results at the analytical level. A total of 570 comparisons were made encompassing 6 different allergen extracts and 4 associated MA: egg white/ovomuroid (nGal d 1), cow's milk/casein (nBos d 8), peanut/rAra h 2, hazelnut/rCor a 14, fish and shrimp (Figure 1). The correlation between the two methods was evaluated using the Spearman's test which showed very high rho coefficients for both allergen extracts ( $r = 0.92$ ) and MA ( $r = 0.96$ ) (Figure 1A, B). Using a Bland-Altman approach to test agreement between the two methods (Figure 1C, D), we observed a significant divergence ( $p < 0.0001$ ) between absolute differences only for values between 10 and 100 kU<sub>A</sub>/L, but not between residuals (difference/average). When considering values between 0.1 and 100 kU<sub>A</sub>/L, NOVEOS sIgE results were lower than ImmunoCAP results, by a mean of -15%, from -13% (extracts,  $p < 0.0001$ ) to -17% (MA,  $p = 0.0006$ ).

Then, we found a very good level of agreement ( $\kappa$  index 0.84; agreement 0.92) between the two methods (Figure S1). Highest or lowest levels of concordance were found for egg white extract ( $\kappa$  1.0, agreement 1.00), and for shrimp ( $\kappa$  0.74) and hazelnut extracts (agreement 0.81), respectively. Next and to gain further insight in the analysis of discordances, sIgE values were subdivided according to the sIgE reactivity classes from class 0 ([?]0.35 kU<sub>A</sub>/L) to classes 5-6 (>50 kU<sub>A</sub>/L) (Figure 2A). The percentage of agreement within classes was 72% ( $n = 410/570$  sIgE results), while 23% (133/570) results differed by one class. Only 4.7%

(27 results) differed by 3 to 4 IgE reactivity classes and corresponded to 25 patients (two patients were discordant for both extract and MA).

### Comparison of ImmunoCAP and NOVEOS clinical performance

We performed ROC analysis to compare clinical performance of ImmunoCAP and NOVEOS. We also selected sIgE optimal thresholds allowing optimal discrimination between food allergic and non-allergic individuals. As presented in Table 2 and Figure S2, areas under ROC curves (AUC) were comprised from 0.79 for hazelnut extract (ImmunoCAP f17) to 0.97 for ovomucoid nGal d 1 (NOVEOS F233). However, the mean value of AUC was higher for NOVEOS than for ImmunoCAP ( $p=0.03$ ). Next, and for setting the optimal threshold for the 10 food allergens, Youden's index that combines optimal sensitivity and specificity was calculated and the optimal cut-off values for sIgE reported in Table 2. Cut-off values for ImmunoCAP and NOVEOS were similar (mean:  $6.7 \pm 3.8$  kU<sub>A</sub>/L for ImmunoCAP and  $4.6 \pm 2.1$  kU<sub>A</sub>/L for NOVEOS) and the difference was not significant. The most divergent cut-off values were between hazelnut extract (ImmunoCAP cut-off 16.7 kU<sub>A</sub>/L versus NOVEOS cut-off 3.6 kU<sub>A</sub>/L) and cow's milk (ImmunoCAP cut-off 6.9 kU<sub>A</sub>/L versus NOVEOS cut-off 3.3 kU<sub>A</sub>/L). Sensitivity, specificity, positive (PPV) or negative (NPV) predictive values were also comparable without significant difference (mean sensitivity and specificity: 81% and 84% for ImmunoCAP and 84% and 86% for NOVEOS). The highest PPV was 95% except for egg white extract (ImmunoCAP and NOVEOS: highest PPV=90%) (Table 2). Next, sIgE cut-offs established for the 10 food allergens were further used to discriminate allergic from non-allergic individuals by calculating OR, RR, Cohen's kappa coefficients, and percentages of agreement between each method and patients' status. As presented in Figure 3, a strong association between sIgE results and clinical status was reported for the 10 allergens. The overall values of RR (4.1 for ImmunoCAP versus 4.6 for NOVEOS), OR, kappa and agreement were higher for NOVEOS than for ImmunoCAP when data from all 10 allergens were pooled, as well as when only allergen extracts were considered (Table S1). However, these differences were not significant. For the four MA, OR and RR were higher for ImmunoCAP than for NOVEOS, while agreement and kappa indexes were identical with both techniques (Table S1). In addition, both techniques were associated with better OR, RR, agreement and kappa indexes for MA than for allergen extracts (Table S1). Considering individual allergens (Table S2), cow's milk sIgE results (extract and casein nBos d8) were associated with the highest RR (8.2), OR (>100), percentages of agreement (90-92%) and kappa indexes (0.80-0.83). The lowest values were obtained with ImmunoCAP peanut extract (RR: 2.7; kappa: 0.49; agreement: 75%) and hazelnut extract (RR: 2.6 for NOVEOS).

Cohen's Kappa index showed a "good" (0.61-0.80) or "very good" (0.81-1) degree of association for 6 out of 10 allergens tested for ImmunoCAP as compared to 8/10 for NOVEOS (Table S2,  $p=0.035$ , Wilcoxon test). In addition, percentages of agreement were above 80% for 9 out of 10 allergens tested with NOVEOS while this was true for 7 out of 10 allergens tested with ImmunoCAP (Table S2). Overall, comparing kappa indexes and agreement for 10 allergens (*i.e.* 20 comparisons), values were more frequently higher for NOVEOS (11/20) than for ImmunoCAP (2/20).

Finally, thirty-one non-allergic patients present with a class "1" or class "2" sIgE results (0.35 to 3.5 kU<sub>A</sub>/L) with ImmunoCAP, but have a class "0" ( $[?]0.35$  kU<sub>A</sub>/L) NOVEOS result ( $p<0.0001$ , Figure 2B), while there is no significant difference between the two methods for allergic patients with low sIgE results (Figure 2C).

### Origin of discordances between ImmunoCAP and NOVEOS

The 27 most divergent sIgE results from Figure 2A are shown in detail in Figure S3. As most discordant results concerned plant allergens (18/27), we investigated two possible causes. The first potential explanation is the spiking of ImmunoCAP but not NOVEOS hazelnut extract with Cor a 1, a member of the PR-10 MA family (22). Thus, we assayed the 53 hazelnut-sensitized samples for anti-Cor a 1 sIgE using the Cor a 1 NOVEOS reagent F428. Sera with high concentrations of anti-Cor a 1 sIgE ( $>10$  kU<sub>A</sub>/L; range 11 to  $>100$  kU<sub>A</sub>/L,  $n = 12$ ) were excluded from new ROC curves calculation. The new AUC were 0.81 for ImmunoCAP and 0.84 for NOVEOS (data not shown), compared to previous values of 0.79 for ImmunoCAP and 0.82 for NOVEOS before removal of the anti-Cor a 1 sIgE-positive samples. Cut-off values were unchanged (16.7 for

ImmunoCAP versus 3.6 for NOVEOS).

The second potential cause for discordant results resides in CCD displayed by plant allergens. We hypothesized that peanut or hazelnut positive results obtained using ImmunoCAP but not NOVEOS were related to IgE reactivity against CCD. We were able to test 11 samples (out of 25) for CCD IgE reactivity by using ImmunoCAP o214 reagent and found that 8/11 samples possessed anti-MUXF3 IgE. We then used a reagent blocking CCD antibody reactivity (MUXF3-HSA, ProGlyCan reagent from Hamosan) for the three samples which were the most discordant for peanut (1 patient) and hazelnut extracts (2 patients). CCD-blocker reagent abolished ImmunoCAP reactivity against peanut and hazelnut extracts for these three samples, while testing these same samples with NOVEOS revealed no reactivity to peanut or hazelnut extracts, without adding the CCD-blocker (Table 3). In order to confirm these results in a different setting, we selected MUXF3-positive samples from 8 adult patients with *Hymenoptera* venom sensitization but without a history of food allergy. All these samples showed sIgE reactivity against ImmunoCAP hazelnut extract, but no or very low reactivity against NOVEOS hazelnut extract. The ImmunoCAP reactivity was abolished or strongly reduced after addition of the CCD-blocker reagent (Table 3).

## Discussion

We report here the compared performance of two sIgE platforms and their clinical cut-offs for 10 common food allergens. Clinical cut-offs for sIgE have been previously proposed multiple times, in particular for food allergens, as indicators of the probability of presenting with allergic symptoms, rather than thresholds accurately predicting the occurrence of symptoms (14, 23, 24). Thus, the quantitative nature of sIgE measurements is essential for allergy diagnosis, and physicians must be aware of the characteristics of the employed methods. Indeed, several routine methods of sIgE quantitation co-exist, because they belong to successive generations and to different times of availability for clinical use. First generation tests were radioimmunoassays which used an anti-IgE reagent labelled with a radio-isotope, usually  $^{125}\text{I}$ : the RAST (*RadioAllergo Sorbent Test*, Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden) was commercialized in 1974 (25). The main second-generation test is based on the ImmunoCAP technology (originally from Pharmacia AB, now ThermoFisher Scientific), where allergens are covalently attached to a nitrocellulose sponge (4). Third generation sIgE tests are represented by the IMMULITE 2000 system (Siemens Healthcare SAS, Saint-Denis, France), which uses biotinylated soluble allergens bound to a large diameter (25mm) avidin-coated unique bead, and a chemiluminescent signal is used for detection (26). Recently (2020), fourth-generation technologies for sIgE determination were made available (NOVEOS, Hycor, Garden Grove, CA, USA and IDS-iSYS, Bolton, UK), differing from third generation tests through the use of biotin-labelled allergens bound to avidin micro-beads and chemiluminescent detection (16, 27).

We found that NOVEOS sIgE results were significantly lower than those obtained with ImmunoCAP, by a mean value of 15%. This discrepancy is not due to a defect in the linearity of NOVEOS technology (28) which is similar to that of ImmunoCAP (27). The differences we observed between the two methods could be due to an underestimation by NOVEOS, to an overestimation by ImmunoCAP, or both. Significant discrepancies had been reported previously between ImmunoCAP and Immulite, a third-generation technology developed by SIEMENS (29). It is notable that our data show very few differences for low values (0.1 to 1  $\text{kU}_A/\text{L}$ ). These levels of sIgE are important for early detection of sensitization against food allergens in children (30, 31). By contrast, if the two methods produce significantly different results for high sIgE concentrations, these discrepancies are of lesser clinical significance, especially if they are greater than the clinically relevant cut-offs.

For clinical performance, NOVEOS is better able to exclude allergy in sensitized individuals having low sIgE values (0.35-3.5  $\text{kU}_A/\text{L}$ ) and we also found some false positive results in non-allergic patients tested with ImmunoCAP for peanut and hazelnut extracts. Despite these discrepancies, we report that NOVEOS and ImmunoCAP have mostly similar performance for discriminating between food allergic and food tolerant individuals. It is impossible to determine clinically relevant universal thresholds of sIgE concentrations due to important variations from one population to another one. For example, the cut-off for rAra h 2 sIgE concentration in peanut allergy varies from 0.10 to 42.2  $\text{kU}_A/\text{L}$  between studies (15). However, the

establishment of “local” clinical cut-offs is of utmost importance for the management of a given population of patients including the design of OFC protocols. In support of this assertion, a 2002 study conducted in our center found a clinical threshold for ImmunoCAP peanut extract sIgE (cut-off of 15kU<sub>A</sub>/L with 95% specificity and 44% sensitivity) which was similar to the values we report here (cut-off of 14kU<sub>A</sub>/L, 86% specificity and 51% sensitivity) (24). Thus, cut-off values can be established for a given population on the condition of using similar protocols and seem to be stable for extended periods (20 years in this example). Our study further supports that sIgE measurements by both ImmunoCAP and NOVEOS, are highly informative on the risk of allergy in the patients we studied based on OR values >10 and RR>2.

We investigated two potential causes of discrepancies in clinical performance between NOVEOS and ImmunoCAP with hazelnut and peanut extracts, namely Cor a 1 spiking of ImmunoCAP hazelnut extract and the presence of CCD. While Cor a 1 spiking of ImmunoCAP hazelnut extract did not contribute to clinical performance discrepancies, CCD did. Thus, our study supports the view that glycosylated epitopes are more accessible to sIgE with ImmunoCAP than with NOVEOS. This could be due to the avidin-coated beads and the biotinylation of NOVEOS allergens. Another possibility is that anti-CCD sIgE react both with CCD determinants on allergen molecules and also with the nitrocellulose sponge matrix on ImmunoCAP (32, 33). Unlike the animal-derived galactose- $\alpha$ -1,3-galactose epitope, plant CCD (*e.g.* MUXF3), are currently considered devoid of clinical relevance in allergy (34). This could explain our findings of better sIgE - confirmed plant food allergy correlation with NOVEOS than with ImmunoCAP. For recombinant MA which are non-glycosylated in both systems we found similar clinical performance as expected.

There are several limitations to our study. Firstly, this is a retrospective, monocentric study. Secondly, the population was mainly comprised of children (85%). In addition, and depending on the allergen, the percentage of patients under a strict avoidance diet varied from 12% (peanut) to 53% (seafood) and an OFC was not systematically performed for food allergy diagnosis, except for peanut. On the other hand, our study encompasses a large number of comparisons including both extracts and molecular food allergens. Moreover, the heterogeneity of the patients and of their therapeutic protocols mirrors our regular clinical practice.

In conclusion, we demonstrate here that, for 10 common food allergen extracts and molecules, assayed in a large pediatric cohort, sIgE determination performed with NOVEOS or with ImmunoCAP are highly correlated with and predictive of the actual diagnosis of food allergy or tolerance. Despite a ten-fold lower test sample volume requirement (4  $\mu$ L) compared to ImmunoCAP (40  $\mu$ L), NOVEOS has an overall better capacity to identify patients at risk of allergy versus asymptomatic sensitization ( $p=0.03$  when AUC are compared). Further confirmatory studies are warranted including more allergens (*i.e.* other food allergens, respiratory, venom, drugs) and both adult and pediatric patients from other geographical areas.

### Acknowledgments

We thank Roland Carbonnel, Xavier Jentet, Didier Laurent and Nathalie Barbier from Hycor France for their technical help. We thank the *Allergy tests working group* of the French Allergology Society for their advices.

### References

1. Anotegui IJ, Melioli G, Canonica GW, Caraballo L, Villa E, Ebisawa M, et al. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ J.* 2020;13(2):100080.
2. Hamilton RG, Hemmer W, Nopp A, Kleine-Tebbe J. Advances in IgE Testing for Diagnosis of Allergic Disease. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020;8(8):2495-504.
3. Omenaas E, Bakke P, Elsayed S, Hanoa R, Gulsvik A. Total and specific serum IgE levels in adults: relationship to sex, age and environmental factors. *Clin Exp Allergy.* 1994;24(6):530-9.
4. Ewan PW, Coote D. Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the ImmunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies. *Allergy.* 1990;45(1):22-9.

5. van Hage M, Hamsten C, Valenta R. ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(4):974-7.
6. Valenta R, Karaulov A, Niederberger V, Zhernov Y, Elisyutina O, Campana R, et al. Allergen Extracts for In Vivo Diagnosis and Treatment of Allergy: Is There a Future? *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(6):1845-55 e2.
7. Wollmann E, Lupinek C, Kundi M, Selb R, Niederberger V, Valenta R. Reduction in allergen-specific IgE binding as measured by microarray: A possible surrogate marker for effects of specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(3):806-9 e7.
8. Sereme Y, Casanovas N, Michel M, Martin-Blondel A, Mankouri F, Pinchemel S, et al. IgG removal significantly enhances detection of microarray allergen-specific IgE reactivity in patients' serum. *Allergy.* 2021;76(1):395-8.
9. Holzweber F, Svehla E, Fellner W, Dalik T, Stubler S, Hemmer W, et al. Inhibition of IgE binding to cross-reactive carbohydrate determinants enhances diagnostic selectivity. *Allergy.* 2013;68(10):1269-77.
10. J. K-T, L.K. P, R.G. H. Quality management in IgE-based allergy diagnostics. *Journal of Laboratory Medicine.* 2016;40(2):81-96.
11. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27 Suppl 23:1-250.
12. Caubet JC, Nowak-Węgrzyn A, Moshier E, Godbold J, Wang J, Sampson HA. Utility of casein-specific IgE levels in predicting reactivity to baked milk. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(1):222-4 e1-4.
13. Masthoff LJ, Mattsson L, Zuidmeer-Jongejan L, Lidholm J, Andersson K, Akkerdaas JH, et al. Sensitization to Cor a 9 and Cor a 14 is highly specific for a hazelnut allergy with objective symptoms in Dutch children and adults. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(2):393-9.
14. Beyer K, Grabenhenrich L, Hartl M, Beder A, Kalb B, Ziegert M, et al. Predictive values of component-specific IgE for the outcome of peanut and hazelnut food challenges in children. *Allergy.* 2015;70(1):90-8.
15. Krogulska A, Wood RA. Peanut allergy diagnosis: Moving from basic to more elegant testing. *Pediatr Allergy Immunol.* 2020;31(4):346-57.
16. Potapova E, Bauersachs D, Vilella V, Meneguzzi G, Scala E, Sfika I, et al. Validation study of a new chemiluminescent singleplex IgE assay in a set of Italian allergic rhinitis patients. *Clin Exp Allergy.* 2021;51(4):604-13.
17. Potapova E, Panetta V, Grabenhenrich L, Icke K, Grubl A, Muller C, et al. A singleplex IgE test to a mixture of molecules from multiple airborne allergen sources: Innovating in vitro screening of respiratory allergies. *Pediatr Allergy Immunol.* 2022;33(11):e13867.
18. 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.* 2014;69(8):1008-25.
19. Kowalski ML, Ansotegui I, Aberer W, Al-Ahmad M, Akdis M, Ballmer-Weber BK, et al. Risk and safety requirements for diagnostic and therapeutic procedures in allergology: World Allergy Organization Statement. *World Allergy Organ J.* 2016;9(1):33.
20. Bird JA, Leonard S, Groetch M, Assa'ad A, Cianferoni A, Clark A, et al. Conducting an Oral Food Challenge: An Update to the 2009 Adverse Reactions to Foods Committee Work Group Report. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020;8(1):75-90 e17.
21. Schisterman EF, Perkins NJ, Liu A, Bondell H. Optimal cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples. *Epidemiology.* 2005;16(1):73-81.

22. Sicherer SH, Dhillon G, Laughery KA, Hamilton RG, Wood RA. Caution: the Phadia hazelnut ImmunoCAP (f17) has been supplemented with recombinant Cor a 1 and now detects Bet v 1-specific IgE, which leads to elevated values for persons with birch pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(2):413-4, 4 e2.
23. Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(5):891-6.
24. Rance F, Abbal M, Lauwers-Cances V. Improved screening for peanut allergy by the combined use of skin prick tests and specific IgE assays. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(6):1027-33.
25. Wide L. Clinical significance of measurement of reaginic (IgE) antibody by RAST. *Clin Allergy.* 1973;3 Suppl:583-95.
26. Li TM, Chuang T, Tse S, Hovanec-Burns D, El Shami AS. Development and validation of a third generation allergen-specific IgE assay on the continuous random access IMMULITE 2000 analyzer. *Ann Clin Lab Sci.* 2004;34(1):67-74.
27. Klingebiel C, Philippe R, Mathieu P, Vitte J, Apoil P. Automated immunoassay instruments for the detection and determination of specific immunoglobulin E. *Revue Française d'Allergologie.* 2022;62(7):613-8.
28. Bauersachs D, Potapova E, Renz H, Benes SH, Matricardi PM, Skevaki C. Validation of the analytical performance of the NOVEOS System, a system which improves upon the third-generation in vitro allergy testing technology. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(11):1865-74.
29. Wang J, Godbold JH, Sampson HA. Correlation of serum allergy (IgE) tests performed by different assay systems. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(5):1219-24.
30. Nilsson SF, Lilja G, Jarnbert-Pettersson H, Alm J. Relevance of low specific IgE levels to egg, milk and peanut in infancy. *Clin Exp Allergy.* 2019;49(3):308-16.
31. Balsells-Vives S, San Bartolome C, Casas-Saucedo R, Ruano-Zaragoza M, Rius J, Torradeflot M, et al. Low Levels Matter: Clinical Relevance of Low Pru p 3 sIgE in Patients With Peach Allergy. *Front Allergy.* 2022;3:868267.
32. Hemmer W, Altmann F, Holzweber F, Gruber C, Wantke F, Wohrl S. ImmunoCAP cellulose displays cross-reactive carbohydrate determinant (CCD) epitopes and can cause false-positive test results in patients with high anti-CCD IgE antibody levels. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(1):372-81 e3.
33. Sinson E, Ocampo C, Liao C, Nguyen S, Dinh L, Rodems K, et al. Cross-reactive carbohydrate determinant interference in cellulose-based IgE allergy tests utilizing recombinant allergen components. *PLoS One.* 2020;15(4):e0231344.
34. Swoboda I, Breiteneder H. Glycotopes as players in the allergic immune response. *Allergy.* 2023;78(1):14-6.



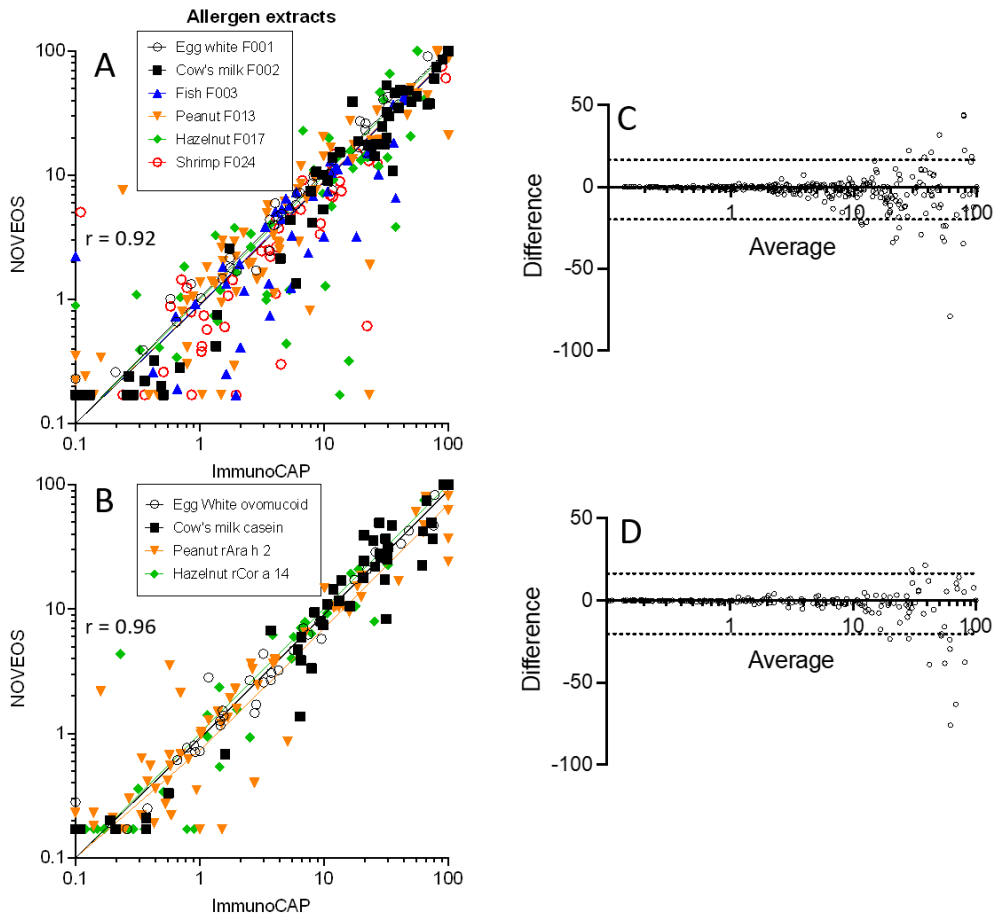


Fig. 1

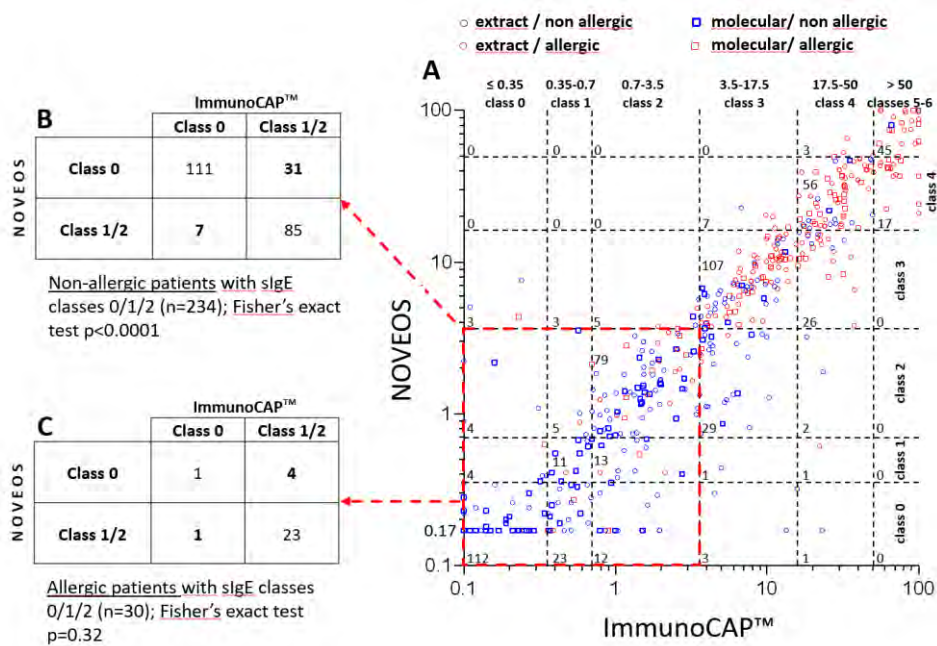


Fig. 2

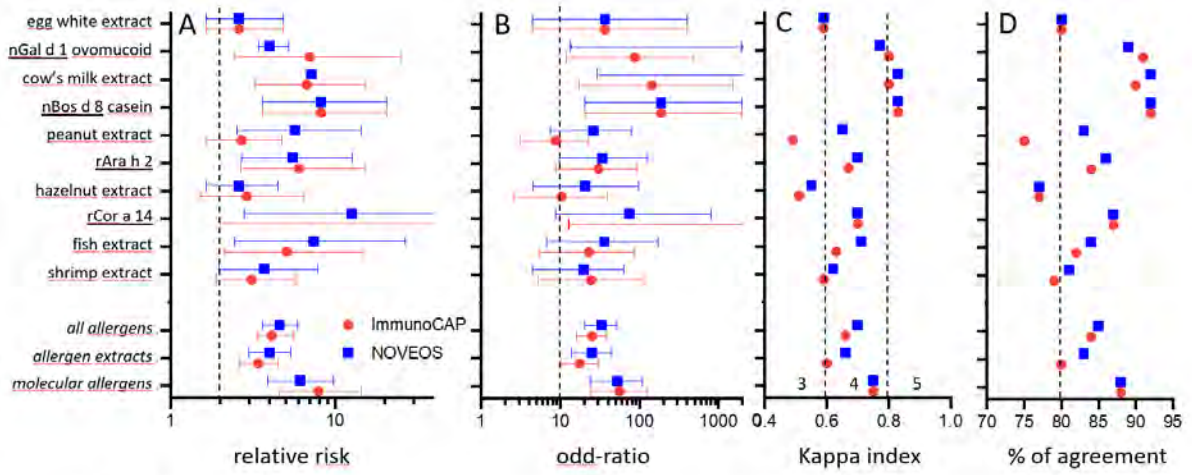


Fig. 3

**FIGURE 1** Correlation between ImmunoCAP™ and NOVEOS results.

A, C: allergen extracts (337 data points); B, D: molecular allergens (233 data points);  $r$  is Spearman's rho; C, D: Bland-Altman plots showing sIgE concentration from NOVEOS are on average 13% (extracts) to 17% (MA) below ImmunoCAP sIgE values, for results above 0.17 kUA/L.

**FIGURE 2** Global clinical performance of ImmunoCAP™ and NOVEOS.

A, Results from both methods were grouped into IgE reactivity classes and the number of data points is indicated for all combinations of NOVEOS and ImmunoCAP™ results; red: allergic patients; blue: non-allergic patients; circles: extracts, squares: MA. B, C, contingency tables and Fisher's exact tests for non-allergic (B) or allergic (C) patients with low sIgE results (classes 0, 1 or 2).

**FIGURE 3** Relative risk (A), odd-ratio (B), kappa index (C) and percentage of agreement (D) of clinical allergy assessed from sIgE levels.

Individuals were categorized according to their allergic status and to the sIgE cut-off for each allergen. Contingency tables were analyzed (Fisher's exact test) to evaluate odd-ratio (A, Baptista-Pike) and relative risk (B, Koopman) of presenting with clinical allergy depending on specific IgE levels. The degree of agreement between sIgE results and clinical status is shown in C (Cohen's kappa index) and D (% of agreement: true positives + true negative / total number of tests). ImmunoCAP™: red circles; NOVEOS: blue squares; molecular allergens are underlined; dashed lines show accepted thresholds for clinical pertinence: RR>2, OR>10, kappa index rankings for the degree of agreement with clinical status: 3 (moderate), 4 (good), 5 (very good), and % of agreement > 80%.

Allergen	Number of patients	Median age (IQR)	Sex ratio	Patients with OFC	Strict avoidance <sup>(1)</sup>	Allergic <sup>(2)</sup>
Peanut	76	8 (6-11)	1.6	76 / 76	12%	43%
Cow's milk	60	7 (2-19)	2.0	31 / 60	28%	52%
Egg white	44	3 (2 - 6)	2.6	30/ 44	18%	34%
Hazelnut	53	6 (4-10)	2.3	20 / 53	39%	36%
Fish	51	9 (4-13)	1.7	24 / 51	53%	43%
Shrimp	53	10 (6-15)	1.0	17 / 53	53%	45%
<i>All patients</i>	<i>289</i>	<i>7 (4-12)</i>	<i>1.7</i>			

**TABLE 1** Demographics and clinical status of patients.

A total of 289 patients were studied; 48/289 individuals (17%) presented with 2 or more food allergies and were tested for the corresponding allergens. <sup>(1)</sup>: percentage of patients following a strict avoidance diet. <sup>(2)</sup>: allergic status was assessed either through simple-blind OFC, or through anamnesis for patients who were not explored by OFC.

Allergen, code <sup>(1)</sup>	Type <sup>(2)</sup>	Method <sup>(3)</sup>	AUC	Cut-Off	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	≥ 95% PPV
Peanut, f13	E	I	0.81	5.5	73%	77%	70%	79%	37.8
Peanut, F013	E	N	0.85	7.6	73%	91%	85%	81%	19.8
Peanut rAra h 2, f423	M	I	0.87	2.3	76%	91%	86%	83%	6.1
Peanut rAra h 2, F423	M	N	0.89	1.8	82%	88%	84%	87%	3.7
Egg white, f1	E	I	0.89	6.0	93%	72%	63%	95%	25.8 <sup>(4)</sup>
Egg white, F001	E	N	0.90	6.5	93%	72%	63%	95%	26.7 <sup>(4)</sup>
Egg white nGal d 1, f233	M	I	0.95	5.0	87%	93%	87%	93%	10.2
Egg white nGal d 1, F233	M	N	0.97	2.9	100%	83%	75%	100%	7.4
Cow's milk, f2	E	I	0.94	6.9	97%	83%	86%	96%	49.2
Cow's milk, F002	E	N	0.94	3.3	100%	83%	86%	100%	48.2
Milk casein nBos d 8, f78	M	I	0.95	6.4	97%	86%	88%	96%	48.2
Milk casein nBos d 8, F078	M	N	0.94	4.3	97%	86%	88%	96%	48.2
Hazelnut, f17	E	I	0.79	16.7	65%	86%	72%	80%	52.8
Hazelnut, F017	E	N	0.82	3.6	90%	70%	64%	92%	56.3
Hazelnut rCor a 14, f439	M	I	0.87	5.6	65%	100%	100%	83%	5.6
Hazelnut rCor a 14, F439	M	N	0.87	4.2	70%	97%	93%	85%	6.2
Fish, f3	E	I	0.87	7.7	72%	90%	84%	81%	37.0
Fish, F003	E	N	0.88	6.5	73%	93%	89%	82%	28.0
Shrimp, f24	E	I	0.85	3.6	92%	69%	71%	91%	40.0
Shrimp, F024	E	N	0.86	3.5	83%	79%	77%	85%	16.0

**TABLE 2** Summary of ImmunoCAP™ and NOVEOS clinical performance.

Cut-off values (kUA/L) correspond to optimal correlations between sIgE dosages and clinical status (highest Youden index). PPV, NPV: positive / negative predictive values. sIgE concentrations associated with PPV above 95% are in kUA/L. Phadia f17 is supplemented with rCor a 1 (PR-10). (1) Allergen source and identification; (2) E: allergen extract, M: molecular; (3) I: ImmunoCAP™ (ThermoFisher), N: NOVEOS (Hycor); (4) maximum PPV = 90%.

Sample #	Age (y)	Sex	MUXF3*	Allergen extract	ImmunoCAP™		NOVEOS
					CCD-blocker		
					without	with	without
1	8	M	2.98	peanut	23.10	< 0.1	< 0.1
2	13	F	8.43	hazelnut	13.4	0.13	0.17
3	9	M	1.81	hazelnut	3.27	0.22	0.22
4	67	M	1.15	hazelnut	0.46	< 0.1	< 0.1
5	71	M	2.19	hazelnut	0.60	< 0.1	< 0.1
6	70	F	1.63	hazelnut	3.96	< 0.1	< 0.1
7	46	M	15.7	hazelnut	4.87	0.80	< 0.1
8	78	M	8.30	hazelnut	20.0	< 0.1	0.80
9	34	M	3.50	hazelnut	1.95	< 0.1	< 0.1
10	32	M	9.29	hazelnut	14.6	0.14	0.15
11	26	M	44.0	hazelnut	7.04	0.17	< 0.1

**TABLE 3** MUXF3-positive samples show reactivity against peanut or hazelnut extracts with ImmunoCAP™ f13/f17 reagents, but not with NOVEOS F013/F017.

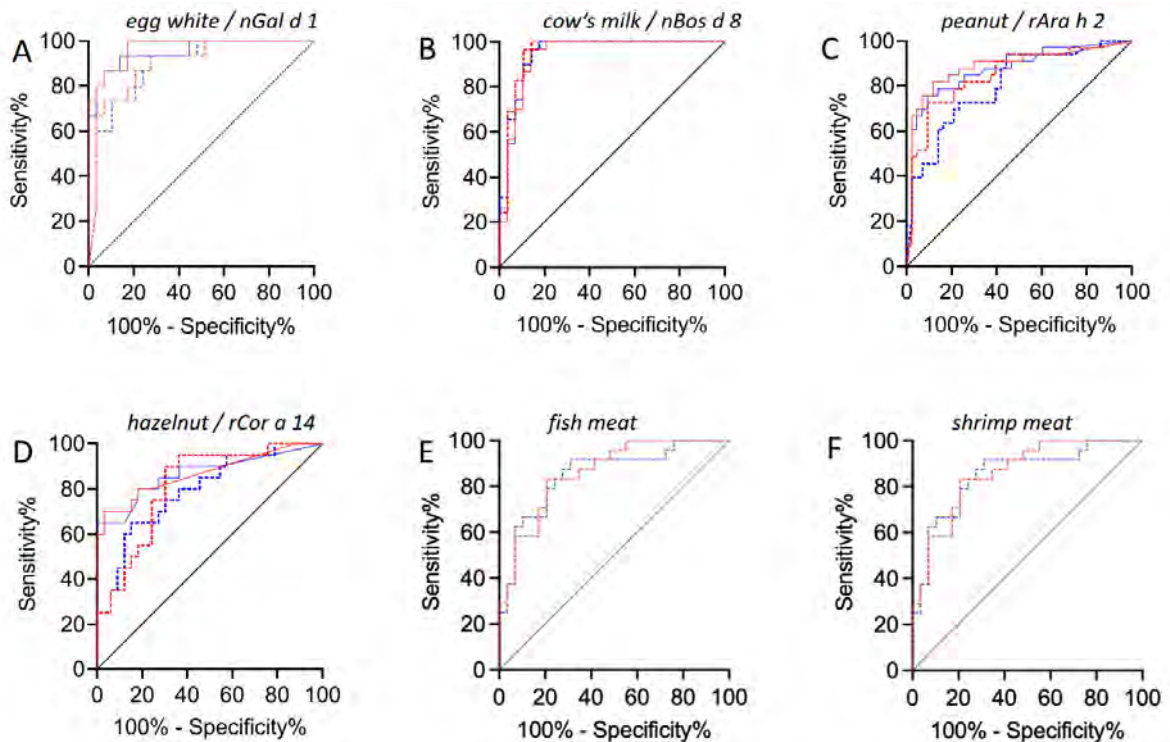
Samples #1 - 3 were from this study and were chosen for their discordance between ImmunoCAP™ and NOVEOS results for peanut or hazelnut extract (positive with ImmunoCAP™ versus negative /very low for NOVEOS). Patients #4-11 are not from the main study and were selected for their MUXF3-positivity during routine testing for sensitization against hymenoptera venom. CCD-blocker reagent (MUXF3-HSA) was added at a final concentration of 20 µg/mL. \*: MUXF3 sIgE were measured using ImmunoCAP™ o214. All values are in kU<sub>A</sub>/L

	<i>kappa index</i>		<i>% of agreement</i>	
	extracts	moleculars	extracts	moleculars
egg's white	1.00	0.77 ±0.1	1.00	0.89
cow's milk	0.97 ±0.03	0.86 ±0.07	0.98	0.93
peanut	0.84 ±0.06	0.81 ±0.07	0.92	0.91
hazelnut	0.83 ±0.10	0.90 ±0.07	0.81	0.96
fish	0.87 ±0.07		0.94	
shrimp	0.74 ±0.09		0.87	
all extracts	0.84 ±0.03		0.92	
all moleculars		0.84 ±0.04		0.92

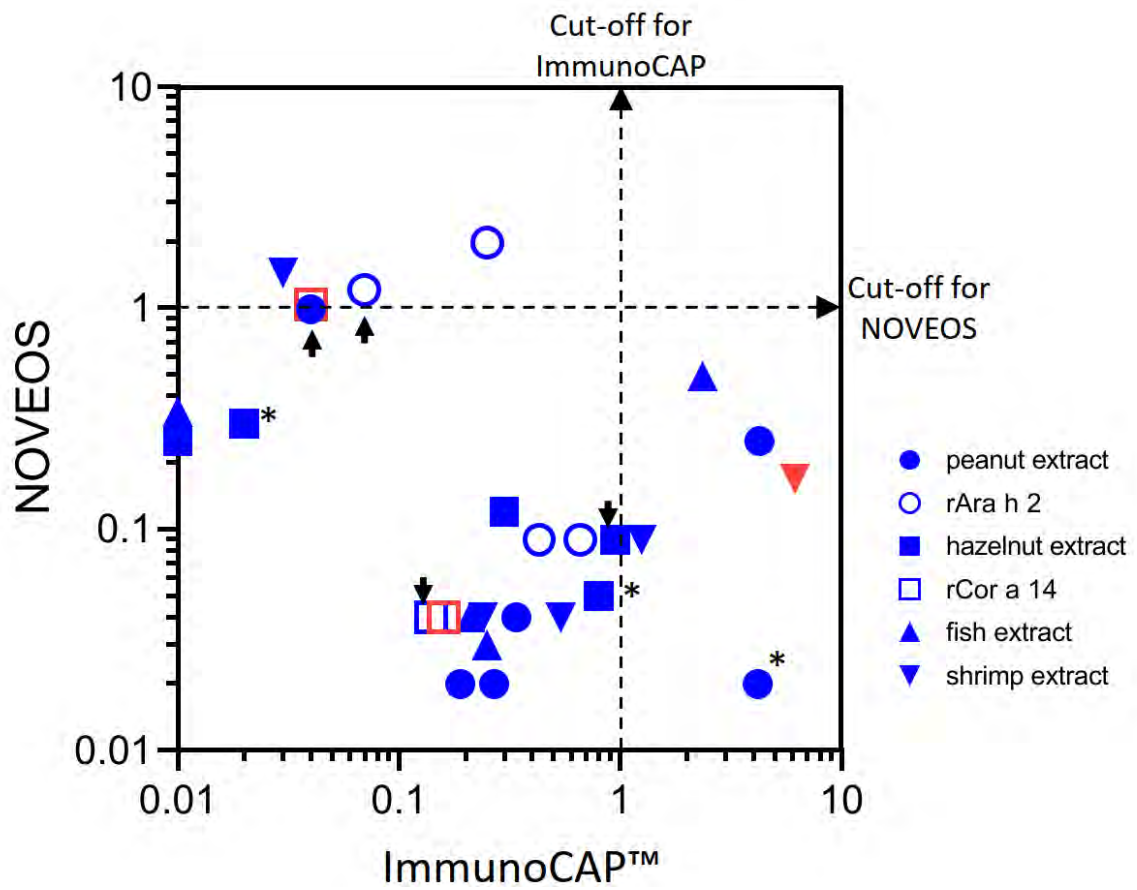
**Kappa**

very good	0.81-1.00
good	0.61-0.80
moderate	0.41-0.60
fair	0.21-0.40
poor	0.00-0.20

### Supplementary Figure 1



### Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



**FIGURE S1** Agreement between NOVEOS and ImmunoCAP™ results.

Cohen's kappa index and percentage of agreement were calculated for each tested allergen. Results were considered to be in agreement when sIgE results from the two methods were both below or above their respective cutoffs listed in Table 2.

**FIGURE S2** ROC curves for ImmunoCAP™ and NOVEOS.

blue: ImmunoCAP™ ROC curves; Red: NOVEOS ROC curves; A. egg white f1 (*dashed*), nGal d 1 ovomucoid (*solid*); B. cow's milk extract f2 (*dashed*), nBos d 8 casein f78 (*solid*); C. peanut extract f13 (*dashed*), rAra h 2 f423 (*solid*); D. hazelnut extract f17 (*dashed*), rCor a 14 f439 (*solid*); E. fish meat extract f3, F. shrimp extract f24. ROC curves' AUC are listed in Table 2.

**FIGURE S3** Analysis of large discordances between NOVEOS and ImmunoCAP™ results.

The ImmunoCAP™ and NOVEOS sIgE values which were discordant by at least 2 IgE reactivity classes are shown (n = 27 results out of 570 sIgE dosages). For a given allergen, the sIgE result is shown as the ratio of the sIgE concentration (in kU<sub>A</sub>/L) divided by the optimal cut-off for that allergen (as specified in Table 2), where a value of 1 corresponds to the cut-off value. Patients are categorized as "allergic" (red symbols) or "non-allergic" (blue symbols). Arrows designate extracts and MA results from the same two patients. Asterisks designated the three patients tested with a CCD-inhibitor (patients #1, 2 and 3 in Table 3).

Discordant sIgE results were for peanut extract (n = 6), rAra h 2 (n=4), hazelnut extract (n=5), rCor a sIg14 (n=3), fish (n=4) and shrimp extracts (n=5). Using the cut-off values established above, nine patients were miss-categorized as "allergic", four by NOVEOS and five by ImmunoCAP™. Two allergic patients were correctly categorized by one method but not by the other: one patient allergic to shrimp was above the ImmunoCAP™ cut-off for this allergen, but below the NOVEOS cut-off, and one patient allergic to hazelnut was above the NOVEOS cut-off (for both hazelnut extract and rCor a 14) but below the ImmunoCAP™ cut-off. Finally, one patient allergic to hazelnut was miss-classified (below clinical cut-offs) by both methods and both hazelnut allergens (rCor a 14 and extract).

Method	Allergens	O.R. (95% CI)	R.R. (95% CI)	% of agreement	k index
ImmunoCAP	all	25.1 (15.9 - 38.8)	4.1 (3.4 - 5.6)	84%	0.66
Noveos	all	33.0 (20.5 - 52.1)	4.6 (3.6- 5.9)	85%	0.70
ImmunoCAP	extracts	17.4 (10.1 - 30.1)	3.4 (2.6 - 4.5)	80%	0.60
Noveos	extracts	25.1 (13.7 - 44.8)	4.0 (3.0 - 5.4)	83%	0.66
ImmunoCAP	moleculars	55.8 (24.2 - 127)	7.9 (4.6 - 14.4)	88%	0.75
Noveos	moleculars	52.5 (23.7 - 108)	6.1 (3.9 - 9.8)	88%	0.75

**TABLE S1** Odd ratios and relative risks of clinical allergy assessed from sIgE concentrations.

Contingency tables were established by regrouping results according to clinical status and allergen cut-offs. OR (Baptista-Pike), RR (Koopman) and kappa index (Cohen) were calculated, separately for ImmunoCAP™ and NOVEOS methods, and for allergens extracts (f1, f2, f3, f13, f17, f24), molecular allergens (f233, f78, f423, f439) or for all allergens. Percentage of agreement between sIgE dosages and clinical status was calculated as follows: (true positives + true negatives)/total number of patients.

f1 ImmunoCAP	Non allergic	Allergic	% agreement	$\kappa$ index	F001 NOVEOS	Non allergic	Allergic	% agreement
< 6 KU <sub>A</sub> /L	21	1	80%	0.59	< 6.5 KU <sub>A</sub> /L	21	1	80%
> 6 KU <sub>A</sub> /L	8	14			> 6.5 KU <sub>A</sub> /L	8	14	
<i>p</i> <0.0001	OR=36.7	RR=2.6			<i>p</i> <0.0001	OR=36.7	RR=2.6	
f233 ImmunoCAP	Non allergic	Allergic	% agreement	$\kappa$ index	F233 NOVEOS	Non allergic	Allergic	% agreement
< 5 KU <sub>A</sub> /L	27	2	91%	0.80	< 2.9 KU <sub>A</sub> /L	24	0	89%
> 5 KU <sub>A</sub> /L	2	13			> 2.9 KU <sub>A</sub> /L	5	15	
<i>p</i> <0.0001	OR=87.7	RR=7			<i>p</i> <0.0001	OR=NC	RR=4.0	
f2 ImmunoCAP	Non allergic	Allergic	% agreement	$\kappa$ index	F002 NOVEOS	Non allergic	Allergic	% agreement
< 6.9 KU <sub>A</sub> /L	24	1	90%	0.80	< 3.3 KU <sub>A</sub> /L	24	0	92%
> 6.9 KU <sub>A</sub> /L	5	30			> 3.3KU <sub>A</sub> /L	5	31	
<i>p</i> <0.0001	OR=144.0	RR=6.7			<i>p</i> <0.0001	OR=NC	RR=7.2	
f78 ImmunoCAP	Non allergic	Allergic	% agreement	$\kappa$ index	F078 NOVEOS	Non allergic	Allergic	% agreement
< 6.4 KU <sub>A</sub> /L	25	1	92%	0.83	< 4.3 KU <sub>A</sub> /L	25	1	92%
> 6.4 KU <sub>A</sub> /L	4	30			> 4.3 KU <sub>A</sub> /L	4	30	
<i>p</i> <0.0001	OR=187.5	RR=8.2			<i>p</i> <0.0001	OR=187.5	RR=8.2	
f13 ImmunoCAP	Non allergic	Allergic	% agreement	$\kappa$ index	F013 NOVEOS	Non allergic	Allergic	% agreement
< 5.5 KU <sub>A</sub> /L	33	9	75%	0.49	< 7.6 KU <sub>A</sub> /L	39	9	83%
> 5.5 KU <sub>A</sub> /L	10	24			> 7.6 KU <sub>A</sub> /L	4	24	
<i>p</i> <0.0001	OR=8.8	RR=2.7			<i>p</i> <0.0001	OR=26.0	RR=5.7	
f423 ImmunoCAP	Non allergic	Allergic	% agreement	$\kappa$ index	F423 NOVEOS	Non allergic	Allergic	% agreement
< 2.3 KU <sub>A</sub> /L	39	8	84%	0.67	< 1.8 KU <sub>A</sub> /L	38	6	86%
> 2.3 KU <sub>A</sub> /L	4	25			> 1.8 KU <sub>A</sub> /L	5	27	
<i>p</i> <0.0001	OR=30.5	RR=6.0			<i>p</i> <0.0001	OR=34.2	RR=5.5	
F17 ImmunoCAP	Non allergic	Allergic	% agreement	$\kappa$ index	F017 NOVEOS	Non allergic	Allergic	% agreement
< 16.7 KU <sub>A</sub> /L	28	7	77%	0.51	< 3.6 KU <sub>A</sub> /L	23	2	77%
> 16.7 KU <sub>A</sub> /L	5	13			> 3.6 KU <sub>A</sub> /L	10	18	
<i>p</i> =0.0001	OR=10.4	RR=2.9			<i>p</i> <0.0001	OR=20.7	RR=2.6	
f439 ImmunoCAP	Non allergic	Allergic	% agreement	$\kappa$ index	F439 NOVEOS	Non allergic	Allergic	% agreement
< 5.6 KU <sub>A</sub> /L	33	7	87%	0.70	< 4.2 KU <sub>A</sub> /L	32	6	87%
> 5.6 KU <sub>A</sub> /L	0	13			> 4.2 KU <sub>A</sub> /L	1	14	
<i>p</i> <0.0001	OR=NC	RR=NC			<i>p</i> <0.0001	OR=74.7	RR=12.6	
f3 ImmunoCAP	Non allergic	Allergic	% agreement	$\kappa$ index	F003 NOVEOS	Non allergic	Allergic	% agreement
< 7.7 KU <sub>A</sub> /L	26	6	82%	0.63	< 6.5 KU <sub>A</sub> /L	27	6	84%
> 7.7 KU <sub>A</sub> /L	3	16			> 6.5 KU <sub>A</sub> /L	2	16	
<i>p</i> <0.0001	OR=23.1	RR=5.1			<i>p</i> <0.0001	OR=36.0	RR=7.4	
f24 ImmunoCAP	Non allergic	Allergic	% agreement	$\kappa$ index	F024 NOVEOS	Non allergic	Allergic	% agreement
< 3.6 KU <sub>A</sub> /L	20	2	79%	0.59	< 3.5 KU <sub>A</sub> /L	23	4	81%
> 3.6 KU <sub>A</sub> /L	9	22			> 3.5 KU <sub>A</sub> /L	6	20	
<i>p</i> <0.0001	OR=24.4	RR=3.1			<i>p</i> <0.0001	OR=19.7	RR=3.7	

**TABLE S2** Contingency tables and analysis (Fisher's exact test) to evaluate odd-ratio (Baptista-Pike) and relative risk (Koopman) of presenting with clinical allergy depending on specific IgE levels.

For each allergen, optimal cut-off values from Table 1 are indicated on the left and the number of patients above or below that value is shown for the two categories of allergic or non-allergic patients. OR=odd-ratio; RR=relative risk; NC=not calculable. *p* values are from Fisher's exact test.

---

**ABSTRACT**

We compared in 289 patients the specific IgE assays of 10 allergens carried out on 2 analyzers: NOVEOS (Hycor) and PHADIA250 (Thermofisher). The allergens studied are: peanut (f13 extract and rAra h 2 f423), cow's milk (f2 extract and f78 casein), hazelnut (f17 extract and rCor a 1 f439), egg white (extract f1 and f233 ovomucoid), fish (f3 extract) and shrimp (f24 extract). Our results demonstrate an analytical concordance between the two analyzers ( $\rho > 0.9$ ) with slightly lower values for NOVEOS (-15%). The optimal thresholds of specific IgE values have been calculated and are correlated with allergy (NOVEOS: relative risk 4.3, odds-ratio 33.0, agreement 85%; ImmunoCAP: relative risk 4.1, odds-ratio 25.1, agreement 84%). NOVEOS is less affected by cross-reactivity due to carbohydrate determinants, while requiring a sample volume ten times lower than PHADIA.

---

## **Analyse comparative et performance clinique de deux méthodes de dosage des IgE spécifiques : ImmunoCAP™ (Thermofisher) et NOVEOS (Hycor)**

---

**Présentée et soutenue publiquement par :** Benjamin TROUCHE--ESTIVAL

### **RESUMÉ**

Nous avons comparé chez 289 patients les dosages d'IgE spécifiques de 10 allergènes réalisés sur 2 automates : NOVEOS (Hycor) et PHADIA250 (Thermofisher). Les allergènes étudiés sont : l'arachide (extrait f13 et rAra h 2 f423), le lait de vache (extrait f2 et la caséine f78), la noisette (extrait f17 et rCor a 1 f439), le blanc d'œuf (extrait f1 et ovomucoïde f233), le poisson (extrait f3) et la crevette (extrait f24). Nos résultats démontrent une concordance analytique entre les deux automates ( $\rho > 0.9$ ) avec des valeurs légèrement plus basses pour NOVEOS (-15%). Les seuils optimaux de valeurs d'IgE spécifiques ont été calculés et sont corrélés à l'allergie (NOVEOS : risque relatif 4,3, odd-ratio 33,0, concordance 85% ; ImmunoCAP™ : risque relatif 4,1, odd-ratio 25,1, concordance 84%). NOVEOS est peu affecté par la réactivité croisée due aux déterminants glucidiques, tout en nécessitant un volume d'échantillon dix fois inférieur au PHADIA.

---

**TITRE ET RÉSUMÉ EN ANGLAIS :** voir au recto de la dernière page de la thèse

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :** Biologie Médicale

---

**MOTS-CLES :** allergie alimentaire, IgE spécifiques, extrait d'allergène, allergène moléculaire, déterminant glucidique, réaction croisée, performance clinique

---

### **INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :**

Laboratoire d'Immunologie  
CHU de Toulouse - Institut Fédératif de Biologie  
330 Avenue de Grande Bretagne  
31300 Toulouse

**DIRECTEUR DE THÈSE :** Pol André APOIL, Docteur