HAL
open science

Physiopathologie et explorations des toxidermies immunoallergiques

Annick 05/05/1959 Barbaud

To cite this version:

Annick 05/05/1959 Barbaud. Physiopathologie et explorations des toxidermies immunoallergiques. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1998. Français. NNT : 1998NAN11003 . tel-01748361

HAL Id: tel-01748361

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748361

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I FACULTE DE MEDECINE DE NANCY

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I
Ecole Doctorale : BIOLOGIE ET SANTE
Spécialité : Biologie structurale, moléculaire et cellulaire

SCD-UHP - NANCY 1 BIBLIOTHÈQUE MÉDECINE

PHYSIOPATHOLOGIE ET EXPLORATIONS DES TOXIDERMIES IMMUNOALLERGIQUES

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement
le 30 Mars 1998
pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY I

par

Annick BARBAUD
Docteur en Médecine
Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
Microbiologie, Enzymologie et Nutrition

née le 5 Mai 1959
à Drancy

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs	E. GROSSHANS (Strasbourg)	Professeur
	J.F. NICOLAS (Lyon)	Directeur de Recherche INSERM
Directeur de thèse	M-C. BENE (Nancy)	Professeur
Membres	G.C. FAURE (Nancy)	Professeur
	J-L. SCHMUTZ (Nancy)	Professeur

D 007 137914 3

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

PUBLICATIONS SE RAPPORTANT A CE TRAVAIL

Travaux publiés dans la littérature internationale

Barbaud A. Place of excipients in drug related allergy. Clin Rev Allergol Immunol 1995, 13 : 253-63.

Barbaud A, Béné MC, Schmutz JL, Ehlinger A, Weber M, Faure GC. Role of delayed cellular hypersensitivity and adhesion molecules in amoxicillin-induced morbilliform rashes. Arch Dermatol 1997, 133 : 481-6.

Barbaud A, Béné MC, Faure G. Immunopathological physiopathology of cutaneous adverse drug reactions. Eur J Dermatol 1997, 7 : 319-23.

Kohler C, Kolopp-Sarda MN, De March-Kennel A, Barbaud A, Béné MC, Faure GC. Sequential assessment of cell cycle S phase in flow cytometry : a non-isotopic method to measure lymphocyte activation *in vitro*. Analytical Cell Pathol 1997, 14 : 51-9.

Travaux publiés en Français dans des revues avec comité de lecture.

Barbaud A, Tréchot P, Gillet-Terver MN, Zannad F, Schmutz JL. Investigations allergologiques dans une toxidermie au diltiazem (Tildiem 300 LP^{R}). Thérapie 1993, 48 : 498-9.

Barbaud A, Schmutz JL, Mougeolle JM. - Réactions immuno-allergiques cutanées dues aux vaccins. Ann Dermatol Vénéréol 1995, 122 : 129-38.

Barbaud A, Got I, Tréchot P, Noirez V, Schmutz JL. Allergies cutanées et insulinothérapie. Aspects récents, conduite à tenir. Ann Dermatol Vénéréol 1996, 123 : 214-8.

Travaux acceptés pour publication internationale

Barbaud A, Béné MC, Reichert-Penetrat S, Jacquin-Petit MA, Schmutz JL, Faure GC. Immunocompetent cells and adhesion molecules in 14 cases of cutaneous drug reactions induced by antibiotics. Arch Dermatol.

Barbaud A, Reichert-Penetrat S, Tréchot P, Jacquin-Petit MA, Ehlinger A, Noirez V, Faure GC, Schmutz JL, Béné MC. The use of skin testing in investigation of cutaneous adverse drug reactions. Br J Dermatol

INTRODUCTION

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Les toxidermies sont des complications cutanéo-muqueuses secondaires à l'administration par voie entérale, intravasculaire ou intramusculaire de médicaments. Elles représentent les effets secondaires médicamenteux néfastes les plus fréquents, mais les mécanismes impliqués dans leur survenue sont nombreux et complexes. Des réponses diverses du système immunitaire vis à vis des médicaments potentiellement antigéniques semblent impliquées et étroitement intriquées dans de nombreux cas pour lesquels une physiopathologie claire est difficile à discerner. C'est à la définition et à l'explication de ces toxidermies "immuno-allergiques" qu'est consacré ce travail.

La prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients ayant présenté une toxidermie est également mal codifiée. Pour améliorer cette prise en charge thérapeutique et les techniques des tests diagnostiques *in vivo* et *in vitro,* une meilleure connaissance du mécanisme physiopathologique, en particulier immunologique, de ces effets secondaires médicamenteux apparaît indispensable (de Weck 1991, Breathnach 1995, Barbaud 1997).

Partant de l'hypothèse que différents mécanismes immunologiques sont en cause dans les toxidermies, nous avons estimé que l'immunophénotypage *in situ* de biopsies de patients présentant une toxidermie et/ou des tests cutanés médicamenteux positifs pouvait constituer une bonne approche de l'exploration des processus physiopathologiques à l'origine de ces effets secondaires médicamenteux. Ce type d'exploration apparaît comme un complément *ex vivo* utile aux tests biologiques *in vitro* proposés, dont la pertinence et l'interprétation restent sujets de controverses.

Ces investigations, reposant sur une très rigoureuse **méthodologie clinique** (Barbaud Arch Dermatol 1997) de définition des patients ayant développé une toxidermie, peuvent aussi améliorer la détermination de l'imputabilité de chaque médicament administré au patient et la méthodologie des tests cutanés et des tests *in vitro*, six à dix semaines après la survenue de la dermatose. Seules d'aussi strictes conditions de prise en charge des patients, telles qu'elles l'ont été dans ce travail, permettent une interprétation correcte des résultats immunologiques obtenus sur biopsies cutanées de toxidermies ou de tests médicamenteux cutanés positifs et/ou des résultats d'études faites sur les cellules circulantes.

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Trois grands axes d'études ont ainsi été développés dans ce travail :

* Appréciation de la valeur des **tests cutanés** en fonction de la sémiologie de la toxidermie et du médicament responsable

* Exploration des **cellules et molécules immunocompétentes** potentiellement impliquées ***in situ***.

* Evaluation des **réponses obtenues *in vitro*** à partir des cellules circulantes.

Ce travail rassemble les résultats de recherches cliniques obtenus dans ces trois axes diagnostiques, après une série de rappels de l'état des connaissances concernant la sémiologie et les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les toxidermies.
La discussion de ces résultats comporte la proposition d'un protocole d'explorations permettant de préciser le type d'hypersensibilité impliqué dans les toxidermies et présente une série d'autres études envisagées à court terme dans la poursuite de ce travail.

ETAT DE LA QUESTION

CARACTERISTIQUES CLINICO-HISTOLOGIQUES DES TOXIDERMIES

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Les sémiologies des toxidermies immuno-allergiques sont extrêmement diverses : urticaire, prurit, purpura par vascularite leucocytoclasique, érythème polymorphe, syndrome de Lyell, pustulose exanthématique généralisée, exanthème maculo-papuleux, éruption lichénoïde, érythème pigmenté fixe, photodermatose, Syndrome Babouin ... Chaque aspect clinique semble avoir ses propres mécanismes immuno-allergiques (de Weck 1991, Breathnach 1995, Barbaud 1997 Eur J Dermatol).

Après avoir rappelé les principales caractéristiques des toxidermies immuno-allergiques et les principaux mécanismes des réactions immunologiques cutanées, nous ferons la synthèse des connaissances actuelles portant sur la physiopathologie des toxidermies.

CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES TOXIDERMIES

(Breathnach 1992, Wolkenstein 1997).

Les aspects cliniques et histologiques des toxidermies sont très variés. Nous ne nous intéresserons ici qu'aux toxidermies de mécanisme immuno-allergique et n'aborderons pas les toxidermies toxiques, idiosyncrasiques, génétiques, ni les réactions de Jarisch-Herxheimer de la classification de Breathnach et Hintner (1992). Les caractéristiques des toxidermies immuno-allergiques seront rappelées succintement.

Prurit

Le prurit médicamenteux ne présente aucune caractéristique particulière. Il se traduit par des lésions de grattage non spécifiques parfois associées à une hyperéosinophilie sanguine.

L'histologie n'a aucune particularité qui permettrait d'orienter le diagnostic vers une étiologie médicamenteuse.

Urticaire et Oedème de Quincke

L'urticaire est composée de papules de tailles variables (quelques millimètres à plusieurs centimètres) très prurigineuses, érythémateuses, oedémateuses, à contours bien limités. Chaque lésion élémentaire est mobile et fugace. L'urticaire profonde (appelée auparavant angio-oedème) est un oedème dermo-hypodermique, de couleur normale sans prurit mais avec sensation de tension cutanée. Si elle atteint les muqueuses oro-pharyngées, l'urticaire profonde est appelée oedème de Quincke. Elle peut alors conduire à des troubles de déglutition et surtout à une dyspnée laryngée asphyxiante. L'urticaire peut être un signe d'accident anaphylactique et s'intégrer dans un tableau plus complet et grave, mettant en jeu à court terme le pronostic vital : le choc anaphylactique. Le choc anaphylactique associe une urticaire, des troubles digestifs et rapidement un collapsus cardio-vasculaire par vasodilatation massive sous l'effet d'une importante histaminolibération.

Histologie : Il existe un oedème dermique et un minime infiltrat périvasculaire comportant des cellules T et des polynucléaires éosinophiles.

Exanthème maculo-papuleux (EMP)

Ils apparaissent quelques jours ou quelques heures après la prise médicamenteuse responsable. Brutalement l'exanthème se développe sur tout le revêtement cutané avec une prédominance sur le tronc et les membres. Les lésions fixes, qui sont parfois prurigineuses ou associées à une sensation de " cuisson " cutanée, peuvent prendre des aspects variables d'un patient à l'autre. Les lésions élémentaires sont maculo-papuleuses d'un diamètre de quelques millimètres, assez mal limitées, érythémateuses ou rouge violacé, parfois purpuriques. Certaines lésions sont punctiformes, chez d'autres patients les éléments ont un diamètre de 1 à 2 centimètres voire confluent en placards érythémato-squameux. Il serait probablement intéressant de classer ces exanthèmes maculo-papuleux qui ont des aspects cliniques variés et qui peut-être ont aussi des mécanismes immuno-allergiques sous-jacents différents. Certains

exanthèmes sont composés de lésions maculeuses punctiformes assez comparables aux lésions observées dans les exanthèmes liés aux infections virales comme par exemple le " rash " de la mononucléose infectieuse. Lorsque la cause des EMP est supprimée, ils disparaissent en quelques jours avec une fine desquamation.

Histologie :
L'épiderme est normal ou siège d'une discrète exocytose lymphocytaire avec quelques altérations monocellulaires des kératinocytes de l'assise basale. Dans le derme, les infiltrats périvasculaires sont principalement composés de cellules T parfois associées à des polynucléaires éosinophiles.

Erythème pigmenté fixe

C'est la seule dermatose dont l'origine est toujours induite par une intolérance médicamenteuse, qu'il s'agisse d'une sensibilisation au principe actif ou à un des excipients du médicament. Il est caractérisé par la survenue, quelques heures après la prise du médicament responsable, d'une dermatose, le plus souvent symétrique, prédominant aux extrémités, constituée de lésions ovalaires, bien limitées, érythémateuses parfois violacées, papuleuses, pouvant être bulleuses en leur centre, qui guérissent en laissant une pigmentation persistante séquellaire. Les lésions peuvent être indolores, prurigineuses ou donner une sensation de brûlure cutanée. En cas de reprise du médicament responsable, les lésions réapparaissent sur les mêmes sites cutanés, associées éventuellement à de nouvelles localisations.

Histologie : Il existe un infiltrat cellulaire périvasculaire, une exocytose (Civatte 1982) lymphocytaire T et une vacuolisation des cellules de l'assise basale épidermique pouvant aboutir à une nécrose et une apoptose kératinocytaire. L'infiltrat cellulaire périvasculaire prédomine dans le derme papillaire et est composé principalement de cellules T.

Erythème polymorphe, syndrome de Stevens-Johnson et syndrome de Lyell

Dans l'érythème polymorphe et le syndrome de Stevens-Johnson, après une phase prodromique pseudo-grippale, des lésions maculo-papuleuses ou pseudo-urticariennes apparaissent sur l'ensemble du revêtement cutané, associées à des lésions en cocarde. L'atteinte muqueuse, constante dans le syndrome de Stevens-Johnson, associe un érythème et des érosions douloureuses. Une atteinte conjonctivale peut être observée. Une altération de l'état général, une fièvre, des arthralgies et une atteinte pulmonaire peuvent aussi survenir. Un signe de Nikolsky peut être positif. Dans le syndrome de Stevens-Johnson, les décollements épidermiques, s'ils existent, demeurent limités à moins de 10% de la surface corporelle.
Le syndrome de Lyell est la forme la plus sévère des toxidermies bulleuses épidermolytiques. Après une phase de quelques heures d'exanthème maculo-papuleux avec altération de l'état général et sensation de " cuisson " cutanée, un décollement bulleux, en lambeaux épidermiques survient, pouvant aboutir à une épidermolyse quasi-généralisée, donnant au patient l'aspect d'un "ébouillanté ". Les muqueuses buccale, génitale voire conjonctivale, oesophagiennes et trachéobronchique sont atteintes avec érythème et érosions profuses douloureuses. La fièvre est constante, aggravant les déperditions hydro-électrolytiques. Malgré les mesures de réanimation qui ont amélioré le pronostic, le décès peut survenir encore dans 30% des cas environ par pneumopathie, coagulation intravasculaire disséminée mais le plus souvent par surinfection. La guérison est lente en environ 4 semaines, plus lente encore sur les muqueuses, avec des séquelles non exceptionnelles comme une alopécie, une hyperpigmentation ou des taies cornéennes.

Histologie : L'aspect est celui d'une nécrose kératinocytaire avec clivage épidermique voire destruction totale de l'épiderme.

Pustulose aiguë exanthématique généralisée (Roujeau 1991)

Chez un patient, avec ou sans antécédent psoriasique, elle survient quelques heures après la prise du médicament responsable. Elle est caractérisée par la rapide extension d'un exanthème érythémateux scarlatiniforme vite recouvert d'un semis de petites pustules aseptiques de faible diamètre (moins de 5 mm), non folliculaires, parfois associées à un purpura, des pseudo-cocardes ou des bulles. Une fièvre, une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles et une augmentation de la vitesse de sédimentation y sont associées. Son évolution est rapidement favorable en moins de 2 semaines.

Histologie : Les pustules spongiformes sous-cornées ou intra-épidermiques, composées de polynucléaires neutrophiles, sont parfois associées à une nécrose focale kératinocytaire. Le derme papillaire est oedémateux, les infiltrats périvasculaires sont riches en polynucléaires neutrophiles parfois associés à des éosinophiles et/ou à une vascularite pouvant être leucocytoclasique.

Vasculites d'hypersensibilité médicamenteuse (Hannedouche 1986).

La peau est rarement le seul organe atteint dans ces pathologies. Les manifestations cutanées comportent un purpura aggravé par l'orthostatisme, infiltré, palpable, parfois nécrotique et/ou bulleux. Un purpura muqueux peut être observé. D'autres lésions cutanées peuvent y être associées : papules érythémateuses annulaires, nodules, placards urticariens.
Certaines éruptions pseudo-urticariennes, discrètement purpuriques, peuvent être dues à une vasculite d'hypersensibilité. Dans ce cas les lésions papuleuses, oedémateuses, sont plus fixes (durent plus de 24 heures), que dans la véritable urticaire.
Ces vasculites d'hypersensibilité associent fréquemment les signes cutanés à une fièvre, des arthralgies, une atteinte rénale (hématurie, protéinurie, insuffisance rénale) et plus rarement à une atteinte pulmonaire, digestive (douleurs abdominales, hémorragie digestive), une neuropathie ou une myocardite.

La vasculite peut être associée à un syndrome inflammatoire, une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles, une augmentation des complexes immuns circulants et une consommation du complément.

Histologie : Il existe une vascularite leucocytoclasique. Les vaisseaux ont une paroi épaissie (nécrose fibrinoïde) et sont entourés d'un infiltrat riche en polynucléaires neutrophiles à noyau pycnotique, comportant souvent des polynucléaires éosinophiles. L'extravasation d'hématies est fréquente et d'importance variable.

Syndrome d'hypersensibilité (Callot 1996).

C'est une toxidermie grave, caractérisée par la survenue brutale d'un exanthème maculo-papuleux généralisé et/ou d'une érythrodermie, pouvant s'accompagner d'un oedème du visage. L'éruption peut être parsemée de pustules. Cet exanthème, souvent associé à un énanthème, est accompagné d'une fièvre élevée, d'une altération de l'état général, d'une polyadénopathie et d'une hépatosplénomégalie.
Une hyperleucocytose avec hyperlymphocytose et hyperéosinophilie est retrouvée très souvent associée à une cytolyse hépatique. L'évolution est lentement favorable en plusieurs semaines, conditionnée par l'atteinte hépatique qui dans certains cas est létale.

Histologie : L'infiltrat dermique lymphocytaire est très dense pouvant prendre un aspect pseudo-lymphomateux.

Réactions eczémateuses, érythrodermies

Des placards eczémateux peuvent être observés au point d'injection de certains médicaments (insuline, vaccins, héparines), qu'ils soient liés au désinfectant utilisé avant l'injection, au matériel d'injection, au produit actif ou à un des excipients de la préparation médicamenteuse injectée.

Des éruptions généralisées eczémateuses, erythémato-squameuses peuvent être observées dans des cas d'intolérance médicamenteuse. Les éruptions les plus profuses peuvent aboutir à un état érythémateux et squameux de tout le revêtement cutané : l'érythrodermie (Sigurdsson 1996).

Histologie : la spongiose et l'exocytose lymphocytaire épidermiques sont associées à des infiltrats d'importance modérée, périvasculaires, principalement composés de lymphocytes.

Photoallergie médicamenteuse (Roujeau 1989)

Il s'agit d'une éruption eczémateuse siégeant sur les régions cutanées photoexposées (visage, cou avec respect du V sous mentonnier, sillon rétro-auriculaire, avant-bras, dos des mains, jambes), n'atteignant pas les régions cutanées protégées par les vêtements. Si la prise médicamenteuse est poursuivie, le test Saidman, c'est à dire la détermination de la dose érythémale minimale (DEM) sur le dos du patient, est diminué.

Histologie : Il existe une spongiose et une exocytose lymphocytaire dans l'épiderme.

Syndrome Babouin

Décrit en 1987 par Andersen *et coll.* avec l'amoxicilline, il s'agit d'une dermatose érythémateuse, siégeant sur les fesses et le pelvis, parfois associée à une atteinte flexurale (creux poplités, plis des coudes, sillons sous-mammaires) survenant lors de l'administration d'un médicament chez un sujet ayant présenté antérieurement un eczéma de contact en manipulant ce même médicament. Le syndrome Babouin peut être déclenché également par des substances non médicamenteuses comme le nickel et le mercure.
On peut en rapprocher des toxidermies flexurales (Wolf 1993) sans atteinte des fesses.

Histologie : L'épiderme peut être le siège d'une spongiose et d'une exocytose lymphocytaire. L'infiltrat dermique est périvasculaire, riche en lymphocytes. Il peut s'y associer une vascularite leucocytoclasique.

LE SYSTEME IMMUNITAIRE CUTANE

La peau est un organe doté d'un système immunitaire original, parfois appelé SALT (Skin Associated Lymphoid Tissue), présentant des analogies, mais aussi des différences avec le tissu lymphoïde associé aux muqueuses, et clairement différencié du système immunitaire systémique profond (Bos 1997).

DIFFÉRENTES CELLULES IMMUNOCOMPÉTENTES ENTRENT EN JEU DANS LE SALT.

Les kératinocytes

Riches en kératine qui leur confère leur rôle de barrière mécanique, ils ont en outre des fonctions extrêmement importantes de cellules immunocompétentes susceptibles de sécréter de nombreuses cytokines (Ansel 1990). Activés, ils expriment à leur surface l'Intercellular Adhesion molecule 1 (ICAM 1) et les antigènes d'histocompatibilité de classe II (Singer 1989). L'expression de ces molécules de surface est modulée par des cytokines dont les principales sont l'interféron gamma (IFN γ) (Barker 1989, Caugham 1990) et le Tumor Necrosis Factor-bêta (TNF β) (Ansel 1990, Krutmann 1990).

Les cellules dendritiques présentatrices d'antigène et cellules de Langerhans (Thivolet 1988, Headington 1990, Meunier 1993, Meunier 1995, Grabbe 1996).

Elles sont d'origine médullaire et ont un rôle majeur dans la captation d'un antigène (ag) parvenu dans la peau, son transport sur le lieu de présentation antigénique aux lymphocytes T (peau et ganglion lymphatique de drainage) et l'activation des cellules T.

Les **cellules de Langerhans** contiennent la protéine S100, elles expriment à leur surface les antigènes HLA de classe II, CD1 et CD11a/CD18. Elles sont essentiellement localisées dans l'épiderme, entre les kératinocytes et forment un réseau sur toute la surface cutanée.

Les cellules dendritiques dermiques, d'individualisation plus récente dans la peau, représentent en fait une population polymorphe (Meunier 1993). Parmi elles, les cellules dendritiques pseudo-Langerhansiennes paraissent avoir un rôle majeur. Il s'agit de cellules CD1a+ et HLA DR+ qui expriment également CD1c, parfois d'autres molécules comme le facteur XIII, CD1b et CD32 mais qui sont CD36 négatives (Meunier 1993).
Ce type de cellules dendritiques dermiques pourrait avoir un rôle important dans la présentation antigénique aux lymphocytes T. Des cellules dendritiques dermiques CD1a+ et HLA DR+ ont été observées dans la dermatite atopique. Leur nombre est très diminué après traitement par ultraviolets (UV) A1 (Grabbe 1996). Les nombres de cellules CD1a+ CD1c+ HLA DR+ CD36- sont très diminués dans les modèles *in vitro* d'irradiation de suspensions cellulaires de cellules dermiques et épidermiques (Meunier 1995). Il n'est pas déterminé actuellement s'il s'agit de cellules de Langerhans en migration de l'épiderme vers les voies sanguines et lymphatiques ou de précurseurs des cellules de Langerhans migrant dans l'autre sens.

Les lymphocytes T

Les cellules T sont des cellules effectrices majeures dans les réactions d'hypersensibilité retardée à médiation cellulaire. Les lymphocytes T auxiliaires (exprimant CD4), ne reconnaissent que les antigènes présentés par une molécule HLA de classe II, par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique (TCR), lié à la molécule CD3. Activés, ils synthétisent de nombreuses cytokines. Les lymphocytes T exprimant CD8 sont supresseurs ou cytotoxiques. Ils reconnaissent, par leur TCR, les antigènes présentés dans un contexte HLA de classe I. L'activation des lymphocytes qui conduit à la synthèse de cytokines, induit leur prolifération et l'activation d'autres lymphocytes T, de lymphocytes B, de cellules de la lignée monocytaire, des kératinocytes, des cellules endothéliales et des granulocytes.

Activés, les lymphocytes T expriment à leur surface différentes formes du récepteur pour l'interleukine 2 dont la molécule CD25 et certaines molécules d'adhésion dont LFA 1 et la sélectine L (LECAM 1 - CD62L).

Les lymphocytes B

Ils sont caractérisés par la présence à leur surface d'immunoglobulines qui constituent leur système de reconnaissance de l'antigène ou BCR. Ils expriment de nombreuses molécules associées au BCR dont les antigènes pan-B, CD19 et CD21. Leur activation, qui dépend des cytokines produites par les lymphocytes T, conduit à leur prolifération générant des cellules mémoire et des cellules effectrices se différenciant en plasmocytes produisant des immunoglobulines.

Les granulocytes

Composés des polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, ils peuvent lorsqu'ils sont activés être cytotoxiques et intervenir dans les réactions retardées ou à complexes immuns circulants. Ils expriment en particulier CD44, LFA1, CD13 et CD15.

Les cellules endothéliales

Elles ont un rôle immunitaire important, en particulier elles sont impliquées dans les phénomènes de "homing" cellulaire, terminologie indiquant la capacité de cellules, en particulier lymphocytaires, de se diriger spécifiquement vers et dans l'organe où se situe la réaction immunitaire répondant à l'antigène vis-à-vis duquel ces cellules sont sensibilisées et donc capables de répondre spécifiquement. Les cellules endothéliales expriment le facteur VIII. Activées, elles expriment la Sélectine E (CD62E- ELAM 1), la sélectine P (CD62P-GMP 140), VCAM 1 (CD106) et ICAM 1(CD54), ligand de LFA 1 exprimé en particulier sur les cellules T activées. La sélectine E (ELAM 1) paraît avoir un rôle primordial dans le "homing" lymphocytaire car elle pourrait être le ligand du "cutaneous lymphocyte-antigen" ou "cutaneous leucocyte antigen" (CLA). CLA semble être une molécule de homing exprimée sélectivement par les lymphocytes T se dirigeant spécifiquement dans la peau (De Boer 1994, Santamaria Babi 1995, Gonzalez 1997).

Les mécanismes immunologiques d'hypersensibilité cellulaire retardée peuvent être schématisés comme suit :

L'antigène ou l'haptène, que constitue par exemple un médicament, peut être combiné aux protéines de surface kératinocytaires ou présenté par les cellules dendritiques présentatrices d'antigène (avec ou sans apprêtement) couplé aux molécules HLA de classe I ou II *in situ* et/ou dans le ganglion lymphatique de drainage. Cette présentation antigénique induit l'activation de cellules T, qui, par l'intermédiaire de leurs sécrétions lymphokiniques, vont entraîner l'inhibition et/ou l'activation, la prolifération de cellules inflammatoires et/ou immunocompétentes, avec en particulier une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à leur surface. L'activation des cellules endothéliales et l'expression à leur surface de molécules d'adhésion, favorisent dans un second temps le "homing" des cellules inflammatoires vers la peau. L'expression des molécules d'adhésion à la surface des kératinocytes peut également favoriser leur contact avec les lymphocytes T et la présentation des antigènes. Si la réponse T générée est de type cytotoxique, elle peut aboutir à la destruction des kératinocytes.

Par ailleurs, les cellules T CD4+ activées et/ou proliférant *in situ* peuvent accentuer les phénomènes inflammatoires tissulaires et leur expression clinique.

Il reste toutefois difficile de comprendre comment l'ingestion ou l'administration parentérale d'un médicament peut conduire au développement de réactions cutanées généralisées.

Autres mécanismes

L'activation des cellules T et des cellules B peut également conduire à d'autres mécanismes immunitaires comme la formation d'IgE ou de complexes immuns circulants.

Les **IgE spécifiques** de médicaments peuvent être synthétisées. Elles se fixent par l'intermédiaire de leur fragment Fc sur leurs récepteurs, présents à la surface des mastocytes et des polynucléaires basophiles. Lors de la réadministration de l'haptène médicamenteux, celui-ci se fixe sur les IgE, créant un pontage entre plusieurs IgE. Ce pontage des IgE entraîne une dégranulation des mastocytes et des basophiles, avec en particulier, une libération

d'histamine. Ce mécanisme est en cause dans les accidents anaphylactiques médicamenteux, les oedèmes de Quincke et certaines urticaires.

Le couplage d'une immunoglobuline spécifique à un haptène médicamenteux, peut conduire à la formation de **complexes immuns circulants** de taille intermédiaire, capables de précipiter dans les vaisseaux. Cette précipitation de complexes immuns circulants entraîne une activation du complément, une libération de médiateurs chimiotactiques pour les polynucléaires neutrophiles, un afflux de ces polynucléaires et une altération des parois endothéliales favorisant l'extravasation de cellules inflammatoires et de globules rouges. Ce mécanisme conduit à des lésions histologiques de vascularite leucocytoclasique.

DESCRIPTION ET MECANISMES DES TOXIDERMIES IMMUNO-ALLERGIQUES

Les toxidermies relèvent de différents mécanismes physiopathologiques : réaction de Jarisch-Herxheimer (exanthème de la mononucléose infectieuse sous ampicilline), idiosyncrasie et toxicité (alopécie des chimiothérapies), toxicité cumulative (pigmentation aux sels d'or), toxicité retardée (carcinomes cutanés à l'arsenic), effets facultatifs (candidose sous antibiotiques) et immuno-allergiques (de Weck 1991, Breathnach 1995 - part 1). C'est à ce dernier type de toxidermie, qui est le plus fréquent, que nous nous intéressons dans cette étude. Ce chapitre fait la synthèse de l'état actuel des connaissances des mécanismes des toxidermies immuno-allergiques. Il a fait l'objet d'une publication dans l'*European Journal of Dermatology* (Barbaud 1997).

Les médicaments peuvent induire des toxidermies dont les **aspects cliniques** sont très divers ce qui est peut être lié au type de réactions immuno-allergiques mises en jeu. Ainsi les toxidermies urticariennes sont dues, pour un certain nombre d'entre elles à une **hypersensibilité immédiate médiée par les Immunoglobulines E** (IgE).

D'autres toxidermies relèvent d'un mécanisme d'**hypersensibilité cellulaire retardée**. Ce mécanisme serait en cause dans la survenue des exanthèmes maculo-papuleux (EMP), érythèmes pigmentés fixes (EPF), toxidermies lichénoïdes ou eczématiformes, érythèmes polymorphes, syndromes de Stevens-Johnson, syndromes de Lyell ou des toxidermies bulleuses. Selon Tone *et coll.* (1992), des caractéristiques histologiques communes sont retrouvées dans les toxidermies sous-tendues par un mécanisme d'hypersensibilité cellulaire retardée. L'infiltrat dermique est composé majoritairement de lymphocytes T. Certains de ces lymphocytes sont en relation étroite avec la jonction dermo-épidermique (JDE) et les kératinocytes de l'assise basale de l'épiderme. Ceci peut conduire à la liquéfaction, la vacuolisation et la dyskératose des kératinocytes. On peut observer la présence caractéristique d'une nécrose cellulaire satellite (" satellite cell necrosis "), c'est à dire la présence de kératinocytes nécrotiques en contact étroit avec des lymphocytes T. Dans les formes sévères de toxidermie, comme l'érythème polymorphe, le syndrome de Stevens-Johnson ou l'EPF, la dyskératose kératinocytaire peut aboutir au clivage épidermique au sein de l'assise basale des kératinocytes, ou induire une complète nécrose toxique de tout l'épiderme.

CARACTERISTIQUES IMMUNOLOGIQUES GENERALES DES TOXIDERMIES

Relation entre les facteurs immuno-allergiques et non immunologiques impliqués dans la physiopathologie des toxidermies.

Dans le déclenchement des toxidermies, les mécanismes immunitaires peuvent être accompagnés de facteurs non immunologiques (de Weck 1991, Chosidow 1994, Bircher 1995). En particulier les facteurs susceptibles d'augmenter l'intensité des réponses immunitaires spécifiques du médicament, peuvent aussi jouer un rôle majeur dans le déclenchement des accidents cutanés médicamenteux immuno-allergiques.

Les capacités de **métabolisme** médicamenteux, **génétiquement programmées**, peuvent ainsi favoriser le développement d'une toxidermie (Koponen 1986, de Weck 1991, Chosidow 1994, Bircher 1995, Mauri-Helweg 1995, Hertl 1995) en entraînant une accumulation de métabolites toxiques et/ou immuno-réactifs (par exemple formation d'hydroxylamine dans les toxidermies bulleuses au sulfaméthoxazole, accumulation d'un métabolite arène-oxyde de la phénytoïne dans le syndrome d'hypersensibilité aux anti-convulsivants).

Les infections virales peuvent également amplifier les réactions immunitaires indésirables aux médicaments (Chosidow 1994) en entraînant des perturbations transitoires des systèmes enzymatiques, modifiant ainsi le métabolisme médicamenteux et favorisant l'accumulation de métabolites, réactifs immunologiquement. Ce type de mécanisme pourrait expliquer la grande fréquence des exanthèmes maculo-papuleux chez les patients infectés par le virus Epstein-Barr ou le développement de toxidermies dues aux sulfamides chez 45 à 60% des patients contaminés par le virus de l'immunodéficience acquise humaine (VIH) (Chosidow 1994).

Antigènes impliqués dans les toxidermies

La plupart des publications concernant les toxidermies rapportent des sensibilisations vis à vis de(s) la molécule(s) active(s) composant un médicament plutôt que des sensibilisations aux excipients entrant dans la formulation des médicaments.
Pourtant, même si ces causes sont plus rares (Barbaud 1995), les **excipients**, les conservateurs, les colorants ont été parfois prouvés responsables d'urticaire, de réaction anaphylactique voire d'autres formes cliniques de toxidermies. Ces excipients sont le plus souvent responsables d'accidents médicamenteux de type hypersensibilité immédiate médiée par les IgE, mais dans un petit nombre d'observations, d'autres mécanismes immunologiques ont été démontrés comme la formation de complexes immuns circulants (dextran-anticorps anti-dextran après vaccination par le BCG, Cremophor EL-anticorps anti-cremophor EL) ou l'activation du complément par le Cremophor EL. La saccharine a été mise en cause dans le déclenchement d'un exanthème maculo-papuleux, une photosensibilisation due à l'érythrosine a été publiée (*in* Barbaud 1995) et enfin une vasculite leucocytoclasique due aux colorants médicamenteux a été rapportée (Lowry 1995).

Malgré ces quelques cas pour lesquels la responsabilité des excipients a été évoquée, la plupart des toxidermies sont dues à (aux) la molécule(s) active(s) du médicament. Les **antigènes** en cause, et plus spécifiquement les **épitopes**, impliqués dans les réactions immunitaires médicamenteuses n'ont pas tous été identifiés. Les épitopes peuvent être situés sur la molécule native elle-même ou sur un de ses métabolites (de Weck 1991, Mauri-Helweg 1995). Une sensibilisation à des métabolites médicamenteux, et non à la molécule mère, a été récemment démontrée par Popescu *et coll.* (1996). Par des prick tests et des tests intradermiques (IDR), réalisés chez 5 patients ayant des antécédents de réactions allergiques au cyclophosphamide, ces auteurs ont montré que des résultats positifs immédiats à ces tests cutanés étaient obtenus en testant 2 métabolites du cyclophosphamide mais que les tests réalisés avec le cyclophosphamide lui-même demeuraient négatifs.

La plupart des études portant sur les toxidermies par sensibilisation au principe actif d'un médicament, concernent les déterminants antigéniques des antibiotiques appartenant à la

famille des **bêta-lactamines** (Voorhorst 1980, Adkinson 1990, de Weck 1991, Silviu-Dan 1993, Blanca 1994, Vega 1994, Romano 1995, Torres 1997). Ces antibiotiques sont tous métabolisés en benzylpenicilloyl (BPO). Le BPO est le déterminant majeur en cause dans les réactions allergiques induites par les bêta-lactamines, mais d'autres métabolites, appelés déterminants mineurs, peuvent aussi être responsables de sensibilisation. Les épitopes responsables des accidents allergiques aux bêta-lactamines sont multiples, avec de nombreuses variations comme l'ont montré les analyses des réactions positives immédiates aux prick tests et aux IDR réalisés avec les bêta-lactamines ou les tests *in vitro* recherchant les IgE spécifiques anti-bêta-lactamines.

La plupart des patients sont sensibilisés à la BPO, mais certains sujets ne reconnaissent que les déterminants mineurs, ou que les épitopes portés par les chaînes latérales A des pénicillines A (Voorhorst 1980, Adkinson 1990, Silviu-Dan 1993, Blanca 1994, Romano 1995, Hertl 1995, Torres 1997), ou à la fois la BPO et des déterminants mineurs par des tests réalisés *in vivo* (Silviu-Dan 1993) ou *in vitro* (Torres 1997). Parmi 21 patients sensibilisés aux bêta-lactamines et explorés par des prick tests, 8 avaient des réactions positives seulement avec les prick tests réalisés avec la BPO, 10 patients seulement aux prick tests réalisés avec les déterminants mineurs des chaînes latérales et 3 patients à la fois aux prick tests réalisés avec la BPO et avec les déterminants mineurs (Silviu-Dan 1993). Par technique d'inhibition de RAST et d'inhibition d'ELISA (pour l'étude des IgG), Torres *et coll.* (1997) ont récemment démontré, chez 7 patients sensibles aux bêta-lactamines que ces sujets avaient des IgE et des IgG anti-BPO et/ou anti épitopes de la chaîne latérale de l'amoxicilline et que chez un même sujet les épitopes reconnus par les IgE n'étaient pas forcément les mêmes que les spécificités des IgG anti bêta-lactamines. Parmi 54 patients ayant développé des réactions anaphylactoïdes à l'amoxicilline, Vega *et coll.* (1994) ont démontré que la sensibilisation était liée à la chaîne latérale spécifique des pénicillines A sans allergie au BPO (63% des patients avaient des prick tests positifs à l'amoxicilline sans allergie au BPO). Certains patients sont sensibilisés spécifiquement aux épitopes en position C7 de la chaîne latérale des céphalosporines sans allergie démontrée aux autres bêta-lactamines (Blanca 1994).

Un patient ayant présenté un exanthème scarlatiniforme induit par l'ampicilline avait des tests épicutanés positifs aux dérivés des bêta-lactamines ayant une conformation comportant le radical D(-)-alpha-amino-benzyl, mais ces patients avaient des tests négatifs quand ceux-ci étaient réalisés avec des molécules bêta-lactamines contenant le radical L(+)-alpha-aminé (Voorhorst 1980).

La sensibilisation aux bêta-lactamines peut donc être liée à un ou plusieurs déterminants antigéniques et pourrait même être stéréoisomérique pour un épitope donné.

Reconnaissance des antigènes sensibilisants par les lymphocytes T

Activation lymphocytaire T (Koponen 1986, Bell 1989, de Weck 1991, Chosidow 1994, Hertl 1995, Brander 1995)

La réponse cellulaire T peut être induite par les antigènes médicamenteux soit sous forme native soit sous une forme liée aux protéines. Par définition, les haptènes non conjugués ne peuvent pas induire la prolifération des lymphocytes T sensibilisés (de Weck 1991). La stimulation des lymphocytes T ne peut être déclenchée que par des épitopes réactifs, couplés aux molécules HLA de classe I ou de classe II, présentés de façon efficace à la surface membranaire des cellules présentatrices d'antigène (CPA).

Bell *et coll.* (1989) et Brander *et coll.* (1995) ont étudié s'il était nécessaire qu'un apprêtement cellulaire (internalisation et transformation de l'antigène à l'intérieur de la cellule présentatrice) des haptènes des bêta-lactamines par les CPA ait lieu, pour déclencher une stimulation lymphocytaire T spécifique. Ils ont utilisé des CPA normales ou des CPA préalablement fixées par le glutaraldéhyde, donc capables de présenter l'antigène mais ayant perdu leur capacité d'apprêtement. Les pénicillines comportant des radicaux réactifs aminés ou hydroxylés (qui peuvent se lier aux protéines membranaires cellulaires) peuvent déclencher une stimulation lymphocytaire T spécifique si elles sont présentées couplées à des molécules HLA à la surface des CPA. Selon Brander *et coll.* (1995), la pénicilline G native peut être présentée par des CPA qui ont été préfixées par le glutaraldéhyde, et ne requiert donc pas de " processing " cellulaire préalable à cette présentation pour stimuler spécifiquement les lymphocytes T. La pénicilline G peut se lier aux molécules HLA de classe I ou de classe II (Brander 1995). La pénicilline G pourrait même être présentée par des cellules activées (comme les cellules T activées elles-mêmes qui expriment des molécules HLA à leur surface) sans l'intervention des CPA classiques (Brander 1995). A l'inverse, la BPO liée à la sérum albumine humaine (BPO-SAB) nécessite un " processing " par les CPA pour devenir

immunogène vis à vis des lymphocytes T. En effet la fixation préalable des CPA par le glutaraldéhyde abolit la stimulation des lymphocytes T par la BPO.

Les molécules HLA de classe I ou de classe II sont impliquées dans la stimulation des cellules T par les médicaments (Koponen 1986, Hertl 1993, Chosidow 1994, Hertl 1995, Brander 1995). Les règles classiques des restriction de classe I et de classe II s'appliquent aux processus d'activation clonale des cellules CD8+ ou CD4+ par la pénicilline G (Brander 1995). La pénicilline G peut se lier aux molécules HLA de classe I ou de classe II mais on ne sait pas si la pénicilline se lie à la molécule HLA elle-même ou à un peptide antigénique situé dans la niche à peptide (Brander 1995). Selon Bell *et coll.* (1989), la réponse lymphocytaire T pourrait être dirigée contre les molécules HLA modifiées par la fixation de l'haptène (" modified-self response "). En effet la pénicilline G inhibe spécifiquement la fixation de certains anticorps dirigés contre des molécules HLA comme les anticorps anti-Aw32, anti-B15 ou anti-B40 (Koponen 1986). De plus, certaines molécules HLA pourraient être liées à un risque accru de développer une toxidermie comme les spécificités HLA A29, B12 et/ou HLA DR7 dans les syndromes de Lyell induits par les sulfamides (Mobini 1993), l'antigène HLA B40 dans les syndromes de Lyell (Paquet 1994), faisant évoquer la possibilité que la fixation des haptènes médicamenteux puisse être spécifique d'allèle ou que ces haptènes prennent une orientation particulière dans la niche à peptides. Drouet *et coll.* (1997) ont, de plus, récemment montré dans une étude préliminaire, que la fréquence de l'haplotype HLA DRB1*1301 DQB1*0603 était augmenté dans les exanthèmes maculo-papuleux (20 cas), le phénotype HLA B51 était augmenté dans la PEAG (14 cas) mais de façon non significative par rapport à une population contrôle de la même région géographique.

La stimulation des lymphocytes T par un tel **" soi modifié "** pourrait aussi être en cause dans le déclenchement de certains exanthèmes viraux (Bell 1989). Cette parenté des mécanismes immunitaires pourrait rendre compte en partie des similitudes parfois observées cliniquement entre les exanthèmes maculo-papuleux médicamenteux et les éruptions survenant au cours d'infections par le virus Epstein-Barr.

Les cellules effectrices : les lymphocytes T (Koponen 1986, de Weck 1991, Chosidow 1994, Hertl 1995, Brander 1995).

Différentes techniques ont été utilisées pour étudier la nature des lymphocytes T impliqués dans le déclenchement des toxidermies. Les cellules T peuvent être phénotypées *in situ* sur des biopsies cutanées réalisées sur des toxidermies ou sur des tests cutanés médicamenteux positifs. Les **lymphocytes circulants** peuvent être phénotypés et/ou clonés avec ou sans stimulation par le médicament *in vitro*. Les lymphocytes infiltrants peuvent être aussi extraits de l'épiderme comme l'ont rapporté Hertl *et coll.* (Hertl et Bohlen 1993, Hertl et Gerstel 1995).

Sur des séries de patients, limitées, avant notre étude, l'immunophénotypage réalisé sur des biopsies de toxidermies supposées de mécanisme immunitaire cellulaire retardé mettent en évidence un infiltrat périvasculaire composé majoritairement de lymphocytes CD4+ (Hertl 1993, Warrington 1993, Miyauchi 1991). Si les lymphocytes T infiltrant l'épiderme sont majoritairement CD8+ dans l'érythème polymorphe, le syndrome de Stevens-Johnson, le syndrome de Lyell et l'érythème pigmenté fixe (Miyauchi 1991, Villada 1992, Hertl 1993), ils sont CD4+ dans le très petit nombre de cas d'exanthème maculo-papuleux où ils ont été étudiés (Warrington 1993). Selon Hertl *et coll.* (1995, 1993) quelle que soit la présentation clinique de la toxidermie étudiée, les lymphocytes, extraits de l'épiderme puis clonés, sont toujours de phénotype CD8+. Selon ces auteurs ces résultats ne seraient pas consécutifs à un artéfact technique car avec la même méthode, les cellules T extraites d'épiderme provenant de biopsies de tests épicutanés positifs au fragrance mix sont de phénotype CD4+. Hertl *et coll.* (Hertl et Gerstel 1993) ont démontré chez des patients atteints de toxidermies bulleuses sévères induites par les bêta-lactamines, que les cellules T CD8+ isolées de l'épiderme étaient cytotoxiques vis à vis des kératinocytes et des lymphocytes B. Les clones provenant de ces lymphocytes T CD8+ isolés de l'épiderme, synthétiseraient plutôt de l'interféron gamma (IFNγ) que de l'interleukine 4 (IL4). Or la sécrétion d'IFNγ régule positivement l'expression de l'intercellular adhesion molecule 1 (ICAM 1/CD54) à la surface des cellules endothéliales et des kératinocytes, ce qui pourrait favoriser le " homing " cutané des lymphocytes T. Cette expression épidermique d'ICAM 1 pourrait aussi augmenter l'adhésion des cellules T CD8+ aux kératinocytes, permettant ainsi la cytotoxicité et le développement de " satellite cell necrosis ". Les infections virales peuvent entraîner une activation polyclonale, non spécifique

du virus, des cellules T CD8+ et conduire ainsi à l'émergence de lymphocytes T spécifiques d'un médicament. Ce mécanisme est suspecté dans le développement des exanthèmes survenant chez des patients prenant de l'ampicilline lors des infections par le virus Epstein-Barr et dans les toxidermies dues aux sulfamides chez les patients contaminés par le VIH (Chosidow 1994).

Les études portant sur les lymphocytes T circulants de patients ayant présenté une toxidermie aux bêta-lactamines rapportent des résultats hétérogènes d'une publication à l'autre. Dans des modèles de cultures lymphocytaires brèves, Koponen *et coll.* (1986) ont mis en évidence une augmentation du taux des lymphocytes CD4+ Leu8+, alors que Perez *et coll.* (1991) ont montré une augmentation des cellules T spécifiques des bêta-lactamines de phénotype CD4+ CD45 RO+. Inversement, dans des cultures prolongées suivies de clonage, Hertl *et coll.* (1993) ont obtenu 7/7 clones, tous de phénotype CD8+, à partir du sang de patients ayant présenté des exanthèmes maculo-papuleux dûs aux bêta-lactamines. Dans les tests de transformation lymphocytaire, Brander *et coll.* (1995) ont démontré que les lymphocytes T spécifiques stimulés par la pénicilline G étaient principalement de phénotype CD4+, durant la première semaine de culture, mais que le nombre de cellules T CD8+ augmentait pour atteindre un pourcentage de 25% si les cultures étaient prolongées (avec l'adjonction d'IL2 dans le milieu de culture). A l'inverse, la BPO-SAB stimulerait principalement les cellules CD4+, même dans les cultures prolongées durant plus d'une semaine.
Des clones de cellules T CD8+ provenant du sang de 2 patients allergiques aux bêta-lactamines produisaient, après stimulation, de l'IL2 et de l'IFNγ (Hertl 1993).
Il faut remarquer que les résultats obtenus par Brander *et coll.* (1995) sont plus hétérogènes. Ces auteurs ont étudié le phénotype des lymphocytes impliqués dans la réponse cellulaire T chez 10 patients allergiques ayant présenté une urticaire ou un exanthème maculo-papuleux dû aux bêta-lactamines. Dix clones spécifiques de la pénicilline G ont été isolés (provenant de 2 patients allergiques aux bêta-lactamines) : 2 clones produisaient de forts taux d'IL4 et d'IL5 ; 3 clones produisaient de forts taux d'IFNγ, d'IL4 et d'IL5. Ces clones avaient un profil de sécrétion de cytokines qui ne permet pas de les classer de façon stricte en Th1 ou Th2.

La recherche d'une éventuelle clonalité de la réponse lymphocytaire dans les toxidermies peut aussi être appréciée par l'analyse du répertoire du récepteur pour l'antigène (T cell receptor = TCR) des cellules T. Par une technique de culture cellulaire *in vitro*, sur les cellules T

circulantes CD4+ et CD8+ d'un patient allergique aux sulfamides, Mauri-Helweg *et coll.* (1995) ont observé une prolifération préférentielle des cellules exprimant un récepteur de type Vβ17, 9 jours après une stimulation cellulaire *in vitro* par le sulfaméthoxazole. Ces résultats suggèrent que les cellules T spécifiques du médicament ont une restriction d'usage de certains gènes V du TCR (Mauri-Helweg 1995). Inversement dans les travaux de Brander *et coll.* (1995), 6 clones de cellules T spécifiques de BPO-SAB, isolés à partir des cellules circulantes de 2 patients allergiques aux bêta-lactamines n'exprimaient pas de restriction d'usage de certains gènes V du TCR.

CARACTERISTIQUES IMMUNOLOGIQUES DE TOXIDERMIES SPECIFIQUES.

Urticaire, oedème de Quincke, réactions anaphylactiques.

(Koponen 1986, Silviu-Dan 1993, Hertl 1993, Blanca 1994, Vega 1994, Hertl 1995, Romano 1995, Brander 1995).

Ces toxidermies peuvent être déclenchées par les principes actifs ou les excipients des médicaments sous leur forme commercialisée.
Selon Hertl *et coll.* (1995) les lignées cellulaires T isolées à partir des cellules circulantes des patients ayant présenté une urticaire due à la pénicilline sont majoritairement CD4+. Ces lignées CD4+ produisent de l'IL4, de faibles taux d'IL2 et pas d'IFNγ (profil de production cytokinique de type Th2). Ces cellules CD4+ n'ont pas de capacité de cytotoxicité vis à vis des lymphocytes B ou des kératinocytes (Hertl 1995).
Pour Brander *et coll.* (1995), le profil de sécrétion cytokinique des clones de cellules T spécifiques de la Pénicilline G (même ceux qui proviennent de cellules circulantes de patients qui présentent une synthèse d'IgE spécifiques de pénicilline G) est hétérogène. Aucune prédominance d'un profil cytokinique quelconque n'a été mis en évidence par cette équipe. L'exposition sporadique à un allergène médicamenteux n'est peut être pas suffisante pour déclencher une réponse avec profil cytokinique Th2 mais des cellules Th0 pourraient être en cause dans ces accidents médicamenteux allergiques immédiats. Les cellules avec un profil Th0 peuvent sécréter de faibles taux d'IL4 qui peuvent être suffisants pour déclencher une commutation de classe (" switch ") vers les IgE.
D'autres mécanismes immunologiques et inflammatoires peuvent être en cause dans certains cas d'urticaire, comme la formation de complexes immuns circulants ou une dégranulation mastocytaire induite par l'activation du complément (*in* Barbaud Clin Rev Allergol Immunol 1995).

Erythème polymorphe, syndrome de Stevens-Johnson, syndrome de Lyell et toxidermies bulleuses

(Tagami 1983, Roujeau 1985, Miyauchi 1991, Heng 1991, Tone 1992, Hagdrup 1992, Hertl 1992, Chosidow 1994, Friedmann 1994, Paquet 1994, Moncada 1994, Rasmussen 1995, Wolkenstein 1996, Paul 1996).

Ces toxidermies sévères aboutissant à la cytolyse des kératinocytes, ne sont pas uniquement dues à des réactions immunologiques dirigées contre un médicament. A leur origine interviennent beaucoup d'autres facteurs (Chosidow 1994) comme des prédispositions génétiques, par exemple une capacité génétiquement programmée du métabolisme enzymatique médicamenteux, des prédispositions HLA de présentation d'antigènes immunocompétents particuliers et des infections virales. Une cytotoxicité kératinocytaire directe de certaines drogues est peut être aussi en cause.
Les mécanismes inflammatoires impliqués dans ces toxidermies sont similaires à ceux intervenant dans les réactions de maladie du greffon contre l'hôte, avec une réaction immunitaire **cellulaire retardée** médiée par des cellules T CD8+. Un très petit nombre d'épitopes responsables de ces toxidermies graves ont été étudiés en raison de l'absence de modèle permettant de les reproduire *in vitro* et de l'habituelle négativité des tests cutanés médicamenteux (Wolkenstein 1996) quand ils sont réalisés chez les patients qui les ont développées. Les résultats de l'immunophénotypage *in situ* dépendent du délai avec lequel est pratiquée la biopsie cutanée après le déclenchement de la toxidermie.

Quelques cellules de Langerhans CD1+ ont été observées dans l'épiderme et le derme (Villada 1992, Friedmann 1994, Paquet 1994) tandis qu'un assez grand nombre de cellules dendritiques (Facteur XIII+, HLA DR+) et de macrophages a été observé dans les infiltrats périvasculaires et l'épiderme (Friedmann 1994).
Les cellules dendritiques sécrètent du Tumor Necrosis Factor α (TNFα) qui peut augmenter les réactions de cytotoxicité lymphocytaire dirigées contre les kératinocytes. Le TNFα est abondant dans l'épiderme des patients atteints de ces toxidermies graves (Roujeau 1985, Paquet 1994, Heng 1991).

L'activation des **cellules endothéliales**, avec une forte expression des molécules d'adhésion comme ICAM 1/CD54, ELAM 1/CD62E (endothelial leukocyte adhesion molecule 1), et de VCAM 1/CD106 (vascular cell adhesion molecule 1) pourrait jouer un rôle important dans le " homing " cutané des lymphocytes (Friedmann 1994). L'intégrité des cellules endothéliales est conservée comme en témoigne la fixation demeurant normale de la lectine *Ulex Europeanus 1* sur ces cellules (Friedmann 1994).

Les processus d'activation des **lymphocytes T** dans ces toxidermies ne sont pas élucidés. Dans le **syndrome de Lyell** induit par la salazopyrine, Hagdrup *et coll.* (1992) ont observé une diminution précoce du taux des lymphocytes circulants, avec une diminution rapide mais transitoire du rapport CD4+/CD8+. Selon ces mêmes auteurs (Hagdrup 1992), ces anomalies pourraient être dues à une extravasation précoce des cellules T CD4+. En effet les infiltrats

périvasculaires contiennent principalement des cellules T CD3+, CD45 RO+ et CD4+ (CD4+/CD8+ > 3) (Miyauchi 1991, Villada 1992, Hertl et Bohlen 1993, Friedmann 1994, Paquet 1994, Hertl 1995, Rasmussen 1995). Un très faible pourcentage de ces cellules T exprime CD25 (Récepteur de l'IL2) (Friedmann 1994, Paquet 1994). Les lymphocytes infiltrant l'épiderme sont plutôt de phénotype CD8+ (CD8+/CD4+ d'environ 4) (Villada 1992, Friedmann 1994, Paquet 1994, Heng 1991) avec expression de CD25 sur 25% de ces cellules (Friedmann 1994). Selon les travaux de Hertl *et coll.* (1992, 1993) les clones de cellules T isolés de lymphocytes épidermiques provenant de patients ayant développé des toxidermies bulleuses dues aux bêta-lactamines expriment toujours CD3, CD8, HLA DR et le TCR α/β. Les lignées de cellules T CD8+ obtenues chez deux patients qui avaient présenté un exanthème bulleux induit par l'amoxicilline, exprimaient une activité cytotoxique mais pas d'activité suppressive après stimulation mitogénique par la concavaline A (Hertl 1992).
Dans les **réactions cutanées bulleuses** induites par les bêta-lactamines, les clones de cellules T CD8+ isolés à partir des lymphocytes infiltrant l'épiderme prolifèrent en présence de CPA autologues modifiées par la fixation de l'haptène médicamenteux (Hertl et Bohlen 1993). Ces cellules T clonales ont un profil de sécrétion de cytokines de type Th1 après activation par le médicament et une activité cytotoxique contre les kératinocytes. Ces clones de cellules T induisent l'expression d'ICAM 1 à la surface des kératinocytes, ce qui pourrait favoriser le développement de l'adhésion cellule T-kératinocyte et de " satellite cell necrosis ". Les études immunohistochimiques de la nécrose épidermique ont mis en évidence une régulation positive avec expression d'ICAM 1 et de HLA DR à la surface des kératinocytes (Miyauchi 1991, Villada 1992, Hertl et Bohlen 1993, Hertl 1995, Rasmussen 1995). La nécrolyse kératinocytaire est consécutive à des modifications de la membrane cellulaire, des flux calciques intracellulaires et de la polymérisation des perforines qui entraînent un élargissement des pores membranaires puis la cytolyse. Une augmentation d'expression de l'ARN messager des perforines a été récemment mise en évidence dans les cellules T CD8+ cytotoxiques (Moncada 1994). La lyse des kératinocytes pourrait donc être initiée par différents mécanismes : la cytotoxicité des cellules T CD8+ infiltrant l'épiderme vis à vis des kératinocytes, la libération de TNFα et/ou une action toxique directe de la drogue elle-même. Le TNFα peut également être initiateur d'apoptose, or l'apoptose comme mécanisme de la mort kératinocytaire vient d'être mise en évidence dans le syndrome de Lyell (Paul 1996).

Exanthème maculo-papuleux (Bruynzeel 1985, Koponen 1986, Tone 1992, Hertl et Gersel 1993, Bircher 1995, Warrington 1993, Hertl 1995, Romano 1995, Brander 1995, Barbaud Arch Dermatol 1997)

(Note : les résultats se rapportant à la référence bibliographique " Barbaud Arch Dermatol 1997 " seront détaillés ultérieurement dans le manuscrit).

Plusieurs études soutiennent l'hypothèse de l'existence de mécanismes immunitaires **cellulaires retardés** à l'origine des exanthèmes maculo-papuleux médicamenteux. L'exanthème apparaît 1 à 10 jours après l'introduction du médicament, les tests cutanés médicamenteux sont en général négatifs lors des lectures précoces à 30 minutes mais peuvent être positifs sur les lectures tardives à 24 heures des tests épicutanés (Bruynzeel 1985, Bruynzeel 1987, Warrington 1993, Blanca 1994, Romano 1995, Barbaud Arch Dermatol 1997). Il sera intéressant de comparer ces résultats à ceux obtenus sur des tests intradermiques ou des des prick tests médicamenteux avec positivité retardée.

Le nombre de cellules de Langerhans CD1+ épidermiques est augmenté selon Dascalu *et coll.* (1992) ou normal (Barbaud Arch Dermatol 1997). Selon Brander *et coll.* (1995), les exanthèmes maculo-papuleux induits par les béta-lactamines surviennent après stimulation de lymphocytes T spécifiques du médicament qui sont de phénotype CD4+ ou CD8+. Hertl *et coll.* (1993, 1995) pour leur part, à partir des cellules périphériques de 2 patients atteints d'exanthème maculo-papuleux induits par les bêta-lactamines, ont isolé des clones de cellules T spécifiques du médicament, tous de phénotype CD8+ et ayant un effet suppresseur sur la mitogénèse induite par la Concavaline A. Ces clones de cellules T CD8+ prolifèrent en présence de bêta-lactamines et ont un profil de sécrétion de cytokines de type Th1. Les cytokines Th1 peuvent être impliquées dans la régulation positive d'expression de HLA DR et d'ICAM 1/CD54. La recherche d'expression épidermique de HLA DR et de CD54/ICAM 1 devra donc être étudiée chez nos patients. Le rôle majeur que certains auteurs font jouer aux cellules T CD8+ dans le déclenchement des exanthèmes maculo-papuleux médicamenteux doit être discuté car, dans plusieurs études, les infiltrats périvasculaires observés sont composés majoritairement de lymphocytes CD4+ (Tone 1992, Hertl 1995, Warrington 1993, Barbaud Arch Dermatol 1997) avec un rapport CD4+/CD8+ égal à 3 (Barbaud Arch Dermatol 1997). Il nous paraît nécessaire d'étudier sur de plus grandes séries de patients, et ce *in situ*, la nature de ces cellules T. Selon Koponen *et coll.* (Koponen 1986) chez 3 patients ayant eu un exanthème maculo-papuleux, 7 jours après une stimulation cellulaire *in vitro* par une bêta-lactamine, 90% des lymphocytes issus du sang périphérique étaient de type CD4+. Parmi ces cellules CD4+, plus de 50% exprimaient Leu8, et étaient des cellules inductrices de suppression. Il nous paraît également nécessaire d'étudier l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales, qui jouent un rôle majeur dans le " homing " cutané des cellules inflammatoires.

Dans nos études nous rapporterons l'étude de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et discuterons leur rôle dans le recrutement des lymphocytes T dans la peau.

Erythème pigmenté fixe (Visa 1987, Hindsen 1987, Shiohara 1989, Smoller 1991, Teraki 1994, Komatsu 1996).

L'érythème pigmenté fixe pourrait relever de mécanismes immunitaires retardés à médiation cellulaire. Les infiltrats dermiques sont composés de cellules T CD4+ et CD8+ en proportions égales (Visa 1987, Hindsen 1987). Les cellules T infiltrant l'épiderme sont observées principalement dans les assises basales et suprabasales et sont de phénotype CD8+. Une persistance anormalement prolongée de ces cellules T CD8+ dans l'épiderme a été observée dans des biopsies cutanées faites sur les sites pigmentés séquellaires, 3 semaines après la phase inflammatoire d'erythèmes pigmentés fixes (Hindsen 1987). Le rôle de ces cellules T persistant de façon prolongée dans l'épiderme pourrait être majeur pour expliquer les poussées caractéristiques, toujours situées aux mêmes sites de l'EPF. Komatsu *et coll.* (1996) ont isolé et cultivé ces cellules T persistant dans l'épiderme à partir de biopsies réalisées chez 2 patients ayant un EPF. Ces cellules T avaient un phénotype CD8+ chez un des patients mais CD4+ chez l'autre, et ne proliféraient pas en présence du médicament responsable de l'EPF. Des analyses portant sur l'expression des familles des gènes Vα et Vβ ont montré que les cellules T isolées des infiltrats épidermiques utilisaient un répertoire restreint de ces familles de gènes, par rapport à la variété plus grande utilisée par les lymphocytes circulants analysés chez les mêmes patients (Komatsu 1996). La récidive des lésions sur des sites toujours identiques chez un même patient pourrait être liée à une activation localisée de cellules T ayant un potentiel cytolytique et persistant de façon prolongée dans l'épiderme.

Sur les sites inflammatoires, les kératinocytes des assises basales et suprabasales expriment fortement ICAM 1 et HLA DR (Shiohara 1989, Smoller 1991, Teraki 1994, Hertl 1995) en particulier en regard des infiltrats dermiques denses (Shiohara 1989, Smoller 1991). Après un test de provocation orale, sur les sites inflammatoires, l'expression d'ICAM 1 par les kératinocytes est précoce, intense et persistante (6 à 10 jours) (Teraki 1994) tandis que l'expression de HLA DR est transitoire (Shiohara 1989). Chez le même patient, après un test de provocation orale, aucune expression d'ICAM 1 ou de HLA DR n'est observée sur les biopsies cutanées prélevées sur des sites non inflammatoires (Teraki 1994). *In vitro*, après exposition à la drogue responsable, les kératinocytes prélevés en zones lésionnelles expriment ICAM 1/CD54 plus rapidement et plus intensément que ne le font les kératinocytes prélevés en zones non-inflammatoires (Teraki 1994). La dissociation, localisée aux sites inflammatoires, entre l'expression kératinocytaire des marqueurs d'activation ICAM 1/CD54 et HLA DR pourrait être liée à une anomalie localisée de réponse des kératinocytes à l'IFNγ (Shiohara 1989) ou au TNFα, cytokines qui pourraient elles-mêmes être produites par des cellules T cutanées activées.

RATIONALE

L'objectif majeur de ce travail est d'approfondir la compréhension des **mécanismes immunologiques** impliqués dans les toxidermies et améliorer leur exploration clinique et paraclinique.

Il est nécessaire de déterminer si la réponse aux **tests médicamenteux cutanés et *in vitro*** dépend de la sémiologie de la toxidermie et/ou du médicament. Une meilleure connaissance des mécanismes des toxidermies permettrait d'améliorer les méthodes de tests *in vitro*.

La démarche générale a été une **inclusion prospective de 310 patients** ayant présenté une toxidermie et/ou un accident cutané après une vaccination, avec un bilan initial strict permettant de déterminer les critères d'imputabilité de chaque médicament ou solution vaccinale administrés, dans le déclenchement de la dermatose observée.
La plupart de ces patients ont bénéficié de biopsies cutanées de la toxidermie initiale. Si une biopsie pouvait être réalisée avant toute administration d'un médicament immuno-modulateur, cette biopsie était conservée en congélation pour effectuer un immunophénotypage.
Six à 10 semaines après la disparition de la toxidermie, des tests cutanés et des tests *in vitro* médicamenteux étaient réalisés. En cas de positivité de ces tests cutanés médicamenteux des biopsies étaient réalisées.

Les méthodes de **tests cutanés médicamenteux** ne sont pas codifiées dans l'exploration des toxidermies. La mise au point de ces tests, une évaluation de ces techniques, la détermination de leurs critères de lecture pour déterminer leur sensibilité et leur spécificité dans les différents types de toxidermie et avec différents médicaments a été un des premiers objectifs de ce travail.

Une étude *in situ* par **immunophénotypage** des biopsies cutanées de **toxidermie et/ou de tests cutanés médicamenteux** positifs est une des approches de l'exploration des mécanismes immunologiques en cause dans les toxidermies.
Sur les biopsies cutanées, plusieurs techniques ont été appliquées pour explorer différents aspects des mécanismes immunitaires éventuellement en jeu dans ces accidents médicamenteux.

La recherche de dépôts d'immunoglobulines et de complément *in situ*, de complexes immuns circulants avait pour objectif d'étudier l'éventuelle participation des complexes immuns dans la pathogénèse de la toxidermie.
Le phénotypage des cellules T présentes dans la peau servait à déterminer la sous-population prédominante dans les différents secteurs cutanés : infiltrats dermiques, cellules sous-épidermiques voire intra-épidermiques.
La recherche de marqueurs d'activation des cellules T permettait d'apprécier leur état fonctionnel d'activation.
La caractérisation des cellules dendritiques épidermiques et dermiques avait pour objet de déterminer les caractéristiques de ces cellules présentatrices d'haptènes.
L'étude de l'expression des molécules d'adhésion leucocytaires et vasculaires a permis de déterminer l'importance des phénomènes de recirculation cellulaire et/ou de chimiotactisme local.
Enfin nous avons recherché si les cellules T recrutées dans la peau lors des toxidermies subissaient une apoptose après leur activation.

Sur les infiltrats lymphocytaires T *in situ* nous avons étudié par PCR DGGE si la réponse cellulaire T dans les toxidermies est **monoclonale** ou non.

Les techniques d'exploration *in vitro* des toxidermies, autres que les urticaires, sont peu évaluées dans la littérature. Il était nécessaire d'étudier les réponses obtenues avec 2 voies d'approches différentes : les tests de **dégranulation des basophiles humains (TDBH) et les tests d'activation lymphocytaire (TAL)**.

Cette approche diagnostique des toxidermies a été appliquée dans un premier temps pour l'exploration des **exanthèmes maculo-papuleux induits par l'amoxicilline**.

Les résultats d'immunophénotypage observés sur les biopsies cutanées de ces patients atteints d'EMP induits par l'amoxicilline et sur leurs tests cutanés médicamenteux positifs ont été comparés aux résultats obtenus chez **14 autres patients atteints d'EMP ou d'érythrodermie induits par des antibiotiques** appartenant ou non au groupe pharmacologique des bêta-lactamines. L'objectif était de préciser si les premiers résultats obtenus étaient applicables à des toxidermies de même sémiologie (exanthème maculo-papuleux) mais déclenchées par

d'autres antibiotiques ou d'une autre sémiologie supposée être également due à une hypersensibilité cellulaire retardée (érythrodermie par exemple).

Deux toxidermies particulières ont été plus précisément détaillées car elles soulèvent des problèmes interprétatifs spécifiques. Il s'agit d'un **érythème polymorphe induit par le Lamisil ®250 comprimé**, sans sensibilisation prouvée à la terbinafine et **un syndrome Babouin induit par l'administration de veinoglobulines**.

Enfin l'exploration des **accidents cutanés sévères après vaccination** a été abordée de façon isolée car ils peuvent être dus, comme les toxidermies, à des stimulations hapténiques du système immunitaire mais également à une stimulation non spécifique de l'immunité humorale et/ou cellulaire (Barbaud Ann Dermatol Vénéréol 1995).

MATERIEL ET METHODES

PATIENTS

Tous les patients consultant pour une dermatose évocatrice de **toxidermie** ou de réaction cutanée anormale après une **vaccination**, examinés dans le service de Dermatologie du CHU de Nancy de Janvier 1993 à Juillet 1997, ont été inclus dans ce travail.

A ce jour 310 patients ont été étudiés. Pour chaque patient l'analyse de la toxidermie a été réalisée selon la méthode détaillée dans la section " Méthodes ".

Parmi ces patients :

* **Cinq patients** ont fait l'objet d'une première étude portant sur l'immunophénotypage des exanthèmes maculo-papuleux induits par l'amoxicilline et des tests médicamenteux cutanés positifs réalisés chez les mêmes patients.

***Soixante douze patients** présentant une toxidermie pour laquelle un médicament avait une imputabilité très probable selon les critères de Bégaud *et coll.* (1985) ou Moore *et coll.* (1985) dans sa survenue, et qui de plus ont bénéficié de tests épicutanés, voire de prick-tests et/ou d'IDR avec ce médicament, ont été inclus dans une analyse de la valeur et de la spécificité des tests médicamenteux cutanés dans les toxidermies.

* Des résultats particuliers ont été observés chez deux patientes (un érythème polymorphe dû au Lamisil®250 cp et un syndrome Babouin dû aux veinoglobulines). Les investigations et hypothèses soulevées par ces observations sont détaillées.

* **Trente et un patients** ayant une imputabilité probable ou très probable d'un médicament lors de la survenue de leur toxidermie ont bénéficié de tests médicamenteux *in vitro* : TDBH et/ou TAL avec les médicaments suspectés. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec les tests cutanés médicamenteux chez les mêmes patients.

* **Quatorze patients** ayant présenté une toxidermie (exanthème maculo-papuleux ou érythrodermie) pour laquelle il a été d'une part possible de déterminer qu'un antibiotique avait une imputabilité probable ou très probable dans sa survenue, d'autre part d'obtenir une biopsie cutanée avant toute administration de médicament immunomodulateur ont bénéficié d'une étude immunohistologique approfondie :

✶Recherche de dépôts d'immunoglobulines et/ou de complément traduisant la participation des complexes immuns circulants.

✶Phénotypage des cellules T présentes dans la peau pour déterminer les sous-populations prédominantes dans les différents territoires concernés : infiltrats, cellules sous-épidermiques voire intraépidermiques.

✶Recherche d'expression de marqueurs d'activation des cellules T traduisant leur état fonctionnel.

✶Caractérisation des cellules dendritiques épidermiques et dermiques.

✶Molécules d'adhésion leucocytaires et vasculaires pour déterminer l'importance des phénomènes de recirculation cellulaire et/ou de chimiotactisme local.

✶ Comportement des cellules T recrutées dans la peau vis à vis de l'apoptose déclenchée par leur activation (étude de l'expression de 2 marqueurs d'apoptose : Bcl2 et CD95).

✶ Etude de la clonalité éventuelle de l'infiltrat lymphocytaire T.

* La biopsie cutanée d'une patiente ayant présenté une toxidermie due à la pristinamycine avec une expression épidermique de CD62L sans expression lymphocytaire dermique de cette sélectine, a été utilisée pour la détermination de la masse moléculaire de la molécule épidermique reconnue par l'anticorps CD62L dans les toxidermies.

* **Treize patients** ayant présenté une réaction cutanée anormale après une **vaccination** ont été étudiés.

- Cinq patients ont bénéficié d'investigations après la survenue d'une urticaire consécutive à une vaccination anti-hépatite B.
- Un patient a présenté une réactivation d'un très ancien purpura rhumatoïde, un autre une urticaire après une vaccination anti-grippale.
- Six patients ont bénéficié d'investigations complémentaires après la survenue de réactions d'intolérance cutanée après vaccination anti-tétanique, anti-diphtérique et anti-poliomyélitique.

METHODES

Analyse clinique des toxidermies - Tests cutanés médicamenteux - Imputabilité médicamenteuse

Toutes les interprétations des résultats immuno-allergologiques cutanés réalisés chez les patients inclus dans ce travail, qu'il s'agisse des tests médicamenteux cutanés ou des investigations immunologiques *in situ* sur biopsie ou sériques, nécessitent une analyse très rigoureuse de tous les dossiers de patients suspects de toxidermie.
La détermination stricte de l'imputabilité d'un ou plusieurs médicaments dans la survenue des toxidermies est une base indispensable pour toutes les interprétations ultérieures des études immuno-allergiques.
Cette détermination repose sur des données anamnestiques, chronologiques, sémiologiques et paracliniques recueillies dans un dossier que nous avons créé dans l'optique de cette étude prospective.

Données cliniques

Après recueil des antécédents, en particulier d'allergie médicamenteuse, la dermatose est décrite en détaillant les lésions primaires, leur localisation, l'atteinte muqueuse associée. Des photographies sont prises et jointes au dossier du patient.

Chronologie des prises médicamenteuses

Les critères chronologiques sont des arguments centraux dans l'imputabilité d'un médicament à l'origine d'une toxidermie. Le délai d'apparition de la toxidermie après l'administration du médicament, l'évolution après l'arrêt du traitement voire après une réintroduction accidentelle de ce même médicament doivent être précisés (Begaud 1985, Shear 1990, Roujeau 1990).

La chronologie des prises médicamenteuses est déterminée par un interrogatoire très précis avec analyse des ordonnances du patient. Le recueil des données est rapporté de deux façons :
- sur un schéma chronologique
- sur un tableau d'informations portant sur les médicaments administrés : ces données complètent le schéma chronologique. Nom commercial, forme galénique, DCI, posologie, dates de début et d'arrêt d'administration permettront :
- de calculer la dose totale de drogue reçue,

- d'étudier la responsabilité du principe actif mais également des excipients d'un médicament commercialisé (Barbaud Clin Rev Allergol Immunol 1995).

L'évolution clinique immédiate

Après éviction de(s) la drogue(s) imputée(s), l'évolution de la toxidermie spontanée ou sous traitements locaux et généraux, qui sont notifiés, est décrite.

Examens complémentaires biologiques

Devant toute toxidermie les explorations biologiques prescrites sont :

* La numération formule sanguine-plaquettes, la vitesse de sédimentation, le dosage de la protéine C réactive (PCR), les bilans rénal et hépatique. Ils permettent de rechercher l'existence d'une hyperleucocytose et/ou d'une hyperéosinophilie associées, un syndrome inflammatoire, l'existence d'anomalies rénales en particulier lors des vasculites allergiques médicamenteuses ou d'anomalies du bilan hépatique puisque, par ordre de fréquence, le foie est après la peau le second organe atteint lors des accidents immuno-allergiques médicamenteux (Tréchot 1996).

* Enfin l'étude du statut immunitaire du sujet est exploré selon trois versants :
- l'immunité humorale : dosage pondéral des immunoglobulines (Ig) G, A, M, E.
- les pathogénies à complexes immuns circulants (CIC) : recherche de CIC, dosages du complément total (CH50), de ses fractions C3, C4. Des anomalies peuvent être observées dans les vasculites allergiques médicamenteuses.
- l'immunité cellulaire : sous-populations lymphocytaires circulantes.

* L'hypothèse d'une réaction cutanée post infectieuse est explorée par la réalisation de tests sérologiques viraux et bactériens vis à vis d'*Herpes hominis* type I et II, Mycoplasme, *Cytomegalovirus*, *Chlamydiae*, *Rickettsiae*, Epstein-Barr virus, *Haemophilus influenzae b*, *Parvovirus B 19*, *Coxsackie virus*, Enterovirus, complétés par la recherche des antistreptolysines, antistreptokinases et antistreptodornases.

Examen anatomo-pathologique et immuno-histologique de la biopsie cutanée de toxidermie

Les prélèvements réalisés par biopsie-suture ou punch-biopsie, sont examinés histologiquement dans le laboratoire d'anatomopathologie des Professeurs A. Duprez et J-M Vignaud de l'Hôpital Central du CHU de Nancy.

La seconde biopsie, immédiatement congelée dans l'azote liquide est transportée au laboratoire d'Immunologie du CHU de Nancy (Prs M.C. Béné et G. Faure). Le premier examen immuno-histologique est réalisé en immunofluorescence directe pour rechercher d'éventuels signes de vascularite avec dépôts cutanés vasculaires d'immunoglobulines et/ou de complément. Les pièces biopsiques sont également conservées en congélation à -80°C pour les techniques ultérieures d'immuno-histochimie par techniques d'immuno-fluorescence indirecte.

Bilan dermato-allergologique

Il est réalisé **6 à 10 semaines** après la disparition de la toxidermie, dans le Secteur de Dermato-Immuno-Allergologie du service de Dermatologie, sous la responsabilité du Dr A. Barbaud.

Il comporte une étude du statut dermato-allergique du sujet :

* recherche d'un terrain atopique par prick tests aux pneumallergènes courants,
* mise en évidence de sensibilisation de contact par tests épicutanés de la batterie standard européenne
* tests cutanés médicamenteux.

Tests épicutanés (Patch-tests) aux médicaments(s).

Outre la batterie standard ICDRG (International Contact Dermatitis Research Group) (Adams 1990), des tests épicutanés avec le ou les médicament(s) imputé(s) sont réalisés (Barbaud 1993).

Ces tests sont réalisés :

- avec le médicament sous sa **forme commercialisée** : comprimé pilé, contenu de gélules, solution injectable ou buvable... Après être réduits en poudre au mortier, les comprimés

pulvérisés sont testés tel quels et dilués à 30% dans l'eau et dans la vaseline. Pour la préparation dans la vaseline la poudre de médicament est incorporée très progressivement dans la vaseline pour obtenir un mélange homogène. Le contenu des capsules est testé tel quel, dilué à 30% dans l'eau et dans la vaseline. L'enveloppe des gélules est testée telle quelle après avoir été humidifiée. Les médicaments commercialisés en solution sont testés tels quels et dilués à 30% dans l'eau.
Si le test épicutané avec le produit commercialisé est positif, un détail du test est nécessaire. Contact est pris avec la firme pharmaceutique produisant le médicament pour obtenir les différentes molécules le composant. Dès l'obtention de ceux-ci, produit actif et excipients sont testés individuellement aux concentrations et dans les véhicules adéquats.

- Si le **produit actif** pur est disponible dès le premier testage, il est testé pur et dilué à 30% dans différents excipients, après étude de miscibilité faite par l'équipe de la Pharmacie des Hôpitaux Maringer-Villemin-Fournier. En général le principe actif est testé dilué dans l'eau et la vaseline pour les produits présentés sous forme de poudre. En cas de non miscibilité du principe actif dans ces véhicules, d'autres excipients sont parfois utilisés (alcool, propylèneglycol ...). Les produits actifs qui ont pu être testés purs sont rapportés dans le tableau 1.

- Un grand nombre d'**excipients** et de conservateurs contenus dans les spécialités pharmaceutiques ont été également testés en poudre sous forme pure (tableau 2).
La concentration de 30% dans la vaseline, l'eau ou les autres excipients utilisés pour les tests épicutanés a été choisie car pour la plupart des médicaments se présentant sous forme de poudre cette concentration était la plus haute qui permettait d'avoir une bonne distribution de la drogue dans la vaseline et donc une homogénéisation de la préparation utilisée pour le test épicutané.

La lecture des tests épicutanés, mis en place sur le dos du patient, sur des supports d'aluminium avec adhésif hypoallergénique (Finn Chamber sur adhésif Scanpor®, Epitest Ltd oy, Tuusula, Finlande) est faite à 20 minutes, 48 et 96 heures et si possible, en cas de négativité de ces tests après une semaine. Les critères de positivité sont ceux définis par l'ICDRG :

0 : test négatif

IR : test irritatif avec érythème

+ : test positif avec érythème et papule

++ : test positif avec érythème, papule et vésicules

+++ : test positif avec érythème, confluence de vésicules ou bulle.

Deux types de toxidermies bénéficient d'investigations particulières :

- dans l'érythème pigmenté fixe, les tests épicutanés sont posés sur le dos mais également sur le site de l'éruption initiale, aisément repérable puisqu'il est le siège d'une pigmentation séquellaire (Alanko 1987).

- Dans les photoallergies médicamenteuses (Jeanmougin 1986), outre les patch-tests médicamenteux simples, des photopatch-tests de la batterie standard des photoallergènes et avec le ou les médicament(s) suspecté(s) sont réalisés. Vingt quatre heures après la pose des tests épicutanés, ceux-ci sont ôtés et le site est irradié par des UVA (10 Joules). La lecture des tests est effectuée à la 72ème heure avec les critères de positivité des épidermotests définis par l'ICDRG.

Une punch-biopsie des tests positifs est réalisée pour différencier un test positif d'une irritation (IR) qui ne relève pas d'un mécanisme allergique. Dans cette étude ce prélèvement est conservé à -80°C, dans l'optique d'études immuno-histochimiques ultérieures.

Les Prick-tests médicamenteux :

Les prick-tests sont réalisés avec le produit pur ou le(s) médicament(s) suspecté(s) tel quel ou ses (leurs) différent(s) composant(s) (principes actifs et excipients) sur la face antérieure de l'avant-bras grâce à des microlancettes (Microlancetter®, Bayer).

Les tests sont réalisés avec les comprimés réduits en poudre, le contenu pur et au travers de l'enveloppe des gélules, les solutions et les poudres telles quelles. Quand cela est possible le produit actif et les excipients du médicament suspecté sont testés séparément sous la forme pure utilisée pour les tests épicutanés. Si le bilan est motivé par la survenue d'une urticaire médicamenteuse, les prick tests sont réalisés avec des dilutions séquentielles du médicament suspecté avec les mêmes préparations que celles utilisées pour les IDR à 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1} puis avec la forme pure.

En dehors des investigations que nous avons réalisées avec l'amoxicilline et dans un cas d'exanthème maculo-papuleux dû à la pseudoéphédrine, les prick tests ne sont pas réalisés quand les tests épicutanés (ou les photopatch tests) médicamenteux sont positifs. Les prick tests sont considérés positifs quand le diamètre de la papule de réaction du prick-test médicamenteux a un diamètre supérieur à celui obtenu avec le témoin négatif (sérum physiologique à 0,9%) sur la lecture réalisée à 20 minutes. Dans tous les cas les prick tests sont également lus 24 heures après leur réalisation.

Un témoin positif des prick tests médicamenteux est réalisé avec une solution de phosphate de codéine à 9%.

Les intradermo-réactions (IDR) médicamenteuses :

Les tests médicamenteux intradermiques (IDR) sont réalisés seulement quand les prick tests ont des résultats négatifs sur la lecture effectuée 20 minutes après le test avec le médicament suspect.

Les IDR ne sont jamais réalisées chez des patients qui ont présenté un érythème polymorphe, un syndrome de Lyell ou ayant un aspect de vascularite leucocytoclasique sur l'examen histologique.

En l'absence de possiblité d'obtenir des formes stériles de josamycine, pristinamycine ou acide pipémidique lors de la réalisation de nos investigations il n'a pas été possible de pratiquer des IDR avec ces produits chez nos patients.

Les médicaments sous forme commercialisée et leur composition, les molécules pures actives et les excipients testés chez nos patients sont rapportés dans les tableaux 1 et 2.

Les règles et recommandations suivies lors de la pratique des IDR médicamenteuses sont les suivantes :

1) les dilutions sont pratiquées sous hotte à flux laminaire, dans les 2 heures qui précèdent l'administration des IDR.

2) toutes les précautions sont prises pour que puisse être mis en route, si nécessaire, un traitement d'urgence d'une réaction anaphylactique. Les patients ayant des IDR médicamenteuses sont hospitalisés durant les 24 heures qui suivent la réalisation de ces tests cutanés. Une voie d'abord veineuse est mise en place avant de débuter les IDR, avec une perfusion de soluté glucosé à 5%. Cette perfusion est laissée en place 2 heures après la réalisation de la dernière IDR si les résultats sont négatifs mais au moins 6 heures après la dernière IDR si les résultats sont positifs. La mesure de la tension artérielle, du pouls et du débit expiratoire de pointe (technique du peak-flow) est pratiquée régulièrement durant les 24 heures d'hospitalisation.

3) Les tests intradermiques sont réalisés avec des solutions stériles de(s) la drogue(s) suspectée(s), diluées de façon séquentielle (10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1}) dans du sérum physiologique stérile phénolé (sérum physiologique à 0,9% dans du phénol à 0,5%).

4) Les tests intradermiques sont réalisés sur la face d'extension des bras, en injectant un faible volume (0,04 mL) ce qui entraîne l'apparition d'une papule d'injection d'un diamètre de 4 à 6 mm. Un contrôle négatif est réalisé en pratiquant une IDR avec le soluté de dilution du principe actif. Le résultat des IDR est considéré comme positif si la papule de réaction, observée à 30 minutes, a un diamètre supérieur ou égal à 10 mm. La première IDR est réalisée avec la dilution 10^{-4}. Si les résultats sont négatifs à 30 minutes, les IDR suivantes sont réalisées, toutes les 30 minutes, avec des concentrations progressivement croissantes jusqu'à la solution pure, tant que les résultats des IDR précédentes demeurent négatifs.

5) Les lectures des IDR sont faites à 30 minutes, 6 heures et 24 heures. Si des réactions tardives sont observées, le diamètre de la papule apparue est mesuré. Quand les résultats des IDR sont négatifs à 24 heures une lecture tardive des tests est programmée une semaine plus tard. Si le patient ne peut pas être revu, un entretien téléphonique avec lui a lieu une semaine plus tard, pour confirmer la négativité des IDR.

Une biopsie des IDR médicamenteuses positives est réalisée pour différencier une réaction positive d'une irritation et les prélèvements sont conservés à -80°C après congélation immédiate dans l'azote liquide, pour réaliser secondairement des investigations immunohistochimiques complémentaires.

Conservateurs, colorants et excipients des médicaments

Les modalités des tests réalisés avec ces composants sont rapportées dans le tableau 2.

Témoins négatifs pour les investigations immunoallergologiques.

Depuis 1993, nous constituons une banque de données de résultats de tests médicamenteux chez des " témoins négatifs ".
Les patients prenant plusieurs médicaments, qui ont présenté une dermatose comprenant les médicaments étudiés dans ce travail (tableau 1), peuvent être utilisés comme témoins négatifs. Les patients sélectionnés comme témoins négatifs nécessitaient des tests avec les médicaments A et B, 6 semaines après la survenue de leur toxidermie. La responsabilité du médicament A dans la survenue de la toxidermie a pu être retenue. Le médicament B n'était donc pas responsable de la dermatose. De tels patients ont été retenus comme témoins négatifs pour déterminer le seuil irritatif des tests cutanés réalisés avec le médicament B.
De plus devant la constatation de très fréquentes irritations chez nos patients, pour les IDR réalisées avec la pénicilline G, l'érythromycine et la spiramycine, les concentrations irritantes ont été contrôlées sur 5 volontaires sains recrutés dans l'équipe médicale et para-médicale de notre service.

Tests statistiques

Les analyses statistiques, comparant l'incidence des tests positifs selon les différentes présentations cliniques initiales des toxidermies ont été réalisées avec le système Myosotis software (Coultronics France, Margency, France) avec un test Khi-2.

Tableau 1 : Dilutions utilisées pour les tests cutanés

Les préparations pour les tests épicutanés (PT) sont rapportées comme suit. Si les produits étaient obtenus sous forme de poudre, toutes les préparations ont été testées, telles quelles sous forme de poudre pure, diluée à 30% dans l'eau et à 30% dans la vaseline. Si les préparations obtenues étaient sous forme liquide, elles ont été testées telles quelles et diluées à 30% dans l'eau. Les tests intradermiques ont été réalisés avec les solutions mères dont les compositions suivent (IDR) et auparavant avec ces solutions mères diluées à 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} et 10^{-1}. Les préparations pures utilisées pour les tests épicutanés sont celles qui ont été utilisées également pour les prick tests.

- **aciclovir** : PT = pur en poudre ;
- **amiodarone** : Pt et IDR = 50mg/mL dans l'eau
- **amoxicilline** : PT = pur en poudre; IDR = 1g/2.5mL
- **ampicilline** : PT = pur en poudre
- **articaïne** : PT et IDR = 72 mg/1.8 mL
- **captopril** : PT = pur en poudre
- **carbamazépine** : PT = pur en poudre
- **céfadroxil** : PT = pur en poudre à partir du contenu de gélules commercialisées contenant lactose, silice et stéarate de magnésium ; IDR = 100 mg/mL
- **céfapirine** : PT = pur en poudre; IDR = 0.2g/mL
- **cefpodoxime** : PT = pur en poudre
- **chlormézanone** : PT = poudre à partir de comprimés commercialisés contenant aussi phosphate calcique, amidon, gélatine, saccharine.
- **cloxacilline** : PT = pur en poudre
- **co-trimoxazole** : PT and IDR = 80 mg/mL dans l'eau
- **cyamémazine** : PT and IDR = at 10 mg/mL dans une solution commercialisée contenant de l'acide acétique, acide ascorbique, polyoxy-éthylèneglycol dans l'eau.
- **danazol** : PT = pur en poudre
- **diltiazem** : PT = pur en poudre
- **doxycycline** : PT and IDR = 20mg/mL dans l'eau dans une solution commercialisée contenant du chlorure de magnésium, polyvidone et de l'amino-2-éthanol
- **énoxoparine** : PT = 100mg/mL dans l'eau
- **érythromycine** : PT = pur en poudre; IDR = **positivité spécifique seulement jusqu'à 0.2 mg/mL.**
- **estradiol** : PT = pur en poudre; IDR = 1 mg/ml après solubilisation dans l'alcool
- **fusafungine** : PT = pur en poudre
- **fluvoxamine** : PT = pur en poudre
- **glibenclamide** : PT = en poudre à partir de comprimés commercialisés contenant du lactose, amidon, talc, silice et stéarate de magnésium
- **héparine** : PT = 25 000 UI/mL dans l'eau
- **hydroquinidine** : PT = en poudre à partir du contenu d'une gélule commercialisée contenant talc, polyvidone, Eudragit L, acide méthacrylique et acide stéarique.
- **hydroxyzine** : PT = à 50mg/mL dans une solution commercialisée diluée dans de l'hydroxyde de sodium et de l'eau.

- **isoniazide** : PT = en poudre dans des comprimés commercialisés contenant lactose, amidon et stéarate de magnésium ; IDR = à 100mg/mL à partir d'une solution commercialisée contenant des parahydroxybenzoates de méthyle et de propyle.

- **josamycine** : PT = sous forme d'une poudre commercialisée contenant laurylsulfate de sodium, amidon et aspartam.

- **méthoxsalène (5-MOP)** : PT = à partir d'une solution commercialisée, dont la dilution est de 0.1g/mL, contenant de l'alcool éthylique et de l'eau.

- **norfloxacine**: PT = en poudre à partir d'un comprimé commercialisé contenant hydroxycellulose, stéarate de magnésium, dioxyde de titane.

- **paracétamol** : PT = pur en poudre; IDR = 0.1 mg/mL avec présolubilisatipon dans l'alcool.

- **pénicilline G** : PT = en poudre contenant aussi du citrate de sodium ; IDR = **positivité spécifique seulement jusqu'à 5.10^5 U/mL.**

- **pholcodine** : PT = pur en poudre

- **acide pipémidique**: PT = en poudre à partir d'une poudre commercialisée contenant carboxyméthylcellulose, stéarate de magnésium, amidon et talc

- **piroxicam** : PT = pur en poudre; IDR = 20 mg/mL

- **pristinamycine** : PT = pur en poudre

- **pseudoéphédrine** : PT = pur en poudre

- **simvastatine :** PT = en poudre sous une forme commercialisée contenant carboxyméthylcellulose, amidon, butylhydroxyanisole, acide ascorbique, acide citrique, stéarate de magnésium.

- **spiramycine** : PT = pur en poudre; IDR = **positivité spécifique seulement jusqu'à 375 UI/mL.**

- **tétrazépam** : PT = pur en poudre; IDR = 10 mg/mL

- **triamcinolone** : PT = 1% vaseline

Tableau 2 : dilutions utilisées pour les tests cutanés avec les conservateurs, colorants et excipients médicamenteux.

Les préparations pour les tests épicutanés (PT) sont rapportées avec la concentration et le véhicule utilisés. Les tests intradermiques ont été réalisés avec les solutions mères dont les compositions suivent (IDR) et auparavant avec ces solutions mères diluées à 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} et 10^{-1}.

- **alcool éthylique 95°**: PT = à 70% et 10% dans l'eau
- **alcool benzylique** : PT = 5% dans la vaseline
- **carboxyméthylcellulose** : PT = 5% dans l'eau
- **cellulose** : PT = pur en poudre
- **érythrosine** : PT = 2% dans la vaseline et 10% dans l'eau
- **gélatine** : PT = pur en poudre
- **lactose** : PT = pur en poudre et 50% dans la vaseline
- **stéarate de magnésium** : PT = pure et 10% dans la vaseline
- **parahydroxybenzoate de méthyl** : PT = 3% dans la vaseline ; IDR = 1mg/mL (10 témoins négatifs)
- **huile essentielle de néroli** : PT = 10% dans la vaseline
- **polyoxyéthylène glycol 1540** : PT = pur en poudre
- **propylène glycol** : PT = 5% dans la vaseline et 10% dans l'eau
- **saccharine** : PT = pur en poudre
- **silicate** (aérosil 200) : PT = pur en poudre
- **amidon** = PT = pur en poudre et 10% dans l'eau
- **acide stéarique** : PT = 5% dans la vaseline
- **talc** : PT = pur en poudre

Tests immunologiques in vitro

Tests non spécifiques réalisés durant la phase toxidermique

Complexes immuns circulants (Béné 1997)

Principe

La taille des complexes immuns est dépendante des proportions d'antigènes et d'anticorps les composant, c'est à dire à la fois de la dose d'antigène qui pénètre dans l'organisme et de l'intensité de la réponse immunitaire humorale de ce dernier. Les complexes formés par l'association d'anticorps et d'antigènes sont ainsi le plus souvent éliminés spontanément dans l'organisme, soit par filtration rénale s'ils sont de petite taille, soit par le système phagocytaire s'ils sont de grande taille.
La détection de complexes antigène-anticorps de taille intermédiaire, donc potentiellement pathogènes, peut être effectuée dans le sérum.
Deux types de techniques sont utilisés. Une technique totalement non spécifique repose sur la capacité des complexes immuns à précipiter dans une solution de polyéthylène glycol (PEG) à 3.5%. Il s'agit en fait d'une rupture de solubilité générée par la structure en mailles de la solution de PEG. N'importe quel système macromoléculaire de taille adéquate peut précipiter dans ce milieu. En pratique, seuls les complexes immuns circulants remplissent ces conditions dans le sérum humain.
L'autre type de technique repose sur des bases immunologiques, notamment sur la capacité des complexes antigène-anticorps à activer le complément. Des tests basés sur la fixation de C1q sont utilisés pour détecter une activation de la voie classique. La fixation de conglutinine permet de détecter l'activation de C3, commune aux voies classique et alterne.
Dans cette étude, les complexes immuns circulants ont été recherchés par précipitation au PEG, et par la mise en évidence en néphélémétrie de l'agglutination de billes de latex recouvertes de C1q humain.

Méthode

Test au PEG

Dans une cupule de néphélémétrie, 20 microlitres du sérum à tester dilué au 1/5 sont additionnés de 100 microlitres d'une solution à 7% de PEG et de 120 microlitres de tampon

borate de sodium. Après agitation, le mélange est incubé à température ambiante pendant 30 minutes. L'intensité du trouble formé est mesurée à l'issue de cette période d'incubation en néphélémétrie. La valeur obtenue est comparée à une courbe d'étalonnage réalisée avec un mélange calibré d'IgG humaines agrégées. Les résultats sont exprimés en mg/L. La valeur seuil de ce test a été fixée à 25 mg/L.

Test de fixation du C1q

Dans une cupule de néphélémétrie, 20 microlitres du sérum à tester sont additionnés de 100 microlitres d'une suspension de billes de latex recouvertes de C1q humain (Behring, Marburg, Allemagne), de 100 microlitres de tampon glycine et de 20 microlitres de PEG. Après agitation, le mélange est incubé à température ambiante pendant 30 minutes. L'intensité du trouble formé est mesurée à l'issue de cette période d'incubation en néphélémétrie. La valeur obtenue est comparée à une courbe d'étalonnage réalisée avec un mélange calibré d'IgG humaines agrégées. Les résultats sont exprimés en mg/L. La valeur seuil de ce test a été fixée à 1.5 mg/L.

Etude des sous-populations lymphocytaires

Principe

Les caractéristiques du maintien de l'homéostasie dans le système immunitaire conduisent à un contrôle efficace des populations cellulaires présentes dans les tissus et les liquides biologiques. Les taux des différents types de lymphocytes sont ainsi en proportions très similaires chez les individus en bonne santé, et des variations de ces valeurs sont de bons indicateurs des efforts du système immunitaire pour répondre à la présence d'éléments potentiellement pathogènes.
Dans ce travail, certains patients ont bénéficié d'une analyse des sous-populations lymphocytaires sanguines.

Méthode

L'identification des sous-populations lymphocytaires repose sur la mise en évidence de la fixation à la surface de ces cellules d'anticorps monoclonaux spécifiques des antigènes de différenciation caractéristiques de ces différentes classes de lymphocytes.

Les échantillons de sang doivent être analysés dans les plus brefs délais pour garantir un résultat représentatif des caractéristiques des cellules circulantes. L'échantillon de sang veineux est recueilli sur EDTA-K.

Pour préserver les cellules potentiellement fragiles, une technique de séparation douce des lymphocytes par centrifugation sur gradient de Ficoll a été appliquée à tous les échantillons. Les anticorps utilisés étaient dirigés contre CD3 pour identifier l'ensemble des lymphocytes T, CD4 pour la sous-population de lymphocytes T auxiliaires restreints de classe II, CD8 pour la sous-population de lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques restreints de classe I (Coulterclone, Miami, FL), CD57 pour les cellules à activité Natural Killer (NK) (Coulter-Immunotech, Marseille, France). Par ailleurs, les lymphocytes B ont été identifiés par la mise en évidence de la présence d'immunoglobulines à leur surface, à l'aide de Fab de chèvre anti-Fab humains (Nordic, Oslo, Norvège).

Cinq aliquotes de chaque suspension lymphocytaire obtenue ont été marqués respectivement en immunofluorescence directe pour les lymphocytes B, en immunofluorescence indirecte pour les anticorps monoclonaux spécifiques des cellules T. Les cellules marquées ont été fixées en paraformaldéhyde et analysées en cytométrie de flux (EPICS XL, Coultronics, Miami, FL). Les pourcentages de cellules marquées par les différents réactifs utilisés ont été relevés. Une numération-formule effectuée pour chaque échantillon de sang a ensuite permis d'exprimer également les résultats en valeur absolue. Les valeurs de référence du laboratoire pour ces sous-populations sont données dans le tableau ci-dessous :

CD3	70-80%
CD4	45-55%
CD8	20-30%
CD57	5-15%
sIg	8-12%
CD4/CD8	2 ± 0.2

Tests spécifiques : tests médicamenteux in vitro

Test de dégranulation des basophiles humains (TDBH)

Principe

Certaines réponses anticorps favorisent la production d'IgE. Ces immunoglobulines cytophiles se fixent spontanément sur des récepteurs spécifiques exprimés sur les mastocytes tissulaires et les basophiles sanguins. Lorsqu'une grande quantité d'IgE de même spécificité est fixée sur ces cellules et que l'antigène dont elles sont spécifiques entre en contact avec elles, le pontage des IgE induit une activation cellulaire aboutissant à la libération dans le milieu extérieur du contenu de leurs granules.

Cette réactivité peut être reproduite *in vitro*. Certains tests mesurent alors l'histamine libérée (tests d'histaminolibération leucocytaire, HLL). Ces tests isotopiques sont extrêmement sensibles et doivent être réalisés immédiatement après le prélèvement. D'autres tests reposent sur la disparition de la métachromasie des granules cellulaires, qui apparaissent en rouge après coloration au bleu de toluidine, ou bleu turquoise après coloration au bleu alcyan, dans les basophiles non dégranulés. Moins sensibles mais plus robustes, ces tests de dégranulation sont plus faciles à mettre en œuvre. Comme les HLL, ils sont toutefois susceptibles de donner des résultats positifs en présence d'agents dégranulants par un mécanisme indépendant de la fixation de l'antigène aux IgE.

Méthode

D'après la méthode décrite par Sainte-Laudy (1987), les leucocytes d'un échantillon de sang périphérique prélevé sur citrate de sodium sont recueillis dans le plasma par sédimentation spontanée. Ceci permet d'enrichir la suspension en basophiles, ces cellules sédimentant moins vite que les autres leucocytes. Sept aliquotes de cette suspension cellulaire sont ensuite incubés, dans un tampon enrichi en calcium et en magnésium, dans les puits de plaques de microtitration selon le schéma ci-dessous :

1	2	3	4	5	6	7
Tampon seul	Anti-sérum anti-IgE	Antigène dilué à 10^{-6}	Antigène dilué à 10^{-5}	Antigène dilué à 10^{-4}	Antigène dilué à 10^{-3}	Antigène dilué à 10^{-2}

L'incubation d'aliquotes de 20 microlitres de la suspension cellulaire avec 20 microlitres des différentes dilutions d'antigène est répétée pour chaque produit testé (ici les médicaments suspectés, et/ou leurs excipients). A l'issue d'une incubation de 30 minutes à 37°C, chaque puits est additionné de 180 microlitres de Bleu de Toluidine en solution dans un tampon à base d'acide acétique, permettant la perméabilisation des cellules et la coloration en rouge des granules des basophiles. Chaque suspension est ensuite montée dans une cellule de numération de type Nageotte, puis examinée au microscope pour le dénombrement des basophiles dans $1mm^3$ de suspension cellulaire. Le témoin anti-IgE permet de vérifier la présence de ces immunoglobulines sur les basophiles, et leur capacité à dégranuler. Au moins 50% des basophiles doivent être dégranulés. Les dilutions du médicament testé ne génèrent aucune variation du nombre de basophiles lorsque le test est négatif. Les tests positifs sont caractérisés par l'observation d'au moins 30% de dégranulation pour une ou deux dilutions. En effet, aux plus fortes dilutions, la quantité d'antigène est insuffisante pour réaliser un pontage efficace, et aux plus faibles dilutions, chaque site Fab reçoit son propre antigène, là encore sans pontage possible. Les agents dégranulants non IgE-dépendants n'engendrent généralement pas ce type de courbe "en cloche".

Test d'activation lymphocytaire (TAL) (Kohler 1997)

Principe

Le contact du système immunitaire avec un immunogène entraîne la génération de clones de cellules spécifiques, dont une partie persiste sous forme de cellules-mémoire. Ces cellules circulent entre les différents sites anatomiques du système immunitaire par voie lymphatique et sanguine. Leur nombre est d'autant plus élevé que la stimulation a été forte et/ou récente. Il est possible de stimuler une nouvelle prolifération de ces cellules, génératrice de nouveaux clones, en les plaçant à nouveau en contact avec l'antigène dont elles sont spécifiques, en présence d'un minimum de cellules présentatrices d'antigène. Les monocytes sanguins et les lymphocytes B du sang périphérique peuvent remplir ce rôle de présentation, et permettre l'activation et la prolifération *in vitro* de lymphocytes T.

Méthode

La technique utilisée dans ce travail repose sur une mesure cinétique de l'activation lymphocytaire *in vitro* (Kohler 1997). Les lymphocytes du sang périphérique sont isolés stérilement sur gradient de Ficoll. La suspension cellulaire obtenue est ajustée à 10^6/mL dans un milieu composé de RPMI, d'un supplément nutritif (à base d'inuline, ne contenant pas de sérum albumine) (Ultroser, Gibco, Cergy Pontoise) et d'antibiotiques (pénicilline 10 000 U/ml, streptomycine 10 000 U/ml et fungizone 25 µg/ml) (Gibco). Pour chaque échantillon testé, deux cultures-témoins sont réalisées. Un puits de culture est préparé avec seulement la suspension cellulaire diluée au ½ dans ce milieu. Un témoin positif est réalisé dans un autre puits de culture en diluant la suspension cellulaire au ½ avec une solution de phytohémagglutinine (PHA) à 1 µg/mL. Ce mitogène est capable d'activer la prolifération de tous les lymphocytes T, et permet d'apprécier la capacité des cellules isolées à se multiplier *in vitro*. Enfin, pour chaque produit (médicament ou excipient) testé, un puits de culture est préparé en diluant la suspension cellulaire au ½ avec une solution stérile au 1/100 préparée dans le milieu de culture.

Les plaques de culture sont incubées stérilement à 37°C dans une étuve supplémentée de 6% de CO2 et saturée en vapeur d'eau pendant 6 jours.

La prolifération cellulaire est appréciée en **cytométrie de flux**, après perméabilisation de la membrane et marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (DNA Prep, Coultronics, Miami, FL) par mesure de la quantité d'ADN et analyse du cycle cellulaire, dans chaque échantillon, à J3, J4, J5 et J6. L'analyse du cycle cellulaire est effectuée par le logiciel M-Cycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

Chaque échantillon présentant un pourcentage de cellules en phase S égal ou supérieur à 2 fois la valeur notée pour les cellules du puits-témoin ne contenant que le milieu de culture est considéré comme positif. Selon les patients et selon les produits, le pic de prolifération peut être noté à l'un ou l'autre des jours de lecture. Le témoin-PHA présente le plus souvent un pic de prolifération maximale à J3.

Critères d'imputabilité (Bégaud 1985, Moore 1985)

Ils sont établis au décours de la toxidermie et revus lors des conclusions du bilan par le Dr Ph. Tréchot du laboratoire de Pharmacologie et le Dr A. Barbaud du service de Dermatologie du CHU de Nancy.

L'imputabilité intrinsèque et l'imputabilité extrinsèque sont déterminées selon les critères de Bégaud *et coll.* (1985) ou Moore *et coll.* (1985). Pour évaluer l'intérêt des tests médicamenteux cutanés et des tests médicamenteux in vitro, pour déterminer l'imputabilité de chaque médicament nous ne tenons compte que des données cliniques, chronologiques et bibliographiques. Les résultats des investigations complémentaires quelsqu'ils soient ne sont pas pris en compte pour calculer cette imputablité.

Nous rappelons que ce protocole d'investigation, a été soumis et approuvé par le **Comité de Protection des Personnes vis à vis des Recherches Biologiques Humaines du CHU de Nancy (Accord daté du 08 Juin 1995).**

Etudes immunologiques des toxidermies

Présentation antigénique, adhésion et apoptose *in situ* dans les toxidermies.

Immunophénotypage in situ des cellules immunocompétentes impliquées dans les toxidermies.

Ces analyses ont été réalisées sur coupes en congélation, par technique d'immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux, sur des biopsies conservées à -80°C, provenant de **toxidermies et/ou de tests cutanés médicamenteux positifs**.

Les anticorps monoclonaux utilisés pour l'étude de chaque cellule cutanée immunocompétente ont été les suivants :

Kératinocytes

- HLA DR (Coulterclone, Hialeah, Fl, USA)
- CD54 (ICAM 1) (Immunotech, Luminy, France)
- CD 62L (L selectin) (LECAM 1) (Becton Dickinson, Moutainview, Ca, USA)

Cellules dendritiques présentatrices d'antigène (CPA)

- CD1a (Coulterclone)
- HLA DR (Coulterclone)

Lymphocytes

- CD3 (Coulterclone)
- CD4 (Coulterclone)
- CD8 (Coulterclone)

Pour étudier l'état d'activation des cellules T impliquées :

- CD25 récepteur pour l'IL 2 (Coulterclone)
- CD11a-CD18 (LFA 1) (Immunotech)
- CD 62L (L sélectine) (LECAM 1) (Becton Dickinson)

Endothéliocytes

- CD106 (VCAM 1) (Immunotech)
- CD 54 (ICAM 1) (Immunotech)
- CD62E (E sélectine, ELAM 1) (Becton Dickinson)
- CD 62P (P sélectine, GMP 140) (Becton Dickinson)

Le tableau 3 résume les marquages des anticorps monoclonaux utilisés dans cette étude.

Etude de l'apoptose

- marqueur d'apoptose CD95 (Fas = Apo-1) (Immunotech)
- marqueur de défense contre l'apoptose : Bcl2 (Dako)

	Kératinocytes	Cellules dendritiques et de Langerhans	Lymphocytes	Endothéliocytes
HLA-DR	Activés	Constitutif	Activés	Activés
CD54	Activés	Activées		Activés
CD1a		Constitutif		
CD3			Cellules T	
CD4			sous-population T	
CD8			sous-population T	
CD62E				Activés
CD62P				Activés
CD62L			Activés	
CD25			Activés	
CD11a			Constitutif	
CD106				Activés

Tableau 3 : Expression des antigènes de différenciation et des molécules d'adhésion étudiés dans cette série dans la peau normale ou lors de réactions inflammatoires cutanées.

Technique d'immunofluorescence indirecte

Sur les biopsies cutanées conservées en congélation à -80°C, des coupes de 4 microns d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryomicrotome réfrigéré à -30°C. Après réhydratation des coupes dans un tampon salin (PBS = phosphate-buffered saline) durant 5 minutes, l'incubation est réalisée avec les anticorps monoclonaux (Ig de souris, 0,2 à 0,5 mL par coupe) tels qu'ils ont été décrits dans le paragraphe précédent, en chambre humide à température ambiante, durant 30 minutes.

Après 3 lavages dans du PBS, les coupes sont incubées à température ambiante, durant 30 minutes, avec un anti-sérum de mouton anti-Ig de souris conjugué à la fluorescéine (au 1:50 dans du PBS ; Dako). Les coupes sont ensuite rincées 3 fois dans une solution de PBS, montées dans une solution de PBS et de glycérol, puis en aveugle, sont examinées avec un microscope à fluorescence (BH2, Olympus, Tokyo, Japon).

Clonalité des cellules lymphoïdes T infiltrantes dans les toxidermies.

La définition de la clonalité des réponses cellulaires T aux médicaments a été abordée *in vivo* sur les prélèvements réalisés chez les patients au niveau des lésions et sur les tests cutanés.

Elle utilise une méthode d'analyse du réarrangement des chaînes gamma du TCR par PCR et électrophorèse en gel dénaturant, technique qui n'a été appliquée pour l'instant, qu'à l'étude de proliférations lymphoïdes tumorales (Théodorou 1996, Cordel 1997, Delfau 1997).

La technique repose sur une extraction d'ADN à partir de biopsies cutanées, suivie d'une amplification par PCR du segment réarrangé comportant les gènes Vγ et J du récepteur pour l'antigène des cellules T (TCR) et révélation d'une éventuelle monoclonalité par migration électrophorétique de l'ADN en conditions dénaturantes. La position des brins d'ADN amplifiés est révélée par coloration du gel d'électrophorèse au bromure d'éthidium.

Cette technique a pour objectif de rechercher si les lymphocytes cutanés infiltrants dans les toxidermies témoignent d'une réponse monoclonale, oligoclonale ou polyclonale. La technique utilisée suit celle décrite par Théodorou *et coll.* (1996).

Méthode

Extraction d'ADN

L'ADN est préparé par digestion par la protéine kinase et extraction par phénol/formol.

Une partie des biopsies conservées en congélation ont été broyées au potter, après décongélation à température ambiante, mises en suspension dans 20 µl de Tris-extraction buffer. Une digestion protéique est réalisée par adjonction de Protéinase K durant 15 mn à 50°C. La protéinase K est ensuite inactivée par chauffage à 95°C durant 20 secondes.

Trois cycles d'extraction de l'ADN au phénol sont effectués selon les modalités suivantes : adjonction de 500 µl de phénol, agitation manuelle douce durant 5 minutes suivie d'une centrifugation à 3500 tours/minutes, à 4°C, durant 5 minutes puis recueil du surnageant.

Un quatrième cycle pour éliminer les résidus phénolés est effectué par adjonction de 700 µl de chloroforme, agitation manuelle de 5 minutes puis centrifugation à 3500 tours/minute, à 4°C, durant 5 minutes suivi d'un recueil du surnageant.

Le surnageant est mis en présence de 1 ml d'éthanol à 96°, centrifugé à 10 000 tours/minute, à 4°C durant 58 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est reconstitué par adjonction de 10 ml de NaCl 5M et conservé à -80°C.

Amplification des gènes Vγ et J du TCR par PCR.

L'ADN extrait est placé dans 5 µl de tampon Tris à pH 8,3, dans un tampon de réaction à base de chlorure de magnésium 2,5M, auquel sont ajoutés : 40 pmol de chaque amorce, 1,5 Unités de Taq polymérase, 1 U d'Uracil DNA glycosylase (Gibco BRL, Gaithersburg, Ma, USA), 200 µM de chaque base dATP, dGTP, dCTP et 400 µM d'UTP pour un volume final de 50 µl.

Les 8 amorces (Vγ I, Vγ II, Vγ III, Vγ IV, J1, JP, JP1 et JP2) ont été fabriquées par Genset (Paris, Fr) et sont identiques à celles utilisées par Théodorou *et coll.* (1996).

Pour détruire les produits d'amplification spontanés le mélange est porté à 50°C durant 10 minutes.

La PCR est réalisée en thermocycleur, par 40 cycles selon les modalités suivantes : dénaturation de l'ADN par chauffage à 94°C durant 1 minute, hybridation des amorces durant

1 minute à 56°C, élongation par la Taq polymérase durant 2 minutes à 72°C. La PCR est interrompue par refroidissement à 4°C.

Analyse des fragments VJ amplifiés par DGGE.

Une migration électrophorétique de 30 µl de produits d'amplification est réalisée sur gel de gradient dénaturant : gel de polyacrylamide à 6,5% contenant un gradient dénaturant de 10-60 pour cent (100% dénaturant = urée 7M et 40% volume/volume formamide) dans du tampon TAE (40mM Tris base, 20mM d'acétate de sodium, EDTA sodique 1mM, pH 7,4), dans une cuve d'électrophorèse-DGGE (Biorad, Richmond, USA) à 150V durant 4 à 5 heures à 54°C.
A l'issue de l'électrophorèse, le gel est coloré par immersion durant 10 minutes dans du bromure d'éthidium (photosensible à 254 nm) et les bandes éventuellement objectivées sont photographiées sous illumination par lampe UVC.

Etude de CD62L épidermique.

Détermination de la masse moléculaire de l'antigène reconnu par le CD62L sur les kératinocytes par précipitation et Western-Blot.

L'observation inattendue d'une expression épidermique de CD62L nous a conduits à rechercher la masse moléculaire de cette molécule, par précipitation et Western-Blot, pour vérifier s'il s'agissait d'une réactivité croisée ou de l'expression de cette sélectine par les kératinocytes.

Méthode

L'ensemble de la punch biopsie a été décongelé, broyé en Potter dans un tampon d'extraction protéique constitué de PBS, de Tween et de Nonidet, puis incubé durant 1 heure à 4°C dans le même tampon d'extraction. Un extrait protéique soluble a été obtenu après centrifugation à 2000 tours /mn durant 30 mn. Le surnageant a ensuite été utilisé pour une technique d'immunocapture par un anticorps monoclonal CD62L (Becton Dickinson, Mountainview, Ca, USA). Cent microlitres du surnageant ont été incubés avec 10 microlitres d'anticorps, pendant une heure à 4°C.

Après 3 lavages dans du tampon Tris-HCl, 100 µl de protéine A-Sépharose (SIGMA) en Tampon Tris (100 µg de protéine A) ont été ajoutés à 30 µl de l'extrait incubé avec l'anticorps monoclonal et incubés 3 heures à T° ambiante. Après 3 lavages de 20 mn chacun puis une centrifugation à 2000 tours/mn, à 4°C dans 200 µl de tampon Tris HCl-pH7 0,1M, le culot de centrifugation a été recueilli. Ce culot contient la Protéine A sépharose ayant capté le Fc des Ig monoclonales et les antigènes éventuellement fixés par ces dernières. Pour identifier cet antigène, une électrophorèse SDS-PAGE sur Phast gel, gradient 10-15, du culot a été réalisée, en conditions dénaturantes, suivie d'un électrotransfert sur membrane de polyvinyldifluoride (PVDF).

Cette membrane a permis la réalisation d'un Western Blot pour rechercher la présence de CD62L dans le culot. Après un surcoating par la sérum albumine bovine (SAB) (PBS + 1% SAB + 0,1% Tween 20) et incubation durant 30 mn à T° ambiante, la membrane a été incubée durant 1 heure avec 10 µl d'anticorps monoclonal de souris CD62L dilué dans 3mL de PBS+1%SAB.

Puis 3 lavages de 5 mn en PBS ont été réalisés pour éliminer le monoclonal ainsi fixé. La révélation de la fixation de l'anticorps à CD62L a été réalisée selon les étapes suivantes :

- incubation de la membrane avec des AC polyclonaux de mouton anti IgG de souris (DAKO) conjugués à la péroxydase, dilués au 1/1000ème dans 25 mL de PBS.
- adjonction de 25 µl d'eau oxygénée (substrat de la peroxydase) et de 20 mg de diamino-3,3'-benzidine tétrachlorhydrate (chromogène) dans 10 mL de Tampon Tris 0,1 M-pH 7,5.
- adjonction de 3 mL de chlorure de nickel à 3% puis de 25 µl d'eau oxygénée.

PREMIERE ETUDE : RÔLE DE L'HYPERSENSIBILITÉ CELLULAIRE RETARDÉE ET EXPRESSION DES MOLÉCULES D'ADHÉSION DANS LES EXANTHÈMES MACULO-PAPULEUX INDUITS PAR L'AMOXICILLINE

OBJECTIFS

Des biopsies cutanées ont été réalisées chez cinq patients ayant développé un exanthème maculo-papuleux (EMP) induit par l'amoxicilline. L'immunophénotypage réalisé sur ces biopsies a été comparé à celui obtenu sur les tests cutanés (tests épicutanés, prick tests avec positivation tardive, IDR avec positivation tardive) chez ces mêmes patients.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Patients

Cinq patients (2 femmes et 3 hommes, d'âge moyen = 56 ans) qui ont développé une EMP après la prise d'amoxicilline (Clamoxyl®500, Laboratoire Beecham Sevigné, Paris, France) ont été inclus dans cette étude. Le traitement par amoxicilline avait été prescrit pour un syndrome oro-pharyngé dans 4 cas, pour une pyélonéphrite aiguë dans le 5ème cas (patient#1). Selon les critères de Bégaud *et coll.* (1985) ou Moore *et coll.* (1985) l'imputabilité de l'amoxicilline était très probable dans la survenue de l'EMP, y compris chez les 2 patients qui n'ont pas développé ultérieurement de test cutané médicamenteux positif. Les examens biologiques étaient normaux chez tous les patients en dehors d'une cytolyse hépatique transitoire avec élévation des transaminases (doublement des taux de l'alanine aminotransférase et de l'aspartate aminotransférase) accompagnée d'une hyperéosinophilie observée chez un des patients (patient #3).

Tous les patients ont donné leur consentement éclairé pour la réalisation des investigations immuno-allergologiques et les biopsies cutanées.

Les investigations réalisées durant la phase toxidermique sont celles qui ont été décrites dans le chapitre " Matériel et Méthodes ". Elles ont comporté le bilan biologique (investigations immunologiques, infectieuses), deux biopsies cutanées l'une pour examen histologique, l'autre pour immunofluorescence (IF) directe et immunophénotypage par immunofluorescence indirecte (IFI).

L'immunofluorescence directe a pu être réalisée sur les 5 biopsies, l'IF indirecte a pu être effectuée sur 4 des 5 biopsies.

Les anticorps monoclonaux utilisés en IFI ont été :
HLA DR, CD1, CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD11a-CD18/LFA 1, CD49d-CD29/VLA4, CD54/ICAM 1, CD106/VCAM 1; CD31/PECAM 1, CD62E/ELAM 1 (E Sélectine), CD62L/LECAM 1 (L Sélectine), CD62P/GMP 140 (P Sélectine).

Tests effectués à distance de la survenue de la toxidermie

Chez les 5 patients le bilan immuno-allergologique a été réalisé au minimum 6 semaines après la survenue de la toxidermie.
La recherche des IgE spécifiques a été réalisée selon la technique classique (Ceska 1972) du radioallergosorbent test (RAST), en utilisant des disques commercialisés par Pharmacia (Uppsala, Sweden) sur lesquels étaient préalablement fixées de la pénicilline G ou V ou des molécules d'ampicilline et d'amoxicilline.
Des TDBH en présence de CLAMOXYL 500® ou d'amoxicilline ont été réalisés selon la technique de Sainte-Laudy (1987), décrite dans le chapitre " Matériel et Méthodes ".

Tests cutanés

Suivant la méthodologie décrite dans le chapitre " Matériel et Méthodes " les tests cutanés ont été réalisés chez les 5 patients.
Les **prick tests** ont été réalisés en utilisant une solution d'amoxicilline (Laboratoires Smith-Kline-Beecham, Paris, France) diluée à 1g/2.5 ml dans du sérum physiologique. Les résultats des lectures faites à 20 minutes et 24 heures ont été comparés à ceux des témoins négatifs (sérum physiologique à 0,9%) et positif (phosphate de codéine à 9%).
Les **tests épicutanés** ont comporté la batterie standard ICDRG, des tests avec de l'amoxicilline (Laboratoires Smith-Kline-Beecham) testée pure et diluée à 50% dans la vaseline. Les tests ont été posés sur le dos des patients sur des supports Finn Chamber sur support Scanpor®, lus à 20 minutes, 48, 72 et 96 heures. Leurs résultats ont été rapportés selon les critères de lecture de l'ICDRG (Adams 1990).

Les tests intradermiques (IDR) ont été réalisés avec une solution-mère d'amoxicilline préparée à 1g/2.5 mL dans du sérum physiologique, et testée de façon séquentielle à des dilutions progressives (10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1}) faites dans du sérum physiologique phénolé salin (phénol à 0.5% dans du sérum physiologique à 0.9%) stérile. Les résultats des IDR ont été lus à 30 mn (positives si le diamètre de réaction a un diamètre de plus de 10 mm) et à 24 heures. Le diamètre des papules de réactions, éventuellement observées à 24 heures a été mesuré. Quand les IDR étaient négatives à 24 heures un appel téléphonique du patient a été fait, 1 semaine après la réalisation des tests, pour s'assurer de l'absence de positivité tardive des IDR.

La population de témoins négatifs pour ces investigations cutanées à l'amoxicilline comporte actuellement 59 témoins négatifs pour les tests épicutanés à l'amoxicilline, 42 témoins négatifs pour les prick tests à l'amoxicilline et 22 témoins négatifs pour les IDR à l'amoxicilline. Ces témoins négatifs tels qu'ils ont été définis dans le chapitre " Matériel et Méthodes " étaient tous des patients ayant bénéficié d'investigations immuno-allergologiques vis à vis de ce médicament, 6 semaines après la prise d'amoxicilline.
Chez les patients qui ont eu des résultats positifs de leurs tests cutanés, des biopsies cutanées de ces tests ont été réalisées avec consentement éclairé des patients.

RESULTATS

Il n'existait aucune anomalie immunologique sérique chez ces patients. Les taux des Ig et des fractions du complément étaient normaux, il n'y avait pas de complexes immuns circulants. Les sous-populations lymphocytaires étaient normales. Les sérologies virales étaient négatives ou témoignaient de séroprotections anciennes. Des antécédents atopiques étaient retrouvés chez un seul des patients (patient #5), qui avait des prick tests positifs aux poussières de maison et *Dermatophagoides pteronyssinus.*

L'examen histologique des biopsies faites en phase toxidermique objectivait un épiderme normal ou siège d'une exocytose lymphocytaire très modérée. Les infiltrats dermiques étaient périvasculaires, modérés, mononucléés et contenaient quelques polynucléaires éosinophiles. Il n'y avait pas de vascularite leucocytoclasique.

Les résultats de l'examen en immunofluorescence directe étaient négatifs sauf chez un patient. Dans ce cas (patient #3), il existait des dépôts linéaires d'IgM à la jonction dermo-épidermique et des dépôts de C3 dans les vaisseaux.

Les résultats de l'immunofluorescence indirecte (tableau 4) étaient comparables chez tous les patients, y compris chez les 2 patients qui n'ont pas développé ensuite de tests cutanés positifs. Les kératinocytes étaient activés exprimant CD54 (ICAM 1) (figure 5) et HLA DR. Les infiltrats périvasculaires, riches en lymphocytes, étaient composés principalement de lymphocytes T CD4+ et d'environ 30% de cellules CD8+. Les cellules endothéliales paraissaient activées et présentaient une forte expression de CD54 (ICAM 1) et de CD62E (E sélectine) (figure 1) mais sans expression de CD106 (VCAM 1).

Les résultats des RAST à la pénicilline G, pénicilline V, à l'amoxicilline et à l'ampicilline étaient négatifs. Les TDBH à l'amoxicilline étaient également négatifs.
Les résultats des tests épicutanés de la batterie standard des tests ICDRG étaient tous négatifs. Trois patients ont eu des tests positifs à l'amoxicilline sur les lectures réalisées à 48 et 96 heures. Aucun des 59 témoins négatifs n'a développé de réaction immédiate ou tardive des tests épicutanés à l'amoxicilline.

Chez 2 des 5 patients une réaction eczémateuse a été observée sur le site de réalisation des prick tests à 24 heures. Aucune réaction retardée à 24 heures n'a été observée sur le site des prick tests réalisés avec les témoins négatifs (sérum physiologique) ou positifs (codéine). Aucun des 42 sujets témoins négatifs n'a eu de réaction immédiate ou retardée des prick tests à l'amoxicilline.
Chez 3 patients les tests intradermiques (réalisés chez les 5 patients jusqu'à la solution pure) étaient positifs sur la lecture tardive des IDR faite à 24 heures. Aucun des 22 témoins négatifs n'a développé de réaction, immédiate ou retardée, des IDR à l'amoxicilline.
Les résultats des tests cutanés sont rapportés dans le tableau 5. Aucun patient n'a développé de réaction immédiate des tests cutanés. Il n'y a pas eu de réactivation de l'exanthème maculo-papuleux lors de la pratique des tests cutanés.

Des biopsies cutanées ont pu être réalisées, à 48 heures, chez les 3 patients qui ont eu des tests épicutanés positifs à l'amoxicilline, à 24 heures chez les 3 patients ayant eu des IDR positives tardivement à l'amoxicilline (sur le site de la solution diluée à 10^{-1}, donc amoxicilline à 0,1g/2,5mL) et chez un des 2 patients qui avaient des prick tests positifs à 24 heures.
Les résultats (rapportés dans le tableau 6) d'immunophénotypage sur les sites de ces tests positifs étaient comparables à ceux observés sur les biopsies cutanées obtenues lors de la toxidermie. Il est important de noter que le patient#5, qui n'avait pas eu d'immunophénotypage de sa toxidermie, avait des résultats d'immunophénotypage des biopsies des tests médicamenteux positifs identiques à ceux des autres patients. Il y avait également des résultats d'immunophénotypage très comparables entre les différents types de tests cutanés médicamenteux positifs.

La discussion des résultats de cette étude sera faite dans le Chapitre " Discussion Générale ".

	cas 1	cas 2	cas 3	cas 4	cas 5
IFD	-	-	IgM à la JDE	-	-
	-	-	C3 vasc	-	-
IFI					
CL épidermiques CD1+	normal	normal	normal	diminué	nf
Kératinocytes					
HLA-DR	+	+	+	+	nf
CD54/ICAM 1	+	+	+	+	nd
Lymphocytes épidermiques					
CD2+CD3+CD8+	-	-	+	-	nf
Lymphocytes périvasculaires					
CD2+CD3+CD4+	++	++	++	++	nf
CD2+CD3+CD8+	+/-	+/-	+/-	+/-	nf
CD11a-CD18/LFA1	+	+	+	+	nf
HLA-DR	-	+	-	+	nf
CD62L/LECAM1	+	-	-	-	nf
CD25	-	-	-	-	nf
CD49d-CD29/VLA4	-	-	-	-	nf
Cellules endothéliales					
CD54/ICAM1	+	+	+	+	nf
CD62E/ELAM1	++	++	++	++	nf
CD31/PECAM1	+	+/-	+	+	nf
CD62P/P sélectine	+	+	+	-	nf
CD106/VCAM1	-	-	-	-	nf
délai	5 j.	7 j.	11 j.	7 j.	11j.

Tableau 4 : résultats immunologiques du phénotypage effectué sur les biopsies réalisées lors de l'exanthème maculo-papuleux induit par l'amoxicilline.

CL : Cellules de Langerhans ; les taux normaux de cellules Langerhans CD1 positives dans l'épiderme étaient de 100 à 400 cellules/mm2 ; nf : non fait; délai : délai séparant la date d'apparition de l'exanthème maculo-papuleux et la date de réalisation de la biopsie cutanée.

	Prick tests		Tests intradermiques		Patch-tests	
	20 mn	24 H	20 mn	24 H	20 mn	48 and 96H
Cas 1	-	+	-	+ (dès 10^{-2})	-	+
Cas 2	-	-	-	+ (dès 10^{-2})	-	+
Cas 3	-	-	-	-	-	-
Cas 4	-	-	-	-	-	-
Cas 5	-	+	-	+(dès 10^{-3})	-	-

Tableau 5 : résultats des lectures, faites à 20 minutes et 24 heures, des tests cutanés effectués avec l'amoxicilline.

Pour les tests intradermiques, les réactions positives retardées ont été observées avec différentes dilutions d'amoxicilline (1g/2.5 ml) ; dilutions à 10^{-1} ; 10^{-2} et même 10^{-3} de la solution pure.

		Patient 1		Patient 2		Patient 5	
	prick	IDR	patch	IDR	patch	IDR	patch
IFD	-	-	-	-	-	-	-
IFI							
CL CD1+	Nal	Nal	Nal	Nal	Nal	Nal	Nal
Kératinocytes							
CD54/ICAM1	+	+	+	+	+	+	+
HLA-DR	-	-	-	-	+	-	-
Lymphocytes épidermiques							
CD2+CD3+CD8+	-	-	-	-	-	-	-
Lymphocytes périvasculaires							
CD2+CD3+CD4+	+	+	+	+	+	+	+
CD2+CD3+CD8+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
CD11a-CD18/LFA1	+	+	+	+	+	+	+
HLA-DR	-	-	-	-	+	-	-
CD62L/LECAM1	-	-	+	+/-	+/-	+	-
CD25	-	-	-	-	-	-	-
CD49d-CD29/VLA4	-	-	-	-	-	-	-
Cellules endothéliales							
CD54/ICAM1	++	++	++	++	++	++	++
CD62E/ELAM1	++	++	++	++	++	++	++
CD31/PECAM1	+	+	+	+	+	+	+
CD62P/P sélectine.	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
CD106/VCAM1	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 6 : résultats immunohistologiques des biopsies cutanées effectuées sur les tests cutanés à l'amoxicilline positifs.

LC : cellules de Langerhans ; les taux normaux de cellules de Langerhans épidermiques CD1 positives étaient de 100 à 400 cellules/mm2. Les biopsies cutanées ont été faites 24 heures après la réalisation des prick tests ou des IDR et 48 heures après la pose des tests épicutanés.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude clinique et immunohistologique sont en faveur de l'existence de mécanismes immunitaires d'hypersensibilité cellulaire retardée médiée par les cellules T à l'origine des exanthèmes maculo-papuleux dus à l'amoxicilline. Ces mécanismes font intervenir une forte expression de certaines molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et les cellules infiltrantes. Ces résultats soulignent également l'importance des lectures tardives des tests cutanés médicamenteux, en particulier à l'amoxicilline, qu'il s'agisse bien sûr des tests épicutanés mais également des prick tests et des IDR.

DEUXIEME ETUDE : INTERET DES TESTS CUTANES MEDICAMENTEUX DANS LE DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE DES TOXIDERMIES, EVALUE PAR UNE ETUDE PROSPECTIVE.

OBJECTIFS

Les tests cutanés effectués avec le(s) médicament(s) suspecté(s) responsable(s) dans le déclenchement d'une toxidermie sont parfois réalisés à visée diagnostique dans le bilan étiologique de ces accidents médicamenteux. L'intérêt de ces tests n'a pratiquement jamais été évalué par des études prospectives. Cette étude a été réalisée pour :

* faire une première évaluation de l'intérêt global de ces tests dans le monitorage d'une toxidermie,

* évaluer l'intérêt respectif de chaque type de test cutané en fonction du médicament en cause et de la sémiologie initiale de la toxidermie.

* enfin une première évaluation de la sensibilité de ces tests et la détermination de la spécificité de certains tests devrait pouvoir être établie sur cette série.

Cette série est à notre connaissance la première étude prospective chez des patients strictement sélectionnés, rapportant les résultats de 3 types de tests cutanés avec 37 médicaments différents et 11 types de sémiologie, comprenant la comparaison des résultats à ceux observés chez des témoins négatifs originaux quand à leur modalités de recrutement.

MATERIEL ET METHODES

Patients

Trois cent dix patients ont été inclus dans ce protocole tel qu'il a été décrit dans le chapitre " Matériel et Méthodes ". Pour chaque patient inclus les caractéristiques cliniques de la toxidermie ont été déterminées et classées. L'imputabilité de chaque médicament pris avant ou au décours de la survenue de la toxidermie a été calculée, selon les critères de Bégaud *et coll.* (1985) ou Moore *et coll.* (1985). A partir de cette population nous avons pu isoler une sous-population de 72 patients répondant aux critères d'inclusion de cette étude portant sur l'intérêt des tests. Les critères d'inclusion de ces patients sont rapportés dans le tableau 7.

Tous les patients inclus avaient une imputabilité très probable d'un seul médicament dans la survenue de leur toxidermie et ont pu bénéficier de tests épicutanés médicamenteux avec le médicament suspecté 6 à 10 semaines après la survenue de leur toxidermie. Trente et un de ces 72 patients ont eu, au moins, deux épisodes du même type de toxidermie survenu au décours de la reprise du même médicament (réintroduction accidentelle).

Les caractéristiques cliniques de ces 72 patients (24 hommes, 48 femmes, âge moyen = 52,3 ans, écart type = 21,4 ans) étaient réparties comme suit : 21 exanthèmes maculo-papuleux (EMP), 6 exanthèmes maculo-papuleux avec composante purpurique, 14 urticaires, 4 urticaires associées à un oedème de Quincke, 7 érythrodermies, 8 eczémas généralisés, 1 eczéma localisé, 4 photosensibilisations, 3 érythèmes pigmentés fixes (EPF), 3 prurits et une pustulose aiguë généralisée (PEAG) (tableaux 8,9,10). Les médicaments en cause étaient des agents anti-infectieux dans 42 cas : béta-lactamines dans 21 cas (tableau 8), macrolides et apparentés dans 14 cas, triméthoprime-sulfaméthoxazole dans 2 cas, quinolones dans 2 cas ; doxycycline, aciclovir, isoniazide chacun dans 1 cas (tableau 9). Les médicaments en cause dans les 30 autres cas de toxidermie sont rapportés dans le tableau 10.

Tests épicutanés

Les tests épicutanés ont été réalisés selon les modalités décrites dans le chapitre " Matériel et Méthodes ", avec pour chaque patient les tests épicutanés de la batterie standard ICDRG, et le médicament en cause dans la survenue de la toxidermie (tableau 1), sous la forme commercialisée qui avait été administrée lors de la survenue de l'accident cutané. Au total, sur cette population, 37 médicaments différents ont été testés. Pour 27 médicaments il a de plus été possible de tester la molécule active du médicament responsable sous sa forme pure, diluée à 30% dans l'eau et à 30% dans la vaseline. Enfin un grand nombre d'excipients, conservateurs et colorants des médicaments incriminés ont pu être testés séparément selon des modalités détaillées dans le tableau 2.

Dans 3 cas d'EPF, en plus de la pose de tests épicutanés médicamenteux sur le dos des patients, des tests épicutanés avec le médicament et les excipients, ont été appliqués sur le site pigmenté séquellaire de l'EPF.

Les résultats des tests épicutanés ont été lus à 20 minutes, 48, 72 et 96 heures. Les résultats des tests épicutanés ont été rapportés selon les critères de lecture préconisés par l'ICDRG (Adams 1990).

Prick tests

Dans 46 cas, les prick tests ont été réalisés, sur la face antérieure de l'avant bras, avec le médicament responsable de la toxidermie. Quand cela était possible, le produit actif pur et les excipients ont été testés séparément sous forme pure. Dans les cas où la toxidermie initiale était une urticaire, les prick tests ont été réalisés avec des dilutions progressivement croissantes du médicament responsable avec les mêmes solutions que celles utilisées pour les IDR, en utilisant des dilutions à 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1} puis la solution-mère pure. En dehors des cas d'exploration de toxidermies à l'amoxicilline et d'un cas de toxidermie due à la pseudo-éphédrine (#68), les prick tests n'ont été pratiqués qu'en cas de négativité des tests épicutanés (sur la lecture réalisée à 48 heures).
Dans 2 cas (patients#20, 58) bien que les tests épicutanés soient demeurés négatifs, les prick tests n'ont pas été réalisés en raison du refus des patients concernés de poursuivre les investigations.
Les réactions des prick tests ont été comparées à celles observées avec les témoins négatifs (sérum physiologique à 0,9%) et positif (phosphate de codéine à 9%). Les lectures ont été réalisées à 20 minutes et 24 heures.

Tests intradermiques

Les tests intradermiques (IDR) ont été réalisés seulement quand les prick tests médicamenteux étaient négatifs sur la lecture effectuée à 20 minutes. Les modalités et règles suivies pour la pratique des IDR ont été strictement celles décrites dans le chapitre " Matériel et Méthodes ". En raison de la non mise à disposition de formes pures et stériles de josamycine, pristinamycine et d'acide pipémidique ces trois médicaments n'ont pas pu être testés, et ce malgré la négativité des tests épicutanés et des prick tests effectués avec ces médicaments, chez les patients concernés. Enfin 3 patients (#21, 25, 37) n'ont pas accepté la réalisation des IDR car ils ont jugé que ces tests étaient trop longs et trop contraignants.

Les médicaments, les excipients testés, la nature et la concentration finale de la solution mère réalisée pour la pratique des IDR sont rapportés dans le tableau 1.
Les IDR ont été réalisées sur la face externe du bras, en injectant un faible volume (0,04 mL) de la solution testée entraînant l'apparition d'une papule d'injection de 4 à 6 mm de diamètre.
Le témoin négatif des IDR avait la même composition que la solution mère, le médicament testé en moins.
Les IDR étaient lues à 30 minutes, 6 heures et 24 heures selon les critères de positivité décrits dans le chapitre " Matériel et Méthodes ". Quand les IDR étaient négatives à 24 heures, une lecture tardive était réalisée à 1 semaine ou au minimum un entretien téléphonique était programmé avec le patient pour s'assurer de la négativité définitive des IDR.

Conservateurs, colorants et excipients médicamenteux

Les modalités de testage de ces composants des médicaments dans leurs formes commercialisées sont rapportés dans le tableau 2.

Témoins négatifs

Les témoins négatifs rapportés dans cette étude et dont les résultats des tests sont rapportés dans le tableau 11, ont tous été recrutés selon les modalités décrites dans le chapitre " Matériel et Méthodes ". Il s'agissait de patients ayant pris un médicament X appartenant à la liste des médicaments inclus dans cette étude, et qui 6 semaines après l'arrêt du médicament X ont bénéficié de tests cutanés médicamenteux avec ce produit pharmaceutique. Au terme de tout le bilan la responsabilité du médicament X avait pu être écartée.
De plus devant la constatation de très nombreuses irritations lors de la réalisation d'IDR avec la pénicilline G, l'érythromycine et la spiramycine, les concentrations irritantes ont été confirmées et contrôlées en réalisant des IDR avec ces 3 antibiotiques chez 5 volontaires sains.

Statistiques

Les analyses statistiques, comparant l'incidence des tests positifs en fonction des manifestations cliniques initiales de la toxidermie, ont été réalisées en utilisant le logiciel Myosotis (Coultronics-France, Margency, France) par un test du Khi-2.

RESULTATS

Les résultats obtenus sont rapportés comme suit : tableau 8 pour les bêta-lactamines, tableau 9 pour les autres agents anti-infectieux ; tableau 10 pour les autres médicaments et tableau 11 pour les témoins négatifs.

Tests épicutanés

Aucun patient n'a développé de réaction immédiate lors de la réalisation des tests épicutanés médicamenteux. Vingt sept patients (27/72, 37,5%) avaient des tests épicutanés positifs sur les lectures effectuées à 48 et/ou 96 heures. Chez 21 patients les tests épicutanés étaient positifs à la fois sur les lectures effectuées à 48 et à 96 heures. Chez 6 patients (#6,18,29,31,46,50) les tests épicutanés négatifs à 48 et 72 heures n'étaient positifs qu'à partir de la lecture réalisée à 96 heures.

Par rapport aux manifestations cliniques initiales observées durant la toxidermie, la fréquence de positivité des tests épicutanés se répartissait comme suit :

EMP, 14+21 (67%) ; EMP avec composante purpurique 2+/6 (soit au total pour tous les EMP, 16+/27 (59,3%)) ;

urticaires, 1+/14 (7%) ; urticaires avec oedème de Quincke, 1+/4 (soit pour toutes les urticaires, 2+/18 (11,1%)) ;

érythrodermies, 5+/7 ;

eczémas, 3+/9 ;

PEAG, 1+/1 ;

EPF, 0+/3;

photosensibilités, 0+/4 ;
et prurit, 0+/3.

Les 3 patients qui avaient développé un EPF avaient des tests épicutanés médicamenteux négatifs y compris en ce qui concernait les tests épicutanés réalisés sur les sites pigmentés séquellaires.
Les 4 patients ayant présenté une photosensibilisation ont également bénéficié de phototests épicutanés (photopatch tests) avec le médicament en cause. Dans les 4 cas ces photopatch tests étaient positifs. Durant une pUVAthérapie avec de la Méladinine® (méthoxsalène), prescrite pour un psoriasis, un de ces 4 patients (#62) a développé un eczéma généralisé très sévère. Chez ce patient les photopatch tests réalisés avec le méthoxsalène (irradiés en UVA) étaient très fortement positifs, avec un aspect histologique d'eczéma aigu sur la biopsie du test.
Parmi les 72 patients qui ont tous bénéficié de tests épicutanés, 5 ont présenté une réactivation, modérée dans son intensité, de leur toxidermie initiale : après réalisation de tests épicutanés positifs respectivement à l'aciclovir (#42), l'amoxicilline (#17), l'hydroxyzine (#61), la pseudoéphédrine (#68) et la triamcinolone (#72).

Prick tests

Des prick tests médicamenteux ont pu être réalisés chez 46 patients, donnant les résultats suivants : 11 patients ont développé des réactions positives (24%) répartis en 7 patients (15%) avec des réactions immédiates sur les lectures effectuées à 20 minutes et les 4 autres (8,7%) (tous ayant à l'origine une toxidermie de type EMP) avec des réactions uniquement sur les lectures tardives, effectuées à 24 heures, des prick tests.
En ne considérant que les patients ayant présenté une toxidermie de type EMP, 5/17 patients (29,4%) avaient des prick tests positifs, l'un d'entre eux ayant seulement une réaction immédiate à 20 minutes à l'érythromycine et les 4 autres avec des réactions retardées à 24 heures (à l'amoxicilline ou à la pseudoéphédrine).
Parmi les 3 patients ayant présenté un prurit médicamenteux, 1 avait un prick test positif à 20 minutes au tétrazépam.

Parmi les patients testés qui avaient présenté initialement une urticaire, 4/13 (30%) avaient des prick tests positifs avec l'amoxicilline, la céfapirine, le paracétamol ou la spiramycine, sur les lectures effectuées à 20 minutes.

Un des 4 patients ayant présenté un oedème de Quincke avait un prick test positif à 20 minutes à la pholcodine (patiente#64) qui a entraîné une réactivation modérée de l'oedème de Quincke et d'un prurit oculaire. Cette réaction positive et cette réactivation étaient apparues lors des tests effectués avec la solution à 10^{-1} soit pholcodine à 10% dans l'eau, la solution diluée à 10^{-2} n'ayant pas entraîné de réaction sur le site du prick test.

Au total dans les urticaires avec ou sans oedème de Quincke associé, les prick tests médicamenteux étaient positifs dans 5/17 cas (29,4%).

Nous n'avons pas observé de prick test faussement positif parmi les patients témoins négatifs.

Tests intradermiques

Parmi les 30 patients ayant bénéficié d'IDR, 20 ont eu des tests positifs (66,6%), 4 en lecture immédiate à 30 minutes seulement (2 EMP et 2 urticaires), 12 sur les lectures tardives seulement (avec amoxicilline, érythromycine, énoxoparine et piroxicam) et 4 à la fois avec des résultats positifs sur les lectures immédiates et les lectures tardives (avec amoxicilline, piroxicam et estradiol)) (tableaux 8, 9 et 10).

Chez un des patients (#53), les IDR ne sont devenues positives que trois jours après leur réalisation.

Les résultats des IDR ont été interprétés selon les résultats obtenus chez les témoins négatifs, ce qui nous a permis de mettre en évidence l'existence de réactions irritatives non spécifiques lors de la pratique des IDR avec certains médicaments. Des réactions irritatives ont été observées avec la Pénicilline G, l'érythromycine et la spiramycine. Dans notre expérience les concentrations qui peuvent être utilisées pour réaliser des IDR avec ces antibiotiques sont les suivantes : 5×10^5 U/mL pour la Pénicilline G, 0,2mg/mL pour l'érythromycine et 375 U/mL pour la spiramycine.

Au total, les IDR étaient positives chez 8 des 12 patients testés (67%) ayant développé un EMP, chez 4 des 5 patients ayant eu un eczéma et chez 5 des 10 patients ayant développé une urticaire et/ou un oedème de Quincke.

Chez les patients ayant eu des réactions positives de leurs IDR médicamenteuses, une patiente a présenté une réactivation de son EMP, limitée au bras sur lequel furent réalisées les IDR (#49), un autre patient a eu une réactivation d'une urticaire (#49) et un troisième un oedème de Quincke d'intensité modérée (patiente #38).

Au total 52 des 72 patients (72%) ont eu au moins un test cutané pertinent, positif avec le médicament en cause dans la survenue de leur toxidermie.
Aucune réaction n'a été observée pour les tests épicutanés, les prick tests et/ou les IDR réalisés avec les conservateurs, excipients ou colorants des médicaments.

Analyses statistiques

Pour déterminer si le type sémiologique de la toxidermie initiale avait une influence sur l'incidence de positivité des tests médicamenteux positifs, nous avons comparé les résultats des tests cutanés en fonction des caractéristiques cliniques initiales qu'avaient présentées les patients.
Un nombre significativement plus élevé de tests épicutanés positifs a été observé chez les patients ayant eu un EMP (59,3%) comparés aux patients ayant eu une urticaire initiale (11%) ($p = 0,001$).
Nous avons également comparé l'incidence des prick tests et des IDR positifs chez des patients qui avaient des tests épicutanés négatifs. Chez les patients ayant eu un EMP, 5/12 (42%) avaient des tests épicutanés négatifs mais des prick tests ou des IDR positifs, tandis que parmi les urticariens 11/13 patients (85%) avaient des tests épicutanés négatifs et des prick tests ou des IDR positifs ($p = 0,2$). Parmi les patients ayant des tests épicutanés négatifs, un plus grand nombre de prick tests positifs étaient retrouvés chez les urticariens (5+/17, 29,4%) en comparaison avec les résultats obtenus chez les patients ayant développé un EMP (0) ($p = 0,32$).

Tableau 7 : Critères d'inclusion

- Les caractéristiques cliniques de la toxidermie ont été vues et décrites par un des membres de l'équipe de Dermatologie de l'Hôpital Fournier (Nancy). Une photographie des lésions a été prise.
- Une biopsie cutanée pour faire au minimum un examen histologique a été réalisée lors de la survenue de la toxidermie.
- La chronologie des prises médicamenteuses du patient, l'imputabilité de chaque médicament pris avant et pendant la survenue de la toxidermie ont pu être déterminées suivant les critères d'imputabilité proposés par Bégaud *et coll.* (1985) et repris par Moore *et coll.* (1985).
- Patients ayant une imputabilité très probable d'un médicament dans la survenue de la toxidermie.
- Bilan biologique fait durant la toxidermie : NFS-plaquettes, VS, taux de créatinine, transaminases, phosphatases alcalines, bilirubine ; dosage des Immunoglobulines, du complément total et de ses fractions C3 et C4, dosage des complexes immuns circulants, détermination des sous-populations lymphocytaires ; sérologies *Herpes hominis* type I and II, *Mycoplasma*, Cytomégalovirus, *Rickettsiae* , virus Epstein-Barr, *Haemophilus influenzae b* , Parvovirus B 19, virus Coxsackie, Entérovirus ; dosage des antistreptolysines, antistreptokinases, antistreptodornases.
- Patients ayant donné leur consentement éclairé pour la réalisation des tests cutanés, réalisés 6 à 10 semaines après la survenue de la toxidermie.
- Tests épicutanés réalisés, au moins 1 mois après l'arrêt de thérapeutique cortisonée topique ou systémique.
- Patients ne recevant ni antihistaminiques (type anti-H1) ni β bloquants lors de la réalisation des tests cutanés.

Tableau 8 : Résultats des tests cutanés chez les patients ayant une toxidermie induite par les bêta-lactamines. Pt # : numéro du patient, PC : présentation clinique lors de la toxidermie, Pt : test épicutané ou patch test, prTi : lecture immédiate des prick tests, prTr : lecture tardive à 24H des prick tests, IDRi : lecture immédiate des tests intradermiques (IDR), IDRr : lecture tardive des IDR, Reint = patient ayant eu au moins 2 épisodes toxidermiques en prenant le même médicament (réintroduction accidentelle), ** : réactivation de la toxidermie lors de la réalisation des tests. EMP : exanthème maculo-papuleux, EMP+pur : EMP avec composante purpurique, eczéma G : eczéma généralisé, érythroD : érythrodermie, EPF: érythème pigmenté fixe, PEAG : pustulose exanthématique aiguë généralisée, photoS : photosensibilité, urt+OQ : urticaire avec oedème de Quincke, * : phototest épicutané ou photopatch test positif, contrôles neg : nombre de patients contrôles négatifs. Les résultats des tests épicutanés sont donnés à 48 et 96 heures, selon les critères de lecture de l'ICDRG (Adams 1990).

Pt#	PC	Pt	prTi	prTr	IDRi	IDRr	Réint	Médicament
1	EMP	-	-	-	-	-	0	amoxicilline
2	EMP	-	-	-	-	-	0	amoxicilline
3	EMP	++/++	-	+	-	+	0	amoxicilline
4	EMP	++/++	-	-	-	+	+	amoxicilline
5	EMP	++/++	-	+	-	+	+	amoxicilline
6	EMP	0/+	nf		nf		0	amoxicilline
7	EMP	++/++	-	+	-	+	+	amoxicilline
8	EMP	-	-	-	+	-	0	amoxicilline
9	EMP + pu	+/+	-	-	-	+	0	amoxicilline
10	EMP + pu	-	-	-	-	+	0	amoxicilline
11	urticaire	-	-	-	-	-	0	amoxicilline
12	urticaire	-	-	-	+	+	0	amoxicilline
13	urticaire	+/++	-	-	nf		0	amoxicilline
14	urticaire	-	+	-	nf		+	amoxicilline
15	urticaire	-	-	-	+	-	0	amoxicilline
16	érythroD	-	-	-	-	+	+	amoxicilline
17	eczéma G	-	-	-	-	+ 48h	0 **	amoxicilline
18	eczéma G	0/+	nf		nf		0	Pénicilline G
19	urticaire	-	+	-	nf		+	céfapirine
20	EPF	-	nf		nf		+	cefpodoxime
21	PEAG	+/+	nf		nf		0	cloxacilline

Tableau 9 : Résultats des tests cutanés chez les patients ayant une toxidermie induite par les agents anti-infectieux non bêta-lactamines. Pt # : numéro du patient, PC : présentation clinique lors de la toxidermie, Pt : test épicutané ou patch test, prTi : lecture immédiate des prick tests, prTr : lecture tardive à 24H des prick tests, IDRi : lecture immédiate des tests intradermiques (IDR), IDRr : lecture tardive des IDR, Reint = patient ayant eu au moins 2 épisodes toxidermiques en prenant le même médicament (réintroduction accidentelle), ** : réactivation de la toxidermie lors de la réalisation des tests. EMP : exanthème maculo-papuleux, EMP+pur : EMP avec composante purpurique, eczéma G : eczéma généralisé, érythroD : érythrodermie, EPF: érythème pigmenté fixe, PEAG : pustulose exanthématique aiguë généralisée, photoS : photosensibilité, urt+OQ : urticaire avec oedème de Quincke, * : phototest épicutané ou photopatch test positif, contrôles neg : nombre de patients contrôles négatifs. Les résultats des tests épicutanés sont donnés à 48 et 96 heures, selon les critères de lecture de l'ICDRG (Adams 1990).

Pt#	PC	Pt	prTi	prTr	IDRi	IDRr	Reint	Médicament
22	urticaire	-	-	-	-	+	0	érythromycine
23	EMP	-	+	-	nf		0	érythromycine
24	urticaire	-	-	-	nf		+	josamycine
25	urticaire	-	+	-	nf		0	spiramycine
26	urt+OQ	-	-	-	-	-	+	spiramycine
27	EMP	+/+	nf		nf		0	pristinamycine
28	EMP	++/++	nf		nf		0	pristinamycine
29	EMP	0/+	nf		nf		0	pristinamycine
30	EMP	+/+	nf		nf		0	pristinamycine
31	EMP	0/+	nf		nf		0	pristinamycine
32	ErythroD	-	-	-	nf		0	pristinamycine
33	ErythroD	+/+	nf		nf		0	pristinamycine
34	ErythroD	+/+	nf		nf		0	pristinamycine
35	ErythroD	++/++	nf		nf		0	pristinamycine
36	EPF	-	-	-	-	-	+	doxycycline
37	EMP	-	-	-	nf		+	co-trimoxazole
38	urticaire	-	-	-	+	-	+ **	co-trimoxazole
39	EMP+ pu	-	-	-	nf		+	norfloxacin
40	EMP + pu	-	-	-	nf		+	acide pipémidique
41	EMP	-	-	-	-	-	+	isoniazide
42	EMP	+/+	nf		nf		0 **	aciclovir

Tableau 10 : Résultats des tests cutanés chez les patients ayant une toxidermie induite par des médicaments non anti-infectieux. Pt # : numéro du patient, PC : présentation clinique lors de la toxidermie, Pt : test épicutané ou patch test, prTi : lecture immédiate des prick tests, prTr : lecture tardive à 24H des prick tests, IDRi : lecture immédiate des tests intradermiques (IDR), IDRr : lecture tardive des IDR, Reint = patient ayant eu au moins 2 épisodes toxidermiques en prenant le même médicament (réintroduction accidentelle), ** : réactivation de la toxidermie lors de la réalisation des tests. EMP : exanthème maculo-papuleux, EMP+pur : EMP avec composante purpurique, eczéma G : eczéma généralisé, érythroD : érythrodermie, EPF: érythème pigmenté fixe, PEAG : pustulose exanthématique aiguë généralisée, photoS : photosensibilité, urt+OQ : urticaire avec oedème de Quincke, * : phototest épicutané ou photopatch test positif, contrôles neg : nombre de patients contrôles négatifs. Les résultats des tests épicutanés sont donnés à 48 et 96 heures, selon les critères de lecture de l'ICDRG (Adams 1990).

Pt#	PC	Pt	prTi	prTr	IDRi	IDRr	Reint	Médicament
43	Eczéma G	-	-	-	-	-	0	amiodarone
44	urticaire	-	-	-	-	-	+	articaine
45	urticaire	-	-	-	-	-	+	articaine
46	ErythroD	0/+	nf		nf		0	captopril
47	EMP	-	-	-	-	-	0	carbamazépine
48	EMP+pu	+/+	nf		nf		0	carbamazépine
49	EMP+pu	-	-	-	+	-	0 **	cyamémazine
50	EMP	0/++	nf		nf		0	diltiazem
51	Eczéma G	-	-	-	-	+	0	énoxoparine
52	Eczéma G	+/+	nf		nf		+	énoxoparine
53	Eczéma L	-	-	-	-	+	+	énoxoparine
54	Eczéma G	-	-	-	+	+	+	estradiol
55*	photoS	-	nf		nf		0	fluvoxamine
56	urt+AO	+/+	nf		nf		0	fusafungine
57	prurit	-	-	-	nf		+	glibenclamide
58	prurit	-	nf		nf		+	héparine
59*	photoS	-	nf		nf		0	hydroquinidine
60*	photoS	-	nf		nf		0	hydroquinidine
61	ErythroD	+/+	nf		nf		0 **	hydroxyzine
62*	photoS	-	nf		nf		+	méthoxsalène
63	urticaire	-	+	-	nf		+	paracétamol
64	urt+OQ	-	+	-	nf		+ **	pholcodine
65	EPF	-	-	-	-	+	+	piroxicam
66	urt+OQ	-	-	-	+	+	+	piroxicam
67	urticaire	-	-	-	+	+	+	piroxicam
68	EMP	++/++	-	+	nf		+ **	pseudoéphédrine
69	Eczéma G	-	-	-	nf		+	simvastatine
70	EMP	+/+	nf		nf		0	tétrazépam
71	prurit	-	+	-	nf		+	tétrazépam
72	Eczéma G	++/++	nf		nf		0 **	triamcinolone

Tableau 11 : nombre de tests épicutanés, de prick tests et d'IDR réalisés chez les patients contrôles négatifs.

*Pt : patch test, prT : prick test, IDR : tests intradermiques. * 1 témoin négatif pour le captopril avait un test épicutané faussement positif.*

Médicament testé	Patch-test	prickTest	IDR
amoxicilline	*59*	*42*	*22*
pénicilline G	*16*	*9*	*7*
céfapirine	*6*	*5*	*4*
cefpodoxime	*2*	*0*	*0*
cloxacilline	*2*	*1*	*0*
érythromycine	*24*	*7*	*7*
josamycine	*13*	*6*	*0*
spiramycine	*8*	*8*	*6*
pristinamycine	*11*	*3*	*0*
doxycycline	*6*	*2*	*2*
co-trimoxazole	*4*	*3*	*2*
norfloxacine	*7*	*3*	*0*
acide pipémidique	*1*	*1*	*0*
isoniazide	*1*	*1*	*1*
aciclovir	*17*	*2*	*0*
amiodarone	*6*	*3*	*1*
articaïne	*12*	*5*	*3*
captopril	*7(1*+/-)*	*0*	*0*
carbamazépine	*4*	*2*	*1*
cyamémazine	*4*	*3*	*0*
diltiazem	*8*	*0*	*0*
énoxoparine	*11*	*5*	*0*
oestradiol	*6*	*3*	*3*
fluvoxamine	*5 photopatch -*	*0*	*0*
fusafungine	*7*	*0*	*0*
glibenclamide	3	1	0
héparine	9	8	5
hydroquinidine	3 *photopatch -*	0	0
hydroxyzine	*8*	*0*	*0*
méthoxsalène	*0 photopatch -*	*0*	*0*
paracétamol	*92*	*22*	*17*
pholcodine	*4*	*3*	*0*
piroxicam	*20*	*6*	*6*
pseudoéphédrine	*8*	*2*	*0*
simvastatine	2	*0*	*0*
tétrazépam	*18*	*7*	*0*
triamcinolone	*10*	*0*	*0*

CONCLUSION

Cette étude a montré l'utilité (72% des patients ont eu un test médicamenteux cutané pertinent) et la faisabilité de tests séquentiels cutanés avec le médicament responsable chez les patients ayant présenté une toxidermie. Les règles de réalisation de ces tests, telles qu'elles ont été suivies et détaillées dans cette étude, doivent être respectées pour interpréter correctement ces tests et les réaliser avec des conditions de sécurité maximales pour les patients.

Les résultats des tests médicamenteux cutanés dépendent du médicament en cause et du type sémiologique de toxidermie présentée initialement par le patient. Des tests médicamenteux cutanés négatifs n'excluent pas la responsabilité du médicament testé.

La spécificité de ces tests, en particulier la spécificité des IDR, doit toujours être vérifiée pour éviter de déclarer des tests médicamenteux faussement positifs. La constitution de populations de patients témoins négatifs pour ces tests cutanés, telles que nous les avons définies a montré dans cette étude toute son utilité dans le respect total de l'éthique médicale.

Ce travail réalisé dans des conditions strictes de sélection des patients permet de cerner l'utilité des tests cutanés médicamenteux dans les toxidermies induites par l'exposition systémique à un médicament. Nos résultats indiquent que la réalisation et l'interprétation des tests cutanés médicamenteux, dans ces conditions strictes, peuvent entrer dans les critères permettant de déterminer l'imputabilité d'un médicament dans la survenue d'une toxidermie.

TROISIEME ETUDE : EXPLORATIONS IMMUNO-ALLERGOLOGIQUES DANS UN CAS D'ERYTHEME POLYMORPHE INDUIT PAR LE LAMISIL ® 250 COMPRIMÉS

OBJECTIFS

La terbinafine est une allylamine antifongique, commercialisée sous le nom de Lamisil® comprimés à 250 mg et sous forme topique (Lamisil crème ®). Par voie orale la tolérance du Lamisil® est bonne, mais quelques cas d'érythème polymorphe et/ou de syndrome de Lyell ont été rapportés au décours de la prise de ce médicament (Carstens 1994, Rzany 1994, Mc Gregor 1994, Tramaloni 1995, Todd 1995, White 1996). Dans le cas que nous avons diagnostiqué et que nous rapportons ici, le bilan immuno-allergologique a confirmé la responsabilité du Lamisil® comprimé dans la survenue de cette toxidermie, mais soulève le problème de l'agent contenu dans la formule de commercialisation responsable de cette toxidermie.

OBSERVATION

Une femme âgée de 56 ans, ayant comme seul antécédent médical important la survenue d'un exanthème maculo-papuleux après la prise de tétrazépam prescrit pour des cervicalgies, a développé un érythème polymorphe sévère atteignant 70% du revêtement cutané, avec de vastes placards inflammatoires en cocarde, 7 jours après la mise en route d'un traitement par Lamisil® comprimé (1cp/j) prescrit pour une onychomycose des orteils. Elle n'avait jamais eu de prescription antérieure de terbinafine. Lors de la survenue de la toxidermie, la patiente prenait également un traitement hormonal séquentiel (17 béta-estradiol et progestérone) depuis 4 mois. Quarante huit heures après l'apparition de l'érythème polymorphe, la patiente fut hospitalisée, tous les médicaments étant immédiatement interrompus. Trois mois plus tard, après la disparition de l'érythème polymorphe, le traitement hormonal fut réintroduit et parfaitement toléré.

L'érythème polymorphe était composé de lésions papulo-oedémateuses en cocarde, dont certaines confluaient en vastes placards oedématiés, rouges, violacés avec ébauche de décollement bulleux en leur centre. Il n'existait ni signe de Nikolsky, ni atteinte muqueuse associée. En-dehors de l'onychomycose, le reste de l'examen clinique était normal. Les biopsies cutanées montraient un infiltrat périvasculaire dermique dense lympho-histiocytaire avec quelques polynucléaires neutrophiles sans leucocytoclasie, et quelques altérations des kératinocytes des assises basales épidermiques. L'immunofluorescence directe (IFD) était négative.

Bilan Biologique

Il existait une hyperleucocytose à 19 500 polynucléaires neutrophiles/mm3, une hyperéosinophilie à 854 polynucléaires éosinophiles/mm3, une cytolyse hépatique modérée avec augmentation des transaminases avec SGPT à 141 UI/l (Nale<40), SGOT et 5'nucléotidase à la limite supérieure de la normale, et gamma glutamyl transférase très augmentée à 101 U (Normale<47 U). Il n'existait pas de syndrome inflammatoire, pas de perturbations du bilan immunologique (anticorps antinucléaires, complexes immuns circulants, dosage du complément CH50 et de ses fractions C3, C4, dosage pondéral des immunoglobulines).

Ce bilan biologique s'est normalisé 10 jours après l'arrêt du Lamisil® cp.

Les sérologies répétées (*Herpes virus hominis* 1 et 2, mycoplasme, cytomégalovirus, *Chlamydiae*, *Haemophilus influenzae*, parvovirus B19 et entérovirus) n'ont montré aucune séroconversion récente. La culture virale d'un prélèvement buccal et labial était négative.

La radiographie pulmonaire était normale. Le groupage HLA était A1-24, B65-57, DR1-7, DRw53 et DQ5-3.

Evolution

Avec la simple application de dipropionate de bétaméthasone (Diprosone crème ®) la dermatose a disparu dans les 6 semaines qui ont suivi l'arrêt du Lamisil®, sans récidive dans les 24 mois suivants.

Investigations immuno-allergologiques

Les tests épicutanés ont été réalisés six mois après la survenue de l'érythème polymorphe. Ils comportaient la Batterie Standard Européenne des tests épicutanés, Lamisil® 250 tel quel, Lamisil® 1% crème telle quelle, terbinafine pure en poudre et à 50% dans la vaseline, stéarate de magnésium testé pur en poudre et à 10% dans la vaseline, carboxyméthylcellulose testée pure en poudre, cellulose microcristalline testée pure en poudre et silice testée pure en poudre. Les résultats des tests épicutanés sont rapportés dans le tableau 12.

Au même moment des TDBH et TAL ont été réalisés avec le Lamisil®250 cp et ses différents composants.

RESULTATS

Des résultats similaires ont été observés avec les 3 types de tests. La patiente a présenté des tests épicutanés positifs (15 témoins négatifs), un TDBH (1 témoin négatif) et un TAL (0 témoin négatif) positifs avec le Lamisil®250 cp mais ni la terbinafine (testée pure, diluée dans la vaseline ou dans le véhicule utilisé pour la forme topique), ni les excipients du comprimé n'ont donné de test positif lorsqu'ils ont été testés séparément.

Ces trois types de tests (épicutanés, TDBH et TAL) ont été contrôlés 3 mois plus tard et ont donné les mêmes résultats.

COMMENTAIRES

La terbinafine induit peu d'effets secondaires : dysgueusie, neutropénie, troubles gastro-intestinaux, toxidermies. Notre observation associe deux effets secondaires réversibles pour lesquels l'imputabilité du Lamisil®cp est vraisemblable (I3) selon les critères de Bégaud *et coll.* (1985) ou Moore *et coll.* (1985) : hépatotoxicité et érythème polymorphe.

Des érythèmes polymorphes ou des syndromes de Lyell à la terbinafine ont été rapportés dans la littérature (Carstens 1994, Rzany 1994, Mc Gregor 1994, Tramaloni 1995, Todd 1995, White 1996) survenus, comme chez notre patiente, dans le mois qui suivait la mise en route du traitement. Ils ont tous régressé en quelques semaines en dehors d'un cas de décès (White1996).

Dans un cas de pustulose exanthématique généralisée induite par le Lamisil 250® cp, Kempinaire *et coll.* (1997) ont obtenu un test épicutané positif avec la terbinafine. En fait ces auteurs ne précisent pas s'ils ont testé le Lamisil 250® cp ou la terbinafine pure. Leur observation souligne l'intérêt des tests épicutanés avec ce médicament mais ne permet pas de préciser si la terbinafine ou le Lamisil 250® cp étaient responsables. Exceptée l'observation de Carstens *et coll.* (1994) dans laquelle le test épicutané réalisé avec le Lamisil® crème était négatif, les autres observations de patients précédemment publiées ne font pas état d'investigations immuno-allergologiques.

Notre observation montre que les tests épicutanés avec le Lamisil®250 cp, mais aussi des tests *in vitro* comme le TDBH et le TAL peuvent être positifs dans le bilan de patients ayant présenté une toxidermie grave avec cet antifongique.

Il serait nécessaire de tester à l'avenir les patients, heureusement rares, atteints d'érythème polymorphe dû à ce médicament pour connaître la sensibilité et la spécificité de ces tests pour le bilan étiologique de cette toxidermie.

Les résultats de ces investigations posent le problème de l'agent responsable de cette toxidermie puisque par 3 approches différentes, le Lamisil®250 cp a entraîné des réponses positives mais qu'aucune réponse n'a été observée lors des tests effectués séparément avec les différents composants du comprimé. En raisonnant uniquement sur les tests épicutanés, l'hypothèse d'un test épicutané faussement négatif à la terbinafine paraît pouvoir être écartée sur les arguments suivants : utilisation de la terbinafine pure (comme dans le comprimé) mais aussi testée dans le véhicule de la forme topique, qui favorise la pénétration cutanée de la molécule.

Il serait nécessaire que de tels bilans soient réalisés chez d'autres patients pour confirmer ou infirmer nos résultats qui soulèvent plusieurs questions :

- la terbinafine est-elle responsable des érythèmes polymorphes secondaires à la prise de Lamisil®250cp ?
- Si elle ne l'est pas, s'agit-il d'une " compound-allergy " (Kellett 1986) ou d'une sensibilisation à une molécule qui n'apparaîtrait pas dans la formule du Lamisil®250cp ?
- Le Laboratoire Sandoz ayant eu connaissance de cette observation, n'a pas retrouvé d'impureté ou de composant n'apparaissant pas dans la formulation du produit fini.

Tests épicutanés	**lectures à 48H et 96H**
résine paratertiary butyl-formol	+/+
autre allergènes de la batterie standard ICDRG	-
Lamisil®250 cp	+/+
Lamisil 1% crème®	-
terbinafine poudre* pure	-
terbinafine poudre* 50% vaseline	-
stéarate de magnésium poudre* pur	-
stéarate de magnésium poudre*10% vaseline	-
carboxyméthylamidon pur*	-
méthylhydroxypropylcellulose pure*	-
silice colloïdale*	-
cellulose microcristalline pure	-
Myolastan® cp pur	+/+
tétrazépam poudre pur	+/+
tétrazépam poudre 10% vaseline	+/+/-
Oestrogel®	-
Surgestone®	-
Tests *in vitro*	**Résultats**
TDBH **Lamisil®250 cp**	+
TAL au **Lamisil®250 cp**	+
TDBH et TAL	
terbinafine poudre* pure	-
stéarate de magnésium poudre* pur	-
carboxyméthylamidon pur*	-
méthylhydroxypropylcellulose pure*	-
silice colloïdale*	-
cellulose microcristalline pure	-

Tableau 12 : Résultats des tests épicutanés et *in vitro* réalisés chez une patiente ayant présenté un érythème polymorphe dû au Lamisil®250cp. *TDBH : test de dégranulation des basophiles humains ; TAL : test d'activation lymphocytaire : * Produits gracieusement fournis par le Laboratoire Sandoz (Rueil Malmaison, F).*

QUATRIEME ETUDE : SYNDROME BABOUIN INDUIT PAR LES VEINOGLOBULINES (IMMUNOGLOBULINES INTRAVEINEUSES)

OBJECTIFS

Le syndrome Babouin a une physiopathologie méconnue. Dans le premier cas décrit, à notre connaissance, induit par l'administration de veinoglobulines intraveineuses, les études immunologiques et les tests cutanés ont été réalisés pour tenter de déterminer les mécanismes en cause dans cette toxidermie.

OBSERVATION

Une patiente agée de 28 ans a présenté une polyradiculonévrite sensitivo-motrice avec déficit moteur rapidement invalidant, prédominant à la racine des membres inférieurs et paresthésies des extrémités. Cette polyradiculonévrite, avec hyperprotéinorachie, n'avait pas de cause infectieuse, dégénérative ou toxique. Le bilan immunitaire était normal. Le dosage des IgA sériques était normal. Cette polyradiculonévrite aboutissant à une parésie des membres inférieurs, empêchant la marche, un traitement mensuel par immunoglobulines humaines polyvalentes (Tégélines®), à la dose usuelle de 0,4g/kg/j, durant 5 jours consécutifs, initialement associées à du Laroxyl® (amitryptiline) était débuté.

Après la deuxième cure de Tégélines®, un **eczéma dyshidrosique** était apparu avec quelques vésicules latéro-digitales prurigineuses. Avec un traitement par dipropionate de bétaméthasone (Diprosone crème®), les lésions dyshidrosiques disparaissaient en quelques jours. Après chaque cure suivante de Tégélines®, un eczéma dyshidrosique réapparut, la patiente ne signalant plus cet effet secondaire qui disparaissait en quelques jours sous traitement corticoïde topique. L'amélioration de la symptomatologie neurologique était très importante, avec légère diminution de la force motrice entre chaque cure et une récupération quasi-totale d'une motricité normale à la fin des cures de veinoglobulines.

Après 6 mois de cures mensuelles de veinoglobulines, la motricité étant satisfaisante une tentative de relais par une corticothérapie générale (0,5 mg/kg/j) avec arrêt du Laroxyl® et des veinoglobulines était décidée. La mauvaise tolérance générale de la corticothérapie et une dégradation de la motricité survenant, cette thérapeutique fut interrompue et au 9ème mois d'évolution, les cures de veinoglobulines furent reprises (8ème cure), avec à nouveau une amélioration qualifiée de " spectaculaire " sur l'évolution de la symptomatologie neurologique.

En dehors des poussées de dyshidrose les cures ont été poursuivies avec une bonne tolérance, toutes les huit semaines, jusqu'au 15ème mois d'évolution. A ce moment, pour la dixième

cure, la nature des veinoglobulines utilisées fut modifiée et des Sandoglobulines® prescrites. Vingt quatre heures après la première injection de Sandoglobulines® (2 perfusions de 2 heures de 12g), un placard érythémateux, non prurigineux des fesses apparut. Il n'y avait pas eu d'administration d'autre médicament, aucun thermomètre n'avait été cassé dans la chambre. La dermatose s'étendit et au troisième jour d'évolution (les 2ème et 3ème injections de Sandoglobulines® de la cure ayant été réalisées), il s'agissait d'un placard érythémateux, papuleux, à contours nets, atteignant les fesses, à bords bien limités sur la fesse droite, s'étendant sur le flanc gauche, touchant les deux plis sous fessiers sans dermite flexurale des autres plis associée. Un traitement local par Diprosone crème® et l'arrêt de la cure de veinoglobulines furent prescrits. Ce placard, caractéristique d'un **syndrome Babouin**, sans autre lésion cutanéo-muqueuse associée, devint au 6ème jour d'évolution très prurigineux, conduisant à la prescription par le médecin traitant de la patiente d'une corticothérapie générale (0,5mg /kg /j), rapidement dégressive sur une semaine.

Examens complémentaires lors de la toxidermie

Histologiquement, sous un épiderme normal il existait un oedème du derme superficiel, un infiltrat lymphohistiocytaire à prédominance périvasculaire.

L'immunofluorescence directe objectivait des dépôts granuleux de C1q à la jonction dermo-épidermique et dans les vaisseaux, sans dépôt associé d'immunoglobulines.

Sur l'immunophénotypage, les infiltrats périvasculaires étaient composés principalement de cellules T CD3+ CD4+ exprimant HLA DR. Les cellules de Langerhans (CL) CD1a positives étaient en nombre normal dans l'épiderme (environ 15 par champ au grossissement 400), et 10 CL/champ exprimaient également HLA DR. Des cellules dendritiques CD1a+ étaient observées en petit nombre dans le derme (3 à 4 cellules par champ et quelques foyers épidermiques). De nombreuses cellules dendritiques HLA DR étaient présentes dans le derme avec une prédominance périvasculaire.

Les cellules endothéliales étaient fortement CD54 (ICAM 1) positives, en particulier en regard des infiltrats périvasculaires riches en cellules dendritiques exprimant HLA DR. Elles exprimaient faiblement CD62E et CD62P. Quelques cellules T sous épidermiques étaient

CD25 positives (2 à 3 cellules T/champ) au grossissement 400. Les cellules T périvasculaires éatient CD62L positives.
Les kératinocytes des assises basales exprimaient HLA DR mais ni CD54/ICAM1, ni CD62L. Par contre de façon inattendue, une dérepression d'expression de **CD62P par les kératinocytes** avec un renforcement de cette expression, fin, linéaire quasi continu le long de la jonction dermo-épidermique était observé (figure 2).

Le bilan biologique était normal sans anomalie du bilan immunitaire. Il n'existait pas de séroconversion virale (hépatites A,B ou C ou *parvovirus B19*).

La symptomatologie cutanée disparaissait en 12 jours.

Investigations immuno-allergiques

Le bilan immunoallergique a été réalisé 6 semaines plus tard afin de préciser si le syndrome Babouin était en relation avec l'administration de Sandoglobulines®, si la reprise du traitement par veinoglobulines était possible compte tenu de son efficacité sur une neuropathie invalidante chez une femme jeune. Toutes les étapes de ce bilan ont été réalisées avec consentement éclairé de la patiente.

Tests cutanés

Les tests cutanés ont été réalisés selon les modalités rapportées dans le tableau 13.
Nous avons pratiqué des *tests épicutanés* de la batterie standard ICDRG, thiomersal, (mercurothiolate sodique) et Sandoglobulines® testées pures, à 30% vaseline, 30% eau, 30% huile d'olive, 30% dilué dans du propylèneglycol à 10% dans l'eau, 30% dans du DMSO dilué à 10% dans l'eau. Ces tests épicutanés avec différentes concentrations de veinoglobulines testées dans différents excipients ont également été posés sur la fesse, site initial de la toxidermie. Les lectures ont été faites à 20 minutes, 48 heures et 96 heures puis 1 semaine.
Les *prick tests* ont été réalisés avec des Sandoglobulines®, diluées à 10^{-2} puis 10^{-1} et pures, en comparant les résultats à ceux d'un témoin négatif (sérum physiologique à 0,9% et à un témoin positif (phosphate de codéine à 9%) sur des lectures faites à 20 minutes et 24 heures.
Enfin les *IDR*, préparées stérilement selon les modalités décrites dans le chapitre " Matériel et Méthodes ", ont été faites sur le bras, à partir d'une solution de Sandoglobulines® pure diluée à 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} 10^{-1} puis avec la solution pure. Une IDR avec la solution pure de Sandoglobulines® a été réalisée *sur la fesse*.

Le TDBH aux Sandoglobulines® était négatif et un test d'activation lymphocytaire avec les Sandoglobulines® était positif réalisé 6 semaines après la survenue du syndrome Babouin mais négatif lors d'un contrôle réalisé 18 semaines après la toxidermie.
Tous les tests cutanés étant négatifs en lectures immédiates et retardées, avec la demande et le consentement éclairé de la patiente, il fut tenté de faire une *réintroduction des Sandoglobulines®*. Cette réintroduction fut effectuée plus de 2 semaines après la réalisation des IDR. La première injection en intraveineuse lente, durant 2 heures était de 0,24g (3,5 mg/kg) soit un centième de la dose quotidienne administrée durant une cure, qui compte normalement 5 injections à 24 heures d'intervalle.
Cette administration étant bien tolérée, 15 jours plus tard, une administration de 2,4g (35 mg/kg) fut réalisée (1/10ème de la dose quotidienne d'une cure). La tolérance était bonne mais 8 heures après l'administration de cette dose, un érythème lombaire non prurigineux apparut, régressant spontanément en quelques heures. Une biopsie réalisée sur cet érythème retrouvait une discrète vasodilatation, sans infiltrat cellulaire dermique. L'immunofluorescence directe était négative. L'IF indirecte objectivait la présence de quelques lymphocytes T CD4+ périvasculaires non activés (pas d'expression de LFA 1, de CD25 ni de CD62L), un nombre normal de cellules de Langerhans épidermiques (20 cellules CD1a+ par champ microscopique au grossissement 400, 5 cellules HLA DR+) sans activation des cellules endothéliales (absence d'expression de CD62E, expression très modérée de CD62P). Les kératinocytes n'étaient pas activés, ils n'exprimaient ni CD54, ni HLA DR, pas plus que CD62L ou CD62P.

Après discussion collégiale, un déficit moteur réapparaissant, la possibilité de reprise des Tégélines® fut soulevée. La patiente demanda la *réintroduction* de cette thérapeutique. Les IDR réalisées jusqu'à la solution pure sur les bras avec les *Tégélines®* étant négatives, la réadministration de ces veinoglobulines fut faite à 1/10ème de la dose d'une injection quotidienne de la cure (2,5g), en administration intraveineuse lente sur 2 heures.

Cette réintroduction bien tolérée, fut suivie 2 semaines plus tard de la réadministration de Tégélines® à la dose normale d'une injection quotidienne par administration de 25g de Tégélines® sur 5 heures. Une heure après la fin de l'administration de ces veinoglobulines, une sensation de cuisson cutanée et un érythème des membres inférieurs apparurent. Dans les heures et les jours qui suivirent, des poussées de sensation de forte cuisson cutanée et d'exanthème maculeux, érythémateux, du dos, des jambes des faces externes des bras

apparaîtront. Ils furent contrôlés par administration d'une corticothérapie fractionnée dans la journée en trois prises, à une dose totale de 1mg/kg/j, associée à la prise *per os* de dexchlorphéniramine (6mgx2/j,Polaramine R®) et à une corticothérapie locale (dipropionate de bétaméthasone). Après une semaine d'évolution la corticothérapie générale put lentement être diminuée, la symptomatologie cutanée disparaissant au 10ème jour. Tous les traitements ont été interrompus après 3 semaines, sans récidive de la dermatose.

Western Blot avec les Sandoglobulines®

Des Western Blots ont été réalisés avec le sérum de la patiente après séparation électrophorétique des Sandoglobulines® seules. Cette technique avait pour objectif de préciser s'il existait chez la patiente des IgG reconnaissant une protéine contenue dans les Sandoglobulines®, différente des immunoglobulines.

Technique

Une séparation électrophorétique des Sandoglobulines® (composées d'IgG surtout, d'IgA et d'IgM) a été réalisée par électrophorèse SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide, gradient 10-15, après traitement dénaturant par SDS et bêta mercapto-éthanol.

Après électrotransfert sur phase solide (nylon), une saturation des sites non spécifiques de fixation de la phase solide (non occupés par les protéines transférées) a été réalisée par de la Sérum Albumine Bovine (SAB).

Un Blot des Sandoglobulines® fut conservé comme contrôle pour incubation directe avec des anticorps (AC) anti IgG humaines (DAKO).

Un autre Blot bénéficiait d'une incubation avec le sérum de la patiente (dilué au 1/50ème dans du PBS supplémenté en SAB), durant 30 mn, suivie de 3 rinçages en PBS.

Tous les Blots ont alors été incubés avec des AC polyclonaux de chèvre anti-IgG humaines (DAKO) conjugués à la peroxydase, durant 30 mn, à température ambiante.

Après 3 rinçages en PBS, la révélation a été réalisée grâce à l'adjonction de tampon Tris HCl 0,1Mol - pH 7,4 ; de 6mg de diamino-3,3'-benzidine tétrachlorhydrate, 25 microlitres d'eau oxygénée et 2ml de chlorure de nickel à 3%. L'arrêt de la révélation a été réalisé par immersion dans l'eau distillée. Les masses moléculaires des bandes d'Ig observées ont été déterminées à l'aide du logiciel IM1D (Pharmacia, Upsalla, suède) après passage au Scanner et analyse d'image.

Résultats

Les chaînes lourdes et légères des IgG contenues dans la préparation ont été mises en évidence. Aucune autre protéine n'a pu être objectivée. Les IgG de la patiente ne reconnaissent pas de protéines ayant une masse moléculaire différente de celle des IgG contenues dans les Sandoglobulines®.

COMMENTAIRES

Les veinoglobulines utilisées chez cette patiente étaient des immunoglobulines humaines (provenant du plasma d'environ 16000 volontaires) obtenues par fractionnement, lyophilisées, diluées dans de l'eau p.p.i. avec du sucrose, de la pepsine porcine, sans conservateur. En particulier aucune des préparations administrées ne contenait de thiomersal. Ces veinoglobulines sont composées à 96% d'IgG et contiennent des traces d'IgA, d'IgM et des fragments d'IgE.

Elles peuvent être utilisées dans des déficits immunitaires humoraux et dans des pathologies supposées auto-immunes, comme le purpura thrombopénique idiopathique (Schiavotto 1993) ou la dermatomyosite, à la dose de 0,4g/kg/j par cures de 5 jours. Il existe des pathologies pour lesquelles les veinoglobulines ont une indication reconnue et d'autres pour lesquelles des essais préliminaires sont en cours (Mouthon 1997). En neurologie des essais sont en cours pour évaluer leur intérêt dans le syndrome de Guillain Barré, la polyradiculonévrite démyélinisante chronique inflammatoire mais aussi les neuropathies avec IgM monoclonale, neuropathie motrice multifocale avec bloc de conduction persistant, la myasthénie, ou la sclérose en plaque (Misbah 1993, Hugues 1996, Brannagan 1996, Mouthon 1997). Leur administration est contre-indiquée chez les sujets atteints de déficit en IgA.

Notre patiente a reçu des veinoglobulines pour une neuropathie sensitivo-motrice d'évolution sévère et rapide, supposée dysimmunitaire. Le dosage de ses IgA sériques, réalisé à distance de toute administration de veinoglobulines était normal.

L'administration des veinoglobulines est **en général bien tolérée**. La fréquence de leurs effets secondaires est peu évaluée. Elle est considérée dans la littérature de 1 à 15% (Bussel 1997). Dans la série de 83 patients de Schiavotto *et coll.* (1993) cette fréquence d'effets secondaires

est de 12% dont 4% sont sévères, dans la série comptant 88 patients de Brannagan *et coll.*(1996) elle est de 59% mais seuls 4,5% sont sévères. Les réactions d'intolérance les plus fréquentes sont des flushes et des sensations d'oppression thoracique, fièvre, nausée, troubles digestifs, hypotension artérielle. Elles sont liées à la dose reçue et à la vitesse d'administration des veinoglobulines.

D'autres effets secondaires ont été rapportés comme des insuffisances rénales, accidents thrombo-emboliques, des méningites aseptiques, des neutropénies, des séroconversions virales (Misbah 1993, Bussel 1997, Mouthon 1997). Le risque de transmission de virus, en particulier de l'hépatite C ou du *parvovirus B19* n'existerait plus avec les techniques récentes de stérilisation de ces veinoglobulines.

Les manifestations anaphylactiques surviennent principalement chez des patients présentant un déficit en IgA et qui ont développé des AC anti-IgA (IgE-anti-IgA), ou activé le complément par des aggrégats d'IgG.

Outre les manifestations anaphylactiques, les **dermatoses induites par les veinoglobulines** ne semblent pas tout à fait exceptionnelles. Leur fréquence est non évaluée. Si seulement un patient sur 258 (0,4%) a présenté un problème cutané (érythème douloureux au point d'injection) dans la série d'une étude multicentrique colligée par Hugues (1997), Hamdalla (1996) souligne avoir au contraire observé 5 effets secondaires cutanés chez ses 5 patients traités pour syndrome de Guillain Barré. Dans la série de 88 patients de Brannagan (1996), 5 ont présenté des effets secondaires cutanés (6%). Nous avons retrouvé 3 cas d'alopécie (Cham-Lan 1987), des ulcérations buccales survenues lors d'une neutropénie induite par le traitement (Misbah 1993), des érythèmes polymorphes (Misbah 1993, Bussel 1997).

Dans la littérature des 10 dernières années il existe pourtant de multiples rapports, principalement dans des séries de patients traités pour purpura thrombopénique idiopathique ou neuropathies, de manifestations cutanées surtout à type d'eczéma (Barucha 1987, Schiavotto 1993, Hamdalla 1996, Brannagan 1996, Whittam 1997).

Nous avons relevé un cas d'eczéma dyshidrosique (Brannagan 1996), 5 observations d'eczéma généralisé ayant débuté et/ou prédominant sur les mains, parfois associé à une atteinte sévère du visage (Brannagan 1996, Whittam 1997), observations desquelles on peut rapprocher un exanthème des mains et du visage (Brannagan 1996). Des eczémas ou érythrodermies ont été observés dans 3 cas (Barucha 1987, Hamdalla 1996) et d'autres dermatoses, malheureusement décrites succintement, sont signalées comme un exanthème maculo-papuleux du tronc et des cuisses (Brannagan 1996), un exanthème purpurique

(Brannagan 1996), un exanthème prurigineux (Hamdalla 1996), un exanthème squameux (Hamdalla 1996) et une éruption urticarienne (Brannagan 1996). Il faut rappeler que chez notre patiente les premières lésions étaient un eczéma dyshidrosique. Ces lésions surviennent de façon retardée 6 heures à 15 jours après la cure d'immunoglobulines intraveineuses, durent de quelques jours à 3 semaines et récidivent lors de la poursuite du traitement même avec adjonction d'une corticothérapie générale. Il faut pourtant noter que dans deux cas l'eczéma n'a pas récidivé lors des administrations ultérieures d'immunoglobulines intraveineuses (Barucha 1987, Hamdalla 1996). Nous n'avons pas retrouvé d'autre observation de syndrome Babouin induit par l'administration de veinoglobulines dans la littérature.

Le syndrome Babouin a été décrit en 1984 par Andersen *et coll.* après l'administration d'amoxicilline par voie générale, chez un sujet ayant un eczéma de contact à cette bêta-lactamine (Andersen 1984). Le syndrome Babouin est caractérisé par un exanthème en plaques bien limitées, symétriques, érythémateuses, maculeuses parfois vésiculeuses, des fesses avec parfois éruption des plis de flexion en particulier des plis inguinaux, poplités, des coudes et plis sous-mammaires.

Histologiquement l'épiderme est normal ou siège d'une spongiose modérée. Dans le derme est observé un infiltrat périvasculaire parfois associé à une vascularite leucocytoclasique et une extravasation d'hématies.

Il survient chez des sujets ayant une réexposition hématogène à un allergène auquel ils sont sensibilisés et au contact duquel ils ont développé antérieurement un eczéma de contact. Le syndrome Babouin a été décrit après exposition aux bêta-lactamines (Andersen 1984, Herfs 1993, Duve 1994, Köhler LD 1996), à la clindamycine, à l'érythromycine (Goossens 1997), à la néomycine (Bouffioux 1990), à l'héparine et également au nickel, aux dérivés mercuriels (Fernandez 1995, Le Coz 1996) qu'il s'agisse des vapeurs de mercure inhalées lors du bris d'un thermomètre pour prise de température rectale, de pose d'amalgames dentaires mercuriels ou lors de la manipulation de jeux dans lesquels de petites boules de mercure sont déplacées dans un labyrinthe en plastique. Le syndrome Babouin dû à une exposition mercurielle est volontiers érythémato-papuleux et pustuleux.

Le diagnostic repose sur la positivité du **test épicutané** effectué avec l'allergène responsable de l'eczéma de contact et du syndrome Babouin. Dans la littérature quand les tests épicutanés ont été réalisés ils ont toujours été positifs sauf dans l'observation d'un syndrome Babouin dû à l'amoxicilline rapportée par Herfs *et coll.* (1993). Chez notre patiente les tests épicutanés (à

différentes dilutions, dans de multiples excipients), les prick tests et même les IDR sont demeurés négatifs, qu'ils soient réalisés sur le dos, les bras ou le site de la toxidermie.

La symptomatologie observée est sémiologiquement caractéristique de ce syndrome. Il faut également noter qu'il a été précédé durant les cures précédentes par un eczéma dyshidrosique. Pourtant nous n'avons pas observé de test épicutané positif ni dans le dos, ni sur le site de la toxidermie initiale, pas plus qu'une positivité tardive des prick tests et/ou IDR réalisés avec les veinoglobulines.
Le mécanisme de cette toxidermie exceptionnelle déclenchée par l'administration d'immunoglobulines intraveineuses demeure mystérieux. Il ne s'agit pas d'une réactivation d'une allergie de contact. Les produits utilisés ne contenaient pas de conservateurs, en particulier pas de thiomersal, ils comportaient tous deux du sucrose et de la pepsine porcine. La patiente n'avait pas de test épicutané positif aux veinoglobulines. Barucha *et coll.* (1987) signalent un cas de dermatose induite par l'administration de Sandoglobulines®, qui aurait été rattachée à une sensibilisation à la pepsine porcine. Le patient aurait été antérieurement exposé à la pepsine porcine par l'administration d'insuline.

Si les immunoglobulines intraveineuses sont elles-mêmes en cause, quel pourrait être le mécanisme responsable de ces manifestations cutanées ?
Il faut noter que dans l'observation rapportée, la patiente a développé successivement une dyshidrose, un syndrome Babouin et un exanthème maculeux généralisé, trois dermatoses classées dans les manifestations possibles **d'allergie de contact systémique** dans la revue faite par T. Menné *et coll.* en 1994. La revue de la littérature montre que la plupart des manifestations cutanées non anaphylactiques sont eczémateuses avec ou sans dyshidrose. Les immunoglobulines intraveineuses peuvent-elles reproduire le mécanisme inconnu des allergies de contact systémique ? Le statut immunitaire de la patiente, avec une neuropathie supposée dysimmunitaire a peut-être un rôle.
Nous n'avons pas d'argument pour un mécanisme immunologique immédiat IgE dépendant. Les manifestations survenues après les cures ou lors des épreuves de réadministration sont tardives (environ 6 heures après le début de l'administration), les taux d'IgA et d'IgE de la patiente sont normaux, les prick tests, IDR et TDBH avec les Sandoglobulines® étaient négatifs.

Des dépôts de complément étaient retrouvés dans les vaisseaux et à la jonction dermo-épidermique chez notre patiente sans présence de complexes immuns circulants, sans consommation du complément total, des fractions C3 et C4. Par Western Blot nous n'avons pas retrouvé la présence d'IgG de la patiente reconnaissant une molécule contenue dans la préparation qui ait une masse moléculaire différente de celle des immunoglobulines humaines intraveineuses.

Les tests cutanés explorant l'immunité cellulaire retardée (tests épicutanés, prick tests et IDR avec lecture tardive) étaient négatifs. En particulier, les tests épicutanés réalisés chez notre patiente et dans un cas d'eczéma par Hamdalla *et coll.* (1996) étaient négatifs. Le TAL réalisé 6 semaines après la survenue du syndrome Babouin (donc 10 semaines après la dernière administration de veinoglobulines) était positif avec les Sandoglobulines®. Par contre ce TAL était négatif lors du contrôle fait 18 semaines après. S'agit-il d'une diminution de réactivité spécifique cellulaire T, au contraire d'une réactivité normale après une administration récente d'Ig (en l'absence de témoins ayant reçu récemment des veinoglobulines cette hypothèse ne peut pas être écartée) ? L'immunophénotypage retrouvant des cellules T CD4+ périvasculaires, quelques cellules dendritiques HLA DR et CD1a+ et une activation des endothéliocytes peut être en faveur de mécanismes cellulaires retardés.

Lorsque l'on reprend les différents mécanismes supposés d'action des immunoglobulines intraveineuses, tels qu'ils ont été listés par Mouthon *et coll.* (1997) (tableau 14) il est possible que par leur capacité d'intervention sur les mécanismes immunitaires humoraux, sur les mécanismes cellulaires T, sur la modulation de production des cytokines et sur l'élimination des complexes immuns, les veinoglobulines puissent reproduire le mécanisme encore non élucidé des allergies systémiques de contact.

Enfin cette observation a pour la première fois, à notre connaissance, révélé l'expression de la **P sélectine** (GMP-140, PADGEM, CD62P) **sur les kératinocytes** et au long de la jonction dermo-épidermique. CD62P est une molécule d'adhésion exprimés par les plaquettes et les cellules endothéliales, très impliquée dans les phénomènes initiaux du " rolling " leucocytaire des cellules inflammatoires et ainsi dans l'extravasation de ces cellules (Mayadas 1993, Varki 1994, Mc Ever 1995). Les ligands de CD62P sont CD24 (exprimé par les cellules myéloïdes et les lymphocytes B) et CD162 (exprimé par les cellules myéloïdes et une sous-population de cellules T) (Mayadas 1993, Varki 1994). Son expression épidermique est-elle liée à l'administration de veinoglobulines ou en cause dans la survenue d'un syndrome Babouin ?

Nous n'avons pas retrouvé cette expression de CD62P dans 21 biopsies cutanées (19 toxidermies et 2 eczémas de contact avec extension des lésions à distance du point d'application d'un topique médicamenteux). Il serait intéressant de rechercher cette expression épidermique de CD62P dans d'autres syndromes Babouin et dans des toxidermies induites par des veinoglobulines.

Cette observation souligne aussi la nécessaire prudence vis à vis de la poursuite du traitement par veinoglobulines chez un patient qui développe une dyshidrose après chaque cure.

Cette observation rappelle enfin que la réexposition à un médicament responsable d'une toxidermie est susceptible de réinduire une toxidermie plus sévère que celle qui avait été observée initialement.

	lectures à 20 minutes	lectures à 24, 48, 96 H et à 7 J
Tests épicutanés		
DOS		
Batterie standard ICDRG	-	-
thiomersal	-	-
Sandoglobulines®		-
pures	-	-
30% vaseline	-	-
30% eau	-	-
30% acétone	-	-
30% huile d'olive	-	-
30% dans PG à 10% eau	-	-
30% dans DMSO à 10% eau	-	-
FESSES		
Sandoglobulines®		
pures	-	-
30% vaseline	-	-
30% eau	-	-
30% acétone	-	-
30% huile d'olive	-	-
30% dans PG à 10% eau	-	-
30% dans DMSO à 10% eau	-	-
Prick test Sandoglobulines®		
10^{-2}	-	-
10^{-1}	-	-
pur	-	-
Sandoglobulines®		
IDR (bras)		
10^{-4}, 10^{-3},10^{-2}, 10^{-1}	-	-
pure	-	-
IDR (fesses, pure)	-	-
Réadministration		
Sandoglobulines® dose 1/100 0,24g = 3,5 mg/kg (IVL 2H)	-	-
Sandoglobulines® dose 1/10 2,4g = 0,035g/kg (IVL 2H)	-	**érythème lombaire**
Tégélines ®		
IDR 10-1 et pure	-	-
Réadministration		
Tégélines ® dose 1/10 (2,5g = 0,035 g/kg)	-	-
Tégélines ® dose normale en IVL sur 5 heures (25g =0,35g/kg)	-	**exanthème maculeux généralisé**

Tableau 13 : procédures d'investigations cutanées médicamenteuses et de réadministration médicamenteuse dans un syndrome Babouin induit par les immunoglobulines intraveineuses.

Effets précoces après l'injection d'immunoglobulines intraveineuses

- Neutralisation des autoanticorps circulants
- Blocage des récepteurs Fc sur les macrophages spléniques
- Inhibition de la lyse cellulaire dépendante du complément
- Modifications de la solubilité et de la clairance des complexes immuns
- Modulation de la production des cytokines pro-inflammatoires
- Modifications phénotypiques des leucocytes circulants

Effets à moyen et long terme après injection d'immunoglobulines intraveineuses

- Sélection des répertoires immunitaires des lymphocytes B et T
- Modulation des fonctions effectrices des lymphocytes B et T à travers des modifications des cytokines produites
- Suppression d'alloanticorps.

Tableau 14 : Mécanismes d'action proposés des immunoglobulines intraveineuses lors de leur utilisation dans les maladies auto-immunes ou inflammatoires (d'après Mouthon *et coll.* 1997)

CONCLUSION

Le syndrome Babouin a une physiopathologie inconnue, supposée relever de mécanismes d'hypersensibilité cellulaire T retardée. Cette observation soulève l'hypothèse de mécanismes immunitaires cellulaires T mais dans lesquels un rôle modulateur des Ig est possible.

CINQUIEME ETUDE :

CELLULES IMMUNOCOMPETENTES, MOLECULES D'ADHESION, APOPTOSE ET CLONALITE DANS 14 CAS DE TOXIDERMIES INDUITES PAR LES ANTIBIOTIQUES.

OBJECTIFS

La physiopathologie des toxidermies immuno-allergiques est mal connue, et l'immunophénotypage *in situ* est un des moyens d'exploration des mécanismes immunitaires responsables de ces accidents médicamenteux.

Dans 5 cas d'exanthème maculo-papuleux induit par l'amoxicilline, notre première étude a montré que des mécanismes immunitaires cellulaires retardés étaient en cause avec une forte expression des molécules d'adhésion sur certaines cellules, en particulier les cellules endothéliales et les kératinocytes. Cette étude faite sur chez **14 patients** ayant une **toxidermie induite par des antibiotiques** avait pour objectif d'une part de préciser si les résultats observés chez 5 patients atteints d'EMP dû à l'amoxicilline étaient confirmés chez d'autres patients ayant le même type d'accident cutané avec la même bêta-lactamine, d'autre part d'examiner si ces résultats pouvaient être étendus à des exanthèmes maculo-papuleux induits par d'autres antibiotiques (pénicilline G, pristinamycine, norfloxacine ou isoniazide) ou des érythrodermies induites par la pristinamycine.

Ce travail a été élargi par la recherche de marqueurs d'apoptose et par une étude de la clonalité des cellules T observées.

MATERIEL ET METHODES

Population

Chez 14 patients, des biopsies cutanées ont été réalisées, avant toute administration d'une thérapeutique immunomodulatrice, 2 à 9 jours après l'apparition d'une toxidermie induite par les antibiotiques. Les biopsies ont été réalisées 3 à 8 jours après l'arrêt du médicament responsable. Pour tous ces patients (6 hommes, 8 femmes, d'âge moyen 64 ans), la responsabilité d'un antibiotique était probable dans le déclenchement de la toxidermie, selon les critères publiés par Bégaud *et coll.* (1985) et repris par Moore *et coll.* (1985).

Cinq patients avaient un exanthème maculo-papuleux (EMP) induit par des bêta-lactamines (amoxicilline dans 4 cas, pénicilline M - Orbénine®- dans 1 cas), 7 patients avaient une toxidermie due à la pristinamycine (3 EMP, 4 érythrodermies), un patient avait un EMP dû à la norfloxacine et un patient avait un EMP dû à l'isoniazide (tableau 15).

Histologie et immunohistologie

Pour chaque patient, deux biopsies ont été pratiquées en utilisant un punch-biopsie de 4 mm de diamètre. La première biopsie a été fixée par le formaldéhyde et la seconde immédiatement congelée dans l'azote liquide et conservée à -80°C jusqu'à la réalisation des techniques d'immunofluorescence.

Cette dernière a permis une étude en immunofluorescence directe à la recherche de dépôts d'Ig et de fractions du complément et une étude par immunofluorescence indirecte, selon les modalités techniques détaillées dans le chapitre " Matériel et Méthodes ".

Les anticorps monoclonaux utilisés pour visualiser les cellules de Langerhans étaient CD1a et HLA DR.

Les types de cellules T présentes et leur état d'activation ont été étudiés grâce à l'utilisation des AC monoclonaux dirigés contre CD3, CD4, CD8 et CD25.

L'expression des molécules d'adhésion a été recherchée sur les kératinocytes, les cellules endothéliales et les lymphocytes avec des anticorps monoclonaux dirigés contre CD11a-CD18 (leukocyte function-associated antigen 1, LFA 1), CD54 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM 1), CD106 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM 1) ; CD62E (endothelial leukocyte adhesion molecule 1, ELAM 1, sélectine E), CD62L (leukocyte endothelial cell adhesion molecule 1, LECAM 1, sélectine L) et CD 62P (P sélectine, GMP 140).

Détermination de la masse moléculaire du CD62L épidermique

Pour vérifier si le marquage épidermique observé dans certaines toxidermies dues à la pristinamycine ou à l'isoniazide, correspondait effectivement à celui de la L sélectine nous avons caractérisé la molécule kératinocytaire reconnue par le CD62L en déterminant sa masse

moléculaire et en la comparant à la masse moléculaire des 2 types d'antigènes connus, reconnus par CD62L.

Par ailleurs nous avons recherché si cette expression de CD62L kératinocytaire était observée dans d'autres pathologies cutanées.

La détermination de la masse moléculaire de l'ag reconnu par CD62L sur les kératinocytes a été réalisée sur la biopsie cutanée prélevée lors de la survenue d'un exanthème maculo-papuleux dû à la pristinamycine chez une patiente chez laquelle nous avons pu déterminer qu'il existait une très forte expression de CD62L sur toute la hauteur de l'épiderme mais aucune expression de CD62L sur les cellules dermiques. Cette étude a été réalisée par des techniques d'extraction protéique et d'immunocapture suivies d'un Western-Blot (chapitre " Matériel et Méthodes ").

Apoptose dans les toxidermies : expression de CD95 et Bcl2

L'apoptose est une mort cellulaire programmée. Son étude dans les toxidermies a été faite sur les kératinocytes et les cellules T.

L'expression de **Bcl-2** (marqueur de défense contre l'apoptose) (Hockenbery 1991, Möröy 1996) et celle du marqueur d'apoptose **CD95** (Gulbins 1996, Schlottmann 1996) ont été étudiées *in situ*, par technique d'immunofluoresence indirecte, sur 14 biopsies de toxidermies induites par les antibiotiques, selon les méthodes qui ont été décrites dans le chapitre " Matériel et Méthodes ".

Monoclonalité des lymphocytes T infiltrants dans les toxidermies

Dix biopsies cutanées de toxidermie ont été analysées : 7 exanthèmes maculo-papuleux induits par l'amoxicilline (4 cas), l'isoniazide (1 cas), la norfloxacine (1 cas) ou la pristinamycine (1 cas) ; une érythrodermie due à la pristinamycine ; un érythème pigmenté fixe dû au céfodoxime et une urticaire induite par la spiramycine.

La technique décrite dans le chapitre " Matériel et Méthodes ", suivant celle de Théodorou *et coll.* (1996) repose sur une extraction d'ADN à partir de biopsies cutanées, suivie d'une amplification par PCR des gènes Vg et J du récepteur pour l'antigène des cellules T (TCR) et

révélation d'une éventuelle monoclonalité par migration électrophorétique de l'ADN en conditions dénaturantes. La position des brins d'ADN amplifiés est révélée par coloration du gel d'électrophorèse au bromure d'éthidium.

RESULTATS

Histologie et immunohistologie

Sur tous les prélèvements, histologiquement, l'épiderme était normal ou siège d'un discret infiltrat lymphocytaire. Dans le derme un infiltrat mononucléé peu abondant était présent dans les aires périvasculaires. Des polynucléaires (PN) éosinophiles étaient observés dans un cas d'exanthème maculo-papuleux (EMP) dû à la pénicilline M, dans 3 des 7 toxidermies induites par la pristinamycine (1 EMP et 2 érythrodermies) et dans 1 EMP induit par la norfloxacine. Les biopsies dans lesquelles étaient observées des PN éosinophiles avaient été réalisées, en moyenne, un peu plus tardivement par rapport à la date d'apparition de la toxidermie, que celles ne contenant pas ces cellules (délai moyen respectivement de 6,5 jours contre 3,2 jours). Les études en immunofluorescence directe étaient négatives chez tous les patients.

En immunofluorescence indirecte, les cellules de Langerhans épidermiques exprimant CD1a étaient en nombre normal sur toutes les biopsies (300 à 400/mm2). En moyenne, soixante cellules de Langerhans par mm^2, exprimaient également HLA DR.
Des cellules dendritiques dermiques CD1a positives ont été observées dans 8 des 14 cas (tableau 15). Ces cellules dendritiques dermiques CD1a+ étaient présentes dans des EMP induits par la norfloxacine ou l'isoniazide, dans toutes les toxidermies induites par les bêta-lactamines (5/5), mais seulement dans une des 7 toxidermies induites par la pristinamycine. Ces cellules étaient en contact avec la jonction dermo-épidermique (figure 6) ou dans les espaces périvasculaires (figure 7). Des cellules périvasculaires exprimant HLA DR et de morphologie dendritique, étaient aussi observées dans 13 des 14 prélèvements. Le seul patient chez lequel ces cellules dendritiques exprimant HLA DR n'étaient pas observées avait un EMP dû à l'amoxicilline. Au total, des cellules dendritiques dermiques CD1a+/HLA-DR+ ont été observées dans 7 des 10 EMP (3 des 4 dus à l'amoxicilline, 1/1 dû à la pénicilline M, 0 des

3 dus à la pristinamycine, 1/1 dû à l'isoniazide, 1/1 dû à la norfloxacine) et dans 1 des 4 érythrodermies induites par la pristinamycine.

Sur tous les prélèvements, des lymphocytes T CD3+ étaient présents, en nombre variable, soit autour des vaisseaux, soit dispersés dans le derme papillaire. Dans 6 des 7 toxidermies induites par la pristinamycine, les cellules T CD3+ étaient nombreuses avec des infiltrats très denses dans 4 cas. Des cellules T CD3+ étaient visualisées dans le derme superficiel, en contact avec la jonction dermo-épidermique mais très rarement observées dans l'épiderme. Ces cellules T CD3+ épidermiques étaient observées dans des toxidermies dues à la pristinamycine ou à l'isoniazide.
Les infiltrats périvasculaires étaient composés majoritairement de cellules T CD4+ (50-80% des cellules T CD3+). Des cellules T CD4+ épidermiques n'ont été observées que dans 1 cas d'érythrodermie et 1 cas d'EMP induits par la pristinamycine.
Des cellules T CD8+ à la jonction dermo-épidermique ont été observées, en petit nombre, dans 6 cas (5 EMP dus à l'isoniazide, à l'amoxicilline, à la pénicilline M ou à la pristinamycine (n=2) et 1 érythrodermie due à la pristinamycine). Des cellules T CD8+ étaient aussi retrouvées dans les infiltrats périvasculaires.
Les cellules T dermiques exprimaient CD11a (LFA1) dans tous les cas et CD62L dans la moitié des cas (2 des 4 EMP dus à l'amoxicilline, 2 des 3 EMP induits par la pristinamycine, 2 des 4 érythrodermies dues à la pristinamycine et 1 EMP dû à la pénicilline M). L'expression de CD25 par les cellules T n'était observée que dans un cas d'EMP dû à la norfloxacine, tandis que HLA DR était exprimé dans tous les prélèvements, par les cellules T périvasculaires, suggérant que ces cellules T sont effectivement activées.

Les cellules endothéliales étaient activées et exprimaient très fortement CD54 dans tous les cas, CD62P dans tous les cas sauf deux (1 EMP et 1 érythrodermie dus à la pristinamycine) et CD62E dans 8 des 14 toxidermies (3 des 4 EMP dus à l'amoxicilline, 1 EMP dû à la pénicilline M, 3 des 4 érythrodermies et 1 des 3 EMP dus à la pristinamycine).VCAM1 (CD106) n'était exprimé, et ce faiblement, que dans 3 des 14 toxidermies (1 EMP dû à l'amoxicilline et 2 érythrodermies dues à la pristinamycine).

Dans la plupart des cas, en particulier dans les assises basales épidermiques, les kératinocytes paraissaient activés, exprimant CD54 dans 10 des 14 cas (2 des 4 EMP dus à l'amoxicilline,

les EMP dus à la pénicilline M et à l'isoniazide, 3 des 3 EMP et 2 des 4 érythrodermies induites par la pristinamycine), mais les kératinocytes exprimaient HLA DR seulement dans 3 des 14 cas (1EMP du à l'isoniazide et 2/4 érythrodermies dues à la pristinamycine).

Enfin, un marquage inattendu des kératinocytes par **CD62L** a été observé chez 5 patients (3 patients avec une érythrodermie due à la **pristinamycine** (figure 3), 1 EMP dû à la pristinamycine et 1 EMP induit par l'**isoniazide**). CD62L était exprimé sur toute la hauteur de l'épiderme et sur les cellules épithéliales des canaux excréteurs des glandes sudoripares (figure 4). Pour un de ces 5 patients nous avons pu obtenir la biopsie d'un test épicutané positif à la pristinamycine. Sur la biopsie de ce test, les kératinocytes exprimaient également CD62L, comme dans la toxidermie initiale du patient. Il n'y avait aucune corrélation entre l'expression de CD62L par les kératinocytes et celle d'une autre molécule d'adhésion par les kératinocytes ou les cellules infiltrantes. L'expression de CD62L par les kératinocytes n'était pas corrélée avec la présence d'images histologiques de "satellite cell necrosis" dans l'épiderme. Chez les patients ayant une toxidermie secondaire à la prise de pristinamycine, ceux dont les kératinocytes exprimaient CD62L avaient eu une biopsie cutanée 1 à 12 jours (délai moyen = 5 jours) après la survenue de la toxidermie. Par contre, pour les patients avec une toxidermie due à la pristinamycine mais ne présentant pas d'expression épidermique de CD62L, les biopsies avaient été réalisées 1 ou 2 jours (délai moyen : 1,33 jours) après la survenue des premiers signes de la toxidermie. De même chez le patient qui avait un EMP dû à la prise d'isoniazide et une expression épidermique de CD62L, la biopsie cutanée avait été réalisée 9 jours après le déclenchement de la toxidermie et 2 jours après l'arrêt du médicament responsable. Des biopsies tardives avaient toutefois été réalisées chez d'autres patients sans que soit observée d'expression kératinocytaire de CD62L.

Détermination de la masse moléculaire du CD62L épidermique

Une bande protéique a été observée sur la membrane. Sa masse moléculaire a été déterminée à l'aide du logiciel IM1D (Pharmacia, Upsalla, Suède) après passage au Scanner et analyse d'image.

Il s'agissait d'une bande de **76 kD**, cette masse moléculaire correspondant à celle de la L sélectine leucocytaire, exprimée sur les lymphocytes.

Expression de CD62L par les kératinocytes dans d'autres dermatoses

Nous n'avons pas observé d'expression de CD62L épidermique ni sur une urticaire due à la spiramycine, ni sur 2 eczémas de contact induits par des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Rappelons que cette expression n'était pas retrouvée dans 5 cas d'exanthème maculo-papuleux induit par les bêta-lactamines, 1 EMP du à la norfloxacine et 3 toxidermies dues à la pristinamycine dans la population de patients étudiés dans la cinquième étude ni chez la patiente ayant présenté un syndrome Babouin induit par les veinoglobulines.

L'expression kératinocytaire de CD62L n'est liée, dans cette étude, ni à l'expression des autres marqueurs d'activation des kératinocytes, ni à la présence d'un infiltrat lymphocytaire dermique dense observé en histologie, ni à la présence de " satellite cell necrosis ".
Cette expression pourrait être liée à la prise d'un type de médicament. Il n'existe pas de parenté chimique entre la pristinamycine et l'isoniazide. Dans les spécialités utilisées par les patients (PYOSTACINE® et RIMIFON®), les seuls excipients communs sont le stéarate de magnésium, présent dans les autres spécialités prises par des patients appartenant à cette population mais n'ayant pas d'expression épidermique de CD62L et l'amidon de blé présent aussi dans une spécialité contenant de la spiramycine qui avait été prise par une patiente avec urticaire à ce macrolide mais qui n'avait pas d'expression kératinocytaire de CD62L.

Apoptose dans les toxidermies : expression de CD95 et Bcl2

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 16.

Kératinocytes

L'expression du marqueur d'apoptose CD95 était retrouvée dans 7/14 cas, 5/10 EMP et 2/4 érythrodermies, 2/5 EMP dus aux bêta-lactamines, 4/7 toxidermies dues à la pristinamycine. Cette expression était peu importante, elle ne concernait que quelques kératinocytes de l'assise basale épidermique. L'expression de CD95 sur plusieurs assises épidermiques n'était observée que dans un cas d'EMP dû à la pristinamycine. Dans 3 de ces 7 cas il y avait expression conjointe du marqueur d'apoptose CD95 et du marqueur de protection vis à vis de

l'apoptose Bcl-2. L'expression de Bcl-2 n'était observée dans l'épiderme que dans 4 cas sur l'assise basale épidermique. Dans 2 de ces cas (#7,12) seules quelques cellules de l'assise basale épidermique étaient marquées. Il n'est pas possible de préciser s'il s'agissait de l'expression normale de mélanocytes ou de l'expression anormale de Bcl-2 par des kératinocytes.

Lymphocytes

Une expression lymphocytaire de CD95 n'était observée que dans deux EMP, l'un induit par l'amoxicilline, l'autre par la pristinamycine et cette expression ne concernait que quelques lymphocytes dermiques périvasculaires. Les lymphocytes périvasculaires exprimaient Bcl-2 dans 11 cas sur 14. Dans les deux cas d'expression lymphocytaire de CD95 il existait également une expression du marqueur de protection contre l'apoptose Bcl-2.

Monoclonalité des lymphocytes T infiltrants dans les toxidermies

Dans les 10 prélèvements cutanés examinés, **aucune monoclonalité des cellules T** n'a été mise en évidence. La technique a été validée par ailleurs dans le laboratoire par démonstration de monoclonalité cellulaire T dans d'autres tissus, en particulier dans des infiltrats de pathologies dysimmunitaires glandulaires.

DISCUSSION

Nous avons étudié *in situ* 14 biopsies de toxidermies induites par des antibiotiques et avons mis en évidence une expression tout à fait inhabituelle de **CD62L par les kératinocytes** de certains patients.

L'expression de CD62L épidermique, sur ces premiers résultats semble être liée à la prise de **certains antibiotiques** et au **délai** écoulé entre la survenue de la toxidermie et la réalisation de la biopsie.

Le CD62L est une sélectine leucocytaire exprimée par les lymphocytes mais aussi les thymocytes, les cellules NK, les PN neutrophiles et le PN éosinophiles (Pigott 1993). Cette sélectine est impliquée dans le " homing " lymphocytaire et monocytaire sur les sites inflammatoires, l'adhésion des phagocytes sur les cellules endothéliales, du " rolling " des leucocytes sur les veinules. Son ligand est sialylé. C'est un polypeptide, comportant 7 sites de glycosylation, dont le PM déterminé en SDS-PAGE est de 74 kD sur les lymphocytes (Tedder 1990) mais de 90 à 100 kD sur les PN neutrophiles (Griffin1990). Nous avons déterminé que l'antigène reconnu par le CD62L sur les kératinocytes a un PM de 76kD ce qui correspond au PM de l'ag reconnu par le CD62L sur les lymphocytes.

Le rôle de la dérepression d'expression de cette sélectine sur les kératinocytes dans ces toxidermies n'est pas connu. Cette expression paraît être liée à certains médicaments et apparaître surtout chez des patients ayant une biopsie assez tardive par rapport au début des signes de toxidermie. La recherche de l'expression de cette sélectine par les kératinocytes dans un plus grand nombre d'autres dermatoses inflammatoires serait intéressante.

L'**apoptose** des kératinocytes ou des cellules T ne paraît pas être un phénomène physiopathologique important dans les exanthèmes maculo-papuleux ou les érythrodermies induites par les antibiotiques.

	délai *	C dendritiques CD1a+ dermiques	HLA DR sur kératinocytes	CD54 sur kératinocytes	CD62L sur kératinocytes
EMP (amoxicilline)	3 jours	présentes	négatif	positif	négatif
EMP (amoxicilline)	1 jour	présentes	négatif	positif	négatif
EMP (amoxicilline)	7 jours	présentes	négatif	positif	négatif
EMP (amoxicilline)	5 jours	présentes	négatif	négatif	négatif
EMP (pénicilline M)	7 jours	présentes	négatif	positif	négatif
EMP (norfloxacine)	2 jours	présentes	négatif	négatif	négatif
EMP (isoniazide)	9 jours	présentes	positif	positif	positif
EMP (pristinamycine)	1 jour	absentes	négatif	positif	négatif
EMP (pristinamycine)	1 jour	absentes	négatif	positif	négatif
EMP (pristinamycine)	12 jours	absentes	négatif	positif	positif**
Erythrodermie (pristinamycine)	1 jour	absentes	négatif	négatif	positif
Erythrodermie (pristinamycine)	5 jours	absentes	négatif	positif	positif
Erythrodermie (pristinamycine)	2 jours	présentes	positif	positif	positif
Erythrodermie (pristinamycine)	2 jours	absentes	positif	négatif	négatif

Tableau 15 : Résultats immuno-histologiques des biopsies cutanées effectuées sur des toxidermies induites par des antibiotiques.

** Délai séparant la date de début de la toxidermie et la date de réalisation de la biopsie cutanée. ** Une expression de CD62L était aussi retrouvée sur la biopsie cutanée effectuée sur un test épicutané positif à la pristinamycine chez ce patient.*

	KERATINOCYTES		LYMPHOCYTES	
sémiologie	*CD95*	*Bcl2*	*CD95*	*Bcl-2*
EMP amoxicilline	+	-	+	+
EMP amoxicilline	-	-	-	-
EMP amoxicilline	-	-	-	+
EMP amoxicilline	-	-	-	+(70%)
EMP cloxacilline	+	-	-	+(quelques)
EMP norfloxacine	-	-	-	-
EMP isoniazide	+/-	+/-	-	+25%périvas
EMP pristinamycine	-	-	-	+ (80%)
EMP pristinamycine	+	+ assbas	+	+ périvasc
EMP pristinamycine	+2,3 assises	-	-	+ périvasc
EryD pristinamycine	+	-	-	+ périvasc
EryD pristinamycine	-	+/-	-	+ périvasc
EryD pristinamycine	+	+assbas	-	+ périvasc
EryD pristinamycine	-	-	-	-

Tableau 16 : Expression de CD95 et Bcl-2 par les kératinocytes et les lymphocytes *in situ* dans 14 cas de toxidermies induites par les antibiotiques.

EMP : exanthème maculo-papuleux, EryD : érythrodermie, perivasc : lymphocytes des espaces périvasculaires, assbas : assise basale.

CONCLUSION

Cette étude immuno-histochimique apporte des arguments supplémentaires en faveur de l'existence de mécanismes immunitaires d'hypersensibilité cellulaire retardée dans la physiopathologie des exanthèmes maculo-papuleux et des érythrodermies induits par les antibiotiques. Sur 4 nouveaux patients cette étude confirme les résultats que nous avions observés dans 5 cas antérieurs d'exanthème maculo-papuleux dû à l'amoxicilline. Si des similitudes sont observées dans ces différentes toxidermies ces résultats soulignent que des données établies pour un type sémiologique de toxidermie induite par un antibiotique donné ne sont pas totalement applicables à des toxidermies ayant soit un aspect clinique différent, soit une cause différente. En particulier il semble que les cellules dendritiques CD1a+ dermiques jouent un rôle dans les toxidermies dues aux bêta-lactamines mais qu'elles soient très rarement présentes dans les toxidermies dues à la pristinamycine. A l'inverse la mise en évidence dans l'épiderme, pour la première fois à notre connaissance, d'une expression kératinocytaire de CD62L, dont la masse moléculaire est identique à celle du CD62L exprimée par les cellules T, a été retrouvée dans 4 des 7 toxidermies dues à la pristinamycine et sur la biopsie d'un test épicutané à la pristinamycine positif.

Les phénomènes d'apoptose, étudiés par l'expression in situ de CD95 et du marqueur de protection contre l'apoptose Bcl-2 étaient peu importants. Contrairement aux résultats obtenus par méthode TUNEL dans les toxidermies épidermolytiques (Paul 1996), il ne semble pas exister d'apoptose majeure kératinocytaire dans les exanthèmes maculo-papuleux ou dans les érythrodermies médicamenteuses.
Les lymphocytes infiltrants n'expriment presque jamais de marqueurs d'apoptose, au contraire ils expriment fréquement Bcl-2. Le devenir des lymphocytres infiltrants dans ces toxidermies ne semble donc pas être une mort in situ par apoptose.

Par technique PCR-DGGE nous n'avons pas observé de monoclonalité des cellules T infiltrantes dans les 10 toxidermies induites par des antibiotiques étudiées.

SIXIEME ETUDE : REACTIVITE CELLULAIRE AUX MEDICAMENTS *IN VITRO* (TDBH ET TAL)

OBJECTIFS

La sensibilité et la spécificité des tests médicamenteux *in vitro* est mal connue. Cette étude a été réalisée pour faire une évaluation préliminaire de l'intérêt de ces tests dans les toxidermies qu'il s'agisse des tests de dégranulation des basophiles humains (TDBH) ou de la technique originale des tests d'activation lymphocytaire (TAL).

MATERIEL ET METHODES

Population

Trente et un patients ayant une imputabilité probable ou très probable d'un médicament lors de la survenue de leur toxidermie ont bénéficié de tests médicamenteux in vitro.
Un TDBH avec le médicament suspecté a été réalisé chez 28 d'entre eux, et un TAL chez 18 de ces patients. Les caractéristiques de ces patients sont rapportées dans le tableau 17.
Chez certains de ces patients nous avons également pu durant la phase toxidermique, faire une recherche des complexes immuns circulants et/ou une étude des sous-populations lymphocytaires, selon les méthodes décrites dans le chapitre " Matériel et Méthodes ".

RÉSULTATS

Sensibilité des TDBH et TAL

Un **TDBH positif** a été observé chez 8 des 28 patients testés (**32%**), dont 3 avaient un test cutané médicamenteux positif. Un **TAL positif** a été observé chez 5 des 18 patients testés (**28%**), dont 6 avaient un test cutané médicamenteux positif.
Dans 16 cas sur 28 (57%) les patients avaient au moins un test cutané pertinent positif tandis que les TDBH et/ou TAL réalisés au même moment demeuraient négatifs.
Dans 4 cas sur 31 (13%), les tests in vitro réalisés avec le médicament suspecté étaient positifs alors que les tests cutanés médicamenteux étaient demeurés négatifs. Il s'agissait de 3 TDBH,

réalisés dans le cadre du bilan d'une urticaire due à l'amoxicilline, d'une érythrodermie due à la pristinamycine et d'un EMP induit par l'isoniazide.

Deux cas de positivité *in vitro* avec négativité des tests cutanés concernaient des TAL effectués dans le cadre de l'exploration d'une érythrodermie due à la pristinamycine (la même que celle présentant un TDBH positif) et un syndrome Babouin induit par les veinoglobulines. Il faut remarquer que dans l'observation d'un syndrome Babouin induit par les veinoglobulines, un autre TAL réalisé 6 semaines après la toxidermie était positif mais négatif lors d'un contrôle réalisé 18 semaines plus tard.

Spécificité des TDBH et des TAL

La spécificité de ces tests reste à définir.

Spécificité des TDBH

Parmi des patients appartenant à la population des 310 sujets analysés suspects de toxidermie mais non inclus dans cette étude car n'ayant pas une imputabilité très probable de la responsabilité d'un médicament dans la survenue de leur éruption cutanée, pour l'amoxicilline nous avons observé des résultats positifs des TDBH chez 9 des 26 autres patients chez lesquels ce test avait été réalisé avec ce médicament. Ces 26 TDBH à l'amoxicilline ont été réalisés chez des patients pour lesquels l'imputabilité de cette bêta-lactamine n'était pas très probable dans la survenue de leur dermatose mais la responsabilité de cet antibiotique était possible. Chez 6 des 9 " témoins " ayant un TDBH positif à l'amoxicilline, l'imputabilité de cette bêta-lactamine dans la survenue de leur dermatose était toutefois possible. A ce stade de notre étude, nous ne pouvons pas préciser si ces patients étaient de véritables témoins négatifs (le TDBH étant alors faussement positif) ou des patients "allergiques" à cet antibiotique (le TDBH étant un vrai positif).

Pour la pristinamycine, chez 1 " témoin négatif " sur 7, le TDBH était positif, ce patient ayant eu une dermatose pour laquelle le diagnostic de toxidermie à la pristinamycine ne pouvait pas être écarté.

Il serait donc nécessaire afin de déterminer la spécificité de ce test de réaliser des TDBH chez des patients ayant pris les médicaments sus-cités comme l'amoxicilline, la pristinamycine ou le Lamisil®250, sans signe d'intolérance, 6 semaines auparavant.

Spécificité des TAL

Pour les TAL, le problème de la spécificité est également posé. Pour l'amoxicilline 12 TAL sur 37 réalisés avec l'amoxicilline sous différentes formes chimiques (amoxicilline pure, amoxicilline sodique associée à l'acide clavulanique) étaient positifs chez des patients n'appartenant pas à notre série. Dans tous ces cas la responsabilité de l'amoxicilline dans la survenue de leur dermatose était possible.

Pour la pristinamycine, 3 sujets ont eu des TAL positifs sur 6 patients témoins testés. Chez ces patients dans 2 cas, la responsabilité de la pristinamycine dans leur toxidermie était possible, par contre dans le 3ème cas la responsabilité de cette molécule a été écartée (sans essai de réintroduction de la synergistine chez le patient). Ce dernier cas fait évoquer la possibilité de TAL faussement positifs avec la pristinamycine chez des patients ayant pris ce médicament 6 semaines auparavant, et ce sans effet secondaire. Dans cette hypothèse, 3 TAL ont été réalisés sur des cellules T provenant du sang de patients, traités par pristinamycine, sans signe d'intolérance. Chez ces 3 patients, les TAL à la pristinamycine étaient positifs. Les TAL à la pristinamycine semblent donc pouvoir être positifs si une prise récente de pristinamycine a eu lieu, qu'il y ait ou non signe d'intolérance à cet antibiotique.

Chez une patiente ayant présenté un EMP après la prise de cyamémazine (IDR positive, réactivation de la toxidermie lors de la réalisation des IDR) le TAL réalisé 6 semaines plus tard avec la cyamémazine n'a pas pu être interprété, toutes les cellules mises en présence de cyamémazine (pas de témoin fait sur les cellules d'un autre patient) ayant été lysées. Nous avons observé à la même date chez la patiente des TAL positifs pour d'autres médicaments pris au moment de la toxidermie, interrompus durant 6 semaines jusqu'à la réalisation des examens immuno-allergiques, à savoir l'Imovane® (repris ensuite sans problème), le Flebosmyl® (non repris), le Sulfarlem® (repris ensuite sans problème). La responsabilité de ces médicaments avait été écartée dans la survenue de la toxidermie. Cette patiente avait des antécédents d'urticaire après la prise de floctafénine mais pas d'antécédent connu aux antibiotiques. On doit en effet soulever, devant ces réponses lymphocytaires touchant

plusieurs classes médicamenteuses, le problème d'une réactivité lymphocytaire induite par les antibiotiques utilisés, à faibles doses dans la culture lymphocytaire. Cette hypothèse est écartée par la réalisation du témoin négatif qui sert à l'interprétation des tests dits positifs, ceux dont la phase S est au moins multipliée par 2, le milieu de culture utilisé pour ce témoin négatif contenant les mêmes antibiotiques.

Dans 2 cas nous avons pu réaliser de nouveaux TAL à quelques semaines d'intervalle. Pour le Lamisil®250 cp, un TAL a été retrouvé positif sur un prélèvement fait 8 semaines après la survenue d'un érythème polymorphe induit par cette allylamine. Cinq mois plus tard le contrôle réalisé retrouvait toujours un TAL positif chez cette patiente avec le Lamisil®250. Pour le Lamisil®250, 1 témoin, n'ayant jamais pris de Lamisil® avait un TAL négatif, un témoin ayant eu une dermatose lors de la prise de cet antifongique, sans qu'il soit possible d'affirmer ou d'infirmer la responsabilité de ce médicament dans la survenue de ce prurit avait un TAL positif.

Pour les Sandoglobulines®, un TAL réalisé 6 semaines après l'arrêt des injections de veinoglobulines était positif, par contre le contrôle réalisé chez la même patiente 18 semaines après l'arrêt des veinoglobulines était négatif. Il faut remarquer que la sensibilité de cette patiente aux veinoglobulines persistait cliniquement à 18 semaines puisqu'à cette date une réintroduction à des doses faibles, de veinoglobulines a entraîné une dermatose généralisée maculeuse ayant nécessité la mise sous corticothérapie générale à 1mg/kg/j pour juguler la poussée.

Cette première évaluation de l'intérêt de la méthode originale des TAL dans le bilan des accidents médicamenteux montre qu'ils ont une sensibilité moyenne et une spécificité qui reste à définir. Il sera important à l'avenir :

- d'essayer de déterminer s'il existe une **variation chronologique** de la réactivité lymphocytaire T spécifique du médicament. La positivité des TAL chez des sujets venant de prendre de la pristinamycine est importante à connaître. Ce type de réponse doit être recherché pour d'autres médicaments. La positivité d'un TAL 6 semaines après l'administration de veinoglobulines mais négative 18 semaines après cette prise incite à supposer que la réactivité lymphocytaire spécifique d'un médicament peut diminuer à distance de la prise médicamenteuse. Cette diminution de réactivité n'est pas vérifiée pour tous les médicaments.

En effet chez une patiente 2 TAL au Lamisil 250®, réalisés à 6 mois d'intervalle, étaient positifs.

- d'étudier les lymphocytes T stimulés spécifiquement par le médicament pour connaître leur type, leur **réponse oligoclonale ou monoclonale éventuelle**, leur spécificité de reconnaissance épitopique.

Bilan immunitaire réalisé durant la phase toxidermique

Une hyperéosinophilie a été observée dans 2 cas sur les 15 recherches faites chez des patients en phase de toxidermie (un prurit généralisé dû à l'héparine et une urticaire induite par l'érythromycine).

Dans cette population de patients dont l'imputabilité pour un médicament était probable ou très probable dans la survenue de leur toxidermie, ayant tous bénéficié au moins d'un test épicutané médicamenteux et souvent de prick tests et d'IDR, de TDBH et/ou de TAL avec le médicament responsable, chez 9 sujets a été réalisée une recherche de complexes immuns circulants (CIC), et chez 8 sujets une étude des sous populations lymphocytaires.

La présence d'un taux légèrement augmenté de CIC a été retrouvée chez un seul patient (1/9 = 11%) dans les premiers jours de la survenue d'un EMP dû à l'amoxicilline.

Quatre patients avaient des sous populations lymphocytaires normales. Dans 2 cas d'EMP dus à l'amoxicilline il existait une lymphopénie associée à une diminution du rapport CD4/CD8 (0,77). Le rapport CD4/CD8 était légèrement augmenté, avec un taux de lymphocytes sanguins normal dans un cas d'EMP dû à l'amoxicilline et un cas d'érythème polymorphe dû au Lamisil®250 cp.

Tableau 17 : Résultats des tests in vitro.

Résultats des tests biologiques (test de dégranulation de basophiles humains (TDBH), tests d'activation lymphocytaire médicamenteux (TAL)), des anomalies immunologiques rencontrées durant l'accident médicamenteux (complexes immuns circulants (CIC), sous-populations lymphocytaires, rapport CD4+/CD8+ (Spop), hyperéosinophilie (Eo)) comparés aux résultats des tests cutanés médicamenteux (tests épicutanés (Pt), prick tests (prT), tests intradermiques avec lectures à 30mn (IDRi) et tardives (IDRr)) chez des patients avec toxidermie pour laquelle un médicament a pu être déterminé responsable de la dermatose, et parfois réintroduit accidentellement avec rechute de la toxidermie (Rin) ou réactivation de la toxidermie durant les tests cutanés (**).

Clinique	Pt	prT	IDRi	IDRr	TDBH	TAL	CIC	Spop	Eo	Rin	Médicament
EMP	+/++	-/+	-	+	+	+	+	0,37	-	+	amoxicilline
EMP	++/++	-/+	-	+	-	nf	nf	nf	-	+	amoxicilline
EMP + pu	+/+	-	-	+	+	-	-	nale	-	0	amoxicilline
EMP + pu	-	-	-	+	-	-	-	0,78	-	0	amoxicilline
érythroD	+	-	+	+	nf	+aug	-	3	nd	+	amoxicilline
Eczema G	-	-	-	+ 48h	-	nf	nf	nf	nf	0 **	amoxicilline
urticaire	-	-	-	-	+	-	nf	nf	-	0	amoxicilline
urticaire	-	-	+	+	-	-	nf	nf	nf	0	amoxicilline
urticaire	-	+	nf		-	-	nf	nf	nf	+	amoxicilline
t.négatifs	59	42	22		9+/26	12+/37					
G Eczema	0/+	nf	nf		-	nf	nf	nf	nf	0	Pénicilline G
t.négatifs	16	9	7		5+/15	0+/5					
urticaire	-	-	-	+	nf	-	nd	Nale	+	0	érythromycine
t.négatifs	24	7	7			0+2					
EMP	+/+	nf	nf		-	-	nf	nf	nf	0	pristinamycine
ErythroD	-	-	nf		+	+	-	Nale	-	0	pristinamycine
ErythroD	+/+	nf	nf		+	nf	nf	nf	nf	0	pristinamycine
ErythroD	+/+	nf	nf		-	nf	nf	nf	-	0	pristinamycine
ErythroD	+/++	nf	nf		-	nf	-	nf	nf	0	pristinamycine
t.négatifs	11	3			1+/7	3+/6					
						+3+					
EMP	-	-	-	-	+	nf	nf	nf	-	+	isoniazide
t.négatifs	1	1	1		1+/1						

Clinique	Pt	prTi	IDRi	IDRr	TDBH	TAL	CIC	Spop	Eo	Rin	Médicament
EMP +pu	-	-	+	-	+	cmort	nf	nf	-	0 **	cyamémazine
t.négatifs	4	3	3		2+/4	0					
Eczéma G	+/+	nf	nf		-	nf	-	nf	nf	+	enoxoparine
Eczéma L	-	-	-	+ 72h	-	nf	nf	nf	nf	+	enoxoparine
t.négatifs	11	5	4		0/5	0+/2					
Eczéma G	-	-	+	+	nf	-	nf	nf	-	+	estradiol
t.négatifs	6	3	3		0	0+/3					
urt+OQ	+/+	nf	nf		-	cmort	nf	nf	-	0	fusafungine
t.négatifs	7				2+/4	1+/2					
prurit	-	-	nf		-	nf	nf	nf	-	+	glibenclamide
t.négatifs	3	1			0/3	0+/1					
prurit	-	nf	nf		-	-	nf	nf	+	+	héparine
t.négatifs	9	8	5		0/6	0+/3					
ErythroD	+/+	nf	nf		-	nf	nf	nf	nf	0 **	hydroxyzine
t.négatifs	8				0/3	0+/1					
photoS	-	nf	nf		-	nf	nf	nf	nf	+	méthoxsalène
t.négatifs	0				0/1						
urticaire	-	-	+	+	-	-	nf	nf	nf	+	piroxicam
t.négatifs	20	6	6		0	1+/9					feldène
S. Babouin	-	-			-	+ /-	-	-	-	nf	veinoglobulines
t.négatifs					0+/1	0					
EMP	+/+	nf	nf		-	-	nf	nf	nf	0	tétrazépam
t.négatifs	18	7	0		1+/3	0+/2					
Eczéma G	++/++	nf	nf		-	nf	nf	nf	nf	0 **	triamcinolone
t.négatifs	10				0	0					triamcinolone
Epolymor	+/+	nf	nf		+	+	-	3		0	Lamisil®cp
t.négatifs					2+/3	1+/1					

CONCLUSION

Une évaluation préliminaire de la sensibilité des TDBH et des TAL médicamenteux, a pour la première fois, à notre connaissance, pu être faite sur une étude prospective, avec différents médicaments et avec des sémiologies variées de toxidermies. De plus ces tests biologiques ont été comparés aux résultats des tests cutanés médicamenteux obtenus chez les mêmes patients. Ces résultats montrent que les TDBH et les TAL n'ont été positifs et pertinents quand les tests cutanés étaient négatifs, que dans un très petit nombre de cas. A l'inverse dans 57% des cas les patients avaient des tests cutanés positifs pertinents, mais des tests in vitro négatifs. Ceci conduit à ne pas recommander la pratique de ces tests de façon systématique dans le bilan courant des toxidermies. Par contre, quand leur spécificité sera établie - en faisant ces tests chez des sujets venant de prendre le médicament avec une parfaite tolérance - ces tests pourraient être des outils d'analyse des mécanismes immunitaires en cause dans certaines toxidermies.

Certaines améliorations doivent aussi être apportées dans la réalisation de ces tests. Le type de molécule testée et sa concentration doivent être précisés. Le nombre de cellules présentatrices d'antigène dans la culture, des études cinétiques de réponse aux haptènes médicamenteux et de la sensibilité des TAL sont souhaitables.

ACCIDENTS CUTANES APRÈS VACCINATION

OBJECTIFS

Selon les données bibliographiques, dans une revue de la littérature que nous avons publiée (Barbaud 1995 Ann Dermatol), les mécanismes des accidents cutanés post-vaccination sont variés : sensibilisation à un des composants de la solution vaccinale (agent vaccinal, conservateurs, adsorbants, résidus de fabrication), stimulation non spécifique immunitaire. L'intérêt des tests immuno-allergiques cutanés en cas d'accident cutané vaccinal est mal connu. Cette étude a pour objet de préciser la place de ces investigations dans le bilan de ces effets secondaires cutanés et d'essayer de déterminer les mécanismes en cause dans certains accidents cutanés post-vaccinaux.

Nous avons examiné **17 patients** présentant une dermatose dans les suites d'une vaccination. Dans **un cas supplémentaire**, nous avons réalisé des investigations chez une femme ayant une " contre indication " à toute vaccination depuis l'enfance, en raison de la survenue d'une urticaire profonde apparue 24 à 48 heures après des vaccinations anti-diphtérie-tétanos-poliomyélitique.

D'autres patients nous ont également été adressés pour bilan après survenue de fortes réactions locales au point d'injection du vaccin (signes non constatés par un membre de l'Equipe du Service de Dermatologie).

Les 17 patients ayant des manifestations cutanées récentes, inclus dans cette étude se répartissaient de la façon suivante :

- après vaccination anti-grippale 1 vasculite allergique et 1 urticaire ;
- après vaccination anti-Diphtérie, Tétanos et Polio 3 réactions eczémateuses au point d'injection, une réaction au point d'injection accompagée d'un exanthème maculo-papuleux des membres inférieurs, une urticaire et un nodule sous cutané accompagné d'une poussée inflammatoire de nodules anciens siégeant sur les anciens sites d'injection de solution de désensibilisation ;
- après vaccination anti-hépatite B, 7 cas d'urticaire (dans 5 cas, les investigations immuno-allergiques ont été réalisées), 1 eczéma au point d'injection et 1 exanthème maculo-papuleux généralisé.

SEPTIEME ETUDE : ACCIDENTS CUTANES APRÈS VACCINATION ANTI-GRIPPALE

Les vaccins anti-grippaux contiennent trois souches de virus cultivés sur milieu à l'œuf embryonné et inactivés par le formol. La vaccination anti-grippale est en général bien tolérée. Elle peut entraîner des manifestations anaphylactiques, avec ou sans allergie à l'oeuf, mais un autre de ses effets secondaires doit être connu : la vasculite allergique. Dans cette étude des accidents cutanés post vaccination nous avons observé 2 cas d'intolérance cutanée à des vaccins anti-grippe : une urticaire généralisée sans oedème de Quincke, dans les 24 heures suivant la première vaccination anti-grippale chez un patient agé de 62 ans **allergique à l'œuf** (RAST au blanc et au jaune d'œuf positifs de classe II) et un cas de vasculite d'hypersensibilité détaillé ci-dessous.

VASCULITE APRES VACCINATION ANTI-GRIPPALE

Observation

Huit jours après une primo-vaccination anti-grippale (MUTAGRIP PASTEUR®), Mr L... Gérard agé de 55 ans a présenté un purpura pétéchial généralisé mais respectant la face, sans aucune autre anomalie de l'examen clinique.

Dans ses antécédents ce patient a présenté un **purpura rhumatoïde à l'âge de 5 ans**, un diabète non insulino-dépendant traité depuis 3 ans par Metformine et Gliclazide et une hypertension artérielle sous Aténolol depuis un an.

Examens complémentaires

Les examens complémentaires réalisés ne mettent pas en évidence d'anomalies de la NFS, des bilans hépatique et rénal, la VS est à 5/12, la coagulation normale. Le bilan immunitaire est sans particularité (sous-populations lymphocytaires, dosage pondéral des immunoglobulines G, A et M, dosage du complément et des complexes immuns circulants). Les sérologies virales (*Herpes virus hominis* types I et II, mycoplasme, chlamydiae, cytomégalovirus,

Parvovirus B19) étaient négatives ou témoignaient d'une séroconversion ancienne, les ASLO, antistreptokinases et antistreptodornases étaient normales.

La biopsie cutanée retrouvait histologiquement une vascularite leucocytoclasique.

En immunofluorescence directe sur biopsie conservée en congélation, on notait des dépôts faiblement granuleux d'IgA, d'IgM, des fractions C3 et C1q du complément. Des dépôts fins et discrets de C3 étaient également présents à la jonction dermo-épidermique.

Evolution

Sans modification des traitements antidiabétiques et antihypertenseurs, le purpura a disparu sous dapsone (DISULONE® 200 mg/j) en deux mois, sans récidive avec 3 ans de recul.

Le diagnostic de **vasculite induite par la vaccination anti-grippale chez un patient ayant des antécédents anciens de purpura rhumatoïde** a été retenu. La vaccination anti-grippale a été définitivement déconseillée. Compte tenu du diagnostic de vascularite leucocytoclasique histologique, les tests cutanés n'ont pas été réalisés.

COMMENTAIRES

Selon 15 cas publiés (Wharton 1974, Blumberg 1980, Streifler 1981, Guillevin 1983, Wattiaux 1988, Patel 1988, Molina 1990, Vial 1990, Cavaghan 1993, Vidal 1993) de vasculite après vaccination anti-grippale dans la littérature et notre observation, ces manifestations surviennent dans les deux semaines qui suivent la primo ou la revaccination anti-grippale. Elles associent un purpura infiltré, parfois nécrotique (12 cas), une urticaire (2 cas), des polyarthralgies (12 cas), une fièvre (4 cas), des myalgies (6 cas), des troubles digestifs (5 cas), une atteinte rénale (5 cas) ou d'autres atteintes plus rares comme une neuropathie, une névrite optique, une péricardite ou une pneumopathie.

Les biopsies cutanées mettent en évidence une vascularite leucocytoclasique avec en IFD l'observation inconstante de dépôts vasculaires d'IgA.

Dans deux observations supplémentaires (Dam Janov 1979, Cannata 1981), la vaccination anti-grippale **a réactivé une vascularite pré-existante**, dont un purpura rhumatoïde comme ce fut le cas chez notre patient.

La physiopathologie de ces vascularites post vaccination anti-grippale est inconnue, la symptomatologie et les résultats des investigations immunologiques suggèrent un mécanisme à complexes immuns circulants. L'existence de cas de rechute d'une vascularite post vaccinale après utilisation de deux vaccins anti-grippe, aux excipients différents suggère que la souche vaccinale a une responsabilité dans le déclenchement de ce processus immunologique.

Notre observation souligne que cette vaccination peut induire une rechute d'une vascularite pré-existante, même si celle ci est très ancienne et jugée stabilisée comme ce fut le cas chez notre patient. Donc la vaccination anti-grippale est utile et le plus souvent bien tolérée, mais son administration doit être mise en question chez les sujets ayant des antécédents, même anciens, de vascularite. La survenue d'une vasculite post-vaccinale contre-indique formellement la poursuite de la vaccination anti-grippale.

HUITIEME ETUDE :

INVESTIGATIONS IMMUNO-ALLERGOLOGIQUES DANS LES REACTIONS SECONDAIRES A LA VACCINATION ANTI-DIPHTERIE - TETANOS -POLIO

INTRODUCTION

Selon notre revue de la littérature (Barbaud Ann Dermatol Venereol 1995) ces vaccins entraînent des réactions locales dans 40 à 70% des cas. La fréquence des réactions générales (encéphalopathie, choc anaphylactique) est estimée selon les séries de 0 à 10,5 cas par million de doses. Après vaccination par les 3 souches de virus vivants atténués poliomyélitiques, par l'anatoxine tétanique, par l'anatoxine diphtérique injectés séparément ou mélangés pour une injection unique ont été rapportés des urticaires, oedèmes de Quincke, des exanthèmes non spécifiques, un érythème polymorphe (Griffith 1988) et un eczéma (Vigan 1990). Des nodules au point d'injection de ces vaccins ont été également rapportés par sensibilisation à l'aluminium.

Après une analyse des données de la littérature nous avons proposé des modalités d'investigations dans les réactions cutanées importantes faisant suite à la vaccination anti-diphtérie-tétanos-poliomyélite (DTP). Nous rapportons les résultats de ces investigations chez **5** patientes ayant présenté de fortes réactions locales, parfois avec manifestations générales, après une vaccination anti-DTP et **une** patiente ayant une contre-indication ancienne de vaccination anti-DTP.

MATERIEL ET METHODES

Cas cliniques

Six patientes agées de 22 à 42 ans (âge moyen = 32,5 ans) ont bénéficié d'investigations dermato-allergologiques, après la survenue de fortes réactions locales (placard inflammatoire, infiltré, douloureux, parfois prurigineux, de plus de 10 centimètres de diamètre sur le site d'injection de vaccins anti-DTP).

Les caractéristiques cliniques des manifestations sont rapportées dans le tableau 18.

Les deux premières patientes (#1,2) avaient présenté une forte réaction locale, avec fièvre, apparues dans les 24 heures suivant la vaccination et qui avaient duré environ une semaine.

La patiente #3, âgée de 37 ans présentait, 24 heures après l'injection (bras gauche) du vaccin DT Polio Pasteur (conservateurs : 2 phénoxyéthanol, formaldéhyde) un placard inflammatoire sur le site de l'administration vaccinale. A 72 heures ce placard inflammatoire, prurigineux, de 20 cm de diamètre était centré par quelques vésicules. Il s'y associait une fièvre à 39°C, un exanthème maculeux des jambes et des chevilles, transitoire, mais sans adénopathie axillaire. Le reste de l'examen clinique était normal. Le bilan retrouvait une hyperleucocytose à polynucléaires, une V.S. à 88/94. Les hémocultures et les sérologies antistreptococciques répétées étaient négatives. Sous traitement par bêta-lactamines, débuté devant la suspicion de streptococcie, les symptômes disparaissaient en 2 semaines. Cette patiente d'origine turque avait un passé vaccinal mal connu mais aucune vaccination anti-DT Polio n'avait été faite depuis son arrivée en France, 20 ans auparavant.

La patiente #4, agée de 22 ans, avait présenté une forte réaction locale compliquée d'une urticaire généralisée, de fièvre et d'arthralgies après une vaccination anti-DTP. Il existait la notion d'une simple primo-vaccination dans les premières années de vie, les rappels de cette vaccination anti-DTP n'ayant pas été réalisés. Il n'existait pas de terrain atopique, pas d'antécédent d'urticaire. Le reste de l'examen clinique était normal. Le bilan biologique ne retrouvait pas d'altération de la fonction rénale. La symptomatologie post-vaccinale régressait en 10 jours, sous corticothérapie générale à faible doses (0,25 mg/kg/j en début de prescription) après un échec des antihistaminiques.

La patiente #5, n'a pas été examinée lors de la survenue de ses réactions post-vaccination. Les réactions étaient survenues à l'âge de 4 ans et 7 ans dans les suites de vaccinations par vaccins anti-DTP. De vastes placards inflammatoires étaient apparus sur le site des injections dans les jours suivant l'injection accompagnés d'une fièvre et de malaises. Depuis cet âge, la patiente, agée de 42 ans, travaillant come aide-soignante dans un service du Centre Hospitalo-Universitaire de Nancy, avait toujours évité une quelconque vaccination. C'est à la demande fort justifiée de son médecin du travail que ces investigations ont été réalisées.

La patiente #6 avait des antécédents de rhinite chronique atopique et avait pendant 2 ans, reçu des injections de désensibilisation vis à vis des acariens et d'un mélange de pollens de graminées. Des nodules cutanés sensibles évoluant parfois par poussées inflammatoires étaient apparus sur les sites d'injection. Cette désensibilisation allergénique avait été interrompue depuis 6 mois lorsqu'était réalisée une injection d'un vaccin D.T.vax® (thiomersal, hydroxyde d'aluminium) et absorption d'un vaccin Polio oral®. Dans les 24 heures, sur le site d'injection du vaccin anti diphtérie et antitétanique, était apparu un placard inflammatoire accompagné d'une poussée inflammatoire des nodules cutanés pré-existants. Ce placard inflammatoire, légèrement prurigineux disparut en quelques jours après application d'un topique cortisoné, mais sur son site se développa un nodule similaire à ceux qui étaient présents sur les sites d'injection des solutions de désensibilisation.
Outre les réactions observées lors de la réalisation des tests cutanés, la patiente avait noté des poussées inflammatoires des nodules cutanés, que nous avons pu, après un interrogatoire poussé, retrouver comme coïncidant avec l'utilisation de la crème anti-perspirante pM® (Laboratoire Promedica) contenant des sels d'aluminium.

Méthode

Les investigations ont été réalisées au moins 6 semaines après la disparition des réactions au point d'injection de la vaccination.

Tests cutanés

Les tests épicutanés ont été réalisés avec :
- Batterie standard des tests épicutanés ICDRG (comportant le formaldéhyde), le ou les antiseptiques utilisés pour la désinfection cutanée avant injection (Bétadine dermique®, alcool (testé par alcool éthylique à 95° dilué à 70% dans l'eau).
- DT Polio Pasteur® (2-phénoxyéthanol, formaldéhyde),
- D.T. Bis Mérieux® (thiomersal),
- vaccin Poliomyélitique inactivé Mérieux® (2-phénoxyéthanol, formaldéhyde),

- vaccin tétanique Pasteur® (thiomersal, hydroxyde d'aluminium),
- thiomersal à 0,1% dans la vaseline, phénoxyéthanol à 1% dans la vaseline, hydroxyde d'aluminium à 10% dans la vaseline et chlorure d'aluminium à 2% dans l'eau.

Les tests épicutanés posés sur le dos des patientes, sur support ne contenant pas d'aluminium, étaient lus à 20 mn, 48 et 96 heures.

En cas de négativité des tests épicutanés, des prick tests avec les vaccins purs sus-cités ont été réalisés, leurs résultats comparés à ceux d'un témoin positif (phosphate de codéine à 9%) et d'un témoin négatif (sérum physiologique à 0,9%) avec lectures réalisées à 20 minutes et 24 heures.

Quand les prick tests étaient négatifs les IDR étaient réalisées, selon les modalités de préparation décrites dans le chapitre " Matériel et Méthodes ", avec des injections effectuées toutes les 30 minutes, tant que la précédente dilution était négative, avec des dilutions progressives de 10^{-4} à 10^{-1} jusqu'à la solution vaccinale pure.

Un dosage des taux des anticorps protecteurs anti-tétaniques, anti-diphtériques et anti-poliomyélitiques a été réalisé pour conseiller au mieux la poursuite et la nécessité de cette poursuite de vaccination.

Investigations immuno-allergologiques dans une toxidermie post-vaccinale due a l'anatoxine tétanique

Dans le cas de la patiente #3 nous avons pu réaliser un immunophénotypage sur les IDR positives 1 heure après l'injection de la solution pure de DTPolio et après 24 heures sur le site de réaction de l'IDR réalisée avec le même vaccin dilué à 10^{-1}.

L'immunophénotypage sur les prélèvements congelés a été réalisé selon les méthodes exposées dans le chapitre " Matériel et Méthodes ".

RESULTATS

Tests cutanés

Les résultats des investigations sont rapportés dans le tableau 18.

Les **tests épicutanés** étaient positifs uniquement chez la patiente #6 avec l'hydroxyde d'aluminium (négatif avec le chlorure d'aluminium) et le thiomersal, 2 vaccins contenant l'un et/ou l'autre cet adsorbant ou ce conservateur (DT Bis Mérieux® et antitétanique Pasteur®). Le test avec une cupule Finn Chamber® vide (cupule en aluminium) était négatif. Chez cette patiente les investigations furent interrompues. La vaccination antipoliomyélitique a été refaite, les anticorps vis à vis du tétanos et de la diphtérie étaient à un taux protecteur, ces vaccinations n'ont pas été refaites.

Les **prick tests** étaient négatifs chez toutes les patientes sauf chez la patiente #5 chez laquelle à deux reprises nous avons observé une réaction papuleuse apparaissant 48 heures après la réalisation du prick avec le vaccin DT Polio Pasteur®. Sur les IDR cette patiente n'a pas développé de réaction pour les vaccins antitétanique ou poliomyélitique. Par contre nous avons observé une réaction retardée sur le site des IDR réalisées avec le vaccin DT Bis Mérieux®. Elle a été revaccinée avec les vaccins antitétanique puis poliomyélitique, sous surveillance hospitalière de 72 heures, avec une parfaite tolérance. Les réactions retardées semblant être rattachées à la toxine diphtérique, cette vaccination a été contre-indiquée, la patiente avait d'ailleurs encore des anticorps protecteurs anti-diphtériques.

Dans les 4 autres cas (#1,2,3,4), nous avons observé une négativité des tests épicutanés, des prick tests et une positivité tardive des **IDR** réalisées avec les vaccins DTPolio Pasteur® à partir de la dilution 10^{-1} (4 témoins négatifs), le vaccin DT Bis (réalisé chez les patientes # 1,2,3) et le vaccin antitétanique. Ceci soulève dans les 4 cas la responsabilité de la toxine tétanique dans la survenue de ces réactions. Chez la patiente #3 les réactions sur les sites du DTPolio Pasteur® étaient, de plus, positives en lecture immédiate pour la solution pure. A 24 heures des réactions de grand diamètre étaient observées dès la dilution 10^{-3} avec ce vaccin et à partir de la dilution 10^{-1} pour les IDR réalisées avec le vaccin tétanique Pasteur®. Chez cette patiente la vaccination anti-tétanique a été contre-indiquée, la patiente avait de toutes façons des anticorps protecteurs à un taux suffisant. Un suivi annuel du taux de ces anticorps a été préconisé.

Chez la patiente #4 les IDR réalisées, contenant la toxine tétanique étaient positives en lecture immédiate puis leur diamètre de réaction a augmenté dans les 48 heures qui ont suivi la réalisation de ces tests avec réapparition d'une urticaire sur les bras et le dos des mains. La patiente a refusé toute autre investigation.

Investigations immuno-allergologiques dans une toxidermie post-vaccinale due à l'anatoxine tétanique

L'IFD était négative. Après 2 heures, quelques lymphocytes (CD3 + CD4+) étaient présents autour de vaisseaux dermiques dont les cellules endothéliales activées exprimaient fortement CD62 E (ELAM 1), faiblement CD62 P (P Sélectine) et CD31 (PECAM 1) mais ni CD106 (VCAM 1), ni CD54 (ICAM 1). A 24 h, il existait une vascularite leucocytoclasique avec une forte infiltration de lymphocytes (2/3 CD4+) périvasculaires exprimant légèrement CD62 L et fortement CD31. Les cellules endothéliales étaient faiblement CD62 E positives mais par contre une expression forte d'ICAM 1 et de CD31 était apparue.

COMMENTAIRES

Dans les réactions sévères après vaccination anti-tétanos-diphtérie-poliomyélite ces investigations peuvent orienter vers une cause déclenchante et aider dans le choix du programme vaccinal ultérieur.

Les investigations telles qu'elles ont été réalisées ont permis de diagnostiquer une sensibilisation à l'aluminium chez la patiente #6. Ce cas réunit les 3 manifestations dues à une sensibilisation à l'**aluminium** dont nous avons fait une revue récente de la littérature (Barbaud Ann Dermatol 1995) : présence de nodules par sensibilisation aux sels d'aluminium persistant sur les sites d'injection des solutions de désensibilisation, des vaccins adsorbés sur sels d'aluminium ou des eczémas de contact avec ces mêmes solutions ou avec des crèmes anti-perspirantes contenant des sels d'aluminium. Dans cette observation il faut également noter la réactivation de poussées inflammatoires des nodules au point d'injection, des solutions de

désensibilisation allergénique lors de la vaccination avec une solution adsorbée sur aluminium, lors de l'utilisation sur les aisselles d'une crème anti-perspirante ou lors de la réalisation des tests épicutanés. La réaction locale observée sur le site de la vaccination a eu deux composantes. Si la réaction nodulaire secondaire est probablement liée à la sensibilisation à l'aluminium, la réaction précoce inflammatoire pouvait être due à l'aluminium et/ou au thiomersal. En effet le test au thiomersal était positif chez cette patiente. Nous avons conseillé par prudence une éviction de contact et d'administration de thiomersal. Pourtant il faut se souvenir chez un patient qui n'a pas eu de réaction d'intolérance à la vaccination, que la découverte d'un test épicutané positif au thiomersal n'entraîne en général aucune réaction d'intolérance lors de l'injection ultérieure de solutions vaccinales contenant ce conservateur (Cox 1988, Aberer 1991, Moller 1994). Enfin l'interprétation d'un test positif au **thiomersal**, chez un patient venant d'être vacciné avec une solution contenant ce conservateur doit toujours être prudente. En effet des "épidémies" de réactions positives aux tests épicutanés réalisés avec le thiomersal ont été rapportées après des campagnes de vaccination avec des solutions contenant du mercurothiolate sodique (Aberer 1991).

Dans notre revue de la littérature (Barbaud Ann Dermatol 1995) nous avions retrouvé des discordances dans les résultats des tests épicutanés réalisés avec les sels d'aluminium. Les deux tests les plus intéressants sont ceux réalisés avec de l'hydroxyde d'aluminium dilué à 10% dans la vaseline et du chlorure d'aluminium à 2% dans l'eau. Selon les données de la littérature il semblait exister des faux négatifs en testant l'hydroxyde d'aluminium dilué à 10% dans la vaseline. A l'inverse chez notre patiente les tests avec le chlorure d'aluminium à 2% dans l'eau étaient négatifs mais ceux avec l'hydroxyde d'aluminium dilué à 10% dans la vaseline étaient positifs. Il semble donc nécessaire de tester avec ces 2 sels en cas de suspicion d'allergie à ce métal.

L'observation d'un **prick test positif retardé** avec une solution vaccinale, comme chez notre patiente #5, est exceptionnelle. Un cas d'eczéma développé sur le site d'un prick test réalisé avec un vaccin DT Polio a été rapporté par Vigan *et coll.* (1990).

Si dans les observations #3 et #4 la responsabilité des vaccins dans les accidents sévères rencontrés ne peut pas être mise en doute, l'interprétation des résultats des cas #1 et 2 est plus difficile. La spécificité des IDR réalisées avec la toxine tétanique a été jugée mauvaise par certains auteurs (Vessal 1976, Weisse 1990), les IDR seraient même positives dans 100% des cas selon Weisse *et coll.* (1990). Dans notre expérience il faut noter que dans 4 cas, chez des

témoins ayant été vaccinés récemment, ces IDR étaient négatives. Les patientes #1 et 2 ayant des AC protecteurs antitétaniques, il n'était pas éthique de leur proposer une réinjection. Actuellement les taux des AC protecteurs de ces patientes sont surveillés annuellement. Lorsque ceux-ci seront négatifs nous avons proposé à ces patientes de refaire une IDR de contrôle aux concentrations auxquelles elles ont réagi dans ce premier bilan, avant de reprendre la vaccination en faisant une injection de 0,1mL de la solution vaccinale diluée au 1/10ème sous surveillance. En cas de bonne tolérance la vaccination sera refaite au minimum 10 jours plus tard.

Les réactions cutanées systémiques dues aux vaccins contenant l'anatoxine tétanique sont rares, à type d'urticaire, oedème de Quincke, exanthème, érythème polymorphe, purpura ou vascularite (Barbaud Ann Dermatol 1995). Les investigations poussées réalisées chez une patiente ayant développé une réaction généralisée après injection d'un vaccin anti DTP ont permis de retenir la responsabilité de l'anatoxine tétanique et non des autres composants de ce vaccin. D'après les études immuno-allergiques sur les IDR, la dynamique d'expression des molécules d'adhésion sur les différents contingents cellulaires impliqués est comparable à celle observée dans des IDR avec des lipopolysaccharides (LPS) mais différente de celle des IDR à la tuberculine (Silber 1994). Les IDR avec des LPS reproduisent des mécanismes d'activation lymphocytaire et des cellules endothéliales aboutissant à une infiltration à polynucléaires neutrophiles.

	Cas 1	cas 2	cas 3	cas 4	cas 5	cas 6
manifestations	fièvre	fièvre	fièvre + EMP	fièvre + urticaire	fièvre + malaise	fièvre + nodule
âge	24 ans	33 ans	37 ans	22 ans	42 ans	37 ans
tests épicutanés						
formaldéhyde 1% eau	-	-	-	-	-	-
thiomersal 0,1% vaseline	-	-	-	-	-	+
2-phénoxyéthanol 1% vas.	-	-	-	-	-	-
hydoxyde d'alu. 10% vas.	-	-	-	-	-	+
chlorure d'alu. 2% eau	-	-	-	-	-	-
DTPolio Pasteur®	-	-	-	-	-	-
DT Bis Mérieux®	-	-	-	-	-	+
polio inactivé Mérieux®	-	-	-	-	-	-
tétanique Pasteur®	-	-	-	-	-	+
prick tests						
DTPolio Pasteur® imm	-	-	-	-	-	nf
DTPolio Pasteur® ret	-	-	-	-	**+ contrôlé**	
DT Bis Mérieux® imm	-	-	-	-	nf	nf
DT Bis Mérieux® ret	-	-	-	-	nf	
polio inac. Mérieux® imm	-	-	-	-	-	nf
polio inac. Mérieux® ret	-	-	-	-	-	
tétanique Pasteur® imm.	-	-	-	-	-	nf
tétanique Pasteur® ret	-	-	-	-	-	
Tests intradermiques						
DTPolio Pasteur® imm	-	-	**+ (pur)**	-	nf	nf
DTPolio Pasteur® ret	**+ (10-1)**	**+ (10-1)**	**+ (10-3)**	-	nf	
DT Bis Mérieux® imm	-	-	nf	**+ (10-1)**	-	nf
DT Bis Mérieux® ret	+ (pur)	**+ (10-1)**	nf	**+ (10-1)**	**+ (10-1)**	
polio inac. Mérieux® imm	-	-	-	-	-	nf
polio inac. Mérieux® ret	-	-	-	-	-	
tétanique Pasteur® imm.	-	-	-	**+/- (10-1)**	-	nf
tétanique Pasteur® ret	**+ (10-1)**	**+ (10-1)**	**+ (10-1)**	**+ (10-1)**	-	
Réactivation des signes	-	-	-	**urticaire 48H**	-	**inflammation sur nodules**
Revaccination						
poliomyélitique	inutile	inutile	inutile	nf	refaite	refaite
diphtérique	inutile	inutile	inutile	nf	**interdite**	inutile
tétanique	inutile (CI ?)	inutile (CI ?)	**interdite**	nf	refaite	inutile

Tableau 18 : Résultats des investigations dans 6 cas de réactions locales très sévères lors de vaccinations anti diphtérie-tétanos-poliomyélitique.
alu. : aluminium, imm : résultats des lectures immédiates
nf : non fait, CI ? : faut il contre-indiquer la vaccination en cause ?

NEUVIEME ETUDE : INVESTIGATIONS IMMUNO-ALLERGOLOGIQUES DANS 5 CAS D'URTICAIRE OU D'OEDEME DE QUINCKE APRES VACCINATION ANTI-HEPATITE B

L'ENGERIX B® (Laboratoires SmithKline et French, vaccin recombinant préparé sur *Saccharomyces cerevisiae*, contenant du thiomersal) et le GenHEVAC B® (Institut Pasteur, vaccin recombinant préparé sur cellules CHO ayant comme conservateur le formaldéhyde), tous deux adsorbés sur sels d'aluminium, sont utilisés pour la vaccination anti-hépatite B. Ils contiennent tous deux l'antigène HBs et induisent une immunisation par la synthèse d'anticorps protecteurs dirigés contre l'antigène HBs mais n'induisent pas la synthèse d'anticorps contre d'autres ag du virus comme les ag HBc ou Hbe.

La vaccination anti-hépatite B est en général bien tolérée (Mac Mahon 1992, Dobson 1995, Barbaud Ann Dermatol 1995) mais des réactions urticariennes ou d'oedème de Quincke ont parfois été signalées (Dobson 1995, Brightman 1989, Lohiya 1987, De Silva 1985).

Après une étude des données de la littérature et du mode de préparation de ces vaccins, nous avions proposé (Barbaud Ann Dermatol 1995) la réalisation d'investigations immuno-allergologiques en cas de survenue de tels effets secondaires pour déterminer la cause de ces réactions urticariennes voire, si toutes ces investigations étaient négatives, permettre la poursuite de la vaccination. Nous rapportons les résultats de ces investigations réalisées chez 5 patients.

PATIENTS ET METHODES

Patients

Cinq patients, âgés de 7 à 38 ans, sans antécédents dermato-allergologiques particuliers, ont été étudiés. Leurs caractéristiques cliniques sont rapportées dans le tableau 19. Quatre patients (patients 1 à 4) avaient développé une urticaire 24 h à 10 jours après la première ou la seconde injection de GenHEVAC B® (patient #1) ou d'ENGERIX B® (patients #2, 3, 4).

Une femme âgée de 38 ans (patient #5) avait développé un oedème de Quincke et une toux sèche, 72 heures après la seconde injection d'ENGERIX B®. Un traitement intraveineux par méthylprednisolone (40mg) avait permis la disparition des symptômes en moins de 24 heures.

Aucun de ces patients n'avait d'antécédent d'urticaire ou d'allergie alimentaire. L'urticaire et l'oedème de Quincke avaient duré de 1 jour à 3 semaines et avaient disparu, sans récidive dans les 15 mois suivants.

Méthode

Examens biologiques lors de la survenue de l'urticaire

Lors de la survenue des manifestations cliniques, les patients avaient tous bénéficié d'un bilan biologique comportant : NFS-Plaquettes, VS, recherche de complexes immuns circulants, dosage du complément total et de ses fractions C3 et C4 ainsi qu'une sérologie d'hépatite B complète (ag HBs, AC anti-HBs, AC anti-HBc et AC anti-Hbe).

Bilan immuno-allergologique

Six semaines après la disparition de l'urticaire ou de l'oedème de Quincke, avec le consentement éclairé des patients et/ou de leurs parents, un bilan immuno-allergologique fut réalisé. Il a comporté des tests épicutanés (batterie standard ICDRG, vaccins ENGERIX B® et GenHEVAC B® testés purs, thiomersal à 0,1% dans la vaseline, hydroxyde d'aluminium à 10% dans la vaseline et chlorure d'aluminium à 2% dans l'eau).

En cas de négativité des investigations précédentes, des prick-tests ont été réalisés avec les deux vaccins et *Saccharomyces cerevisiae* (Laboratoires Stallergènes, Fresnes, France). Un radioallergosorbent test (RAST) anti-*Saccharomyces cerevisiae* a également été réalisé. En cas de négativité de ce bilan, des tests intradermiques (IDR) ont été réalisés (0,04mL), avec les solutions vaccinales GenHEVAC® et ENGERIX B® diluées (10^{-4} à 10^{-1}) dans du sérum physiologique, puis avec les solutions pures. Les IDR ont été faites avec une voie d'abord veineux et une surveillance hospitalière d'au moins 24 heures.

Si tous ces tests lus à 20 minutes, 24 heures, 48 et 96 heures étaient négatifs, une injection de 0,1 mL de la solution vaccinale diluée à 10^{-1} était administrée par voie intra-musculaire, deux semaines plus tard, avec une surveillance hospitalière d'au moins 48 heures.

RESULTATS

Les résultats des investigations biologiques et immuno-allergologiques sont rapportés dans le tableau 20.

Dans trois cas, (patients #1, 2 et 3) l'ensemble des investigations était négatif. Chez le **patient #3, la revaccination a été réalisée, sous surveillance hospitalière, sans aucun effet secondaire**.

Chez le patient #4, le bilan réalisé lors de la survenue de l'urticaire a mis en évidence une augmentation des complexes immuns circulants avec légère consommation du complément. Chez ce patient, la sérologie d'hépatite B, négative trois mois plus tôt, était positive, avec des anticorps anti-HBs mais également anticorps anti-HBc et anti-HBe. L'urticaire était donc probablement due à une **hyper-immunisation** induite par la vaccination qui avait été administrée juste après ou durant une infection asymptomatique (probablement par transmission sexuelle) par le virus de l'hépatite B.

Dans le dernier cas (patient #5), le RAST au *Saccharomyces cerevisiae*, les tests épicutanés et les prick-tests étaient tous négatifs. Les IDR réalisées avec l'ENGERIX B®, négatives en lecture immédiate et à 24 heures, se sont positivées après 72 heures. Les IDR réalisées avec le GenHEVAC B® étaient négatives. Une injection de 0,1 mL du GenHEVAC B® dilué à 10^{-1} a été réalisée par voie intra-musculaire, sous surveillance hospitalière. Malgré la faiblesse des doses, 72 heures après cette injection intramusculaire, la patiente a présenté un discret oedème cervical, une réapparition de la toux sèche, qui ont régressé après une injection de méthylprednisolone. En dehors des sels d'aluminium, le seul composant commun des 2 vaccins étant l'ag HBs, il a été conclu que l'agent responsable de cette urticaire profonde et de cette toux sèche était **l'antigène HBs lui-même**.

DISCUSSION

La vaccination anti-hépatite B est en général bien tolérée avec peu d'effets secondaires rapportés (Mac Mahon 1992, Dobson 1995). Ceux-ci ne doivent pas remettre en cause l'utilité de cette vaccination. L'urticaire et l'oedème de Quincke secondaires à la vaccination anti-hépatite B paraissent rares dans la littérature (Brightman 1989, Lohiya 1987, De Silva 1985).

Lorsqu'ils surviennent, leurs causes ne sont pas bien définies. Dans un cas, Brightmann et coll. (1989) ont pu mettre en évidence qu'une réaction anaphylactique survenue dès la première administration d'ENGERIX B® était due à une sensibilisation au *Saccharomyces cerevisiae*. Des traces de *Saccharomyces cerevisiae* dans l'ENGERIX B® étaient responsables de cet accident anaphylactique.

Notre étude montre que l'urticaire induite par la vaccination anti-hépatite B peut avoir d'autres causes : une sensibilisation contre l'antigène HBs lui-même comme chez la patiente #5 ou une hyperimmunisation comme chez le patient #4.

La survenue d'une urticaire ou d'un oedème de Quincke conduisent souvent le praticien à interrompre la vaccination. La poursuite de cette étude est nécessaire pour évaluer l'intérêt de ce protocole d'investigations. Mais lorsque ce protocole est correctement suivi, ces résultats préliminaires démontrent qu'il permet de déterminer certaines causes d'urticaires post-vaccinales (sensibilisation contre le *Saccharomyces cerevisiae* ou vis à vis de l'ag HBs lui-même ; hyperimmunisation). Si toutes les investigations, réalisées sous surveillance prolongée, demeurent négatives, ce protocole peut permettre, mais ce avec d'extrêmes précautions et une surveillance hospitalière stricte, de poursuivre la vaccination, comme cela fut réalisé chez le patient #3, sans que cette réadministration soit suivie d'effet secondaire.

	Sexe	Age	Manifestations cliniques	Délai de survenue après la vaccination	Durée des symptômes
Cas 1	M	17 ans	urticaire généralisée	10 jours après la 1ère injection	4 jours
Cas 2	M	14 ans	urticaire généralisée	24 h après la 1ère injection	3 semaines
Cas 3	F	7 ans	urticaire généralisée	12 h après la 2ème injection	3 jours
Cas 4	M	19 ans	urticaire généralisée	72 h après la 3ème injection	3 semaines
Cas 5	F	38 ans	oedème de Quincke + toux sèche	72 h après la 2ème injection	24 heures méthylprednisolone IV

Tableau 19 : Caractéristiques cliniques des patients ayant une urticaire induite par la vaccination anti-hépatite B.

	Cas 1	Cas 2	Cas 3	Cas 4	Cas 5
AC anti HBe, AC anti-HBc	-	-	-	**présents**	-
TESTS EPICUTANES					
GenHEVAC B® pur	-	-	-	-	-
ENGERIX B® pur	-	-	-	-	-
Formaldéhyde 1% dans l'eau	-	-	-	-	-
Thiomersal 0.1% dans vaseline	-	-	-	-	-
Hydroxyde d'aluminium	-	-	-	-	-
10 % dans la vaseline					
Chlorure d'aluminium	-	-	-	-	-
2 % dans l'eau					
PRICK TESTS					
GenHEVAC B® pur	-	-	-	nf	-
ENGERIX B® pur	-	-	-	nf	-
Saccharomyces cerevisiae	-	-	-	nf	-
RAST					
Saccharomyces cerevisiae	-	-	-	-	-
IDR					
ENGERIX B® 10^{-4} à pur	-	-	-	nf	**+(72 h)**
GenHEVAC B® 10^{-4} à pur	-	-	-	nf	-
GenHEVAC B® 0.1 ml dilué à 10 % intramusculaire	-	-	-	nf	**+(72 h)**
Revaccination	nf	nf	**bien tolérée**	inutile	nf

Tableau 20: Résultats des investigations immuno-allergologiques chez 5 patients ayant développé une urticaire après vaccination anti-hépatite B.

DISCUSSION GENERALE

INTÉRÊT DES TESTS MÉDICAMENTEUX CUTANÉS

A notre connaissance, aucune série antérieure n'a évalué sur une aussi grande cohorte de patients l'intérêt des tests cutanés médicamenteux dans le bilan de toxidermies d'aspects cliniques définis et variés, avec un aussi grand nombre de médicaments différents.

En ce qui concerne les toxidermies non liées à une vaccination, les résultats obtenus dans cette étude prospective, comprenant 72 patients, souligne l'intérêt des tests cutanés réalisés avec le médicament suspecté pour déterminer la cause d'une toxidermie et en améliorer la prise en charge. En effet dans cette étude nous avons obtenu des tests positifs respectivement dans 43%, 24% et 67% des (photo)patch-tests, prick tests et des tests intradermiques (IDR).

Parmi 72 patients, pour lesquels l'imputabilité d'un médicament était très probable dans le déclenchement d'une toxidermie, **72% avait un test cutané médicamenteux positif**, en associant tests épicutanés (et photopatch-tests dans 4 cas (Jeanmougin 1986)), prick tests et IDR. Il faut remarquer que dans cette série, 31 patients avaient eu au moins une réadministration accidentelle de la drogue responsable, avec une rechute, souvent sévère, de leur toxidermie, avant d'être examinés dans notre service. De plus 9 patients ont présenté une réactivation de leur toxidermie lors de la réalisation des tests cutanés médicamenteux.

Il est nécessaire de préciser l'intérêt de ces tests cutanés médicamenteux, relativement bien supportés par le patient, pour, dans la mesure du possible, éviter les tests de réintroduction du médicament suspect. Certains auteurs considèrent que les **épreuves de réintroduction** du médicament ne sont pas éthiquement envisageables en cas de manifestations cliniques sévères (Sacerdoti 1993), en particulier en cas de survenue d'un érythème polymorphe ou d'un syndrome de Lyell (Kauppinen 1989). L'observation d'une réactivation d'une toxidermie après réadministration de veinoglobulines chez notre patiente ayant présenté un syndrome Babouin confirme la nécessaire réserve et l'extrême prudence qu'il faut conseiller vis à vis des tests de réintroduction médicamenteux après la survenue d'une toxidermie. Outre le risque de réinduire la toxidermie et l'atteinte immuno-allergique d'autres organes, le déclenchement d'une réaction cutanée généralisée chez cette patiente ayant antérieurement présenté une dyshidrose et un syndrome Babouin dus aux veinoglobulines, montre que la réintroduction d'un médicament peut déclencher une toxidermie plus sévère que celle qui avait été observée initialement.

Les **tests épicutanés** (Houwerzihl 1975, Truchetet 1987, Sacerdoti 1993, Breatnach 1995-Part II, Quirino 1997) ont démontré leur innocuité dans le bilan des toxidermies (Felix 1974, Bruynzeel 1989, Calkin 1993). Osawa *et coll.* (1990) ont retrouvé 31,5% de tests épicutanés médicamenteux positifs parmi 197 patients testés après la survenue d'une toxidermie. Bruynzeel *et coll.* (1985) ont obtenu des tests épicutanés positifs pour les bêta-lactamines chez 30 à 35% de patients suspects d'allergie à la pénicilline. Parmi 116 patients ayant une toxidermie dans une étude multicentrique portugaise, Quirino *et coll.* (1997) ont observé 39,7% de tests épicutanés médicamenteux positifs. Dans notre étude, 43% des patients ont eu des réactions positives sur tests épicutanés ou photopatch-tests médicamenteux.

Ces résultats démontrent que les réponses aux tests épicutanés médicamenteux dépendent : 1) de l'aspect clinique et des mécanismes immunologiques de la toxidermie initiale, 2) du médicament en cause dans la toxidermie, 3) de la façon de réaliser les tests et de leurs modalités de lecture, 4) de la détermination de la spécificité des tests épicutanés qui doit tenir compte des résultats obtenus chez des témoins négatifs strictement sélectionnés.

Les résultats des tests épicutanés dépendent du **type clinique de toxidermie**, en particulier ils semblent plus sensibles lorsque la toxidermie initiale relève d'un mécanisme d'hypersensibilité retardée cellulaire T (Breatnach 1995, Barbaud Eur J Dermatol 1997). Dans notre étude, 59,3% des patients atteints d'exanthème maculo-papuleux (EMP) avaient un test épicutané médicamenteux positif, ce qui était significativement différent (p=0,001) des résultats obtenus chez les patients ayant développé une urticaire médicamenteuse (11%), confirmant ainsi l'intérêt des tests épicutanés dans le diagnostic étiologique des EMP (Bruynzeel 1987), comme le suggérait notre première étude portant sur 5 cas d'EMP dus à l'amoxicilline. Bruynzeel *et coll.* (1987) ont rapporté des résultats comparables chez des patients atteints d'EMP dus à l'amoxicilline (18 tests épicutanés positifs parmi 47 patients testés). Dans l'étude de Quirino *et coll.* (1997) il est retrouvé 71,4% de tests épicutanés positifs chez 14 patients testés avec une dermite exfoliative et 45,7% de tests épicutanés positifs chez ceux ayant présenté un exanthème maculo-papuleux. Notre étude portant sur l'immunophénotypage comparatif dans les EMP et les tests épicutanés positifs avec l'amoxicilline (Première étude) était en faveur de l'existence de mécanismes d'hypersensibilité cellulaire T retardée chez les patients développant un EMP dû à l'amoxicilline, mécanismes immunologiques bien reproduits par les tests cutanés pour lesquels des réactions positives tardives étaient apparues. En effet des résultats similaires étaient observés dans l'immunophénotypage de la toxidermie initiale et

celui des biopsies faites sur le site des tests cutanés positifs, qu'il s'agisse des tests épicutanés, des prick tests ou d'IDR. Dans un cas d'EMP dû à la pristinamycine, l'expression de CD62L épidermique lors de la toxidermie était également retrouvé sur la biopsie du test épicutané positif avec cette synergistine chez le même patient (5ème étude). Ces résultats comparant l'immunophénotypage entre toxidermie et tests épicutanés positifs montrent qu'avec certains médicaments et dans certaines toxidermies, les tests cutanés sont capables de reproduire le mécanisme en cause dans la toxidermie et sont aussi de bons moyens d'investigation diagnostique.

Les tests épicutanés peuvent aussi être utiles pour déterminer la drogue responsable dans des toxidermies ayant une présentation clinique différente - mais ayant un mécanisme immunitaire supposé de type hypersensibilité cellulaire retardée (de Weck 1991, Breathnach 1995, Barbaud Eur J Dermatol 1997) - comme la pustulose exanthématique aiguë généralisée (PEAG) (Plantin 1988, Wolkenstein 1996), les érythrodermies (Silva 1982, Camarasa 1985, Romaguera 1989, Osawa 1990, Jones 1994, Michel 1996, Sigurdsson 1996) et les eczémas généralisés (Osawa 1990, Michel 1996). Les photopatch-tests sont intéressants pour explorer les photodermatoses médicamenteuses (Jeanmougin 1986, Menz 1988, Hölze 1991, Gillet-Terver 1996). Les tests épicutanés médicamenteux semblent de moindre intérêt pour l'exploration des érythèmes polymorphes, le syndrome de Lyell (Wolkenstein 1996) ou les urticaires (Felix 1974).

Les tests épicutanés semblent plus sensibles s'ils sont réalisés **sur le site** où s'est développée la toxidermie initiale, en particulier dans le cas des érythèmes pigmentés fixes (EPF) (Alanko 1987, Sehgal 1987, Kikuchi 1991, Alanko 1994). Ceci est peut être également vrai pour d'autres toxidermies. Klein *et coll.* (1995) ont observé dans un cas de syndrome de Lyell des tests épicutanés positifs au co-trimoxazole, uniquement si les tests étaient réalisés sur les régions cutanées où s'était développée la nécrolyse épidermique.

Les résultats des tests épicutanés dépendent du **médicament en cause** dans la survenue de la toxidermie. Comme nos résultats le confirment (études 1 et 2), les tests épicutanés semblent utiles pour déterminer la drogue en cause quand ils sont réalisés avec les bêta-lactamines, en particulier l'amoxicilline et les céphalosporines (Bruynzeel 1987, Romano 1993, Vega 1991, Romano 1995, Bruynzeel 1985, Quirino 1997, nos études 1 et 2), la carbamazépine (Silva 1982, Camarasa 1985, Romaguera 1989, Vaillant 1989, Roriguez-Mosquera 1991, Alanko 1993, Jones 1994, Corazza 1995, Sigurdsson 1996, Puig 1996, Quirino 1997), le tétrazépam (Camarasa 1990, Collet 1992, Tomb 1993, Ortega 1996), la pristinamycine (Michel 1996), les

dérivés hépariniques (Bircher 1990, Moreau 1996), la pseudoéphédrine (Tombs 1991), les corticoïdes (Dooms-Goossens 1995, Bircher 1996), le diltiazem (Romano 1992, Barbaud 1993, Quirino 1997) et l'hydroxyzine (Michel 1997). Des tests épicutanés ont été également rapportés positifs dans l'exploration de toxidermies déclenchées par d'autres médicaments comme le diclofénac (Romano 1994, Quirino 1997), le diazépam (Felix 1974), le méprobamate (Felix 1974); le co-trimoxazole (Klein 1995), le paracétamol (Ibanez 1996), l'acide acétylsalicylique (Quirino 1997), la lincomycine (Quirino 1997) ...

Des tests épicutanés médicamenteux peuvent avoir des **résultats faussement négatifs** pour différentes raisons parmi lesquelles il faut retenir :

1) des tests réalisés avec un médicament qui ne pénètre pas l'épiderme,

2) une concentration choisie pour les tests trop faible pour induire une réaction positive. Pour éviter ce type de problème, dans nos études, nous avons testé les médicaments purs et dilués faiblement à 30% dans la vaseline ou l'eau, 30% étant dans notre expérience la plus forte concentration pour laquelle il était possible d'obtenir une bonne répartition du médicament dans son véhicule.

3) L'excipient choisi pour diluer le médicament peut ne pas faciliter, voire empêcher la pénétration cutanée. Il paraît donc nécessaire d'envisager, lorsqu'un test épicutané paraît faussement négatif, de refaire des tests avec le médicament dilué dans différents excipients (par exemple chez le patient #13 de la deuxième étude, un test épicutané a été observé positif uniquement quand l'amoxicilline était testée diluée dans la vaseline).

4) La molécule responsable de la toxidermie peut ne pas être le médicament sous sa forme native mais un de ses métabolites. Un tel mécanisme a récemment été mis en évidence, avec des techniques de prick tests et d'IDR, chez 5 patients ayant développé une toxidermie après administration de cyclophosphamide (Popescu 1996). Ces 5 patients avaient des tests cutanés négatifs à cette drogue mais des réactions immédiates positives sur les tests réalisés avec 2 métabolites du cyclophosphamide. Troost *et coll.* (1996) ont démontré dans 66 cas d'intolérance à la carbamazépine - ces intolérances étant en majorité des toxidermies - que les tests épicutanés avec la carbamazépine testée diluée dans l'éthanol (5mg/50 µl) étaient positifs chez 20% des patients (12/61), mais que ce pourcentage augmentait jusqu'à 55% lorsque ces auteurs testaient la carbamazépine et ses métabolites actifs (carbamazépine-10,11-époxyde ; 10,11-dihydroxy-carbamazépine).

5) Les lectures tardives adéquates n'ont pas été réalisées. De ce fait nous réalisons les lectures de nos tests épicutanés à 20 minutes, 48 et 96 heures et si possible à une semaine. Quatre des

patients de la deuxième étude (#6,29,31,50) qui avaient des tests épicutanés négatifs à 48 et 72 heures ont développé des réactions positives, pertinentes de ces tests à 96 heures.
Il est par ailleurs indispensable pour espérer une standardisation des tests épicutanés médicamenteux, de préciser sous quelle forme (sel, molécule base) le principe actif a été testé. Nous avons en particulier observé des différences lorsqu'étaient testées l'amoxicilline base et l'amoxicilline sodique.

L'intérêt diagnostique des **prick tests et des IDR** pour déterminer la cause d'une toxidermie a été moins évalué que celui des tests épicutanés. Osawa *et coll.* (1990) ont obtenu des IDR médicamenteuses positives chez 89,7% de leurs patients, mais en l'absence de comparaison de ces résultats à ceux obtenus chez des témoins négatifs **la spécificité de ces IDR** ne peut pas être déterminée. La plupart des publications portant sur les prick tests et les IDR dans les toxidermies concernent les bêta-lactamines (Ressler 1987, Aihara 1987, Adkinson 1990, Blanca 1990, Silviu-Dan 1993, Wickern 1994, Audicana 1994, Romano 1995, nos études 1 et 2). Les prick tests et les IDR ont parfois été utilisés et étudiés pour d'autres médicaments comme le dilatiazem (Romano 1992), les héparinates (Bircher 1990, Moreau 1996), l'insuline (de Shazo 1987, Barbaud Ann Dermatol 1996), l'estradiol (Shelley 1995) ou les corticoïdes (Vidal 1994). Dans nos études 1 et 2, sur une série importante de patients, les prick tests et les IDR ont été réalisés respectivement avec 23 et 12 drogues différentes.
Quand les tests épicutanés sont négatifs, les prick tests et les IDR peuvent être réalisés et ont alors un intérêt diagnostique. Dans la deuxième étude, 21 patients qui avaient des tests épicutanés négatifs ont eu des prick tests et/ou des IDR médicamenteux positifs. Dans l'**urticaire**, quand les tests épicutanés sont négatifs, les prick tests semblent avoir une meilleure valeur diagnostique qu'ils n'en ont dans les EMP. Comme ceci a déjà été rapporté par quelques auteurs et dans nos travaux concernant l'EMP dû à l'amoxicilline (étude 1), nous avons observé des résultats positifs retardés sur la lecture des IDR dans l'exploration des toxidermies induites par l'amoxicilline (Warrington 1993, Romano 1995, notre étude 1) ou l'héparine (Bircher 1990, Moreau 1996). Nous avons aussi observé des prick tests positifs avec la pseudoéphédrine, et une positivation tardive des IDR réalisées avec le piroxicam et l'érythromycine.
Des précautions et une surveillance étroite des patients qui ont ces tests cutanés médicamenteux sont indispensables. Même si les tests épicutanés paraissent les plus dénués d'effets secondaires, nos études montrent qu'ils sont malgré tout capables de **réinduire la**

toxidermie initiale. Ceci a été observé dans cette étude lors de la pratique de tests épicutanés avec l'aciclovir, l'amoxicilline, l'hydroxyzine, la pseudoéphédrine ou le triamcinolone. Ce type d'effet secondaire a également été rapporté avec la pseudoéphédrine (Tombs 1993), la carbamazépine (Vaillant 1989) et le clobazépam (Machet 1992).

Quand les patients avaient présenté une toxidermie à type d'urticaire ou d'oedème de Quincke, les prick tests étaient réalisés avec des dilutions progressives du médicament suspecté. Même avec cette précaution, un patient (#64) a présenté une réactivation de son oedème de Quincke lors de la réalisation d'un prick test avec la pholcodine diluée au 1/10ème de la concentration utilisée en thérapeutique. Le risque de réinduction de la toxidermie initiale est beaucoup plus élevé lors de la réalisation des IDR médicamenteuses. Parmi 30 IDR réalisées, 3 réinductions de l'effet indésirable médicamenteux ont été observées (1 EMP, 1 urticaire, 1 oedème de Quincke). En raison du risque potentiel de ce type d'investigations nous pensons que les règles strictes de réalisation de ces IDR décrites dans le chapitre "Matériel et Méthodes" doivent être parfaitement respectées. Le volume d'injection du médicament doit être aussi faible que possible. Dans notre expérience le volume de 0,04 mL est le volume le plus faible et le plus sûr qui donne des résultats reproductibles.

Calkin et Maibach (1993) ont souligné la nécessité de comparer tout résultat de test épicutané médicamenteux aux résultats obtenus chez au moins 20 **témoins négatifs**. Ceci apparaît pour le moins aussi nécessaire pour rendre des résultats de prick tests et surtout d'IDR médicamenteuses. Dans cette étude, tous nos témoins ont été strictement sélectionnés. Ils avaient tous été traités avec le médicament évalué, dans les 6 semaines précédant la réalisation des tests cutanés, dans les mêmes conditions que les patients inclus dans cette étude. De tels témoins négatifs sont sans doute difficile à obtenir, en particulier pour les médicaments peu utilisés ou induisant rarement des effets secondaires, mais ces témoins doivent être préférés à des sujets sains, premièrement car d'un point de vue éthique ils ont besoin de tests cutanés et il est discutable de faire des tests cutanés potentiellement dangereux chez des sujets sains, deuxièmement parce qu'au regard du médicament étudié ces témoins sont dans les mêmes conditions que les patients inclus dans cette étude. Cette rigueur dans le choix des témoins négatifs est impérative pour interpréter les résultats des tests biologiques car nous avons observé des TAL positifs chez des sujets sains venant de prendre de la pristinamycine sans aucune manifestation clinique consécutive à la prise de cet antibiotique.

Les tests épicutanés positifs paraissent spécifiques lorsqu'ils sont comparés aux témoins négatifs, puisque nous n'avons observé qu'un témoin négatif avec un test épicutané donnant

des résultats douteux (+/-) avec le captopril. Des témoins négatifs sont absolument indispensables pour interpréter les résultats d'IDR médicamenteuses et éviter la déclaration de résultats faussement négatifs comme nous avons pu en démontrer la fréquence avec la pénicilline, l'érythromycine et la spiramycine.

Le très fort pourcentage de tests cutanés positifs médicamenteux observés dans cette étude (72%) est lié à la **sélection stricte des patients** et au respect strict de toutes les règles édictées dans ce travail pour la réalisation et la lecture des tests médicamenteux. Il est nécessaire de souligner que 1) des résultats négatifs sur tous les tests cutanés médicamenteux n'excluent absolument pas la responsabilité du médicament étudié et suspecté dans la survenue d'une toxidermie, et 2) qu'il paraît indispensable de toujours comparer les résultats rapportés à ceux obtenus chez des témoins négatifs correctement sélectionnés. Logiquement **les premiers tests** qui doivent être réalisés sont les **tests épicutanés** (avec des lectures faites au minimum jusqu'à 96 heures). En cas de négativité des tests épicutanés, la réalisation des **prick tests** peut être proposée en particulier après la survenue d'une urticaire (avec des concentrations progressives en cas de bilan réalisé après une urticaire ou un oedème de Quincke). Si ces deux types de tests, et bien sûr si besoin les photopatch-tests, sont négatifs, les IDR médicamenteuses peuvent être réalisées, avec des dilutions progressives de solutions préparées stérilement et administrées chez des patients sous stricte surveillance hospitalière d'au moins 24 heures. La lecture des ces prick tests et des IDR doit être réalisée à 20 minutes, 6 heures et 24 heures au moins et un contrôle doit être réalisé au troisième jour pour s'assurer de la négativité persistante de ces tests cutanés. Les excipients, les conservateurs et les colorants éventuellement présents dans les médicaments sous leurs formes commercialisées doivent être également testés même s'ils induisent assez rarement des toxidermies et qu'ils sont surtout responsables d'urticaire ou de manifestations anaphylactiques (Lowry 1994, Barbaud 1995).

Bien sûr tous les tests cutanés médicamenteux doivent être interrompus dès qu'une réaction positive est apparue. Ceci diminue le risque d'effet secondaire et en particulier de réactivation de la toxidermie initiale qui est le risque clinique majeur de ces investigations.

INVESTIGATIONS IMMUNOALLERGIQUES DANS LES ACCIDENTS CUTANES APRÈS VACCINATION

Après analyse des données de la littérature, nous avons fait une évaluation préliminaire des investigations complémentaires en cas de toxidermies induites par les vaccins (études 7, 8 et 9). Les investigations proposées dans les accidents de vaccination sont :

- soit une **absence de test lors de la survenue d'accident grave** avec une imputabilité très probable du vaccin comme c'est le cas des vasculites survenant après vaccination anti-grippale.
- soit la réalisation de **tests cutanés** avec les différents composants des solutions vaccinales.

Dans les 11 **tests épicutanés** réalisés après toxidermie induite par les vaccins, nous avons observé chez une patiente ayant présenté une réaction locale importante et des nodules sous-cutanés, des tests épicutanés positifs avec le vaccin et deux de ses composants : le conservateur (thiomersal) et l'adsorbant (hydroxyde d'aluminium). Les tests épicutanés étaient négatifs chez les autres patients.

Les **prick tests,** réalisés dans 10 cas de toxidermies vaccinales ayant un test épicutané négatif avec le vaccin, étaient tous négatifs en lecture immédiate mais dans un cas le prick test avec le DTBis était papuleux sur la lecture réalisée à 48H, probablement par réaction retardée à la toxine diphtérique. Ce type de réaction retardée sur le site de prick tests avec les médicaments n'a été rapporté qu'une fois auparavant (Vigan 1990), avec une réaction eczémateuse retardée et non un aspect d'infiltration cutanée comme nous l'avons constaté chez notre patiente.

Il faut remarquer que dans un cas d'urticaire survenue après vaccination anti-grippale, un RAST était positif à l'œuf. Dans ce cas les prick tests au blanc et/ou au jaune d'œuf auraient pu être positifs.

Les **IDR** réalisées avec les solutions vaccinales sont **d'interprétation difficile**. Malgré tout, contrairement à certaines données de la littérature (Weisse 1990), nos patients et les sujets contrôles permettent d'affirmer que toutes les IDR avec les solutions vaccinales, en particulier avec les préparations contenant la toxine tétanique, ne sont pas positives. Dans 9 cas d'IDR réalisées avec les vaccins, nous avons observé une IDR positive sur les lectures immédiates et retardées avec la toxine tétanique, cinq IDR positives de façon retardée (3 avec la toxine tétanique, 1 avec la toxine diphtérique et 1 avec l'antigène HBs et dans ce dernier cas avec une positivité n'apparaissant qu'après 72 heures). Les réinjections n'ayant en général pas été

réalisées lors de bilans négatifs, il n'est pas possible de préciser avec ces résultats préliminaires si une IDR négative autorise la réinjection du vaccin. Dans des cas ou les IDR avec les solutions vaccinales étaient négatives (2 cas avec les solutions anti-poliomyélitiques, un cas avec le vaccin antitétanique et un cas avec l'ag HBs) les patients ont pu être revaccinés avec un bonne tolérance. Il faut remarquer que dans un cas d'IDR négative avec l'ENGERIX B®, la patiente ayant par ailleurs des IDR positives retardées avec le GenHEVAC B®, la réadministration de GenHEVAC B® au 1/100ème de la dose normale a réinduit un oedème laryngé retardé.

Ces **investigations** dans les accidents cutanés de vaccination peuvent **réinduire la toxidermie initiale** puisque nous avons observé une réactivation d'une urticaire après IDR avec un vaccin antitétanique et poussée inflammatoire de nodules sous cutanés après tests épicutanés positifs avec l'hydroxyde d'aluminium et un vaccin contenant cet adsorbant.

Cette étude préliminaire sur les vaccins confirme notre hypothèse proposée en 1995 (Barbaud Ann Dermatol 1995), de **la multiplicité des causes des toxidermies survenant après une vaccination.** Elles peuvent être dues :

- à une **sensibilisation à un des constituants** du vaccin avec, dans notre série, sensibilisations prouvées au thiomersal, à l'hydroxyde d'aluminium, à la toxine diphtérique, à la toxine tétanique, à l'antigène HBs.
- à un mécanisme probablement médié par des **CIC** : une urticaire avec CIC lors de l'injection d'un vaccin anti-hépatite B chez un sujet venant d'être exposé au virus natif et la réactivation d'un purpura rhumatoïde ancien après une vaccination anti-grippale.
- des **mécanismes peut-être non immunitaires spécifiques** d'un antigène contenu dans le vaccin, non reproductibles par les tests *in vivo* et qui dans un cas d'urticaire après vaccination anti-hépatite B n'ont pas récidivé lors de la réadministration du vaccin.

MECANISMES IMMUNOLOGIQUES EN CAUSE DANS LES TOXIDERMIES

Immunophénotypage dans les toxidermies

Les résultats de l'immunophénotypage réalisé sur 14 toxidermies (étude 5) induites par les antibiotiques ont complété les résultats obtenus initialement dans 5 cas de toxidermies induites par l'amoxicilline (étude 1). Un immunophénotypage a également été réalisé dans un syndrome Babouin induit par les veinoglobulines (étude 4). Toutes ces études ont été réalisées de façon prospective, sur des biopsies obtenues chez des patients pour lesquels l'historique des prises médicamenteuses était très bien établi, avec une sémiologie parfaitement déterminée (EMP ou érythrodermie) et après une détermination très stricte de l'imputabilité médicamenteuse dans le déclenchement de leur dermatose. Toutes les biopsies ont été obtenues peu de temps après le déclenchement de la toxidermie et avant l'administration d'une drogue immunomodulatrice.

L'immunophénotypage est un outil diagnostique et d'étude seulement si les travaux sont réalisés de façon prospective sur des patients dont toutes les caractéristiques cliniques sont déterminées de façon stricte comme cela a été proposé et respecté dans ce travail. En raison de l'expression chronologique des molécules d'adhésion, des études telles que celles que nous avons réalisées fournissent des résultats intéressants en ce qui concerne les mécanismes en cause dans les toxidermies immuno-allergiques. Les résultats des tests médicamenteux cutanés que nous avons obtenus (Barbaud Eur J Dermatol 1997, études 1, 2 et 5) ainsi que ceux d'autres auteurs (Romano 1995, Michel 1996) suggèrent que les EMP et les érythrodermies relèvent de mécanismes immunitaires cellulaires retardés.

Cellules dendritiques dans les toxidermies

La cinquième étude portant sur l'immunophénotypage chez 14 patients atteints d'EMP et/ou d'érythrodermie après administration d'antibiotiques a mis en évidence la présence de cellules dendritiques épidermiques (cellules de Langerhans) CD1a+ et parfois HLA DR+ en nombre normal mais a surtout permis l'observation dans certaines toxidermies de la présence de cellules dendritiques CD1a+ HLA DR+ dermiques. La présence de ces cellules dendritiques CD1a+ dermiques semble dépendre du type d'antibiotique en cause puisqu'elles ont été

observées dans tous les EMP induits par les bêta-lactamines mais dans une seule des 7 toxidermies induites par la pristinamycine. Ces cellules dendritiques co-exprimant CD1a et HLA DR pourraient être très proches des cellules de Langerhans. De telles cellules dendritiques issues du derme ont été décrites par Meunier *et coll.* (1993). Grabbe *et coll.* (1995) ont également observé une population de cellules dermiques dendritiques CD1a+ dans la dermatite atopique. Dans cette dernière, Meunier *et coll.* (1995) ont isolé des cellules dermiques dendritiques CD1a+ qui paraissent très sensibles à l'action des UVA1. Nous avons également observé des cellules dendritiques HLA DR dont certaines étaient CD1a+ dans un syndrome Babouin induit par les Sandoglobulines®. La nature et le rôle de ces cellules dermiques CD1a+ n'est pas connu, mais les cellules dermiques isolées par Meunier *et coll.* (1995) avaient *in vitro*, des fonctions présentatrices d'antigène. Les cellules dendritiques dermiques CD1a+ observées dans les EMP induits par les bêta-lactamines, mais également retrouvées dans un EMP dû à la norfloxacine, un EMP dû à l'isoniazide et un syndrome Babouin, pourraient jouer un rôle dans la présentation des haptènes médicamenteux aux cellules T. On ne sait pas non plus à ce jour si ces cellules sont simplement des cellules épidermiques migrant au travers du derme vers les vaisseaux lymphatiques ou sanguins, ou si, à l'inverse elles sont des précurseurs circulants et dermiques des cellules de Langerhans.
L'étude des cellules dendritiques circulantes, en phase toxidermique selon la méthode de Strunk *et coll.* (1997), serait intéressante dans nos travaux futurs.

Cellules T dans les toxidermies

Les études d'immunophénotypage *in situ* sur les biopsies de toxidermies (EMP et érythrodermies), sur les tests positifs cutanés dans les EMP dus à l'amoxicilline et sur un test épicutané positif à la pristinamycine (études 1 et 5), retrouvent des infiltrats dermiques de cellules T (CD3+), à prédominance périvasculaire, dans leur grande majorité CD4+, approximativement 30% des cellules T étant CD8+. Les phénomènes de " satellite cell necrosis " sont rares, et dans nos séries étaient surtout observés dans les toxidermies induites par la pristinamycine. Le rôle probable des cellules CD4+ (exprimant fortement HLA DR mais pas CD25) paraît important dans la survenue des EMP et des érythrodermies dues aux antibiotiques étudiés dans nos séries. Ceci contraste avec les résultats rapportés dans la littérature sur les syndromes de Lyell (Villada 1992, Hertl 1992, Chosidow 1994). Les résultats que nous avons rapportés sur les EMP dus à l'amoxicilline dans nos 2 séries (études

1 et 5) confirment les quelques études d'immunophénotypage antérieures portant sur les EMP induits par cette bêta-lactamine (Warrington 1993, Hertl 1995 J Invest Dermatol). Selon Hertl *et coll.* (1993, 1995 J Invest Dermatol), les clones de cellules T obtenus *in vitro* à partir de cellules du sang périphérique ou de biopsies cutanées de patients étaient CD8+, suggérant un rôle prédominant des cellules T CD8+ dans le déclenchement des EMP dus à l'amoxicilline. Il serait nécessaire comme le suggèrent les travaux de Brander *et coll.* (1995), de préciser sur les TAL positifs la nature des cellules T spécifiques, proliférant en présence du médicament, et de vérifier si elle ne varie pas dans le temps. Il pourrait s'agir initialement de cellules CD4+ durant la première semaine de culture puis une plus forte proportion de cellules T CD8+ pourrait ensuite apparaître.

Dans les dix toxidermies que nous avons étudiées (étude 5) nous n'avons pas mis en évidence de monoclonalité ou d'oligoclonalité des lymphocytes T cutanés infiltrants. Cette étude doit être poursuivie sur une plus grande population et également sur les lymphocytes circulants proliférant en présence du médicament dans les tests d'activation lymphocytaire positifs. L'intérêt de cette technique d'étude du réarrangement du TCR des cellules T par PCR DGGE vient d'être rapporté pour l'analyse des lymphomes T cutanés (Cordel 1997, Delfau 1997).

Les cellules endothéliales

Elles paraissent activées tant dans les biopsies provenant d'EMP induits par les bêta-lactamines ou d'autres antibiotiques, que dans les érythrodermies dues à la pristinamycine, les tests cutanés positifs médicamenteux (amoxicilline, pristinamycine) et un syndrome Babouin induit par les Sandoglobulines®. Il existe une forte expression d'ICAM 1 (CD54), de CD62P (GMP 140, sélectine P) et très souvent une expression, granuleuse, d'ELAM 1 (CD62E). ELAM 1 (CD62 E) est une molécule d'adhésion dont le rôle paraît majeur dans le " homing " lymphocytaire cutané. Cette expression de CD62E pourrait expliquer l'afflux cutané de cellules T spécifiques exprimant à leur surface le ligand de CD62E (ELAM 1) : le CLA (cutaneous late antigen) (Santamaria Babi 1995). Une augmentation d'expression de CLA à la surface des cellules T circulantes chez des 5 patients ayant présenté des allergies aux bêta-lactamines (2 urticaires à l'amoxicilline) et autres médicaments (3 exanthèmes induits par la bléomycine, la spiramycine et un barbiturique) vient d'être rapportée par Gonzalez *et coll.* (1997).

Molécules d'adhésion

Nous avons souligné l'importance des molécules d'adhésion dans les toxidermies. Elles traduisent une fréquente activation des kératinocytes par l'expression d'ICAM 1 (CD54) qui est induite par la sécrétion d'interféron γ. Cette expression d'ICAM 1 par les kératinocytes peut faciliter l'adhésion des cellules T exprimant LFA 1 aux kératinocytes et être à l'origne de " sattelite cell necrosis ". Nous avons déjà souligné l'importance de l'expression des molécules d'adhésion comme ICAM 1 (CD54) et ELAM 1 (CD62E) par les endothéliocytes dans le recrutement des cellules inflammatoires et en particulier des lymphocytes T dont le rôle est central dans les toxidermies non urticariennes.

Nos études 4 et 5 ont par ailleurs mis en évidence, et ce pour la première fois à notre connaissance, une **expression de sélectines par les kératinocytes** : **CD62L** dans des toxidermies induites par la pristinamycine et dans un exanthème maculo-papuleux dû à l'isoniazide, et une expression kératinocytaire avec renforcement au long de la jonction dermo-épidermique et de **CD62P** dans un cas de syndrome Babouin induit par les Sandoglobulines®. Nous avons pu déterminer que la masse moléculaire du CD62L exprimé par les kératinocytes (76 kD) était identique à celle du CD62L exprimé par les cellules T, le CD62L exprimé par les polynucléaires ayant une masse moléculaire différente (90 à 100 kD) (Pigott 1993).

Cette dérepression d'expression des sélectines dans certaines toxidermies est une observation originale que nous n'avons retrouvée ni dans 2 cas d'eczéma de contact médicamenteux, ni dans une urticaire due à la spiramycine, ni dans 9 EMP induits par les bêta-lactamines (études 1 et 5). Il est nécessaire de rechercher si cette expression est spécifique de médicament (nous avons observé une expression de CD62L surtout dans les toxidermies induites par la pristinamycine, et dans un test épicutané positif avec cet antibiotique), ou d'une sémiologie en ce qui concerne l'expression de CD62P que nous n'avons observé que dans un syndrome Babouin.

Le rôle de l'expression de ces sélectines par les kératinocytes n'est pas connu. La portion C terminale du domaine extracellulaire de CD62L peut se lier à des résidus sialylés (Tedder 1990). L'expression de CD62L à la surface des kératinocytes pourrait favoriser l'adhésion des kératinocytes aux cellules de Langerhans, les cellules de Langerhans ayant à leur surface des résidus sialylés (Kapsenberg 1988). Le CD62P ayant comme ligand les cellules myéloïdes et une sous-classe de cellules T, l'hypothèse d'un rôle de cette sélectine dans l'afflux de lymphocytes T dans certains territoires cutanés où cette sélectine est exprimée par les

kératinocytes pourrait être évoqué comme un des mécanismes mystérieux du curieux syndrome Babouin. Seule la recherche d'expression de ces sélectines dans d'autres toxidermies et en particulier dans d'autres syndromes Babouin pourrait à l'avenir préciser le rôle de ces expressions inhabituelles.

Apoptose dans les toxidermies

Certaines toxidermies, en particulier épidermolytiques comme le syndrome de Lyell, aboutissent à une destruction kératinocytaire majeure. Paul *et coll.* (1996) ont rapporté récemment que l'existence d'une mort cellulaire programmée par apoptose (identifiée par méthode TUNEL et en ultrastructure) des kératinocytes était en cause dans ces toxidermies épidermolytiques, ouvrant le champ à de nouveaux espoirs thérapeutiques (traitements anti-apoptotiques) de ces accidents médicamenteux très graves. Flageul *et coll.* (1997) viennent de rapporter l'observation d'une expression modérée ou intense de Fas (CD95) chez 6/8 patients atteints de syndrome de Lyell, de syndrome de Stevens-Johnson ou d'érythème pigmenté fixe, associée dans 5 cas à une expression de Fas ligand (Fas L). Fas et Fas ligand étaient peu présents sur les cellules T dermiques. Une expression épidermique de TNF α supérieure à celle des témoins négatifs était observée chez tous les patients, avec présence du récepteur p55 (CD120a) mais pas du récepteur p75 (CD120b).

Il paraît intéressant de rechercher si de telles anomalies kératinocytaires sont observées dans les toxidermies non épidermolytiques. Nous avons montré dans notre cinquième étude, dans 14 cas de toxidermies non épidermolytiques, que l'apoptose ne paraît pas majeure dans les érythrodermies ou les exanthèmes maculo-papuleux induits par les antibiotiques. Nous avons utilisé une technique d'étude de l'apoptose en analysant l'expression *in situ* d'une des molécules principales dans l'initiation de l'apoptose (expression de CD95 = Fas receptor) et de Bcl2, molécule exprimée par des cellules se défendant contre un processus d'apoptose.

Après ces résultats préliminaires encourageants, il paraît nécessaire de poursuivre cette étude de l'apoptose dans les toxidermies par :

- l'analyse sur un plus grand groupe de patients de l'expression de CD95 et de Bcl2 ;
- l'étude de l'apoptose par repérage *in situ* des clivages de l'ADN par méthode TUNEL (technique de marquage des clivages de l'ADN selon la technique décrite par Gavrieli *et coll.* (1992) et utilisée par Paul *et coll.* (1996)). Cette technique permet de plus de

contourner l'écueil d'interprétation que constitue l'expression de Bcl-2 par certains mélanocytes qui pourraient être difficilement distingués en IFI des kératinocytes de l'assise basale.

L'apoptose des cellules T doit également être étudiée. Certains tests *in vitro* visent à isoler et/ou à stimuler les cellules T circulantes spécifiques du médicament chez les patients ayant eu une toxidermie. Il paraissait nécessaire de s'assurer que les lymphocytes présents dans la peau au moment de la toxidermie ne subissaient pas tous une apoptose, auquel cas il serait illusoire de vouloir retrouver ultérieurement ces cellules dans le sang. Les premiers résultats, que nous avons obtenus chez 14 patients ayant présenté une toxidermie après prise d'antibiotiques, n'ont pas mis en évidence d'apoptose des cellules T cutanées durant ces toxidermies. Ces résultats doivent être analysés

- sur une plus large population
- et avec des médicaments d'autres classes thérapeutiques en associant 2 méthodes d'étude de l'apoptose : le marquage *in situ* et la technique TUNEL.

Dans l'étude de Flageul *et coll.* (1997), l'expression de Fas et Fas par les cellules T dermiques ligand était faible.

TESTS MEDICAMENTEUX *IN VITRO* DANS LES TOXIDERMIES

Une meilleure connaissance des mécanismes en cause dans les toxidermies, à laquelle ce travail contribue, permettra de proposer des tests diagnostiques et d'exploration *in vitro*.

L'innocuité pour le patient des tests *in vitro* médicamenteux fait depuis trois décennies l'objet de proposition de nouveaux tests et d'évaluation, parfois un peu hâtive, de leur intérêt dans le diagnostic de l'allergie médicamenteuse en particulier cutanée. Dans ce travail nous avons essayé d'évaluer l'intérêt de deux types de tests médicamenteux : le test de dégranulation des basophiles humains et un test original d'activation lymphocytaire mesurée par analyse du cycle cellulaire.

Ce travail ainsi que l'analyse de la littérature conduisent à supposer que dans un grand nombre de toxidermies un mécanisme immunitaire d'hypersensibilité cellulaire retardée est en cause dans la survenue de l'accident thérapeutique.

Le TDBH, en dehors des accidents allergiques immédiats, était supposé avoir une sensibilité assez médiocre dans l'exploration des toxidermies. Ceci est confirmé par notre étude portant sur 28 patients ayant une imputabilité probable ou très probable de la responsabilité d'un médicament dans la survenue d'une toxidermie ayant eu lieu 6 à 10 semaines avant la réalisation du test. Le TDBH n'était positif que chez 8/28 patients (32%) : 4 exanthèmes maculo-papuleux, 1 urticaire, 2 érythrodermies et 1 érythème polymorphe. Il est difficile d'interpréter sur une si petite série de tests positifs, l'intérêt que pourrait avoir le TDBH chez des patients ayant eu un accident médicamenteux supposé relever d'un mécanisme d'hypersensibilité cellulaire retardée. S'agit-il de l'association de différents modes de réponses immunitaires (dégranulation des basophiles IgE dépendante ou non spécifique) et de mécanismes immunitaires cellulaires T retardés ou de réactions non spécifiques ? A l'avenir il serait intéressant dans les accidents médicamenteux cutanés immédiats d'évaluer plutôt l'intérêt du test de libération des leucotriènes proposé par de Weck *et coll.* (1993) et qui a déjà donné des résultats intéressants dans l'exploration des accidents allergiques immédiats induits par les bêta-lactamines et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (de Weck 1993, Zollner 1997). La recherche d'IgE spécifiques (RAST) est une méthode qui n'est pratiquée à titre diagnostique que pour certains médicaments (pénicilline G et V, amoxicilline-ampicilline, insulines, curarisants). Dans 5 cas d'EMP induits par l'amoxicilline les RAST à l'amoxicilline et à l'ampicilline étaient négatifs chez nos patients (étude 1). Le RAST a parfois été utilisé pour explorer des accidents médicamenteux autres (par exemple anaphylaxie à la pholcodine, Dybendal 1995), mais pas sur de larges séries de patients.

La plupart des toxidermies non urticariennes étudiées relèvent de mécanismes d'hypersensibilité cellulaire retardée comme l'ont montré notre analyse de la littérature, la fréquence de tests cutanés explorant ce type de réaction immunitaire chez nos patients (études 1 et 2), les mécanismes explorés par le phénotypage *in situ* comparé à celui des tests médicamenteux positifs (études 1 et 5). Un test médicamenteux qui explorerait ce type de mécanisme devrait avoir une meilleure sensibilité dans ces accidents cutanés médicamenteux que le TDBH, voire que les tests d'histaminolibération ou de libération des leucotriènes. Notre

cinquième étude souligne que dans les toxidermies les cellules T infiltrantes *in situ* ne sont pas détruites par apoptose. On peut donc supposer que des cellules T-mémoire qui en dérivent, spécifiques du médicament peuvent être retrouvées dans la circulation sanguine dans les semaines qui suivent l'accident médicamenteux.

La méthode *in vitro* la plus susceptible de reproduire ce mécanisme d'hypersensibilité cellulaire retardée est la stimulation spécifique des cellules T par l'antigène médicamenteux, présenté soit par une protéine porteuse (complexe " haptene-carrier "), soit par des cellules présentatrices d'antigène. Le test *in vitro* le plus proche de ce type de mécanisme est le test d'activation lymphocytaire proche dans son principe du test de transformation lymphocytaire.

Le **test d'activation lymphocytaire** (Kohler 1997) est un test *in vitro* :

- sans risque pour le patient (rappelons que nous avons observé 9 réactivations de toxidermies chez les 72 patients (12,5%) ayant eu des tests cutanés médicamenteux, étude 2),
- plus précis techniquement dans sa réalisation et sa lecture que le classique test de transformation lymphocytaire dans lequel la duplication de l'ADN est marquée par une incorporation de thymidine tritiée, évaluée à un seul instant (Halpern B 1967, Bugnon 1968, Kochman 1969, Saurat 1971, Girard 1971, Vautrin 1971, Sabbah 1972, Larrègue 1972, Mathews 1972, Troost 1996).
- les cellules T qui ont été stimulées, après marquage de l'ADN par iodure de propidium, non radioactif et non toxique pour ces cellules, peuvent être conservées en congélation pour études ultérieures de leur phénotype, leur culture peut être poursuivie ou leur surnageant de culture être recueilli et analysé. Ces techniques secondaires sont impossibles à réaliser dans un TTL en raison de l'utilisation d'un radioélément.
- l'enrichissement cellulaire en particulier en augmentant le nombre de cellules du milieu non lymphocytaire pour augmenter le nombre de CPA que nous envisageons de réaliser, n'est pas possible avec un TTL. En effet dans le TTL il y a nécessité de cultures lymphocytaires pures dépourvues de polynucléaires neutrophiles, ces derniers pouvant métaboliser rapidement la thymidine tritiée et induire un test faussement négatif (Bugnon 1968).

Peu d'études permettent d'évaluer l'intérêt de ces tests de prolifération des cellules T en présence des médicaments dans le bilan des accidents médicamenteux. En effet dans la littérature nous n'avons pas retrouvé de série dans laquelle les auteurs précisent, comme nous l'avons fait, l'imputabilité du médicament testé dans la survenue de l'accident constaté. Cette

absence de prise en compte de ce facteur rend difficile l'interprétation des résultats (Girard 1971).

Les résultats de la littérature ont souligné l'intérêt des TTL dans l'exploration d'accidents induits par les bêta-lactamines, l'aspirine (Halpern 1967), la carbamazépine (Troost 1996). Nous rapportons les résultats préliminaires obtenus avec une technique voisine, chez des patients ayant une imputabilité très probable d'un médicament dans la survenue de leur accident thérapeutique, avec une sémiologie déterminée. Dans cette étude préliminaire la sensibilité de ce test paraît assez médiocre avec une positivité pertinente du test chez 5 des 18 patients testés (32%). La poursuite de l'évaluation sur une plus large série de patients, avec les améliorations techniques que nous allons détailler est nécessaire afin de préciser si ce test est appelé à avoir un intérêt diagnostique à l'avenir.

Pour améliorer et évaluer l'intérêt de ces tests d'activation des cellules T en présence d'un médicament il paraît nécessaire de faire des études prospectives avec des patients pour lesquels des données cliniques précises sont disponibles, l'imputabilité médicamenteuse déterminée, la forme chimique médicamenteuse utilisée pour le test précisée (nous avons observé des discordances entre les résultats obtenus avec l'amoxicilline sodique et l'amoxicilline base), les concentrations des médicaments testés précisées.

Le défaut de spécificité de ces tests peut-il être amélioré ?

Devant un test faussement positif comme nous l'avons observé par exemple chez une patiente avec l'Imovane® (zopiclone) ou chez 3 patients avec la pristinamycine, différentes hypothèses peuvent être avancées. La responsabilité des antibiotiques du milieu de culture pourrait être en cause. Halpern *et coll.* (1967) précisent qu'en cas de suspicion d'allergie aux bêta-lactamines la culture lymphocytaire est faite uniquement avec de la streptomycine. Lorsque ces TAL étaient positifs avec plusieurs médicaments, dont des molécules parfaitement supportées cliniquement par le patient, une stimulation par les antibiotiques présents dans le milieu de culture a été éliminée car il n'y avait pas de prolifération lymphocytaire dans le puits témoin contenant le même milieu de culture. D'autres hypothèses ont été avancées par certains auteurs comme la prise persistante du médicament incriminé qui ferait proliférer les cellules T, stimulées avant la ponction veineuse (Vautrin 1971). Cette hypothèse peut être écartée chez

nos patients. Une autre allergie médicamenteuse peut aussi persister chez le patient. Cette hypothèse peut être écartée dans notre étude car nous réalisons des TAL seulement avec des médicaments qui ont été interrompus depuis 6 à 10 semaines. Enfin l'observation de résultats positifs chez certains patients traités sans effet secondaire par la pristinamycine fait évoquer la possibilité que certains médicaments soient capables d'induire une stimulation lymphocytaire non spécifique ou du moins ne se traduisant pas par une intolérance clinique médicamenteuse.

La faible sensibilité et donc le problème de TAL faussement négatifs peuvent-ils être interprétés et améliorés ?

Dans notre série nous avons contourné, par une sélection très stricte des patients inclus pour évaluer cette technique, l'écueil de l'imputabilité médicamenteuse, rencontré dans nombre de séries antérieures, comme le souligne Bugnon *et coll.* (1968). De vrais négatifs ne peuvent donc pas dans cette étude être pris pour des faux négatifs.

- Il serait nécessaire de préciser **quels médicaments, bien tolérés, sont pris** par les patients lors du prélèvement sanguin ayant servi pour réaliser le TAL. En effet des études antérieures soulignent que certains médicaments peuvent bloquer la prolifération lymphocytaire. Si nous savons qu'aucun de nos patients ne prenait de corticoïdes ou d'antimitotique lors du prélèvement, nous n'avons pas précisé s'ils ne prenaient pas d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ou de chlorpromazine (Bugnon 1968, Kochman 1969).
- Une **trop faible concentration du médicament** *in vitro* peut être responsable de tests faussement négatifs (Bugnon 1968).
- La **nature chimique du médicament** utilisé n'est pas forcément adaptée. Des différences de réactivité peuvent être obtenues lorsque l'on teste l'amoxicilline soit sous forme base soit sous forme sodique dans les tests cutanés, et ceci peut être aussi le cas *in vitro*.
- Le problème de la **dynamique de réactivité des lymphocytes** a déjà été soulevé par d'autres auteurs, la réactivité des réponses cellulaires T médicamenteuses pouvant diminuer lorsque l'on s'éloigne du moment où est survenu l'accident médicamenteux (Girard 1971). Cette diminution de réactivité pourrait être en cause dans la différence de réponse que nous avons observée chez une patiente ayant eu un TAL aux Sandoglobulines® positif à 6 semaines mais négatif 18 semaines après la survenue d'un syndrome Babouin induit par ce traitement. Nous rappelons que, contrairement à la plupart des séries antérieures, nos patients ont bénéficié de ces TAL à une date connue, 6 à 10 semaines après la survenue de leur toxidermie.

- Un TAL peut être négatif si la molécule responsable de la toxidermie n'est pas la molécule native, telle qu'elle est utilisée pour le TAL, mais un de ses **métabolites** (Mathews 1972, Troost 1996). Troost *et coll.* (1996) viennent de démontrer que 26/65 (40%) des patients ayant présenté un accident lors de la prise de carbamazépine avaient un TTL positif avec cet anticonvulsivant, mais que 73% des patients avaient des TTL positifs si des métabolites de la carbamazépine étaient testés en plus.
- L'haptène médicamenteux doit être présenté couplé à une protéine porteuse sérique ou être présenté par une **cellule présentatrice d'antigène** pour induire une stimulation lymphocytaire. Une trop grande déplétion de la culture en CPA pourrait être source de faux négatifs.

Pour améliorer ces TAL et refaire une évaluation de leur intérêt à titre diagnostique différentes données devront être respectées :

- une culture lymphocytaire sera réalisée sans antibiotique. Si les résultats obtenus sont comparables à ceux avec les antibiotiques, l'adjonction d'antibactériens sera maintenue de façon identique à celle proposée dans la technique princeps,
- tous les médicaments pris par le patient lors du prélèvement sanguin servant au TAL seront notés pour interpréter d'éventuels faux négatifs ou des proliférations lymphocytaires non spécifiques,
- les formes chimiques des médicaments testés utilisés pour le TAL et leurs concentrations seront notées,
- des témoins négatifs ayant pris le médicament dans les mêmes délais que les patients étudiés positifs devront être recherchés,
- une augmentation du nombre de CPA dans la culture a été proposée récemment pour améliorer la technique dans le Laboratoire.

Bilans biologiques dans les toxidermies

Chez les patients pour lesquels les résultats observés (études 1, 2, 3, 4, 5, 6) sont pertinents et *a priori* spécifiques, l'association de plusieurs abords immunologiques des mécanismes de leur sensibilisation médicamenteuse (étude immunohistologique *in situ* en phase toxidermique ou sur les tests médicamenteux cutanés positifs, tests *in vitro*) fait supposer que les

mécanismes immunitaires en cause dans les toxidermies, chez certains patients, ne sont pas unicistes. Chez le patient #1 de l'étude 6 (EMP dû à l'amoxicilline, tableau 17), il existait lors de la survenue d'un EMP à l'amoxicilline, la présence transitoire de CIC, des perturbations des sous populations lymphocytaires avec lymphopénie et abaissement du rapport CD4+/CD8+ à 0,37 par diminution du taux des cellules T CD4+. Un mécanisme d'hypersensibilité immunitaire cellulaire retardée pouvait être suspecté. Cette hypothèse est confortée d'une part par les résultats des tests cutanés montrant des réponses positives retardées sur les tests épicutanés, les prick tests et les IDR mais également, d'autre part par la positivité du TAL à l'amoxicilline. Mais chez ce patient il faut remarquer que des mécanismes de type III (présence en phase aiguë de CIC) et de type I (existence d'un TDBH positif), dans la classification de Gell et Coombs, étaient peut être associés.

Les anomalies des taux des CIC paraissent rares dans les toxidermies explorées dans l'étude 6, l'hyperéosinophilie et les perturbations des sous-populations lymphocytaires, inconstantes, avec des résultats variables d'un patient à l'autre même pour des toxidermies dues au même médicament, par exemple l'amoxicilline. La population étudiée est trop faible pour juger de l'utilité de faire ces examens *in vitro* dans le bilan systématique des toxidermies, ou pour en explorer les mécanismes immunitaires en cause.

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Les toxidermies sont les effets secondaires médicamenteux néfastes les plus fréquents. Leurs aspects cliniques sont variés comme le sont leurs mécanismes physiopathologiques. Une amélioration des connaissances portant sur le mécanisme de ces effets secondaires est le moyen d'envisager un progrès dans la prise en charge des patients qui en sont atteints.
Les investigations menées à titre diagnostique ou physiopathologique ne se conçoivent qu'à partir de dossiers de patients obtenus de façon prospective, pour lesquels l'imputabilité d'un médicament et la sémiologie de la toxidermie ont été parfaitement déterminées.

Nos travaux ont respecté ces stricts critères d'inclusion. Ils ont permis de préciser que les tests médicamenteux cutanés avaient un intérêt dans le bilan étiologique des toxidermies puisque sur 72 dossiers, répondant aux critères d'inclusion, 72% avaient un test médicamenteux positif pertinent, qu'il s'agisse de tests épicutanés, de photopatch-tests, de prick tests ou de tests intradermiques. Ce travail permet de définir les modalités de réalisation de ces tests cutanés. Il serait nécessaire de poursuivre ces études sur de plus larges séries de patients répondant aux critères d'inclusion pour définir la sensibilité, la spécificité de ces tests mais également déterminer la forme chimique, la concentration et le véhicule les plus adaptés pour améliorer la sensibilité de ces tests et en limiter les effets secondaires.

Ces tests sont capables de reproduire les mécanismes de certaines toxidermies induites par certaines molécules, en particulier les effets secondaires médicamenteux relevant d'une hypersensibilité cellulaire retardée comme l'ont montré nos études d'immunophénotypage réalisées sur les biopsies de toxidermies et de tests médicamenteux positifs.

Certaines toxidermies comme les exanthèmes maculo-papuleux ou les érythrodermies relèvent de mécanismes d'hypersensibilité cellulaire retardée dans lesquelles les cellules T sont très impliquées comme le sont aussi parfois les cellules dendritiques dermiques.
Les molécules d'adhésion sont impliquées dans ces toxidermies, tant sur les cellules endothéliales où est exprimé CD62E (ELAM 1), ligand de CLA, que sur les cellules T. Mais il faut noter que les molécules d'adhésion sont aussi exprimées par les kératinocytes comme ICAM 1 et que dans nos observations, a été mise en évidence, pour la première fois, l'expression de CD62 L (dans des toxidermies à la pristinamycine) et de CD62P (dans un

syndrome Babouin dû aux veinoglobulines). Le rôle de cette dérepression des sélectines par les kératinocytes dans certaines toxidermies doit être recherché sur une population plus large et dans d'autres dermatoses.

SCD-UHP - NANCY 1 BIBLIOTHÈQUE MÉDECINE

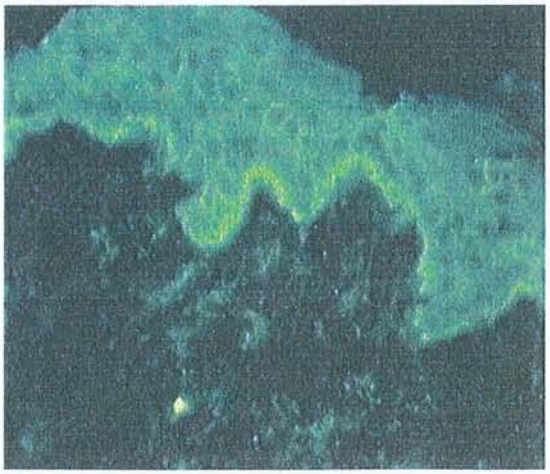
Les cellules T ont un rôle central dans les exanthèmes maculo-papuleux et les érythrodermies. Leur phénotype CD4+ *in situ*, l'absence de monoclonalité, leur absence d'apoptose, nécessitent des investigations complémentaires. Il serait en effet intéressant dans les tests *in vitro* d'activation lymphocytaire spécifique d'un médicament de préciser si la réponse de ces cellules T spécifiques est CD4+ ou devient après quelques jours CD8+, quels sont les épitopes médicamenteux inducteurs (médicament, métabolite, fonction chimique), quel est le type des cellules T CD4+ (Th1 ou Th2) par étude de leurs profils de sécrétion cytokinique, de rechercher si la réponse de ces cellules T est mono, oligo ou polyclonale par technique de PCR DGGE. Enfin durant la toxidermie il serait très intéressant de rechercher des cellules dendritiques CD1a+ circulantes afin de préciser quel rôle ont ces cellules que nous avons mises en évidence *in situ* dans les toxidermies induites par les bêta-lactamines ou dans un syndrome Babouin.

Les tests *in vitro* recherchant une immunité IgE dépendante ou par dégranulation non spécifique pourraient avoir un intérêt dans le diagnostic étiologique, plutôt dans les toxidermies urticariennes. Le test de dégranulation des basophiles humains évalué dans ce travail est apparu peu sensible. Le test de libération des leucotriènes nécessite d'être évalué sur les toxidermies. Les tests d'activation lymphocytaire pourraient avoir un grand intérêt diagnostique. Une nouvelle évaluation de l'intérêt de ce test qui peut être également utilisé ensuite pour des travaux plus fondamentaux portant sur la physiopathologie des toxidermies, devra être refaite après les modifications qui ont été proposées dans ce travail. Ces modifications devront porter sur les conditions de mise en culture, la détermination de la concentration et de la forme chimique du médicament la plus adéquate pour stimuler spécifiquement les lymphocytes, l'augmentation du nombre de cellules présentatrices d'antigène qui nous paraissent indispensables pour la stimulation des cellules T.

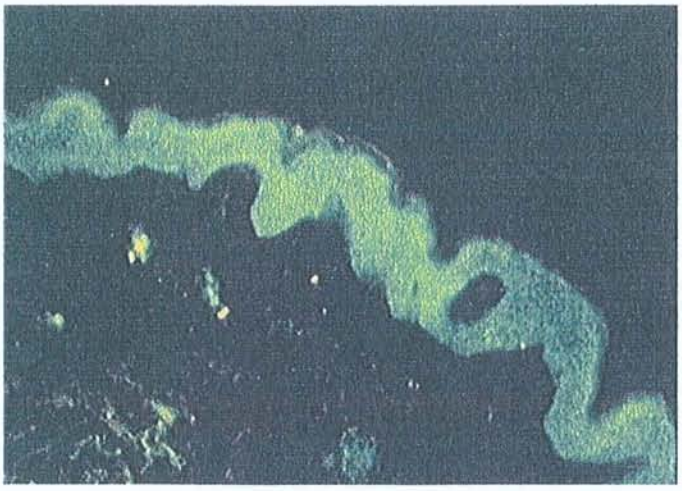
FIGURES

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

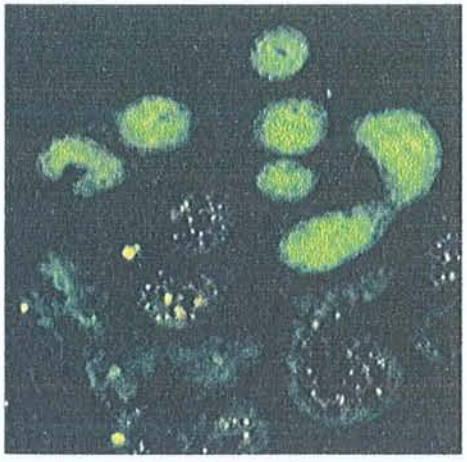
1.Expression endothéliale de CD62E
Grandissement initial x400



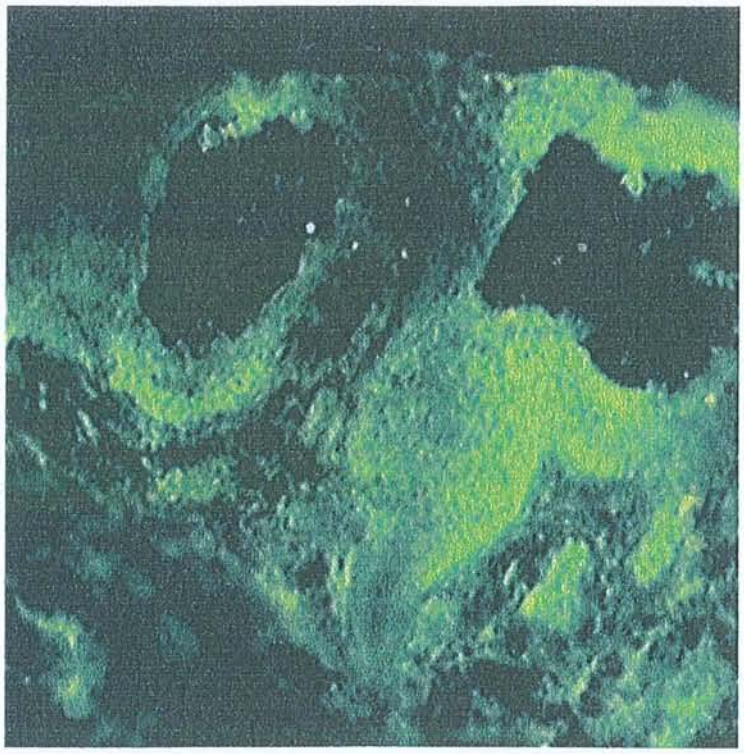
2.Expression épidermique de CD62P
Grandissement initial x400



3.Expression épidermique de CD62L
Grandissement initial x100

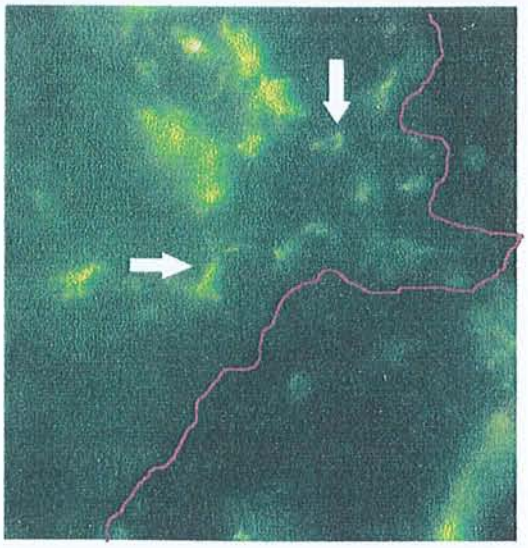


4.Expression de CD62L sur les canaux glandulaires
Grandissement initial x400

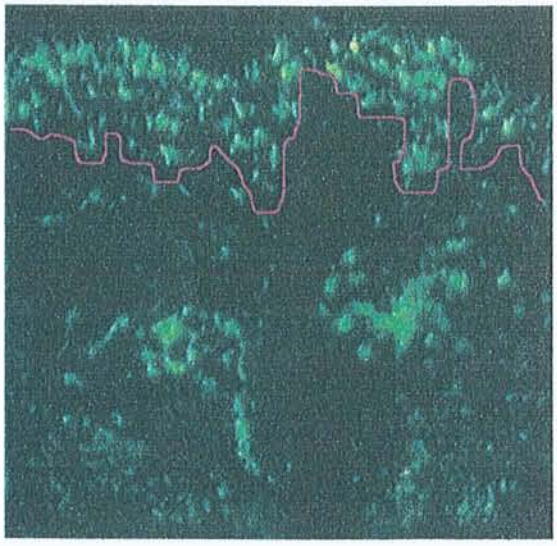


SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

5.Expression épidermique d'ICAM-1/CD54
Grandissement initial x100



6.Cellules dendritiques dermiques DR+
Grandissement initial x400



7.Cellules dendritiques dermiques CD1+
Grandissement initial x400

REFERENCES

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

1. Aberer W. Vaccination despite thimerosal sensitivity. Contact Dermatitis 1991, 24 : 6-10.

2. Adams RM, Fischer T. Diagnostic patch testing. In : *Occupational Skin Diseases* (Adams RM, ed), 2nd edn., Philadelphia : WB Saunders Co, 1990 : 223-53.

3. Adkinson NF. Side chain specific beta-lactam allergy. Clin Exp Allergy 1990, 20 : 445-7.

4. Aihara M, Ikezawa Z. Evaluation of the skin test reactions patients with delayed type rash induced by penicillins and cephalosporins. J Dermatol 1987, 14 : 440-8.

5. Alanko K, Stubb S, Reitamo S. Topical provocation of fixed drug eruption. Br J Dermatol 1987, 116 : 561-7.

6. Alanko K. Patch testing in cutaneous reactions caused by carbamazepine. Contact Dermatitis 1993, 29 : 254-7.

7. Alanko K. Topical provocation of fixed drug eruption : a study of 30 patients. Contact Dermatitis 1994, 31 : 25-7.

8. Andersen KE, Hjorth N, Menne T. The baboon syndrome : systemically-induced allergic contact dermatitis. Contact Dermatitis 1984, 10 : 97-100.

9. Ansel J, Perry P, Brown J, Damm D, Phan T, Hart C, Luger T, Hefeneider S. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. J Invest Dermatol 1990, 94 : 101s-7s.

10. Audicana M, Bernaola G, Urrutia I, Echechipia S, Gastaminza G, Munoz D, Fernandez E, Fernandez de Corres L. Allergic reactions to betalactams : studies in a group of patients allergic to penicillin and evaluation of cross-reactivity with cephalosporin. Allergy 1994, 49 : 108-13.

11. Barbaud A, Tréchot P, Gillet-Terver MN, Zannad F, Schmutz JL. Investigations allergologiques dans une toxidermie au diltiazem (Tildiem 300 LP^{R}). Thérapie 1993,48 : 498-9.

12. Barbaud A. Intérêt des patch-tests aux médicaments dans le diagnostic des toxidermies (à propos de 3 cas) - La lettre du GERDA 1993, 10 : 28-32.

13.Barbaud A, Schmutz JL, Mougeolle JM. Réactions immuno-allergiques cutanées dues aux vaccins. Ann Dermatol Vénéréol 1995, 122 : 129-38.

14.Barbaud A. Place of excipients in drug related allergy. Clin Rev Allergol Immunol 1995, 13 : 253-63.

15.Barbaud A, Got I, Tréchot P, Noirez V, Schmutz JL. Allergies cutanées et insulinothérapie. Aspects récents, conduite à tenir. Ann Dermatol Vénéréol 1996, 123 : 214-8.

16.Barbaud A, Béné MC., Schmutz JL., Ehlinger A., Weber M, Faure GC. Role of delayed cellular hypersensitivity and adhesion molecules in amoxicillin-induced morbilliform rashes. Arch Dermatol 1997, 133 : 481-6.

17.Barbaud A, Béné MC, Faure G. Immunopathological physiopathology of cutaneous adverse drug reactions. Eur J Dermatol 1997, 7 : 319-23.

18.Barker J, Allen M, Mac Donald D. The effect of in vivo interferon-gamma on the distribution of LFA.1 and ICAM.1 in normal human skin. J Invest Dermatol 1989, 93 : 439-42.

19.Barucha C, Mc Millian JC. Eczema after intravenous infusion of immunoglobulin. Br Med J 1987, 295 : 1141.

20.Bégaud B, Evreux J.C, Jouglard J, Lagier G. Imputabilité des effets inattendus ou toxiques des médicaments. Actualisation de la méthode utilisée en France. Thérapie. 1985, 40 : 111-8.

21.Bell SJD, Pichler WJ. Penicillin - allergic patients react to penicillin - modified "self". Allergy 1989, 44 : 199-203.

22.Béné M-C, Faure GC. Exploration fonctionnelle de l'immunité humorale. Editions Médicales Internationales ed. Cachan (Fr), 1997 : pp309.

23.Bircher AJ, Flückiger R, Buchner SA. Eczematous infiltrate plaque to subcutaneous heparin : a type IV allergic reaction. Br J Dermatol 1990, 123 : 507-14.

24.Bircher A, Hunziker N. facteurs de risques dans l'allergie médicamenteuse. In : Progrès en Dermato-Allergologie, Médiscript ed, Viternes (F), 1995 : pp 77-85.

25.Bircher AJ, Pelloni F, Langauer-Messmer S, Müller D. Delayed hypersensitivity reactions to corticosteroids applied to mucous membranes. Br J Dermatol 1996, 135 : 310-3.

26.Blanca M, Vega JM, Garcia J, Carmona MJ, Terados S, Avila MJ, Miranda A, Juarez C. Allergy to penicillin with good tolerance to other penicillins; study of the incidence in subjects allergic to betalactams. Clin Exp Allergy 1990, 20 : 475-81.

27.Blanca M, Vega JM, Garcia J, Carmona MJ, Terado S, Avila MJ, Miranda A, Juarez C. New aspects of allergic reactions to betalactams : cross reactions and unique specificities. Clin Exp Allergy 1994, 24 : 407-15.

28.Blumberg S, Bienfang D, Kantrowitz F. A possible association between influenza vaccination and small-vessel vasculitis. Arch Intern Med 1980, 140 : 847-48.

29.Bos JD. The skin as an organ of immunity. Clin Exp Immunol 1997, 107 : 3s-5s.

30.Bouffioux B, Heid E. Eczéma endogène à la néomycine. Nouv Dermatol 1990, 9 : 25.

31.Brander C, Mauri-Hellweg D, Bettens F, Rolli H, Goldman M, Pichler WJ. Heterogeneous T cell responses to beta-lactam-modified self-sructures are observed in penicillin-allergic individuals. J Immunol 1995, 155 : 2670-8.

32.Brannagan TH, Nagle KJ, Lange DJ, Rowland LP. Complications of intravenous immunoglobulin treatment in neurologic disease. Neurology 1996, 47 : 674-7.

33.Breathnach SM, Hintner H. Adverse drug reactions and the skin. Blackwell Science ed. Oxford (UK), 1992 : pp 394.

34.Breathnach SM. Mechanisms of drug eruptions : Part 1. Australas J Dermatol 1995, 36 : 121-7.

35.Breathnach SM. Management of drug eruptions : Part II. Diagnosis and treatment. Australas J Dermatol. 1995, 36 : 187-91.

36.Brightman C, Scadding C, Dumbreck L, Latchman Y, Brostoff J. Yeast-derived hepatitis B vaccine and yeast sensitivity. Lancet 1989, i : 903.

37.Bruynzeel DP, von Blomberg-van der Flier M, Scheper RJ, van Ketel WG, de Haan P. Penicillin allergy and the relevance of epicutaneous tests. Dermatologica 1985, 171 : 429-34.

38.Bruynzeel DP, Van Ketel WG. Skin tests in the diagnosis of maculopapular drug eruptions. Sem Dermatol 1987, 6 : 119-24.

39.Bruynzeel DP, van Ketel WG. Patch testing in drug eruptions. Sem Dermatol 1989, 8 : 196-203.

40.Bugnon C, Laugier P, Lenys D, Moreau N, Barale T. Application du test de transformation lymphoblastique (T.T.L.) dans les allergies médicamenteuses. Bull Soc Fr Dermatol Syphil 1968, 75 : 670-82.

41.Bussel A. Risques connus et potentiels inhérents à l'utilisation des immunoglobulines IV à fortes doses. Ann Dermatol Vénéréol 1997, 124 : 381-3.

42.Calkin JM, Maibach H. Delayed hypersensitivity drug reactions diagnosed by patch testing. Contact Dermatitis 1993, 29: 223-33.

43.Callot V, Roujeau J-C, Bagot M, Wechsler J, Chosidow O, Souteyrand P, Morel P, Dubertret L, Avril MF, Revuz J. Drug-induced pseudolymphoma and hypersensitivity syndrome. Arch Dermatol 1996, 132 : 1315-21.

44.Camarasa JG. Patch test diagnosis of exfoliative dermatitis due to carbamazepine. Contact Dermatitis 1985, 12 : 49.

45.Camarasa JG, Serra-Baldrich E. Tetrazepam allergy detected by patch test. Contact Dermatitis 1990, 22 : 246.

46.Cannata J, Cueesta V, Peral V. Reactivation of vasculitis after influenza vaccination. Br Med J 1981, 283 : 250.

47.Carstens J, Wendelboe P, Sogaard H, Thestrup-Pedersen K. Toxic epidermal necrolysis and erythema multiforme following therapy with terbinafine. Acta Dermato-Venereol 1994, 74 : 391-2.

48.Caugham W, Lian Jie L, Degitz K. Characterization and functional analysis of interferon gamma induced intercellular adhesion molecule-1 expression in human keratinoocytes and A-431 cells. J Invest Dermatol 1990, 94 : 22s-6s.

49.Ceska MN, Erikson R, Varga JM. Radioimmunosorbent assay of allergens. J Allergy Clin Immunol 1972, 49 : 1-9.

50.Cham-Lam D, Fitzsimons EJ, Douglas WS. Alopecia after immunoglobulin infusion. Lancet 1987, i : 1436.

51.Chosidow O, Bourgault I, Roujeau J-C. Drug rashes. What are the targets of cell-mediated cytotoxicity ? Arch Dermatol 1994, 130 : 627-9.

52.Civatte J. Lésions élémentaires. In *Histopathologie cutanée* (J.Civatte,ed), Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1982 : 22-5.

53.Collet E, Dalac S, Morvan C, Sgro C, Lambert D. Tetrazepam allergy once more detected by patch test. Contact Dermatitis 1992, 26 : 281.

54.Corazza M, Mantovani L, Casetta I, Virgili A. Exfoliative dermatitis caused by carbamazepine in a patient with isolated IgA deficiency. Contact Dermatitis 1995, 33 : 447.

55.Cordel N, Lenormand B, Thomine E, Lauret Ph, Joly P. Evaluation critique de l'étude du réarrangement des gènes du recepteur des lymphocytes T dans le diagnostic des infiltratts lymphocytaires T cutanés. Ann Dermatol Vénéréol 1997, 124 : 86s-7s. (abstract).

56.Cox N, Forsyth A. Thiomersal allergy and vaccination reactions. Contact Dermatitis 1988, 18 : 229-33.

57.Dam Janov J, Amato JA. Progression of renal disease in Henoch-Schönlein purpura after influenza vaccination. J Am Med Assoc 1979, 242 : 2555-6.

58.Dascalu DI, Kletter Y, Baratz M, Brenner S. Langerhans'cell distribution in drug eruption. Acta Derm Venereol 1992, 72 : 175-7.

59.De Boer OJ, Horst E, Pals ST, Bos JD, Das PK. Functional evidence that the HECA-452 antigen is involved in the adhesion of human neutrophils and lymphocytes to tumor necrosis factor-alpha-stimulated endothelial cells. Immunology 1994, 81 : 359-65.

60.Delfau MH, Dalac S, Lepage E, Petrella T, Wechsler J, Farcet JP, Bagot M. Signification pronostique de la détection d'une population lymphocytaire T monoclonale dans les lésions de mycosis fongoïde. Ann Dermatol Vénéréol 1997, 124 : 89s. (abstract)

61.De Shazo RD, Mather P, Grant W. Evaluation of patients with local reactions to insulin with skin test and *in vitro* techniques. Diabetes Care 1987, 10 : 330-6.

62.De Silva L, Rogers M. Hepatitis B vaccine : urticarial reaction. Med J Australia 1985, 143 : 323-4.

63.De Weck AL. Pharmacologic and immunochemical mechanisms of drug hypersensitivity. Immunol All Clin North Am. 1991, 11 : 461-74.

64.De Weck AL, Stadler BM, Urwyler A, Wehner HU, Bühlmann RP. Cellular allergen stimulation test (CAST)-A new dimension in allergy diagnostics. Allergy Clin Immunol News 1993, 5 : 9-14.

65.Dobson S, Scheifele D, Bell A. Assessment of a universal, school-based hepatitis B vaccination program. J Am Med Assoc 1995, 274 : 1210-3.

66.Dooms-Goossens A. Allergy to inhaled corticosteroids : a review. Am J Contact Dermatitis 1995, 6 : 1-3.

67.Drouet M, Lizeaux-Parneix V, Miossec V, Le Brun V, Cogne M, Bonnetblanc J-M, Bernard P. HLA and susceptibility to two distinct types of drug-induced cutaneous reactions. Eur J Dermatol 1997, 7 : 329-32.

68.Duve S, Worret W, Hofmann H. The baboon syndrome : a manifestation of haematogenous contact-type dermatitis. Acta Dermato-Venereologica 1994, 74 : 480-1.

69.Dybendal T, Aasen T, Elsayed S. Type I anaphylactic reaction against pholcodine. Ann Allergy Asthma Immunol. 1995, 74 : 84.

70.Felix R, Comaish J. The value of the patch tests and other skin tests in drug eruptions. Lancet 1974, i : 1017-9.

71.Fernandez L, Maquiera E, Garcia-Abujeta JL, Yanez S, Rodriguez F, Martin-Gil D, Jerez J. Baboon syndrome due to mercury sensitivity. Contact Dermatitis 1995, 33 : 56-7.

72.Flageul B, Paul C, Wolkenstein P, Revuz J, Dubertret L, Roujeau J-C. Etude de l'expression des molécules médiant l'apoptose dans les toxidermies. Ann Dermatol Vénéréol 1997, 124 : 49s-50s. (abstract)

73.Friedmann PS, Strickland I, Pirmohamed M, Park K. Investigation of mechanisms in toxic epidermal necrolysis induced by carbamazepine. Arch Dermatol 1994, 130: 598-604.

74.Gavaghan T, Webber C. - Severe systemic vasculitis syndrome post influenza vaccination. Austr N Zeal J Med 1993, 23 : 220.

75.Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992, 337 : 181-4.

76.Gillet-Terver MN, Modiano P, Tréchot P, Barbaud A, Schmutz JL. Fluvoxamine photosensitivity. Australas J Dermatol 1996, 37 : 62.

77.Girard J-P, Vidmar B, Laugier P. Diagnostic des allergies médicamenteuses : étude comparative des tests d'hémagglutinations, du test des rosettes et du test de transformation lymphoblastique. Rev Fr Allergol 1971, 11 : 347-5.

78.Gonzalez FJ, Blanca M. T lymphocyte subpopulations and markers in allergies to betalactams. All Clin Immunol International 1997, 9 : 22-3.

79.Gonzalez FJ, Carvajal MJ, Leiva L, Juarez C, Blanca M, Santamaria LF. Expression of the cutaneous lymphocyte-associated antigen in circulating T cells in drug-allergic reactions. Int Arch Allergy Immunol 1997, 113 : 345-7.

80.Goossens C, Sass U, Song M. Baboon syndrome. Dermatology 1997, 194 : 421-2.

81.Grabbe J, Welker P, Humke S, Grewe M, Schöpf E, Henz BM, Krutmann J. High-dose ultraviolet A1 (UVA1), but not UVA/UVB therapy, decreases IgE-binding cells in lesional skin of patients with atopic eczema. J Invest Dermatol. 1996, 107 : 419-22.

82.Griffin JD, Spertini O, Ernst TJ, Belvin MP, Levine HB, Kanakura Y, Tedder TF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. J Immunol 1990, 145 : 576-84.

83.Griffith R, Miller O. Erythema multiforme following diphteria and tetanus toxoid vaccination. J Am Acad Dermatol 1988, 19 : 758-9.

84.Guillevin L, Levy Y. Réaction d'hypersensibilité après vaccination antigrippale. Presse Med 1983, 12 : 1668-9.

85.Gulbins E, Szabo I, Lang F. Physiology of Fas-induced programmed cell death. Cell Physiol Biochem 1996, 6 : 361-75.

86.Hagdrup H, Tonnesen E, Clemmensen O, Andersen KE. Abnormalities of lymphocyte function and phenotypic pattern in a case of toxic epidermal necrolysis. Acta Derm Venereol 1992, 72 : 268-70.

87.Halpern B, Amache N, Lagrue G, Hazard J. Diagnostic de l'allergie médicamenteuse " in vitro " par l'utilisation du test de transformation lymphoblastique (T.T.L.). Presse Med 1967, 75 : 461-5.

88.Hamdalla HHM, Hawkes CH, Spokes EG. Bamford JM, Goulding PJ. Intravenous immunoglobulin in the Guillain-Barré syndrome may cause severe adverse skin reactions. Br Med J 1996, 313 : 1399-400.

89.Hannedouche Th, Godin M, Fillastre JP. Vascularites d'hypersensibilité d'origine médicamenteuse. Ann Med Interne 1986, 137 : 57-64.

90.Headington J, Cerio R. Dendritic cells and the dermis : 1990. Am J Dermatopathol 1990, 12 : 217-20.

91.Heng MCY, Allen SG. Efficacy of cyclophosphamide in toxic epidermal necrolysis. Clinical and pathophysiologic aspects. J Am Acad Dermatol 1991, 25 : 778-86.

92.Herfs H, Schirren CG, Przybilla B, Plewig G. Das " Baboon-Syndrom ". Hautarzt 1993, 44 : 466-9.

93.Hertl M, Merk HF, Bohlen H. T-cell subsets in drug-induced toxic epidermal necrolysis. Arch Dermatol 1992, 128 : 272-3.

94.Hertl M, Bohlen H, Jugert F, Boecker C, Knaup R, Merk HF. Predominance of epidermal CD8+ T lymphocytes in bullous cutaneous reactions caused by b-lactam antibiotics. J Invest Dermatol. 1993, 101 : 794-9.

95.Hertl M, Gersel J, Boecker C, Merk HF. Selective generation of CD8+ T-cell clones from the peripheral blood of patients with cutaneous reactions to beta-lactam antibiotics. Br J Dermatol 1993, 128 : 619-26.

96.Hertl M, Merck HF. Lymphocyte activation in cutaneous drug reactions. J Invest Dermatol. 1995, 105 : 95s-8s.

97.Hindsen M, Christensen OB, Gruic V, Lofberg H. Fixed drug eruption : an immunohistochemical investigation of the acute and healing phase. Br J Dermatol 1987, 116 : 351-60.

98.Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. Proc Natl Acad Sci 1991, 88 : 6961-5.

99.Hölzle E, Neumann N, Hausen B, Przybilla B, Schauder S, Hönigsmann H, Bircher A, PlewigG. Photopatch testing : the 5-year experience of the german, austrian, and swiss photopatch test group. J Am Acad Dermatol 1991, 25: 59-68.

100.Houwerzihl J, De Gast GC, Natter JP. Patch tests in drug eruptions. Contact Dermatitis 1975, 1: 180-1.

101.Hugues RAC and *Plasma exchange/Sandoglobulin Guillain-Barré Syndrome trial Group*. Randomised trial of plasma exchange, intravenous immunoglobulin, and combined treatments in Guillain-Barré syndrome. The Lancet 1997, 349 : 225-30.

102.Ibanez MD, Alonso E, Munoz MC, Martinez E, Laso MT. Delayed hypersensitivity reaction to paracetamol (acetaminophen). Allergy 1996, 51 : 121-3.

103.Jeanmougin M. Détermination du pouvoir photosensibilisant d'un médicament par la méthode des photopatch tests. Nouv Dermatol 1986, 5 : 204-8.

104.Jones M, Fernandez-Herrera J, Dorado JM, Sols M, Ruiz M, Garcia-Diez A. Epicutaneous test in carbamazepine cutaneous reactions. Dermatology 1994, 188 : 18-20.

105.Kapsenberg ML, Stiekema KAM, Kallan A, Hagenaars C, Bos JD. The regulatory role of cell surface sialic acid in antigen presentation to helper T cells. In The Langerhans Cell, Ed J. Thivolet, D. Schmitt. Colloque INSERM/ John Libbey Eurotext Ltd. 1988, 172 : 329-333.

106.Kauppinen K, Alanko K. Oral provocation : uses. Semin Dermatol 1989, 8 : 187-91.

107.Kellett JK, King CM, Beck MH. Compound allergy to medicaments. Contact Dermatitis 1986, 14 : 45-8.

108.Kempinaire A, De Raeve L, Merckx M, De Coninck A, Bauwens M, Roseeuw D. Terbinafine-induced acute generalized exanthematous pustulosis confirmed by a positive patch-test result. J Am Acad Dermatol 1997, 37 : 653-5.

109.Kikuchi K, Tsunoda T, Tagami H. Generalized drug eruption due to mexiletine hydrochloride : topical provocation on previously involved skin. Contact Dermatitis 1991, 25 : 70-2.

110.Klein CE, Trautmann A, Zillikens D, Brocker EB. Patch testing in an unusual case of toxic epidermal necrolysis. Contact Dermatitis 1995, 33 : 448-9.

111.Kochman S, Charreire J, Doco, Dubois de Montreynaud J-M. Intérêt du test de transformation lymphoblastique (T.T.L.) dans le diagnostic de l'hypersensibilité retardée et l'intolérance médicamenteuse (682 cas). Presse Med 1969, 77 : 1944.

112.Kohler C, Kolopp-Sarda M-N, De March-Kennel A, Barbaud A, Béné M-C, Faure GC. Sequential assessment of cell cycle S phase in flow cytometry : a non-isotopic method to measure lymphocyte activation *in vitro*. Analytical Cell Pathol 1997, 14 : 51-9.

113.Köhler LD, Schönlein K, Kautzky F, Vogt HJ. Diagnostic at first glance : the Baboon syndrome. Int J Dermatol 1996, 35 : 502-3.

114.Komatsu T, Moriya N, Shiohara T. T cell receptor (TCR) repertoire and function of human epidermal T cells : restricted TCR Valpha-Vbeta genes are utilized by T cells

residing in the lesional epidermis in fixed drug eruption. Clin Exp Immunol 1996, 104 : 343-50.

115.Koponen M, Pichler WJ, de Weck AL. T cell reactivity to penicillin : phenotypic analysis of in vitro activated cell subsets. J Allergy Clin Immunol 1986, 78 : 645-52.

116.Krutmann J, Kock A, Schauer F, Parlow F, Möller A, Kapp A, Förster E, Schöpf E, Luger TA. Tumor necrosis factor beta and ultraviolet radiation are potent regulators of human keratinocyte ICAM.1 expression. J Invest Dermatol 1990, 95 : 127-31.

117.Larregue M, Leporrier M, Roisin M. Lecture isotopique du test de transformation lymphoblastique in vitro. Bull Soc Fr Dermatol Syphil 1972, 79 : 143-6.

118.Le Coz CJ, Boos V, Cribier BJ, Grosshans EM, Heid E. An unusual case of mercurial baboon syndrome. Contact Dermatitis 1996, 35 : 112.

119.Lohiya G. Asthma and urticaria after hepatitis B vaccination. West J Med 1987, 147 : 341.

120.Lowry MD, Hudson CF, Callen JP. Leukocytoclastic vasculitis caused by drug additives. J Am Acad Dermatol 1994, 30 : 854-5.

121.Mac Mahon B, Helminiak C, Wainwright K. Frequency of adverse reactions to hepatitis B vaccine in 43,618 persons. Am J Med 1992, 92 : 254-6.

122.Machet L, Vaillant L, Dardaine VF, Lorette G. Patch testing with clobazepam : relapse of generalized drug eruption. Contact Dermatitis 1992, 26: 347-8.

123.Mathews KP, Pan PM, Wells JH. Experience with lymphocyte transformation tests in evaluating allergy to aminosalicylic acid, isoniazid and streptomycin. Int Arch Allergy 1972, 42 : 653-67.

124.Mauri-Hellweg D, Bettens F, Mauri D, Brander C, Hunziker T, Pichler WJ. Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individual allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine. J Immunol 1995, 155 : 462-72.

125.Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. Cell 1993, 74 : 541.

126.Mc Ever RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. J Biol Chem 1995, 270 : 11025.

127.Mc Gregor JM, Rustin MHA. Terbinafine and erythema multiforme. Br J Dermatol 1994, 131 : 587-8.

128.Menné T, Veien N, Sjolin K-E, Maibach HI. Systemic contact dermatitis. Am J Contact Dermatitis 1994, 5 : 1-12.

129.Menz J, Muller SA, Connolly S. Photopatch testing : a six-year experience. J Am Acad Dermatol 1988, 18 : 1044-7.

130.Meunier L, Gonzalez-Ramos A, Cooper KD. Heterogeneous population of class II MHC+ cells in human dermal cell suspensions. Identification of a small subset responsible for potent dermal antigen-presenting cell activity with features analogous to Langerhans cells. J Immunol. 1993, 151 : 4067-80.

131.Meunier L, Bata-Csorgo Z, Cooper KD. In human dermis, ultraviolet radiation induces expansion of a CD36+ CD11b+ CD1- macrophage subset by infiltration and proliferation ; CD1+ Langerhans-like dendritic antigen-presentating cells are concomitantly depleted. J Invest Dermatol. 1995, 105 : 782-8.

132.Michel M, Dompmartin A, Szczurko C, Castel B, Moreau A, Leroy D. Eczematous-like drug eruption induced by synergistins. Contact Dermatitis 1996, 34 : 86-7.

133.Michel M, Dompmartin A, Louvet S, Szczurko C, Castel B, Leroy D. Skin reactions to hydroxyzine. Contact Dermatitis 1997, 36 : 147-9.

134.Misbah SA, Chapel HM. Adverse effects of intravenous immunoglobulin. Drug Safety 1993, 9 : 254-62.

135.Miyauchi H, Hosokawa H, Akaeda T, Iba H, Asada Y. T-cell subsets in drug-induced toxic epidermal necrolysis. Possible pathogenic mechanism induced by CD8-positive T cells. Arch Dermatol 1991, 127 : 851-5.

136.Mobini N, Ahmed AR. Immunogenetics of drug-induced bullous diseases. Clin Dermatol 1993, 11: 449-60.

137.Molina M, Ortega G, Galvez J, Munoz L. Leucocytoclastic vasculitis induced by influenza vaccine. Medicina Clin 1990, 95 : 78.

138.Moller H. All these positive tests to thimerosal. Contact Dermatitis 1994, 31 : 209-13.

139.Moncada B, Delgado C, Quevado MA. Abnormal T-cell response in toxic epidermal necrolysis. Arch Dermatol 1994, 130 : 116.

140.Moore N, Paux G, Begaud B, Biour M, Loupi E, Boismare F, Royer RJ. Adverse drug reaction monitoring : doing it the french way. Lancet. 1985, ii : 1056-8.

141.Moreau A, Dompmartin A, Esnault P, Michel M, Leroy D. Delayed hypersensitivity at the injection sites of a low-molecular-weight heparin. Contact Dermatitis 1996, 34 : 31-4.

142.Möröy T, Zörnig M. Regulators of life and death : the Bcl-2 gene family. Cell Physiol Biochem 1996, 6 : 312-36.

143.Mouthon L, Kazatchkine M. Utilisations thérapeutiques des immunoglobulines intraveineuses. Concours Med 1997,119 : 693-6.

144.Ortega NR, Barranco P, Lopez Serrano C, Romualdo L, Mora C. Delayed cell-mediated hypersensitivity to tetrazepam. Contact Dermatitis 1996, 34 : 139.

145.Osawa J, Naito S, Aihara M, Kitamura K, Ikezawa Z, Nakajima. Evaluation of skin test reactions in patients with non-immediate type drug eruptions. J Dermatol 1990, 17 : 235-9.

146.Paquet P, Nikkels A, Arrese JE, Vanderkelen A, Pierard GE. Macrophages and tumor necrosis factor alpha in toxic epidermal necrolysis. Arch Dermatol 1994, 130 : 605-8.

147.Patel U, Bradley J, Hamilton D. Henoch-Schönlein purpura after influenza vaccination. Br Med J 1988, 296 : 1800.

148.Paul C, Wolkenstein P, Adle H, Wechsler J, Garchon HJ, Revuz J, Roujeau JC. Apoptosis as a mechanism of keratinocyte death in toxic epidermal necrolysis. Br J Dermatol 1996, 134 : 710-4.

149.Perez T, Girard JP, Dayer E. Imbalance of CD45R and CDw29 helper cell subsets after seven days of culture from penicillin hypersensitive patients. Allergy 1991, 46 : 379-85.

150.Pigott R, Power C. L.Selectin. Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1), Leu 8. In : *the adhesion molecule facts book* (Pigott R, Power C, ed), London : Academic Press-Hartcourt Brace and Company publishers, 1993 : 100-2.

151.Plantin P, Piette F, Le Roy JP, Grulier A, Guillet G, Boergoend H. Toxidermies exanthématiques et pustuleuses. A propos de 6 cas, revue de la littérature. Rech Dermatol 1988, 1 : 385-94.

152.Popescu NA, Sheehan MG, Kuides PA, Loughner JE, Condemi JJ, Looney RJ, Leddy JP. Allergic reactions to cyclophosphamide : delayed clinical expression associated with positive immediate skin tests to drug metabolites in five patients. J Allergy Clin Immunol 1996, 97 : 26-33.

153.Poulter LW, Seymour GJ, Duke O, Janossy G, Panayi G Immunohistological analysis of delayed-type hypersensitivity in man. Cell Immunol. 1982, 74 : 358-69.

154.Puig L, Nadal C, Fernandez-Figueras M-T, Alomar A. Carbamazepine-induced drug rashes : diagnostic value of patch tests depends on clinico-pathologic presentation. Contact Dermatitis 1996, 34 : 435-7.

155.Quirino AP, Barros MA, Gonçalo M, Azenha A, Basto S, Silva R, Bordalo O, Faria A (GPEDC). Valor dos testes epicutaneos no estudo das toxidermias. Congrès Latin des allergies cutanées. Coimbra 30 10 97 : 25-30.

156.Rasmussen JE. Erythema multiforme. Should anyone care about the standards of care ? Arch Dermatol 1995, 131: 726-9.

157.Ressler C, Mendelson LM. Skin test for diagnosis of penicillin allergy. Current Status. Ann Allergy 1987, 59 : 167-70.

158.Rodriguez-Mosquera M, Iglesias A, Saez A, Vidal C. Patch test diagnosis of carbamazepine sensitivity ? Contact Dermatitis 1991, 25 : 137-8.

159.Romaguera C, Grimalt F, Vilaplana J, Azon A. Erythroderma from carbamazepine. Contact Dermatitis 1989, 20 : 304-5.

160.Romano A, Pietrantonio F, Garcovich A, rumi C, Bellocci F, Caradonna P, Barone C. Delayed hypersensitivity to diltiazem in two patients. Ann Allergy 1992, 69 : 31-2.

161.Romano A, Di Fonso M, Pietrantonio F, Pocobelli D, Giannarini L, Del Bono A, Fabrizi G, Venuti A. Repeated patch testing in delayed hypersensitivity to beta-lactam antibiotics. Contact Dermatitis 1993, 28 : 190.

162.Romano A, Pietrantonio F, Di Fonso M, Garcovich A, Chiarelli C, Venuti A, Barone C. Positivity of patch tests in cutaneous reaction to diclofenac. Allergy 1994, 49 : 57-9.

163.Romano A, Di Fonso M, Papa G, Pietrantonio F, Federico F, Fabrizi G, Venuti A. Evaluation of adverse cutaneous reactions to aminopenicillins with emphasis on those manifested by maculopapular rashes. Allergy. 1995, 50 : 113-8.

164.Roujeau JC, Dubertret L, Moritz S, Jouault H, Heslan M, Revuz J, Touraine R. Involvement of macrophages in the pathology of toxic epidermal necrolysis. Br J Dermatol 1985, 113 : 425-30.

165.Roujeau J-C, Beani J-C, Dubertret L, Guillaume J-C, Jeanmougin M, Danan G, Lagier G, Benichou C. Photosensibilité cutanée médicamenteuse. Résultats d'une réunion de consensus. Thérapie 1989, 44 : 223-7.

166.Roujeau J.C. Syndrome de Lyell et imputabilité aux médicaments : problèmes méthodologiques. Allergie et Immunologie 1990, 22 : 21-2.

167.Roujeau J-C, Bioulac-Sage P, Bourseau C, Guillaume JC, Bernard P, Lok C, Plantin P, Claudy A, Delavierre C, Vaillant L, Wechsler J, Danan G, Bénichou C, Beylot C. Acute generalized exanthematous pustulosis. Analysis of 63 cases. Arch Dermatol 1991, 127 : 1333-8.

168.Rzany B, Mockenhaupt M, Gehring W, Schopf E. Stevens-Johnson syndrome after terbinafine therapy. J Am Acad Dermatol 1994, 30 : 509.

169.Sabbah A, Menard E. Test de transformation lymphoblastique appliqué au diagnostic de l'hypersensibilité médicamenteuse et bactérienne. Interprétation isotopique et morphologique. Rev Franç Allergol 1972, 12 : 251-67.

170.Sacerdoti G, Vozza A, Ruocco V. Identifying skin reactions to drugs. Int J Dermatol 1993, 32 : 469-79.

171.Sainte-Laudy J. Standardization of basophil degranulation for pharmacological studies. J Immunol Methods 1987, 98 : 279-82.

172.Santamaria Babi LF, Moser R, Perez Soler MT, Picker LJ, Blaser K, Hauser C. Migration of skin-homing T cells across cytokine-activated human endothelial cell layers involves interaction of the Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA), the very late antigen-4 (VLA-4), and the lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). J Immunol 1995, 154 : 1543-50.

173.Saurat J-H, Cartron J, Wolfromm R. Utilisation du test de transformation lymphoblastique en pratique allergologique. Travail établi sur 157 observations. Rev Fr Allergol 1971, 11 : 357-66.

174.Schiavotto C, Ruggeri M, Rodeghiero F. Adverse reactions after high-dose intravenous immunoglobulin : incidence in 83 patients treated for idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and review of the literature. Haematologica 1993, 78 (supplément 2) : 35s-40s.

175.Schlottmann K, Coggeshall KM. CD95/Fas/Apo-1-mediated signal transduction. Cell Physiol Biochem 1996, 6 : 345-60.

176.Sehgal VN, Gangwani OP. Fixed drug eruption. Current concepts. Int J Dermatol 1987, 26 : 67-74.

177.Shear N. Diagnosing cutaneous adverse reactions to drugs. Arch Dermatol 1990, 126 : 94-7.

178.Shelley WB, Shelley ED, Talanin NY, Santoso-Pham J. Estrogen dermatitis. J Am Acad Dermatol 1995, 32 : 25-31.

179.Shiohara T, Nickoloff BJ, Sagawa Y, Gomi T, Nagashima M. Fixed drug eruption. Expression of epidermal keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Arch Dermatol 1989, 125 : 1371-6.

180.Sigurdsson V, Toonstra J, Hezemans-Boer M, van Vloten WA. Erythroderma. A clinical and follow-up study of 102 patients, with special emphasis on survival. J Am Acad Dermatol 1996, 35 : 53-7.

181.Silber A, Newman W, Reimann KA, Hendricks E, Walsh D, Ringler DJ. Kinetic expression of endothelial adhesion molecules and relationship to leukocyte recruitment in two cutaneous models of inflammation. Lab Invest 1994, 70 : 163-75.

182.Silva R, Machado A, Brandao M, Goncalo S. Patch test diagnosis in carbamazepine erythroderma. Contact Dermatitis 1982, 8 : 283-4.

183.Silviu-Dan F, Mc Phillips S, Warrington R. The frequency of skin test reactions to side-chain penicillin determinants. J Allergy Clin Immunol 1993, 91 : 694-701.

184.Singer KH, Tuck DT, Sampson HA, Hall RP. Epidermal keratinocytes express the adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1 in inflammatory dermatoses. J Invest Dermatol 1989, 9 : 746-50.

185.Smoller BR, Luster AD, Krane JF, Krueger J, Gray MH, Mc Nutt NS, Hsu A, Gottlieb AB. Fixed drug eruptions : evidence for a cytokine-mediated process. J Cutan Pathol 1991, 18: 13-9.

186.Streifler J, Dux S, Garty M, Rosenfeld J. Recurrent pericarditis : a rare complication of influenza vaccination. Br Med J 1981, 283 : 526-7.

187.Strunk D, Egger C, Leitner G, Hanau D, Stingl G. A skin homing molecule defines the Langerhans cell progenitor in human peripheral blood. J Exp Med 1997, 185 : 1131-6.

188.Tagami H, Tatsuta K, Iwatski K, Yamada M. Delayed hypersensitivity in ampicillin-induced toxic epidermal necrolysis. Arch Dermatol 1983, 119 : 910-3.

189.Tedder T, Matsuyama T, Rothstein D, Schlossman SF, Morimoto C. Human antigen-specific memory T cells express the homing receptor (LAM-1) necessary for lymphocyte recirculation. Eur J Immunol 1990, 20 : 1351-5.

190.Teraki Y, Moriya N, Shiohara T. Drug-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 on lesional keratinocytes in fixed drug eruption. Am J Pathol 1994, 145 : 550-60.

191.Theodorou I, Bigorne C, Delfau MH, Lahet C, Cochet G, Vidaud M, Raphael M, Gaulard P, Farcet JP. VJ rearrangements of the TCR γ locus in peripheral T-cell lymphomas : analysis by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. J Pathol 1996, 178 : 303-10.

192.Thivolet J, Schmitt D. The Langerhans cell. John Libbey Eurotext and Inserm ed., Paris, 1988 : pp 492 .

193.Todd P, Halpern S, Munro DD. Oral terbinafine and erythema multiforme. Clin Exp Dermatol 1995, 20 : 247-8.

194.Tomb RR, Lepoittevin JP, Espinassouze F, Heid E, Foussereau J. Systemic contact dermatitis from pseudoephedrine. Contact Dermatitis 1991, 24 : 86-8.

195.Tomb R, Grosshans E, Defour E, Heid E. Allergic skin reaction to tetrazepam detected by patch testing. Eur J Dermatol 1993, 3 : 116-8.

196.Tone T, Nishioka K, Kameyama K, Asai T, Takezaki S, Nishiyama S. Common histopathological processes of phenytoin drug eruption. J Dermatol 1992, 19 : 27-34.

197.Torres MJ, Gonzalez FJ, Mayorga C, Fernandez M, Juarez C, Romano A, Blanca M. IgG and IgE antibodies in subjects allergic to penicillins recognize different parts of the Penicillin molecule. Int Arch Allergy Immunol 1997, 113 : 342-4.

198.Tramaloni S, Castanet J, Chichmanian RM, Lacour JP, Ortonne JP. Erythème polymorphe sévère au cours d'un traitement par terbinafine. Thérapie 1995, 50 : 594-5.

199.Tréchot Ph, Gillet P, Gay G, Hanesse B, Netter P, Castot A, Larrey D. Incidence of hepatitis induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). Ann Rheum Dis 1996, 55 : 936.

200.Troost RJJ, Van Parys JAP, Hooijkaas H, van Joost T, Benner R, Prens EP. Allergy to carbamazepine : parallel in vivo and in vitro detection. Epilepsia 1996, 37 : 1093-9.

201.Truchetet F, Grosshans E, Brandenburger M. Les tests cutanés dans l'allergie médicamenteuse endogène. Ann Dermatol Vénéréol 1987, 114 : 989-97.

202.Vaillant L, Camenen I, Lorette G. Patch testing with carbamazepine : reinduction of an exfoliative dermatitis. Arch Dermatol 1989, 125 : 299.

203.Varki A. Selectin ligands. Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91 : 7390.

204.Vautrin D-A, Janot C, Pupil P. Diagnostic biologique des allergies médicamenteuses par le test de Shelley et le test de transformation lymphoblastique. Rev Fr Allergol 1971, 11 : 329-46.

205.Vega JM, Blanca MM, Carmona MJ *et coll.* Delayed allergic reactions to beta-lactams. Allergy 1991, 46 : 154-7.

206.Vega J, Blanca MM, Carmona MJ, Claros A, Juarez C, Moya MC. Immediate allergic reactions to amoxicillin. Allergy 1994, 49 : 317-22.

207.Vessal S, Kravis L. Immunologic mechanisms responsible for adverse reactions to routine immunizations in children. Clin Pediatr 1976, 15 : 688-96.

208.Vial T, Laine V, Delcombel M, Goubier C, Galland Mc, Mallaret M, Descotes J. Vascularite consécutive à la vaccination antigrippale. A propos de cinq cas. Thérapie 1990, 45 : 509-12.

209.Vidal C, Tome S, Fernandex-Redondo V, Tato F. Systemic allergic reaction to corticosteroids. Contact Dermatitis 1994, 31 : 273-4.

210.Vidal E, Gaches F, Berdah JF, Nadalon S, Lavignac C, Mitrea L, Loustaud-Ratti V, Liozon F. Vascularite après vaccin antigrippal. Rev Med Interne 1993, 14 : 1173.

211.Vigan M, Adessi B, Girardin P, Vuitton D, Laurent R. Réactions d'eczéma après un vaccin DTPolio. Lettre du GERDA 1990, 7 : 34.

212.Villada G, Roujeau J-C, Clerici T, Bourgault I, Revuz J. Immunopathology of toxic epidermal necrolysis. Keratinocytes, HLA-DR expression, Langerhans cells, and mononuclear cells : an immunopathologic study of five cases. Arch Dermatol 1992, 128 : 50-3.

213.Visa K, Kayhko K, Stubb S, Reitamo S. Immunocompetent cells of fixed drug eruption. Acta Derm Venereol 1987, 67: 30-5.

214.Voorhorst R, Sparreboom S. The use of stereoisomers in patch testing. Ann Allergy 1980, 45 : 100-3.

215.Warrington R, Silviu-Dan F, Magro C. Accelerated cell-mediated immune reactions in penicillin allergy. J Allergy Clin Immunol 1993, 92 : 626-8.

216.Wattiaux M, Moulonguet-Doleris L, Cabane J, Lebas J, Imbert JC. Purpura rhumatoïde après vaccination antigrippale. Presse Med 1988, 17 : 649-50.

217.Weisse M, Bass J. Tetanus toxoid allergy. J Am Med Assoc 1990, 264 : 2448.

218.Wharton C, Pietroni R. Polyarteritis after influenza vaccination. Br Med J 1974, 2 : 331-2.

219.White S, Bowen-Jones D. Toxic epidermal necrolysis induced by terbinafine in a patient on long-term anti-epileptics. Br J Dermatol 1996, 134 : 188-9.

220.Whittam LR, Hay RJ, Hughes RAC. Eczematous reactions to human immune globulin. Br J Dermatol 1997, 137 : 467-84.

221.Wickern GM, Nish WA, Bitner AS, Freeman TM. Allergy to beta-lactams : a survey of current practices. J Allergy Clin Immunol 1994, 94: 725-31.

222.Wolf R, Elman M, Brenner S. Drug-induced " intertrigo ". Int J Dermatol 1993, 32 : 515-6.

223.Wolkenstein P, Chosidow O, Fléchet M-L, Robbiola O, Paul M, Dume L, Revuz J, Roujeau JC. Patch testing in severe cutaneous adverse drug reactions, including Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. Contact Dermatitis 1996, 35 : 234-6.

224.Wolkenstein P, Chosidow O. Toxidermies médicamenteuses. Rev Prat 1997, 47 : 327-33.

225. Zollner TM, Röder C, Werner RJ, Diehl S, Kaufmann R. Cellular allergen stimulation test in the diagnosis of intolerance to non-steroidal antiinflammatory drugs. Eur J Dermatol 1997, 7 : 377-8.

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

SCD-UHP - NANCY 1 BIBLIOTHÈQUE MÉDECINE

Table des Matières

INTRODUCTION....2
ETAT DE LA QUESTION....6
CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES TOXIDERMIES....7
Prurit....7
Urticaires et Oedème de Quincke....8
Exanthèmes maculo-papuleux (EMP)....8
Erythème pigmenté fixe....9
Erythème polymorphe, syndrome de Stevens-Johnson et syndrome de Lyell....10
Pustulose aiguë exanthématique généralisée....11
Vasculites d'hypersensibilité médicamenteuse....11
Syndrome d'hypersensibilité....12
Réactions eczémateuses, érythrodermies....12
Photoallergie médicamenteuse....13
Syndrome Babouin....13
DIFFÉRENTES CELLULES IMMUNOCOMPÉTENTES ENTRENT EN JEU DANS LE SALT....16
Les kératinocytes....16
Les cellules dendritiques présentatrices d'antigène et cellules de Langerhans....16
Les lymphocytes T....17
Les lymphocytes B....18
Les granulocytes....18
Les cellules endothéliales....18
Les mécanismes immunologiques d'hypersensibilité cellulaire retardée:....19
Autres mécanismes....19
CARACTERISTIQUES IMMUNOLOGIQUES GENERALES DES TOXIDERMIES....23
Relation entre les facteurs immuno-allergiques et non immunologiques impliqués dans la physiopathologie des toxidermies....23
Antigènes impliqués dans les toxidermies....24
Reconnaissance des antigènes sensibilisants par les lymphocytes T....26
Activation lymphocytaire T....26
CARACTERISTIQUES IMMUNOLOGIQUES DE TOXIDERMIES SPECIFIQUES....31
Urticaire, oedème de Quincke, réactions anaphylactiques....31
Erythème polymorphe, syndrome de Stevens-Johnson, syndrome de Lyell et toxidermies bulleuses....31
Exanthème maculo-papuleux....33
Erythème pigmenté fixe....35
PATIENTS....41
METHODES....43
Analyse clinique des toxidermies - Tests cutanés médicamenteux - Imputabilité médicamenteuse....43
Données cliniques....43
Chronologie des prises médicamenteuses....43
L'évolution clinique immédiate....44
Examens complémentaires biologiques....44
Examen anatomo-pathologique et immuno-histologique de la biopsie cutanée de toxidermie....45
Bilan dermato-allergologique....45

Tests épicutanés (Patch-tests) aux médicaments(s). 45
Les Prick-tests médicamenteux : 47
Les intradermo-réactions (IDR) médicamenteuses : 48
Tests immunologiques in vitro 54
Tests non spécifiques réalisés durant la phase toxidermique 54
Complexes immuns circulants 54
Principe 54
Méthode 54
Test au PEG 54
Test de fixation du C1q 55
Etude des sous-populations lymphocytaires 55
Principe 55
Méthode 55
Tests spécifiques : tests médicamenteux in vitro 57
Test de dégranulation des basophiles humains (TDBH) 57
Principe 57
Méthode 57
Test d'activation lymphocytaire (TAL) 58
Principe 58
Méthode 59
Critères d'imputabilité 60
Etudes immunologiques des toxidermies 61
Présentation antigénique, adhésion et apoptose *in situ* dans les toxidermies. 61
Immunophénotypage in situ des cellules immunocompétentes impliquées dans les toxidermies. 61
Kératinocytes 61
Cellules dendritiques présentatrices d'antigène (CPA) 61
Lymphocytes 61
Endothéliocytes 62
Etude de l'apoptose 62
Technique d'immunofluorescence indirecte 64
Clonalité des cellules lymphoïdes T infiltrantes dans les toxidermies. 64
Méthode 65
Extraction d'ADN 65
Amplification des gènes Vγ et J du TCR par PCR. 65
Analyse des fragments VJ amplifiés par DGGE. 66
Etude de CD62L épidermique 66
Détermination de la masse moléculaire de l'antigène reconnu par le CD62L sur les kératinocytes par précipitation et Western-Blot. 66

PREMIERE ETUDE : RÔLE DE L'HYPERSENSIBILITÉ CELLULAIRE RETARDÉE ET EXPRESSION DES MOLÉCULES D'ADHÉSION DANS LES EXANTHÈMES MACULO-PAPULEUX INDUITS PAR L'AMOXICILLINE 68
OBJECTIFS ....
MATÉRIEL ET MÉTHODES 70
Patients 70
Tests cutanés effectués a distance de la survenue de la toxidermie. 71
Tests cutanés 71

RESULTATS 72
COMMENTAIRES ET CONCLUSION 78

DEUXIEME ETUDE : INTERET DES TESTS CUTANES MEDICAMENTEUX DANS LE DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE DES TOXIDERMIES, EVALUE PAR UNE ETUDE PROSPECTIVE. 79
OBJECTIFS : 80
MATERIEL ET METHODES 80
Patients 80
Tests épicutanés 81
Prick tests 82
Tests intradermiques 82
Conservateurs, colorants et excipients médicamenteux 83
Témoins négatifs 83
Statistiques 84
RESULTATS 84
Tests épicutanés 84
Prick tests 85
Analyses statistiques 87
CONCLUSION 93

TROISIEME ETUDE : EXPLORATIONS IMMUNO-ALLERGOLOGIQUES DANS UN CAS D'ERYTHEME POLYMORPHE INDUIT PAR LE LAMISIL ® 250 COMPRIMÉS 94
OBJECTIFS 95
OBSERVATION 95
Bilan Biologique : 96
Evolution : 96
Investigations immuno-allergologiques 96
RESULTATS 97
COMMENTAIRES 97

QUATRIEME ETUDE : SYNDROME BABOUIN INDUIT PAR LES VEINOGLOBULINES (IMMUNOGLOBULINES INTRAVEINEUSES) 100
OBJECTIFS 101
OBSERVATION 101
Examens complémentaires lors de la toxidermie 102
Investigations immuno-allergiques 103
Tests cutanés 103
Western Blot avec les Sandoglobulines® 105
Technique 105
Résultats 106
COMMENTAIRES 106
CONCLUSION 114

CINQUIEME ETUDE : CELLULES IMMUNOCOMPETENTES, MOLECULES D'ADHESION, APOPTOSE ET CLONALITE DANS 14 CAS DE TOXIDERMIES INDUITES PAR LES ANTIBIOTIQUES. 115
OBJECTIFS 116

MATERIEL ET METHODES 116
Population 116
Histologie et immunohistologie 117
Détermination de la masse moléculaire du CD62L épidermique 117
Apoptose dans les toxidermies : expression de CD95 et Bcl2 118
Monoclonalité des lymphocytes T infiltrants dans les toxidermies 118
RESULTATS 119
Histologie et immunohistologie 119
Détermination de la masse moléculaire du CD62L épidermique 121
Expression de CD62L par les kératinocytes dans d'autres dermatoses 122
Apoptose dans les toxidermies : expression de CD95 et Bcl2 122
Kératinocytes 122
Lymphocytes 123
Monoclonalité des lymphocytes T infiltrants dans les toxidermies 123
DISCUSSION 124
CONCLUSION 127

SIXIEME ETUDE : REACTIVITE CELLULAIRE AUX MEDICAMENTS *IN VITRO* (TDBH ET TAL) 128
OBJECTIFS 129
MATERIEL ET METHODES 129
Population 129
RÉSULTATS 129
Sensibilité des TDBH et TAL 129
Témoins négatifs dans les TDBH et les TAL 130
Spécificité des TDBH et des TAL 130
Spécificité des TDBH 130
Spécificité des TAL 131
Bilan Immunitaire réalisé durant la phase toxidermique 133
CONCLUSION 136
ACCIDENTS CUTANES APRÈS VACCINATION 137
OBJECTIFS 138

SEPTIEME ETUDE : ACCIDENTS CUTANES APRÈS VACCINATION ANTI-GRIPPALE 139
VASCULITE APRES VACCINATION ANTI-GRIPPALE 140
Observation 140
Examens complémentaires 140
Evolution 141
COMMENTAIRES 141

HUITIEME ETUDE : INVESTIGATIONS IMMUNO-ALLERGOLOGIQUES DANS LES REACTIONS SECONDAIRES A LA VACCINATION ANTI-DIPHTERIE - TETANOS -POLIO 143
INTRODUCTION 144
MATERIEL ET METHODES 144
Cas cliniques 144
Méthode 146
Tests cutanés 146

Investigations immuno-allergologiques dans une toxidermie post-vaccinale due a l'anatoxine tétanique 147
RESULTATS 148
Tests cutanés 148
Investigations immuno-allergologiques dans une toxidermie post-vaccinale due a l'anatoxine tétanique 149
COMMENTAIRES 149

NEUVIEME ETUDE : INVESTIGATIONS IMMUNO-ALLERGOLOGIQUES DANS 5 CAS D'URTICAIRE OU D'OEDEME DE QUINCKE APRES VACCINATION ANTI-HEPATITE B 153
PATIENTS ET METHODES 154
Patients 154
Méthode 155
Examens biologiques lors de la survenue de l'urticaire 155
Bilan immuno-allergologique 155
RESULTATS 155
DISCUSSION 156

DISCUSSION GENERALE 160
INTÉRÊT DES TESTS MÉDICAMENTEUX CUTANÉS 161
INVESTIGATIONS IMMUNOALLERGIQUES DANS LES ACCIDENTS CUTANES APRÈS VACCINATION 168
MECANISMES IMMUNOLOGIQUES EN CAUSE DANS LES TOXIDERMIES 170
Immunophénotypage dans les toxidermies 170
Cellules dendritiques dans les toxidermies 170
Cellules T dans les toxidermies 171
Les cellules endothéliales 172
Molécules d'adhésion 173
Apoptose dans les toxidermies 174
TESTS MEDICAMENTEUX *IN VITRO* DANS LES TOXIDERMIES 175
Le défaut de spécificité de ces tests peut il être amélioré ? 178
La faible sensibilité et donc le problème de TAL faussement négatifs peuvent-ils être interprétés et améliorés ? 179
Bilans biologiques dans les toxidermies 180
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 182
REFERENCES 185

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

PUBLICATIONS SE RAPPORTANT A CE TRAVAIL

Ann. Dermatol. Venereol.,
1995, *122* : 129-138.

Mots-clés : Vaccination (réactions immunoallergiques).
Key-words: Vaccination. Immunisation (adverse reactions).

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

RÉACTIONS IMMUNO-ALLERGIQUES CUTANÉES DUES AUX VACCINS

A. BARBAUD*[1], J. L. SCHMUTZ*, J. M. MOUGEOLLE*[1]

DÉFINITION DE LA VACCINATION

L'objectif de la vaccination est de fournir une immunité efficace en faisant apparaître des taux appropriés d'anticorps et une population de cellules sensibilisées susceptibles de se développer rapidement lors d'un nouveau contact avec l'antigène.

Nous insistons d'emblée sur le caractère exceptionnel des accidents post-vaccinaux et sur le fait qu'ils ne remettent absolument pas en question l'intérêt et la nécessité des vaccinations.

GÉNÉRALITÉS (1-7)

Différents types de vaccins

Vaccins bactériens entiers.

Ces vaccins sont constitués de bactéries entières tuées (inactivées) ou vivantes atténuées. Les vaccins bactériens tués sont ceux de la coqueluche, typhoïde, choléra. Le BCG est un vaccin bactérien atténué (*Mycobacterium tuberculosis bovis* = bacille de Calmette et Guérin).

Vaccins viraux entiers.

Ces vaccins contiennent des virus entiers tués (inactivés) ou atténués.

Les *vaccins viraux tués* comprennent ceux de la poliomyélite (forme injectable), la grippe, la rage et l'hépatite A. Les *vaccins viraux vivants* sont la poliomyélite (forme orale), la rougeole, la rubéole, les oreillons et la fièvre jaune. Ces vaccins sont contre-indiqués en cas d'immunosuppression ou lors de la grossesse mais compte tenu de la gravité de certaines maladies virales survenant chez les sujets VIH positifs, certaines de ces vaccinations sont pourtant discutées chez les enfants séropositifs (8).

Vaccins à fraction antigénique.

Les *vaccins polysaccharidiques* comportent des fractions de capsules des bactéries : pneumocoques, méningocoques, *Haemophilus influenzae* B, polyoside capsulaire Vi purifié de *Salmonella typhi* (vaccin *Typhi* Vi Merieux®). Dans les vaccins anti-*Haemophilus influenzae* B, les polysaccharides sont couplés à des porteurs : protéine tétanique dans le HIBest Pasteur® utilisé en France, *Neisseria meningitidis* ou protéine diphtérique dans d'autres vaccins.

Les vaccins contre l'hépatite B sont de type *lipoprotéique* et contiennent l'antigène d'enveloppe du virus de l'hépatite B (antigène HBs), soit provenant du plasma humain de porteurs sains de l'antigène HBs (vaccin Hevac B Pasteur®), soit obtenu par clonage (vaccin Engerix® Smith Kline Beecham, GenHevac B Pasteur®). Dans ces deux derniers vaccins, les cellules ou organites servant de vecteur de l'antigène HBs sont différents. Il s'agit du *Saccharomyces cerevisiae* (levure de bière) pour la préparation du vaccin Engerix B® et des cellules CHO pour le GenHevac B®.

Les vaccins antitétaniques et antidiphtériques sont de type anatoxinique. Les exotoxines bactériennes après traitement par formaldéhyde sont rendues atoxiques sans que soient détruits les déterminants antigéniques immunogènes majeurs. Ce sont alors des anatoxines.

Autres produits pouvant être retrouvés dans les vaccins.

Outre les substances vaccinales, d'autres produits peuvent être retrouvés dans les vaccins et sont donc susceptibles de se comporter en allergènes.

Les *conservateurs* utilisés sont le thiomersal, le formaldéhyde, le 2-phénoxyéthanol et le phénol. Parmi les *excipients,* citons dans le BCG, la présence éventuelle de dextran, de glutamate ou de gélatine. L'hydroxyde d'aluminium est un adjuvant qui augmente la réponse immunitaire aux anatoxines ou à l'antigène HBs (Ag HBs). Certains contaminants sont liés au *milieu de culture* utilisé pour la préparation des souches vaccinales. Les vaccins préparés sur milieu à l'œuf ou sur cellules embryonnées de poulet sont ceux dirigés contre les oreillons, la rougeole, la fièvre jaune et la grippe. Enfin, certains vaccins sont passés sous flux *d'antibiotiques* : néomycine, kanamycine, streptomycine ou polymyxine B.

Classification des effets indésirables liés aux vaccins (3)

Réactions post-vaccinales simples.

Il s'agit de manifestations fréquentes, inflammatoires, au point d'injection du vaccin qui cèdent en général en 48 heures. Elles peuvent s'associer à une fièvre. Dans le cas du vaccin anti-rougeole-oreillons-rubéole (ROR), on peut

* Service de Dermatologie, Hôpital Fournier, 36, quai de la Bataille, F 54035 Nancy Cedex.
1. Membre du GERDA.
Tirés à part : A. Barbaud, à l'adresse ci-dessus.

observer un exanthème syndromique fugace de type morbilliforme ou rubéoliforme.

Accidents post-vaccinaux mineurs.

Plus rares et spontanément résolutifs, ils peuvent reproduire à minima la maladie contre laquelle le vaccin est destiné (parotidite ou orchite après vaccination contre les oreillons).

Accidents post-vaccinaux majeurs.

Ils sont rares. Il peut s'agir de manifestations *locales* au point d'injection de type phénomène d'Arthus ou régionales comme la lymphadénite suppurée après BCG. Les accidents plus sévères sont soit *neurologiques* comme les convulsions du vaccin anti-coquelucheux ou la poliomyélite induite soit *immuno-allergiques*. Ces dernières peuvent, par exemple, se présenter sous la forme de réactions anaphylactiques, d'exanthèmes maculo-papuleux, de vasculite allergique ou d'érythème polymorphe (7).

Mécanismes immunologiques des réactions cutanées post-vaccinales

Certaines de ces réactions sont probablement déclenchées par une sensibilisation à un des composants du vaccin : composé vaccinal, excipient, conservateur, adsorbant, contaminant. L'hyper-immunisation spécifique est également responsable de certains effets secondaires post-vaccinaux. En témoignent la plus grande fréquence des accidents immuno-allergiques après BCG thérapie dans les traitements anticancéreux par rapport à ceux rapportés après simple vaccination par le BCG, la fréquence des intolérances aux vaccins anti-diphtériques ou anti-pneumococciques chez les sujets hyperimmunisés.

Outre ces réactions immunitaires spécifiques il nous apparaît aux vues de la littérature qu'un certain nombre de manifestations post-vaccinales résultent de réactions immunitaires non spécifiques des composants de la solution vaccinale en particulier en cas d'hyper-immunisation. Après vaccination une stimulation non spécifique de l'immunité cellulaire est possible comme en témoignent des observations de rejet de greffe cornéenne après vaccination anti-grippale ou anti-tétanique et l'utilisation du BCG comme stimulant de l'immunité cellulaire en cancérologie. Une stimulation non spécifique de l'immunité humorale est également possible puisque la vaccination anti-grippale peut induire de fausses positivités transitoires des tests par technique ELISA à la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-HTLV1 ou anti-hépatite C (9). Récemment la vaccination anti-hépatite B a été imputée dans l'apparition d'anticorps anti-ADN (10).

Dans d'autres cas enfin, les vaccins paraissent jouer le rôle d'adjuvants dans le déclenchement de réactions de type vascularite comme après vaccination anti-grippale (11) ou anti-pneumococcique.

VACCINS BCG (1, 12-23)

Quatre vaccins sont actuellement commercialisés en France. Les deux BCG (Pasteur) pour injection intradermique et scarification contiennent du glutamate. Le vaccin tuberculeux lyophilisé à usage intradermique Mérieux® et le Monovax bague Mérieux® contiennent du Dextran.

Réactions locales ou présumées infectieuses (1, 6, 12, 13)

Au point d'injection, peuvent être observés des chéloïdes, abcès sous-cutanés, ulcérations, réactions inflammatoires et quelques cas d'eczéma (6, 12).

La lymphadénite suppurée survenant trois à six semaines ou de façon plus retardée (un cas après 12 ans) après le BCG, survient dans 0,1 à 4,3 p. 100 des cas/100.000 doses injectées. Il ne s'agit pas d'une réaction allergique mais d'un problème infectieux dû au bacille vaccinal. Elle est au mieux, évitée en respectant la dose de 0,05 cm^3 injectée (13).

La granulomatose généralisée par le BCG survient dans moins de 0,1 cas/100.000 doses vaccinales. Elle est surtout observée sur les terrains immuno-déprimés et lors de BCG-thérapie où elle peut être létale. Des atteintes hépatiques et pulmonaires granulomateuses peuvent s'y associer. Le fait que les cultures des biopsies cutanées soient le plus souvent négatives, que le traitement antituberculeux soit inefficace mais que certains patients réagissent à la corticothérapie générale, laisse supposer qu'il ne s'agit pas d'une infection généralisée par le BCG mais d'une réaction immunitaire contre le bacille vaccinal (4).

Réactions immuno-allergiques

Il existe une soixantaine de cas publiés de *lupus vulgaires* (15-17) s'observant surtout après revaccination par le BCG (15). Sa fréquence est estimée à 5 cas par million de doses (16). Il se développe quelques mois à 3 ans après la vaccination avec un cas extrême survenu 30 ans après le BCG (16). Dans une observation, son développement est associé à la survenue d'une vasculite urticarienne (15). Sa physiopathologie est mal connue, il s'agirait pour certains d'une hyper-immunisation cellulaire vis-à-vis du bacille après sensibilisation préalable, qu'il s'agisse d'une vaccination antérieure par le BCG ou d'une tuberculose. Pour d'autres auteurs, bien que les cultures réalisées sur biopsie cutanée soient souvent négatives, sa survenue serait liée à la multiplication du bacille au point d'injection. La régression spontanée est de règle, en 3 mois environ. Les traitements par isoniazide ou rifampicine seuls ou associés à des anti-inflammatoires stéroïdiens ou non, accélèrent parfois la guérison.

Des *réactions anaphylactiques* sévères avec éventuellement choc, ont été rapportées de façon exceptionnelle (6). Le

cas de Rudin et coll. (18) est particulier puisqu'il s'agit d'un choc observé chez un nouveau-né âgé de 3 jours, 30 minutes après l'injection du BCG. La mère de l'enfant était sensibilisée au dextran et le BCG utilisé en contenait. Cette réaction pourrait être liée à la présence de complexes immuns circulants composés d'IgG anti-dextran et de dextran, les IgG anti-dextran provenant d'un passage transplacentaire.

D'exceptionnels cas d'*urticaire* sont également rapportés, dont certains récidivant après chaque injection (19). Dans le cas de Misery et coll. (15), un lupus vulgaire et une vasculite urticarienne apparaissent un mois après le BCG. Les deux types de lésions régressent très rapidement après mise en route d'un traitement par rifampicine et isoniazide. Un *syndrome de Sweet* (20) est suvenu 15 jours après une injection de BCG trop dosé (0,08 ml) associé à un nodule ulcéré au point d'injection. La mise sous iodure de potassium entraîne en 48 heures une régression spectaculaire de l'ensemble des signes y compris celle du nodule au point d'injection.

La revue de la littérature a permis de retrouver un cas de vasculite pustuleuse cutanéo-muqueuse avec *pyoderma gangrenosum* et diarrhée (21), quelques cas d'érythème polymorphe (22). Deux observations de dermatomyosite chez des garçons de 14 et 12 ans, respectivement 1 mois et 3 mois après une vaccination par le BCG sont discutables quant à l'imputabilité de la vaccination. Selon les auteurs, le BCG aurait induit une stimulation de l'immunité cellulaire favorisant le développement de la dermatomyosite (23).

VACCINS ANTI-DIPHTÉRIQUE, TÉTANOS, POLIOMYÉLITE, COQUELUCHE (1-4, 6, 24-35)

Vaccins anti-poliomyélitiques (1, 6)

Deux vaccins sont actuellement commercialisés en France, une forme buvable (Mérieux) comportant 3 souches de virus vivants atténués, une forme injectable (Mérieux) avec 3 souches de virus vivants inactivés où sont signalées des traces d'antibiotiques (1, 5). Quelques cas d'urticaire ont été rapportés avec la vaccination par voie orale.

Vaccin anti-diphtérique (1, 6)

Il n'existe pas actuellement en France de vaccin commercialisé comportant exclusivement l'anatoxine diphtérique. Dans les vaccins associés qui la comportent, l'anatoxine est adsorbée sur hydroxyde d'aluminium. Exceptionnellement après cette vaccination ont été rapportés des cas d'urticaire généralisée, d'œdème de Quincke (6).

Vaccin antitétanique

Deux vaccins comportant exclusivement l'anatoxine tétanique sont actuellement commercialisés en France : le Tétavax® (Mérieux) et le vaccin antitétanique Pasteur® qui contiennent tous deux de l'hydroxyde d'aluminium et du thiomersal. Les réactions inflammatoires locales surviennent dans environ 2,5 p. 100 des cas (24, 25), elles représentent 33,6 p. 100 des effets secondaires (24) et seraient outre le problème des granulomes à l'hydroxyde d'aluminium, plus souvent dues à l'anatoxine qu'au thiomersal.

Jacobs et coll. (24) ont analysé 740 cas d'effets secondaires après vaccination par l'anatoxine tétanique. Parmi ces effets secondaires, sont notés des fièvres (15,3 p. 100 des cas), troubles digestifs, arthralgies (1 p. 100 des cas). Treize pour cent des effets secondaires sont allergiques, ils surviennent surtout après une deuxième injection. Il s'agit d'urticaire généralisée, œdème de Quincke, dyspnée, asthme, éternuements, prurit nasal ou oculaire, exanthème non spécifique (5,2 p. 100 des effets secondaires), vésicules ou urticaire au point d'injection.

Vaccin anti-coquelucheux (1, 5)

Le Vaxicoq® (Mérieux) comporte *Bordetella pertussis* inactivé par la chaleur, adsorbé sur hydroxyde d'aluminium; le conservateur est le thiomersal. La fréquence des réactions anaphylactiques est estimée à 1 cas pour 10.000 à 20.000 injections (1).

Vaccins mixtes antidiphtérie et/ou tétanos et/ou poliomyélite (1, 6, 27, 28)

Ces vaccins entraînent des réactions locales dans 40 à 70 p. 100 des cas. La fréquence des réactions générales (encéphalopathie, choc anaphylactique) est estimée selon les séries de 0 à 10,5 cas par million de doses. Après vaccination diphtérie-tétanos injectable et poliomyélite orale, un cas d'érythème polymorphe (27) et un cas d'eczéma (28) sont rapportés.

Vaccins antidiphtérie-tétanos-coqueluche (24, 29-33)

Les réactions immuno-allergiques et cutanées généralisées sont rares (29, 30). Les exanthèmes surviendraient dans 5,7 p. 100 des cas (24, 31). Denning et coll. (31) signalent la survenue exceptionnelle de dermatose exfoliative, eczéma, prurit, urticaire et dépigmentation cutanée. Sont également retrouvées dans la littérature des vascularites allergiques associant purpura et urticaire, une glomérulonéphrite et une vascularite généralisée létale, ces deux derniers cas survenant après des hyperimmunisations (32). Trois petites filles développent un eczéma ou des nodules au point d'injection de ces vaccins rapportés par les auteurs à une sensibilisation à l'aluminium bien qu'une enfant soit également sensibilisée au thiomersal et à la néomycine (33).

Conduite à tenir devant une suspicion d'allergie à ces vaccins

Aucun protocole de test n'a prouvé sa sensibilité. Ces tests apparaissent peu prédictifs.

Dans la plupart des cas retrouvés dans la littérature, l'agent causal de la réaction immuno-allergique provoquée

par ces vaccins, n'est pas recherché ou précisé. Selon Hansson et coll. (26), dans les vaccins antitétaniques l'agent responsable serait plus souvent l'anatoxine que le conservateur (thiomersal).

Nous n'avons pas retrouvé de cas avec test épicutané positif au vaccin complet. Dans le cas de Vigan et coll. (28), le prick-test au DT-polio complet est négatif en lecture immédiate, mais siège d'une éruption eczématiforme vésiculeuse à 24 heures. Les intra-dermoréactions (IDR) avec les vaccins contenant des anatoxines, selon certains, sont *uninterprétables*, car provoqueraient 100 p. 100 de réactions positives non significatives (7, 34). Le seul protocole d'investigations réalisé sur 740 sujets est celui proposé par Jacobs et coll. (24) par *voie sous-cutanée* avec un vaccin diphtérie-tétanos dilué au 1/10e, puis avec le vaccin pur. Cet auteur a également pu tester la toxine tétanique pure non adsorbée en IDR. Quatre-vingt-quatorze des 95 sujets ayant présenté des réactions de type anaphylactique après vaccination diphtérie-tétanos ont eu des tests négatifs, ils n'ont d'ailleurs présenté aucun effet secondaire après revaccination ! Un sujet ayant présenté une urticaire après vaccination a eu des tests positifs mais a pu être revacciné sans problème.

Conduite à tenir.

Devant l'absence de protocole de tests, face à un patient suspect d'avoir présenté une réaction allergique à l'un de ces vaccins, il nous paraît important de respecter les règles suivantes :

— s'assurer de la nécessité de la vaccination, il est en effet possible de doser les *anticorps protecteurs* du sujet. S'ils sont présents, la vaccination est inutile;

— choisir des vaccins comportant un conservateur différent de celui ou ceux présents dans l'injection suspectée;

— utiliser des produits ne comportant qu'un agent vaccinal plutôt que des associations vaccinales qui sont plus réactogènes;

— injecter par voie intra-musculaire, ce qui entraînerait moins d'effets secondaires que la voie sous-cutanée;

— revacciner sous surveillance hospitalière en commençant par une dose d'essai faible : 0,15 ml du vaccin dilué au 1/10e (35) et en cas d'absence de réaction, compléter la dose 10 jours plus tard.

VACCINATION ANTI-GRIPPALE (1, 4, 6, 11, 36-48)

Les vaccins anti-grippaux contiennent trois souches de virus cultivés sur milieu à l'œuf embryonné et inactivés par le formol. La vaccination anti-grippale est en général bien tolérée (36). Elle peut entraîner des réactions locales, exceptionnellement des réactions anaphylactiques et surtout une vasculite allergique. Selon les 16 cas (37-46) analysés dans la littérature ces vasculites surviennent dans les deux semaines qui suivent une primo ou une revaccination. Elles associent un purpura infiltré pouvant être nécrotique (12 cas), une urticaire (2 cas), des polyarthralgies (12 cas), des myalgies (6 cas), des troubles digestifs (5 cas), une fièvre (4 cas), une atteinte rénale (5 cas), une neuropathie, une péricardite, une pneumopathie ou une névrite optique. La biopsie cutanée retrouve une vasculite leucocytoclasique, une immunofluorescence directe parfois positive avec dépôts d'IgA vasculaires. Notons qu'outre ces vasculites *de novo*, dans deux observations (11, 47) la vaccination anti-grippale a entraîné la réactivation d'une vasculite pré-existante dont un purpura rhumatoïde. La physiopathologie de la rechute de ces vasculites est inconnue. La symptomatologie, les investigations immunologiques suggèrent l'existence d'un mécanisme à complexes immuns circulants. L'observation de rechute de la vasculite avec deux types de vaccins aux excipients différents suggère que la souche vaccinale a une responsabilité. Si ces cas ne remettent pas en question l'utilité de la vaccination anti-grippale, elle incitent à proposer une extrême prudence dans sa prescription chez les sujets ayant des antécédents, même anciens, de vasculite. La survenue d'une vasculite post-vaccinale contre-indique formellement la poursuite de la vaccination anti-grippale. Une observation récente de réactivation d'une pemphigoïde bulleuse est rapportée par Bodokh et coll. (48).

VACCINS ANTI-HÉPATITE A OU B (1-4, 6, 10, 49-68)

Trois vaccins anti-hépatite B comportant l'antigène HBs sont actuellement commercialisés en France. L'Hevac B®, le vaccin recombinant Gen Hevac B® contiennent comme conservateur le formaldéhyde. L'Engerix B® est un vaccin recombinant, préparé sur *Saccharomyces cerevisiae* ayant pour conservateur le thiomersal. Un vaccin vivant inactivé protégeant contre l'hépatite A vient d'être commercialisé en France : il s'agit de l'Havrix® qui doit être injecté par voie intra-musculaire dans le deltoïde. Ces quatre vaccins sont tous adsorbés sur hydroxyde d'aluminium ou oxyde d'aluminium pour l'Engerix B®.

EFFETS INDÉSIRABLES

Ils concernent les vaccins anti-hépatite B pour lesquels les réactions secondaires les plus fréquentes sont des réactions locales transitoires. Les réactions générales sont rares et surviennent dans moins de 1 p. 100 des cas.

Mac Mahon et coll. (49) n'observent que 39 effets secondaires après injection de 101.360 doses réalisées chez 43.618 personnes, 68 p. 100 de ces effets secondaires surviennent dès la première dose vaccinale. Ils rapportent quelques cas de myalgies-arthralgies, urticaires, exanthèmes, un phénomène d'Arthus. Il existe d'autres observations de purpura thrombopénique (50), d'urticaires localisées (51) ou généralisées (49, 52). Quelques cas d'érythème polymorphe sont signalés (53-55), leur risque de survenue, en moyenne

4 jours après la vaccination, serait de 0,7 pour 100.000 doses (54). Trois cas d'érythème noueux sont rapportés dont deux récidivant après une nouvelle injection vaccinale anti-hépatite B (56-58). Un cas de périartérite noueuse (PAN) apparue 4 mois après un vaccin anti-hépatite B, si elle est intéressante sur le plan théorique puisque la PAN peut-être associée à la présence d'une sérologie positive d'hépatite B, est discutable quant à l'imputabilité du vaccin dans la survenue de la maladie (59). Le lien entre hépatite B et lichen plan est discuté dans la littérature, or des cas de lichen plan survenus après vaccin anti-hépatite B ont été observés (60-62). Dans un lupus érythémateux disséminé survenu deux semaines après l'injection d'Engerix B®, la vaccination aurait été un facteur précipitant au déclenchement de la maladie auto-immune (63). Récemment une observation d'hépatite avec anticorps anti-ADN natif a été décrite (10). Un exanthème maculopapuleux avec syndrome de Raynaud et pneumopathie, révélateurs d'une vascularite, sont survenus après cette vaccination (64). Enfin, deux observations de syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter avec atteinte articulaire prédominante ont été rapportées (65).

Conduite à tenir devant une allergie a ces vaccins

L'interprétation des tests ou l'agent causal de la réaction immuno-allergique rapportée sont rarement discutés. Les granulomes au point d'injection de Cosnes et coll. (66) sont dus à l'adsorbant (aluminium). Il existe incontestablement certaines observations où le thiomersal est en cause (67, 68).

Une patiente avec antécédents d'allergie alimentaire à des aliments comportant des moisissures, a présenté un choc anaphylactique dès la première injection d'Engerix B®. Les pricks positifs au vaccin et levures, ont permis d'imputer le *Saccharomyces cerevisiae* comme étant à l'origine de cette anaphylaxie (51).

Il n'existe pas de protocole de test à ces vaccins. Quelques cas de tests épicutanés positifs avec le vaccin pur sont observés dans des allergies à l'aluminium. Le prick-test avec le vaccin pur est positif dans l'observation de Brightman et coll. (51). Mac Mahon et coll. (49) ont testé 13 patients par IDR. Selon les auteurs, ce test n'est sensible que dans certaines manifestations comme les urticaires profondes et les phénomènes d'Arthus. Son caractère prédictif ne peut être précisé puisque les six patients testés positifs, n'ont pas été revaccinés.

Après une réaction à ces vaccins, l'absence d'infection par le virus de l'hépatite B antérieure à la vaccination, sera contrôlée par la réalisation d'une sérologie complète de l'hépatite B.

Outre les éventuels tests aux vaccins, il conviendra de tester les sels d'aluminium, les conservateurs en tests épicutanés. Le prick-test et le RAST au *Saccharomyces cerevisiae* pourront être réalisés. Si la revaccination est nécessaire, on utilisera un vaccin comportant un conservateur différent de celui présent dans la solution suspectée. Sous surveillance hospitalière, une dose d'essai (0,15 ml du vaccin au 1/10e) sera injectée puis la vaccination complétée 10 jours plus tard en cas de non réaction.

VACCINS ANTI-ROUGEOLE-OREILLONS-RUBÉOLE (1-4, 6, 69-84)

Vaccins et effets secondaires

Le vaccin anti-oreillons Imovax® est un vaccin viral vivant atténué, cultivé sur milieu à l'œuf embryonné de poule. Il provoque rarement des réactions locales, quelques cas d'exanthèmes ont été rapportés.

Le vaccin anti-rubéolique Rudivax® peut entraîner surtout en période post-pubertaire des réactions au point d'injection, être suivi d'un exanthème rubéoliforme, de fièvre et d'adénopathies.

Le vaccin anti-rougeoleux Rouvax® est composé d'un virus vivant atténué cultivé sur cellules d'embryon de poulet. Il peut entraîner une fièvre (15 p. 100 des cas), un exanthème morbilliforme (5 p. 100 des cas). Il existe des cas de réactions anaphylactiques pouvant être rattachés à cette vaccination (69, 70).

Trois vaccins comportent des associations : Rudi-Rouvax® contre la rougeole et la rubéole, ROR® et Trimovax® contre la rougeole, les oreillons et la rubéole. Ces trois vaccins comportent au moins une souche cultivée sur cellules embryonnées de poulet. Bien tolérées (71) outre les effets secondaires rapportés avec les vaccins non mixtes, ces associations ont comme principal effet secondaire grave, des réactions anaphylactiques. Leur fréquence de survenue est estimée à 71,6 réactions par million de doses injectées (72). Kalet et coll. (72) en ont trouvé 5 cas sur 2.789 doses vaccinales. La survenue de ces manifestations est extrêmement rapide après l'injection vaccinale, à type de dyspnée, asthme, cyanose, œdème du visage ou laryngé, urticaire ou choc anaphylactique (72-74). En dehors de ces réactions, signalons un cas de parapsoriasis en gouttes après ce type de vaccin (75).

Allergènes à l'origine des réactions anaphylactiques à ces vaccins

Tous ces vaccins peuvent contenir à l'état de traces, des antibiotiques dont la néomycine. Le vaccin MMR (Measles-mumps-rubella) utilisé aux États-Unis contient comme excipient de la gélatine. Une jeune femme avec antécédents d'allergie digestive aux gélatines, a présenté un choc anaphylactique immédiatement après une primo-vaccination par le MMR. Un bilan a mis en évidence des pricks-tests positifs au MMR et à différentes gélatines, des IgE anti-gélatines et anti-MMR (73).

Certaines allergies à ces vaccins sont dues à une sensibilisation aux protéines de l'œuf avec prick-test et/ou IDR positifs au vaccin et aux protéines de l'œuf, présence d'IgE anti-vaccin et anti-œuf, blocage de la fixation des IgE sur les protéines de l'œuf par adjonction de vaccin (76-77).

Il pourrait exister d'autres allergènes en cause dans ces réactions anaphylactiques. Dans les 6 cas d'anaphylaxie après vaccin MMR rapportés par Aukrust et coll. (69), les enfants ne sont pas allergiques à l'œuf, aucune protéine de l'œuf n'est retrouvée dans le vaccin, les RAST réalisés vis-à-vis des différents composants du vaccin fournis par le fabricant sont tous négatifs. Différentes hypothèses sont soulevées par ces auteurs soit la responsabilité de contaminants du vaccin, dont les antibiotiques, soit l'existence d'un mécanisme IgE indépendant.

Un cas d'anaphylaxie survenue chez un enfant atopique après un vaccin anti-rougeoleux non cultivé sur milieu à l'œuf, laisse également suspécter que des allergènes autres que les protéines de l'œuf peuvent être en cause dans les manifestations d'allergie immédiate observées avec ces vaccins (70).

Valeur des tests en cas de réaction allergique à ces vaccins

Nous n'avons pas retrouvé de cas de test épicutané positif à ces vaccins ou aux antibiotiques. Les prick-tests avec la solution vaccinale sont inconstamment positifs (69, 74, 76-78). Si les prick-tests sont négatifs, des IDR avec la solution vaccinale diluée ont été proposées avec plusieurs cas de positivité (76-78). La positivité des IDR dans un cas sur six d'anaphylaxie laisse penser qu'elles sont peu sensibles (69). Rappelons que les tests prédictifs à ces vaccins chez les atopiques sans sensibilisation à l'œuf ont été démontrés comme étant inutiles.

Conduite à tenir chez un sujet allergique à l'œuf (69, 76-84)

Les vaccins anti-oreillons, anti-rougeole, anti-fièvre jaune et anti-grippe contiennent des protéines de l'œuf.

Il est maintenant démontré que 95 à 97,5 p. 100 des enfants allergiques à l'œuf, ne font aucune réaction après vaccination anti-rougeole et/ou oreillons. Chez ces enfants la plupart des auteurs suivent le protocole proposé par Herman et coll. (76) *(fig. 1)* ou des schémas qui en découlent.

Dans ce protocole qui sera réalisé sous surveillance en milieu hospitalier, les prick-tests sont réalisés avec la solution vaccinale diluée au 1/100e et/ou au 1/10e et pure (69, 74, 76). L'IDR comporte une injection de 0,02 ml du vaccin au 1/100e. Pour certains auteurs en cas de négativité, une autre IDR est ensuite réalisée au 1/10e (82). Chez les sujets ayant des tests positifs, la revaccination est réalisée de la façon suivante : des injections de 0,05 ml du vaccin pur sont faites par voie sous-cutanée toutes les 20 minutes avec une surveillance étroite, car peuvent survenir des manifestations anaphylactiques (69). Certains proposent d'autres protocoles par injections sous-cutanées de 0,05 ml du vaccin dilué au 1/100e, puis de 0,05 ml du vaccin au 1/10e, puis de 0,05 ml du vaccin pur toutes les 20 minutes (84).

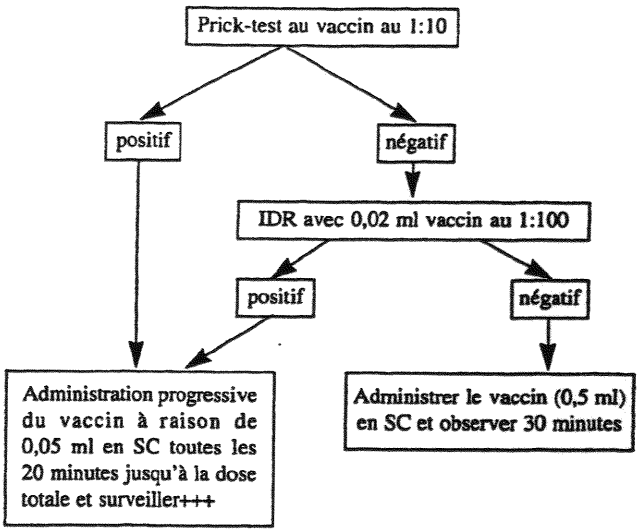


Fig. 1. — Protocole de vaccination anti-rougeole-oreillons-rubéole chez les sujets allergiques à l'œuf (D'après Herman et coll. (76)).

VACCINATION ANTI-*HAEMOPHILUS INFLUENZAE* B (1, 6, 85-90)

Le vaccin HIBest® et ACt HIB Mérieux® sont composés d'un polyoside (polymère de polyribosyl - ribitol phosphate : PRP) conjugué à la protéine tétanique (85). Dans d'autres pays, ce polyoside PRP peut être couplé à la toxine diphtérique (86) ou à *Neisseria meningitidis* (87). Le vaccin HIBest® est donc contre-indiqué en cas d'allergie prouvée à un vaccin antitétanique. En aucun cas la protéine tétanique contenue dans l'HIBest® ne peut remplacer la vaccination antitétanique (88).

Le vaccin couplé à la protéine tétanique paraît bien toléré avec surtout des réactions au point d'injection (85, 88) et rarement urticaire (89). Dans l'année qui a suivi la commercialisation d'un vaccin anti-*Haemophilus influenzae* B aux États-Unis ont été recensés 152 effets secondaires pour 24 lots de vaccins (1 lot correspond à 120.000 à 350.000 doses) (90). Certaines de ces réactions étaient allergiques et/ou cutanées : locales au point d'injection, anaphylactiques (2 cas), à type de maladie sérique (10 cas), urticaire (27 cas), érythème polymorphe, exanthème, purpura thrombopénique, dermatose exfoliative (2 cas). Les sujets déjà vaccinés contre le tétanos peuvent présenter un phénomène d'Arthus se manifestant par une réaction inflammatoire locale ou une poussée fébrile (88).

AUTRES VACCINS (1, 6, 91-100)

Les *vaccins anti-méningococciques* peuvent entraîner des exanthèmes maculo-papuleux (91). Les nouveaux vaccins, de troisième génération, contre *la rage* sont bien tolérés mais peuvent induire des urticaires (92).

Les premiers résultats obtenus avec les *vaccins anti-*

varicelle témoignent d'une bonne tolérance. Un exanthème modéré peut survenir après la vaccination chez 5 à 10 p. 100 des sujets vaccinés sains, mais chez 45 à 50 p. 100 des sujets immuno-déprimés. Chez ces derniers, ces exanthèmes peuvent être associés à des éruptions simulant la varicelle (93).

Le *vaccin anti-pneumococcique* entraîne des réactions au point d'injection dans 50 p. 100 des cas. D'exceptionnels cas d'anaphylaxie ou de pustulose exanthématique aigue sont signalés (94). La revaccination est contre-indiquée car elle entraîne très fréquemment des réactions de type phénomène d'Arthus, ou des glomérulonéphrites (95).

Le *vaccin anti-typhoïde* est à l'origine d'un cas de choc anaphylactique (96), d'un syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter (97), d'un granulome annulaire (98).

Le *vaccin anti-tick-borne encephalitis* (TBE), maladie transmise par les morsures de tique est un vaccin à virus inactivé cultivé sur cellules embryonnées de poulet, qui entraîne dans 10 à 25 p. 100 des cas des réactions locales modérées. Il aurait entraîné une augmentation de fréquence des tests épicutanés positifs au thiomersal lors de sa commercialisation en Autriche (99). Sur 4.000 Australiens vaccinés par le *vaccin anti-encéphalite japonaise*, 7 ont présenté des manifestations œdémateuses urticariennes ou non, des œdèmes de Quincke (100).

GRANULOMES DUS A L'HYDROXYDE D'ALUMINIUM (66, 101-111)

Certains vaccins sont adsorbés sur hydroxyde ou oxyde d'aluminium. Cet adsorbant peut provoquer des nodules douloureux prolongés au point d'injection. De nombreux cas sont décrits avec les vaccins anti-tétaniques, anti-diphtériques, anti-diphtérique-tétaniques et/ou anti-poliomyélitiques (101, 109), anti-hépatite B (66) ou aux solutions de désensibilisation allergénique (110, 111). Rapidement au site d'injection vaccinale, apparaissent un érythème et une induration puis un nodule sensible à la palpation persistant plusieurs mois ou années, pouvant nécessiter une exérèse chirurgicale. Histologiquement, un aspect d'eczéma peut être retrouvé en surface, dans le derme et l'hypoderme une réaction lymphoplasmocytaire majeure associée parfois à des cellules géantes. Ces réactions sont considérées comme *des allergies à l'aluminium* qui persiste au point d'injection.

Chez ces sujets, il faut se méfier du risque de réaction de bords à toutes les cupules Finn Chamber® qui sont composées d'aluminium (110). Les tests épicutanés au vaccin pur peuvent être positifs (66). D'après notre analyse de la littérature le test au chlorure d'aluminium à 2 p. 100 dans l'eau serait le marqueur le plus sensible de cette allergie.

Quand est confirmée une réaction à l'aluminium, lors de la revaccination, il conviendra de choisir les solutions n'en contenant pas ou d'effectuer les injections par voie intra-musculaire ce qui permet une meilleure diffusion de l'adsorbant.

ALLERGIE AU THIOMERSAL (67, 68, 99, 112-117)

Le thiomersal ou mercurothiolate sodique ou sodium-éthyl mercurothiosalicylate, serait à l'origine de certaines réactions allergiques aux vaccins. Des réactions survenant après injection de différents types de vaccins où le seul composé commun est le thiomersal, rendent très vraisemblable sa responsabilité dans la survenue de manifestations essentiellement de type anaphylactique, parfois également dans de fortes réactions locales, dont des abcès, l'exacerbation d'eczéma atopique, des exanthèmes ou urticaires (112, 113). Le thiomersal est composé d'une fraction mercurielle et d'une fraction thiosalicylée. Des études chez l'animal ont permis de démontrer que la sensibilisation peut être dirigée vers la fraction mercurielle (114), le plus fréquemment vis-à-vis de l'acide thiosalicylique, voire parfois aux deux fractions (115). Il existe également quelques cas d'allergie de contact au thiomersal croisée avec une photo-allergie au piroxicam (116).

La plupart des auteurs qui l'imputent dans des accidents de vaccination rapportent des tests épicutanés positifs au thiomersal à 0,1 p. 100 dans la vaseline, plus rarement des IDR positives (0,1 ml d'une solution de thiomersal dilué au 1/10.000e). Mizutani considère que ces IDR ne sont pas spécifiques d'une allergie au thiomersal car elles donnent trop de faux positifs (117).

Que conseiller aux patients présentant un patch-test positif au thiomersal vis-à-vis de leurs vaccinations? (99, 113, 115)

La sensibilisation sur les tests épicutanés au thiomersal est fréquente (2 à 3,7 p. 100 de tests positifs selon les séries). Les études de Cox et coll. (113) et d'Aberer (99) démontrent que l'existence d'un patch-test positif au thiomersal ne contre-indique pas chez ces sujets, la vaccination avec des solutions contenant ce conservateur. Seulement 2 des 62 patients sensibilisés au thiomersal, vaccinés avec une solution contenant ce conservateur ont développé une forte réaction locale, et ce après des injections de très fortes doses vaccinales (hyper-immunisation) (99). La vaccination intramusculaire diminuerait encore le risque de fortes réactions locales aux vaccins contenant du thiomersal.

Chez les sujets ayant présenté une réaction allergique à un vaccin due à ce type de conservateur, il suffira d'utiliser un vaccin équivalent ne contenant pas de thiomersal.

ALLERGIE À LA NÉOMYCINE, FORMALDÉHYDE OU AUTRE CONSERVATEUR

Nous n'avons pas retrouvé de cas prouvé de manifestations allergiques rattachées à une sensibilisation aux antibiotiques qui peuvent être présents à l'état de traces dans certains vaccins. Il existe par contre un cas d'allergie au formaldéhyde avec urticaire survenant huit semaines après

ENSEIGNEMENT POST-UNIVERSITAIRE

une injection vaccinale antitétanique contenant ce conservateur (118) et un cas de réactivation d'une allergie de contact au formaldéhyde après administration d'une solution vaccinale anti-hépatite B contenant ce conservateur (119).

Il n'existe aucun argument dans la littérature pour contre-indiquer la vaccination avec les solutions contenant ce type de produits chez les sujets ayant des patch-tests positifs à la néomycine (120) ou au formaldéhyde.

RÉFÉRENCES

1. Ajjan N. La vaccination. Monographie Institut Mérieux éd., Lyon, 1990.
2. Roitt I. Immunité anti-infectieuse. II - Prophylaxie et immunodéficiences, in Immunologie. Roitt I., Pradel éd., Paris, 172-92.
3. Drucker J. Vaccinations. Bases immunologiques et microbiologiques, indications, contre-indications, accidents, efficacité. Rev Prat 1991;*41*:2001-4.
4. Duclos P, Bentsi-Enchill A. Current thoughts on the risks and benefits of immunisation. Drug Safety 1993;*8*:404-13.
5. Dictionnaire Vidal. 70e édition, 1994.
6. Dittmann S. Immunobiological preparations. *In :* Meyler's Side Effects of Drugs, Dukes M., ed, Elsevier Science Publishers, SED 12, SEDA 15, 1991. Chap. 34 : 340-363, 1992; Chap. 34 : 791-840.
7. Vessal S, Kravis L. Immunologic mechanisms responsible for adverse reactions to routine immunizations in children. Clin Pediatr 1976;*15*:688-96.
8. Newport M, Conway S. Experience of a specialist service for advice on childhood immunisation. J Infect 1993;*26*:295-300.
9. Mac Kenzie W. Multiple false-positive serologic tests for HIV, HTLV1 and hepatitis C following influenza vaccination in 1991. J Am Med Assoc 1992;*268*:1015-7.
10. Lilic D, Ghosh S. Liver dysfunction and DNA antibodies after hepatitis B vaccination. Lancet 1994;*344*:1292-3.
11. Cannata J, Cueesta V, Peral V. Reactivation of vasculitis after influenza vaccination. Br Med J 1981;*283*:250.
12. Dangoisse Ch, Song M. Conduite à tenir devant les complications cutanées du BCG. Ann Dermatol Venereol 1990;*117*:45-51.
13. Oguz F, Müjgan S, Alper G, Alev F, Neyzi O. Treatment of bacillus Calmette-Guerin — associated lymphadenitis. Pediatr Infect Dis J 1992;*11*:887-8.
14. Molina JM, Rabian C, D'Agay MF, Modai J. Hypersensitivity systemic reaction following intravesical bacillus Calmette-Guerin: successful treatment with steroids. J Urol 1992;*147*:695-7.
15. Misery L, Combemale P. BCG vaccine-induced lupus vulgaris and urticarial vasculitis. Dermatology 1993;*186*:274.
16. Izumi A, Matsunaga J. BCG vaccine-induced lupus vulgaris. Arch Dermatol 1982;*118*:171-2.
17. Sehgal V, Jain S, Gupta R. Inoculation lupus vulgaris. J Dermatol 1992;*19*:58-60.
18. Rudin Ch, Amacher A, Berglund A. Anaphylactoid reaction to BCG vaccination. Lancet 1991;*337*:377.
19. Cheson B. BCG therapy and urticaria. Ann Intern Med 1975;*83*:738.
20. Radeff B, Harms M. Acute febrile neutrophilic dermatosis (Sweet's syndrome) following BCG vaccination. Acta Derm Venereol 1986;*66*:357.
21. Dar W. Pustular vasculitis complicating BCG vaccination. Tubercle Lung Dis 1992;*73*:126.
22. Tschen E, Jessen T, Robertson G, Becker L. Erythema multiforme as a complication of BCG scarification technique. Arch Dermatol 1979;*115*:614-5.
23. Kass E, Straume S, Mellebye O, Munthe E, Solheim B. Dermatomyositis associated with BCG vaccination. Scand J Rheumatol 1979;*8*:187-91.
24. Jacobs R, Lowe R, Lanier B. Adverse reactions to tetanus toxoid. J Am Med Assoc 1982;*247*:40-2.
25. White W, Barnes G, Barker E, Gall D, Knight P, Griffith A et al. Reactions to tetanus toxoid. J Hyg Camb 1973;*71*:283-97.
26. Hansson H, Moller H. Cutaneous reactions to merthiolate and their relationship to vaccination with tetanus toxoid. Acta Allergologica 1971;*26*:150-6.
27. Griffith R, Miller O. Erythema multiforme following diphteria and tetanus toxoid vaccination. J Am Acad Dermatol 1988;*19*:758-9.
28. Vigan M, Adessi B, Girardin P, Vuitton D, Laurent R. Réactions d'eczéma après un vaccin DTPolio. Lettre du Gerda 1990;*7*:34.
29. Long S, Deforest A, Smith D, Lazaro C, Wassilak S. Longitudinal study of adverse reactions following diphteria-tetanus-pertussis vaccine in infancy. Pediatrics 1990;*85*:294-302.
30. Verschoor P, Wilschut J, de Jonge G, Kostense P. Frequent symptoms after DTPP vaccinations. Arch Dis Child 1991;*66*:1408-12.
31. Denning D, Peet L, Poole J. Skin rash after triple vaccine. Arch Dis Child 1987;*62*:510-11.
32. Lewis K, Jordan S, Cherry J, Sakai R, Le C. Petechiae and urticaria after DTP vaccination: detection of circulating immune complexes containing vaccine — specific antigens. J Pediatr 1986;*109*:1009-12.
33. Cox N, Moss C, Forsyth A. Allergy to non-toxoid constituents of vaccines and implications for patch testing. Contact Dermatitis 1986;*18*:143-6.
34. Weisse M, Bass J. Tetanus toxoid allergy. J Am Med Assoc 1990;*264*:2448.
35. Therond C. Comment vacciner les allergiques. Vie Med 1981;*28*:2005-9.
36. Margolis K, Nichol K, Poland G, Pluhar R. Frequency of adverse reactions to influenza vaccine in the elderly. J Am Med Assoc 1990;*264*:1139-41.
37. Wharton C, Pietroni R. Polyarteritis after influenza vaccination. Br Med J 1974;*2*:331-2.
38. Blumberg S, Bienfang D, Kantrowitz F. A possible association between influenza vaccination and small-vessel vasculitis. Arch Intern Med 1980;*140*:847-8.
39. Streifler J, Dux S, Garty M, Rosenfeld J. Recurrent pericarditis: a rare complication of influenza vaccination. Br Med J 1981;*283*:526-7.
40. Guillevin L, Levy Y. Réaction d'hypersensibilité après vaccination antigrippale. Presse Med 1983;*12*:1668-9.
41. Wattiaux M, Moulonguet-Doleris L, Cabane J, Lebas J, Imbert JC. Purpura rhumatoïde après vaccination antigrippale. Presse Med 1988;*17*:649-50.
42. Patel U, Bradley J, Hamilton D. Henoch-Schönlein purpura after influenza vaccination. Br Med J 1988;*296*:1800.
43. Molina M, Ortega G, Galvez J, Munoz L. Leucocytoclastic vasculitis induced by influenza vaccine. Medicina Clin 1990;*95*:78.
44. Vial T, Laine V, Delcombel M, Goubier C, Galland MC, Mallaret M et al. Vascularite consécutive à la vaccination antigrippale. A propos de cinq cas. Thérapie 1990;*45*:509-12.
45. Gavaghan T, Webber C. Severe systemic vasculitis syndrome post influenza vaccination. Austr N Zeal J Med 1993;*23*:220.
46. Vidal E, Gaches F, Berdah JF, Nadalon S, Lavignac C, Mitrea L et al. Vascularite après vaccin antigrippal. Rev Med Interne 1993;*14*:1173.
47. Dam Janov J, Amato JA. Progression of renal disease in Henoch-Schönlein purpura after influenza vaccination. J Am Med Assoc 1979;*242*:2555-6.

48. Bodokh I, Lacour JPh, Bourdet JF, Rodot S, Botcazou V, Ortonne JP. Réactivation de pemphigoïde bulleuse après vaccination antigrippale. Thérapie 1994;*49*:141-55.
49. Mac Mahon B, Helminiak C, Wainwright R, Bulkow L, Trimble B, Wainwright D. Frequency of adverse reactions to hepatitis B vaccine in 43, 618 persons. Am J Med 1992;*92*:254-6.
50. Poullin P, Gabriel B. Thrombocytopenic purpura after recombinant hepatitis B vaccine. Lancet 1994;*344*:1293-4.
51. Brightman C, Scadding G, Dumbreck L, Latchman Y, Brostoff J. Yeast-derived hepatitis B vaccine and yeast sensitivity. Lancet 1989;*i*:903.
52. Lohiya G. Asthma and urticaria after hepatitis B vaccination. West J Med 1987;*147*:341.
53. Feldshon SD, Sampliner R. Reaction to hepatitis B virus vaccine. Ann Intern Med 1984;*100*:156-7.
54. Milstein J, Kuristsky J. Erythema multiforme and hepatitis B immunization. Arch Dermatol 1986;*122*:511-2.
55. Wakeel R, White M. Erythema multiforme associated with hepatitis B vaccine. Br J Dermatol 1992;*126*:94-5.
56. Di Giusto C, Bernhard J. Erythema nodosum provoked by hepatitis B vaccine. Lancet 1986;*2*:1042.
57. Goolsby P. Erythema nodosum after Recombivax HB hepatitis B vaccine. N Engl J Med 1989;*321*:1198-9.
58. Rogerson S, Nye F. Hepatite B vaccine associated with erythema nodosum and polyarthritis. Br Med J 1990;*301*:345.
59. Le Goff P, Fauquert P, Youinou P, Hoang S. Périartérite noueuse après vaccination contre l'hépatite B. Presse Med 1988;*17*:1763.
60. Ciaccio M, Rebora A. Lichen planus following HBV vaccination: a coïncidence? Br J Dermatol 1990;*122*:424.
61. Trevisan G, Stinco G. Lichen ruber planus following HBV vaccination. Acta Derm Venereol 1993;*73*:73.
62. Pusel B, Will F, Grosshans E. Lichen plan et vaccination contre l'hépatite B. Nouv Dermatol 1993;*12*:709-10.
63. Tudela P, Marti S, Bonal J. Systemic lupus erythematosus and vaccination against hepatitis B. Nephron 1992;*62*:236.
64. Cokwell P, Allen MB, Page R. Vasculitis related to hepatitis B vaccine. Br Med J 1990;*301*:1281.
65. Hassan W, Oldham R. Reiter's syndrome and reactive arthritis in health care workers after vaccination. Br Med J 1994;*309*:94.
66. Cosnes A, Flechet ML, Revuz J. Inflammatory nodular reactions after hepatitis B vaccination due to aluminium sensitization. Contact Dermatitis 1993;*23*:65-7.
67. Rietschel R, Adams R. Reactions to thimerosal in hepatitis B vaccines. Dermatol Clin 1990;*8*:161-4.
68. Noel I, Galloway A, Ive F. Hypersensitivity to thiomersal in hepatitis B vaccine. Lancet 1991;*338*:705.
69. Aukrust L, Almeland T, Refsum D, Aas K. Severe hypersentivity or intolerance reactions to measles vaccine in six children. Allergy 1980;*35*:581-7.
70. Giampietro P, Bruno G, Grandolfo M, Businco L. Adverse reaction to measles immunization. Eur J Pediatr 1993;*152*:80.
71. Miller C, Miller E, Rowe K, Bowie C, Judd M. Surveillance of symptoms following MMR vaccine in children. Practitioner 1989;*233*:69-73.
72. Kalet A, Berger D, Bateman W, Dubitsky J, Covitz K. Allergic reactions to MMR vaccine. Pediatrics 1992;*89*:168-9.
73. Kelso J, Jones R, Yunginger J. Anaphylaxis to MMR vaccine and gelatin. J All Clin Immunol 1992;*89*:351.
74. Fasano MB, Wood R, Cooke S, Sampson H. Egg hypersensitivity and adverse reactions to measles, mumps and rubella vaccine. J Pediatr 1992;*120*:878-81.
75. Torinuki W. Mucha-Habermann disease in a child: possible association with measles vaccination. J Dermatol 1992;*19*:253-5.
76. Herman J, Radin R, Schneiderman R. Allergic reactions to measles (rubeola) vaccine in patients hypersensitive to egg protein. J Pediatr 1983;*102*:196-9.
77. Puvvada L, Silverman B, Bassett C, Chiaramonte L. Systemic reactions to measles-mumps, rubella vaccine skin testing. Pediatrics 1993;*91*:835-6.
78. Beck S, Williams L, Shirrell A, Burks AW. Egg hypersensitivity and measles-mumps-rubella vaccine administration. Pediatrics 1991;*88*:913-7.
79. Juntunen-Backman K, Peltola H, Backman A, Salo O. Safe immunization of allergic children against measles, mumps, and rubella. Am J Dis Childh 1987;*141*:1103-5.
80. Greenberg M, Birx D. Safe administration of mumps-measles-rubella vaccine in egg-allergic children. J Pediatr 1988;*113*:504-6.
81. Peter G. Administration of measles-mumps-rubella vaccine to children allergic to eggs. J Pediatr 1989;*114*:1067.
82. Lavi S, Zimmerman B, Koren G, Gold R. Administration of measles, mumps and rubella virus vaccine (live) to egg-allergic children. J Am Med Assoc 1990;*263*:269-71.
83. Kemp A, Van Asperen P, Mukhi A. Measles immunization in children with clinical reactions to egg protein. Am J Dis Childh 1990;*144*:33-5.
84. Tounian P, Scheinmann P. Peut-on vacciner les enfants allergiques à l'œuf par un vaccin préparé sur œuf? Conc Med 1994;*116*:1127-9.
85. Fritzell B. Vaccin polyosidique contre *Haemophilus influenzae* B conjugé à la protéine tétanique. Tolérance et immunogénicité chez les nourrissons. Immunol Med 1991;*8*:176-82.
86. Eskola J, Kayhty H, Takala A, Peltola H, Rönnberg PR, Kela E et al. A randomized, prospective field trial of a conjugate vaccine in the protection of infants and young children against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. N Engl J Med 1990;*323*:1381-7.
87. Santosham M, Wolff M, Reid R, Hohenboken M, Bateman M, Goepp J et al. The efficacy in Navajo infants of a conjugate vaccine consisting of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide and *Neisseria meningitidis* outer-membrane protein complex. N Engl J Med 1991;*324*:1767-72.
88. Act HIB, HIBest. Prescrire 1992;*12*:400-2.
89. Humphreys F. Acute urticaria and angio-oedema following *Haemophilus influenzae* b vaccination. Br J Dermatol 1994;*131*: 582-3.
90. Milstien J, Gross T, Kuritsky J. Adverse reactions reported following receipt of *Haemophilus influenzae* type b vaccine: An analysis after 1 year of marketing. Pediatrics 1987;*80*:270-4.
91. Novelli V, Dawod S, Ali M, Al-Kuwari A, Al-Jaber K. Febrile seizures after immunization with meningococcal A + C vaccine. Pediatr Inf Dis J 1989;*8*:250-1.
92. Fishbein D, Yenne K, Dreesen D, Teplis C, Mehta N, Briggs D. Risk factors for systemic hypersensitivity reactions after booster vaccinations with human diploid cell rabies vaccine: a nationwide prospective study. Vaccine 1993;*11*:1390-4.
93. Gershon A. Human immune responses to live attenuated varicella vaccine. Rev Infect Dis 1991;*13*:957s-9s.
94. Correia O, Nunes JP, Vaz-da-Silva M, Pires S, Brandao F, Mesquita-Guimaraes J. Acute exanthematous pustular dermatitis after pneumococcal vaccine. Dermatology 1993;*187*:217.
95. Tan S, Cumming A. Vaccine related glomerulonephritis. Br Med J 1993;*306*:248.
96. Kejeher P, Kelley L, Rickman L. Anaphylactoid reaction after typhoid vaccination. Medicine 1990;*89*:822-4.
97. Keane A, Foley-Nolan D, Barry C, Coughlan R. Reiter's syndrome precipitated by a thyphoid vaccination. Br J Rheumatol 1988;*27*:496-7.
98. Dereure O, Michel B, Marty-Double C, Duntze P. Palissading granuloma after typhoid paratyphoid immunization. Int J Dermatol 1989;*28*:272-3.

). Aberer W. Vaccination despite thimerosal sensitivity. Contact ermatitis 1991;*24*:6-10.
)0. Ruff T, Eisen D, Fuller A, Kass R. Adverse reactions to ıpanese encephalitis vaccine. Lancet 1991;*338*:881-2.
)1. Slater D, Underwood J, Durrant T, Gray T, Hopper I. Aluinium hydroxide granulomas: light and electron microscopic stues and X-ray microanalysis. Br J Dermatol 1982;*107*:103-8.
)2. Fawcett H, Smith N. Injection-site granuloma due to alumium. Arch Dermatol 1984;*120*:1318-22.
)3. Kotovirta ML, Salo O, Visa-Tolvanen K. Contact sensitivity) aluminium. Contact Dermatitis 1984;*11*:135.
)4. Meding B, Augustsson A, Hansson C. Patch test reactions) aluminium. Contact Dermatitis 1984;*10*:107.
)5. Fawcett H, McGibbon D, Cronin E. Persistent vaccination ranuloma due to aluminium hypersensitivity. Br J Dermatol 985;*113*:101-2.
)6. Veien N, Hattel T, Justesen O, Norholm A. Aluminium llergy. Contact Dermatitis 1986;*15*:295-7.
)7. Bohler-Sommeregger K, Lindemayr H. Contact sensitivity to luminium. Contact Dermatitis 1986;*15*:278-81.
)8. Kaaber K, Nielsen A, Veien N. Vaccination granulomas and luminium allergy: course and prognostic factors. Contact Derıatitis 1992;*26*:304-6.
)9. Cominos D, Strutton G, Busmanis I. Granulomas associated ıith tetanus toxoid immunization. Am J Dermatopathol 993;*15*:114-7.
10. Castelain PY, Castelain M, Vervloet D, Garbe L, Mallet B. Sensitization to aluminium by aluminium, precipitated dust and pollen extracts. Contact Dermatitis. 1988;*19*:58-60.
111. Lopez S, Pelaez A, Navarro LA, Montesinos E, Morales C, Carda C. Aluminium allergy in patients hyposensitized with aluminium precipitated antien extracts. Contact Dermatitis 1994;*31*:37-40.
112. Tosti A, Melino M, Bardazzi F. Systemic reactions due to thiomersal. Contact Dermatitis 1986;*15*:187-8.
113. Cox N, Forsyth A. Thiomersal allergy and vaccination reactions. Contact Dermatitis 1988;*18*:229-33.
114. Pirker C, Moslinger T, Wantke F, Gotz M, Jarisch R. Ethylmercuric chloride: the responsible agent in thimerosal hypersensitivity. Contact Dermatitis 1993;*29*:152-4.
115. Moller H. All these positive tests to thimerosal. Contact Dermatitis 1994;*31*:209-13.
116. Ikezawa Z, Kitamura K, Osawa J, Hariya T. Photosensitivity to piroxicam is induced by sensitization to thimerosal and thiosalicylate. J Invest Dermatol 1992;*92*:918-22.
117. Mizutani H. Hypersensitivity to thimerosal. N Engl J Med 1973;*289*:1424.
118. Fabry H. Formaldehyde sensitivity. Two interesting cases. Contact Derm Newsletter 1968;*3*:51.
119. Ring J. Exacerbation of eczema by formalin - containing hepatitis B vaccine in formaldehyde-allergic patient. Lancet 1986;*2*:522-3.
120. Elliman D, Dhanraj B. Safe MMR vaccination despite neomycin allergy. Lancet 1991;*337*:365.

Communiqué

BOURSE EUROPÉENNE DE RECHERCHE EN DERMATOLOGIE ET VÉNÉRÉOLOGIE

YAMANOUCHI PHARMA et l'Académie Européenne de Dermatologie-Vénéréologie (AEDV) offrent une bourse destinée à financer une étude fondamentale ou clinique en dermatologie.

Le projet doit être retourné **avant le 31 mai 1995.** Il sera étudié par un comité scientifique, constitué de 4 personnalités médicales européennes, adhérents de l'AEDV et de 2 membres de YAMANOUCHI.

Le montant de la bourse pourra s'élever à 150 000 F.

Pour obtenir un dossier de présentation du projet, contacter :

YAMANOUCHI PHARMA
Département de Dermato-Vénéréologie,
10, place de la Coupole, BP 105
94223 CHARENTON LE PONT Cedex
Tél. : (1) 46-76-64-00

© Masson, Paris 1995

nn. Dermatol. Venereol.,
)96, *123* : 214-218.

ALLERGIES CUTANÉES ET INSULINOTHÉRAPIE
Aspects récents, conduite à tenir[1]

A. BARBAUD*, I. GOT**, P. TRECHOT***, V. NOIREZ****,
J. L. SCHMUTZ*

Les progrès technologiques dans la production et la puri-
ication de l'insuline ont grandement fait diminuer le pro-
ıème de la sensibilisation à cette thérapeutique. Pourtant
les allergies aux insulines humaines hémisynthétiques, voire
ıroduites par génie génétique, existent encore. Elles peu-
'ent être liées à une sensibilisation à l'insuline elle-même
ıu aux excipients de la solution injectable. Le dermato-
ogue doit de plus connaître les nouvelles techniques d'admi-
ıistration de ce traitement anti-diabétique car elles utili-
ıent un matériel qui peut être aussi à l'origine de
ıensibilisations cutanées.

MATÉRIEL UTILISÉ

LES DIFFÉRENTES INSULINES

L'insuline est un polypeptide composé de deux chaînes A et B de 21 et 30 acides aminés respectivement, reliées entre elles par des ponts disulfures. Elle est sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas. Pour le traitement du diabète insulino-dépendant, elle fut injectée pour la première fois à l'homme en 1922. Quatre types d'insuline sont utilisés : bovine, porcine, humaine hémisynthétique et recombinante fabriquée par génie génétique.

L'insuline bovine est la plus sensibilisante, elle diffère de l'insuline humaine par trois acides aminés. L'insuline porcine ne diffère de l'insuline humaine que par un acide aminé terminal, elle est donc moins sensibilisante que l'insuline bovine. Les insulines animales sont extraites de pancréas animal. La persistance d'impuretés comme des polypeptides pancréatiques favorisait auparavant la sensibilisation à ce type d'insuline. Avec les techniques actuelles de purification, ces contaminants sont éliminés.

L'insuline humaine hémisynthétique est une insuline porcine qui, grâce à des procédés enzymatiques, subit la substitution de l'alanine terminale de la chaîne B par une thréonine, formant ainsi un polypeptide dont la séquence est identique à celle de l'insuline humaine.

Enfin, depuis ces dernières années peuvent être utilisées des insulines humaines recombinantes préparées par génie génétique, sur deux types de vecteur : *Saccharomyces cerevisiae* (levure de bière) ou *Escherichia coli*. Les structures primaire et tertiaire de ces insulines sont identiques à celles de l'insuline humaine (1).

Les préparations injectables d'insuline contiennent des conservateurs : métacrésol, phénol, parahydroxybenzoate de méthyle; des adjuvants comme le chlorure de zinc et le sulfate de protamine. Ce dernier est un polypeptide utilisé pour retarder l'absorption de l'insuline mais également en pathologie cardio-vasculaire pour neutraliser les effets de l'héparine. La protamine est extraite de sperme de poissons (saumon).

LES TECHNIQUES D'INJECTION

L'injection sous-cutanée insulinique demeure la plus couramment utilisée. Le recours à l'insulinothérapie intraveineuse est rare. Durant ces dernières années se sont développées différentes techniques d'insulinothérapie en continu par des pompes à insuline externes ou implantables.

Les injections sous-cutanées itératives sont réalisées après désinfection de la peau (seringues de polypropylène, aiguille en acier inoxydable) en changeant régulièrement le site d'injection pour éviter les lipodystrophies.

Les stylos injecteurs d'insuline (1) facilitent l'administration de l'insuline sous-cutanée chez le diabétique. En matière plastique ou métalliques, ils sont munis à une extrémité d'une aiguille jetable et comportent un réservoir où est glissée la cartouche d'insuline en verre, de 100 Unités/ml (U/ml).

Les pompes externes assurent une perfusion continue d'insuline grâce à une aiguille implantée dans le tissu sous-cutané. Elles comportent un boîtier dans lequel est disposée la cartouche-recharge d'insuline. Ce boîtier est livré avec un étui de cuir ou de tissu. Le boîtier est relié à une

---

1. Une première version de ce travail a été présentée au 15e cours du GERDA, 15-17 septembre 1994, à Leuven (Belgique) : 155-167.

* Service de Dermatologie, Hôpital Fournier, 36, quai de la Bataille, F 54035 Nancy Cedex.
** Service de Diabétologie, Hôpital Jeanne-d'Arc, CHU Nancy-Dommartin-les-Toul.
*** Service de Pharmacologie, CHU Nancy.
**** Pharmacie des Hôpitaux Maringer-Villemin-Fournier, CHU Nancy.
Tirés à part : A. BARBAUD, à l'adresse ci-dessus.

tubulure de longueur variable par l'intermédiaire d'un raccord en PVC. La tubulure est reliée à l'aiguille par l'intermédiaire d'une embase. Le maintien en place de l'aiguille est assuré par un film adhésif transparent. La tubulure peut être en PVC ou co-extrudée (tubulure interne en polyéthylène, tubulure externe en PVC ou en polyuréthane). L'embase de l'aiguille peut être en polycarbonate ou en polyoxyméthylène. L'adhésivité entre l'aiguille et l'embase peut être renforcée par des colles : époxy, maintenant abandonnées, ou acrylates. L'aiguille est le plus souvent en acier inoxydable mais peut être en téflon.

Quelques publications font état d'allergies de contact en rapport avec ce matériel. En dehors des sensibilisations au nickel de l'aiguille, Boom (2) a observé une allergie de contact au site de perfusion, associée à une dyshidrose dans l'observation de Geldof (3), toutes deux liées à l'époxy utilisée pour assurer la cohésion entre l'aiguille et son embase. Busschots (4) a rapporté 2 cas d'eczéma de contact au site de perfusion dû au phénoxypoly (éthylèneoxy) éthylacrylate.

Nous avons observé une patiente présentant un eczéma de contact en regard du boîtier de sa pompe à insuline externe qui était lié à une sensibilisation au paratertiaire-butyl-phénol-formaldéhyde, colle probablement utilisée dans l'étui de cuir qui servait à protéger sa pompe. Dans d'autres pompes externes pour administration intrapéritonéale d'insuline (5), les cathéters sont en polyuréthane et/ou en téflon. L'implantation des cathéters grâce à une aiguille-guide en métal peut être faite avec une anesthésie locale par la crème EMLA® (lidocaïne et prilocaïne). Les problèmes cutanés rapportés sont des infections locales (5) ou des allergies à l'adhésif de fixation (6).

Pompes à insuline implantables (7-9) : la pompe à insuline en forme de disque est en titane. Elle mesure environ 8 cm de diamètre et 2 cm d'épaisseur pour un poids de 168 g lorsqu'elle est pleine. Au milieu de la face supérieure de la pompe, un orifice de 5 mm de diamètre sert au remplissage. Latéralement, un cathéter est placé libre dans la cavité péritonéale. Ce cathéter comprend deux gaines, l'une interne en polyéthylène, l'autre externe en silicone. La pompe est implantée chirurgicalement dans le tissu sous-cutané abdominal. Elle est rechargée par voie transcutanée tous les 3 mois. La durée de vie de la pile de la pompe impose son remplacement chirurgical tous les 3 ans.

Selon l'expérience française du groupe EVADIAC rapportée par V. Lasmann-Vague (5e Journée d'allergologie et d'immunologie clinique en dermatologie, Marseille, 1er juin 1994) concernant 224 diabétiques insulino-dépendants traités par pompe implantable (soit 354 années-patients), les complications observées ont été localement : 4 hématomes, 9 douleurs au point d'implantation, 13 lymphocèles, 7 érosions cutanées, 4 infections de la poche, 8 migrations de la pompe. Renard (8) a observé 7 réactions exsudatives au point d'implantation de la pompe sur 40 patients traités par ce système. Dans 5 cas, il y eut érosion cutanée. Dans un cas, le premier signe d'intolérance était un érythème prurigineux transitoirement amélioré par les antihistaminiques. Des réactions à corps étranger autour de la pompe ont également été rapportées (9).

MANIFESTATIONS ALLERGIQUES CHEZ LE DIABÉTIQUE INSULINO-DÉPENDANT

Outre les manifestations liées aux pompes à insuline déjà signalées, la plupart des allergies observées chez ces patients sont liées à la solution d'insuline ou au matériel d'injection sous-cutanée.

Clinique des réactions allergiques à l'insuline (10-14)

La fréquence des réactions allergiques à l'insuline est très difficile à estimer avec les nouvelles insulines. Jegasothy (11) estimait en 1980 que 8 à 12 p. 100 des diabétiques insulino-dépendants (DID) présentaient une allergie à l'insuline. Les manifestations allergiques sont classées de la façon suivante : réactions retardées localisées qui seraient en rapport avec une réponse immunitaire cellulaire lymphocytaire retardée, réactions immédiates localisées ou généralisées qui seraient en rapport avec une réponse immunitaire immédiate médiée par les IgE et enfin, réactions mixtes qui peuvent relever de différents mécanismes immunitaires de type I, III, voire IV dans la classification de Gell et Coombs.

Les réactions retardées localisées.

Elles siègent au site d'injection. Elles surviennent quelques heures après l'injection, augmentent d'intensité dans les 24 à 48 heures suivantes et régressent en 3 à 7 jours. Elles se manifestent par un érythème prurigineux devenant rapidement papuleux, infiltré ou nodulaire. Elles étaient surtout observées avec les anciennes insulines animales, survenant en début d'insulinothérapie et disparaissant après quelques semaines ou mois. Elles ont malgré tout été observées avec des insulines purifiées ou humaines (15).

Les réactions immédiates localisées (11-14, 16-18)

Il s'agit des réactions les plus fréquentes, caractérisées par un érythème prurigineux ou une urticaire localisés au point d'injection. Leur diamètre, en général limité à quelques centimètres, peut atteindre plus de 15 cm. Ces manifestations surviennent dans les 30 à 120 minutes qui suivent l'administration d'insuline et disparaissent dans les 18 heures suivantes. Elles peuvent apparaître précocement ou plusieurs années après la mise en route d'une insulinothérapie. Elles sont plus rares avec les insulines humaines, mais ont été observées y compris avec les insulines recombinantes (16-18). Elles sont très souvent liées à une sensibilisation à la protamine.

Les réactions immédiates généralisées (16-22).

Les réactions systémiques à l'insuline sont la plupart du temps immédiates à type d'urticaire, avec plus rarement œdème de Quincke ou choc anaphylactique. Elles peuvent être précédées par une urticaire au point d'injection durant plusieurs semaines et mois, ou survenir d'emblée. Devenues beaucoup plus rares avec les insulines humaines, elles peuvent pourtant apparaître même chez des sujets qui n'ont été traités que par des insulines humaines (16-22).

Outre ces manifestations immédiates médiées par les IgE, ont été signalées des dermatoses généralisées purpuriques, des prurits généralisés, des éruptions eczématiformes et des érythrodermies (13, 23).

Réactions mixtes (11, 13, 14).

Certains patients présentent une réaction locale immédiate qui régresse rapidement. Elle est suivie dans les 24 à 48 heures d'une réaction localisée plus persistante. Ce type de manifestation biphasique liée à l'insuline elle-même a été rapportée par Loeb (25) chez une femme de 65 ans qui avait été traitée d'emblée par insuline humaine.

Causes des manifestations allergiques

Lors d'une manifestation localisée, après avoir éliminé une sensibilisation de contact aux constituants du matériel d'injection et aux désinfectants utilisés, il faut tenter de préciser quels sont les éléments de la solution injectable en cause. Les insulines modernes ont permis d'éliminer un grand nombre de réactions qui étaient secondaires à la présence d'impuretés dans les solutions. Selon les fabricants d'insulines recombinantes, aucune trace du vecteur de fabrication n'est retrouvée dans le produit fini (1).

Allergie à l'insuline.

La sensibilisation aux insulines bovine et porcine est expliquée par la différence dans la séquence en acides aminés qui existe entre ces molécules et l'insuline humaine. Pourtant, il existe des sensibilisations aux insulines humaines hémisynthétiques, faisant suite en général à une allergie aux insulines animales. Il existe peu d'observations de la persistance de ces manifestations allergiques lors de l'utilisation d'insuline humaine recombinante. Nous avons observé, chez une femme âgée de 35 ans, une urticaire au point d'injection liée à une sensibilisation à l'insuline, qui a persisté malgré le recours aux insulines humaines recombinantes. Il existe des sensibilisations à l'insuline humaine chez des sujets qui n'ont jamais reçu antérieurement d'insuline animale (19, 24).

Comment peut-on expliquer cette sensibilisation à l'insuline humaine? Selon van Haeften (26), la molécule pourrait devenir immunogène, soit du fait de sa présence dans l'organisme à un site inhabituel, soit par une polymérisation sous-cutanée de l'insuline en modifiant sa structure quaternaire.

Réactions au sulfate de protamine (18, 27-29).

Son utilisation pour des indications cardiovasculaires a parfois entraîné flush, urticaire et anaphylaxie. Chez les diabétiques, elle fut responsable de manifestations localisées, immédiates ou retardées (27), d'hypersensibilités granulomateuses (28). Les IgE anti-protamine ne sont pas spécifiques des réactions allergiques car 53 p. 100 des diabétiques traités par insuline protaminée ont ce type d'anticorps sériques. Chez 38 p. 100 des sujets diabétiques traités par insuline protaminée, des IgG anti-protamine ont été retrouvées (29) mais elles sont aussi présentes chez 8 p. 100 des diabétiques insulino-dépendants non traités par insuline protaminée et 2,5 p. 100 des témoins non diabétiques. Il existe un risque de réactions anaphylactoïdes lors de l'administration de protamine intraveineuse chez des diabétiques qui ont déjà reçu de l'insuline protaminée (29).

Autres allergènes.

Des réactions localisées retardées ont été rapportées à une sensibilisation au zinc (30) et des cas d'urticaire à une sensibilisation au métacrésol (18).

TESTS CUTANÉS (31, 32)

Les insulines sont, en général, testées avec les solutions commercialisées en intradermo-réaction (IDR). Ces tests cutanés à l'insuline ne sont pas spécifiques d'une réaction allergique car ils sont positifs chez 40 à 50 p. 100 des diabétiques insulino-dépendants (DID). Pourtant avec une technique proposée par de Shazo et coll. (32), les IDR seraient négatives chez tous les témoins non diabétiques et chez 89 p. 100 des DID sans réaction allergique. Cette équipe pratique des IDR à 1 unité d'insuline par test : 0,02 ml dans un sérum phénolé salin. La sensibilité de cette méthode paraît malheureusement faible car seulement 52 p. 100 des DID avec réaction locale au point d'injection ont une IDR positive à l'insuline.

Les excipients et les conservateurs peuvent être testés par voie épicutanée. La sensibilisation au métacrésol dans deux cas d'urticaire a été prouvée par la positivité de prick-tests à cette molécule (20). Le zinc peut être testé par voie épicutanée (oxyde de zinc 10 p. 100 vaseline). Des IDR au sulfate de zinc ont été réalisées, elles seraient irritantes (32). Le sulfate de protamine peut être testé par voie épicutanée, en prick-test puis en scratch-test en utilisant une solution commercialisée de protamine injectable.

TESTS *IN VITRO* ET ANTICORPS ANTI-INSULINE

Des anticorps anti-insuline, de type IgE ou IgG, ont été mis en évidence chez le DID. Selon Vermeulen (13), l'allergie à l'insuline serait caractérisée par une augmentation du rapport IgE/IgG tandis que la résistance à l'insuline serait caractérisée par une augmentation des IgG.

La mise en évidence d'anticorps anti-insuline n'est pas spécifique des manifestations allergiques à cette molécule (26, 32-33). Cinquante à 60 p. 100 des DID ont des anticorps anti-insuline. Dans le diabète juvénile, il a été démontré qu'ils peuvent apparaître avant la mise en route du traitement insulinique. Ces anticorps ont été retrouvés chez des jumeaux sains homozygotes de patients DID et chez 1 à 2 p. 100 des donneurs de sang non diabétiques.

De Shazo (32) a montré que chez les DID ayant présenté une réaction allergique au point d'injection, il existe une augmentation du taux d'IgE anti-insuline non significative par rapport à des témoins non diabétiques.

Les diabétiques ont très souvent des IgG anti-insuline et ce à des taux plus élevés que chez les témoins (32-34). Soto-Aguilar (34) a démontré que la mise sous insuline entraînait chez le diabétique une synthèse d'IgG de sous-classes 1, 3 et 4. Chez les sujets ayant présenté des réactions localisées retardées, il existe un taux augmenté d'IgG1 par rapport aux témoins.

CONDUITE À TENIR DEVANT UNE ALLERGIE À L'INSULINE (11, 35)

Nous venons de souligner la limite des investigations immuno-allergologiques *in vivo* et *in vitro*. Il sera nécessaire de noter avec le patient si les réactions surviennent avec tous les types d'insuline ou si elles semblent liées à la présence d'un adjuvant, comme le zinc ou la protamine. Pour certains auteurs, les intradermo-réactions sont utiles car en cas de négativité, elles excluent le diagnostic de sensibilisation à l'insuline.

Conduite à tenir devant une réaction locale retardée

Jegasothy (11) conseille tout d'abord de contrôler avec le patient la technique d'injection. Une surveillance simple est assurée ensuite durant quelques semaines puisque la majorité de ces réactions régressent spontanément. Si après 3 à 5 semaines les lésions persistent, l'auteur conseille de modifier le type d'insuline utilisée en choisissant une insuline moins immunogène, en rappelant que l'immunogénicité des insulines est par ordre décroissant : l'insuline bovine, l'insuline porcine, les insulines humaines hémisynthétiques puis biogénétiques. On proposera également une nouvelle insuline contenant un adjuvant différent. Si ces modifications ne suffisent pas, l'auteur suggère l'administration au point d'injection d'un antihistaminique de type H1 ou d'un corticoïde.

Réaction immédiate

L'interrogatoire puis les tests cutanés auront une valeur d'orientation étiologique. Si l'insuline elle-même est suspectée, il faudra choisir une insuline moins immunogène. Si, malgré les modifications thérapeutiques, la sensibilisation persiste, on pourra avoir recours à un traitement symptomatique. Il est important de noter que la désensibilisation ne sera discutée, en dernier recours, que pour les patients présentant des manifestations allergiques systémiques.

Les antihistaminiques de type H1 (anti-H1) (25, 32, 36).

Selon Loeb et coll. (25), les antihistaminiques sont efficaces dans les réactions immédiates localisées. Deux types d'administration ont été proposés : soit des anti-H1 *per os* administrés 30 minutes avant l'injection d'insuline, soit des injections locales de 1 mg de diphénhydramine ou d'un autre anti-H1 injectable. L'insuline pouvant précipiter quand les deux produits sont mélangés dans une même seringue, il est préférable d'injecter d'abord l'anti-H1, puis l'insuline.

Corticothérapie (19, 25, 36).

Certains auteurs ont proposé dans les formes sévères de sensibilisation à l'insuline, associées à une insulinorésistance, la mise en route d'une corticothérapie générale. Les corticoïdes étant diabétogènes, une extrême prudence est de règle si un tel traitement doit être effectué.

Les dermocorticoïdes sont inefficaces. Certains auteurs (19, 25, 36) ont proposé l'administration de dexaméthasone (1 µg/1 U d'insuline ou 0,5 mg) au point d'injection avec une bonne tolérance glycémique de cette technique. Chez notre patiente ayant une importante sensibilisation locale à l'insuline humaine recombinante, nous avons eu un résultat positif en injectant 0,5 mg de dexaméthasone avant chaque administration d'insuline.

La désensibilisation à l'insuline.

Si certains protocoles se sont révélés efficaces dans des allergies à l'insuline porcine, il faut souligner qu'aucun protocole n'a été évalué dans les allergies à l'insuline humaine (19). Il est même difficile d'affirmer qu'il reste une place à la désensibilisation dans la stratégie de prise en charge de l'allergie à l'insuline depuis la commercialisation de l'insuline recombinante. Ces désensibilisations ne seront proposées qu'en dernier recours devant des manifestations allergiques généralisées à l'insuline recombinante non protaminée, sans oxyde de zinc, pour des patients insulino-dépendants stricts chez qui le régime et le recours aux hypoglycémiants oraux ne permettent pas le contrôle du diabète. Enfin, compte tenu de l'important risque d'acidocétose, ces techniques doivent être mises en œuvre avec une surveillance stricte en soins intensifs. Il existait des protocoles de désensibilisation rapide (19, 35) et des désensibilisations lentes avec arrêt de l'insulinothérapie durant plusieurs jours (11). Holdaway et Wilson (36) ont été les seuls à rapporter l'efficacité d'une désensibilisation par voie orale avec l'insuline associée à la prise d'aspirine.

RÉFÉRENCES

1. Charbonnel B. Les insulines. *In:* Traité de diabétologie. Paris : Pradel, 1990:680-94.

2. Boom B, Van Driel L. Allergic contact dermatitis to epoxy esin in infusion sets of an insulin pump. Contact Dermatitis 1985;*12*:280.
3. Geldof BA, Oranje AP, Van Joost Th. Hand eczema associated with continuous subcutaneous insulin infusion. Contact Dermatitis 1989;*20*:384.
4. Busschots AM, Meuleman V, Poesen N, Dooms-Goossens A. Contact allergy to components of glue in insulin pump infusion sets. Contact Dermatitis 1995;*33*:205-6.
5. Wredling R, Adamson U, Lins PE, Backman L, Lundgren D. Experience of long-term intraperitoneal insulin treatment using a new percutaneous access device. Diabetic Med 1991;*8*:597-600.
6. Hanas R, Ludvigsson J. Side effects and indwelling times of subcutaneous catheters for insulin injections: a new device for injecting insulin with a minimum of pain in the treatment of insulin-dependant diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 1990;*10*:73-83.
7. Saudek C. Implantable insulin pumps: a current look. Diabetes Res Clin Pract 1990;*10*:109-14.
8. Renard E, Bringer J, Jacques-Apostol D, Lauton D, Mestre C, Costalat G et al. Complications of the pump pocket may represent a significant cause of incidents with implanted systems for intraperitoneal insulin delivery. Diabetes Care 1994;*17*:1064-6.
9. Leprat L, Dauzan YR, Nicolescu Cartagi B, De Mascarel A, Masson B, Beylot AM et al. Réaction à corps étranger et traitement du diabète-dépendant par pompe à insuline implantée : 1 cas. Infu-Systèmes 1994;*11*:29-30.
10. Patterson R, Roberts M, Grammer LC. Insulin allergy: revaluation after two decades. Ann Allergy 1990;*64*:459-62.
11. Jegasothy B. Allergic reactions to insulin. Int J Dermatol 1980;*19*:139-41.
12. Perez M, Kohn S. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus. J Am Acad Dermatol 1994;*30*:519-31.
13. Vermeulen C. Les allergies à l'insuline. Sem Hop 1981;*57*:527-34.
14. Plantin P, Sassolas B, Guillet MH, Tater D, Guillet G. Accidents cutanés allergiques aux insulines. Aspects actuels à propos de 2 cas. Ann Dermatol Venereol 1988;*115*:813-7.
15. Chenon D, Fabro M, Richard JL, Rimbaud Y, Mirouze J, Blayac JP. Allergie à une insuline humain biogénétique protaminée avec une augmentation importante des taux d'anticorps anti-insuline et éosinophiles. Presse Med 1989;*18*:1297-8.
16. Ganz M, Unterman T, Roberts M, Uy R, Sahgal S, Samter M et al. Resistance and allergy to recombinant human insulin. J Allergy Clin Immunol 1990;*86*:45-52.
17. Grammer L, Metzger BE, Patterson R. Cutaneous allergy to human (recombinant DNA) insulin. J Am Med Assoc 1984;*251*:459-60.
18. Brooks A, Roseveare CD. Cutaneous allergy (urticaria) due to insulin preparations. Diabetic Med 1993;*10*:33.
19. Thomson D, Ronco J. Prolonged desensitization required for treatment of generalized allergy to human insulin. Diabetes Care 1993;*16*:957-8.
20. Takatsuki H, Ishii H, Yamauchi T, Nakashima N, Nagase S, Hisatomi A et al. A case of insulin allergy: the crystalline human insulin may mask its antigenicity. Diabetes Res Clin Pract 1991;*12*:137-9.
21. Yoshino G, Yamochi W, Moriyama H, Ueno H, Inui A, Oimomi M et al. Pancreatic diabetes with severe generalized allergy to purified beef, pork, and human insulins. Diabetes Care 1990;*13*:1093.
22. Garcia-Ortega M, Knobel H, Mirada A. Sensitization to human insulin. Br Med J 1984;*288*:1271.
23. Beurey J, Jeandidier P, Bermont A. Les complications dermatologiques des traitements antidiabétiques. Ann Dermatol Syphil 1966;*93*:13-42.
24. Balsells MC, Corcoy RM, Lleonart RB, Pujol RV, Mauricio DP, Garcia AP et al. Primary allergy to human insulin in patient with gestational diabetes. Diabetes Care 1991;*14*:423-4.
25. Loeb JA, Herold KC, Barton KP, Robinson LE, Jaspan JB. Systematic approach to diagnosis and management of biphasic insulin allergy with local anti-inflammatory agents. Diabetes Care 1989;*12*:421-3.
26. Van Haeften T. Clinical significance of insulin antibodies in insulin-treated diabetic patients. Diabetes Care 1989;*12*:641-8.
27. Sanchez M, Paolillo M, Suarez Chacon R, Camejo M. Protamine as a cause of generalized allergic reactions to NPH insulin. Lancet 1982;*i*:1243.
28. Hulshof M, Faber WR, Kniestedt WF, Boeree MJ, Kreek P. Granulomatous hypersensitivity to protamine as a complication of insulin therapy. Br J Dermatol 1992;*127*:286-8.
29. Nell L, Thomas J. Frequency and specificity of protamine antibodies in diabetic and control subjects. Diabetes 1988;*37*:172-6.
30. Feinglos M, Jegasothy B. « Insulin » allergy to zinc. Lancet 1979;*i*:122-4.
31. Mirouze J, Monnier L, Rodier M, Balducci JP, Orsetti A, Clot J. Urticaire insulinique chronique. Efficacité thérapeutique et bonne tolérance des insulines humaines. Nouv Press Med 1982;*11*:3121-4.
32. De Shazo RD, Mather P, Grant W, Carrington D, Frentz JM, Lueg M et al. Evaluation of patients with local reactions to insulin with skin tests and *in vitro* techniques. Diabetes Care 1987;*10*:330-6.
33. Sodoyez JC, Koch M, Sodoyez-Goffaux F. Anticorps anti-insuline : méthodologie et implications cliniques. Diabete Metab 1991;*17*:255-69.
34. Soto-Aguilar MC, de Shazo RD, Morgan JE, Mather P, Ibfahim G. Total IgG and IgG subclass specific antibody responses to insulin in diabetic patients. Ann Allergy 1991;*67*:499-503.
35. Grimaldi A. Allergie à l'insuline. Conc Med 1991;*113*:3186.
36. Holdaway I, Wilson J. Cutaneous insulin allergy responsive to oral desensitisation and aspirin. Br Med J 1984;*289*:1565-6.

© Masson, Paris 1996

INVESTIGATIONS IMMUNOALLERGOLOGIQUES DANS UNE TOXIDERMIE AU DILTIAZEM (TILDIEM 300 LP)

IMMUNO-ALLERGOLOGICAL INVESTIGATIONS IN A DRUG ERUPTION DUE TO DILTIAZEM (TILDIEM 300 LP)

A. BARBAUD, Ph. TRECHOT**, M.N. GILLET-TERVER*,*
*F. ZANNAD***, J.L. SCHMUTZ**

* Service de Dermatologie
HOPITAL FOURNIER
36, Quai de la Bataille
54000 NANCY

** Centre de Pharmacovigilance
HOPITAL CENTRAL
54000 NANCY

*** Service de Cardiologie
HOPITAL CENTRAL
54000 NANCY

Le diltiazem est un inhibiteur calcique agissant sur les fibres musculaires myocardiques et lisses, utilisé comme anti-angoreux ou anti-hypertenseur. La fréquence des toxidermies au diltiazem est évaluée à 6,5 cas par million de prescriptions (1).

Nous rapportons le cas d'une femme âgée de 59 ans hospitalisée pour une toxidermie généralisée fébrile apparue 8 jours après la mise en route d'un traitement par diltiazem (TILDIEM 300 LP®) pour une hypertension artérielle traitée antérieurement par l'association hydrochlorothiazide et amiloride (MODURETIC®). Cette patiente ne prenait aucun autre médicament et n'avait pas d'antécédent d'allergie médicamenteuse. Un prurit généralisé était apparu 5 jours après le début du traitement, puis rapidement s'était développée une dermatose généralisée érythémateuse, papulo-vésiculeuse avec un important oedème palpébral érythémateux bilatéral. Trois lésions en cocarde étaient retrouvées sur les avant-bras et il n'existait pas d'atteinte muqueuse associée. Cette toxidermie s'associait à une asthénie et une fièvre à 39,5° C. Le reste de l'examen clinique était normal.

Biologiquement étaient observés un syndrome inflammatoire (VS : 36/70), une hyperleucocytose à polynucléaires (13 000 polynucléaires neutrophiles/mm^3) une cytolyse hépatique modérée (transaminases à 3 fois la normale) avec sérologies virales négatives et échographie hépatique normale. Il n'était pas retrouvé de complexes immuns circulants ni de consommation du complément. La biopsie cutanée objectivait une vésiculation intra-épidermique avec polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes. L'immuno-fluorescence directe cutanée était négative. Le remplacement du diltiazem par du célipropol (CELECTOL 200®) a entraîné une disparition de l'ensemble de la symptomatologie clinique et biologique en 10 jours.

Le bilan allergologique réalisé 7 semaines après la régression de la toxidermie a comporté des patch-tests aux inhibiteurs calciques suivants : TILDIEM 60®, ADALATE 10® (nifédipine), ISOPTINE 120® (vérapamil), LOXEN 20® (nicardipine), NIDREL 20® (nitrendipine), NIMOTOP 10® (nimodipine) ; des prick-tests au TILDIEM 25® injectable et au NIMOTOP 10® injectable ; un TDBH au TILDIEM 60®. Seul le patch-test au TILDIEM 60® (non biopsié) était positif à ++ à 96 et 120 H (les patch-tests réalisés avec certains excipients du TILDIEM 60® étaient négatifs). Cinq témoins avaient des patch-

tests négatifs au TILDIEM 60®. Les patch-tests de la batterie standard de l'International Contact Dermatitis Research Group étaient négatifs. Il n'existait pas de terrain atopique (IgE normales, PHADIATOP® et tests cutanés d'allergie immédiate aux pneumallergènes négatifs).

DISCUSSION

Nous rapportons un nouveau cas de toxidermie au diltiazem à type d'exanthème papulo-vésiculeux proche, sans en avoir les critères complets cliniques et histologiques définis par BEYLOT (1), d'une pustulose exanthématique.

Parmi les inhibiteurs calciques, le diltiazem est le plus souvent en cause dans la survenue des toxidermies aux cliniques variées : exanthème maculo-papuleux (2), urticaire (2), dermite exfoliative (3), pustulose exanthématique (4), dermatose lichénienne parfois photosensible (2, 5), vascularite (6), érythème polymorphe (7, 8) et exceptionnellement un syndrome de Lyell, une éruption pseudo-lupique (2). Une cytolyse hépatique peut être associée comme nous l'avons observé dans notre cas, à la toxidermie. Comme chez notre patiente, la survenue de la toxidermie est le plus souvent précoce après le début du traitement.

Peu d'investigations immuno-allergologiques ont malheureusement été rapportées dans les cas publiés de toxidermies au diltiazem. Comme l'ont récemment rapporté CAMARASA et SERRA-BALDRICH (9) avec 28,7 % de patch-tests pertinents positifs aux médicaments dans 87 cas de toxidermies, cette méthode d'investigation peut être intéressante dans le bilan étiologique des toxidermies. Dans celles dues au diltiazem, le patch-test peut être positif comme dans les deux observations rapportées par ROMANO et Coll. de rashs maculo-papuleux, dans les bilans desquels sont observés des patch-tests au diltiazem (testé à 10 mg/ml) positifs à 48 et 72 heures et des intradermo-réactions au diltiazem (testé à 100 µg/ml) positives de 24 à 72 heures.

La positivité d'un patch-test fait suspecter un mécanisme immuno-allergique de type IV à l'origine de la toxidermie que nous avons observée, sans élément en faveur d'un mécanisme de type I (prick-test, TDBH

négatifs) ou de type III (complexes immuns circulants, consommation du complément, immuno-fluorescence directe cutanée négatifs).

Notre bilan n'a pas permis d'observer de polysensibilisation de classe aux inhibiteurs calciques. Dans l'observation de BORENSTEIN (11), le remplacement du diltiazem par la nifédipine s'accompagne d'une disparition de la toxidermie.

1. BEYLOT C., BIOULAC P., DOUTRE M.S.
Pustuloses exanthématiques aiguës généralisées : à propos de 4 cas.
Ann Dermatol Venereol 1980, 107 : 37-48

2. STERN R., KHALSA J.
Cutaneous adverse reactions associated with calcium channel blockers.
Arch Intern Med 1989, 149 : 829-32.

3. LAVRIJSEN A., VAN DIJKE C., VERMEER B-J.
Diltiazem-associated exfoliative dermatitis in a patient with psoriasis.
Acta Derm Venereol 1986, 66 : 536-37.

4. LAMBERT D., DALAC S., BEER F. et coll.
Acute generalized exanthematous pustular dermatitis induced by diltiazem.
Br J Dermatol 1988, 296 : 308-09.

5. HASHIMOTO M., TANAKA S., HORIO T.
Photosensitivity due to diltiazem hydrochloride.
Acta Derm Kyoto 1979, 74 : 181-86.

6. SHEEHAN-DARE R., GOODFIELD M.
Severe cutaneous vasculitis induced by diltiazem.
Br J Dermatol 1988, 119 : 134.

7. BERBIS P., ALFONSO M., LEVY J. et coll.
Diltiazem associated erythema multiforme.
Dermatologica 1989, 179 : 90-4.

8. TAYLOR J., CLEARLY J., ATKINSON R.
Stevens-Johnson syndrome associated with diltiazem.
Clin Pharm 1990 ; 9 : 948-50.

9. CAMARASA J.G., SERRA-BALDRICH
Patch-test in drug eruptions. (communication personnelle)
In 1st Congress of the European Society of Contact Dermatitis, Bruxelles, Belgique, 8-10/10/92 : pp 23

10. BORENSTEIN D., BERRETTI B., GRUPPER Ch.
Toxidermie au Diltiazem.
Nouv Dermatol 1988, 6-7 : 646.

11. ROMANO A., PIETRANTONIO F., GACOVICH A. et coll.
Delayed hypersensitivity to diltiazem in two patients.
Ann Allergy 1992, 69 : 31-2.

Clinical Reviews in Allergy and Immunology
© Copyright 1995 by Humana Press Inc.
1080-0549/95/253–263/$6.20

Place of Excipients in Drug-Related Allergy

Annick Barbaud

Department of Dermatology, Fournier Hospital,
36 Quai de la Bataille, 54000 Nancy, France

Introduction

An excipient is an inert ingredient in which a drug is incorporated to facilitate drug absorption. In this article, I include all the substances different from the active ingredient that can induce an allergy to a medication after oral or parenteral administration. I discuss in detail the adverse reactions related to excipients in drugs. The adverse reactions occur rarely and have been investigated less than the allergic contact dermatitis owing to excipients and preservatives in topical ointments, transdermal systems, eyedrops, nasal solutions, and suppositories.

Encapsulation Agents

Cellulose Derivatives (1–4)

Carboxymethylcellulose can increase the allergenic potential of penicillin because the hapten metabolites of this betalactam bind covalently to carbohydrate derivatives. By themselves, these polymerized celluloses are practically nonallergenic. Three cases of anaphylactic shock with angio-edema have been reported owing to carboxymethylcellulose used with corticosteroids in solution *(3,4)*.

Emulsifying Agents, Solvents

Dextrans (1,2,5)

These long-chain polysaccharides of glucose have a sensitizing potential, but some adverse effects have been reported when they are used as excipients, apart from a few cases of anaphylaxis when used in BCG vaccines. Interestingly, Rudin et al. *(5)* reported a case in which shock developed in a newborn a few minutes after injection of a BCG vaccine containing dextran. The baby's mother was sensitized to this

carbohydrate polymer and the baby's reaction may have been linked to the formation of immune complexes (dextran–antidextran antibodies) with passage of maternal antidextran immunoglobulins G (IgG) across the placenta from mother to baby.

Gums (1,6)

These agents are used to suspend very insoluble drug powders or as excipients in tablets. The most commonly used are arabic (a derivative of *Acacia senegal*), tragacanth, and karaya gums. Some cases of urticaria, asthma, and pruritus have been reported with arabic and tragacanth gums contained in antihistamines or corticosteroids tablets *(6)*.

Gelatin

This protein, an animal collagen derivative, is the most widely used component in manufacturing drug capsules. It is also used as an excipient in injectable solutions. Gelatin is well tolerated when used as an excipient, unlike what is observed when it is used as a plasma expander. In the United States, the measles-mumps-rubella (MMR) vaccine contains gelatin as an excipient. Anaphylactic shock occurred in a young woman with a history of food allergy to gelatin, the first time she was immunized with the MMR vaccine. She had positive prick tests for this vaccine and for different gelatins and the presence of antigelatin and anti-MMR vaccine IgE *(7)*.

Gluten

Gluten should not be present in oral medications prescribed for subjects with celiac disease or dermatitis herpetiformis.

Cremophor EL (Polyoxyethylated Castor Oil) (1,2,8–11)

This substance is used as a solvent in injectable steroid solutions, liposoluble vitamins including vitamin K, miconazole *(8)*, cyclosporin A *(9)*, and anesthetic agents *(10)*. It can induce anaphylactic reactions with rash, flush, and urticaria. The mechanisms involved in these reactions are debatable. Type 1 hypersensitivity (a few cases with positive skin tests have been reported), activation of the complement system, anti-Cremophor EL-IgG *(10)*, or release of anaphylatoxins may be involved *(1,11)*.

Albumins

The first artificial insemination with a solution containing sperm, penicillin, streptomycin, and bovine serum albumin (BSA) was followed by angioedema and urticaria in a young woman whose occupa-

tion involved handling of laboratory animal sera. The causal relationship with BSA was confirmed by positive prick tests and radioimmunosorbent tests (RAST) with different animal serum albumins *(12)*. BSA has also induced serum sickness following an artificial insemination and anaphylaxis after injection of autologous bone marrow *(1,12)*.

Egg albumin is used in oral medications containing erythromycin to mask the taste of this antibiotic. It is not known to cause any allergic reaction when used in this way *(1)*.

Synthetic Sweeteners

Saccharin (1,2,13,14)

Saccharin (benzosulfimide) is a sulfonamide analog. It can induce crossreactions with sulfonamides. When used as a synthetic sweetener in food, it can cause maculopapular rash, pruritus, urticaria, photosensitization *(13)*, digestive disturbances, or tachycardia. It appears to be rarely involved in adverse reactions when used as a sweetener in drug formulations *(14)*.

Aspartame (1,2,15–17)

Aspartame is a dipeptide sweetener (L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester) that has been suspected to provoke pruritus, urticaria, angioedema, granulomatous septal or lobular panniculitis *(15,16)*, and asthmatiform dyspnea *(1,17)*. It does not appear to be implicated in drug allergy.

Vehicles

Oils

The use of oils as drug vehicles appears to be well tolerated. Only granulomas on the site of injection (sterile oily abscesses) have been reported with intramuscular injection of solutions of perphenazine enanthate or aurothio-glucose containing sesame seed oil *(18)*.

Alcohols (1,2,19–22)

When used as excipients in topical ointments or in drug reservoirs in transdermal systems, alcohols can induce contact dermatitis or urticaria *(19)*. Ingestion of ethyl alcohol can exacerbate urticaria and, more rarely, can induce a true sensitization *(20)*, but to this author's knowledge, this has not been reported with oral or parental medications containing ethyl alcohols.

When used as a preservative, benzyl alcohol can cause contact dermatitis with topical ointments or on the solution injection site. Shmunes *(21)* reported a case of allergy to benzyl alcohol used as a pre-

servative in a solution of sodium tetradecyl sulfate, an agent used in sclerotherapy of varicose veins. Wilson et al. *(22)* described a reaction caused by an injectable heparin containing this preservative.

Propylene Glycol (1,2,23,24)

Propylene glycol is a hygroscopic liquid widely used in topical ointments, but also in oral medications (oral antibiotics and injectable diazepam, lorazepam, phenytoin, hydralazine, etc.). It causes local irritation, contact dermatitis, or urticaria when used in topical agents, but systemic allergic manifestations after ingestion of propylene glycol in drugs are rare *(23)*. Ingestion of propylene glycol can induce systemic endogenous eczema in subjects previously sensitized by topical administration *(24)*. To this author's knowledge, this event described with ingestion of propylene glycol in food seasonings has not been reported with drugs.

Stabilizing Agents—Antioxidants

Ethylenediamine (1,2,25–28)

Contact dermatitis occurring after occupational exposure or topical application of an ointment containing ethylenediamine is not rare. Ethylenediamine is also found in drugs that contain aminophylline, whether for oral, intravenous, or rectal administration. It is used as a stabilizing agent of theophylline. Allergy to ethylenediamine in aminophylline can cause erythroderma, urticaria, maculopapular rashes, and exfoliative dermatitis *(1,2,25)*. It can develop in subjects previously sensitized to ethylenediamine via topical application *(25)*. Recently, Urbani *(26)* reported an urticarial reaction at needle-puncture sites during mesotherapy with aminophylline prescribed for treatment of excess adipose tissue in the thighs. Most often patients sensitized to aminophylline have positive epicutaneous or intradermal test reactions to aminophylline and ethylenediamine but not to theophylline *(26)*. Skin tests may be negative, according to de la Hoz et al. *(27)*. Histamine release tests could be of interest in such cases to diagnose ethylenediamine allergy. Cross-sensitizations have been reported between ethylenediamine, hydroxyzine, and piperazine, when the latter used as an antihelminthic compound is metabolized to ethylenediamine *(28)*.

Sulfites (1,2,29–33)

Sulfites are sulfur dioxide salts which are widely used as antioxidants in food and drugs. They may be present in many different medications, but are found mainly in local anesthetic solutions including those containing epinephrine and in some injectable antibiotics, corticosteroids, dopamine, isoproterenol, and in bronchodilator inhalational

agents. Most allergic reactions are associated with sulfites contained in food. They mostly occur in asthmatic patients and induce exacerbation of asthma, urticaria, angioedema, flush, or even fatal anaphylactic shock, pruritus, and, more rarely, leukocytoclastic vasculitis, or worsening of atopic dermatitis *(1,2,29–32)*. The mechanism involved in adverse reactions to sulfites has not been elucidated and may be a multifactorial process: parasympathetic nerve stimulation by a direct irritant effect of inhaled sulfites, deficit in sulfite oxidase, pseudoallergic mechanism or immediate allergy mediated by IgE. The sensibility of skin tests to sulfites is weak. The oral provocation test is better, but it must be conducted with extreme caution. In drugs, sulfites have been demonstrated to cause paradoxal worsening of asthma attacks when bronchodilator inhalational agents are used *(31)*. After injection of local anesthetic agents containing sulfites and/or epinephrine *(33)*, they have caused angioedema, urticaria, and reactivation of sulfites' occupational-related contact dermatitis.

Dyes

Dyes and preservatives can induce food allergies with development of urticaria or asthma *(34,35)*. They are rarely involved in drug allergies. As pointed out by Michaëlsson and Juhlin *(34)*, the persistence of urticaria despite a free of dyes and/or sensitizing preservatives regimen could be related to ingestion of drugs containing such excipients.

Azo Dyes (1,2,34–40)

The most common azo dyes are tartrazine, sunset yellow, amaranth, or Ponceau red. Tartrazine (yellow dye No. 5, E 102) can induce anaphylactoid reactions, urticaria, angioedema, rashes, rhinitis, asthma, purpura *(36)*, or exacerbation of atopic dermatitis *(37)*. Estimates of aspirin allergy's frequency in combination with tartrazine intolerance in asthmatic patients varies widely in the literature *(35)*. In 1959, Lockey described the first cases of allergy to tartrazine used as a coloring agent in dexamethasone tablets. Since then, tartrazine has been implicated in the development of serious drug-related adverse reactions such as worsening of anaphylactic manifestations after administration of a theophylline formulation containing this dye *(39)*, cases of anaphylactic shock after ingestion of drugs containing tartrazine and sunset yellow *(40)*, and recurrence of purpura and angioedema after ingestion of pentazocine tablets containing this dye *(36)*.

Xanthene Dyes (1,41,42)

This group includes erythrosine, rhodamine, eosin Y, uranin, and fluorinated xanthene dyes (i.e., fluorescein). Erythrosine (tetraiodo-

fluroescein) is a food additive and a drug coloring agent which can induce urticaria, angioedema, asthma, rhinitis, or photosensitization *(41)*. Iodine contained in erythrosine can produce an increase in levels of protein-bound iodine and cause thyroid dysfunction *(42)*.

Preservatives

Benzoates (1,2,29,34–36,43–45)

Benzoic and monobenzoic acids have been implicated in the onset of some food-related asthmas, urticaria, anaphylaxis, and vasculitis. The frequency of combined sensitization to benzoates, aspirin, and tartrazine in asthmatic patients is often discussed in the literature *(34–36)*. Benzoic acid in drugs can perennialize urticaria in a sensitized patient *(34)*. It can trigger an anaphylactoid reaction to anesthetic drugs *(43)*, anaphylactic shock owing to heparin, purpura owing to cough syrups *(36)*, and vasculitis after administration of a medication containing benzoic acid combined with tartrazine *(44)*. Aminobenzoic acid contained in some vitamin preparations can induce urticaria *(45)*.

Phenol-Related Compounds (1,2,46,47)

They are used in injectable solutions such as in heparins (chlorocresol), vaccines (phenol), and insulins (phenol, metacresol). Chlorocresol can induce anaphylactoid reactions after IV administration of heparin *(1)*. It has been implicated in local reactions after subcutaneous injection of heparin in patients with negative skin tests to heparin *(46)*. Two cases of urticaria after isophane insulin have been attributed to metacresol based on positive prick tests with this preservative *(47)*.

Parabens (1,2,29,48–51)

These compounds are alkyl esters (methyl, ethyl, propyl, butyl) of para-hydroxybenzoic acid. They are widely used in topical ointments and cosmetics, and also as preservatives in oral and parenteral drug formulations. They mostly cause contact dermatitis when used in topical ointments. Injection of a local anesthetic agent containing methylparaben can trigger the reactivation of contact dermatitis in a patient previously sensitized to parabens *(48)*. Localized or systemic urticaria and anaphylactoid reactions have been reported with these preservatives following iv administration of corticosteroids *(49)*, delayed after oral administration of haloperidol *(1)*, but especially with use of local anesthetics *(50,51)*. Contact urticaria induced by a contraceptive gel formulation containing methylparaben has been reported *(50)*. It should be noted that methylparaben is toxic for cilia, and a high dose of local anesthetic containing this preservative can decrease clearance of bronchial mucus and lead to worsening of asthma *(1)*.

Thimerosal (1,2,52–61)

Thimerosal (sodium mercurothiolate) is synthesized from ethyl mercuric chloride and thiosalicylic acid. In contact dermatitis, sensitization to thiosalicyclic acid, to the mercuric fraction *(52)*, or even both may occur *(53)*. A few cases of cross-sensitizations between contact allergy to thimerosal and photoallergy to piroxicam have been reported. Thimerosal is used as a preservative in mercuric antiseptics, eyedrops, auricular solutions, and in some injectable preparations used for hyposensitization or immunization. Most sensitizations to thimerosal in nontopical medications have been reported with its use in vaccines *(54–58)*. It has been implicated in urticaria, anaphylaxis, rash, serious local reactions, and exacerbation of atopic dermatitis. Positive patch-tests to thimerosal are frequently observed (2–3.7% of patients tested in some series). Studies by Cox et al. *(56)* and Aberer *(57)* have shown that a positive patch-test to thimerosal is not a contraindication to immunization with solutions containing this preservative. Thimerosal allergy can trigger systemic exanthem following injection of tetanus gammaglobulins *(58)*, serious reactions on the site of injection of hyposensitization solution injection *(59)*, anaphylaxis after injection of heparin *(60)*, and laryngeal edema following the use of a local anesthetic spray formulation *(61)*.

Other Preservatives

Chlorobutanol used as a preservative in cancer chemotherapeutic agents, heparins, and cyanocobalamin has been associated with anaphylactic shock after heparin injection *(62)* and angioedema with vitamin B12 therapy *(1)*. Formaldehyde has been implicated in the development of urticaria, eight weeks after tetanus immunization *(63)* and exacerbation of a contact dermatitis of hands owing to formaldehyde after administration of a hepatitis B vaccine *(64)*. In these two cases, the preservative used in the vaccine solutions was formaldehyde.

Adjuvants

Aluminium Hydroxide (63–66)

Aluminum salts are used as adsorbants in some vaccines *(65,66)* and in hyposensitization solutions *(67,68)*. Aluminum allergy could be owing to the persistence of aluminum metal salts on the site of injection, as demonstrated with absorption spectrometry. It may cause persistent painful skin nodules. Epicutaneous tests with aluminum chloride are inconsistently positive in patients who develop granulomas on the site of injection.

Zinc Oxide (69,70)

This agent is used in insulin preparations. Delayed allergic reactions localized at the site of insulin injection *(69)* or systemic urticaria *(70)* because of zinc have been reported.

Protamine Sulfate (45,71,72)

Protamine is extracted from fish testes and sperm. It is used in the treatment of cardiovascular disorders to neutralize the effects of heparin and also as an adjuvant in insulin preparations. In this latter use, it can induce immediate or delayed allergic reactions, granuloma formation or urticaria *(47,72)*.

Contaminants Arising from Techniques Used in Drug Manufacturing

Traces of Contaminants from Animal Tissues Used in the Drug Extraction Process

Some medications such as heparins (extracted from pig intestinal mucosa, bovine lung tissue) and animal-derived insulins (bovine or porcine pancreatic extracts) formerly contained trace amounts of animal proteins which have induced allergic reactions including anaphylactic shock. Modern purification techniques have eliminated this problem.

Traces Arising from Manufacturing Media

Trace amounts of contaminants from media used for manufacturing of some products such as vaccines can be found in the finished drug.

Antibiotics in Vaccines

Antibiotics are used in the manufacturing process of a large number of vaccines. Although these antibiotics (neomycin, streptomycin, kanamycin, aureomycin) may be present in the final vaccine solution, they have never been implicated in a vaccine allergy.

Egg Protein and Vaccines

Mumps, rubella, yellow fever, and influenza vaccines, prepared on embryonic egg media, can contain egg proteins. Most allergic reactions reported with these vaccines have occurred after administration of rubella and/or mumps vaccines *(73–75)*. These reactions are characterized by a rapid onset of dyspnea, asthma, angioedema, urticaria, or anaphylactic shock following vaccine injection. The causal relationship with egg proteins is unquestionable in some cases in light of positive prick tests and intradermal test reactions to egg proteins, by the presence of antivaccine IgE and antiegg IgE in the sera *(74,75)*.

Proteins Obtained by Genetic Recombination

Some proteins are now obtained by genetic recombination, for example, HBs antigen or insulin. DNA coding for protein synthesis is introduced in a vector such as CHO cells or *Saccharomyces cerevisiae* (beer's yeast) for the HBs antigen, and *Escherichia coli* or *S. cerevisiae* for recombinant insulins. An anaphylactic shock occurring after the first injection of Engerix B® hepatitis B vaccine in a young woman known to have food allergy to yeasts has been attributed to an allergy to the vector used for preparation (*S. cerevisiae*) *(76)*.

References

1. Weiner, M. and Bernstein, I. L. (1989), *Adverse Reactions to Drug Formulation Agents. A Handbook of Excipients*, Marcel Dekker, New York.
2. Zurcher, K. and Krebs, A. (1992), *Cutaneous Drug Reactions. An Integral Synopsis of Today's Systemic Drugs*, 2nd ed., Karger, Basel, Switzerland.
3. Müller, E., Pevny, I., and Metz, G. (1973), *Hautarzt* **24**, 317,318.
4. Beaudoin, E., Kanny, G., Gueant, J. L., and Moneret-Vautrin, D. A. (1992), *Allergie Immunol.* **24**, 333–335.
5. Rudin, Ch., Amacher, A., and Berglund, A. (1991), *Lancet* **337**, 377.
6. Rubinger, D., Friedlander, M., and Superstine, E. (1978), *Lancet* **i**, 689.
7. Kelso, J., Jones, R., and Yunginger, J. (1992), *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**, 351.
8. Stevens, D. (1983), *Drugs* **26**, 347–354.
9. Van Hoof, J-P., Bessems, P., and Beumann, G. H. (1987), *Lancet* **i**, 1456.
10. Moneret-Vautrin, D. A., Laxenaire, M. C., and Viry-Babel, F. (1983), *Br. J. Anaesth.* **55**, 469–471.
11. Smith, J. (1987), *Practitioner* **231**, 579–583.
12. Blay, F., Tomb, R., Vouillot, C., Thierry, R., Grosshans, E., and Pauli, G. (1983), *Contact Dermatitis* **28**, 119.
13. Gordon, H. (1972), *Cutis* **10**, 77–81.
14. Birkbeck, J. (1989), *N. Z. Med. J.* **102**, 24.
15. Novick, N. (1985), *Ann. Intern. Med.* **104**, 206,207.
16. Mc Cauliffe, D. and Poitras, K. (1991), *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**, 298–300.
17. Garriga, M., Berkebile, C., and Metcalfe, D. (1991), *J. Allergy Clin. Immunol.* **87**, 821–827.
18. Sowa, J. (1993), *Arth. Rheum.* **36**, 1632,1633.
19. Ophaswongse, S. and Maibach, H. (1994), *Contact Dermatitis* **30**, 1–6.
20. Elphinstone, P., Kobza Black, A., and Greaves, M. (1985), *J. Roy. Soc. Med.* **78**, 341,342.
21. Shmunes, E. (1984), *Arch. Dermatol.* **120**, 1200–1201.
22. Wilson, J., Solimando, D., Edwards, M. (1986), *Drug. Intell. Clin. Pharm.* **20**, 689–691.
23. Huriez, C., Agache, P., and Martin, P. (1966), *Rev. Fr. Allerg.* **6**, 200.
24. Catanzaro, J. and Smith, J.-G. (1991), *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**, 90–95.
25. De Shazo, R. (1981), *Arch. Intern. Med.* **141**, 1267.
26. Urbani, C. (1994), *Contact Dermatitis* **31**, 198.
27. de la Hoz, B., Perez, C., Tejedor, M. A., Lazaro, M., Salazar, F., and Cuevas, M. (1993), *Ann. Allergy* **71**, 452–454.
28. Eedy, D. (1993), *Contact Dermatitis* **28**, 48,49.
29. Reynolds, J. E. F. (1993), *Martindale. The Extra Pharmacopoeia*, 30th ed., The Pharmaceutical Press, London.

30. Settipane, G. (1984), *J. Am. Acad. Dermatol.* **10,** 1077–1080.
31. Simon, R. (1986), *Ann. Allergy* **56,** 281–288.
32. Przybilla, B. and Ring, J. (1987), *Hautarzt* **38,** 445–448.
33. Dooms-Goossens, A., Gidi de Alam, A., Degreef, H., and Kochuyt, A. (1989), *Contact Dermatitis* **20,** 124–126.
34. Michaëlsson, G. and Juhlin, L. (1973), *Br. J. Dermatol.* **88,** 525.
35. Weber, R., Hoffman, M., Raine, D., and Nelson, H. (1979), *J. Allergy Clin. Immunol.* **64,** 32–37.
36. Michaëlsson, G., Pettersson, L., and Juhlin, L. (1974), *Arch. Dermatol.* **109,** 49–52.
37. Devlin, J. and David, T. (1992), *Arch. Dis. Child* **67,** 709–711.
38. Smith, L. and Slavin, R. (1976), *J. Allergy Clin. Immunol.* **58,** 456–470.
39. Desmond, R. and Trautlein, J. (1981), *Ann. Allergy* **46,** 81,82.
40. Trautlein, J. and Mann, W. (1978), *Ann. Allergy* **41,** 28,29.
41. Vesely, B., Bodmer, R., Guerin, B., and Girard, J. P. (1985), *Rev. Fr. Allergol.* **25,** 7–11.
42. Haas, S. (1970), *Ann. Intern. Med.* **72,** 549–552.
43. Moneret-Vautrin, D. A., Moeller, R., and Malingrey, L. (1982), *Anaesth. Intens. Care* **10,** 156,157.
44. Kubba, R. and Champion, R. (1975), *Br. J. Dermatol.* **93,** 61s–62s.
45. Thomas, D., Pursley, T., and Jorizzo, J. (1984), *Arch. Dermatol.* **120,** 961,962.
46. Hancock, B. and Naysmith, A. (1975), *Br. J. Med.* **iii,** 746,747.
47. Brooks, A. and Roseveare, C. (1993), *Diabetic Med.* **10,** 33.
48. Aeling, J. and Nuss, D. (1974), *Arch. Dermatol.* **110,** 640.
49. Nagel, J., Fuscaldo, J., and Fireman, P. (1977), *JAMA* **237,** 1594,1595.
50. Henry, J., Tschen, E., and Becker, L. (1979), *Arch. Dermatol.* **115,** 1231,1232.
51. Ledermann, D., Freedman, M., Kerpel, S., and Lumerman, H. (1980), *Oral Surg.* **49,** 28–33.
52. Pirker, C., Möslinger, T., Wantke, F., Götz, M., and Jarisch, R. (1993), *Contact Dermatitis* **29,** 152–154.
53. Moller, H. (1994), *Contact Dermatitis* **31,** 209–213.
54. Rietschel, R. and Adams, R. (1990), *Dermatol. Clin.* **8,** 161–164.
55. Forstrom, L., Hannuksela, M., Kousa, M., and Lehmuskallio, E. (1980), *Contact Dermatitis* **6,** 241–245.
56. Cox, N. and Forsyth, A. (1988), *Contact Dermatitis* **18,** 229–233.
57. Aberer, W. (1991), *Contact Dermatitis* **24,** 6–10.
58. Tosti, A., Melino, M., and Bardazzi, F. (1986), *Contact Dermatitis* **15,** 187,188.
59. Tosti, A., Guerra, L., and Bardazzi, F. (1989), *Contact Dermatitis* **20,** 173–176.
60. Chastagner, P., Morali, A., Trechot, P., May, T., and Vidailhet, M. (1988), *Presse Med.* **17,** 795,796.
61. Mainach, H. (1975), *Contact Dermatitis* **1,** 221.
62. Dux, S., Pitlik, S., Perry, G., and Rosenfeld, J. B. (1981), *Lancet* **i,** 149.
63. Fabry, H. (1968), *Cont. Derm. Newsletter* **3,** 51.
64. Heyderman, E. and Brown, B. (1986), *Lancet* **i,** 522,523.
65. Cosnes, A., Flechet, M-L., and Revuz, J. (1990), *Contact Dermatitis* **23,** 65–67.
66. Kaaber, K., Otkjaer Nielsena, O., and Veien, N. (1992), *Contact Dermatitis* **26,** 304–306.
67. Castelain, P-Y., Castelain, M., Vervloet, D., Garbe, L., and Mallet, B. (1988), *Contact Dermatitis* **19,** 58–60.
68. Lopez, S., Pelaez, A., Navarro, L. A., Montesinos, E., Morales, C., and Carda, C. (1994), *Contact Dermatitis* **31,** 37–40.
69. Feinglos, M. and Jegasothy, B. (1979), *Lancet* **i,** 122–124.
70. Gin, H., and Aubertin, J. (1987), *Diabetes Care* **10,** 789.

71. Hulshof, M., Faber, M., Kniestedt, W., Boeree, M., and Kreek, P. (1992), *Br. J. Dermatol.* **127,** 286–288.
72. Chenon, D., Fabro, M., Richard, J. L., Rimbaud, Y., Mirouze, J., and Blayac, J. P. (1989), *Presse Med.* **18,** 1297,1298.
73. Fasano, M. B., Wood, R., Cooke, S., and Sampson, H. (1992), *J. Pediatr.* **120,** 878–881.
74. Herman, J., Radin, R., and Schneiderman, R. (1983), *J. Pediatr.* **102,** 196–199.
75. Puvvada, L., Silverman, B., Bassett, C., and Chiaramonte, L. (1993), *Pediatrics* **91,** 835,836.
76. Brightman, C., Scadding, G., Dumbreck, L., Latchman, Y., and Brostoff, J. (1989), *Lancet* **i,** 903.

Analytical Cellular Pathology 14 (1997) 51–59
IOS Press

Sequential assessment of cell cycle S phase in flow cytometry: a non-isotopic method to measure lymphocyte activation *in vitro*

Ch. Kohler[a,*], M.N. Kolopp-Sarda[a], A. De March-Kennel[a], A. Barbaud[b], M.C. Béné[a] and G.C. Faure[a]
[a]*Laboratoire d'Immunologie, JE DRED 251, Faculté de Médecine & CHU de Nancy, France*
[b]*Service de Dermatologie, CHU de Nancy, Nancy, France*

Received 28 November 1996
Revised 5 March 1997
Accepted 19 March 1997

Abstract. Lymphocyte multiplication can be induced *in vitro* by mitogens or specific antigens, and is usually measured using isotopic methods involving tritiated thymidine. Cellular proliferation can also be analyzed by flow cytometry techniques based on cell cycle analysis through the measurement of DNA content. We applied this method to lymphocytes from 113 individuals, to evaluate lymphocyte proliferation after stimulation *in vitro* by a mitogen (phytohaemagglutinin, PHA) or a recall antigen (tetanus toxoid), using a kinetic approach with four points sequential measurements of the S and G2 phases over six days of culture. The proportion of cells in S phase after PHA stimulation was significantly higher than in controls overall and as early as on day three of the culture. Activation with a recall antigen significantly induced increasing S phase cell proportions up to day six. These data suggest that flow cytometric assessment of the S phase could be a useful alternative to isotopic methods measuring lymphocyte reactivity *in vitro*.

Keywords: Lymphocyte activation, flow cytometry, mitogens, cell cycle, phytohaemagglutinin, tetanus toxoid

1. Introduction

Proper signals of lymphocyte activation induce the proliferation of these cells, both *in vivo* and *in vitro*. The proliferation pathway used by lymphocytes is that of all nucleated cells, and involves a transition from the G0 state into the cell cycle. During the latter, several stages precede mitosis: proteins are synthesized during the G1 phase, that will later be used for the formation of new nuclear material. The DNA cell content subsequently increases during the 8 hrs of the S phase, from the euploid 2n amount to the 4n content of diploid G2 stage cells. The 2.5 to 3 hrs of the G2 phase are occupied by the duplication of centrioles and assembly of microtubules necessary for cell duplication during the sequential steps of mitosis (prophase, metaphase, anaphase and telophase) [12]. The two daughter cells resulting from the ultimate cytodieresis both have a 2n DNA content. They may return

*Corresponding author: Ch. Kohler, MD, PhD, Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre les Nancy, France. Tel.: +33 03 83 59 28 58; Fax: +33 03 83 44 60 22; E-mail: kohlerc@spieao.u-nancy.fr.

0921-8912/97/$8.00 © 1997 – IOS Press. All rights reserved

› the G0 phase, or eventually reenter the cell cycle. One of the developments of flow cytometry :chniques has been an accurate evaluation of the amount of DNA contained in individual cells in ıspension [13,22]. When this technique is applied to normal growing cells, it allows the assessment f the proportion of cells at each stage of the cell cycle. After permeabilizing the cell and nucleus ıembranes, fluorochromes are used to stain the DNA. Propidium iodide (PI) and ethidium bromide, 'hich are widely used, are intercalating agents binding DNA or RNA helices [11,21]. Other stains, ıch as Hoechst 33342, Hoechst 33258 or DAPI are specific for adenine or thymine, while some ntibiotics such as mithramycin or chromomycine A_3 bind guanines and cytidines [5,12,20].

In vitro, lymphocyte multiplication can be induced by specific antigens, that trigger monoclonal or ligoclonal proliferation of discrete specific lymphocyte subsets. Such mitogens as phytohaemagglu-nin (PHA) [17], concanavalin A or pokeweed mitogen (PWM) can also be used, which will more roadly stimulate the polyclonal cell population expressing mitogen receptors [23]. Mitogen-induced roliferation provides a good indication of the functional ability of lymphocytes to multiply. Recall ntigens can provide information on the sensitization state of the individual tested.

Tritiated thymidine incorporation has become the most common way to measure the lymphocyte roliferation induced by such activators *in vitro* [8], the amount of radioactivity emitted by the pelleted ells being proportional to the amount of newly synthesized DNA. However, this time-consuming and :dious method requires specific equipment and precautions as it implies the use of isotopic material. everal alternative methods have been published, using mitochondrial or DNA labels, surface markers lentification or cytokine assays [9,11,14,16,26].

It has been proposed that as activated lymphocytes enter the cell cycle, lymphocyte activation could lso be assessed by flow cytometry after DNA content labelling, by evaluating the presence of cycling ells following mitogenic stimulation [4]. These authors used a one time-point measurement after timulation with mitogens. Here we report on a method developed on this principle to use a kinetic pproach of *in vitro* lymphocyte activation by mitogens or antigens. In order to validate this technique, was applied to purified peripheral blood mononuclear cells to assess the lymphocyte response to HA and the recall antigen, tetanus toxoid. Evaluation of the percentage of cells in S phase appeared › be a reliable tool to measure the functional properties of peripheral blood lymphocytes (PBL), 'hile the kinetic approach we used confirmed that one time-point studies may be too limited for ntigen-specific assessment of lymphocyte proliferation.

. Materials and methods

.1. Patients

Peripheral blood samples were obtained from 113 adult individuals with antecedents of skin rashes, ossibly drug-induced, who were subjected to immunological investigations. The possible lymphocyte ysfunction associated to such drug adverse-effects prompted the assessment of lymphocyte reactivity ı *vitro*, prior to performing a series of skin tests in search of the culprit drug. None of these patients ıffered from any major immunological disease, notably from severe immune deficiency. All gave ıformed consent to blood sampling. Non-specific stimulation through mitogen activation was tested ɔr all 113 of them, and 45 were also tested for recall antigen responsiveness to tetanus toxoid.

2.2. Cell suspensions

Lymphocyte suspensions were prepared from 5 ml of sterile peripheral blood samples, by density gradient centrifugation on Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway), after dilution of the whole blood sample with sterile RPMI 1640 medium (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). After 30 min centrifugation at 400 g, lymphocytes were harvested and washed twice in RPMI. After the second washing, the cells were resuspended at 5×10^6 cells/ml in complete medium composed of RPMI supplemented by 1% HEPES (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France), 1% Ultroser (Gibco BRL) and 0.5% of a mixture of antibiotics (Penicillin 10 000 U/ml, Streptomycin 10 000 μg/ml, Fungizone 25 μg/ml; Gibco BRL). Cytocentrifugates of representative samples of the cell suspensions were examined after May Grünwald Giemsa staining. This permitted us to demonstrate that the cell suspensions obtained contained between 5 and 15% of monocytes. As lymphocytes were not further purified in these preparations, it was assumed that both the small proportion of monocytes and the population of B cells would be sufficient to act as antigen-presenting cells in antigen-specific stimulation.

2.3. Mitogen and antigen preparations

PHA was purchased from Sigma, and used at a concentration of 1 μg/ml in sterile complete RPMI. This optimal dilution was determined after a series of preliminary experiments with PHA diluted sequentially between 10 μg/ml and 0.01 μg/ml. Tetanus toxoid was used as is in the Tetavax® vaccine (Merieux, Lyons, France) preparation currently used in France. The content of a Tetavax® syringe was diluted in sterile complete medium yielding a final concentration of 0.8 UI/ml. The optimal Tetavax® dilution had also been experimentally determined.

2.4. In vitro activation of lymphocytes

Four wells culture plates (Nunc Maxisorp, Roskilde, Denmark) were used for cell culture. Five hundred microliters of the cell suspension (i.e., 5×10^5 lymphocytes) were placed in three of the wells. Then 500 μl of respectively complete RPMI, PHA solution or Tetavax® solution were added to the wells. The plates were identified, closed, and placed for 6 days in a 37°C incubator with a monitored water saturated and 6% CO_2 atmosphere (Sanyo, Osaka, Japan).

One hundred microliters aliquots from each cell suspension were harvested under sterile conditions on days 3, 4, 5 and 6 of the culture.

2.5. DNA analysis

The cells of each harvested aliquote were stained for DNA quantitation using a DNA-Prep (Coulter, Leukocyte Preparation, Hialeah, FL, USA), which distributes controlled volumes of first a permeabilizing solution, then a solution of PI and RNAse. After distribution of the reagents, the cells were allowed to stain for at least 15 min before being processed in flow cytometry.

A specific protocol devised for DNA content assessment was used on an XL flow cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA) after checking the cytometer laser alignment with calibrated beads (DNA Check, Coulter) in order to obtain the smallest peak coefficient variation (CV) while measuring DNA fluorescence on a linear scale. The cells were gated according to the surface and peak of the fluorescence signal, in order to avoid taking doublets into account. The histogram of linear fluorescence distribution was stored and later analyzed using polynomial analysis derived from the Dean and Jett

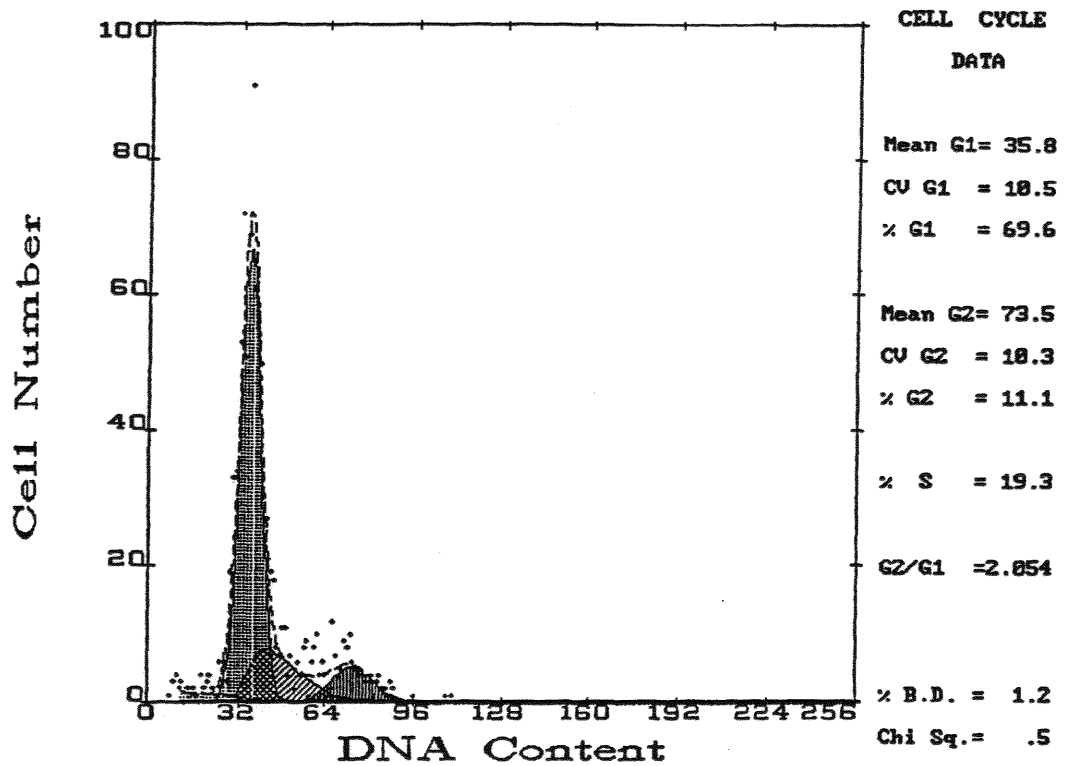


Fig. 1. Typical cell cycle analysis histogram obtained using the M-Cycle software after data acquisition of the flow cytometer.

model [6] with the specific software MultiCycle AV (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA; Fig. 1). This permitted the assessment of the proportions of lymphocytes and lymphoblasts in G0/G1, S and G2+M phases at each time point of the stimulation. The proportions of cells in S and G2+M phases, respectively, were collected as percentages of the gated population of singulets. A forward scatter/side scatter biparametric scattergram, that was not used for gating purposes, allowed us to verify the appearance of larger lymphoblasts in the course of cell activation.

2.6. Statistical analysis

Three factor analysis of variance was used to test the statistical significance of the kinetics of cell activation over time comparing control, PHA and Tetavax® wells. Two factor analysis of variance was then used for PHA and Tetavax® separately. Statistical analysis was performed using A.P. Stats (Micro-6, Nancy, France).

3. Results

3.1. S phase kinetics

The mean percentages (± SE) of cells in the S phase at the four time points tested for all the samples assessed, as well as the response ranges, are summarized in Table 1.

A small proportion of S phase cells was observed in control wells. There was no significant variation of this proportion over time, as shown by two factor variance analysis ($p = 0.17$). However,

Table 1
Sequential assessment of the percentage of cells in the S phase among peripheral blood mononuclear cells cultured for 3, 4, 5 or 6 days with medium alone, PHA or Tetavax®

	D3 mean % (± SE) [range]	D4 mean % (± SE) [range]	D5 mean % (± SE) [range]	D6 mean % (± SE) [range]
Control ($n = 113$)	1.63 (±0.16) [0–8.20]	1.99 (±0.14) [0–8.80]	2.24 (±0.18) [0–11.20]	2.31 (±0.22) [0–8.30]
PHA ($n = 113$)	13.05 (±1.01) [1.80–42.90]	10.44 (±0.83) [1.30–49.10]	9.48 (±0.88) [1.10–35.90]	7.07 (±0.59) [1.70–29.10]
Tetavax ($n = 45$)	3.57 (±0.58) [0–15.30]	4.07 (±0.38) [0.10–10.80]	3.98 (±0.41) [1.00–10.50]	4.11 (±0.47) [0.80–10.70]

examination of individual cases showed noticeable increases of the proportion of cells in S phase, at least at one time point, in 23 cases interpreted as a possible specific reactivity to one of the medium components, i.e., antibiotics, or as ongoing specific APC-mediated stimulation initiated *in vivo*.

In 10 cases, no significant increase of the proportion of S phase cells was detectable at any time after PHA stimulation, suggesting poor reactivity of the cells possibly related to anergy. For the 103 reactive patients (Fig. 2), maximum stimulation was noted on day 3 with, as a mean, 14% (±1.04) of the cells in the S phase. Two-factor analysis of variance confirmed the statistical significance of this increase ($F = 13.2$ (3/56); $p < 0.0001$). Day-to-day comparisons using a protected T test showed significant differences between D3 and D4 ($t = 2.71$), D3 and D5 ($t = 4.01$) and D3 and D6 ($t = 6.14$).

Tetavax® stimulation always was more moderate than PHA activation, but induced an overall continuing increase in the proportion of S phase cells, suggesting secondary activation of newly generated daughter cells. Statistical analysis of this increase using two-factor analysis of variance showed a significant difference ($F = 3.39$ (3/18); $p = 0.024$). Day-to-day comparisons showed significant differences between D3 and D4 ($t = 2.4$), D3 and D5 ($t = 2.85$) and D3 and D6 ($t = 2.51$).

Three-factor analysis of variance showed a highly significant difference between the three culture conditions ($F = 10.6$ (6/408); $p < 0.0001$).

Examination of individual profiles showed variability both in the intensity of the response and in its kinetics, as exemplified on Fig. 3, comparing characteristic Tetavax® activation curves from three different patients. Proliferation profiles differing from those of the same cells cultured with medium alone were observed in 78% of the cases. The difference was usually at least two-fold at the peak time point.

3.2. G2+M phase kinetics

These data are summarized in Table 2.

There were no G2+M cells in the control wells at any time, while PHA stimulated lymphocytes contained a maximum of 3% of G2+M cells on day 3. There was a very small proportion of such cells after Tetavax® stimulation, nevertheless higher than that from control wells, especially on day 3. Three-factor analysis of variance indicated a statistical significance of the differences between the three culture conditions ($F = 2.24$ (6/405); $p = 0.039$).

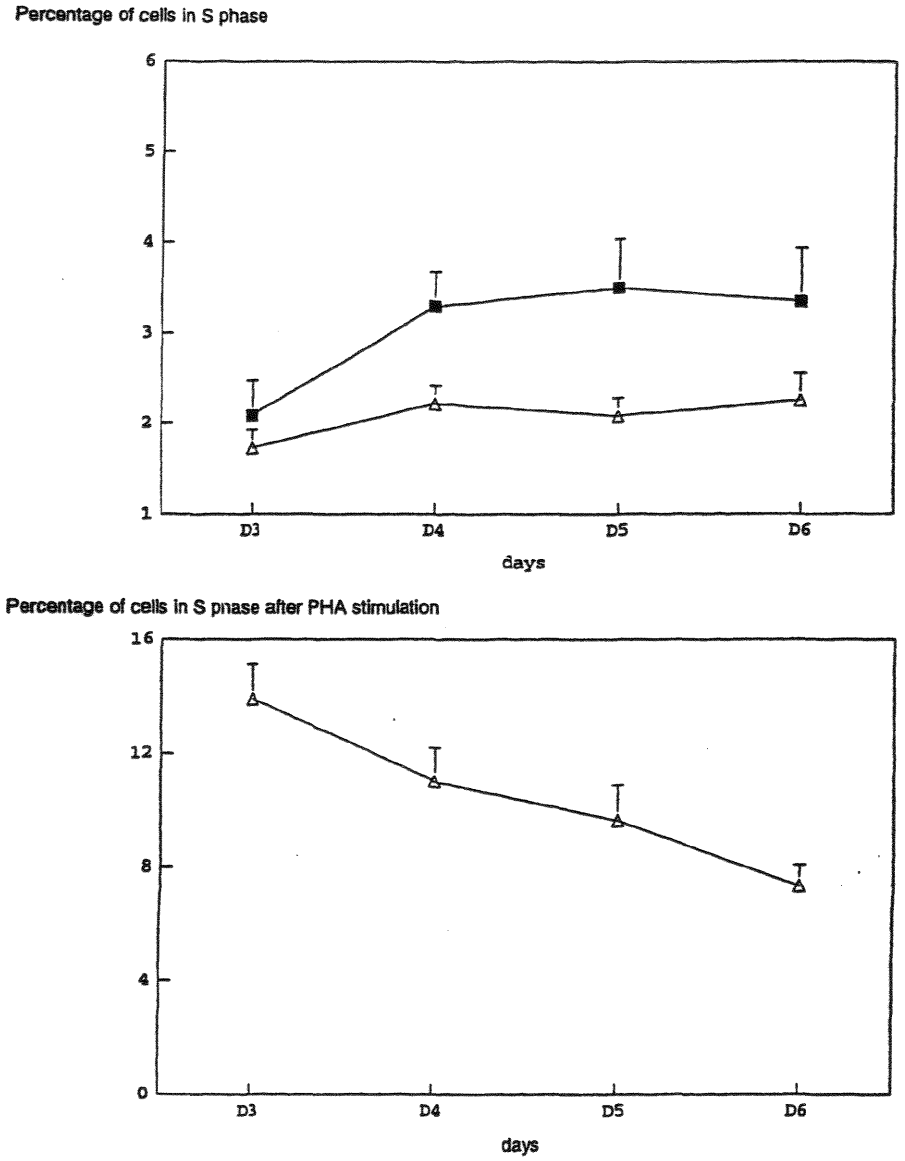


Fig. 2. Mean percentages (topped by S.E.) of peripheral blood mononuclear cells in S phase, assessed in flow cytometry on sequential aliquotes obtained after 3, 4, 5 and 6 days of culture in medium alone (△: control) or with Tetavax® (■) (top panel) or with PHA (△) (lower panel). These curves only take into account the population of 103 non-anergic patients who showed a significant proliferative response to PHA.

4. Discussion

This study establishes the feasability of sequential cell cycle analysis as a non-isotopic alternative to appreciate specific and non-specific lymphocyte activation *in vitro*.

Previous studies have suggested the use of whole blood samples to measure lymphocyte proliferation, both with tritiated thymidine [3] or after PI staining [4]. Our method rather uses purified PBL, since such suspensions are enriched in both lymphocytes and antigen-presenting cells (monocytes and B cells) and devoid of the short-lived polymorphonuclear releasing potentially deleterious compounds over the culture duration [18].

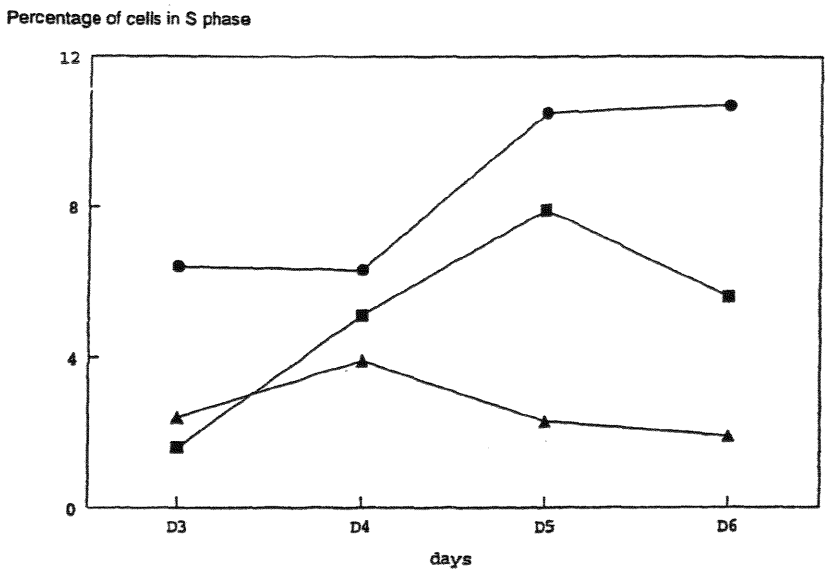


Fig. 3. Tetavax® proliferative response profiles of peripheral blood mononuclear cells from three individual patients, assessed by flow cytometric evaluation of the percentage of cells in the S phase on days 3, 4, 5 and 6 of culture. The kinetics are clearly different, maximal stimulation occurs at different time points, and might go unnoticed if using a single time point evaluation.

Table 2
Sequential assessment of the percentage of cells in G2+M among peripheral blood mononuclear cells cultured for 3, 4, 5 or 6 days with medium alone, PHA or Tetavax®

	D3 mean % (± S.E.)	D4 mean % (± S.E.)	D5 mean % (± S.E.)	D6 mean % (± S.E.)
Control (n = 113)	0.05 (±0.02)	0.04 (±0.01)	0.07 (±0.02)	0.09 (±0.02)
PHA (n = 113)	2.71 (±0.32)	2.37 (±0.27)	1.93 (±0.21)	1.86 (±0.22)
Tetavax (n = 45)	0.32 (±0.10)	0.24 (±0.07)	0.17 (±0.05)	0.25 (±0.09)

The method we developed provides, for stimulation with PHA or a recall antigen, comparable data as previously reported by other authors, which suggests that it could be an interesting alternative to classical isotopic techniques. Indeed, Fried et al. [11] showed, after growing the human hematopoietic cell line SK-L7, that the fractions of cells in the different phases of the cell cycle assessed after PI staining were in good agreement with those obtained from autoradiography after pulse labelling with tritiated thymidine. The kinetics we observed also compares well with data from Ferlini et al. [9] who evaluated the kinetics of lymphocyte activation on days 1, 2, 4 and 7 through mitochondrial uptake of rhodamine 123. These authors stressed the fact that their method allowed the identification of lymphocyte subsets, which can also be performed in multiple-colour flow cytometry using our method. Other alternatives, such as cytokine production *in vitro* which has been demonstrated to be induced by mitogens as well as antigens [16,26], have not always been correlated to PHA stimulation [7], and, as tritiated thymidine incorporation, do not allow the identification of cell subsets. Other authors such as Maino et al. [14], have proposed the use of membrane activation markers such as CD69, to assess lymphocyte responsiveness in short-term assays. They demonstrated that the expression of this surface antigen was correlated to the incorporation of tritiated thymidine. Our data, however, indicate that activation kinetics may vary between individuals, and stress the interest of sequential assessment of each patient's responsiveness profile.

As could have been expected, owing to the polyclonal stimulation it generates, PHA activation yielded the maximal signal observed on day 3, with highly significant numbers of S and G2+M cells at this time point. This is consistent with data from isotopic techniques indicating that 72 hrs is the optimal incubation time to demonstrate PHA stimulation [2,10]. Little is known of the expression of mitogen receptors by newly generated daughter lymphocytes, but our data suggest that there is no further stimulation of these cells by the remaining PHA, or that all has been bound to responding lymphocytes. Interestingly, about 9% of the patients tested failed to respond to PHA. This proportion is similar to what has been reported by Mathews et al. [15] in an isotopic study.

Conversely, the slower but sustained activation induced by Tetavax® suggests that the small subset of T cells expressing a specific TCR recognized a properly presented antigen both as resting or G1 peripheral cells and as newly generated daughter cells with the same TCR. This ongoing activation can best be seen by such sequential assessments by the curve of cumulative stimulation. The higher levels of S phase cells on day 6 are consistent with the classical 7 day culture used for isotopic tests allowing antigen-specific stimulation of T cells *in vitro* [1,15], but individual profile analysis demonstrated that this might not always be the optimal assessment time.

Both for mitogen and antigen activation, assessment of the proportion of cells in S phase appeared to be a better indicator than the measurement of cells in G2+M. Analysis of individual data indicates that the global kinetics reported here may vary by one or two days. These individual variations could be interpreted as depending on each subject's immunological status and on the efficiency of antigen presenting cells. Such variations are less apparent when whole cultured suspensions are supplemented with thymidine and tested at only one time point, and poor responses may be erroneously suspected if the addition of thymidine occurs at a time when cell growth either stalls or only begins. The kinetic approach chosen here permits the observation of such individual patterns, even in the expected good response to a potent recall antigen, used as a vaccine, i.e., administered several times, with adjuvant, to the subjects. This approach might be even more useful to reveal the kinetics of cell activation when assessing responsiveness to drugs liable to yield cutaneous hypersensitivity in minute amounts.

In conclusion, this report indicates that flow cytometric assessment of cell cycle phases in cultured lymphocytes is an efficient alternative to isotopic methods which can be applied not only to mitogen stimulation but also to specific antigens identifying discrete sensitised subsets. This suggests that this method might also be easy to apply to various recall or vaccination antigens in order to verify the presence of sensitised cells and/or vaccination efficacy [24,25]. This method could also be useful for *in vitro* non-invasive delayed type hypersensitivity tests [15,19].

References

[1] S.B. Avery, D.M. Stetson, P.M. Pan and K.P. Matthews, Immunological investigation of individuals with toluene diisocyanate asthma, *Clin. Exp. Immunol.* **4** (1969), 585–589.

[2] L.S. Azzolina, G. Stevanoni and G. Tridente, DNA analysis of stimulated lymphocytes by automatic sampling for flow cytometry, *Cytometry* **9** (1988), 508–511.

[3] E. Bloemena, M.T.L. Roos, J.L.A.M. Van Heijst, J.M.J.J. Vossen and P.T.A. Schellekens, Whole-blood lymphocyte cultures, *J. Immunol. Methods* **122** (1989), 161–167.

[4] S. Bussa, C. Rumi, G. Leone and B. Bizzi, Evaluation of a new whole blood cytometric lymphocyte transformation test for immunological screening, *J. Clin. Lab. Immunol.* **40** (1993), 39–46.

[5] M. Danova, A. Riccardi and G. Mazzini, Cell cycle-related proteins and flow cytometry, *Haematologica* **75** (1990), 252–264.

[6] P. Dean and J. Jett, Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow micro-fluorimetry, *Cell Biol.* **60** (1974), 523.

[7] E. Fagiolo and L. Abenante, Lymphocyte activation and cytokine production in autoimmune hemolytic anaemia (AIHA), *Autoimmunity* **24** (1996), 147–156.
[8] J. Farrant, J.C. Clark, H. Lee, S.C. Knight and J. O'Brien, Conditions for measuring DNA synthesis in PHA stimulated human lymphocytes in 20 μl hanging drops with various cell concentrations and periods of culture, *J. Immunol. Methods* **30** (1980), 301–312.
[9] C. Ferlini, R. Biselli, R. Nisini and A. Fattarossi, Rhodamine 123: a useful probe for monitoring T cell activation, *Cytometry* **21** (1995), 284–293.
[10] B.S.I. Foad, L.E. Adams, Y. Yamauchi and A. Litwin, Phytomitogen responses of peripheral blood lymphocytes in young and older subjects, *Clin. Exp. Immunol.* **17** (1974), 657–664.
[11] J. Fried, A.G. Perez and B.D. Clarkson, Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distribution using Propidium Iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data, *J. Cell Biol.* **71** (1976), 172–181.
[12] C. Jayat and M.H. Ratinaud, Cell cycle analysis by flow cytometry: Principles and applications, *Biol. Cell* **78** (1993), 15–25.
[13] J.K. Larsen, Cell proliferation: analysis by flow cytometry, *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **34** (1992), 317–335.
[14] V.C. Maino, M.A. Suni and J.J. Ruitenberg, Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation, *Cytometry* **20** (1995), 127–133.
[15] K.P. Mathews, P.M. Pan and J.H. Wells, Experience with lymphocyte transformation tests in evaluating allergy to Aminosalicylic Acid, Isoniazid and Streptomycin, *Int. Arch. Allergy* **42** (1972), 653–667.
[16] L. Meroni, D. Trabattoni, C. Balotta, C. Riva, A. Gori, M. Moroni, M. Luisa Villa, M. Clerici and M. Galli, Evidence for type 2 cytokine production and lymphocyte activation in the early phases of HIV infection, *AIDS* **10** (1996), 23–30.
[17] P.L. Nowell, Phytohemagglutinin: an indicator of mitosis in culture of normal hyman leucocytes, *Cancer Res.* **20** (1960), 462–466.
[18] M.R. O'Donovan, S. Johns and P. Wilcox, The effect of PHA stimulation on lymphocyte sub-populations in whole blood cultures, *Mutagenesis* **10** (1995), 371–374.
[19] I. Sarkany, Lymphocyte transformation in drug hypersensitivity, *Lancet* **i** (1967), 743–745.
[20] H.M. Shapiro, Flow cytometry of DNA content and other indicators of proliferative activity, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **113** (1989), 497–591.
[21] I.W. Taylor, A rapid single step staining technique for DNA analysis by flow microfluorometry, *J. Histochem. Cytochem.* **28** (1980), 1021–1024.
[22] P. Vago, Clinical flow cytometric DNA analysis of human solid tumors, *Bull. Cancer* **82** (1995), 122–128.
[23] M.A. Valentine, C.D. Tsoukas, G. Rhodes, J.H. Vaughan and D.A. Carson, Phytohemagglutinin binds to the 20-kDa molecule of the T3 complex, *Eur. J. Immunol.* **15** (1985), 851–854.
[24] J. Vingerhoets, G. Vanham, L. Kestens, G. Penne, G. Leroux-Roels and P. Gigase, Deficient T cell responses in non-responders to hepatitis B vaccination: absence of TH1 cytokine production, *Immunol. Letters* **39** (1994), 163–168.
[25] B.J. Ward, N. Boulianne, S. Ratnam, M.C. Guiot, M. Couillard and G. De Serres, Cellular immunity in measles vaccine failure: demonstration of measles antigen-specific lymphoproliferative responses despite limited serum antibody production after revaccination, *J. Infect. Dis.* **172** (1995), 1591–1595.
[26] G. Wallays and J.L. Ceuppens, Human T lymphocyte activation by pokeweed mitogen induces production of TNF-alpha and GM-CSF and helper signaling by IL-1 and IL-6 results in IL-2 dependent T cell growth, *Eur. Cytokine. Netw.* **4** (1993), 269–277.

Eur J Dermatol 1997; 7: 319-23

Annick BARBAUD
Marie-Christine BÉNÉ
Gilbert FAURE

Immunological physiopathology of cutaneous adverse drug reactions

Different mechanisms are responsible for cutaneous adverse drug reactions (ADR) and some of them are thought to be immunoallergological. The antigens involved in cutaneous ADR can be the active drug itself or the excipients also contained in commercialized drugs. The epitopes recognized can be on the native drug or on metabolites. In ADR due to betalactam antibiotics, the sensitization can involve one or more antigenic determinants (major or minor) and could be stereoisomer-specific for a given epitope. Some drug-induced urticarias and angioedemas are triggered by immediate IgE-specific reactions. Sensitizing antigens, in the HLA molecules of antigen presenting cells, could be recognized by T cells. In ADR, dermal lymphocytes are mostly $CD4^+$. $CD8^+$ cells can be seen in the epidermis. Immunological mechanisms involved in erythema multiforme, Stevens-Johnson syndrome, toxic epidermal necrolysis and bullous reactions are similar to those involved in graft-*versus*-host disease, with delayed T cell-mediated immune reactions mediated by drug specific $CD8^+$ cells. Keratinocyte lysis could be induced by several mechanisms: epidermal $CD8^+$ T cell cytotoxicity, release of TNFα and/or a direct effect of the drug itself. Maculopapular rashes are probably induced by a delayed T-cell mediated immune reaction, but whether $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells are involved is still debated. Localized abnormal responses of keratinocytes to γIFN or TNFα and long-lasting epidermal $CD8^+$ T-cells could be involved in the onset of fixed drug eruptions. Lichenoid drug eruptions could be related to the activation of cytotoxic $CD8^+$ T cells. (*Key words: cutaneous adverse drug reaction, hypersensitivity, betalactam antibiotics, urticaria, maculo-papular rash, erythema multiforme, fixed drug eruption.*)

A. Barbaud: Service de Dermatologie, Hôpital Fournier, CHU de Nancy, 36, Quai de la Bataille, 54000 Nancy, France.
M.-C. Béné, G. Faure: Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine et CHU de Nancy, France.

Reprints: A. Barbaud.
Fax: (+33) 03.83.85.24.12.
E-mail: a.barbaud@chu-nancy.fr

Drugs can induce various cutaneous adverse reactions with a wide range of clinical manifestations. Different mechanisms are responsible for such cutaneous adverse drug reactions but some reactions are thought to be immunoallergological. These immunoallergological reactions induce various clinical features. Immediate immunoglobulin E (IgE)-mediated drug reactions may be involved in urticaria. Other cutaneous adverse drug reactions are thought to be caused by delayed cell-mediated immune reactions such as maculopapular rash, fixed drug eruption, lichenoid or eczematous reactions, erythema multiforme, Stevens Johnson syndrome, toxic epidermal necrolysis and bullous reactions. According to Tone *et al.* [1], common histological features can be observed in cutaneous adverse drug reactions and are thought to be caused by a delayed cell-mediated immune reaction. Most of the cells of the dermal infiltrate are T lymphocytes. Some of these T lymphocytes are in close proximity to the dermo-epidermal junction and keratinocytes of the basal layer, which could induce liquefaction, vacuolization and dyskeratosis of the keratinocytes. Satellite cell necrosis (*i.e.* necrotic keratinocytes adjacent to T lymphocytes) can be observed. In severe forms of cutaneous adverse drug reactions, such as erythema multiforme, Stevens Johnson syndrome or fixed drug eruption, dyskeratosis can provoke an epidermal cleavage into the epidermal basal layer, or induce a complete toxic epidermal necrosis. A better understanding of the mechanisms involved in cutaneous adverse drug reactions would improve methods and interpretation of *in vivo* and *in vitro* diagnostic tests and the therapeutic monitoring of patients suffering from these reactions.

General immunological characteristics of cutaneous adverse drug reactions

Relationship between immunological and non-immunological factors involved in the pathophysiology of cutaneous adverse drug reactions

Immunological mechanisms are not the only factors involved in the onset of cutaneous adverse drug reactions (ADR) [2-4], non-immunological factors [2], including some which can enhance the drug-induced immune reaction may also play a crucial role. A genetically programmed rate of drug metabolism can favor the development of cutaneous ADR [2-7] by inducing an accumulation of toxic or reactive metabolites (*i.e.* the formation of hydroxylamine in bullous reactions to sulfamethoxazole; phenytoin arene-oxide metabolite in the anticonvulsant hypersensitivity syndrome).
Viral infections can amplify adverse immune reactions to drugs [3] by inducing enzymatic alterations, transiently modi-

ring drug metabolism and the accumulation of reactive metabolites. This mechanism would explain the high frequency of mpicillin-induced maculopapular rashes in patients with pstein-Barr viral infection and the development of cutaneous DR to sulfonamides in 45 to 60% of patients with acquired nmunodeficiency syndrome (AIDS) [3].

ntigens implicated in cutaneous adverse drug reactions

lost cutaneous ADR are thought to be linked to a sensitiza-on against the active drug itself and not to the excipients so contained in the commercialized forms of drugs.
owever, even though it is rare [8], excipients, preservatives id colouring agents have been known to induce urticaria or iaphylactic reactions and may also induce cutaneous ADR. hese additives are usually involved in immediate IgE-ediated reactions, but in a few cases other immunological echanisms have been demonstrated such as the formation of rculating immune complexes (dextran-anti-dextran antibo-es after BCG immunization, Cremophor EL-anti Cremo-ior EL antibodies) or complement activation triggered by remophor EL. In other cutaneous ADR, saccharine inducing maculopapular rash and erythrosin provoking photosensiti-ition has also been reported [8].
evertheless, most cutaneous ADR are supposedly related to nsitization to the active drug itself. The antigens, and more ecifically the epitopes, involved in these reactions have not l been identified. The recognized epitopes may be on the itive drug or on one of its metabolites [4, 5]. Such a sensiti-tion to drug metabolites was recently demonstrated by ›pescu *et al.* [9] who, using prick tests and intradermal sts, showed that 5 patients with allergic reactions to cyclo-iosphamide had immediate positive skin tests with 2 cyclo-iosphamide metabolites but not with the native drug.
ost of the studies concerning cutaneous ADR induced by e native drug itself were carried out on the antigenic deter-inants of betalactam antibiotics [4, 10-15]. These antibiotics e metabolized into benzylpenicilloyl (BPO). BPO is the ajor determinant in allergic reactions to betalactam antibio-s, but other products, called minor determinants, may also involved. Immunological responses in patients sensitized betalactam antibiotics are heterogeneous, with wide inter-d intra-individual variation, as shown by the analysis of sitive reactions to betalactam antibiotics prick and intrader-l tests or the *in vitro* search for specific anti-betalactams E. Most patients are sensitized to BPO, but other patients cognize only minor determinants, penicillin A side chains itopes [6, 10-13, 15] or both BPO and minor determinants 3]. Among 21 prick tested patients sensitized to betalactam tibiotics, 8 patients had positive prick test reactions only th BPO, 10 patients only with minor determinants of the e chain and 3 patients with both BPO and minor determi-nts [13]. Among 54 patients who had developed anaphylac-d reactions to amoxicillin, Vega *et al.* [14] demonstrated it the sensitization was related to the penicillin A-specific ain without allergy to BPO (63% of the patients had posi-e prick test reactions to amoxicillin, but none to BPO). me patients are specifically sensitized to epitopes carried the cephalosporin C-7 side chain without demonstrating ergy to other betalactam antibiotics [10]. A patient with a udo-scarlet fever induced by ampicillin had positive patch ults only when tested with betalactam derivatives contai-g the D(–)-alpha-amino-benzyl moiety but negative patch t results when tested with betalactam derivatives contai-g a L(+)-alpha-amino group [15]. Thus, sensitization to betalactam antibiotics can involve one or more antigenic determinants and may be stereoisomer-specific for a given epitope.

Recognition of sensitizing antigens by T lymphocytes

• *T cell activation* [3, 4, 6, 7, 16, 17]

The T cell response can be elicited by drug haptens, either native or protein-bound. Nonconjugated haptens are unable to induce sensitized lymphocytes to proliferate [4]. T lymphocyte stimulation may be triggered by reactive haptens, coupled to a HLA class I or II molecule, actively presented on the membrane of antigen presenting cells (APC). Bell *et al.* [16] and Brander *et al.* [17] have investigated the requirement for antigen processing of the betalactam haptens by the APC, in inducing a specific T lymphocyte stimulation (with normal APC or glutaraldehyde-fixed APC that are killed and cannot process antigens although their antigen presenting capacity remains intact). Amino- or hydroxyl-reactive penicillins (that can be bound to membrane cell proteins) can induce specific T cell stimulation if they are presented coupled to a HLA molecule on the surface of the APC. According to Brander *et al.* [17], native penicillin G can be presented by prefixed APC and thus does not require antigen processing. Penicillin G may bind HLA class I or class II molecules [17]. Penicillin G could even be presented by activated cells (*i.e.* activated T cells themselves that express HLA molecules) without addition of classical APC [17]. Conversely, BPO bound to human serum albumin (BPO-HSA) needs to be processed by APC to become immunogeneic for T lymphocytes, because previous fixation of APC abrogates the stimulation of T cells. HLA class I or II molecules are involved to stimulate specific drug T cells [3, 6, 7, 17, 18]. The classical rules of class I and class II restriction apply to penicillin G-induced clonal activation of $CD8^+$ or $CD4^+$ cells [17]. Penicillin G may bind to the HLA class I and class II molecules but whether penicillin G binds to the HLA molecule itself or to the embedded antigenic peptide has yet to be determined [17]. According to Bell *et al.* [16], the T lymphocyte response would be directed against HLA modified molecules (modified-self response). Penicillin G selectively inhibits the fixation of certain anti-HLA antibodies such as anti-Aw32, anti-B15 or anti-B40 [7]. Additionally, certain HLA molecules could enhance the risk of developing a cutaneous ADR (*i.e.* HLA A29, HLA-B12 and/or HLA DR7 molecules in sulfonamide-induced toxic epidermal necrolysis [19]), suggesting either allele specific binding motifs or a peculiar orientation of grooved peptides in such molecules.
The stimulation of T lymphocytes by a "modified" self would be responsible for viral rashes [16]. This similarity in immunopathological mechanisms between cutaneous ADR and viral exanthemas could explain, in part, the clinical features of maculopapular rash related to antibiotics and rashes induced by Epstein-Barr virus.

• *The effector cells: T lymphocytes* [3, 4, 6, 7, 16, 17]

Different approaches have been used to study T lymphocytes involved in cutaneous ADR. T cells can be immunophenotyped on skin biopsy specimens from ADR lesions and/or from positive drug skin tests. Peripheral blood lymphocytes can be phenotyped and/or cloned with or without *in vitro* drug stimulation. Infiltrating lymphocytes can also be extract-

ed from the epidermis according to the method described by Hertl *et al.* [6, 20]. Immunophenotyping of delayed T cell-mediated cutaneous ADR showed that perivascular infiltrates contain predominantly CD4+ cells [20-23]. If T cells infiltrate the epidermis they are mostly CD8+ in erythema multiforme, Stevens Johnson syndrome, toxic epidermal necrosis and fixed drug eruption [20, 23, 24] but CD4+ and/or CD8+ in maculopapular rash [21, 22]. According to Hertl *et al.* [6, 20], T lymphocytes extracted from the epidermis are CD8+ whatever the clinical feature of the cutaneous ADR. These findings are not a technical artefact since, conversely, T cells extracted from the epidermis of contact allergy to fragrances are CD4+. Hertl *et al.* [20] have demonstrated in patients with bullous cutaneous reactions induced by betalactam antibiotics, that extracted epidermal CD8+ T cells are cytotoxic to keratinocytes and B lymphocytes. The epidermal CD8+ T cell clones isolated by Hertl *et al.* [6], synthesize γ-interferon (γIFN) rather than interleukin-4 (IL4). The secretion of γIFN up-regulates the expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on endothelial cells and keratinocytes, which may enhance skin T cell homing. These ICAM-1+ keratinocytes may also be better bound by CD8+ T cells, favouring cytotoxicity and the development of satellite cell necrosis. Viral infections could induce a non-specific polyclonal activation of CD8+ T cells and facilitate the emergence of drug-specific T lymphocytes. This mechanism has been suspected for ampicillin-induced rashes in Epstein Barr virus infections and for cutaneous ADR due to sulfonamides in patients with AIDS [3].

Studies focused on T lymphocytes from the peripheral blood of betalactam antibiotic allergic patients have yielded heterogeneous results. In short-term lymphocyte cultures, Koponen *et al.* [7] demonstrated an increase of CD4+ Leu8+ T lymphocytes and Perez *et al.* [25] an increase of CD4+CD45 RO+ betalactam specific T cells. Conversely, in long term lymphocyte clones cultures, Hertl *et al.* [18] obtained 7/7 CD8+ T cell clones isolated from 2 penicillin-allergic patients (who had had a maculopapular rash). In the lymphocyte transformation test Brander *et al.* [17] demonstrated that the proliferative response to penicillin G involves predominantly CD4+ T cells during the initial week of culture, but if the culture was prolonged (with the addition of interleukin-2 (IL2)), the percentage of CD8+ T cells increased by up to 25%. In contrast, BPO-HSA stimulated principally CD4+ T cells, even after 1 week of culture.

CD8+T cell clones derived from the peripheral blood of 2 betalactam allergic patients produced, upon stimulation, IL2 and γIFN [18]. However, among 10 betalactam allergic patients with urticaria or exanthema, Brander *et al.* [17] observed a heterogeneous T cell specific response. Ten clones, specific for penicillin G, were isolated (from 2 betalactam allergic patients): 2 clones produced high levels of IL4 and IL5; 3 secreted large amounts of γIFN, IL4 and IL5. Clones produced various cytokines, which did not allow strict classification into Th subtypes. Clonality can also be appreciated through T cell receptor (TCR) repertoire analysis. In *in vitro* T cell cultures, Mauri-Helweg *et al.* [5] observed an enhanced expansion of T cell receptor Vβ17+, on peripheral CD4+ and CD8+ T cells from one sulfonamide allergic patient, 9 days after *in vitro* stimulation with sulfamethoxazole. These results suggest that the drug specific T cells displayed a limited TCR usage [5]. Conversely 6 BPO-HSA T cell clones from 2 betalactam antibiotic allergic patients did not display a limited TCR usage [17].

Immunological characteristics of specific cutaneous adverse drug reactions

Urticaria, angioedema, anaphylactic reactions [6, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 20]

These cutaneous ADR can be induced by drugs or excipients contained in commercialized forms of drugs. According to Hertl *et al.* [6] more CD4+ than CD8+ peripheral T cell lines may be derived from patients with penicillin-induced urticaria. These CD4+ T cell lines produce IL4, small amounts of IL2 and no γIFN (Th2-like cytokine pattern). These CD4+ cells are not cytotoxic for B cells or keratinocytes [6]. According to Brander *et al.* [17], evaluation of the cytokine pattern secreted by penicillin G-specific T cell clones, even from a patient with penicillin G-specific IgE, is more heterogeneous and no predominant Th2-like pattern could be observed in their study. Sporadic exposure to the drug allergen may not be sufficient to elicit a Th2 response but Th0 cells could be involved. Th0 cells secrete small amounts of IL4 that might be sufficient for IgE switching. Upon drug rechallenge, mast cell degranulation, followed by clinical manifestations of urticaria are triggered by hapten cross-bridging of IgE.

Certain cases of urticaria can be triggered by other mechanisms such as circulating immune complex formation and complement specific or non-specific mast cell degranulation.

Erythema multiforme, Stevens Johnson syndrome, toxic epidermal necrolysis and bullous reactions [1, 3, 23, 24, 26-32]

These severe, cutaneous adverse drug reactions that lead to cytolysis of keratinocytes, are not only induced by immunoallergological mechanisms directed against a drug, several other factors are also involved [3] such as genetically regulated enzyme rates of activity, HLA specificity predisposition and viral infections. Direct cytotoxicity may also be involved for certain drugs.

The immunological mechanisms involved are similar to those involved in graft-*versus*-host disease, with a cytotoxic, delayed T cell-mediated immune reaction mediated by CD8+ cells. Few drug epitopes have been studied because of the lack of satisfactory *in vitro* models and the usually negative results of skin tests [33] for these cutaneous ADR. The features of immunophenotyping depend on the interval between when skin biopsy specimens are obtained and the beginning of the cutaneous ADR. The epidermis and dermis contain few CD1+ Langerhans cells [24, 30, 31], while dendritic cells (Factor XIII+, HLA DR+) [31] and macrophages are quite numerous in perivascular infiltrates and in the epidermis [30]. Dendritic cells secrete TNFα which could enhance cytotoxicity against keratinocytes. TNFα is abundant in the epidermis of patients with these severe cutaneous ADR [27, 31, 34]. Endothelial cell activation, with a strong expression of adhesion molecules such as ICAM-1/CD54, endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM 1)/CD62E and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM 1)/CD106, could play a prominent role in T lymphocyte homing to the skin [30]. The cellular integrity of endothelial cells is preserved as shown by the normal fixation of the lectin Ulex Europeaus 1 [30].

The activation pathway of lymphocytes is not clearly understood. In toxic epidermal necrolysis induced by salazopyrine, an early decrease of the peripheral blood lymphocyte count has been reported [28], with an early but transient decrease in

he CD4+/CD8+ ratio. According to Hagdrup *et al.* [28], these nomalies could be due to CD4+ T cell extravasation. Pervascular infiltrates contain predominantly CD3+, CD45 RO+ nd CD4+ T cells (CD4+/CD8+ = 3) [6, 20, 23, 24, 30, 31, 5]. Very few T cells express CD25 (IL2 receptor) [30, 31]. 'he epidermis contains predominantly CD8+ T cells CD8+/CD4+ = 4) [24, 30, 31, 34] with surface expression of :D25 on 25% of these infiltrating T cells [30]. According to lertl *et al.* [20, 29] epidermal T cell clones isolated from atients with bullous cutaneous reactions caused by betalacam antibiotics always express CD3+, CD8+, HLA-DR and an :/β TCR. Skin CD8+ T cell lines from 2 patients with moxicillin-induced bullous exanthema were found to exhibit cytotoxic activity but no suppressor activity on concavalin ı mitogenesis [29].

ı bullous cutaneous reactions due to betalactams, CD8+ epiermal T cell clones proliferate in response to drug-modified utologous APC [20]. These T cells produce Th1 pattern ytokines after activation. Epidermal CD8+ T cell clones dislay cytotoxicity against epidermal cells. T cell clones induce ıe expression of ICAM-11 on the surface of the epidermal ell, explaining the development of satellite cell necrosis. mmunohistochemical studies of tumor epidermal necrosis ave found an up-regulation of ICAM-1 and HLA DR on eratinocytes [6, 20, 23, 24, 35]. Keratinocyte necrolysis is ıduced by modifications in the cell membrane, intracellular ıflux of calcium, perforin polymerization that leads to enlared membrane cell pores and cytolysis. An increased expresion of perforin mRNA has been recently demonstrated in :D8+ cytotoxic cells [32]. Keratinocyte lysis could be indued by several mechanisms: epidermal CD8+ T cell cytotoxity, release of TNFα and/or a direct effect of the drug itself. 'NFα could initiate apoptosis. Apoptosis as a mechanism of eratinocyte death has recently been demonstrated in toxic pidermal necrolysis [36].

laculopapular rash [1, 2, 6, 7, 11, 17, 18, 21, 22, 37]

everal studies support the hypothesis of a delayed T cellıediated immune reaction in patients with maculopapular ısh induced by drugs. The rash begins 1 to 10 days after ıtake of the drug; immediate skin tests readings are usually egative but drug patch, intradermal [10, 11, 21, 22, 37, 38] ıd even prick tests [21] may have positive results on elayed readings.

he number of epidermal CD1+ Langerhans cells can be ıcreased [39] or normal [21]. According to Brander *et al.* .7], betalactam antibiotic-induced maculopapular rash can ccur after stimulation of CD4+ or CD8+ T cells. Hertl *et al.* ;, 18] reported peripheral betalactam-specific T cell clones om 2 patients with maculopapular rash, that were exclusiely CD8+, and which had a suppressor effect on concavalin -induced mitogenesis. These CD8+ T cell clones proliferated ı response to betalactam antibiotics, and had a Th1-like /tokine pattern. Th1 cytokines could be involved in the upgulation of HLA-DR and ICAM-1/CD54 expression as bserved in amoxicillin-induced maculopapular rash [21]. he crucial role of CD8+ T cells in inducing maculopapular sh has to be discussed as in many reports, perivascular filtrates of T lymphocytes are frequent and are predomiıntly CD4+ [1, 6, 21, 22] (CD4+/CD8+ = 3 [21]). In the udy by Barbaud *et al.* [21] however, among 5 patients with amoxicillin-induced maculopapular rash, epidermal infiltrating T cells were observed in only one case, and were CD8+. According to Koponen *et al.* [7], on day 7 after betalactam stimulation in 3 patients with maculopapular rash, 90% of the activated, peripheral T lymphocytes were CD4+. Among these CD4+ T cells, more than 50% expressed Leu8+, and thus were suppressor cell inducers. Endothelial cell activation, with a strong expression of adhesion molecules such as CD54 (ICAM-1), CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) and CD62E (ELAM 1) could play a prominent role in T lymphocyte homing to the skin [21].

Fixed drug eruption [40-45]

Delayed, cellular immune responses, implicating cytotoxic CD8+ T cells have been thought to be responsible for fixed drug eruption. Dermal infiltrates contain T cells CD4+ or CD8+ in equal proportions [40, 41]. Infiltrating epidermal T cells predominate in basal and suprabasal layers of the epidermis and are predominantly CD8+. An unusual persistence of these epidermal CD8+ T cells has been observed in skin biopsy samples obtained from non-inflammatory, pigmented plaques, 3 weeks after the onset of fixed drug eruptions [41]. The role of these long-lasting epidermal T cells could be crucial. Komatsu *et al.* [45] have isolated and cultured these epidermal-persistent T cells from two patients with fixed drug reaction. The cells were CD8+ in one patient and CD4+ in the second case, and did not proliferate in response to the culprit drug. T cell receptor Vα and Vβ analysis demonstrated that the epidermal T cells derived from the lesional epidermis used a very limited range of Vα and Vβ gene families, compared with peripheral blood lymphocytes obtained from the same patients [45]. Recurrence of skin lesions at identical sites could be related to the activation of local T cells with cytolytic potential, persisting in the epidermis.

At inflammatory sites, basal and suprabasal keratinocytes strongly express ICAM-1 and HLA DR [6, 42, 43, 44], especially near dense dermal T cell infiltrates [42, 43]. After an oral drug challenge, at inflammatory sites, there was a strong, rapid and long-lasting (6 to 10 days) keratinocyte expression of ICAM-1 [44], while the expression of HLA DR was transient [42]. In the same patient, after drug re-challenge, no expression of ICAM-1 or HLA DR was observed on biopsy samples from non-inflammatory sites [44]. Lesional keratinocytes expressed ICAM-1 (CD54) more quickly and intensely after *in vitro* exposure to the causative drug, than those from non-lesional skin [44]. The localized dissociation of keratinocyte expression of activation markers (ICAM-1 and HLA DR) at the inflammatory sites could be related to an abnormal response of keratinocytes to γIFN [42] or TNFα, that may be produced by activated skin T cells.

Lichenoid drug eruption [46, 47]

Dermal infiltrates contain CD4+ and CD8+ T cells. Lichenoid drug eruptions could be related to the activation of cytotoxic CD8+ T lymphocytes. *In vitro*, captopril can induce specific CD8+ T cell activation directly or *via* its action on prostaglandin metabolism. Unlike the findings observed in idiopathic lichen planus, data from Bretin *et al.* [46] suggest a decreased number of Langerhans cells, as observed in graft-*versus*-host-disease [47]. ■

References

1. Tone T, Nishioka K, Kameyama K, Asai T, Takezaki S, Nishiyama S. Common histopathological processes of phenytoin drug eruption. *J Dermatol* 1992; 19: 27-34.
2. Bircher A, Hunziker N. Facteurs de risques dans l'allergie médicamenteuse. In: *Progrès en Dermato-Allergologie*. Médiscript ed, Viternes F, 1995; 77-885.
3. Chosidow O, Bourgault I, Roujeau J-C. Drug rashes. What are the targets of cell-mediated cytotoxicity? *Arch Dermatol* 1994; 130: 627-9.
4. De Weck AL. Pharmacologic and immunochemical mechanisms of drug hypersensitivity. *Immunol All Clin North Am* 1991; 11: 461-74.
5. Mauri-Hellweg D, Bettens F, Mauri D, Brander C, Hunziker T, Pichler WJ. Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine. *J Immunol* 1995; 155: 462-72.
6. Hertl M, Merck HF. Lymphocyte activation in cutaneous drug reactions. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 95s-8s.
7. Koponen M, Pichler WJ, de Weck AL. T cell reactivity to penicillin: phenotypic analysis of *in vitro* activated cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 645-52.
8. Barbaud A. Place of excipients in drug-related allergy. *Clin Rev Allergol Immunol* 1995; 13: 253-63.
9. Popescu NA, Sheehan MG, Kuides PA, Loughner JE, Condemi JJ, Looney RJ, Leddy JP. Allergic reactions to cyclophosphamide: delayed clinical expression associated with positive immediate skin tests to drug metabolites in five patients. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 26-33.
10. Blanca M, Vega JM, Garcia J, Carmona MJ, Terado S, Avila MJ, Miranda A, Juarez C. New aspects of allergic reactions to betalactams: cross reactions and unique specificities. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 407-15.
11. Romano A, Di Fonso M, Papa G, Pietrantonio F, Federico F, Fabrizi G, Venuti A. Evaluation of adverse cutaneous reactions to amino penicillins with emphasis on those manifested by maculopapular rashes. *Allergy* 1995; 50: 113-8.
12. Adkinson NF. Side chain specific beta-lactam allergy. *Clin Exp Allergy* 1990; 20: 445-7.
13. Silviu-Dan F, McPhillips S, Warrington RJ. The frequency of skin test reactions to side-chain penicillin determinants. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 694-701.
14. Vega J, Blanca MM, Carmona MJ, Claros A, Juarez C, Moya MC. Immediate allergic reactions to amoxicillin. *Allergy* 1994; 49: 317-22.
15. Voorhorst R, Sparreboom S. The use of stereoisomers in patch testing. *Ann Allergy* 1980; 45: 100-3.
16. Bell SJD, Pichler WJ. Penicillin-allergic patients react to penicillin-modified "self". *Allergy* 1989; 44: 199-203.
17. Brander C, Mauri-Hellweg D, Bettens F, Rolli H, Goldman M, Pichler WJ. Heterogeneous T cell responses to beta-lactam-modified self-sructures are observed in penicillin-allergic individuals. *J Immunol* 1995; 155: 2670-8.
18. Hertl M, Gersel J, Boecker C, Merk HF. Selective generation of CD8+ T cell clones from the peripheral blood of patients with cutaneous reaction to beta-lactam antibiotics. *Br J Dermatol* 1993; 128: 619-26.
19. Mobini N, Ahmed AR. Immunogenetics of drug-induced bullous diseases. *Clin Dermatol* 1993; 11: 449-60.
20. Hertl M, Bohlen H, Jugert F, Boecker C, Knaup R, Merk HF. Predominance of epidermal CD8+ T lymphocytes in bullous cutaneous reactions caused by B-lactam antibiotics. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 794-9.
21. Barbaud A, Béné MC, Schmutz JL, Ehlinger A, Weber M, Faure GC. Role of delayed cellular hypersensitivity and adhesion molecules in amoxicillin-induced morbilliform rashes. *Arch Dermatol* 1997; 133: 481-6.
22. Warrington R, Silviu-Dan F, Magro C. Accelerated cell-mediated immune reactions in penicillin allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 626-8.
23. Miyauchi H, Hosokawa H, Akaeda T, Iba H, Asada Y. T cell subsets in drug-induced toxic epidermal necrolysis. Possible pathogenic mechanism induced by CD8-positive T cells. *Arch Dermatol* 1991; 127: 851-5.
24. Villada G, Roujeau JC, Clerici T, Bourgault I, Revuz J. Immunopathology of toxic epidermal necrolysis. Keratinocytes, HLA-DR expression, Langerhans cells, and mononuclear cells: an immunopathologic study of five cases. *Arch Dermatol* 1992; 128: 50-3.
25. Perez T, Girard JP, Dayer E. Imbalance of CD45R and CDw29 helper cell subsets after seven days of culture from penicillin hypersensitive patients. *Allergy* 1991; 46: 379-85.
26. Tagami H, Tatsuta K, Iwatski K, Yamada M. Delayed hypersensitivity in ampicillin-induced toxic epidermal necrolysis. *Arch Dermatol* 1983; 119: 910-3.
27. Roujeau JC, Dubertret L, Moritz S, Jouault H, Heslan M, Revuz J, Touraine R. Involvement of macrophages in the pathology of toxic epidermal necrolysis. *Br J Dermatol* 1985; 113: 425-30.
28. Hagdrup H, Tonnesen E, Clemmensen O, Andersen KE. Abnormalities of lymphocyte function and phenotypic pattern in a case of toxic epidermal necrolysis. *Acta Derm Venereol* 1992; 72: 268-70.
29. Hertl M, Merk HF, Bohlen H. T cell subsets in drug-induced toxic epidermal necrolysis. *Arch Dermatol* 1992; 128: 272-3.
30. Friedmann PS, Strickland I, Pirmohamed M, Park K. Investigation of mechanisms in toxic epidermal necrolysis induced by carbamazepine. *Arch Dermatol* 1994; 130: 598-604.
31. Paquet P, Nikkels A, Arrese JE, Vanderkelen A, Pierard GE. Macrophages and tumor necrosis factor alpha in toxic epidermal necrolysis. *Arch Dermatol* 1994; 130: 605-8.
32. Moncada B, Delgado C, Quevado MA. Abnormal T cell response in toxic epidermal necrolysis. *Arch Dermatol* 1994; 130: 116.
33. Wolkenstein P, Chosidow O, Flechet ML, Robbiola O, Paul M, Dumé L, Revuz J, Roujeau JC. Patch testing in severe cutaneous adverse drug reactions, including Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Contact Dermatitis* 1996; 35: 234-6.
34. Heng MCY, Allen SG. Efficacy of cyclophosphamide in toxic epidermal necrolysis. Clinical and pathophysiologic aspects. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25: 778-86.
35. Rasmussen JE. Erythema multiforme. Should anyone care about the standards of care? *Arch Dermatol* 1995; 131: 726-9.
36. Paul C, Wolkenstein P, Adle H, Wechsler J, Garchon HJ, Revuz J, Roujeau JC. Apoptosis as a mechanism of keratinocyte death in toxic epidermal necrolysis. *Br J Dermatol* 1996; 134: 710-4.
37. Bruynzeel DP, Von Blomberg-Van der Flier RJ, Scheper RJ, Van Ketel WG, de Haan P. Penicillin allergy and the relevance of epicutaneous tests. *Dermatologica* 1985; 171: 429-34.
38. Bruynzeel DP, Van Ketel WG. Skin tests in the diagnosis of morbilliform drug eruptions. *Semin Dermatol* 1987; 6: 119-24.
39. Dascalu DI, Kletter Y, Baratz M, Brenner S. Langerhans' cell distribution in drug eruption. *Acta Derm Venereol* 1992; 72: 175-7.
40. Visa K, Kayhko K, Stubb S, Reitamo S. Immunocompetent cells of fixed drug eruption. *Acta Derm Venereol* 1987; 67: 30-5.
41. Hindsen M, Christensen OB, Gruic V, Lofberg H. Fixed drug eruption: an immunohistochemical investigation of the acute and healing phase. *Br J Dermatol* 1987; 116: 351-60.
42. Shiohara T, Nickoloff BJ, Sagawa Y, Gomi T, Nagashima M. Fixed drug eruption. Expression of epidermal keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Arch Dermatol* 1989; 125: 1371-6.
43. Smoller BR, Luster AD, Krane JF, Krueger J, Gray MH, McNutt NS, Hsu A, Gottlieb AB. Fixed drug eruptions: evidence for a cytokine-mediated process. *J Cutan Pathol* 1991; 18: 13-9.
44. Teraki Y, Moriya N, Shiohara T. Drug-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 on lesional keratinocytes in fixed drug eruption. *Am J Pathol* 1994; 145: 550-60.
45. Komatsu T, Moriya N, Shiohara T. T cell receptor (TCR) repertoire and function of human epidermal T cells: restricted TCR V alpha-V beta genes are utilized by T cells residing in the lesional epidermis in fixed drug eruption. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 343-50.
46. Bretin N, Dreno B, Bureau B, Litoux P. Immunohistological study of captopril-induced late cutaneous eruptions. *Dermatologica* 1988; 177: 11-5.
47. Osawa J, Kitamura K, Saito S, Ikezawa Z, Nakajima H. Immunohistochemical study of graft-*versus*-host. Reaction (GVHR)-type drug eruptions. *J Dermatol* 1994; 21: 25-30.

Reprinted from the Archives of Dermatology April, 1997 Volume 133 Copyright 1997, American Medical Association

OBSERVATION

Role of Delayed Cellular Hypersensitivity and Adhesion Molecules in Amoxicillin-Induced Morbilliform Rashes

Annick M. Barbaud, MD; Marie-Christine Béné, PharmD, PhD; Jean-Luc Schmutz, MD; Agnès Ehlinger, MD; Max Weber, MD; Gilbert C. Faure, MD, PhD

Background: Morbilliform rashes induced by amoxicillin are thought to be caused by a delayed cell-mediated immune reaction. The importance of amoxicillin skin tests is not well defined. A better understanding of the mechanisms of amoxicillin-induced morbilliform rashes can be obtained by performing cutaneous immunohistological studies on specimens from amoxicillin-induced morbilliform rashes and positive amoxicillin skin test results.

Observations: Skin biopsy specimens were obtained from 5 patients who had developed an amoxicillin-induced morbilliform rash. All patients underwent amoxicillin prick, patch, and intradermal tests. Similar immunohistological investigations were performed on amoxicillin-induced morbilliform rashes and positive skin test biopsy specimens, with a special focus on the expression of adhesion molecules. Three of the 5 patients developed delayed positive results to intradermal and patch tests and 2 patients developed delayed positive results to prick tests. Amoxicillin-induced morbilliform rashes were well reproduced by skin tests, with similar immunohistological results in amoxicillin-induced morbilliform rashes and skin test biopsy specimens. Keratinocytes were activated and expressed CD54 (intercellular adhesion molecule 1); perivascular lymphocytes were mostly $CD2^+$, $CD3^+$, and $CD4^+$ and exhibited CD11a through CD18 (leukocyte function–associated antigen 1) and often HLA-DR and/or CD62L (leukocyte endothelial cell adhesion molecule 1); and endothelial cells were activated with a strong expression of CD54 (intercellular adhesion molecule 1), CD62E (endothelial leukocyte adhesion molecule 1), and CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) in lesser amounts.

Conclusions: Findings of this clinical and immunohistochemical study support the theory of a T-cell–mediated immune reaction in patients with amoxicillin-induced morbilliform rashes, with a strong involvement of adhesion molecules both on endothelial and infiltrating cells. Our findings emphasize the importance of delayed readings of amoxicillin prick, intradermal, and patch tests.

Arch Dermatol. 1997;133:481-486

MORBILLIFORM rashes induced by amoxicillin are not rare. When present, they usually appear within the first 10 days after the intake of the drug. The rashes are thought to be caused by a delayed-type, cell-mediated immune reaction,[1] as has been suggested in a few in vivo and in vitro studies.[2,3]

Immediate IgE-mediated drug reactions usually manifest as an urticarial reaction. In immediate hypersensitivity, results of skin tests performed with the suspected allergen, such as prick tests or intradermal skin tests (IDRs), develop in minutes. Elevated levels of serum-specific IgE can be detected using radioallergosorbent tests, while the human basophil degranulation test enables the identification of basophil-bound IgE specific for the allergen tested. Reactions caused by circulating immune complexes induce purpuric cutaneous lesions with a histological leukocytoclastic vasculitis; under direct immunofluorescence examination, immunoglobulin and/or complement fraction deposits on vascular walls are observed. T-cell–mediated immune drug reactions may appear with various clinical manifestations. Dermal T-lymphocyte infiltrates predominate in perivascular areas. Delayed positive reactions to IDRs or patch tests performed with the suspected allergen can be observed in T-cell–mediated immune reactions.

Indirect immunofluorescence can be useful to determine the immunophenotype of infiltrating cutaneous immunocompetent cells and their activation state. In T-cell–mediated immune reactions, keratinocytes from the basal layers of the epidermis are often activated and express HLA-DR and CD54 (intercellular adhe-

From the Dermatology Department, Fournier Hospital (Drs Barbaud, Schmutz, Ehlinger, and Weber), and the Immunology Laboratory, Faculté de Médecine (Drs Béné and Faure), University Hospital of Nancy, Nancy, France.

PATIENTS, MATERIALS, AND METHODS

Five patients (2 women and 3 men; mean age, 56 years) who developed a morbilliform rash 1 to 10 days after the intake of amoxicillin (Clamoxyl 500, Beecham Sevigne Laboratories, Paris, France) were selected for this study. The administration of amoxicillin had been motivated by tonsillitis in 4 of the patients and by acute pyelonephritis in the fifth patient. According to criteria proposed by Begaud et al,[7] amoxicillin imputability in the onset of the rash was very probable for all patients, even in the 2 who had negative skin test results. All biological findings were normal, except in 1 patient (patient 3) where transient hepatic cytolysis (doubling of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase levels) with hypereosinophilia was observed. All patients gave informed consent for subsequent testing and biopsies.

INVESTIGATIONS DURING THE COURSE OF THE CUTANEOUS DRUG REACTIONS

All patients underwent the following peripheral blood immunological and infectious investigations:

Immunological Investigations
- Immunoglobulin levels
- Complement fraction assays
- Circulating immune complex assays
- Lymphocyte subset assessments

Infectious Investigations
- *Herpesvirus hominis*
- Mycoplasma
- Cytomegalovirus
- Rickettsiae
- Epstein-Barr virus
- *Haemophilus influenzae*
- Human parvovirus B19
- Coxsackievirus
- Antistreptolysins, antistreptokinases, and antistreptodornases

From each patient, 2 skin biopsy specimens were obtained using a 3-mm-diameter punch. The first biopsy specimen was fixed with formaldehyde and the second was immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C until studied.

The fixed skin biopsy specimens were paraffin embedded, sliced, and then stained with hemalum eosin–safranin O.

Four micrometer-thick frozen sections were obtained with a refrigerated microtome at −30°C. Fluorescein isothiocyanate monospecific antisera (Dako, Glostrup, Denmark) were used to detect cutaneous deposits of immunoglobulins or C3 and C1q.

Indirect immunofluorescence was performed on 4 of the 5 specimens. After rehydration of the serial frozen-cut sections in phosphate-buffered saline (PBS) solution for 5 minutes, incubation was performed with a series of murine monoclonal antibodies diluted at appropriate concentrations in PBS solution. T-cell subsets and activation states were determined using antibodies against HLA-DR, CD1, CD2, CD3, CD4, CD8, and CD25 (Coulterclone, Hialeah, Fla).

The expression of a series of adhesion molecules was also investigated, using antibodies against CD11a-CD18 (leukocyte function–associated antigen 1), CD49d-CD29(VLA4), CD54 (ICAM-1), CD106 (vascular cell adhesion molecule 1 [Immunotech, Luminy, France]), CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1), CD62E (endothelial leukocyte adhesion molecule 1) (E-selectin), CD62L (leukocyte endothelial cell adhesion molecule 1) (L-selectin), and CD62P (P-selectin, GMP 140 [Becton Dickinson, Mountain View, Calif]).

Incubation with monoclonal antibodies was performed in a moist chamber at room temperature for 1 hour. After 3 washes with PBS solution, sections were then incubated for 30 minutes at room temperature with

sion molecule 1 [ICAM-1]).[4] The activation state of T cells is reflected by the expression of CD25, HLA-DR, and such adhesion molecules as CD11a (leukocyte function–associated antigen 1), CD49d-CD29(VLA4), or CD62L (L-selectin).[5,6] Endothelial cell activation is observable by an increased expression of CD54 (ICAM-1),[5] CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1), CD106 (vascular cell adhesion molecule 1), P-selectin (CD62P or GMP 140 [a granule membrane protein with a molecular weight of 140 kd]), and especially E-selectin (CD62E [endothelial leukocyte adhesion molecule 1]).

The objectives of this study were to first investigate the immunological mechanisms responsible for amoxicillin-induced morbilliform rashes and thereafter to determine whether similar immunological mechanisms were responsible for positive amoxicillin skin tests. Immunophenotyping of skin biopsy specimens and immunoassays of peripheral blood samples were performed for 5 patients who had amoxicillin-induced morbilliform rashes. Six weeks after the onset of the morbilliform rash, immunoallergological cutaneous tests were performed with immediate and delayed readings. An extensive immunophenotyping was also performed on positive skin test biopsy specimens.

RESULTS

No peripheral humoral or cellular immunity abnormalities were observed in the patients. Immunoglobulin and complement levels were normal and no circulating immune complexes were present. Lymphocyte subsets were within normal ranges. Viral serologic test results showed no seroconversion. A history of atopy was reported by only 1 patient (patient 5), who had positive prick test results to dust mites.

Histological examination of the biopsy specimens showed that the epidermis was either normal or exhibited a slight lymphocytic exocytosis. Moderate mononuclear infiltrates were observed in perivascular areas with a few eosinophilic cells. There was no leukocytoclastic vasculitis. Results of direct immunofluorescence were negative in all but 1 patient. On the skin biopsy specimen of patient 3, linear IgM deposits were found at the dermoepidermal junction with C3 intravascular deposits. Results of indirect im-

fluorescein-conjugated sheep antiserum against mouse immunoglobulin (diluted 1:50 in PBS solution [Dako]). The sections were then washed 3 times with PBS solution, mounted in PBS solution with glycerol, and examined in a blinded fashion under a fluorescence microscope (BH2, Olympus, Tokyo, Japan).

SKIN TESTS PERFORMED 6 WEEKS AFTER RASH ONSET

Immunoallergological investigations were performed starting 6 weeks after onset of the morbilliform rashes. Specific IgEs were assayed with radioallergosorbent tests using penicillin G–, penicillin V–, and a combination of ampicillin and amoxicillin–coated paper disks (Pharmacia, Uppsala, Sweden), as previously described.[8]

Patients' basophil reactivity in the presence of Clamoxyl (Beecham Sevigne Laboratories) and amoxicillin was studied. A human basophil degranulation test with Clamoxyl and amoxicillin was performed according to the method described by Sainte-Laudy.[9] Prick tests were performed on the volar forearm skin with a solution of amoxicillin (Smith-Kline-Beecham Laboratories, Paris, France) diluted at 1 g:2.5 mL in saline solution. Reactions were considered positive when a wheal with a diameter larger than that of the negative control (0.9% saline) was present 20 minutes later. Positive controls were performed with 9% codeine phosphate. In all patients a delayed reading was performed 24 hours after initial tests.

Patch tests were performed on the upper back using Finn Chambers on Scanpor tape (Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finland). In all patients, patch tests of the European standard series were used and amoxicillin was tested both at full concentration and at 50% in petrolatum. The reactions were read at 20 minutes and at 48, 72, and 96 hours. The results of patch testing were reported according to the International Contact Dermatitis Research Group criteria for patch test reading.[10]

Intradermal tests were performed using a sterile solution of amoxicillin at 1 g:2.5 mL in saline serum diluted sequentially (10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, and 10^{-1}) in phenolated saline solution (0.5% phenol in 0.9% saline) in the sterile atmosphere of a laminar flow and then filtered. Intradermal tests were performed on the extensor surface of the arm with a small volume (0.04 mL) that produced a wheal to 5 mm in diameter. A negative control was performed with phenolated saline solution. When read after 30 minutes, the IDR results were considered positive when a wheal of more than 10 mm in diameter was observed. The first IDR was performed with a 10^{-4} dilution. If results were negative, subsequent IDRs were performed with increasingly higher serial dilutions up to the pure solution at 30-minute intervals, as long as test results of the previous dilution were negative. Intradermal test readings were performed at 30 minutes, 6 hours, and 24 hours. If a delayed positive reaction was observed, the diameter of the papule was measured. Since IDRs were performed after the 48-hour readings for the amoxicillin patch test, the investigations were lengthy for the patients and it was impossible to perform more delayed IDR readings. When the IDR results were negative, a telephone call to the patient 1 week later confirmed that the results were indeed negative.

Patients who had demonstrated a dermatosis 6 weeks previously while taking several drugs, including amoxicillin, were used as negative controls for immunoallergological investigations. These patients required drug investigations that proved that amoxicillin was not responsible for the dermatosis. There were 11 negative control patients for amoxicillin skin prick tests and IDRs and 30 negative control patients for amoxicillin patch tests.

After obtaining each patient's informed consent, biopsies were performed when skin test results were positive. Direct immunofluorescence and indirect immunofluorescence were performed as described earlier for further analysis during the presence of the morbilliform rash.

munofluorescence (**Table 1**) were similar in all patients, even in the 2 who later failed to demonstrate reactivity to skin tests. Perivascular infiltrates contained predominantly $CD4^+$ cells and approximately 30% $CD8^+$ cells. Endothelial cells were activated and exhibited especially strong fluorescence for CD62E; CD106 was never observed. Results of radioallergosorbent tests with penicillin G, penicillin V, ampicillin, and amoxicillin, as well as those for the human basophil degranulation test with amoxicillin, were all negative.

The results of skin testings (**Table 2**) showed that none of the patients developed an immediate response to amoxicillin skin tests. No relapse of morbilliform rashes induced by amoxicillin was observed during skin testing. In 2 of the 5 patients an eczematous reaction was seen on the prick test area at 24 hours. The negative saline and positive codeine control patients exhibited negative results at 24 hours. None of the 11 negative control patients had positive prick test results.

Results of patch tests of the European standard series were all negative. Three patients had positive patch test reactions to amoxicillin at 48 and at 96 hours. The 30 negative control patients had no immediate or delayed response to amoxicillin patch tests.

Intradermal tests were performed with amoxicillin in concentrations up to the pure solution. In 3 patients the IDR results were positive at 24 hours. None of the 11 negative control patients developed any immediate or delayed IDR response to amoxicillin.

No immediate responses to amoxicillin skin tests were developed by any patients.

Skin biopsies were performed at 48 hours on the 3 patients with positive patch test results to amoxicillin, at 24 hours on the 3 patients with positive IDR results (10^{-1} dilution), and at 24 hours on 1 of the 2 patients with delayed positive prick test reactions. The results (**Table 3**) were similar to those that had been observed on the initial skin biopsy specimens of the morbilliform rashes. It is important to note that patient 5, who had not undergone a biopsy for indirect immunofluorescence during the initial amoxicillin-induced morbilliform rash, had similar immunohistological results to the others. There was also much similarity in the results among the biopsies performed on the different types of tests.

Table 1. Immunohistological Results of the Morbilliform Rash Skin Biopsy Specimens*

Findings	Patient No. 1	2	3	4	5
Direct Immunofluorescence					
	–	–	IgM at DEJ	–	–
	–	–	Intravascular C3 Deposits	–	–
Indirect Immunofluorescence					
CD1 in epidermal LCs†	Normal	Normal	Normal	Decreased	ND
Keratinocytes					
HLA-DR	+	+	+	+	ND
CD564 (ICAM-1)	+	+	+	+	ND
Epidermal lymphocytes					
CD2⁺, CD3⁺, CD8⁺	–	–	+	–	ND
Perivascular lymphocytes					
CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺	++	++	++	++	ND
CD2⁺, CD3⁺, CD8⁺	+/–	+/–	+/–	+/–	ND
CD11a-CD18 (LFA-1)	+	+	+	+	ND
HLA-DR	–	+	–	+	ND
CD62L (LECAM-1)	+	–	–	–	ND
CD25	–	–	–	–	ND
CD49d-CD29 (VLA-4)	–	–	–	–	ND
Endothelial cells					
CD54 (ICAM-1)	+	+	+	+	ND
CD62E (ELAM-1)	++	++	++	++	ND
CD31 (PECAM-1)	+	+/–	+	+	ND
CD62P (P-selectin)	+	+	+	–	ND
CD106 (VCAM-1)	–	–	–	–	ND
Delay, d‡	5	7	11	7	11

*DEJ indicates dermoepidermal junction; LCs, Langerhans cells; ND, tests not done; minus sign, negative result; plus sign, positive result on approximately 20% of cells; plus/minus sign, faint result on sparse labeled cells; double plus sign, strongly positive result on numerous cells; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; LFA-1, leukocyte function–associated antigen 1; LECAM-1, leukocyte endothelial cell adhesion molecule 1; VLA-4, vascular cellular adhesion molecule 4; ELAM-1, endothelial leukocyte adhesion molecule 1; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule 1; and VCAM-1, vascular cellular adhesion molecule 1.

†CD^+ epidermal LC normal ranges were 300 to 400 mm^2.

‡Delay between the onset of the morbilliform rash and the skin biopsy.

Table 2. Results of Skin Test Reactions to Amoxicillin*

Patient No.	Prick Tests 20 min	Prick Tests 24 h	Intradermal Tests 20 min	Intradermal Tests 24 h†	Patch Tests 20 min	Patch Tests 48 and 96 h
1	–	+	–	+ (Until 10^{-2})	–	+
2	–	–	–	+ (Until 10^{-2})	–	+
3	–	–	–	–	–	–
4	–	–	–	–	–	–
5	–	+	–	+ (Until 10^{-3})	–	+

*Minus signs indicate negative readings; plus signs, positive readings.

†For intradermal testing, delayed positive reactions read at 24 hours were observed with different amoxicillin dilutions: pure solution (1 g per 2.5 mL), 10^{-1}, 10^{-2}, and 10^{-3} dilutions of the pure solution.

COMMENT

The data reported herein support the theory of a delayed T-cell–mediated immune reaction in patients with morbilliform rashes induced by amoxicillin, accurately reproduced by skin tests with delayed positivity showing similar immunological alterations in situ.

There was no evidence in this study of an immediate IgE-mediated immune reaction. The morbilliform rash began 1 to 10 days after the intake of amoxicillin and all immediate skin test readings gave negative findings, as did the findings from the radioallergosorbent and the human basophil degranulation tests.

Immunophenotyping of the morbilliform rashes showed that many cell types are involved in such delayed T-cell–mediated immune responses. Keratinocytes were activated, expressing HLA-DR and ICAM-1 in the basal layers of the epidermis, a result that has been reported to be induced by such cytokines (produced by activated immunocompetent cells) as interferon-γ or tumor necrosis factor α.[4] The presence of these molecules in suprabasal keratinocytes can be considered indirect proof of the activation

Table 3. Immunohistological Findings for the Positive Amoxicillin Skin Test Results*

Findings	Patient 1			Patient 2		Patient 5	
	Prick Test	IDR Test	Patch Test	IDR Test	Patch Test	IDR Test	Patch Test
Direct Immunofluorescence							
	–	–	–	–	–	–	–
Indirect Immunofluorescence							
CD1+ in LCs†	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Keratinocytes							
CD54 (ICAM-1)	+	+	+	+	+	+	+
HLA-DR	–	–	–	–	+	–	–
Epidermal lymphocytes							
CD2+, CD3+, CD8+	–	–	–	–	–	–	–
Perivascular lymphocytes							
CD2+, CD3+, CD4+	+	+	+	+	+	+	+
CD2+, CD3+, CD8+	+/–	+/–	+/–	+/–	+/–	+/–	+/–
CD11a-CD18 (LFA-1)	+	+	+	+	+	+	+
HLA-DR	–	–	–	–	+	–	–
CD62L (LECAM-1)	–	–	+	+/–	+/–	+	–
CD25	–	–	–	–	–	–	–
CD49d–CD29 (VLA-4)	–	–	–	–	–	–	–
Endothelial cells							
CD54 (ICAM-1)	++	++	++	++	++	++	++
CD62E (ELAM-1)	++	++	++	++	++	++	++
CD31 (PECAM-1)	+	+	+	+	+	+	+
CD62P (P-selectin)	+	+	+	+/–	+/–	+/–	+/–
CD106 (VCAM-1)	–	–	–	–	–	–	–

Skin biopsies were performed 24 hours after the prick test or the IDR testing and during the 48-hour patch test reading. IDR indicates intradermal; for an explanation of the rest of the abbreviations, see Table 1.

†CD1+ epidermal LC normal ranges were 300 to 400 mm².

of such immunocompetent cells as T lymphocytes in amoxicillin-induced morbilliform rashes.

Delayed immune cellular responses have been thought to be responsible for other types of cutaneous drug reactions, such as fixed drug eruption,[11] toxic epidermal necrolysis,[6,12,13] and bullous erythroderma.[14] In these conditions, CD8+ T lymphocytes seem to have a more prominent role than in morbilliform rashes. In our study, however, most of the cells of perivascular infiltrates were CD4+ T lymphocytes. This is in accordance with data from Warrington et al,[1] who described such CD4+ infiltrates and activated keratinocytes in 2 patients with amoxicillin-induced morbilliform rashes.

Hertl and Merk,[15] who reported that CD8+ T lymphocytes could play a crucial role in amoxicillin-induced morbilliform rashes, used a different approach in preparing T-cell clones from the biopsy specimens after the extraction and culture of the infiltrating epidermal cells.

The presence, in situ, of HLA-DR and CD62L on infiltrating T cells that we observed indicated the activated state of both CD4+ and CD8+ cells. Amoxicillin-induced morbilliform rashes could be due to T lymphocytes sensitized to this antibiotic, such as shown by Koponen et al[16] in the blood of patients hypersensitive to amoxicillin.

Activation of the endothelial cells was found to be important in this study, with a strong expression of CD54 (ICAM-1), CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1), and especially of CD62E (endothelial leukocyte adhesion molecule 1). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1 is a major adhesion molecule, which plays a prominent role in T lymphocyte homing to the skin, because it is the ligand of the cutaneous lymphocyte antigen or cutaneous leukocyte antigen.[17] Skin homing of T lymphocytes involved in cutaneous immune reactions would be correlated to the expression of this pair of adhesion molecules: endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and cutaneous leukocyte antigen.

The profile of adhesion molecule expression in amoxicillin-induced morbilliform rashes that we report is similar to that observed in cutaneous models of delayed cell-mediated immune responses after intradermal injection of tuberculin[18] or contact dermatitis due to metal sensitization.[19,20] However, no vascular cell adhesion molecule 1 endothelial expression was seen in our study, while Friedmann et al[20] found it in positive metal patch test results.

Our work also emphasizes the importance of delayed readings of skin tests. Recently, Wickern et al[21] reported a survey of current practices used by 3500 physicians to manage β-lactam drug allergies. Most of the skin tests used were prick tests and IDRs with immediate readings. As confirmed by our study, this method does not seem appropriate for the etiologic diagnosis of amoxicillin-induced morbilliform rashes. Delayed readings of skin tests, especially patch tests[22-28] and IDRs with amoxicillin,[1,24,28,29] appear highly informative in the diagnosis of these adverse drug reactions. As we have shown, there seems to be a strong correlation in these patients between the positivity of patch tests and delayed IDRs to amoxicillin.[28] Furthermore, we noted that in such patients even the amoxicillin prick tests could have posi-

tive results on a delayed reading. The frequency of delayed positivity in skin tests in patients with amoxicillin-induced morbilliform rashes is additional proof supporting the theory of delayed T-cell–mediated hypersensitivity in this disorder. This theory is also supported by the fact that we observed similar immunohistological results in biopsy specimens with positive skin test results and biopsy specimens from the various types of tests, from one patient to another, and in the initial biopsy specimens of the morbilliform rashes.

These results lead us to question the investigation protocols in β-lactam antibiotic hypersensitivity proposed by Blanca et al.[29] We think that an oral challenge should be considered with great caution or not performed at all in patients with amoxicillin-induced morbilliform rashes. The responsible mechanism is very different from that of immediate reactions to amoxicillin where oral challenges are well documented.[29] Negative responses to penicillin and immediate negative skin test reactions to amoxicillin are insufficient to authorize the immediate administration of an oral challenge with amoxicillin in patients with amoxicillin-induced morbilliform rashes. A rapid increase in the antibiotic's dosage during an oral challenge, as proposed for testing immediate adverse drug reactions, is not a suitable procedure for delayed immunological reactions.

Calkin and Maibach[26] stressed the need for available negative controls in every report of drug patch tests. This also appears necessary for drug intradermal testing. False-positive drug IDR results have been reported with vaccines[30] and insulin.[31] It was ascertained that all our negative control patients had been treated with amoxicillin within 6 weeks before being tested, as had been the allergic patients. Such negative control patients are difficult to collect but they seem to be better than healthy subjects, first from an ethical point of view, and second because, regarding drug intake, negative control patients have the same history of use of the drug as the patients studied.

In conclusion, this study demonstrates that amoxicillin-induced morbilliform rashes are related to a T-cell–mediated immune reaction that is immunologically well reproduced in delayed positive skin tests. These physiopathologic observations emphasize and support the importance of the delayed reading of apparently negative immediate and delayed skin tests with amoxicillin.

Accepted for publication November 18, 1996.

This work was supported by the Commission for Clinical Research of the University Hospital of Nancy. The Immunology Laboratory is supported by the French Minister of Education and Research.

Presented in part at a meeting of the French Society of Dermatology, Paris, France, November 10, 1994.

Reprints: Annick M. Barbaud, MD, Dermatology Department, Hôpital Fournier, University Hospital of Nancy, 36 Quai de la Bataille, 54035 Nancy, Cedex, France.

REFERENCES

1. Warrington RJ, Silviu-Dan F, Magro C. Accelerated cell-mediated immune reactions in penicillin allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 1993;92:626-628.
2. Bell SJD, Pichler WJ. Penicillin-allergic patients react to penicillin-modified self. *Allergy.* 1989;44:199-203.
3. Vega JM, Blanca MM, Carmona MJ, Claros A, Juarez C, Moya MC. Delayed allergic reactions to beta-lactams. *Allergy.* 1991;46:154-157.
4. Ansel J, Perry P, Brown J, et al. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol.* 1990;94(suppl):101s-107s.
5. Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today.* 1992;13:106-112.
6. Friedmann PS, Strickland I, Pirmohamed M, Park BK. Investigations of mechanisms in toxic epidermal necrolysis induced by carbamazepine. *Arch Dermatol.* 1994;130:598-604.
7. Begaud B, Evreux JC, Jouglard J, Lagier G. Imputabilité des effets inattendus ou toxiques des médicaments: actualisation de la méthode utilisée en France. *Therapie.* 1985;40:111-118.
8. Ceska MN, Erikson R, Varga JM. Radioimmunosorbent assay of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 1972;49:1-9.
9. Sainte-Laudy J. Standardization of basophil degranulation for pharmacological studies. *J Immunol Methods.* 1987;98:279-282.
10. Adams RM, Fischer T. Diagnostic patch testing. In: Adams RM, ed. *Occupational Skin Diseases.* 2nd ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 1990:223-253.
11. Shiohara T, Nickoloff BJ, Sagawa Y, Gomi T, Nagashima M. Fixed drug eruption: expression of epidermal keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Arch Dermatol.* 1989;125:1371-1376.
12. Miyauchi H, Hosokawa H, Akaeda T, Iba H, Asada Y. T-cell subsets in drug-induced toxic epidermal necrolysis: possible pathogenic mechanism induced by CD8+ T cells. *Arch Dermatol.* 1991;127:851-855.
13. Correia O, Delgado L. Cutaneous T-cell recruitment in toxic epidermal necrolysis. *Arch Dermatol.* 1993;129:466-468.
14. Hertl M, Bohlen H, Jugert F, Boecker C, Knaup R, Merk HF. Predominance of epidermal CD8+ T lymphocytes in bullous cutaneous reactions caused by beta-lactam antibiotics. *J Invest Dermatol.* 1993;101:794-799.
15. Hertl M, Merk HF. Lymphocyte activation in cutaneous drug reactions. *J Invest Dermatol.* 1995;105(suppl):95s-98s.
16. Koponen M, Pichler WJ, De Weck AL. T cell reactivity to penicillin: phenotypic analysis of in vitro activated cell subsets. *J Allergy Clin Immunol.* 1986;78:645-652.
17. De Boer OJ, Horst E, Pals ST, Bos JD, Das PK. Functional evidence that the HECA-452 antigen is involved in the adhesion of human neutrophils and lymphocytes to tumor necrosis factor-alpha–stimulated endothelial cells. *Immunology.* 1994;81:359-365.
18. Silber A, Newman W, Reimann KA, Hendricks E, Walsh D, Ringler DJ. Kinetic expression of endothelial adhesion molecules and relationship to leukocyte recruitment in two cutaneous models of inflammation. *Lab Invest.* 1994;70:163-175.
19. Goebeler M, Meinardus-Hager G, Roth J, Goerdt S, Sorg C. Nickel chloride and cobalt chloride, two common contact sensitizers directly induce expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) by endothelial cells. *J Invest Dermatol.* 1993;100:759-765.
20. Friedmann PS, Strickland I, Memon M, Johnson PM. Early time course of recruitment of immune surveillance in human skin after chemical provocation. *Clin Exp Immunol.* 1993;91:351-356.
21. Wickern GM, Nish WA, Bitner AS, Freeman TM. Allergy to beta-lactams: a survey of current practices. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;94:725-731.
22. Silviu-Dan F, McPhillips S, Warrington R. The frequency of skin test reactions to side-chain penicillin determinants. *J Allergy Clin Immunol.* 1993;91:694-701.
23. Sacerdoti G, Voza A, Ruocco V. Identifying skin reactions to drugs. *Int J Dermatol.* 1993;32:469-479.
24. Bruynzeel DP, Van Ketel WG. Skin tests in the diagnosis of morbilliform drug eruptions. *Semin Dermatol.* 1987;6:119-124.
25. Romano A, Difonso M, Pietrantonio F, et al. Repeated patch testing in delayed hypersensitivity to beta-lactam antibiotics. *Contact Dermatitis.* 1993;28:190.
26. Calkin JM, Maibach H. Delayed hypersensitivity drug reactions diagnosed by patch testing. *Contact Dermatitis.* 1993;29:223-233.
27. Bruynzeel DP, von Blomberg-van der Flier RJ, Scheper RJ, van Ketel WG, de Haan P. Penicillin allergy and the relevance of epicutaneous tests. *Dermatologica.* 1985;171:429-434.
28. Romano A, Difonso M, Papa G, et al. Evaluation of adverse cutaneous reactions to aminopenicillins with emphasis on those manifested by morbilliform rashes. *Allergy.* 1995;50:113-118.
29. Blanca M, Vega JM, Garcia J, et al. Allergy to penicillin with good tolerance to other penicillins: study of the incidence in subjects allergic to beta-lactams. *Clin Exp Allergy.* 1990;20:475-481.
30. Weisse M, Bass J. Tetanus toxoid allergy. *JAMA.* 1990;264:2448.
31. de Shazo RD, Mather P, Grant W, et al. Evaluation of patients with local reactions to insulin with skin tests and in vitro techniques. *Diabetes Care.* 1987;10:330-336.

Printed and Published in the United States of America

THE USE OF SKIN TESTING IN THE INVESTIGATION OF CUTANEOUS ADVERSE DRUG REACTIONS.

A. Barbaud* MD, S. Reichert-Penetrat* MD, P.Tréchot** PharmSciD, M-A. Jacquin-Petit* MD, A. Ehlinger* MD, V. Noirez° PharmSciD, G.C. Faure***MD,PhD, J-L. Schmutz* MD, M-C. Béné*** PharmSciD, PhD.

* Dermatology department, Fournier Hospital; ** Pharmacology Laboratory ; ° Central Pharmacy, Fournier Hospital; *** Immunology Laboratory - University Hospital of Nancy, Nancy, France.

Reprint requests :

Annick BARBAUD, MD

Service de Dermatologie

Hôpital Fournier, 36 Quai de la Bataille

University Hospital of Nancy

54000 - NANCY- France

Phone number : (33) 03 83 85 24 65

Fax number (33) 03 83 85 24 12

e-mail : a.barbaud@chu-nancy.fr

SUMMARY

Skin testing with the suspected compound has been reported to be helpful in determining the cause of cutaneous adverse drug reactions (ADR), but the value and specificity of these tests need to be determined. In this study 72 patients with presumed drug eruptions (27 maculopapular, 18 urticarial, 7 erythrodermic, 9 eczematous, 4 photosensitivity, 3 fixed drug eruptions, 3 with pruritus and 1 with acute generalized exanthematous pustulosis) were assessed. All had drug patch tests, 42 also had prick tests, and 30 had intradermal tests (performed on hospitalised patients using a sterile solution of the suspected drug, diluted sequentially) with immediate and delayed readings. Among these patients, 52 (72%) had a positive skin test reaction, respectively 43%, 24% and 67% in patch, prick and intradermal skin tests. The results of skin tests varied with the drug tested and with the clinical type of cutaneous ADR, as a significantly higher number of positive patch tests was observed in maculopapular rashes than in urticarial reactions ($p = 0.001$). This study supports the value of careful sequential drug skin testing in establishing the cause of cutaneous ADR. Guidelines are proposed for performing these tests, and include use of appropriate negative control patients, to avoid false positive results.

The skin is affected in 25 to 30% of adverse drug reactions (ADR) [1]. Different mechanisms are responsible for such cutaneous drug reactions, but some ADR are thought to be of immunological origin [1-3]. Skin testing with the suspected drug, may be helpful in determining the cause of a cutaneous ADR. It may include drug patch-tests (or photopatch tests), prick tests and/or intradermal tests (IDR).
In immediate immunoglobulin E-mediated drug reactions, rules defining the procedures for prick tests and IDR have been proposed in previous studies [4], but care must be taken in reading not only the immediate but also delayed reactions of these skin tests. Cutaneous ADR thought to be caused by a delayed cell-mediated immune reaction [1-3] such as maculopapular rashes (MPR), fixed drug eruptions (FDE), lichenoid or eczematous reactions are rarely evaluated through these tests. However, as we and others have shown, patch tests can be helpful for the aetiological diagnosis [5-15]. Osawa *et al.* [14] have reported positive drug patch test results in 31.5% of cutaneous ADR of non-immediate type. More specifically, the positivity rates reported in the literature vary between 17 and 35% in investigated cutaneous ADR due to penicillin derivatives [8,11].

In spite of the interest of such investigations, the literature lacks prospective studies having determined the value and specificity of drug skin tests in cases of cutaneous ADR. Guidelines are also lacking concerning the procedure to use for each drug and the various clinical forms of cutaneous ADR.
This paper reports a study in which the clinical features of the cutaneous ADR, the chronology of drugs intakes and the imputability of each drug (according to the criteria proposed by Moore *et al.* [20]) were assessed for 72 patients. Drug patch tests, often with associated prick tests and IDR, were performed, six weeks after the onset of the cutaneous ADR. Immediate and delayed readings were evaluated for each series of tests.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This study received the approval of the Medical Ethical Committee of the University Hospital of Nancy (France). For each of the 310 patients enrolled, clinical features of the dermatosis were classified. Imputability for each drug taken prior to or during the onset of dermatosis was determined, according to criteria proposed by Moore *et al.* [20]. Seventy two patients fulfilled inclusion criteria (Table 1).

All the included 72 patients had a very likely intrinsic imputability of one drug at the onset of dermatosis, and had drug patch tests, 6 weeks after the onset of cutaneous ADR. Thirty one of the 72 patients had had at least two episodes of similar cutaneous ADR after taking the culprit drug again (accidental rechallenge).

Clinical aspects of these 72 patients (24 men, 48 women ; mean age = 52.3 years, standard deviation = 21.4 years) were as follows : 21 maculopapular rashes (MPR), 6 maculopapular and purpuric rashes, 14 urticarias, 4 urticarias with angioedema, 7 erythrodermas (exfoliative dermatitis), 8 generalized eczemas, 1 localized eczema, 4 photosensitivity eczematous reactions, 3 fixed drug eruptions (FDE), 3 pruritus and 1 acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) (Tables 2,3 and 4). The drugs involved were anti-infectious agents in 42 cases : betalactam drugs in 21 cases (table 3) ; macrolides and related in 14 cases, co-trimoxazole in 2 cases ; quinolones in 2 cases ; doxycycline, aciclovir, isoniazid in one case each (Table 3). The various drugs responsible for cutaneous ADR in the other 30 patients are reported in Table 4.

Patch tests

Patch tests were performed on the upper back of all 72 patients using Finn Chambers on Scanpor tape ® (Epitest Ltd oy, Tuusula, Finland). In all patients, patch tests of the European standard series were used and the drug responsible for the cutaneous ADR was tested with the commercialised form used by the patient. As a whole 37 different drugs were investigated. Pills in powder form were tested as is,

diluted at 30% in water. The content of capsules was tested as is, diluted at 30% in pet. and diluted at 30% in water. The gel jacket portion of capsules was moistened and tested as is. Liquid preparations were tested both as is and diluted 1:1 in water. For 27 of the drugs involved, the pure drug was also tested as is, diluted at 30% in petrolatum and at 30% in water. Additionally, the excipients and preservatives contained in the commercialised drug were tested (Table 5).
Patch test reactions were read at 20 minutes, 2, 3 and 4 days. The results of patch testing were reported according to the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) criteria for patch test reading [21].

Prick Tests

In 46 cases, prick tests were performed, on the volar forearm skin with the commercialised form of the drug, thought to be the agent of the cutaneous ADR. Whenever possible, both the pure drug and excipients were tested as is (in the form used for patch testing). If urticaria had developed in the patient, the drug was tested with the same sequential solutions as those used for IDR at 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1} then pure. Except for investigations performed with amoxycillin, and in one other case (n°68), prick tests were performed only when drug patch tests had negative results. In two cases (n°20,58) prick tests were not performed because the patients had refused further investigations after they had had patch tests with negative results.
Reactions were considered positive when a weal with a diameter larger than that of the negative control (0.9% saline) was present 20 minutes later. Positive controls were performed with codeine phosphate at 9%. In all cases a delayed reading was performed 24 hours after initial tests.

Intradermal tests (IDR)

Intradermal tests were performed only when prick tests showed negative results 20 minutes after testing with the suspected drug. Intradermal tests were never

performed in patients with erythema multiforme (EM), toxic epidermal necrolysis (TENs) or leucocytoclastic vasculitis on histological examination. Because no sterile forms of josamycin, pristinamycin and pipemidic acid could be obtained for skin testing, intradermal tests with these drugs could not be performed. In an additional 3 cases (n^{os}21,25,37) the patients refused intradermal testing. The pure drugs tested, vehicles, as well as the nature and the concentration of the initial dilution used are reported in Table 5.

The following guidelines were applied for IDR testing :

1) Dilutions were prepared, under a laminar flow, no longer than 2 hours preceding administration. 2) All necessary precautions were taken in case emergency treatment should be needed. Tested patients were hospitalised for a minimum of at least 24 hours following the IDR tests. Intravenous glucose solution was given for at least 2 hours following the last IDR when the investigation results remained negative, and for at least 6 hours if the IDR had positive results. Blood pressure, pulse and peak-flow were regularly monitored. 3) Intradermal tests were performed using a sterile solution of the suspected drug, diluted sequentially (10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1}) in phenolated saline (0.5% phenol in 0.9% saline). 4) Intradermal tests were performed on the extensor surface of the arm, with a small volume (0.04 mL) that produced a weal of 4 to 6 mm in diameter. A negative control was performed with phenolated saline. When read after 30 minutes, IDR results were considered positive if a weal of more than 10 mm in diameter was observed. The first IDR was performed with a 10^{-4} dilution. If results were negative after 30 minutes, subsequent IDR were performed with increasingly higher serial dilutions up to the pure solution, at 30 minutes intervals, as long as tests results of the previous dilution were negative. 5) Intradermal test results readings were performed at 30 minutes, 6 hours and 24 hours. If a delayed positive reaction was observed the diameter of the papule was measured. When the IDR results were negative, a telephone call to the patient, 1 week later, confirmed that the results were indeed negative or not.

Preservatives, colouring agents and excipients

The method of testing these drug components is reported in Table 5.

Negative controls for immunological investigations

In order to ensure the absence of non significant skin reactivity (irritation) at the doses used for skin tests, a population of negative controls was recruited (Table 6). These controls were patients who had demonstrated a dermatosis, 6 weeks previously, while taking several drugs, including one of those implicated in this study. They were considered negative controls if they failed to display reactivity to one of these drugs, while another drug was confirmed to be responsible for the cutaneous ADR they had had. For example, if a patient had taken amoxycillin and paracetamol, was demonstrated to have displayed a cutaneous ADR due to amoxycillin, and displayed negative skin tests with paracetamol, he/she was enrolled as a negative control for paracetamol. Additionally, for intradermal testing with penicillin G, erythromycin and spiramycin, the irritant concentrations were controlled and confirmed by performing IDR in 5 healthy volunteers (who are all co-authors of this paper).

Statistics

Statistical analysis, comparing the incidence of positive skin test reactions according to the initial clinical features of the cutaneous ADR were performed using Myosotis software (Coultronics France, Margency, France) with a χ^2 test.

RESULTS

Patient data are reported in Table 2, for betalactam antibiotics ; in Table 3, for other anti-infectious agents, and in Table 4, for other drugs.

Patch tests with drugs

None of the patients developed immediate positive patch test reactions.

Twenty seven patients of 72 (37.5%) had positive drug patch test reactions at 2 days and/or 4 days. In 21 patients, patch test reactions were positive, from readings taken on day 2 and day 4. Six patients (n°s 6,18,29,31,46,50) developed a positive patch test reaction only on the reading taken on day 4. Frequencies of positive drug patch test reaction distribution according to initial clinical features were as follows : MPR, 14+/21 (67%) ; maculopapular and purpuric rashes, 2+/6 (therefore, in all MPR, 16+/27 (59.3%)) ; urticaria, 1+/14 (7%); angioedema, 1+/4 (therefore in urticaria and angioedema, 2+/18 (11.1%)); erythroderma, 5+/7 ; eczema, 3+/9 ; AGEP, 1+/1 ; fixed drug reactions, 0+/3 ; photosensitivity reactions, 0+/4 and pruritus, 0+/3. In patient #13 a positive patch test reaction was obtained only when amoxycillin was diluted in petrolatum, but negative when the drug was tested as is or diluted in water..

The 3 patients with FDE had negative patch test results when tested on the pigmented site of the previous adverse drug reaction.

The 4 patients with photosensitivity all had positive photopatch test results. During PUVAtherapy with methoxsalen, prescribed for psoriasis, one of these 4 patients (#62) developed a severe generalized eczema. For the same patient the results of a photopatch test with methoxsalen (irradiated with UVA) were strongly positive, with histological features of eczema on the skin biopsy.

Among the 72 patients having patch tests, 5 had a slight relapse of cutaneous ADR : after a positive patch test reaction with aciclovir (n°42), amoxycillin (n°17), hydroxyzine (n°61),pseudoephedrine (n°68) or triamcinolone (n°72).

Prick tests

Prick tests were performed in 46 patients, and the following was observed : 11 had positive reactions (24%) ; 7 (15%) of them with only an immediate positive reaction at 20 minutes reading and 4 (8.7%) (with a clinical feature of MPR) with only a delayed positive reaction at the 24 hours reading.

Among the patients with initial clinical features of MPR, 5/17 (29.4%) had positive prick test reactions, 1 of them with only an immediate positive reaction with erythromycin at 20 minutes reading and 4 with only positive reactions (with amoxycillin or pseudoephedrine) at 24 hours reading.
Among the 3 patients with initial clinical features of pruritus, 1 had a positive prick test reaction with tetrazepam at 20 minutes reading.
Among the patients with initial clinical features of urticaria, 4/13 (30%) had positive prick test reactions with amoxycillin, cefapirin, acetaminophen (paracetamol) or spiramycin, at 20 minutes reading. Among the 4 patients with initial features of angioedema 1 had a positive prick test reaction with pholcodine at 20 minutes reading (patient #64) with a slight relapse of angioedema and ocular pruritus.
In urticaria and angioedema prick tests were positive in 5/17 cases (29.4%). No false positive prick test results were observed in any of the negative controls.

Intradermal tests (IDR)

Among the 30 patients undergoing IDR, 20 had positive results (66.6%), 4 on immediate reading only (2 MPR and 2 urticarias), 12 on delayed reading only (with amoxycillin, erythromycin, enoxoparin and piroxicam) and 4 both on immediate and delayed readings (with amoxycillin, piroxicam and oestradiol) (Tables 2,3 and 4).
In 1 patient (n°53), the IDR result with enoxoparin only became positive on day 3.
Iintradermal test results were interpreted based on the reaction of negative controls, which allowed the detection of non-specific irritant reactions. Irritant reactions were observed with penicillin G, erythromycin and spiramycin. In our experience, test concentrations must be carefully considered, as too high a concentration may yield false positive results. The highest concentration levels selected in this study were as follows : $5x10^5$ U/mL for penicillin G, 0.2 mg/mL for erythromycin and 375 U/mL for spiramycin.
Altogether, IDR results were positive for the 8 of the 12 (67%) tested patients exhibiting MPR, 4 of the 5 patients with eczema and 5 of the 10 patients with

urticaria and/or angioedema. After positive IDR reactions, one patient had localized MPR (patient #49), one urticaria (patient #22) and one slight angioedma (patient #38).

As a whole 52 out of 72 patients (72%) manifested at least one positive, pertinent skin test result.
No positive reactions on patch, prick or IDR testing with preservatives, colouring agents and excipients were observed in any patient.

Statistical analysis

In order to appreciate whether the type of ADR influenced the rate of positive skin test reactions, we compared the results of these tests between the various clinical features of ADR. A significantly higher (p=0.001) number of positive patch test results was observed in MPR (59.3%) when compared to urticarias (11%). We also compared the results of prick tests and IDR performed in patients who had patch tests with negative results. In MPR, 5/12 (42%) patients had negative results of patch tests but positive prick tests or IDR, while in urticarias 11/13 patients (85%) had negative results of patch tests, but positive prick tests or IDR (p = 0.2). In patients with patch tests with negative results, a higher number of positive prick test results was observed in urticarias (5+/17, 29.4%) when compared to MPR (0%) (p = 0.32).

DISCUSSION

The results obtained in this prospective study involving 72 patients, emphasise the value of drug skin tests with the suspected drug in defining the cause of, and in monitoring, cutaneous adverse drug reactions, as positive results were obtained in respectively 43%, 24% and 67% of (photo)patch, prick and IDR drug skin tests. In

case of prick tests and IDR, they were performed in preselected patients, with negative patch test results.

Among 72 patients who had a very likely intrinsic imputability [20] of one drug at the onset of their cutaneous adverse drug reaction, 72% had a positive skin test reaction, using a combination of patch (plus photopatch tests in 4 patients [22]), prick and intradermal drug tests. It should be emphasised that in this series, 31 patients had had a readministration of the responsible drug with a relapse, often severe, of the cutaneous ADR, before they were examined in our department. Nine patients had a relapse of the cutaneous ADR following the investigations.

It is necessary to define the value of the relatively safe drug skin tests in order to avoid, whenever possible, drug rechallenges. Some authors considered reexposure to the responsible drug for cutaneous ADR ethically inadvisable if severe cutaneous manifestations [18], especially EM or TENs [23], occurred during the drug intake.

Patch testing has proven to be a very safe method in the monitoring of cutaneous ADR [5,9,15]. Osawa *et al.* [14] have demonstrated that positive patch test results were obtained in 31.5% of 197 patients manifesting cutaneous ADR. Bruynzeel *et al.* [11] were able to obtain positive patch test results in 30-35% of patients suspected of being allergic to penicillin. In the data reported here, 43% of the patients had positive results with drug patch or photopatch tests.

These data emphasise that drug patch test results depend on 1) clinical features and immunological mechanisms involved in cutaneous ADR, 2) the drug responsible for cutaneous ADR and the manner in which tests are performed and read. 3) The specificity of patch test results also needs to be verified using appropriate negative controls.

Drug patch test results depend on initial clinical features of the cutaneous ADR, especially if the cutaneous ADR is a T-cell mediated immune drug reaction [3,6]. In this study, 59.3% of patients with MPR had positive patch test results ; this was significantly different ($p = 0.001$) from the results observed in patients with urticarias (11%), therefore confirming the value of patch tests in monitoring MPR [7,12].

Bruynzeel *et al.* [7] reported similar results in patients with MPR due to amoxycillin (18 of 47 positive patch test results). Our previous immunohistological studies [12] supported the hypothesis of a delayed T-cell-mediated immune reaction in patients with MPR induced by amoxycillin, accurately reproduced by drug skin tests with delayed positivity. Similar immunohistological alterations were found *in situ* in biopsy specimens obtained from maculopapular rashes induced by amoxycillin and biopsy specimens obtained in the same patients who had delayed positive results of their patch tests, prick tests and/or IDR performed with amoxycillin [12].

Patch tests may as well be useful in determining the culprit drug in some other clinical features of cutaneous ADR - thought to be induced by a cellular delayed immune reaction [1-3] - such as AGEP [13], erythrodermas [14,24,25] and generalized eczema [14,24]. Photopatch tests have an investigative value in drug photosensitivity[22,26,27]. Patch tests appear to be of less investigative value in determining the cause of erythema multiforme, TENs [13] or urticaria [15].

Patch tests seem to be more sensitive if performed on the site of a previously affected area of skin, especially in FDE [28,29]. This may also hold true for other clinical types of cutaneous ADR. Klein *et al.* [30] observed positive patch test reactions to co-trimoxazole only when patch tests were performed on the area previously affected by TENs.

Patch test results vary with the drug suspected as the cause of the cutaneous ADR. As confirmed by our data, patch tests seem to be useful in determining the culprit drug when they are performed with betalactam antibiotics, especially amoxycillin and cephalosporins[7-12,31], carbamazepine[25,32-34], tetrazepam[35], pristinamycin [24], heparin [36,37], pseudoephedrine[38], corticosteroids [39,40], diltiazem [41] and hydroxyzine [42]. They may also be of diagnostic value for other drugs [9] such as, diclofenac [43], diazepam [15], meprobamate [15] and co-trimoxazole [30].

False negative drug patch test results can be due to various causes. The drug being tested may be unable to penetrate into the epidermis or the concentration used in patch testing is too low to elicit a positive reaction. To avoid this, tests were carried

out with pure drugs and diluted only by 30%, the highest concentration giving a good distribution of the drug into the white petrolatum. The vehicle with which the drug was diluted may not enhance the penetration of the tested drug into and through the epidermis. For this reason we to patch tested each drug with different vehicles [28] (*i.e.* in patient #13 a positive patch test reaction was obtained only when amoxycillin was diluted in petrolatum). Another explanation of course is that the culprit source of the cutaneous ADR was not the native drug itself but one of its metabolites [14]. Such a mechanism was recently noted by Popescu *et al.* [44] who demonstrated using prick tests and IDR, that five patients with allergic reactions to cyclophosphamide had immediate positive skin tests when performed with 2 cyclophosphamide metabolites but not with the native drug. Appropriate delayed readings have to be performed. Immediate and delayed readings in our study were performed at 20 minutes, on days 2 and 4 and whenever possible on day 7. Four patients (#6,29,31,50) with negative patch test reactions on day 2 and 3 had positive readings on day 4.

The diagnostic value of prick tests and IDR in determining the causes of cutaneous ADR has been less evaluated than the value of patch tests. Osawa *et al.* [14] obtained positive IDR results in 89.7% of their patients, but in the absence of appropriate negative controls the specificity of their IDR cannot be validated. Most papers published on drug prick tests and IDR relate to ADR induced by betalactam antibiotics [10,12,16,17,45]. Prick tests and IDR have been performed less frequently with other drugs such as diltiazem [41], heparin [36,37], insulin [46], oestradiol [47] or corticosteroids [48]. In this study, using an unusually large pool of patients, prick tests and IDR were performed with respectively 23 and 12 different drugs.
When patch test results are negative, prick tests and IDR can be performed and be of diagnostic value. In this study, 21 patients who had negative results of their drug patch tests had positive results of drug prick tests or IDR. In urticaria, when patch test results are negative, prick tests seem to have a higher diagnostic value than in MPR. As previously reported, we observed delayed positive IDR results in

cutaneous ADR due to amoxycillin [10,12,19] or to heparin [36,37]. We also observed delayed positive prick tests results with pseudoephedrine, and delayed positive IDR results with piroxicam and erythromycin.

Caution must be used when performing drug skin tests. Even if patch tests seem to be the safest, we emphasise that they are also able to reinduce an adverse drug reaction. This was observed in this study when using aciclovir, amoxycillin, hydroxyzine, pseudoephedrine or triamcinolone. This phenomenon has also been reported with pseudoephedrine [38], carbamazepine [32] and clobazepam [49].

When patients had an initial clinical presentation of urticaria or angioedema, prick tests were performed with diluted preparations of the suspected drug. Even with this precaution, one patient (n°64) had a relapse of angioedema. The risk of relapse of initial cutaneous ADR is even greater when performing IDR. Among 30 IDR performed, 3 incidents were observed (1 MPR, 1 urticaria and 1 angioedema). Because of this risk, we suggest that the guidelines described in « Materials and Method » sections be strictly adhered to. The volume of drug administered for IDR should be as low as possible. In our experience 0.04 mL is the safest quantity and the lowest volume that gives reproducible responses.

Calkin and Maibach [9] stressed the need for at least 20 negative controls in order to report drug patch test results. This also appears to be necessary for reporting prick and intradermal drug test results. In this study, it was ascertained that all negative control patients had been treated with the drug in question, within 6 weeks before being tested, as had been the allergic patients. Such negative controls are difficult to collect, especially for drugs not widely used or well tolerated, but they seem to be better than healthy subjects, first from an ethical point of view, and second because, regarding drug intake, negative control patients have the same history of use of the drug as the patients studied. Positive patch test results seem specific compared to negative controls, as only one doubtful false positive patch test result was observed among 7 negative controls tested with captopril. Negative controls for interpreting

IDR results are absolutely necessary to avoid the declaration of a false positive result, as we determined for penicillin, erythromycin or spiramycin.
The high percentage of positive test results (72%) observed in this study is due to the careful following of the guidelines herein proposed. It must be emphasised that 1) negative results in skin tests do not exclude responsibility of a drug in the onset of a cutaneous ADR 2) and that it is practicable to compare test results with specifically selected negative patient controls. Logically, the first tests to be performed should be patch tests (confirmed by readings taken after at least 96 hours). Prick tests can then be performed (obviously using sequential increasing dilutions in patients with urticaria or angioedema), especially to investigate urticarias. Only when both patch and prick tests are negative should IDR be performed, with sterilised sequential dilutions in hospitalised patients. Both prick tests and IDR readings should be made at 20mn, 6 hours and 24 hours at least, and whenever possible confirmed on day 3. Excipients, preservatives and colouring agents have to be tested as well, even if they are an infrequent cause of cutaneous ADR and preferentially induce urticaria or anaphylactic reactions [50].

In conclusion this study demonstrates the feasibility and value of careful sequential drug testing for the determination of the cause of cutaneous ADR, and proposes guidelines to perform such investigations. In this type of sequential drug testing, it is imperative to remember that all testings should be halted as soon as a confirmed positive drug test has been obtained. This must be done in order to avoid a relapse of the initial cutaneous adverse drug reaction, which amongst other things can be caused by clinical intolerance to these tests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants from the Clinical Research Commission of the University Hospital of Nancy and by the French Minister of Education and Research (J.E. DRED # 251).

REFERENCES

1- Breathnach SM. Mechanisms of drug eruptions : Part 1. Australas J Dermatol 1995;36: 121-7.

2- de Weck AL. Pharmacologic and immunochemical mechanisms of drug hypersensitivity. Immunol Allergol Clin North Am 1991;11: 461-74.

3- Barbaud A, Béné M-C, Faure G. Immunological physiopathology of cutaneous adverse drug reactions. Eur J Dermatol 1997;7 : 319-23.

4- Ressler C, Mendelson LM. Skin test for diagnosis of penicillin allergy. Current Status. Ann Allergy 1987;59: 167-70.

5- Bruynzeel DP, van Ketel WG. Patch testing in drug eruptions. Semin Dermatol 1989;8: 196-203.

6- Breathnach SM. Management of drug eruptions : Part II. Diagnosis and treatment. Australas J Dermatol 1995;36: 187-91.

7- Bruynzeel DP, Van Ketel WG. Skin tests in the diagnosis of maculopapular drug eruptions. Sem Dermatol 1987;6:119-24.

8- Romano A, Di Fonso M, Pietrantonio F *et al.* Repeated patch testing in delayed hypersensitivity to beta-lactam antibiotics. Contact Dermatitis 1993;28: 190.

9- Calkin JM, Maibach H. Delayed hypersensitivity drug reactions diagnosed by patch testing. Contact Dermatitis 1993;29: 223-33.

10- Romano A, Di Fonso M, Papa G *et al.* Evaluation of adverse cutaneous reactions to aminopenicillins with emphasis on those manifested by maculopapular rashes. Allergy 1995;50: 113-8.

11- Bruynzeel DP, von Blomberg-van der Flier M, Scheper RJ *et al.* Penicillin allergy and the relevance of epicutaneous tests. Dermatologica 1985;171:429-34.

12- Barbaud A, Béné M-C, Schmutz J-L *et al.* Role of delayed cellular hypersensitivity and adhesion molecules in amoxycillin-induced morbilliform rashes. Arch Dermatol 1997;133 :481-6.

13- Wolkenstein P, Chosidow O, Fléchet M-L *et al.* Patch testing in severe cutaneous adverse drug reactions, including Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. Contact Dermatitis 1996;35:234-6.

14- Osawa J, Naito S, Aihara M *et al.* Evaluation of skin test reactions in patients with non-immediate type drug eruptions. J Dermatol 1990;17: 235-9.

15- Felix R, Comaish J. The value of the patch tests and other skin tests in drug eruptions. Lancet 1974;i: 1017-9.

16- Blanca M, Vega JM, Garcia J et al. Allergy to penicillin with good tolerance to other penicillins; study of the incidence in subjects allergic to betalactams. Clin Exp Allergy 1990;20: 475-81.

17-Silviu-Dan F, Mc Phillips S, Warrington R. The frequency of skin test reactions to side-chain penicillin determinants. J Allergy Clin Immunol 1993;91: 694-701.

18- Sacerdoti G, Vozza A, Ruocco V. Identifying skin reactions to drugs. Int J Dermatol 1993;32: 469-79.

19- Warrington RJ, Silviu-Dan F, Magro C. Accelerated cell-mediated immune reactions in penicillin allergy. J Allergy Clin Immunol 1993;92: 626-8.

20- Moore N, Paux G, Begaud B, Biour M, Loupi E, Boismare F, Royer RJ. Adverse drug reaction monitoring : doing it the french way. Lancet 1985;ii: 1056-8.

21- Adams RM, Fischer T. Diagnostic patch testing. In : *Occupational Skin Diseases* (Adams RM, ed), 2nd edn., Philadelphia : WB Saunders Co, 1990 ; 223-53.

22- Jeanmougin M. Détermination du pouvoir photosensibilisant d'un médicament par la méthode des photopatch tests. Nouv Dermatol 1986;5: 204-8.

23- Kauppinen K, Alanko K. Oral provocation : uses. Semin Dermatol 1989;8: 187-91.

24- Michel M, Dompmartin A, Szczurko C *et al.* Eczematous-like drug eruption induced by synergistins. Contact Dermatitis 1996;34: 86-7.

25- Jones M, Fernandez-Herrera J, Dorado JM, Sols M, Ruiz M, Garcia-Diez A. Epicutaneous test in carbamazepine cutaneous reactions. Dermatology 1994;188: 18-20.

26- Hölzle E, Neumann N, Hausen B *et al.* Photopatch testing : the 5-year experience of the German, Austrian, and Swiss photopatch test group. J Am Acad Dermatol 1991;25: 59-68.

27- Menz J, Muller SA, Connolly S. Photopatch testing : a six-year experience. J Am Acad Dermatol 1988 ;18 : 1044-7.

28- Alanko K, Stubb S, Reitamo S. Topical provocation of fixed drug eruption. Br J Dermatol 1987;116: 561-7.

29- Sehgal VN, Gangwani OP. Fixed drug eruption. Current concepts. Int J Dermatol 1987;26: 67-74.

30- Klein CE, Trautmann A, Zillikens D, Brocker EB. Patch testing in an unusual case of toxic epidermal necrolysis. Contact Dermatitis 1995;33: 448-9.

31- Adkinson NF. Side-chain specific beta-lactam allergy. Clin Exp Allergy 1990;20: 445-7.

32- Vaillant L, Camenen I, Lorette G. Patch testing with carbamazepine : reinduction of an exfoliative dermatitis. Arch Dermatol 1989;125: 299.

33- Alanko K. Patch testing in cutaneous reactions caused by carbamazepine. Contact Dermatitis 1993;29: 254-7.

34- Puig L, Nadal C, Fernandez-Figueras M-T, Alomar A. Carbamazepine-induced drug rashes : diagnostic value of patch tests depends on clinico-pathologic presentation. Contact Dermatitis 1996;34: 435-7.

35- Ortega NR, Barranco P, Lopez Serrano C *et al.* Delayed cell-mediated hypersensitivity to tetrazepam. Contact Dermatitis 1996;34: 139.

36- Bircher AJ, Flückiger R, Buchner SA. Eczematous infiltrated plaques to subcutaneous heparin : a type IV allergic reaction. Br J Dermatol 1990;123: 507-14.

37- Moreau A, Dompmartin A, Esnault P *et al.* Delayed hypersensitivity at the injection sites of a low-molecular-weight heparin. Contact Dermatitis 1996;34: 31-4.

38- Tombs RR, Lepoittevin JP, Espinassouze F *et al.* Systemic contact dermatitis from pseudoephedrine. Contact Dermatitis 1991;24: 86-8.

39- Dooms-Goossens A. Allergy to inhaled corticosteroids : a review. Am J Contact Dermatitis 1995;6: 1-3.

40- Bircher AJ, Pelloni F, Langauer-Messmer S, Müller D. Delayed hypersensitivity reactions to corticosteroids applied to mucous membranes. Br J Dermatol 1996;135: 310-3.

41- Romano A, Pietrantonio F, Garcovich A *et al.* Delayed hypersensitivity to diltiazem in two patients. Ann Allergy 1992;69: 31-2.

42-Michel M, Dompmartin A, Louvet S *et al.* Skin reactions to hydroxyzine. Contact Dermatitis 1997 ;36 : 147-9.

43- Romano A, Pietrantonio F, Di Fonso M *et al.* Positivity of patch tests in cutaneous reaction to diclofenac. Allergy 1994;49: 57-9.

44- Popescu NA, Sheehan MG, Kouides PA *et al.* Allergic reactions to cyclophosphamide : delayed clinical expression associated with positive immediate skin tests to drug metabolites in five patients. J Allergy Clin Immunol 1996;97: 26-33.

45- Audicana M, Bernaola G, Urrutia I *et al.* Allergic reactions to betalactams : studies in a group of patients allergic to penicillin and evaluation of cross-reactivity with cephalosporin. Allergy 1994;49: 108-13.

46- Barbaud A, Got I, Tréchot P *et al.* Allergies cutanées et insulinothérapie. Aspects récents, conduite à tenir. Ann Dermatol Vénéréol 1996;123: 214-8.

47- Shelley WB, Shelley ED, Talanin NY, Santoso-Pham J. Estrogen dermatitis. J Am Acad Dermatol 1995;32: 25-31.

48- Vidal C, Tome S, Fernandex-Redondo V, Tato F. Systemic allergic reaction to corticosteroids. Contact Dermatitis 1994;31: 273-4.

49- Machet L, Vaillant L, Dardaine VF, Lorette G. Patch testing with clobazepam : relapse of generalized drug eruption. Contact Dermatitis 1992;26: 347-8.

50- Barbaud A. Place of excipients in drug related allergy. Clin Rev Allergol Immunol 1995;13:253-63.

Table 1 : Criteria for Inclusion of patients and some details of undertaken investigations

- Clinical features of the cutaneous adverse reaction were observed by at least one of the co-authors, described, photographed and classified.
- Skin biopsy with histological study was performed at the onset of the cutaneous adverse drug reaction.
- Chronology of drug intakes and imputability for each drug taken prior to or during the onset of dermatosis could be determined according to criteria proposed by Moore *et al.*[20].
- One drug was identified as being very likely the cause of the eruption at its onset.
- The following investigations were performed : full blood count, platelet count, sedimentation rate ; serum creatinine, transaminases, alkaline phosphatase, bilirubin ; Immunoglobulin levels, complement fractions assays, circulating immune complex assays, lymphocyte subset assessment ; tests for *Herpes hominis* type I and II, *Mycoplasma*, Cytomegalovirus, *Rickettsiae* , Epstein-Barr virus , *Haemophilus influenzae b* , Parvovirus B 19, Coxsackie virus, Enteroviruses serologies ; Antistreptolysins, antistreptokinases, antistreptodornase assays.
- Patients had given informed consent for drug patch tests, 6 to 10 weeks after the onset of the cutaneous ADR.
- Drug patch tests could be performed, at least 1 month after the discontinuation of local or systemic corticosteroid therapy
- Patients were off antihistamines or β blockers when the skin tests were performed.

Table 2 : Skin test results in patients with cutaneous adverse drug reaction induced by beta-lactam antibiotics.

MPR : maculopapular rash, MPR+pur : MPR with purpura, G eczema : generalized eczema, erythroD : erythrodermia, FDE : fixed drug eruption, AGEP : acute generalized erythematous pustulosis, photoS : photosensitivity, urt+AO : urticaria with angioedema. Results of patch tests are given on day 2 and day 4 readings, according to ICDRG criteria for patch test reading [21].

Nd : not done; * : positive photopatch test; ** : reactivation of the cutaneous ADR following skin testing.

Patient number	Presentation	Patch test	PrickTest immediate	PrickTest delayed	Intra dermal testing immediate	Intra dermal testing delayed	Reintroduced	Drug
1	MPR	-	-	-	-	-	0	amoxycillin
2	MPR	-	-	-	-	-	0	amoxycillin
3	MPR	++/++	-	+	-	+	0	amoxycillin
4	MPR	++/++	-	-	-	+	+	amoxycillin
5	MPR	++/++	-	+	-	+	+	amoxycillin
6	MPR	0/+	nd		nd		0	amoxycillin
7	MPR	++/++	-	+	-	+	+	amoxycillin
8	MPR	-	-	-	+	-	0	amoxycillin
9	MPR + pu	+/+	-	-	-	+	0	amoxycillin
10	MPR + pu	-	-	-	-	+	0	amoxycillin
11	urticaria	-	-	-	-	-	0	amoxycillin
12	urticaria	-	-	-	+	+	0	amoxycillin
13	urticaria	+/++	-	-	nd		0	amoxycillin
14	urticaria	-	+	-	nd		+	amoxycillin
15	urticaria	-	-	-	+	-	0	amoxycillin
16	erythroD	-	-	-	-	+	+	amoxycillin
17	G Eczema	-	-	-	-	+ 48h	0 **	amoxycillin
18	G Eczema	0/+	nd		nd		0	Penicillin G
19	urticaria	-	+	-	nd		+	cefapirin
20	FDE	-	nd		nd		+	cefpodoxime
21	AGEP	+/+	nd		nd		0	cloxacillin

Table 3 : Skin test results in patients with cutaneous adverse drug reactions induced by non beta-lactam antibiotics. See legend to table 2 for abbreviations.

Patient number	Presentation	Patch test	PrickTest immediate	PrickTest delayed	Intra dermal testing immediate	Intra dermal testing delayed	Reintroduced	Drug
22	urticaria	-	-	-	-	+	0	erythromycin
23	MPR	-	+	-	nd		0	erythromycin
24	urticaria	-	-	-	nd		+	josamycin
25	urticaria	-	+	-	nd		0	spiramycin
26	urt+AO	-	-	-	-	-	+	spiramycin
27	MPR	+/+	nd		nd		0	pristinamycin
28	MPR	++/++	nd		nd		0	pristinamycin
29	MPR	0/+	nd		nd		0	pristinamycin
30	MPR	+/+	nd		nd		0	pristinamycin
31	MPR	0/+	nd		nd		0	pristinamycin
32	ErythroD	-	-	-	nd		0	pristinamycin
33	ErythroD	+/+	nd		nd		0	pristinamycin
34	ErythroD	+/+	nd		nd		0	pristinamycin
35	ErythroD	++/++	nd		nd		0	pristinamycin
36	FDE	-	-	-	-	-	+	doxycycline
37	MPR	-	-	-	nd		+	co-trimoxazole
38	urticaria	-	-	-	+	-	+ **	co-trimoxazole
39	MPR+ pu	-	-	-	nd		+	norfloxacin
40	MPR + pu	-	-	-	nd		+	pipemidic acid
41	MPR	-	-	-	-	-	+	isoniazid
42	MPR	+/+	nd		nd		0 **	aciclovir

Table 4 : Skin test results in patients with cutaneous adverse drug reactions induced by non antibiotic drugs. See legend to table 2 for abbreviations.

Patient number	Presentation	Patch test	PrickTest immediate	PrickTest delayed	Intra dermal testing immediate	Intra dermal testing delayed	Reintroduced	Drug
43	G Eczema	-	-	-	-	-	0	amiodarone
44	urticaria	-	-	-	-	-	+	articaine
45	urticaria	-	-	-	-	-	+	articaine
46	ErythroD	0/+	nd		nd		0	captopril
47	MPR	-	-	-	-	-	0	carbamazepine
48	MPR+pu	+/+	nd		nd		0	carbamazepine
49	MPR+pu	-	-	-	+	-	0 **	cyamemazine
50	MPR	0/++	nd		nd		0	diltiazem
51	G Eczema	-	-	-	-	+	0	enoxoparin
52	G Eczema	+/+	nd		nd		+	enoxoparin
53	L Eczema	-	-	-	-	+	+	enoxoparin
54	G Eczema	-	-	-	+	+	+	estradiol
55*	photoS	-	nd		nd		0	fluvoxamine
56	urt+AO	+/+	nd		nd		0	fusafungine
57	pruritus	-	-	-	nd		+	glibenclamide
58	pruritus	-	nd		nd		+	heparin
59*	photoS	-	nd		nd		0	hydroquinidine
60*	photoS	-	nd		nd		0	hydroquinidine
61	ErythroD	+/+	nd		nd		0 **	hydroxyzine
62*	photoS	-	nd		nd		+	methoxsalene
63	urticaria	-	+	-	nd		+	paracetamol
64	urt+AO	-	+	-	nd		+ **	pholcodine
65	FDE	-	-	-	-	+	+	piroxicam
66	urt+AO	-	-	-	+	+	+	piroxicam
67	urticaria	-	-	-	+	+	+	piroxicam
68	MPR	++/++	-	+	nd		+ **	pseudoephedrine
69	G Eczema	-	-	-	nd		+	simvastatine
70	MPR	+/+	nd		nd		0	tetrazepam
71	pruritus	-	+	-	nd		+	tetrazepam
72	G Eczema	++/++	nd		nd		0 **	triamcinolone

Table 5 : Dilutions used for skin testing

The pure tested preparations are reported as follows. If they were in powder, all these preparations were tested as is, diluted at 30% in water and in petrolatum (pet.). If they were liquid they were tested as is and diluted at 30% in water. Intradermal tests were performed using the following solutions, diluted sequentially (10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1}) and pure. Pure preparations for patch tests and for IDR were used for prick tests.

- **aciclovir** : PT = pure in powder ;
- **amiodarone** : PT and IDR = 50mg/mL in water
- **amoxycillin** : PT = pure in powder ; IDR = 1g/2.5mL
- **ampicillin** : PT = pure in powder
- **articaine** : PT and IDR = 72 mg/1.8 mL
- **captopril** : PT = pure in powder
- **carbamazepine** : PT = pure in powder
- **cefadroxil** : PT = in powder from the content of commercialised capsules contaning lactose, silica and magnesium stearate ; IDR = 100 mg/mL
- **cefapirin** : PT = pure in powder ; IDR = 0.2g/mL
- **cefpodoxime** : PT = pure in powder
- **chlormezanone** : PT = in powder in a commercialised pill containing calcic phosphate, starch, gelatine, saccharine, gelatine
- **cloxacillin** : PT = pure in powder
- **co-trimoxazole** : PT and IDR = 80 mg/mL in water
- **cyamemazine** : PT and IDR = at 10 mg/mL in a commercialised solution containing acetic acid, ascorbic acid, polyoxy-ethyleneglycol in water
- **danazol** : PT = pure in powder
- **diltiazem** : PT = pure in powder
- **doxycycline** : PT and IDR = 20mg/mL in water in a commercialised solution with magnesium chlorate, polyvidone, amino-2-ethanol
- **enoxoparin** : PT = 100mg/mL in water
- **erythromycin** : PT = pure in powder ; IDR = specific positivity only to 0.2 mg/mL.

- **fusafungine** : PT = in powder

- **fluvoxamine** : PT = pure in powder

- **glibenclamide** : PT = in powder from a commercialised pill containing lactose, starch, talc, silice and magnesium stearate

- **heparin** : PT = 25 000 UI/mL in water

- **hydroquinidine** : PT = in powder from the content of a commercialised capsule containing starch, polyvidone, Eudragit L, methacrylic acid, talc and stearic acid

- **hydroxyzine** : PT = at 50mg/mL in a commercialised form diluted in sodium hydroxide and water.

- **isoniazid** : PT = in powder in a commercialised pill with lactose, starch and magnesium stearate ; IDR = at 100mg/mL in a commercialised solution with methyl and propyl parahydroxybenzoates;

- **josamycin** : PT = in powder in a commercialised form containing sodium laurylsulfate, starch and aspartam.

- **methoxsalene (5-MOP)** : PT = in commercialised solution at 0.1g/mL diluted in ethylic alcohol and water

- **norfloxacin** : PT = in powder from a commercialised pill containing hydroxycellulose, magnesium stearate, titanium oxide

- **oestradiol** : PT = pure in powder ; IDR = 1 mg/ml after solubilization in alcohol

- **paracetamol** (acetaminophen): PT = pure in powder ; IDR = 0.1 mg/mL after solubilization in alcohol.

- **penicillin G** : PT = in powder with sodium citrate ; IDR = specific positivity only to 5.10^5 U/mL.

- **pholcodine** : PT = pure in powder

- **pipemidic acid** : PT = in powder in a commercialised form with carboxymethylcellulose, magnesium stearate, starch and talc

- **piroxicam** : PT = pure in powder ; IDR = 20 mg/mL

- **pristinamycin** : PT = pure in powder

- **pseudoephedrine** : PT = pure in powder

- **simvastatine :** PT = in powder in a commercialised form with carboxymethylcellulose, starch, butylhydroxyanisole, ascorbic acid, citric acid, magnesium stearate.

- **spiramycin** : PT = pure in powder; IDR = specific positivity only to 375 UI/mL.

- **tetrazepam** : PT = pure in powder ; IDR = 10 mg/mL

- **triamcinolone** : PT = 1% in petrolatum

Drug preservatives colouring agents and excipients :

- **alcohol 95°**: PT = at 70% and 10% in water

- **benzylic alcohol** : PT = 5% in pet.

- **carboxymethylcellulose** : PT = 5% in water

- **cellulose** : PT = pure in powder

- **erythrosine** : PT = 2%in pet. and 10% in water

- **gelatine** : PT = pure in powder

- **lactose** : PT = pure in powder and 50% in pet.

- **magnesium stearate** : PT = pure and 10% in pet.

- **methyl parahydroxybenzoate** : PT = 3% in pet.; IDR = 1mg/mL (10 negative controls)

- **neroli essential oil** : PT = 10% in pet.

- **polyoxyethylene glycol 1540** : PT = pure in powder.

- **propylene glycol** : PT = 5% in pet. and 10% in water

- **saccharine** : PT = pure in powder

- **silicate** (aerosil 200) : PT = pure in powder

- **starch** = PT = pure in powder and 10% in water

- **stearic acid** : PT = 5% in pet.

- **talc** : PT = pure in powder

IMMUNOCOMPETENT CELLS AND ADHESION MOLECULES IN 14 CASES OF CUTANEOUS DRUG REACTIONS INDUCED BY ANTIBIOTICS .

Annick M. Barbaud*, MD, Marie C. Béné**, PharmD, PhD, Sophie Reichert-Penetrat*, MD, Marie-Agnès Jacquin-Petit*, MD, Jean-Luc Schmutz*, MD,
Gilbert C. Faure**, MD, PhD.

* Dermatology Department, Fournier Hospital, 36 Quai de la Bataille,
** Immunology Laboratory, Faculté de Médecine
University Hospital of Nancy - 54000- Nancy - France.

Part of the data herein reported were presented during the annual meeting of the french society of dermatologic research in Tours on the 11th April 1997.

Reprint requests :
Annick BARBAUD, MD
Service de Dermatologie
Hôpital Fournier, 36 Quai de la Bataille
University Hospital of Nancy
54000 - NANCY - France
Phone number : (33) (0) 3 83 85 24 65
Fax number : (33) (0) 3 83 85 24 12
e-mail : a.barbaud@chu-nancy.fr

493 WORDS

Having previously published the immunohistological characteristics of amoxicillin induced rashes [1], we report here a similar study performed in patients with cutaneous adverse drug reactions (ADR) related to the ingestion of various antibiotics.

Materiel and methods : Skin biopsies were obtained, prior to the administration of any immunomodulating therapy, from 14 patients (6 men, 8 women, mean age 64), 1 to 12 days after the onset of antibiotic-induced cutaneous ADR (**Table 1**) : MPR induced by betalactams (5 cases), norfloxacin (1 case), isoniazid (1 case) or pristinamycin (3 cases) and 4 erythrodermas [2] induced by pristinamycin. For each patient indirect immunoflorescence was performed as previously described [1]. Langerhans cells were visualized using monoclonal antibodies (MoAb) to CD1a and HLA DR (Coulterclone, Hialeah, Fla). T-cell subsets and their activation were determined using antibodies against CD3, CD4, CD8 and CD25 (Coulterclone). The expression of a series of adhesion molecules was investigated, using MoAb against CD11a-CD18 (leukocyte function-associated antigen 1, LFA-1), CD54 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1), CD106 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) (Immunotech, Luminy, France) ; CD62E (endothelial leukocyte adhesion molecule 1, ELAM-1, E selectin), CD62L (leukocyte endothelial cell adhesion molecule 1, LECAM-1, L selectin) and CD 62P (P selectin, GMP 140) (Becton Dickinson, Moutain View, Calif).

Results : As previously described in amoxicillin-induced MPR [1], perivascular T-lymphocytes mostly CD4+, exhibited CD11a-CD18 and CD62L ; endothelial cells were activated, expressing CD62E in 8 cases ; activated keratinocytes expressed CD54/ICAM-1 in 10 cases. Dermal CD1a+ dendritic cells were observed in 8 cases (all betalactam-induced rashes but only 1/7 pristinamycin-induced rashes). An unexpected expression of CD62L (usually expressed by activated T cells or polymorphonuclears [3]) was observed on keratinocytes throughout the entire epidermis in 1 isoniazid-induced MPR and 4/7 pristinamycin-induced rashes. (**Figure 1**).

In one of these 5 patients, a similar epidermal CD62L-labelling was observed on the biopsy sample of a patch test with positive results for pristinamycin. Keratinocyte expression of CD62L was not correlated with that of other adhesion molecules or the presence of satellite cell necrosis. In patients with pristinamycin-induced cutaneous ADR, skin biopsies were performed with a mean delay of 5 or 1.33 days after the onset of the ADR, respectively in patients with or without keratinocyte expression of CD62L.

Comments : Dendritic dermal cells co-expressing CD1a and HLA-DR were observed in MPR induced by betalactam antibiotics. Such dendritic cells have been observed *in vivo* and *in vitro* [4,5] in atopic dermatitis and shown to be able to act as antigen presenting cells [4].

The unexpected expression of CD62L on keratinocytes could be a late event in cutaneous ADR related to delayed cellular hypersensitivity to such drugs as pristinamycin or isoniazid, possibly involved in increasing keratinocytes adhesiveness for CD1a+ Langerhans cells relocation or in the recruitment of epidermal T cells.

In conclusion, this immunohistochemical study confirms that T-cell-mediated immune reactions are involved in antibiotic-induced maculopapular rashes or erythrodermas, yet different patterns of cell activation could be observed with the reaction to specific drugs.

References

1- Barbaud A, Béné MC, Schmutz JL, Ehlinger A, Weber M, Faure GC. Role of delayed cellular hypersensitivity and adhesion molecules in morbilliform rashes induced by amoxicillin. Arch Dermatol. 1997 ;133:481-486.

2- Sigurdsson V, Toonstra J, Hezemans-Boer M, van Vloten WA. Erythroderma. A clinical and follow-up study of 102 patients, with special emphasis on survival. J Am Acad Dermatol 1996; 35:53-57.

3-Pigott R, Power C. L.Selectin. Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1), Leu 8. In the adhesion molecule facts book, Pigott R, Power C ed, Academic Press-Hartcourt Brace and Company publishers, London, 1993 : 100-102.

4- Meunier L, Bata-Csorgo Z, Cooper KD. In human dermis, ultraviolet radiation induces expansion of a CD36+ CD11b+ CD1- macrophage subset by infiltration and proliferation ; CD1+ Langerhans-like dendritic antigen-presentating cells are concomitantly depleted. J Invest Dermatol. 1995;105:782-788.

5- Grabbe J, Welker P, Humke S, Grewe M, Schöpf E, Henz BM, Krutmann J. High-dose ultraviolet A1 (UVA1), but not UVA/UVB therapy, decreases IgE-binding cells in lesional skin of patients with atopic eczema. J Invest Dermatol. 1996;107:419-422.

	delay *	dendritic CD1a+ dermal cells	HLA DR on keratinocytes	CD54 on keratinocytes	CD62L on keratinocytes
MPR (amoxicilline)	3 days	present	negative	positive	negative
MPR (amoxicilline)	1 day	present	negative	positive	negative
MPR (amoxicilline)	7 days	present	negative	positive	negative
MPR (amoxicilline)	5 days	present	negative	negative	negative
MPR (Penicillin M)	7 days	present	negative	positive	negative
MPR (norfloxacin)	2 days	present	negative	negative	negative
MPR (isoniazid)	9 days	present	positive	positive	positive
MPR (pristinamycin)	1 day	none	negative	positive	negative
MPR (pristinamycin)	1 day	none	negative	positive	negative
MPR (pristinamycin)	12 days	none	negative	positive	positive **
Erythroderma (pristinamycin)	1 day	none	negative	negative	positive
Erythroderma (pristinamycin)	5 days	none	negative	positive	positive
Erythroderma (pristinamycin)	2 days	present	positive	positive	positive
Erythroderma (pristinamycin)	2 days	none	positive	negative	negative

Table 1 : Immunohistological results of cutaneous adverse drug reaction skin biopsy specimen.

* Delay between the onset of clinical manifestations and biopsy sampling. ** CD62L also observed on a skin biopsy sample of patch test performed with pristinamycin with positive results.

Figure 1 : Unusual epidermal expression of CD62L in an erythrodermia induced by pristinamycin. CD62L is observed on keratinocytes and perivascular lymphocytes (arrow). Autofluorescence of elastic fibers and lipofuchsin can be seen in the dermis (initial magnification x100).

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Nom : **BARBAUD**

Prénom : **Annick**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE ET SANTÉ**

Spécialité : **BIOLOGIE STRUCTURALE, MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 8 AVR 1998 n° 19

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1 ★ LE PRÉSIDENT

P. FINANCE

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1

24-30, rue Lionnois B.P. 3069 54013 Nancy cedex · Tél. 03 83 85 48 00 · Fax 03 83 85 48 48

Adresse électronique : _____ @uhp.u-nancy.fr

BARBAUD, ANNICK

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY 1 - ANNEE 1998

SUJET DE LA THESE Physiopathologie et explorations des toxidermies immunoallergiques.

MOTS CLES Toxidermies, Dermatologie, Immunologie, Médicaments, Vaccinations, Tests allergologiques, Molécules d'adhésion, Lymphocytes.

RESUME

Les toxidermies immuno-allergiques constituent un important problème de santé publique mais sont de physiopathologie mal connue. Ce travail est consacré à la définition et à l'exploration de ces pathologies, dans l'optique d'une amélioration de la prise en charge diagnostique des toxidermies et d'une meilleure compréhension des anomalies immunitaires impliquées dans leur apparition. Sur la base d'une rigoureuse méthodologie clinique, une population de 310 patients, inclus de façon prospective, a été étudiée, et trois axes d'étude ont été développés : appréciation de la valeur des tests cutanés en fonction de la sémiologie et du médicament responsable, exploration des cellules et molécules immunocompétentes potentiellement impliquées *in situ*, évaluation des réponses obtenues *in vitro* à partir des cellules circulantes. Nous avons démontré l'utilité (72% des patients ayant un test cutané positif) et la faisabilité des tests cutanés dans le bilan étiologique des toxidermies, 43% des patients ayant un test épicutané positif (dont 59,3% des sujets ayant développé un exanthème maculo-papuleux), 24% un prick test positif et 66,6% une IDR positive en lecture immédiate et/ou retardée. Ces résultats indiquent que la positivité des tests dépend du médicament en cause, de la sémiologie et donc du mécanisme immunologique de la toxidermie. Ceci est confirmé par l'immunophénotypage comparatif de biopsies de toxidermies et de tests cutanés médicamenteux positifs. La plupart des toxidermies non urticariennes relèvent ainsi de mécanismes d'hypersensibilité cellulaire retardée impliquant des lymphocytes T. On y observe également des cellules dendritiques dermiques CD1a+, et l'expression de molécules d'adhésion par les cellules dermiques et épidermiques. Nous avons par ailleurs mis en évidence l'expression inattendue de sélectines (CD62L, CD62P) par les kératinocytes. Dans les toxidermies non épidermolytiques nous avons démontré qu'il n'existait pas de phénomènes majeurs d'apoptose des kératinocytes ou des cellules T. De plus ces dernières ne semblent pas résulter d'une prolifération clonale *in situ* comme le montre l'étude du réarrangement du récepteur T pour l'antigène des lymphocytes cutanés. L'étude de 17 patients ayant présenté un accident cutané lors de vaccination démontre que les causes de ces toxidermies sont variées : sensibilisation à un des constituant de la solution vaccinale, complexes immuns circulants ou mécanismes peut-être non immunitaires. Enfin sur des toxidermies variées dans leur sémiologie et leur cause, nous avons évalué l'apport potentiel d'explorations *ex vivo* à partir de prélèvements sanguins des patients. En conclusion, nos résultats apportent des éléments importants évaluant les critères nécessaires au diagnostic précis de ces accidents médicamenteux et améliorant la compréhension de leurs mécanismes physiopathologiques.

JURY

Rapporteurs	E. GROSSHANS (Strasbourg)	Professeur
	J.F. NICOLAS (Lyon)	Directeur de Recherche INSERM
Directeur de thèse	M-C. BENE (Nancy)	Professeur
Membres	G.C. FAURE (Nancy)	Professeur
	J-L. SCHMUTZ (Nancy)	Professeur