HAL
open science

Évaluation du terrain génétique des hypersensibilités

Anne-Claire Bursztejn

To cite this version:

Anne-Claire Bursztejn. Évaluation du terrain génétique des hypersensibilités. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0344 . tel-01751220

HAL Id: tel-01751220

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751220v1

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la vie et de la Santé »

Par Anne-Claire BURSZTEJN

Évaluation du terrain génétique des hypersensibilités

Date de soutenance : 25 novembre 2013

Membres du jury

Rapporteurs

Monsieur Vincent DESCAMPS	PUPH, U976, Université de Paris VII, France
Monsieur Pierre VABRES	PUPH, EA4271, Université de Bourgogne, Dijon, France

Examinateurs

Madame Annick BARBAUD Directeur de thèse	PUPH, EA7298, Université de Lorraine, Nancy, France
Monsieur Christophe NEMOS Co-Directeur de thèse	MCU, U954, Université de Lorraine, Nancy, France
Madame Anne TSICOPOULOS	Directeur de recherche, U1019, Institut Pasteur, Lille, France
Monsieur Jean-Louis GUEANT	PUPH, U954, Université de Lorraine, Nancy, France

Membre invité

Monsieur Jean-Luc SCHMUTZ	PUPH, EA7298, Université de Lorraine, Nancy, France

U-954, NGERE, Université de Lorraine, 9 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France

A NOS DIRECTEUR ET CO-DIRECTEUR DE THESE

Madame le Professeur Annick Barbaud,
Professeur de Dermatologie, co-directrice de l'EA7298, Université de Lorraine

Nous avons découvert à vos côtés la Dermato-allergologie.
Vous nous avez initié à la recherche clinique puis encouragé à persévérer dans la recherche et la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-tendant les hypersensibilités médicamenteuses par la réalisation de cette thèse d'université.
Les échanges autour de ce travail ont été riches et se poursuivront au delà de ce travail.
Votre travail, votre rigueur et votre sens profond de la pédagogie sont pour nous un modèle.
Veuillez trouver ici un modeste témoignage de notre admiration et notre profond respect.

Monsieur Christophe Nemos,
Maître de Conférence des Universités, Université de Lorraine

Vous nous avez initié à la recherche et au travail scientifique. Vous nous avez fait découvrir les nouveaux outils de la génétique avec conviction et enthousiasme.
Vous nous avez soutenu à chaque instant de cette thèse.
Pour toutes ces discussions à bâtons rompus qu'elles soient scientifiques ou pas.
Veuillez trouver ici un témoignage de notre amitié et de notre admiration.

A NOS RAPPORTEURS ET JUGES

Monsieur le Professeur Vincent Descamps
Professeur de Dermatologie, Université Paris VII

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de cette thèse.
Veuillez y trouver un modeste témoignage de notre admiration et de notre profond respect pour tous vos travaux dans le cadre de cette maladie complexe qu'est le DRESS.

Monsieur le Professeur Pierre Vabres
Professeur de Dermatologie, Université de Bourgogne

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de cette thèse.
Nous admirons vos connaissances de la Dermatologie pédiatrique et de la Génétique.
Vous nous avez accueillis avec bienveillance dans le groupe de recherche en Dermatologie pédiatrique et permis de participer à de riches échanges grâce aux visioconférences de Dermatologie génétique.
Veuillez trouver ici un témoignage de notre profonde admiration et de notre très grand respect.

A NOS JUGES

Madame le Docteur Anne Tscicopoulos,
Directeur de Recherche, Institut Pasteur Lille

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse.
Vos travaux au sein de l'Institut Pasteur apportent un éclairage sur la physiopathologie de la maladie asthmatique contribuant à une meilleure compréhension des phénomènes immuno-allergiques. Nous vous savons gré de juger ce modeste travail en y apportant votre expertise dans les domaines de l'Immunologie et de la Génétique.
Que cette thèse soit le témoin de notre profond respect.

Monsieur le Professeur Jean-Louis Guéant
Professeur de Biochimie, Directeur de l'unité INSERM U954, Université Lorraine

Vous nous avez acceuilli avec bienveillance dans votre laboratoire.
Vous nous avez confié le premier travail de cette thèse.
Vos réflexions, toujours pertinentes, nous ont permis d'avancer pas à pas dans ce travail.
Nous admirons vos capacités de travail et votre intelligence.
Veuillez trouver ici le témoin de notre profond respect.

Monsieur le Professeur Jean-Luc Schmutz
Professeur de Dermatologie, Université Lorraine

Vous nous avez accueillis dans votre service, enseigné la Dermatologie, incité à compléter notre formation initiale par la réalisation d'un master et d'une Thèse d'Université.
Nous vous remercions infiniment pour tout le soutien que vous nous apportez.
Veuillez trouver ici le témoin de notre très grand respect et de notre profonde gratitude.

A Thomas, Denise, Renée, Pascal, Stéphanie et Séverine et tous les techniciens des laboratoires de Biochimie et de Génétique,
Petits ouvriers de l'ombre sans qui rien de tout cela ne serait possible.

A toute l'équipe de Dermatologie, secrétaires, infirmières, aides-soignantes, internes,
Pour nous permettre de travailler au quotidien dans une ambiance agréable.

A Laurence et Aurélie,
Pour leur aide technique, et bien plus encore !

A Claire, Marie et Maud,
Pour votre soutien, pour nos pauses de midi (qui vont manquer à ceux qui restent) et tout simplement pour notre amitié !

A Monsieur Cuny,
A Anne-Lise, Fadia, Florence et Julie

A Laëtitia L et Laëtitia G

Et à tous ceux que je ne peux pas citer mais que je n'oublie pas !

A toi Maman,
La douleur est grande, le manque immense.

A Sinan,
Pour ton soutien, tes relectures. Pour notre bonheur familial et que le travail n'empiète pas toujours sur nos soirées et week-end ! Sois assuré de tout mon amour.

A Nour, Elyes et Ismaël,
Mes 3 rayons de soleil ! pour tout le bonheur que vous me donnez !

A Papa,
Pour m'avoir donné l'envie, comme Maman, de faire médecine ! Pour m'avoir montrer le chemin. Pour tes encouragements de chaque instant. Pour que nous partagions plus de temps.

A Perrine, A Lise, A Ben,
Pour ta relecture, Perrine. Pour que cette fin d'année 2013 rime avec réussite pour toutes les 2, Lise. Pour notre complicité. Pour que cette année 2013 finisse vite et que 2014 soit bien meilleure…

A Simon, Arthur et Raphaël,
Et vive les cousinades !

A Samia, Mohamed et Khaled,
Pour votre soutien de chaque instant, dans les bons et les mauvais moments.

A Tante Anne,

A Ana et Pauline,

A Vivien,
Pour plus de moments familiaux partagés.

A tous nos amis d'ici et d'ailleurs…

Table des Matières

Liste des abréviations 9

Liste des tableaux 13

Liste des figures 14

Introduction 15

A. Définitions 15

1. Hypersensibilité 15
2. Allergie 18
3. Allergie médicamenteuse 19
    a. Hypersensibilité immédiate 21
    b. Hypersensibilité retardée 23
        i. Exanthème maculo-papuleux 23
        ii. Le syndrome d'hypersensibilité ou DRESS 24
    c. Phénomène de sensibilisation 27
        i. Le concept d'haptène 27
        ii. Le concept p-i 28
        iii. Autre voie de sensibilisation 29
4. Variations du génome 31
    a. CNV 32
    b. SNP 35

B. Génétique des hypersensibilités 36

1. Hypersensibilités aux bétalactamines 39
2. DRESS 45

C. Objectifs et Approches 49

1. Approche par gènes candidats 50
    a. les gènes NOD1 et NOD2 50
        i. voies de signalisation des gènes NOD1 et NOD2 51
        ii. associations pathologiques 53
        iii. les gènes NOD1 et NOD2 et l'atopie 54
    b. polymorphismes cytokiniques 59
2. Approche pangénomique 61

Patients, Matériels et Méthodes 65

A. Patients 65

1. Hypersensibilité aux bétalactamines 65
2. Toxidermies médicamenteuses, cohorte française 68
3. DRESS 71
B. Matériels 73
1. Extraction de l'ADN génomique 73
a. A partir du sérum 73
b. A partir du sang total 73
c. Stockage de l'ADN extrait 75
2. Génotypage des polymorphismes des gènes NOD1 et NOD2 76
a. Réaction de polymérisation en chaîne 76
b. Technique Immunochip 78
3. Hybridation Comparative Génomique en microréseau 79
4. Vérification qPCR 81
C. Méthodes d'analyse 82
1. Analyse statistique pour les études de polymorphismes 82
a. Hypersensibilité aux bétalactamines 82
b. Toxidermies médicamenteuses, cohorte française 83
2. Analyse de l'hybridation comparative génomique en microréseau 84
Résultats **85**
A. Hypersensibilités aux bétalactamines 85
1. Article publié 88
B. Toxidermies médicamenteuses, cohorte française 93
1. Article publié 96
C. DRESS 106
Discussion **114**
A. Hypersensibilités aux bétalactamines 114
B. Toxidermies médicamenteuses, cohorte française 116
C. DRESS 119
Conclusion et Perspectives **126**
Bibliographie **128**
Liste des publications 140

Liste des abréviations

a/A : amplification

ABL : allergie aux bétalactamines

ACSF3 : famille des acyl-coA synthétase, membre 3

ADN : acide désoxyribonucléique

ADAM22 : ADAM *metallopeptidase domain* 22

ADP : adénopathie

AIB : allergie immédiate aux bétalactamines

APC : cellule présentatrice d'antigène

ARB : allergie retardée aux bétalactamines

ba : basophile

BL : bétalactamines

C7orf50 : *chromosome 7 open reading frame 50*

CAMK2B : *calcium/calmodulin- dependent protein kinase II beta*

CAR : *Constituve Receptor of Androstane*

CARD : *caspase recruitment domain*

CD : *cluster* de différenciation

CDH15 : cadhérine 15

CES1 : carboxylestérase 1

CESP1 : carboxylestérase pseudogène 1

CGH : *Comparative Genomic Hybridization*

CIC : complexe immun circulant

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : cytomégalovirus

CNV : *copy number variation*

Cy3/5 : cynanine 3/5

CYB5 : cytochrome b5

CYB5T3 : cytochrome b5 reductase

CYP2C19*2 : isoforme du cytochrome P 450

d/D : délétion

DAMP : *danger-associated molecular pattern*

DECIPHER : *Database of Chromosomal Inbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (https://decipher.sanger.ac.uk)

DGV : *Database Genomic Variants* (projects.tcag.ca/variation/)

DNAJB6 : DnaJ (Hsp40) homolog, sous-famille B, membre 6

dNTP : mélange de désoxyribonucléotides

DRESS : *Drug Reaction with Eosinophila and Systemic Symptoms*

Dup : duplication

EBV : *Epstein Barr Virus*

EM : effet miroir

EMP : exanthème maculo-papuleux

ENDA : *European Network of Drug Allergy*

eo : éosinophile

EPHX1 : *epoxide hydrolase 1 microsomal (xenobiotic)*

FAM19A5 : *family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like) member A5*

FcεRI : récepteur de haute affinité des IgE

FISH : *Fluorescent Hybridization In Situ*

Flu : fluorescéine (sonde marquée à la fluorescéine)

GB : globules blancs

HHV : *human herpes virus*

HLA : *human leukocyte antigen*

HOXA11-AS : homeobox A11-antisens

HOXB5/6/7 : homeobox B5/6/7

HS : hypersensibilité

HSI : hypersensibilité immédiate

Hsp : *heat shock protein*

HSR : hypersensibilité retardée

IC : intervalle de confiance

IDR : Intra-Dermo-Reaction

ie-DAP : *dipeptide γ-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid containing peptidoglycan*

IFNγ : interferon gamma

IFNR1/2 : récepteur de l'interféron 1/2

Ig : immunoglobuline

IKK : *inhibitor of NFκB kinase*

IL : interleukine

IL1RL1 : *interleukin 1 receptor-like 1*

IL21R : récepteur de l'IL21

IL4RA : récepteur alpha de l'interleukine 4

IRAK1 : *interleukin 1 receptor-associated kinase 1*

KCNQ2 : canal potassium voltage-dépendant, sous-famille KQT-*like*, membre 2

KCNT1 : canal potassique sous-famille T, membre 1

KLRC2 : *killer cell lectin-type recepto subfamily C, member 2-like*

ko : *knock out*

LACTB : *lactamase beta*

LAMP1 : *lysosomal-associated membrane protein 1*

LC : LC-red-640 (sonde fluorescente rouge)

LCR : *low-copy repeat*

LINC00304 : long intergenic non-protein coding RNA-304

LRR : *leucin rich repeat*

LT : lymphocytes T

MAMP : *microbial-associated molecular pattern*

MAPK : *mitogen activated kinase-like protein*

MAP3K7IP1 : TAB1

mc : mastocyte

MDP : *muramyl dipeptide*

MgCl2 : chlorure de magnésium

NAT2 : N-acétyltransférase 2

NET : nécrolyse épidermique toxique

NFκB : *nuclear factor kappa B*

NK : cellules *natural killer*

NKG2A/2C : KLRC1/2

Nl : normal

NLR : *nod like receptor*

NOD 1/2 : *nucleotide-binding oligomerization domain containing* 1/2

NR : non réalisé

OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man*

OR : odds ratio

PAL : phosphatase alcaline

pb : paire de bases

PCR : *polymerase chain reaction*

PDXDC1 : *pyroxidal-dependent decarboxylase domain containing 1*

PHRC : Protocole Hospitalier de Recherche Clinique

p-i concept : *pharmacologic interaction with immune receptor*

PPP2R3B : protein phosphatase 2, regulatory subunit beta

PREX1 : *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1*

PXR : *Pregnane X Receptor*

RICK : *receptor interacting serine-threonine kinase*

SC : surface corporelle

SLCO4A1 : *solute carrier organic anion transporter family, membre 4A1*

SNP : *single nucleotide polymorphism*

SSJ : syndrome de Steven-Johnson

STAT6 : *signal transducer and activator of transcription 6*

Tr : transaminases

TAB1 : *TGF-beta activated kinase 1*

TCR : récepteur des cellules T

Th : lymphocytes T helper

TGFβ : *transforming growth factor* béta

TLR : *toll like receptor*

TNFα : *tumor necrosis factor* alpha

TPO : test de provocation orale

T reg : lymphocyte T régulateur

UCKL1 : *uridine-cytidine kinase 1-like 1*

UCSC : *University of California Santa Cruz genome browser* (genome.ucsc.edu/)

VHA/B/C : virus de l'hépatite A/B/C

Liste des tableaux

Tableau I.A.1 : Classification de Gell et Coombs. 17
Tableau I.A.2: Classification des effets secondaires des médicaments. 20
Tableau I.A.3: Critères diagnostiques du DRESS. 26
Tableau I.B.1: Synthèse des associations rapportées chez les patients présentant une hypersensibilité aux bétalactamines. 44
Tableau I.B.2 : HLA spécifiques des DRESS en fonction des populations étudiées. 48
Tableau I.C.1 : Associations entre les polymorphismes étudiés et les items de l'atopie. 57
Tableau II.A.1 : Caractéristiques cliniques et biologiques des contrôles et patients avec allergie aux bétalactamines, en Italie. 66
Tableau II.A.2 : Caractéristiques cliniques et biologiques des contrôles et patients avec allergie aux bétalactamines, en Espagne. 67
Tableau II.A.3 : Caractéristiques cliniques des patients avec toxidermie médicamenteuse et des contrôles. 69
Tableau II.A.4 : Caractéristiques cliniques des patients ayant présenté un DRESS. 70
Tableau II.A.5 : Caractéristiques cliniques des patients DRESS. 72
Tableau II.B.1: liste des amorces de PCR, sondes Flu et LC utilisées pour le génotypage des polymorphismes des gènes NOD1 et NOD2. 77
Tableau III.A.1 : Résultats des polymorphismes des gènes NOD1 et 2 dans la cohorte italienne. 87
Tableau III.A.2 : Résultats des polymorphismes des gènes NOD1 et 2 dans la cohorte espagnole. 87
Tableau III.B.1 : Résultats des polymorphismes cytokiniques. 94
Tableaux III.B.2 : Résultats de l'analyse par haplotypes pour IL1-RN VNTR et IL1-β-511C>T (rs2234663 et rs16944). 95
Tableau III.C.1 : Caractéristiques des patients DRESS et résultats de la CGH. 110
Tableau III.C.2 : Variations d'intersection. 111
Tableau III.C.3 : Variations partagées par au moins 2 témoins. 113

Liste des figures

Figure I.A.1 : Définitions des hypersensiblités et allergies en fonction des mécanismes sous jacents. 18
Figure I.A.2 : Urticaire aigüe au cours d'un traitement par Zyban®.
21
Figure I.A.3 : Réalisation et résultats de prick tests et IDR médicamenteux. 22
Figure I.A.4 : Exanthème maculo-papuleux au cours d'un traitement par pénicilline. 23
Figure I.A.5 : Réalisation et résultats de patch tests médicamenteux. 24
Figure I.A.6 : DRESS à la carbamazépine. 25
Figure I.A.7 : Schéma du déroulement du DRESS. 25
Figure I.A.8 : Schéma représentant les différentes modalités de sensibilisation médicamenteuse. 28
Figure I.A.9 : Schéma représentant les différentes voies d'activation du système immunitaire en présence du médicament, ainsi que les facteurs liés au patient qui pourraient être en cause dans l'hypersensibilité médicamenteuse. 29
Figure I.A.10 : Schéma représentant les facteurs impliqués dans l'hypersensibilité médicamenteuse. 30
Figure I.B.11 : Principe de la CGH array. 34
Figure I.B.1: Schéma général de la réponse immunitaire montrant les différents acteurs potentiels qui ont été ciblés par les études de polymorphismes. 37
Figure I.C.1 : Structure du gène NOD1 et de sa protéine. 51
Figure I.C.2 : Structure du gène NOD2, et de sa protéine. 51
Figure I.C.3 : Voies de signalisation de Nod1 et Nod2. 52
Figure I.C.4 : Rôle de l'IL10 dans la régulation de l'immunité innée et adaptative. 53
Figure II.B.1 : Extraction d'ADN sur sang total. 73
Figure II.B.2 : Principe de réalisation d'une puce Illumina. 78
Figure II.B.3 : Exemple de rapport de lame après passage dans le scanner. 80
Figure IV.1: Schéma adapté de Camous et al. représentant le déroulement d'un DRESS. 125

Introduction

A. Définitions

1. Hypersensibilité

L'hypersensibilité est un terme utilisé pour décrire des signes ou symptômes reproductibles dans le temps, apparaissant après l'exposition à un stimulus donné à une dose habituellement tolérée par des individus sains (Johansson et al., 2001 ; Johansson et al., 2004).
Ces manifestations peuvent être allergiques ou non. Lorsqu'elles sont allergiques (secondaires à un mécanisme immunologique), elles peuvent être IgE dépendantes ou non (Johansson et al., 2001).

Les phénomènes d'hypersensibilité sont habituellement décrits selon la classification de Gell et Coombs (tableau I.A.1) (Schnyder et al., 2009).

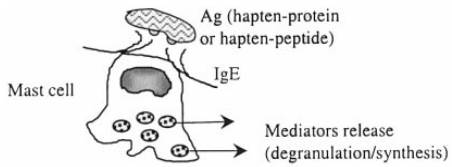
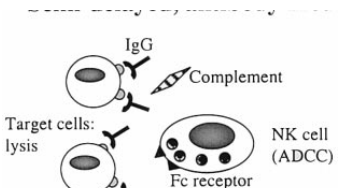
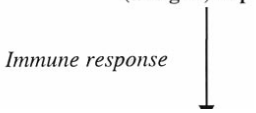
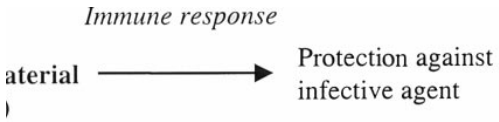
Le type I correspond à des réactions médiées par les immunoblobulines E (IgE). Après un premier contact antigénique induisant la production d'IgE spécifiques dirigées contre l'antigène, l'antigène soluble est reconnu à l'occasion d'un second contact par les IgE spécifiques qui vont se lier à leur récepteur de haute affinité (FcεRI) placé à la surface des mastocytes. Cette liaison va provoquer l'activation et la dégranulation des mastocytes. Celle-ci libère différents médiateurs tels que l'histamine et provoque l'apparition de symptômes tels qu'une rhinite allergique, un asthme, une urticaire ou un choc anaphylactique (Schnyder et al., 2009).

Le type II est un mécanisme cytotoxique, médié par les IgG. Cette réaction cytotoxique va être dirigée contre la membrane des globules rouges, des globules blancs ou des plaquettes. Elle pourrait également se diriger contre les précurseurs des cellules hématopoiétiques de la moëlle osseuse, induisant une anémie hémolytique, une leucopénie ou une thrombopénie. Il peut également s'agir d'anticorps dirigés contre d'autres récepteurs cellulaires tels que les récepteurs de la thyroïde (anticorps anti-thyroglobuline) qui seront alors responsables d'une thyroïdite auto-immune (Schnyder et al., 2009).

Le type III est lié à la présence de complexes immuns circulants. Ces complexes immuns pourraient se lier à la cellule endothéliale et provoquer l'activation du complément. Les symptômes classiquement associés à ces phénomènes sont les vascularites immunoallergiques (Schnyder et al., 2009).

Enfin le type IV est lié à des phénomènes d'immunité cellulaire. Il existe différents mécanismes faisant intervenir les lymphocytes T CD4 avec une réponse Th1 ou Th2, ou les lymphocytes T CD8. Les manifestations cliniques sont extrêmement variables : psoriasis, dermatite atopique, pelade ou vitiligo mais aussi diabète, asthme allergique chronique, par exemple (Schnyder et al., 2009). Pichler a détaillé le type IV en 4 sous-catégories afin de tenir compte des mécanismes cellulaires sous-jacents. Le type IVa est lié à une réponse immunitaire Th1, impliquant majoritairement l'IFNγ. Le type IVb est associé à une réponse Th2 impliquant l'IL4 et 5. Le type IVc est associé à une réponse lymphocytaire T cytotoxique, impliquant la perforine et le granzyme B. Enfin, le type IVd est associé aux cellules T et tout particulièrement à l'IL8 (Pichler, 2003).

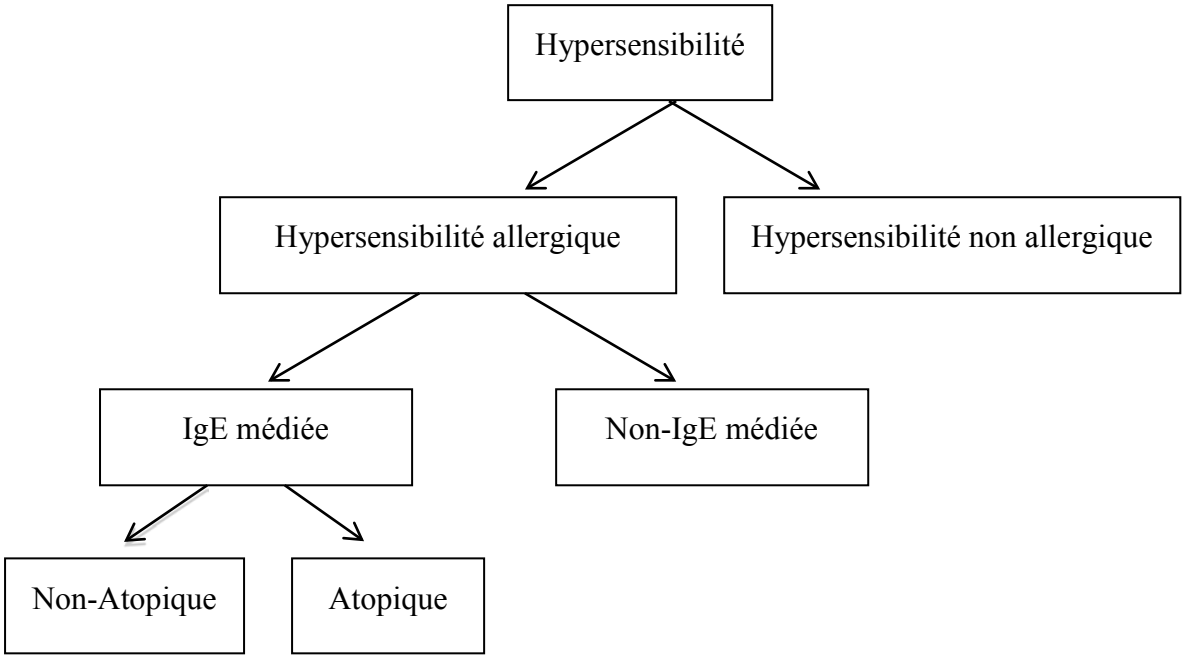
Tableau I.A.1 : Classification de Gell et Coombs (Descotes et al., 2001). Ig : immunoglobulines, CIC : complexes immuns circulants, EMP : exanthème maculo-papuleux.

Type I	Type II	Type III	Type IV
aigüe, IgE	IgG	CIC	retardé, cellulaire (LT)
			
Urticaire	Cytopénie médicamenteuse	Vascularite	Dermatite atopique, EMP

2. Allergie

Le terme « allergie » provient du grec *allos* qui signifie changement et *ergos* qui signifie réaction. Si les maladies allergiques étaient déjà décrites dès l'antiquité grecque et romaine, le terme d'allergie n'apparaît dans la littérature scientifique qu'en 1906 (Lilja et al., 1998).
L'allergie est une réaction d'hypersensibilité liée à des mécanismes immunologiques spécifiques (fig. I.A.1). En effet, d'autres mécanismes peuvent être en cause dans le cas des hypersensibilités non-allergiques tels que des phénomènes pharmacologiques (exemple type : hypersensibilité à l'aspirine). L'allergie peut être liée à une immunité cellulaire ou humorale (Johansson et al., 2001 ; Johansson et al., JACI 2004).

Figure I.A.1 : Définitions des hypersensiblités et allergies en fonction des mécanismes sous jacents (d'après Johansson et al., 2001).



3. Allergie médicamenteuse

A l'occasion d'une prise médicamenteuse, 5 types d'évènements peuvent se produire : les effets indésirables fréquents et connus des médicaments ou effets de type A ; les allergies médicamenteuses ou effets de type B ; les effets de type C liés à la structure chimique de la molécule et son métabolisme ; les effets de type D, apparaissant de façon très retardée, plusieurs années après le début du traitement ; et enfin les effets de type E apparaissant à l'arrêt du traitement (tableau I.A.2) (Shnyder et al., 2009 ; Naisbitt et al., 2000). Seuls les effets de type A et B sont classiquement décrits.

Les effets de type A sont des réactions fréquentes, liés aux propriétés pharmacologiques et à la toxicité de la molécule. Elles sont prévisibles, peuvent survenir chez tout individu, et sont, pour la majorité, connues aux décours des études précliniques ou aux études de phase 1 lors du développement d'un médicament.

Les effets de type B sont plus rares (5 à 15 % des effets indésirables des médicaments) et non prévisibles. Ils sont liés à des mécanismes immunologiques (ou non) et semblent survenir chez des patients prédisposés (Alfirevic et al., 2010). Lorsqu'ils sont supposés être liés à des phénomènes immunologiques, ils sont décrits selon la classification de Gell et Coobs.

On classe les allergies médicamenteuses en fonction du délai de réaction par rapport à la prise médicamenteuse : allergie immédiate, survenant dans un délai inférieur à quelques heures après la prise médicamenteuse et l'allergie retardée, survenant plus tardivement (Romano et al., 2007).
Classiquement, les réactions immédiates correspondent cliniquement à une urticaire ou un angioedème voire un choc anaphylactique. Elles sont majoritairement IgE médiées. Les réactions retardées quant à elles peuvent se présenter, cliniquement, sous une multitude de formes : exanthème maculo-papuleux (EMP), érythème polymorphe, syndrome de Stevens-Johnson (SSJ), syndrome de Lyell ou nécrolyse épidermique toxique (NET), pustulose exanthématique aigüe généralisée, érythème pigmenté fixe ou *drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms* (DRESS). Les mécanismes immunologiques sous tendant ces réactions retardées semblent multiples et hétérogènes. Ils sont décrits comme « non-IgE médiés ».

La fréquence des allergies ou hypersensibilités médicamenteuses est estimée à 10% des patients hospitalisés et 7% de la population générale (Demoly et al., 2007).

Tableau I.A.2: Classification des effets secondaires des médicaments (Naisbitt et al., 2000).

Type A (*Augmented*) : fréquent, souvent prévisible	Lié à la pharmacologie du médicament, réaction dose dépendante	Saignements sous anticoagulants
Type B (*Bizarre*) : plus rare, imprévisible	Réaction immuno-médiée ou non	Exanthème maculo-papuleux, asthme à l'aspirine
Type C (*Chemical*)	Lié à la structure chimique et au métabolisme du médicament	Hépatotoxicité du paracétamol
Type D (*Delayed*)	Après plusieurs années de traitement	Carcinome urinaire après traitement par cyclophosphamide
Type E (*End of treatment*)	A l'arrêt du traitement	Epilepsie à l'arrêt de la phénytoïne

a. Hypersensibilité immédiate

Cliniquement l'hypersensibilité immédiate se manifeste par une urticaire, un angioedème voire un choc anaphylactique survenant quelques minutes à quelques heures après une prise médicamenteuse.

L'urticaire est sans doute la manifestation clinique la plus fréquente. Il s'agit de lésions papuleuses, érythémateuses, oedémateuses, très prurigineuses, de taille variable (fig. I.A.1). Chacune des lésions est fugace et migratrice. L'atteinte cutanée peut-être généralisée.

Ces lésions d'urticaire peuvent parfois s'associer à des phénomènes d'angioedème : oedème hypodermique réalisant une tuméfaction ferme mal limitée, ni érythémateuse ni prurigineuse. L'angioedème est fréquemment localisé au niveau du visage, sur les lèvres ou les paupières. L'atteinte peut être muqueuse, plus profonde et se localiser au niveau des voies aérodigestives supérieures provoquant dysphonie, dyspnée, troubles de la déglutition.

Les lésions régressent à l'arrêt du traitement mais peuvent nécessiter un traitement spécifique par anti-histaminiques voire corticothérapie par voie générale ou adrénaline.

Figure I.A.2 : Urticaire aigüe au cours d'un traitement par Zyban®.

Le diagnostic clinique est confirmé par la réalisation de tests allergologiques : prick tests et intra-dermo-réactions (IDR) réalisés avec le médicament suspect ainsi qu'avec les molécules de la même classe médicamenteuse afin de vérifier l'absence de réaction croisée et de donner une solution alternative au patient (fig. I.A.2) (Barbaud et al., 1998 ; Waton et al., 2009 ; Waton et al., 2011).

Des tests in vitro ont également été développés, en particulier la recherche d'IgE spécifiques dirigés contre la molécule incriminée (Romano et al., 2007).

Figure I.A.3 : Réalisation et résultats de prick tests et IDR médicamenteux.

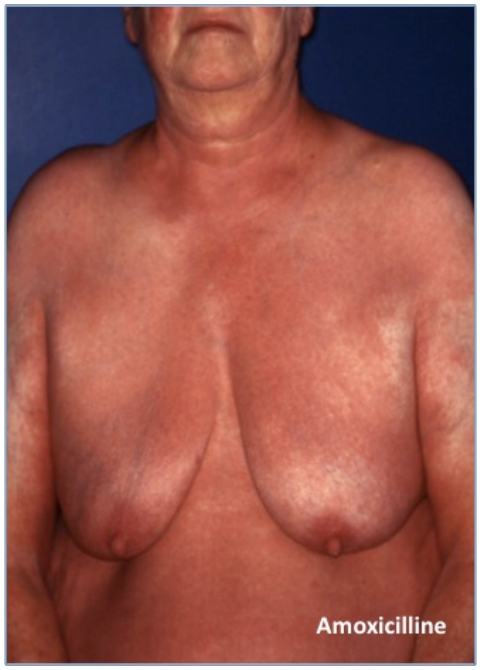
b. Hypersensibilité retardée

Les manifestations cliniques des hypersensibilités retardées sont très variables depuis l'EMP jusqu'au syndrome de Lyell, en passant par l'érythème pigmenté fixe ou le DRESS.
Nous ne décrirons ici que l'EMP et le DRESS.

L'exanthème maculo-papuleux

L'EMP est une éruption médicamenteuse habituellement sans gravité survenant quelques jours après le début d'un traitement médicamenteux (1 à 10 jours). Il s'agit d'une éruption cutanée érythémateuse maculo-papuleuse généralisée, prurigineuse et souvent renforcée dans les plis (fig. I.A.3). Habituellement, il n'existe pas d'atteinte muqueuse, de décollement cutané, ou d'adénopathie. L'état général du patient est conservé. Une hyperéosinophilie modérée est fréquemment constatée à la numération formule sanguine. Une atteinte rénale ou hépatique (signes de gravité) doit être recherchée.
Les lésions régressent à l'arrêt du médicament imputable en une dizaine de jours avec souvent l'apparition d'une desquamation généralisée. Des traitements locaux par dermocorticoïdes peuvent être proposés pour limiter le prurit et l'inflammation cutanée.

Figure I.A.4 : Exanthème maculo-papuleux au cours d'un traitement par pénicilline.



Le diagnostic clinique sera, là encore, confirmé par la réalisation de tests médicamenteux, prick tests et IDR, mais également de tests épicutanés (patch tests, fig. I.A.4). Dans le cas d'une hypersensibilité retardée, les lectures tardives des tests, notamment pricks tests et IDR, est très importante afin de ne pas méconnaître des tests positifs.

Des tests in vitro ont été développés pour le diagnostic de ce type de toxidermie, tels que les tests d'activation lymphocytaire (Romano et al., 2007).

Figure I.A.5 : Réalisation et résultats de patch tests médicamenteux.

Le syndrome d'hypersensibilité ou DRESS

Il s'agit d'une toxidermie sévère survenant plusieurs semaines après le début du traitement (2 à 6 semaines). Cliniquement, il existe un exanthème maculo-papuleux généralisé fébrile, souvent associé à un œdème du visage et des extrémités et à la présence de multiples adénopathies (fig.I.A.5). Les symptômes cliniques sont associés à des anomalies biologiques et d'autres atteintes d'organes : hyperéosinophilie marquée, atteinte hépatique, atteinte rénale, parfois cardiaque ou pulmonaire, ainsi que des réactivations virales, en particulier du groupe herpès (fig. I.A.6). La résolution des symptômes est souvent plus lente que dans les EMP.
Des critères clinico-biologiques ont été proposés afin d'affirmer le diagnostic avant la réalisation de tests médicamenteux. A chaque critère est associé un score. Le score global permet de classer les patients en DRESS possible, probable ou certain (tableau I.A.3) (Kardaun et al., 2007).

Figure I.A.6 : DRESS à la carbamazépine.

Figure I.A.7 : Schéma du déroulement du DRESS (Descamps et al., 2010).

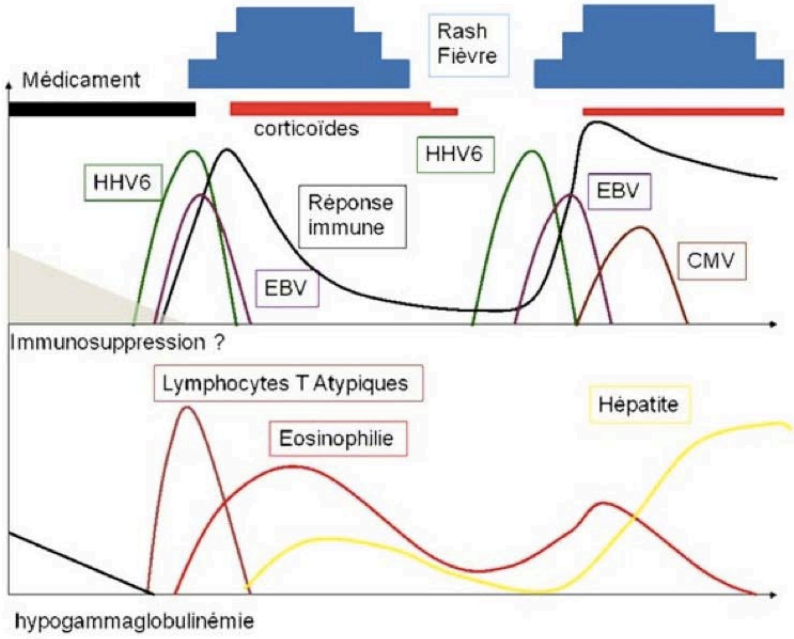


Tableau I.A.3: Critères diagnostiques du DRESS (Kardaun et al., 2007). GB : globules blancs, SC : surface cutanée, jrs : jours, VHA : virus de l'hépatite A, VHB, virus de l'hépatite B, VHC : virus de l'hépatite C, N : non, I : inconnu ou indéterminé, O : oui, Min : minimum, Max : maximum.

Score <2 : pas de DRESS, Score compris entre 2 et 4 : DRESS possible, Score compris entre 4 et 5 : DRESS probable, Score > 5 : DRESS certain.

Score	-1	0	1	2	Min	Max
Fièvre ≥ 38°5C	N/I	O			-1	0
Adénopathies		N/I	O		0	1
Eosinophilie		N/I			0	2
Eosinophilie			0,7-1,499 10^9/L	≥ 1,5 10^9/L		
Eosinophilie si GB < 4.0 10^9/L			1,0-19,9 %	≥ 20%		
Lymphocytes atypiques		N/I	O		0	1
Atteinte cutanée					-2	2
Extension (% SC)		N/I	> 50%			
EMP suggestif de DRESS	N	I	O			
Biopsie suggérant le DRESS	N	I/O				
Atteinte d'organe					0	2
Foie		N/I	O			
Rein		N/I	O			
Poumon		N/I	O			
Muscle/Cœur		N/I	O			
Pancréas		N/I	O			
Autre organe		N/I	O			
Résolution ≥ 15 jrs	N/I	O			-1	0
Autres étiologies recherchées						
Anticorps anti-nucléaires						
Hémocultures						
Sérologies VHA, VHB, VHC						
Chlamydia, mycoplasme						
Si aucune n'est positive ou ≥ 3 négatives			O		0	1
Score total					-4	9

c. Phénomène de sensibilisation

La sensibilisation médicamenteuse implique la stimulation et l'expansion de lymphocytes T spécifiques du médicament. Cette réaction peut impliquer soit les lymphocytes T uniquement soit les cellules T et les cellules B avec formation consécutive d'anticorps spécifiques (majoritairement IgE) (Schnyder et al., 2009).
Cette stimulation du système immunitaire repose principalement sur 2 concepts : le concept d'haptène et le concept « p-i » pour *pharmacologic interaction with immune receptor* (fig. I.A.6) (Gerber et al., 2004 ; Pichler et al., 2011).

Le concept d'haptène.

L'haptène est une molécule de petit poids moléculaire chimiquement active capable de former une liaison covalente avec des protéines ou des peptides. Les haptènes liés ou non à un peptide sont alors apprêtés par les cellules présentatrices d'antigènes.
Ils sont alors liés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et transportés dans les organes lymphoïdes pour être présentés aux cellules T naïves. Leur reconnaissance induit dès lors une prolifération et une expansion cellulaire T avec différenciation en lymphocytes T effecteurs et en lymphocytes T mémoires.
Le complexe protéique comportant l'haptène peut également être immunogène pour les cellules B : en présence de lymphocytes T auxilliaires spécifiques (Th2) producteurs d'interleukines (IL) 4, 5 et 10, les lymphocytes B peuvent proliférer, se différencier et produire des IgE. En présence de lymphocytes Th1, une production IgG et IgM prédomine (Schnyder et al., 2009).

Certains médicaments existent initialement sous la forme de pro-haptène qui est une molécule inactive nécessitant d'être métabolisée pour devenir active et réactive.
Une fois métabolisé, le composé réactif se comporte comme un haptène.

Le concept p-i

Il a été démontré que certains médicaments ne passent pas par la voie des haptènes pour stimuler les cellules T. Certains médicaments pourraient ainsi se lier avec des molécules du CMH de façon non covalente et être présentés directement aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes. Trois conditions semblent requises pour passer par cette voie :

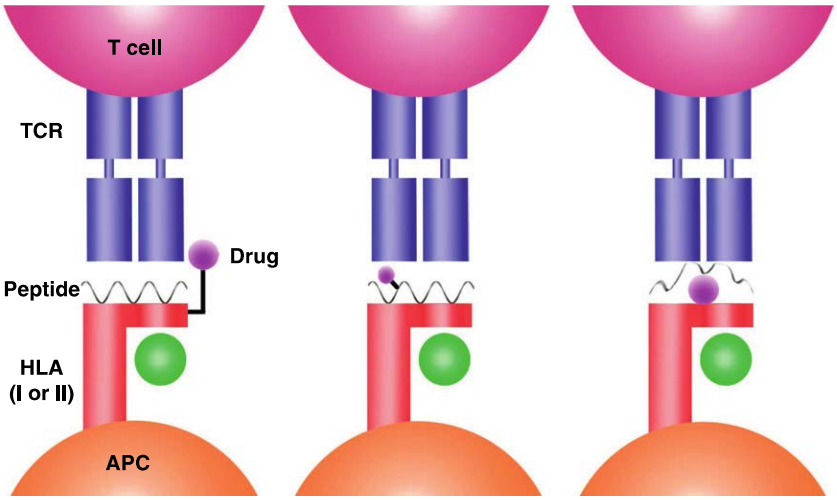
(i) les lymphocytes T doivent exprimer un récepteur T capable de se lier au médicament et d'induire une réponse immunitaire,

(ii) le seuil d'activation de ces lymphocytes doit être faible (ceci implique que les lymphocytes T stimulés par cette voie soient des lymphocytes T mémoire issus d'une réponse antigénique préalable),

(iii) une interaction entre la molécule du CMH à la surface de la cellule présentatrice d'antigène et le récepteur T doit permettre d'intensifier la réponse immunitaire.

Au total cela implique donc un réseau immunitaire dense. Ces conditions semblent tout particulièrement réunies au niveau de la peau (Schnyder et al., 2009).

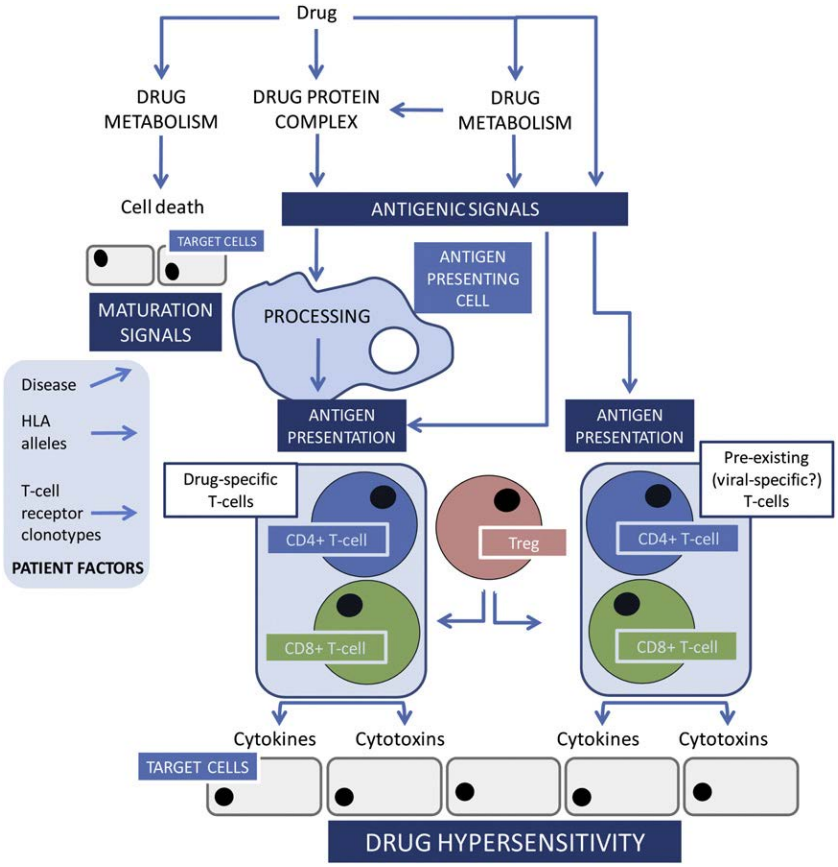
Figure I.A.8 : Schéma représentant les différentes modalités de sensibilisation médicamenteuse (Camous et al., 2012). A : le médicament forme une liaison covalente avec la molécule du CMH, B : le médicament est présenté au récepteur T en liaison avec un peptide par la molécule HLA, C : le médicament forme une liaison non covalente avec la molécule du CMH.



Autre voie de sensibilisation

Une autre voie pourrait également stimuler le système immunitaire en présence du médicament. Au cours du métabolisme du médicament, un stress oxydatif pourrait survenir, stimulant les cellules dendritiques et activant les cellules T (fig.I.A.7) (Pichler et al., 2011).

Figure I.A.9 : Schéma représentant les différentes voies d'activation du système immunitaire en présence du médicament, ainsi que les facteurs liés au patient qui pourraient être en cause dans l'hypersensibilité médicamenteuse (Pichler et al., 2011).

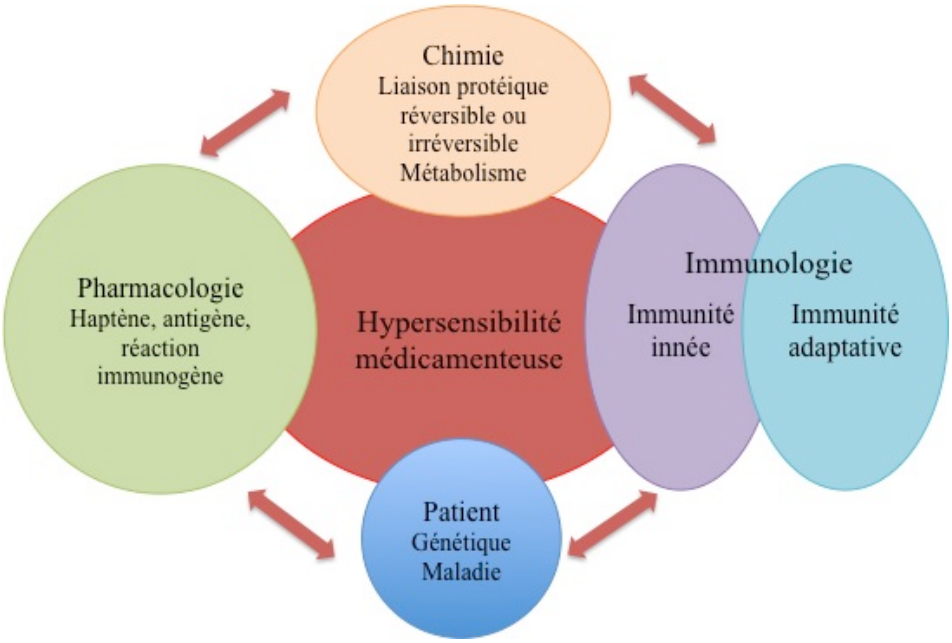


Le risque de sensibilisation et la sévérité des symptômes cliniques dépendent de plusieurs facteurs :

- état d'activation du système immunitaire du patient,
- dose, fréquence, durée de l'exposition et voie d'administration
- mais aussi, probablement l'existence d'un terrain génétique prédisposant.

Ces réactions sont notamment plus fréquentes chez les femmes (Demoly et al., 2007). La notion d'atopie comme facteur de susceptibilité pour l'allergie médicamenteuse est par contre débattue (fig. I.A.8).

Figure I.A.10 : Schéma représentant les facteurs impliqués dans l'hypersensibilité médicamenteuse (Pichler et al., 2011).



4. Variations du génome

Le génome humain est aujourd'hui reconnu comme étant variable d'un individu à l'autre. Ces variations peuvent prendre différentes formes et présenter un caractère délétère ou non.

Les techniques de cytogénétiques telles que le caryotype ou la *Fluorescent Hybridization In Situ* (FISH) permettent d'identifier des variations telles que des pertes ou gains d'un chromosome en totalité (aneuploïdies), partielles ou segmentaires. Pour être visibles ces variations doivent avoir une taille supérieure à quelques mégabases (Tang et al., 2013).

Lorsque ces variations ont une taille évaluée entre 1 kb et 1 Mb, elles sont dénommées variations en nombre de copies ou *copy number variations* (CNV) (Tang et al., 2013).

Lorsque leur taille est inférieure à 1 kb, on parle d'insertions ou de délétions en fonction du caractère délété ou amplifié de la séquence variable (Tang et al., 2013).

Enfin, si la variation n'intéresse qu'un nucléotide, elle est appelée *single nucleotide polymorphism* (SNP).

Ces variants sont le témoin de la diversité inter-individuelle. Leur fréquence est estimée à plus de 3,5 millions sur l'ensemble du génome soit environ 1000 variants/Mb. La majorité de ces variants est fréquente au sein d'une population (Wu et al., 2013). Chaque individu pourrait être porteur de 250 à 300 variants responsables d'une perte de fonction protéique et de 500 à 100 variants impliqués dans des pathologies connues (Almal et al., 2012).

La majorité de ces variations apparait au cours de la méïose. Si elles sont *de novo* chez le 1er individu qui en est porteur, elles sont ensuite transmissibles, contrairement à la très grande majorité des variations post-zygotiques en mosaïque (Ku et al., 2013).

a. CNV

Le CNV est un fragment d'ADN de taille supérieure à 1 kb, présent en nombre de copies variable chez un individu donné par comparaison à un génome de référence. Il peut être de structure simple ou complexe (Redon et al., 2006). Ces variations sont généralement stables et peuvent être transmises (Almal et al., 2012).

L'identification des CNV fait notamment appel à la technique d'hybridation comparative en microréseau ou *comparative genomic hybridization* (CGH) *array*, également appelée « puce ». Cette technique permet de comparer l'hybridation d'un ADN test à celle d'un ADN témoin, sur un microréseau constitué d'oligonucléotides synthétisés sur une lame. Les ADN test et témoin sont marqués par des fluorochromes différents. Si le ratio entre l'ADN test et l'ADN témoin est négatif, une délétion est identifiée. A l'inverse, si ce ratio est positif, une amplification est identifiée (fig I.A.10). Les oligonucléotides synthétisés sur le microréseau ont en moyenne une taille de 60 pb. La densité de ces puces est extrêmement variable, allant de 180K à 1 voire 2 M. Plus la densité est importante, plus la résolution moyenne et génique est importante. Ces outils ne permettent pas de détecter les variations de petite taille telles que les SNP (Nemos et al., 2008).

Avant leur identification chez des sujets volontaires sains, ces CNV étaient connus pour leur influence sur l'expression des gènes et leur rôle pathogène dans des maladies mendéliennes telles que des syndromes microdélétionnels mais également des traits phénotypiques complexes tels que l'obésité ou l'autisme (Almal et al., 2012 ; Redon et al., 2006). Le développement de certaines pathologies pourrait être dépendant non pas d'un, mais de plusieurs CNV, voire de l'association de CNV et de SNP (Almal et al., 2012).

Redon et al., ont pour la première fois évalué la présence de ces CNV chez des individus volontaires sains. Ils ont ainsi démontré qu'environ 12% du génome humain était variable. Environ la moitié des variations identifiées étaient partagées par au moins 2 individus. Aucune région du génome n'est apparue totalement exempte de ces variations. La part variable d'un chromosome était estimée entre 6 et 19%. Pour autant, la localisation préférentielle de ces CNV était intergénique et à distance d'éléments ultra-conservés du génome. En outre, cette étude démontrait la possibilité de regouper les individus en fonction de leur origine ethnique sur la base de CNV communs (Redon et al., 2006).

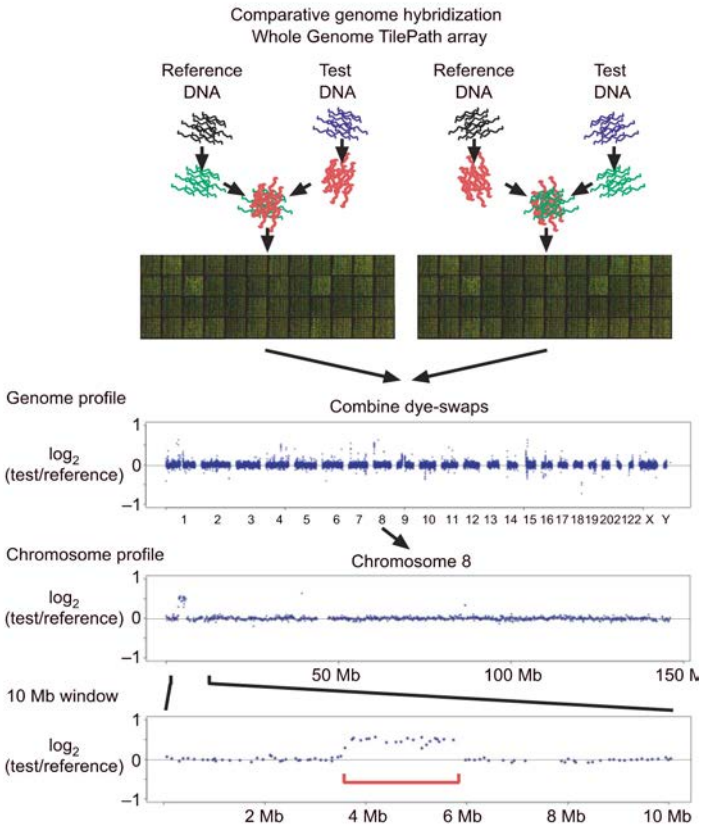
Deux ans plus tard, Kidd et al., ont montré que près de 25% du génome pouvait être variable. Les variations identifiées avaient une taille estimée entre quelques kb et 130 kb. Elles étaient distribuées de façon aléatoire dans les régions géniques et intergéniques. La majorité des variants identifiés était déjà listée dans des banques de données, permettant d'estimer la fréquence de ces polymorphismes à plus de 5%. Ces auteurs ont également pu montrer que le mécanisme de recombinaison homologue non-allélique était majoritairement en cause dans l'apparition de ces variations (Kidd et al., 2008).

A ce jour, plus de 25000 CNV sont rapportés, dont plus de 1000 de taille supérieure à 50 kb chez des individus dits sains (Arlt et al., 2012).

Cependant, si la portion variable du génome est évaluée à 25%, les CNV paraissent rares avec une fréquence évaluée à moins de 1%. En effet, ils seraient soumis à une sélection négative forte probablement en raison de leur rôle potentiellement pathogène (Tang et al., 2013).

On peut classer les CNV selon différents critères : leur fréquence ou leur caractère bénin ou pathologique (Arlt et al., 2012 ; Nemos et al., 2008).
En fonction de leur fréquence, on distingue les CNV récurrents, représentant 20 à 40% de ces variations et les CNV non récurrents. Les premiers ont des points de cassure localisés au niveau de segments dupliqués de l'ADN ou de régions répétées (*low-copy repeats*, LCR). Les seconds ont des points de cassure « privé » indépendants de duplications segmentaires. On peut cependant identifier des régions contenant plusieurs CNV ne partageant pas les mêmes points de cassure (Arlt et al., 2012).
En fonction de l'effet d'un CNV sur le phénotype d'un individu, on distingue les CNV pathogènes des CNV bénins ou non définis. Le caractère pathogène est suspecté
(i) lorsque le CNV est *de novo* et que les parents sont sains, ou hérité si les parents présentent le même phénotype,
(ii) lorsque les gènes contenus sont des gènes OMIM ou si de nombreux gènes sont compris dans la variation,
(iii) lorsque le CNV appartient à une région identifiée comme pathogène (notamment dans les bases de données telles que DECIPHER).
La taille (supérieure à 3 Mb) et le caractère délété plutôt que dupliqué seraient des critères mineurs pour un CNV pathogène (Nemos et al., 2008).

Figure I.B.11 : Principe de la CGH array (Redon et al., 2006).



b. SNP

Ces petites variations d'un seul nucléotide sont les variations les plus fréquentes. Il en existerait environ 10 millions sur l'ensemble du génome, soit environ 1 toutes les 290 pb (Wu et al., 2013). Les SNP n'ayant pas d'impact sur un trait phénotypique sont généralement stables dans le temps et transmis de génération en génération. Ils sont la source principale de l'hétérogénéité génétique humaine. Ils peuvent constituer un marqueur génétique d'une population donnée (Thomas et al., 2011).

Ces variants peuvent être « synonymes », ne modifiant pas la séquence protéique.
Lorsqu'ils sont situés dans une région codante, ils peuvent altérer la séquence d'amino-acide et potentiellement impacter la stucture ou la fonction de la protéine traduite. Ils sont alors appelés SNP non-synonymes. Ces derniers pourraient représenter plus de 50% des mutations connues et pourraient être impliqués dans des maladies héréditaires (Wu et al., 2013).

L'étude de ces variants peut être entreprise au cours d'une étude familiale comparant les polymorphismes hérités (parentaux) aux polymorphismes *de novo*, potentiellement pathogènes.
De larges études de populations comparant la fréquence de ces polymorphismes au sein de plusieurs populations, notamment porteuses d'un trait phénotypique permettent d'identifier un SNP en tant que facteur de risque du trait phénotypique considéré (Wu et al., 2013).

L'identification des SNP par la technique de polymérisation en chaîne en temps réel (PCR) est rapide et peu coûteuse. Cependant, elle ne permet pas l'évaluation de multiples SNP de façon simultanée (Cantsilieris et al., 2013).
Des outils de types puces SNP ont été développés pour permettre l'exploration d'un très grand nombre de SNP dans le même temps (cf technique Immunochip détaillée plus loin).

Ainsi, de nombreux SNP ont pu être identifiés comme facteur de risque de pathologies complexes ou multi-factorielles telles que le lupus ou l'asthme (Cantsilieris et al., 2013 ; Wjst et al., 2013)

B. Génétique des hypersensibilités médicamenteuses

L'hypothèse d'un terrain génétique prédisposant à la survenue d'une réaction d'hypersensibilité médicamenteuse a été évoquée du fait du caractère imprévisible de ces évènements et de la sévérité variable d'un patient à l'autre. En effet, à l'occasion d'un traitement strictement identique avec une molécule administrée, à la même posologie et pour une même durée d'exposition, les tableaux cliniques observés pourront varier de la toxidermie peu sévère à la toxidermie sévère avec atteinte systémique et pronostic vital engagé.
En outre, il existe quelques rares cas rapportés dans la littérature de cas familiaux de toxidermie (Pirmohamed, 2006).

Les études publiées à ce jour se sont beaucoup intéressées au typage HLA, étant donné le rôle central des molécules du CMH dans le déclenchement de la réponse immunitaire. Plusieurs groupages HLA avaient été associés à des accidents médicamenteux tels que l'HLA-A29, B12 et DR7 et le SSJ secondaire à la prise d'un sulfonamide, l'HLA-A2 et B12 et le SSJ secondaire à la prise d'AINS, l'HLA-B59 et l'atteinte ophtalmologique du SSJ, l'HLA-AW33 et B17/BW58 et les toxidermies à l'allopurinol. Mais ces associations n'étaient pas considérées comme suffisamment fortes pour donner lieu à un test diagnostique avant la prescription de telle ou telle molécule (Hung et al., 2005).

Quelques associations majeures ont depuis été décrites.
Ainsi, Chung et al. ont montré l'association forte entre le risque de survenue d'un syndrome de SSJ à la carbamazépine et la présence de l'HLA-B*1502 chez les chinois Han. Cet allèle HLA était, en effet, présent chez 100% des patients ayant présenté un SSJ à la carbamazépine, contre 3% des patients tolérant cette molécule et 8,6% dans la population générale, soit un odds ratio (OR) à 2,54 en cas de prise médicamenteuse, et un OR à 895 si l'on compare les patients ayant présenté une toxidermie à la population générale (Chung et al., 2004).
Cette association a depuis été confirmée dans d'autres populations, chinoises, thaï, malaisiennes et indiennes. Elle ne semble cependant pas exister dans les populations caucasiennes ou les japonais (Phillips et al., 2010).

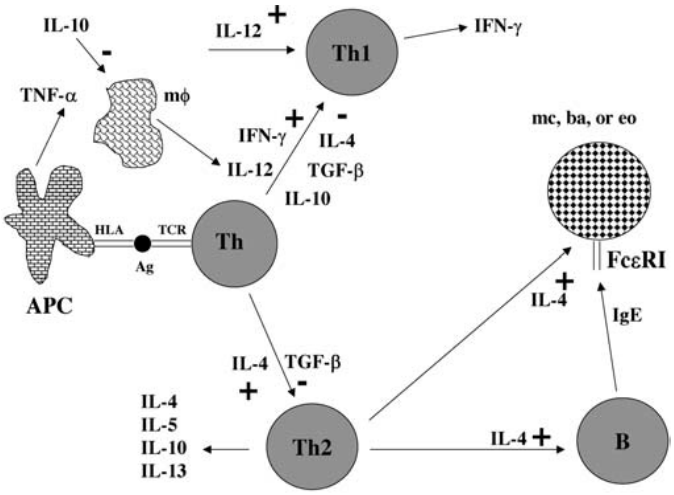
La survenue d'une hypersensibilité DRESS à l'abacavir semble très clairement corrélée à la présence de l'allèle HLA B*5701 ; la survenue de SSJ chez les chinois Han à HLA B*1502 ;

la survenue de SSJ, NET voire DRESS à l'allopurinol dans différentes populations à HLA B*5801, (Chung et al., 2004 ; Hetherington et al., 2002 ; Hung et al., 2005 ; Mallal et al., 2002).

La plupart de ces associations sont spécifiques d'une origine ethnique, d'un médicament et d'un type d'accident médicamenteux (Lonjou et al., 2006).

D'autres études se sont intéressées aux polymorphismes cytokiniques, ces molécules jouant un rôle important dans le contrôle de la réponse immunitaire (fig. I.B.1). Ces études sont principalement réalisées dans le cadre d'hypersensibilités aux bétalactamines que nous détaillons un peu plus loin.

Figure I.B.1: Schéma général de la réponse immunitaire montrant les différents acteurs potentiels qui ont été ciblés par les études de polymorphismes (Vandebriel, 2004). APC : cellules présentatrice d'antigènes, mϕ : macrophage, Th : lymphocyte T *helper* (auxiliaire), TCR : récepteur des cellules T, mc : cellule mastocytaire, ba : basophiles, eo : eosinophiles IL : interleukine, IFN : interféron, TGF : *tumor growth factor*, Ig : immunoglobuline, HLA : *human leukocyte antigen*, TNF : *tumor necrosis factor*, FcεRI : récepteur de haute affinité des IgE.



Quelques études ont évalué le rôle des gènes codant pour des enzymes métabolisant les médicaments. Cependant, les résultats de la majorité de ces études sont peu concluants. Encore récemment, Sacco et al. n'ont pas pu démontrer d'association entre l'allergie au sulfonamide et certains variants de 3 enzymes impliquées dans le métabolisme de ce cette molécule : CYB5 (cytochrome b5), CYB5T3 (cytochrome b5 reductase) et NAT2 (N-acétyltransférase 2) (Sacco et al., 2012).
Toutefois, on peut retenir une étude récente menée en Thaïlande, évaluant le terrain génétique des toxidermies sévères aux anticonvulsivants aromatiques chez des enfants. Quarante patients ayant présenté majoritairement des DRESS (n=33) et 40 patients tolérant les mêmes traitements ont été inclus. Les résultats de cette étude plaident en faveur d'une association entre CYP2C19*2 et les toxidermies graves aux phénobarbital a été constatée. Or, ce polymorphisme CYP2C19*2 est un marqueur de métabolisme réduit de cette enzyme qui appartient à la famille du cytochrome P450 et est largement impliquée dans la bioactivation et la détoxification des anticonvulsivants aromatiques. L'OR calculé au cours de cette étude était de 4,5 (IC95% : 1,17-17,37) (Manuyakorn et al., 2013).

Au total, il apparaît clairement que l'hypersensibilité médicamenteuse est une maladie multifactorielle mais également multigénique.

1. Hypersensibilités aux bétalactamines

Les bétalactamines (BL), antibiotiques les plus largement prescrits, sont très fréquemment impliquées dans la survenue de toxidermies médicamenteuses, en particulier immédiates. De nombreuses études ont évalué l'existence d'un terrain génétique sous-tendant ces réactions d'hypersensibilité.

La première étude qui a évalué le terrain génétique de patients ayant présenté une hypersensibilité (HS) aux BL est celle de Romano et al.. Cette étude a évalué les gènes du CMH chez des patients ayant présenté une hypersensibilité retardée aux bétalactamines. Bien que menée sur une cohorte de petite taille, 24 patients comparés à un grand nombre de témoins (522 individus), cette étude a mis en évidence une forte prévalence des HLA2 et DRw2 avec des OR respectifs de 6,76 et 9,28 (Romano et al., 1998).

Qiao et al. ont étudié plusieurs gènes de susceptibilité pour les HS aux BL. Leur cohorte est majoritairement constituée de patients avec allergie immédiate aux BL. En premier lieu, ils ont testé un polymorphisme du gène codant pour le récepteur de haute affinité des IgE, FcεRI chez 158 patients chinois ayant présenté majoritairement des HS immédiates aux BL.
En effet, FcεRI est associé à l'asthme atopique et à la production d'IgE spécifique. De plus, les IgE sont suspectés d'être impliqués dans les mécanismes physiopathologiques des hypersensibilités aux BL. Les auteurs ont montré une association entre ce polymorphisme et la présence d'IgE spécifiques. Ceci serait la confirmation du rôle des IgE et de leur récepteur dans l'apparition d'une hypersensibilité (Qiao et al., 2004).
Cette même équipe a ensuite étudié des polymorphismes cytokiniques et leur association avec l'HS aux BL. Ils ont tout d'abord évalué les polymorphismes de l'IL4 et de l'IL4Rα. En effet, l'IL4 joue un rôle clé dans la production d'IgE par les lymphocytes B et son récepteur a un rôle pivot dans la voie de l'IL4, la production d'IgE et le développement d'une immunité Th2. La population étudiée comprenait 156 patients avec HS aux BL, majoritairement de type immédiat et 88 contrôles. Les auteurs ont montré l'association du polymorphisme testé de l'IL4Rα étudié (Q576R) avec l'hypersensibilité retardée aux BL mais également avec des taux d'IgE spécifiques augmentés (Qiao et al., 2005).
La même équipe a montré sur une plus large cohorte de 242 patients l'association de 2 polymorphismes du gène codant pour le récepteur de l'IL4 avec l'HS aux BL. Dans cette

étude, le génotype AA du polymorphisme Q576R de l'IL4RA était associé à un risque accru d'hypersensibilité aux BL (p=0,005), à la présence de tests positifs et à un taux IgE élevé. Le génotype AA du polymorphisme I75V était quant à lui associé à un risque augmenté d'urticaire (p=0,049). Ces données étaient confirmées par l'analyse des haplotypes (Huang et al., 2009).

L'IL13 étant un cofacteur de l'IL4, Yang et al. ont étudié un polymorphisme de l'IL13 et 2 polymorphismes de la région intergénique entre les gènes codant pour ces 2 cytokines chez 158 patients et 89 contrôles. Au cours de cette étude, ils ont montré l'association entre les 2 polymorphismes intergéniques et la présence d'IgE spécifiques (Yang et al., 2005).

Récemment, cette équipe a testé des polymorphismes du gène STAT6 impliqué dans la voie de signalisation de l'IL4. Ils ont identifié une association entre le génotype majoritaire et le risque d'HS aux bétalactamines, en particulier, le risque d'HS immédiate. Les auteurs n'ont pas retrouvé d'association entre les polymorphismes testés et la présence d'IgE spécifiques (Huang et al., 2012).

Cette équipe avait également testé l'association entre 2 polymorphismes du promoteur de l'IL10 (-1082 G/A et -819 C/T) et l'HS aux BL chez 102 patients et 86 contrôles. Ils ont montré une fréquence significativement plus faible de l'allèle rare du polymorphisme -1082 C/T chez les patients présentant une hypersensibilité avec IgE spécifiques élevés et une fréquence significativement plus faible de l'allèle rare du second polymorphisme chez les patients avec HS et IgG spécifiques (Qiao et al., 2007).

Ils ont également testé 2 polymorphismes du promoteur du gène codant pour l'IL18 chez 606 patients chinois Han et 614 sujets contrôles. La très grande majorité de ces patients avaient présenté une allergie immédiate aux BL. Dans cette étude, le génotype minoritaire pour le polymorphisme -607 A/C était significativement plus fréquent chez les patients que chez les contrôles. Le risque relatif de présenter une HS aux BL en présence de l'allèle A pour ce polymorphisme était de 1,51 (IC : 1,28-1,78). Pour le second polymorphisme testé (-137 G/C), l'allèle minoritaire, C, était significativement associé avec le risque d'HS aux BL (OR=1,79, IC : 1,40-2,28). Ces données étaient confirmées par l'analyse par haplotypes (Ming et al., 2011).

Gao et al. se sont également intéressés aux polymorphismes de gènes codant pour l'INF-γ et son récepteur (IFNR1). Au cours de cette étude, 144 patients chinois ont été recrutés, parmi lesquels 1/3 avaient des tests cutanés positifs ; 67 patients avaient présentés une allergie immédiate aux BL, 42 une allergie retardée. La présence de 18 CA répétés dans un intron du gène de l'IFN-γ semblait protecteur de la survenue d'une urticaire ($p < 0,05$) et la présence de

l'allèle A du polymorphisme testé du gène de l'IFNR1, protecteur de la survenue d'une hypersensibilité (p >0,05). Par contre, l'influence de ces polymorphismes sur la sécrétion d'IFN n'était pas démontrée (Gao et al., 2008).
Enfin, Yang et al. ont évalué le typage HLA-DR chez 113 chinois Han ayant présenté une HS aux BL en raison du rôle clé de ces molécules HLA dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Ils ont montré l'association entre HLA-D9 et le rôle potentiellement protecteur de HLA-DR14.1 vis à vis de l'HS immédiate, l'urticaire et la présence d'IgE spécifiques. De même, ils ont montré un rôle protecteur de HLA-DR10 vis à vis de l'hypersensibilité (Yang et al., 2006).

Guglielmi et al. ont testé l'association entre des polymorphismes de gènes codant pour des cytokines ou leurs récepteurs : IL4, IL13, IL10, STAT6, IL4Rα, IL21R, IFNR1, IFNR2 et FcεRIβ. Au cours de cette étude cas-témoin, 44 patients français ayant présenté une allergie immédiate démontrée aux BL et autant de témoins ont été recrutés. Seuls un variant du récepteur de l'IL4 et 2 variants localisés dans le promoteur de l'IL10 ont été identifiés comme associés avec l'hypersensibilité immédiate (HSI) aux BL chez des femmes atopiques. Chez ces patientes, la présence de l'allèle rare pour 2 promoteurs de l'IL10 (-819 et -592) augmentait le risque d'HSI (OR=17,5, IC : 1,26-533,07) de même que la présence de l'allèle rare pour le polymorphisme I75V du récepteur de l'IL4 (OR=5,4, IC : 1,16-27,7). Ce dernier polymorphisme avait en revanche un effet protecteur chez les hommes atopiques. Le polymorphisme étudié du récepteur de l'IL4 semble influencer l'activation de STAT6, sa prolifération et l'activité transcriptionnelle du promoteur Iε en réponse à une stimulation par l'IL4. Les 2 polymorphismes de l'IL10 localisés au niveau de son promoteur sont, à l'inverse, responsables d'une plus faible expression de IL10. Or, IL10 est une cytokine inhibitrice tandis que IL4 est une cytokine activatrice (Guglielmi et al., 2006). Les associations montrées dans cette étude sont donc tout à fait pertinentes.

Dans une cohorte de 210 patients italiens ayant présenté une allergie immédiate aux BL, Guéant-Rodriguez et al. ont également évalué les polymorphismes de l'IL13 ainsi que du récepteur de l'IL4. L'allèle majoritaire pour les polymorphismes de l'IL4Rα I50V et Q551R était significativement associé à l'hypersensibilité aux BL (p=0,027 et p=0,015 respectivement). Ces mêmes polymorphismes ainsi que le polymorphisme R130Q de l'IL13 étaient associés à un taux élevé d'IgE (p=0,002, p=0,042 et p=0,020 respectivement). La

combinaison de l'allèle le moins fréquent du polymorphisme de l'IL13 et de l'un des polymorphismes majoritaires de l'IL4Rα était associée au risque d'HS (OR=2,9, IC : 1,5-5,4). A l'inverse, l'association de l'allèle majoritaire de l'IL13 et de l'un des allèles minoritaires de l'IL4Rα avait un effet protecteur (OR=0,5, IC : 0,4-0,8). Ces associations plaident pour un rôle complémentaire de ces 2 gènes dans les mécanismes allergiques IgE médiés. La forte prévalence d'un taux d'IgE augmenté chez les patients présentant une allergie immédiate aux BL faisait également discuter le lien entre ce type d'HS et l'atopie (Guéant-Rodriguez et al., 2006).

Cette même équipe a étudié l'implication d'un polymorphisme du TNFα chez les mêmes patients (169 patients italiens ayant présenté une allergie immédiate aux BL). Dans cette étude, l'allèle majoritaire du polymorphisme -308G>A du TNFα était clairement associé avec un risque accru d'allergie immédiate aux BL (p=0,016, OR=2,45, IC : 1,18-5,08) et à un taux élevé d'IgE spécifiques (p=0,023, OR=3,83, IC : 1,12-13,18), mais n'avait pas d'influence sur le taux d'IgE total (p<0,0001, OR=1,01, IC : 1,0-1,01). Le polymorphisme étudié est reconnu pour moduler le taux de TNFα circulant et pour être en déséquilibre de liaison avec 3 autres variants du promoteur du même gène, ce qui confirme son importance fonctionnelle. L'implication du TNFα dans l'allergie aux BL pourrait être liée à son rôle clé dans les mécanismes de présentation antigénique (Guéant-Rodriguez et al., 2008).

Apter et al. ont évalué des polymorphismes de gènes codant pour différentes cytokines impliquées dans l'hypersensibilité immédiate (IL4, IL4R, IL10) et d'un gène codant pour une bétalactamase impliquée dans le métabolisme des BL (LACTB), chez des patients blancs américains déclarant avoir présenté une allergie immédiate aux BL. Parmi 23 cas et 39 témoins, ces auteurs ont pu identifier l'influence de 3 SNP de l'IL4 sur l'allergie immédiate aux BL, dont 2 confirmés par l'analyse multivariée : rs100624446 et rs11740584 avec des OR à 6,21 pour chacun de ces SNP. Dans cette étude, l'influence de l'un des polymorphismes de LACTB (rs2729835) dans un modèle multivarié n'était que marginale (Apter et al., 2008).

Plus récemment, Cornejo-Garcia et al. ont réalisé une étude portant sur plusieurs polymorphismes de l'IL13, IL4, IL4RA, STAT6, LACTB et du TNF α dans une cohorte de 340 patients et autant de contrôles d'origine espagnole. Le taux d'IgE était associé avec les polymorphismes des gènes IL4RA, IL4 et IL13. L'un des polymorphismes de l'IL4RA et de LACTB étaient associés avec la présence d'IgE spécifiques dirigés contre des

pneumallergènes. Enfin, le polymorphisme de LACTB était associé avec la présence d'IgE spécifiques dirigés contre les BL. Au cours de cette étude, la prévalence de l'atopie était élevée chez les patients avec HS aux BL. Pour expliquer l'association entre ces 2 pathologies et la prévalence élevée dans cette cohorte à la fois d'IgE anti-BL et anti-acariens, les auteurs émettaient deux hypothèses : (i) une sensibilisation aux acariens stimulant la production d'IL4 et de façon conséquente d'IgE spécifique des BL ; (ii) une possible homologie de structure entre les protéines allergisantes des acariens et les haptènes sensibilisants des BL (Cornejo-Garcia et al., 2012).

Au total, si des associations ont été montrées, peu ont été confirmées par plusieurs études. La difficulté d'interprétation de ces résultats tient tout d'abord au fait que les populations étudiées sont d'origines ethniques différentes (patients européens ou américains, caucasiens ; patients asiatiques, chinois). De plus, les critères d'inclusion peuvent varier (hypersensibilité rapportée par le patient, tests cutanés positifs, IgE spécifiques positives, hypersensibilité immédiate définie sur le délai de réaction), de même que la présentation clinique ou le mode de confirmation diagnostique (tests cutanés ou *in vitro*). Enfin, le choix des polymorphismes testés pour un gène donné est rarement le même entre 2 équipes différentes (tableau I.B.1).

Ces approches par gène candidat sont certainement utiles pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et des déterminants génétiques sous-tendant ces accidents médicamenteux. Cependant, elles ne donnent qu'une vision partielle de mécanismes complexes et de situations hétérogènes, sans doute multigéniques.

Tableau I.B.1: Synthèse des associations rapportées chez les patients présentant une hypersensibilité aux bétalactamines. HLA : *human leucocyte antigen*, HSR : hypsersensibilité retardée, HSI : hypersensibilité immédiate, Ig : immunoglobulines, IL : interleukine* : risque combiné pour les polymorphismes de l'IL13 et IL4Rα.

	Association	Pas d'association
HLA		
HLA-2, - DRw2	HSR (Romano, 1998)	
HLA-DRB	DR9 : risque HSI	
	DR10, DR14.1 : protège de l'HSI	
	(Yang, 2006)	
Fcε-RI (E237G)	IgE spécifiques (Qiao, 2004)	Guglielmi, 2006
IL4-Rα		Guéant-Rodriguez, 2006 (S478P)
I50V	HSI*, taux IgE total (Guéant-Rodriguez, 2006)	
	Taux IgE spécifiques (Cornejo-Garcia, 2012)	
I75V	HSI (Huang, 2009)	Apter, 2008
	HSI f atopiques (Guglielmi, 2006)	
Q551R	HSI* (Guéant-Rodriguez, 2006)	
	Taux IgE total (Cornejo-Garcia, 2012)	
Q576R	HSR, IgE spécifiques (Qiao, 2005 ; Huang, 2009)	Guglielmi, 2006
IL4	HSI (Apter, 2008)	Guglielmi, 2006 (-589, -34)
		Qiao, 2005 (-589)
		Cornejo-Garcia, 2012 (-34)
IL4-IL13	IgE spécifiques (Yang, 2005)	
IL13 (R130Q)	HSI* (Guéant-Rodriguez, 2006)	Guglielmi, 2006 (R130Q, -1512, -1112)
	Taux IgE total (Cornejo-Garcia, 2012)	Guéant-Rodriguez, 2006 (-1055)
		Yang 2005 (R130Q)
STAT6	HS (Huang, 2012)	Guglielmi, 2006 (In 18)
		Cornejo-Garcia, 2012
IL10		Apter, 2008
-592	HSI f atopiques (Guglielmi, 2006)	
-819	HSI f atopiques (Guglielmi, 2006)	
	Protège HS avec IgG (Qiao, 2007)	
-1082	Protège HS avec Ig spé (Qiao, 2007)	Guglielmi, 2006
IL18	HS (Ming, 2011)	
IL21R (-83)		Guglielmi, 2006
TNFα (-308G/A)	HSI (Guéant-Rodriguez, 2008)	Cornejo-Garcia, 2012
IFN	18CA : protège HSI (Gao, 2008)	
IFNR1 (V14M)	Allèle A : Protège HS (Gao, 2008)	
LACTB	IgE spécifiques (Cornejo-Garcia, 2012)	Apter, 2008

2. DRESS

Peu d'études se sont centrées sur la génétique de cette toxidermie grave.

L'hypersensibilité à l'abacavir est une toxidermie spécifique mais proche du DRESS. C'est la première situation qui a mené à la réalisation d'un test diagnostique avant la prescription d'une molécule. En effet, HLA-B*5701 est associé à la survenue de cette hypersensibilité avec un OR supérieur à 100 (Mallal et al., 2002 ; Hetherington et al., 2002). Cette très forte association est aujourd'hui expliquée par la spécificité de cet HLA dans la présentation antigénique de l'abacavir (Chessman et al., 2008 ; Illing et al., 2012 ; Pompeu et al., 2012).

Le DRESS à la névirapine est lui associé à la présence de différents HLA en fonction des populations étudiées : HLA-B*1402 et HLA-Cw8 chez des patients sardes (Littera et al., 2006), HLA-Cw8 chez des patients japonais (Gatanaga et al., 2007) et HLA-B*3505 chez des patients Thai (Chantarangsu et al., 2009).

Au cours d'une étude portant sur 51 patients chinois Han ayant présenté une toxidermie grave à l'allopurinol parmi lesquels 30 DRESS, Hung et al. ont étudié un très grand nombre de SNP. Ces SNP avaient été choisis selon différents critères : les gènes du CMH, des gènes codant pour des enzymes du métabolisme des médicaments (dont ceux de l'allopurinol), des phénomènes immunologiques et des gènes de la régulation de l'apoptose. Ces auteurs ont pu montrer l'association de ces accidents médicamenteux graves avec la présence de SNP dans les gènes codant pour les CMH de classe III et dans un gène régulateur de l'apoptose. Ils ont ensuite réalisé le génotypage HLA pour ces patients et constaté la présence des allèles HLA-A*3302, B*5801, Cw*0302 et DRB1*0301 avec une fréquence plus importante que dans 2 populations contrôles constituées d'une part de patients tolérant la carbamazépine et d'autre part de sujets volontaires sains. HLA-B*5801 était présent chez tous les patients étudiés avec un OR par rapport aux patients tolérants calculé à 580,3 (IC : 23,2-6665,26) (Hung et al., 2005).
Ces données ont été confirmées dans une étude portant sur des patients thaï mais pour l'association spécifique entre HLA-B*5801 et le risque de SSJ/NET (Tassaneevakul et al., 2009), et plus récemment chez des patients caucasiens (Lonjou et al., 2008) et japonais (Kaniwa et al., 2008). Dans l'étude de Kang et al., ce même HLA-B*5801 a été identifié

comme facteur de risque des toxidermies graves à l'allopurinol parmi 20 patients ayant présenté un DRESS et 5 patients ayant présenté un SSJ ou NET. Combiné à HLA-Cw*0302 ou isolément, l'OR était calculé à 97,8 (IC 95% : 18,3-522,5) en cas de traitement par allopurinol. Dans cette même étude, HLA-A*3303 était également un facteur de risque de ces toxidermies (OR=20,5) (Kang et al., 2011). Plus récemment, Gonçalo et al. ont également confirmé l'association entre l'HLA-B*5801 et les toxidermies graves à l'allopurinol chez 25 patients caucasiens, portugais, dont 19 DRESS et 6 SSJ/NET. La fréquence de cet HLA était notamment de 63,2% chez les patients DRESS versus 4,3% des patients tolérants soit un OR calculé à 37,71 (IC 95% : 4,13-343,87) en cas de prise médicamenteuse (Gonçalo et al., 2013).

Calligari et al. ont étudié le terrain génétique d'une jeune patiente ayant présenté un DRESS à la carbamazépine. Cette patiente avait la particularité d'être porteuse du groupage HLA A*3101 mais également d'un variant homozygote de l'enzyme EPHX1. Le variant enzymatique identifié avait pour effet de réduire l'activité de l'enzyme EPHX1 (Calligari et al., 2009). Or des variants de cette enzyme avaient déjà été associés à un sur-risque d'hypersensibilité à la carbamazépine (Green et al., 1995).
Récemment, plusieurs équipes japonaises ont confirmé l'association entre HLA-A*3101 et les toxidermies à la carbamazépine, en particulier les DRESS. La première étude, basée sur une étude SNP pangénomique comportait 54 patients ayant présenté une toxidermie à la carbamazépine dont 29 DRESS. Les 12 SNP identifiés étaient tous localisés en 6p21.33, locus de HLA-A. HLA-A a ensuite été détaillé chez 61 patients atteints de DRESS (7 cas supplémentaires) et 376 patients tolérants la molécule, permettant d'identifier HLA-A*3101 chez 60,7% des cas versus 12,5% des sujets tolérants soit un OR égal à 10,8 (5,9-19,6). Ces résultats ont été répliqués sur une plus petite cohorte de 16 patients et 44 sujets tolérants pour lesquels l'OR pour les DRESS était calculé à 9,5 (IC : 4,6-19,5) (Ozeki et al., 2011). La seconde population étudiée était constituée de 15 patients dont 9 DRESS. L'OR calculé pour ce groupage HLA était de 11,2 (IC 95% : 2,67-47,11) (Niihara et al., 2012).
Cette association a également été confirmée dans une cohorte d'enfants canadiens d'origines variées. Au cours de cette étude, 42 enfants ayant présenté une toxidermie à la carbamazépine ont bénéficié de génotypages HLA spécifiques. Parmi eux, 6 avaient présenté un DRESS et 26 un EMP. HLA-A*3101 était présent chez 50% des patients DRESS et chez 23,1% des patients EMP versus 3,3% des enfants tolérant la carbamazépine soit un OR égal à 26,4 (IC 95% : 2,5-307,9) pour le DRESS, 8,6 pour l'EMP et 11,2 pour ces 2 types de toxidermie.

Cette association était également confirmée chez les patients d'origine européenne (OR=10,05) (Amstutz et al., 2013).

Au cours d'une étude portant sur 14 cas de DRESS (ou EMP graves) aux anti-tuberculeux, une équipe coréenne a identifié HLA-Cw*0401 comme étant associé avec cette pathologie avec un OR de 6,90 (IC 95% : 2,2-21,66). Les haplotypes Cw*0401-A*1101, Cw*0401-B*1501 ou Cw*0401-A*1101-B*1501 étaient associés avec le DRESS (Kim et al., 2013).

A partir d'une revue de la littérature des cas de DRESS survenus chez des patients japonais compliqués de diabète fulminans (15 cas), Onuma et al. ont déterminé que HLA-B*62 était un facteur de risque de cette complication rare (Onuma et al., 2012).

Au total, les études portant sur le terrain génétique des DRESS ont porté très majoritairement sur des populations homogènes de patients avec une origine ethnique particulière et des DRESS déclenchés par des molécules spécifiques (tableau I.B.2). Ces études ont permis de montrer que certains HLA étaient des facteurs de risque, parfois majeurs, de cette toxidermie grave et de développer des tests diagnostiques avant la prescription de certaines molécules, notamment l'abacavir.

Tableau I.B.2 : HLA spécifiques des DRESS en fonction des populations étudiées.

Molécule	HLA	Population concernée	Références
Abacavir	B*5701	Australien	Mallal, 2002
		Américains (blancs)	Hetherington, 2002
Nevirapine	B*1402	Sardes	Littera, 2006
	Cw8	Sardes	Littera, 2006
		Japonais	Gatanaga, 2007
	B*3505	Thaï	Chantarangsu, 2009
Allopurinol	B*5801	Chinois Han	Hung, 2005
		Portugais	Gonçalo, 2013
		Coréens	Kang, 2011
	A*3303	Coréens	Kang, 2011
Carbamazépine	A*3101	Italiens	Calligari, 2009
		Japonais	Ozeki, 2011
			Niihara, 2012
		Canadiens (origine européenne)	Amstutz, 2013
Anti-tuberculeux	Cw0401	Coréens	Kim, 2013
DRESS et diabète fulminans	B*62	Japonais	Onuma, 2012

C. Objectifs et Approches

Au cours de ce travail, nous avons cherché à évaluer le terrain génétique des hypersensibilités, tout d'abord par une approche par gènes candidats

1. dans le cas de toxidermies à une molécule donnée
2. dans le cas de toxidermies diverses avec des molécules variées.

puis, par une approche globale, sur l'ensemble du génome, à la recherche de gènes candidats, dans le cas d'une toxidermie en particulier mais déclenchée par de nombreuses molécules.

Nous avons donc utilisé diverses approches moléculaires.

La première approche par analyse de SNP de gènes candidats pourrait être qualifiée de génétique moléculaire. Le choix des gènes NOD1 et NOD2 a été dicté par leur implication dans l'immunité innée et adaptative ; leur rôle dans les défenses anti-bactériennes et leur association démontrée avec les différents items de l'atopie.

La seconde approche analysant les SNP de plusieurs gènes codant pour des cytokines au cours de différentes toxidermies pourrait être qualifiée d'intégrative. Nous avons ici étudié plusieurs gènes clairement identifié dans la physiopathologie des hypersensibilités médicamenteuses.

Enfin, la dernière approche, génomique, *sans a priori*, a utilisé une technique innovante adaptée à l'analyse de cohortes de petite taille.

1. Approche par gènes candidats

a. les gènes NOD1 et NOD2

Les gènes NOD1 (ou CARD4) et NOD2 (ou CARD15) codent pour des récepteurs intracellulaires cytosoliques reconnaissant différents signaux tels que les molécules issues de bactéries (microbial-associated molecular pattern, MAMP) ou les molécules de « signal danger » (danger-associated molecular pattern, DAMP). Ils appartiennent à la famille des NLR (nucleotide-binding oligomerization domain (Nod) like receptor).

Ces récepteurs ont une structure tri-partite constituée d'une région C-terminale riche en répétitions de leucine, dont le rôle est de reconnaître les ligands, d'un domaine central pour la liaison aux nucléotides et l'oligomérisation, et d'un domaine effecteur N-terminal.
La famille des NLR comporte 22 membres, dont les récepteurs Nod1 et Nod2 qui ont la particularité d'avoir dans la région N-terminale des domaines CARD (caspase recruitment domain), au nombre de 1 pour Nod1 et de 2 pour Nod2 (Kanneganti et al., 2007 ; Le Bourhis et al., 2007).

Le gène NOD1 a une expression ubiquitaire, tandis que NOD2 a une expression principalement dans les macrophages et les cellules dendritiques, les cellules de Paneth, les kératinocytes, l'épithélium intestinal, le poumon, la cavité buccale et les ostéoblastes (Corréa et al., 2012).

Les structures des gènes NOD1 et NOD2 ainsi que les protéines produites sont représentées dans les figures I.C.1 et I.C.2.

Figure I.C.1 : Structure du gène NOD1 et de sa protéine (Weidinger et al., 2005b).

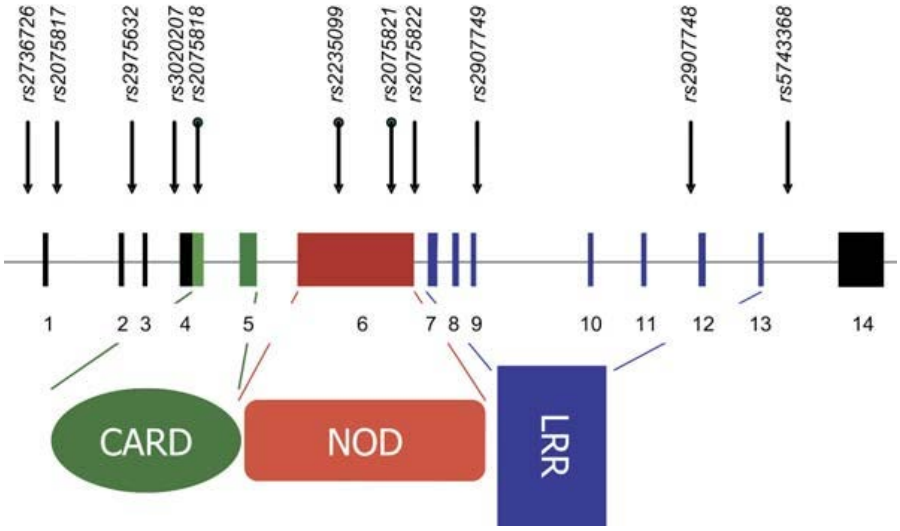
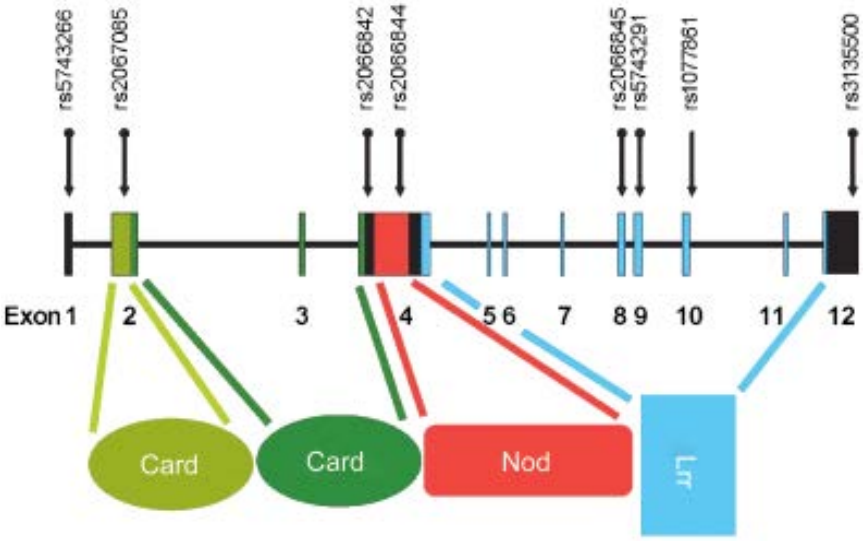


Figure I.C.2 : Structure du gène NOD2 et de sa protéine (Weidinger et al., 2005a).

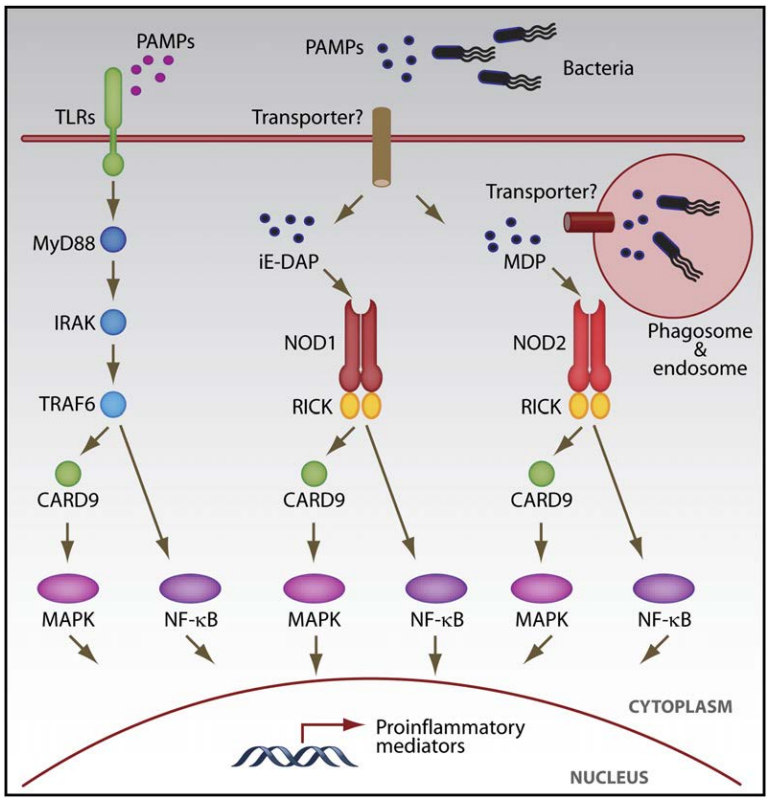


Voies de signalisation des gènes NOD1 et NOD2.

Ces récepteurs sont, à leur état de base, inactifs. Cette inactivation serait le fait de la partie LRR qui inhiberait l'oligomérisation jusqu'à l'activation par un ligand. Le ligand une fois fixé sur la partie LRR induirait un changement de conformation, l'oligomérisation et l'activation de voies de signalisation. Nod2 reconnaît ainsi les MDP (muramyl dipeptide) qui sont les plus grands motifs peptidoglycanne communs aux bactéries Gram-positives et négatives. Nod1 reconnaît les iE-DAP (*dipeptide γ-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid containing peptidoglycan*) généralement observés dans les bactéries Gram-négatives.

L'activation de ces 2 récepteurs induit notamment la voie NFκB ou la voie des MAPK via le recrutement de RIP2 (*receptor-interacting protein 2*) également appelé RICK qui est une sérine-thréonine kinase qui interagit elle-même avec le complexe IKK (*Inhibitor of NFκB kinase*). Cette interaction libère le NFκB qui se transloque alors dans le noyau pour activer la transcription de différents gènes. Ces récepteurs peuvent ainsi moduler l'immunité innée en augmentant l'inflammation et la phagocytose par le recrutement des neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques (Bansal et al., 2011 ; Kanneganti et al., 2007 ; Le Bourhis et al., 2007).

Figure I.C.3 : Voies de signalisation de Nod1 et Nod2 (Kanneganti et al., 2007).

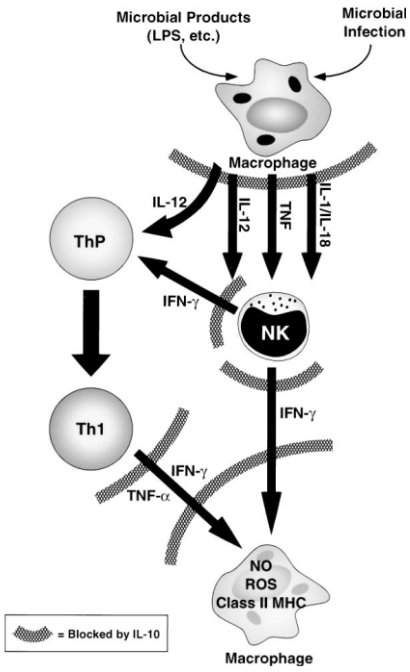


Ces récepteurs sont également impliqués dans l'immunité adaptative, Th1 et Th2 *via* l'IL12 et l'IgG1 respectivement (Fritz et al., 2007 ; Le Bourhis et al., 2007). Il a également été démontré que ces 2 récepteurs interagissaient entre eux et modulaient la sécrétion de cytokines telles que IL-1β, IL6, IL10 ou le TNF-α (Carneiro et al., 2008 ; Corréa et al., 2012 ; Netea et al., 2005 ; Tada et al., 2005). Or l'IL10 est une cytokine inhibitrice qui joue un rôle déterminant dans les phénomènes inflammatoires et dans la tolérance immunitaire (Moore et al., 2001).

Plus récemment, il a été montré que les agonistes de Nod2 pouvait induire une dérégulation de la balance Treg/Th2, bloquer la tolérance et induire ainsi une inflammation à éosinophiles (Duan et al., 2010).

Enfin, l'expression du gène NOD2 pourrait être induite par l'IFNγ, comme d'autres gènes, et induire une apoptose, notamment dans les kératinocytes de sujets atopiques (Rebane et al. 2012).

Figure I.C.4 : Rôle de l'IL10 dans la régulation de l'immunité innée et adaptative (Moore et al., 2001).



Associations pathologiques

NOD2 est associé avec différentes pathologies telles que la maladie de Crohn (Hugot et al., 2001, Ogura et al., 2001), le syndrome de Blau (Micelli-Richard et al., 2001), la maladie du greffon contre l'hôte (Holler et al., 2004) ou l'atopie (Kabesch et al., 2003). Les mécanismes sous-jacents à ces associations ont été étudiés dans la maladie de Crohn. En effet, dans la maladie de Crohn, les polymorphismes détectés seraient responsables d'une diminution de l'activité antimicrobienne dans l'intestin d'où une prolifération de la flore intestinale et l'apparition d'une inflammation (Billmann-Born et al., 2011).

Kabesch et al. ont pour la première fois évalué les 3 polymorphismes associés à la maladie de Crohn dans des populations atopiques. Au total, 1872 sujets d'origine allemande ont été génotypés au cours de cette étude. Parmi les sujets recrutés, environ 10% présentaient un asthme, 18,5% une dermatite atopique, 9% une rhinite allergique et 25,5% un test cutané positif. L'allèle C en position 2722 (rs2066845) était associé à un risque de rhinite allergique (OR=3,16) et un risque de dermatite atopique (OR=1,85). Le risque de développement d'une atopie était majoré (OR=1,73) en cas d'insertion d'un C en position 3020 (rs5743293), de même que le taux d'IgE était majoré en association avec ce polymorphisme chez les sujets atopiques. La présence de 2 polymorphismes étudiés sur 3 majorait encore le risque d'atopie (OR=3,06) et de rhinite allergique (OR=4,64) (Kabesch et al., 2003).
Hysi et al. ont, quant à eux, évalué 12 polymorphismes du gène NOD1 et leur association avec l'asthme et le taux d'IgE au sein de 3 populations différentes : 2 panels de familles autraliennes et anglosaxonnes constitués respectivement de 203 et 215 individus, ainsi que 600 sujets asthmatiques allemands et 1194 contrôles. Les auteurs ont pu montrer l'association du polymorphisme rs2907749 avec une élévation du taux d'IgE dans les 2 premières cohortes, et avec l'asthme dans la cohorte de familles australiennes. Ces associations étaient confirmées dans la cohorte allemande avec un OR pour l'asthme calculé à 6,30 (IC 95% : 1,4-28,3), à 5,4 pour un taux d'IgE supérieur au 50è percentile (IC 95% : 1,15-25,3) et à 18,4 pour un taux d'IgE supérieur au 90è percentile (IC 95% : 2,29-147,6). D'autres polymorphismes du gène NOD1 étaient associés soit à l'asthme (rs2975632, rs2075822 dans la cohorte anglosaxonne ; rs3020207, rs2736726, rs2075817, rs2975632 dans la cohorte allemande) soit au taux d'IgE (rs2975632, rs2075822 et rs2736726 dans la cohorte allemande) (Hysi et al., 2005).

Une autre équipe allemande s'est ensuite intéressée aux polymorphismes du gène NOD2 dans une cohorte de 1875 adultes. Au sein de cette cohorte, 9% des patients étaient asthmatiques, 26% présentaient une rhinite allergique, 13% une dermatite atopique et 32,2% un taux d'IgE >100kU/l. Huit polymorphismes ont été évalués. L'allèle T en position rs1077861 était associé à un effet protecteur pour le développement de l'asthme (OR= 0,648). L'allèle A en position rs3135500 était associé à un sur-risque d'asthme (OR=1,374). Deux polymorphismes étaient associés avec un effet protecteur pour la rhinoconjonctivite : l'allèle A en position rs5743266 et l'allèle T en position rs2066842 (OR= 0,8). Le polymorphisme rs2066845 était associé à un taux élevé d'IgE (OR=1,87) (Weidinger et al., 2005a).

La même équipe a testé sur 3 cohortes de patients 11 polymorphismes du gène NOD1. La première cohorte comportait 1417 sujets, parmi lesquels environ 9% étaient asthmatiques, 2% présentaient une dermatite atopique et 25% une rhino-conjonctivite allergique. La seconde cohorte était constituée de 454 sujets parmi lesquels 50% présentaient une dermatite atopique, 9% un asthme et 28% une rhino-conjonctivite allergique. Enfin, 189 trios familiaux (enfant et parents) ont été recrutés sur la base d'une dermatite atopique chez l'enfant. La moitié des enfants présentait un asthme associé et 30% une rhino-conjonctivite. Un tiers des parents présentait une dermatite atopique, 12% un asthme et 11% une rhino-conjonctivite allergique. Dans la première cohorte, l'allèle A en position rs2907749 et l'allèle T en position rs2075822 étaient associés avec un taux d'IgE augmenté (OR=1,3). Le risque était augmenté en cas d'homozygotie aux locus rs2907748, rs2907749, rs2075822 avec des OR variant de 1,63 à 3,23. Dans cette même cohorte, les homozygotes en position rs2736726, rs2075817 semblaient protégés de la dermatite atopique (OR=0,4). L'un des haplotypes analysés était protecteur d'un taux élevé d'IgE (OR=0,5), tandis qu'un autre était protecteur pour la dermatite atopique (OR=0,2). Ce dernier résultat était confirmé dans la seconde cohorte et confirmait l'analyse polymorphisme par polymorphisme décrite plus haut. Enfin dans la cohorte familiale, 7 des 11 polymorphismes testés étaient associés au taux d'IgE selon un modèle quantitatif. La dermatite atopique et l'asthme étaient associés à la transmission de l'allèle C en position rs2907748 et de l'allèle T en position rs2075822 (Weidinger et al., 2005b).

Eder et al. ont également centré leur étude sur les polymorphismes du gène NOD1. Sept polymorphismes ont été testés chez 668 enfants originaires d'Autriche et d'Allemagne. Cette étude évaluait l'association entre les symptômes respiratoires de l'atopie chez des enfants en milieu rural vivant ou non dans des fermes et un terrain génétique prédisposant. Les enfants vivant dans une ferme présentaient moins d'asthme, de rhinite saisonnière ou de rhinoconjonctivite et moins de sensibilisation aux pneumallergènes. Seul l'un des polymorphismes éudiés (rs2075817) était significativement associé avec les paramètres de l'atopie. En effet, les enfants porteurs de l'allèle majoritaire de ce polymorphisme et vivant dans une ferme étaient particulièrement protégés contre l'apparition d'une sensibilisation à certains pneumallergènes, d'une rhinite allergique ou d'un asthme. Il s'agit de la première étude démontrant l'influence de l'environnement sur un terrain génétique prédisposé (Eder et al., 2006).

Macaluso et al. ont étudié les polymorphismes de 7 gènes de la famille des NLR parmi lesquels les gènes NOD1 et NOD2 chez 392 patients atteints spécifiquement de dermatite atopique et 297 contrôles d'origine allemande. Le polymorphisme R702W (rs2066844) à l'état hétérozygote semblait associé avec la dermatite atopique (OR=1,98), cependant la différence n'était plus significative après correction de Bonferroni. Un haplotype rare pour les polymorphismes testés du gène NOD1 était associé à la dermatite atopique (Macaluso et al., 2007).

Enfin, plus récemment, Reijmerinck et al. ont étudié 169 SNP localisés sur 29 gènes impliqués dans la voie TLR, parmi lesquels les gènes NOD1 et NOD2 chez 3062 enfants néerlandais. Ces auteurs ont montré l'association du gène NOD2 avec le taux d'IgE en fonction de l'âge. Ils ont également montré l'association du gène NOD1 avec le taux d'IgE spécifiques pour le lait et l'œuf chez les enfants âgés de 1 à 2 ans. En outre, au cours de l'analyse multifactorielle, le polymorphisme rs2075818 du gène NOD1 était associé avec l'un des polymorphismes du gène IL1RL1 et un taux d'IgE élevé chez les enfants entre 6 et 8 ans. Le polymorphisme rs2907749 du gène NOD1 était associé avec 2 polymorphismes des gènes IRAK1 et MAP3K7IP1 à l'asthme chez les enfants entre 6 et 8 ans (Reijmerink et al., 2010).

Au total, l'association entre les polymorphismes des gènes NOD1 et NOD2 et les différents items de l'atopie n'a été évalué que dans des populations caucasiennes, européennes. En fonction des polymorphismes étudiés, les associations sont variables, avec des OR souvent faibles. Le tableau I.C.1 récapitule les associations décrites pour les polymorphismes évalués dans notre étude.

Tableau I.C.1 : Associations entre les polymorphismes étudiés et les items de l'atopie.

Polymorphisme	Associations	Références
rs2066844	DA	Macaluso, 2007
rs2066845	Rhinite allergique et DA	Kabesch, 2003
	IgE	Weidinger, 2005a
rs5743293	Atopie et IgE	Kabesch, 2003
rs2907749	IgE	Weidinger, 2005b
		Hysi, 2005
	Asthme	Hysi, 2005
		Reijmerink, 2010

Nous avons choisi d'évaluer les 3 polymorphismes du gène NOD2 classiquement associés à la maladie de Crohn : rs2066844 (p.R702W c.C2104T), rs2066845 (p.G908R c.G2722C), rs5743293 (p.L1007fs c.3020insC), en raison

i. de l'association montrée entre ces polymorphismes et certains items de l'atopie et en particulier le taux d'IgE
ii. du lien débattu entre atopie et hypersensibilités aux bétalactamines
iii. du rôle de Nod2 démontré dans l'apoptose kératinocytaire et dans l'induction d'une inflammation à éosinophiles, ces mécanismes physiopathologiques pouvant être en cause dans les hypersensibilités aux bétalactamines
iv. de l'utilisation des bétalactamines dans le traitement d'infections bactériennes
v. du rôle de Nod2 dans les mécanismes de défense antibactériens.

Le choix du polymorphisme du gène NOD1 (rs2907749, c.T2453+16C) a été dicté par les mêmes raisons que pour les polymorphismes testés du gène NOD2 mais également en raison de l'interaction entre ces 2 gènes et par la fréquence allélique de ce polymorphisme.
Ces gènes n'avaient pas été testés jusque là dans une cohorte de patients ayant présenté une hypersensibilité médicamenteuse.

Il s'agit ici d'un choix *a priori* de gènes candidats sur la base d'arguments physiopathologiques et de données de la littérature qui ne donnent qu'une vision partielle du terrain de cette pathologique multigénique. De plus, les fréquences alléliques de ces polymorphismes, étant donné la taille de la cohorte étudié, risquaient de prendre en défaut les analyses statistiques. Toutefois, les cohortes d'hypersensibilité aux bétalactamines étudiées ici étaient parmi les plus conséquentes au regard des données de la littérature. En outre, il s'agit de l'une des rares études portant à la fois sur des hypersensibilités immédiates et retardées avec un nombre comparable de sujets dans ces 2 types d'hypersensibilité.

b. Polymorphismes cytokiniques

Il s'agit ici également d'une étude par approche de gènes candidats. Cette étude a été conçue par le Dr Isabelle Gastin et le Professeur Annick Barbaud. Ce projet a fait l'objet d'un PHRC déposé en 2005 et ayant débuté en 2006.
Le choix des polymorphismes testés (gènes codant pour IL1 et IL1 RN, IL5, IL16, et TNFα) reposait sur les données de physiopathologie des toxidermies, le rôle des cytokines en tant que modulateurs de la réponse immunologique, allergique à un médicament.

En effet, l'origine immunologique de ces accidents médicamenteux était démontrée par :
- la réapparition accélérée de la réaction en cas de réintroduction médicamenteuse
- la mise en évidence d'une réactivité lymphocytaire T spécifique du médicament imputable (Gennis et al., 1991 ; Jonhson-Reagan et al., 2003 ; Pichler, 2005 ; Yawalkar et al., 2000).
L'EMP était décrit comme une hypersensibilité cellulaire retardée avec un rôle central des lymphocytes T. Ces lymphocytes T avaient pu être caractérisés, CD4+ dans le derme et CD45+ et CD8+ à la jonction dermo-épidermique (Demoly et al., 2003 ; Pichler, 2005).
La réponse immunitaire à un allergène donné pouvait être, chez un patient donné, soit liée à la production de clones T exprimant un récepteur de faible affinité associé à la production de cytokines en faible quantité, soit liée à la production de clones T exprimant un récepteur de haute affinité et la production importante de cytokines de profil Th2, IL4, IL5 (Britschgi et al., 2001 ; Pichler, 2003).
D'autres clones cellulaires T, CD4 ou rarement CD8 associés à un réponse de type Th1 avec production d'IFNγ avaient également été mis en évidence (Mauri-Hellweg et al., 1995 ; Zanni et al., 1997 ; Zanni et al., 1998).
Les cytokines de profil Th2 étaient retrouvées en cas de réactions immédiates et celles de profil Th1 étaient retrouvées dans les réactions retardées à la phase aigüe de l'accident médicamenteux. Cependant, l'association de réponses Th1 et Th2 était suspectée dans l'EMP, notamment lors de la constatation de tests épicutanés positifs de façon immédiate ou retardée dans ces toxidermies (Barbaud et al., 1998).
Enfin, par analogie avec la dermatite atopique, qui associe à la fois des réactions immédiates et retardées, l'implication de l'IL1 et du TNFα pouvait être suspectée dans ces hypersensibilités médicamenteuses (Westphal et al., 2003).

Au moment du dépôt de ce projet, aucune étude sur des polymorphismes génétiques de cytokines dans des hypersensibilités médicamenteuses n'avait été publiée.
Le nombre de polymorphismes testés a été augmenté en fonction des données de la littérature : ajout de polymorphismes des gènes codant pour l'IL2, l'IL4 et l'IL10.

A la différence des autres études réalisées sur le terrain génétique des hypersensibilités médicamenteuses, cette étude ne s'est pas centrée sur un type d'hypersensibilité donnée à un médicament donné mais a pris en compte des patients atteints de toxidermies immédiates ou retardées, de gravité variables et attribuées à de multiples médicaments. De plus, cette étude a testé un grand nombre de polymorphismes. En outre, il s'agit d'une des rares études françaises sur le sujet, or l'origine ethnique des patients module considérablement le terrain génétique.

Ainsi, cette étude devait permettre d'identifier des marqueurs génétiques impliqués

i. dans les accidents médicamenteux de manière générale (mécanisme commun)
ii. dans un type d'hypersensibilité donné permettant d'expliquer pourquoi une molécule n'est pas spécifique d'un accident.

2. Approche pangénomique

Contrairement aux approches par gènes candidats, il s'agit ici de rechercher des gènes cibles, sans *a priori*. En effet, au regard des données de la littérature, il apparaît clairement que les toxidermies, si elles sont génétiquement déterminées, sont des pathologies multigéniques. A ce jour, l'approche par gènes candidats à évaluer des groupages HLA, des polymorphismes de gènes codant pour des enzymes métabolisant les médicaments ou des cytokines modulant la réponse immunitaire à l'origine de ces accidents médicamenteux.

Si des associations fortes témoignant du risque de développer un type de toxidermie à une molécule ont pu être mis en évidence, l'ensemble des accidents médicamenteux n'est pas expliqué par ces facteurs de risque. D'autres gènes de susceptibilité restent à découvrir. Il existe probablement des facteurs communs à la survenue de ces hypersensibilités, aujourd'hui inconnus ; ce d'autant que les mécanismes immunologiques diffèrent peu en dehors de leur intensité, notamment entre 2 types d'hypersensibilités retardées, par exemple.

En outre, Nelson avait montré, en 2009, qu'une étude pangénomique était intéressante dans ce type de situation pour évaluer un large panel de gènes candidats ou pour en découvrir de nouveaux. Habituellement, cette approche pangénomique basée sur l'étude de SNP est réservée aux larges populations cas-témoins en raison de la taille des polymorphismes étudiés et de leur fréquence dans la population générale. Or, le caractère rare des accidents médicamenteux, ne permettant pas l'inclusion de très larges cohortes de patients, devrait limiter l'application de ces technologies aux hypersensibilités médicamenteuses. Pourtant, ces auteurs ont démontré que l'approche SNP pangénomique aurait permis l'identification de ces gènes de susceptibilité forte en testant 15 cas et 200 témoins. Le nombre de cas nécessaire pour démontrer une association varie bien sûr en fonction de l'effet du gène de susceptibilité : si l'OR est de 5, le nombre de cas nécessaire est de 150, tandis que pour un OR supérieur à 1000, ce nombre sera réduit à 9, en cas de génotype homozygote. Ils ont ensuite confirmé ceci par l'analyse de 22 patients ayant présenté une hypersensibilité à l'abacavir versus 203 témoins à l'aide d'une puce SNP Affymetrix de 500K. Six des 10 SNP les plus significatifs ont été confirmés par PCR chez les 22 cas, les 150 cas supplémentaires et les 175 patients tolérant l'abacavir. Quatre d'entre eux avaient des résultats discordants entre la technique Affymetrix et la seconde. Parmi les 39 marqueurs avec un seuil de significativité inférieur à 2×10^{-5}, 5 étaient localisés dans la région HLA du chromosome 6. L'analyse de cas et de

contrôles supplémentaires pour les marqueurs de cette région permettait de retenir un marqueur associé avec l'hypersensibilité à l'abacavir, rs2394999, en déséquilibre de liaison avec HLA-B*5701. Une analyse séquentielle de 5, 10, 15, 20 puis 22 cas d'hypersensibilité à l'abacavir permettait d'aboutir à la même conclusion dès l'analyse de 15 cas. L'importance d'une validation des résultats et d'une sélection rigoureuse des cas et de la population contrôle était soulignée (Nelson et al., 2009).

Depuis, Ozeki et al. ont utilisé cette technologie pour évaluer 55 cas de toxidermies sévères à la carbamazépine et 882 sujets contrôles. Ils ont ainsi pu identifier 12 SNP associés à ces toxidermies à la carbamazépine. Ces SNP étant localisés dans une région de 436 kb au locus 6p21.33 en déséquilibre de liaison avec le locus HLA-A, les auteurs ont génotypé les allèles HLA-A chez 61 cas et 376 patients tolérant la carbamazépine. Ceci a permis l'identification du locus HLA-A*3101 associé avec les hypersensibilités étudiées avec un OR de 10,8 tandis que HLA-A*0206 était protecteur de ces hypersensibilités (OR=0,1). Seul le premier résultat a pu être répliqué chez 16 nouveaux cas et 44 patients tolérants (Ozeki et al., 2011).

Génin et al. ont étudié le terrain génétique de patients ayant présenté un SSJ ou NET à l'aide d'une puce SNP Illumina. Après la réalisation des contrôles qualité, 268 914 SNP autosomiques génotypés chez 424 cas (200 SSJ, 78 NET et 146 phénotypes intermédiaires) et 1881 contrôles ont pu être analysés. Six SNP localisés sur le chromosome 6 dans la région du CMH étaient significativement associés avec les cas de toxidermie grave. Un haplotype (CACGAC) était associé avec le risque de toxidermie (OR=2,84, IC : 2,03-3,98). Cet haplotype avait une association plus forte avec le risque de toxidermie à l'allopurinol (OR=7,77, IC : 4,66-12,98), ce qui tendrait à confirmer les associations spécifiques entre certains marqueurs génétiques et un type de toxidermie à une molécule donnée (Génin et al., 2011).

Plus récemment, Shen et al. ont appliqué cette technologie à l'étude de 77 cas de syndromes de Steven-Jonhson et Lyell à de multiples médicaments et de 198 contrôles afin d'identifier un facteur de risque commun à ce type de toxidermie. Le nombre de SNP et CNV étudiés était 2 fois plus important que lors de l'étude de Nelson et al. (Nelson et al., 2009) : 1 million. Quelques cas supplémentaires (19) ont été testés à l'aide d'une autre puce 1 million. Pour l'analyse, 72 cas et 162 contrôles ont été retenus. Un SNP (rs6016348), localisé sur le chromosome 20, était identifié au cours de l'analyse avec un OR égal à 2,0 (IC 95% : 1,9-4,6).

Une seconde analyse avec un nombre plus important de témoins a été réalisée permettant d'identifier le SNP rs1737412 (OR=4,0) localisé sur le chromosome 7, intronique d'un gène putatif chez les patients originaires d'Europe du nord-ouest mais pas chez les européens du sud. L'analyse des cas secondaires à la prise de lamotrigine permettait d'identifier un SNP (rs12019361) intronique du gène ADAM22 impliqué dans l'épilepsie. L'analyse des CNV ne permettait pas d'identifier d'association significative. Toutefois, elle suggérait l'implication de régions géniques contenant notamment le gène PREX1 impliqué dans la régulation du signal inflammatoire chez la souris et le gène LAMP1 codant pour un marqueur des lymphocytes CD8+ et des cellules mastocytaires cutanées activées. Au total, les auteurs n'ont pas retenu de variant associé à la population étudiée (Shen et al., 2012).

Ces outils, bien que prometteurs, n'ont à ce jour pas permis d'identifier réellement de nouveau gènes candidats.

Les puces CNV s'intéressent à des variations de plus grande taille que les puces SNP. Elles s'adressent non pas à l'étude de larges populations mais à l'étude de plus faibles cohortes. Elles ont démontré leur intérêt à la fois dans le cas de maladies mono ou multigéniques. Contrairement aux puces SNP, il n'est pas nécessaire de constituer une large population contrôle puisque chaque patient est hybridé contre un témoin de même sexe. L'analyse fait ensuite appel à des comparaisons entre les patients étudiés et à l'aide des bases de données en ligne.

Cet outil nous semblait donc être original et intéressant pour l'exploration d'une toxidermie rare telle que le DRESS syndrome.

Dans le but d'identifier des gènes candidats spécifiques de cette toxidermie et non d'une molécule, nous avons choisi de sélectionner uniquement des patients atteints de DRESS. Afin d'homogénéiser au maximum la population étudiée, nous n'avons retenu que des patients ayant un score de probabilité élevé de DRESS.

Au cours de l'analyse, nous avons utilisé des critères spécifiques (détaillés au chapitre « méthodes d'analyse »).

Cependant, la difficulté de l'analyse tient principalement au fait que

i. les données générées par ces techniques sont très nombreuses
ii. il n'y pas d'analyse statistique comparant les données obtenues chez les patients à celles obtenues chez des témoins
iii. les bases de données sont alimentées par des études CNV variées effectuées à l'aide de différentes puces (de densité variable, par exemple). Les bornes des variations identifiées ne sont donc que très rarement strictement concordantes.

Patients, Matériels et Méthodes

A. Patients

1. Hypersensibilités aux bétalactamines

Nous avons recruté prospectivement 210 patients avec un antécédent d'allergie immédiate (moins d'1 h après la prise médicamenteuse) à au moins une bétalatamine et 158 patients avec un antécédent d'allergie retardée (>1h après la prise médicamenteuse) à au moins une bétalactamine suivi dans le même service. Cette population a été recrutée entre janvier 1995 et juin 2003 dans l'unité d'allergologie de C.I. Columbus (Rome, Italie) et Oasi Maria S.S. (Troina, Italie). Les patients avaient présenté une réaction allergique à une pénicilline ou une céphalosporine et présenté une allergie immédiate ou retardée diagnostiquée sur la base de tests cutanées et/ou d'IgE spécifiques. Les caractéristiques cliniques et biologiques des patients sont résumées dans le tableau II.A.1. L'étude avait été approuvée par le comité local d'éthique. Tous les participants avaient reçu une information éclairée sur le risque des tests allergologiques et donné un consentement écrit à la réalisation de l'étude (Guéant-Rodriguez et al., 2006 ; Guéant-Rodriguez et al., 2008).

Le groupe témoin était constitué de 368 volontaires appariés en âge et en sexe, recrutés dans une consultation de médecine préventive à Rome (Italie), en l'absence d'antécédent personnel ou familial d'allergie, y compris les allergies médicamenteuses (immédiate ou non), de maladies respiratoires ou dermatologiques. De plus, tous les patients ayant une protéine C réactive supérieure à 5 mg/L étaient exclus.

L'ensemble des témoins et patients était d'origine caucasienne.

Tableau II.A.1 : Caractéristiques cliniques et biologiques des contrôles et patients avec allergie aux bétalactamines, en Italie

Caractéristiques	Allergie Immédiate aux bétalactamines (AIB) n=210	Allergie Retardée aux bétalactamines (ARB) n=158	Allergie aux bétalactamines (ABL) n=368	Contrôles n=368	p ABL vs contrôles	p AIB vs contrôles	p ARB vs contrôles
	n (%, 95% I.C.)	n (%, 95% I.C.)	N (%, 95% I.C.)	n (%, 95% I.C.)			
Age	40 (24-55)	41 (28-53)	42 (26-55)	44 (28-59)	0,258	0,282	0,441
Femmes	144 (68,6, 62,2-74,9)	115 (72,3, 64,9-8,7)	144 (68,6, 62,2-74,9)	242 (65,6, 61,1-70,8)	0,248	0,531	0,149
Intervalle de temps (mois)	6 (2-18)	24 (6-108)	12 (3-60)	NA	NA	NA	NA
Antécédent personnel atopie	57 (27,1, 21,6-33,5)	47 (29,6, 23,0-37,0)	102 (27,8, 23,1-32,4)	0			
Antécédent familial atopie	69 (33,9, 26,5-39,3)	68 (42,7, 59,5-69,9)	120 (32,8)	0			
Taux sérique d'IgE total	263,2 ± 341,3	82,31 ± 10,5	20,2 ± 18,4	31,7 ± 2,4	<0,001	<0,001	<0,001
IgE >100kUI/l	109 (49,3, 42,4-56,1)	38 (24,6, 17,8-31,5)	147 (35,5, 35,3-45,7)	16 (8,1, 4,3-11,9)	<0,001	<0,001	<0,001
Allergie à une pénicilline	123 (59,0, 52,3-65,5)	153 (91,1, 86,7-95,5)	276 (75,0, 70,5-79,4)	0			
Allergie à une céphalosporine	87 (41,0, 34,5-47,7)	5 (3,1, 0,4-5,9)	92 (25,0, 20,5-29,4)	0			
Test cutané, positif à							
Médicament suspect*	144 (78,3, 72,2-84,2)	143 (96,6, 92,3-8,5)	287 (78,2, 73,9-82,4)	NA	NA	NA	NA
Penicilloyl polylysine	55 (26,2, 20,2-32,2)	6 (3,8, 1,8-8,0)	61 (16,6, 12,8-20,4)	NA	NA	NA	NA
Minor determinant mixture	53 (25,2, 19,3-31,2)	16 (10,0, 6,3-15,7)	69 (18,8, 14,8-22,8)	NA	NA	NA	NA
Benzylpénicilline	56 (26,7, 20,6-32,6)	75 (47,2, 39,5-54,9)	131 (35,7, 30,8-40,6)	NA	NA	NA	NA
Ampicilline	76 (36,2, 29,6-42,7)	151 (95,6, 91,1-7,8)	227 (61,9, 56,9-66,8)	NA	NA	NA	NA
Amoxicilline	75 (35,7, 29,2-42,2)	151 (95,6, 91,1-7,8)	227 (61,9, 56,9-66,8)	NA	NA	NA	NA

NA : non applicable.

* Réalisé chez 184 patients avec allergie immédiate aux bétalactamines.

Une étude de réplication a été réalisée dans le sud de l'Espagne incluant 387 cas avec une allergie immédiate et 326 contrôles (tableau II.A.2). Les critères d'inclusion étaient les mêmes que ceux utilisés pour la cohorte italienne (Cornejo-Garcia et al., 2012).

Tableau II.A.2 : Caractéristiques cliniques et biologiques des contrôles et patients avec allergie aux bétalactamines, en Espagne.

Caractéristiques	Allergie aux bétalactamines (ABL) n=387 N (%, 95% I.C.)	Contrôles n=326 n (%, 95% I.C.)	p ABL vs contrôles
Age	49 (37-57)	43 (33-53)	0,258
Femmes	208 (56,9, 51,9-62,1)	198 (60,2, 54,8-65,5)	0,394
Intervalle de temps (mois)	5 (2-10)	NA	NA
Antécédent personnel atopie	52 (14,3, 10,6-17,9)	39 (11,9, 8,3-15,3)	0,344
Taux sérique d'IgE total	195,2 ± 21,8	123,0 ± 13,9	<0,001
IgE >100kUI/l	115 (49,8, 43,3-56,2)	82 (25,3, 20,4-29,9)	<0,001
Allergie à une pénicilline	343 (93,9, 91,5-96,4)	0	
Allergie à une céphalosporine	22 (6,1, 3,6-8,4)	0	

NA : non applicable.

Les tests allergologiques étaient réalisés dans les 2 études conformément aux recommandations du groupe ENDA (European Network for Drug Allergy) (Torres et al., 2003 ; Romano et al., 2004). L'atopie était définie par un taux d'IgE totale >100 kUI/l et un antécédent personnel d'allergie (asthme, rhinite ou dermatite atopique).

2. Toxidermie médicamenteuse, cohorte française

Nous avons réalisé une étude cas témoin unicentrique entre novembre 2006 et décembre 2011 pour évaluer les polymorphismes des gènes codant pour diverses cytokines chez des patients ayant présenté une toxidermie.

Au total, 118 patients ont été inclus prospectivement. Les critères d'inclusion étaient les suivants : (i) un âge supérieur à 18 ans, (ii) un antécédent de toxidermie dont le diagnostic avait été établi par un dermatologue (urticaire, EMP ou DRESS), (iii) une toxidermie de type urticaire avec ou sans angioedème, un exantème maculo-papuleux secondaires à une prise médicamenteuse ou un médicament récemment introduit ou associés à des tests cutanés positifs ou un DRESS avec un score de Kardaun plausible (≥ 4) et (iv) une chronologie médicamenteuse détaillée et compatible avec le diagnostic de toxidermie (Kardaun et al., 2007).

Nous avons également inclus 236 volontaires sains incluant 132 sujets examinés dans le cadre d'une visite de contrôle du Centre de Médecine Préventive locale et 104 patients adressés pour une coronarographie dont le résultat était normal (Guéant-Rodriguez et al., 2011). Aucun de ces sujets témoins n'avait d'antécédent d'accident médicamenteux ou d'hypersensibilité, de maladie inflammatoire ou auto-immune.

Cette étude était approuvée par le comité d'éthique local (Comité de Protection des Personnes de Lorraine). Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées après obtention du consentement éclairé signé par chaque patient, en accord avec la déclaration d'Helsinki.

Chaque patient avait eu des tests cutanés selon les méthodes préalablement décrites (Barbaud, 2009 ; Brockow et al., 2002). En résumé, chaque patient avait des tests immuno-allergologiques au moins 6 semaines après la régression de la toxidermie. Les premiers tests réalisés étaient des patch tests puis, s'ils étaient négatifs, des pricks tests et des intradermoréactions étaient réalisés. Enfin, si l'ensemble des tests était négatif, un test de provocation orale ou de substitution était réalisé au cours d'une hospitalisation.

Les principales caractéristiques des patients et témoins sont mentionnées dans les tableaux II.A.3 et II.A.4.

Tableau II.A.3 : Caractéristiques cliniques des patients avec toxidermie médicamenteuse et des contrôles. EMP : exanthème maculopapuleux, DRESS : *Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms*, a : an, TPO : test de provocation orale.

		Patients avec toxidermie médicamenteuse			
	Contrôles	Tous cas confondus	EMP	Urticaire et angioedème	DRESS
Nombre	236	118	70	31	17
Age (a)	64,5 ± 12,0	58,7 ± 14,9	61,8 ± 14,3	53,6 ± 13	55,1 ± 17,6
Sexe					
Homme	163 (69,1)	45 (38,1)	35 (50,0)	4 (12,9)	6 (35,3)
Femme	73 (30,9)	73 (61,9)	35 (50,0)	27 (87,1)	11 (64,7)
Médicament suspect déterminé par					
Test cutané positif		82	53	16	13
TPO positif		9	3	6	-
1 médicament imputable		27	14	9	4
Classe médicamenteuse responsable					
Bétalactamine		34	20	10	4
Produit de contraste iodé		38	32	6	0
Pristinamycine		4	-	-	4
Vancomycine		3	-	-	3
Carbamazépine		3	-	-	3
Allopurinol		3	-	-	3
Aminoside		1	-	-	1
Minocycline		1	-	-	1
Corticostéroïdes		1	-	-	1
Autre classe		35	18	15	2

Tableau II.A.4 : Caractéristiques cliniques des patients ayant présenté un DRESS. ADP : adénopathies dans au moins 2 sites, NR : non réalisé, PAL : phosphatases alcalines, Tr : transaminases, Nl : normale, * : tests cutanés positifs.

	Sexe	Age	Eruption cutanée	Fièvre	ADP	Eosiniphilie max	Atteinte hépatique	Autre atteinte d'organe	Score DRESS	Réactivation virale	Médicament ou classe médicamenteuse suspect
1	H	56	+	+	+	4156	PAL x 1.5Nl		6	NR	Corticostéroides*
2	F	40	+	+		320 avec lymphopénie atypique	Tr x 4Nl		4	NR	Pristinamycine*
3	F	51	+	+	+	800			4	NR	Glycopeptide* et inhibiteurs de la pompe à protons*
4	F	75	+	+		7400	Tr x 1.5Nl	Insuffisance rénale	6	-	Ranélate de strontium, bétalactamine*
5	H	55	+	-	+	1400	Tr x 2Nl	Insuffisance rénale	5	-	Pristinamycine*
6	M	61	+	+	+	1310			4	EBV, HHV7	Bétalactamine*
7	F	69	+	+		1580	Tr x 15Nl, PAL x 3Nl	Insuffisance rénale	6	EBV, HHV6, HHV7	Allopurinol
8	F	63	+	+	+	1750			5	HHV7	Aminoside* et glycopeptide*
9	H	41	+	+	+	3020	Tr x 15Nl		6	EBV	Bétalactamine*
10	H	63	+	+	+		Tr x 6Nl, PAL x 2Nl		4	EBV, HHV7	Carbamazépine*
11	F	60	+	+		3570	Tr x 10Nl, PAL x 5Nl		5	NR	Carbamazépine*
12	F	47	+	+		742	PAL x 2.5Nl		4	IgM anti-CMV	Pristinamycine et macrolide (2 poussées)
13	F	91	+	+	+	2700	PAL x 2Nl	Insuffisance rénale	7	CMV, HHV6	Allopurinol
14	F	29	+	+	+	1040	PAL x 1.7Nl		5	HHV7	Bétalactamine*
15	H	18	+	+	+	2950	Tr x 9Nl, PAL x 4Nl	Péricardite	7	HHV6	Minocycline
16	F	71	+	-		3190	Tr x 8Nl		4	EBV	Carbamazépine*
17	F	46	+	+	+	2480	Tr x 4Nl, PAL x 3Nl		6	EBV, HHV7	Pristinamycine* et glycopeptide*

3. DRESS

Au cours de la précédente étude évaluant les polymorphismes cytokiniques chez des patients ayant présenté une toxidermie, 28 avaient présenté un DRESS. Nous avons sélectionné 18 d'entre eux ayant un score ≥ à 5 selon les critères de Kardaun (tableau II.A.5) (Kardaun et al., 2007). Cette étude était approuvée par le comité d'éthique local (Comité de Protection des Personnes de Lorraine). Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées après l'obtention du consentement éclairé signé par chaque patient, en accord avec la déclaration d'Helsinki.

Chaque patient avait eu des tests cutanés selon les méthodes préalablement décrites (Barbaud, 2009 ; Brockow et al., 2002). En résumé, chaque patient avait des tests immuno-allergologiques au moins 6 semaines après la régression de la toxidermie. Les premiers tests réalisés étaient des patch tests puis, s'ils étaient négatifs, des pricks tests voire des intradermoréactions étaient réalisés.

Les échantillons contrôles étaient constitués par 5 sujets témoins, 2 hommes et 3 femmes extraient avec la même technique. Ces ADN « de référence » étaient utilisés pour réaliser l'hybridation génomique comparative.

Tableau II.A.5 : Caractéristiques cliniques des patients DRESS. ADP : adénopathies dans au moins 2 sites, NR : non réalisé, PAL : phosphatases alcalines, Tr : transaminases, Nl : normale, * : tests cutanés positifs, Autre cause recherchée : anticorps anti-nucléaires, hémoculture, sérologies VHA, VHB, VHC, chlamydia/mycoplasme (au moins ¾ doivent être négatifs).

	Sexe	Age	Eruption cutanée	Fièvre	ADP	Eosiniphilie max	Atteinte hépatique	Autre atteinte d'organe	Autre cause recherchée	Score DRESS	Réactivation virale	Médicament ou classe médicamenteuse suspect	CGH control
1	H	56	+	+	+	4156	PAL x 1.5Nl		-	6	NR	Corticostéroides*	H1
2	F	40	+	+		320 avec lymphopénie atypique	Tr x 4Nl		-	5	NR	Pristinamycine*	F1
3	F	75	+	+		7400	Tr x 1.5Nl	Insuffisance rénale	-	6	-	Ranélate de strontium, bétalactamine*	F1
4	H	55	+	-	+	1400	Tr x 2Nl	Insuffisance rénale	-	5	-	Pristinamycine*	H1
5	F	69	+	+		1580	Tr x 15Nl, PAL x 3Nl	Insuffisance rénale	-	7	EBV, HHV6, HHV7	Allopurinol	F2
6	H	41	+	+	+	3020	Tr x 15Nl		-	7	EBV	Bétalactamine*	H2
7	H	63	+	+	+		Tr x 6Nl, PAL x 2Nl		-	5	EBV, HHV7	Carbamazépine*	H1
8	F	60	+	+		3570	Tr x 10Nl, PAL x 5Nl		-	6	NR	Carbamazépine*	F1
9	F	47	+	+		742	PAL x 2.5Nl		-	5	IgM anti-CMV	Pristinamycine et macrolide (2 poussées)	F1
10	F	91	+	+	+	2700	PAL x 2Nl	Insuffisance rénale	-	7	CMV, HHV6	Allopurinol	F1
11	F	29	+	+	+	1040	PAL x 1.7Nl		-	6	HHV7	Bétalactamine*	F1
12	H	18	+	+	+	2950	Tr x 9Nl, PAL x 4Nl	Péricardite	-	7	HHV6	Minocycline	H1
13	F	71	+	-		3190	Tr x 8Nl		-	5	EBV	Carbamazépine*	F1
14	F	46	+	+	+	2480	Tr x 4Nl, PAL x 3Nl		-	7	EBV, HHV7	Pristinamycine* et glycopeptide*	F2
15	F	23	+	+	+	1248	Tr x 4Nl, PAL x 2Nl		-	6	HHV6, HHV7	Salazopyrine	F2
16	F	31	+	+		6100	Tr x 2Nl		-	6	EBV, HHV6, HHV7	Inhibiteur de pompe à protons*	F3
17	F	65	+	-		4000	Tr x 2Nl	Insuffisance rénale	-	6	EBV	Bétalactamine* and quinolone*	F3
18	F	57	+	+	+	1400	Tr x 10Nl		-	7	EBV	Produit de contraste iodé*	F3

B. Matériels

1. Extraction d'ADN génomique

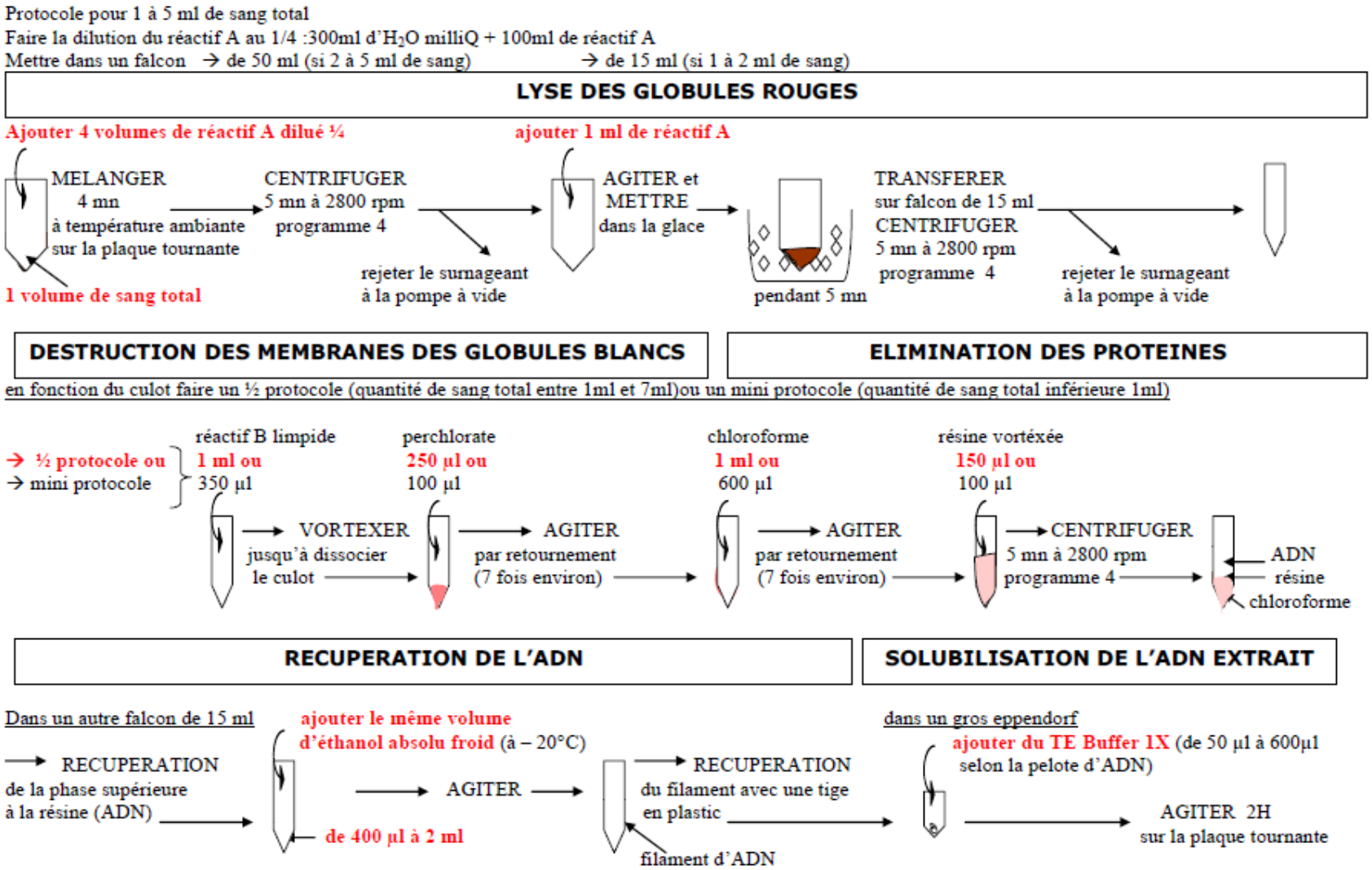
a. A partir de sérum

Pour les populations italiennes et espagnoles, l'ADN génomique a été extrait à partir de 200 µl de sérum grâce au kit d'extraction QIAmp *blood* mini kit (Quiagen, Courtaboeuf, France). Avant de commencer, un bain marie était mis à chauffer à 56°C. Dans un tube eppendrof, 40 µl de protéase étaient prélevés. On y ajoutait 400 µl de sérum à extraire. Le mélange était agité à l'aide d'un vortex pendant 15 s, puis on y ajoutait 400 µl de buffer AL avant d'agiter à nouveau 15 s et de placer le mélange au bain marie pendant 10 min. Après une brève centrifugation, on ajoutait 400 µl d'éthanol froid (-20°C). Le tout était à nouveau agité au vortex 15 s puis centrifugé brièvement. Le mélange était ensuite déposé sur une colonne placée elle-même au dessus d'un tube eppendorf de 2 ml et centrifugé pendant 1 min à 13000 rpm. Une fois le filtrat jeté, l'opération était renouvelée. On ajoutait ensuite 500 µl de buffer AW1 avant de centrifuger à nouveau 1 min à 13000 rpm. Le filtrat était jeté avant d'ajouter 500 µl de buffer AW2 puis de centrifuger à 2 reprises pendant 3 min à 13000 rpm. La colonne était ensuite placée sur un tube eppendorf de 1,5 ml. On ajoutait 40 µl de buffer AE et le mélange était laissé à température ambiante pendant 5 minutes pour incubation. Enfin, une centrifugation de 1 min à 13000 rpm permettait de récupérer l'ADN extrait.

b. A partir de sang total

Pour les populations françaises, l'ADN était extrait à partir d'une fraction de sang total enrichie en lymphocytes grâce au kit d'extraction NUCCLEON BAC3 (Amersham Pharmacia Biotech, Milan, Italie) conformément à la technique habituelle et aux instructions du fabriquant (fig. II.B.1).

Figure II.B.1 : Extraction d'ADN sur sang total.



c. Stockage de l'ADN extrait

L'ADN extrait était stocké à -20°C avant la réalisation des analyses génétiques. La concentration en ADN génomique était contrôlée au Nanodrop 1000 (Thermo scientific). Les courbes d'absorption étaient analysées. L'intégrité et la qualité de l'ADN génomique (200 ng) étaient vérifiées à l'aide du profil de migration électrophorétique sur gel d'agarose 2%.

2. Génotypage des polymorphismes des gènes NOD1 et NOD2

a. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

Le génotypage de 3 polymorphismes du gène NOD2 (rs2066844 (p.R702W c.C2104T), rs2066845 (p.G908R c.G2722C), rs5743293 (p.L1007fs c.3020insC)) et 1 polymorphisme du gène NOD1 (rs2907749, c.T2453+16C) a été réalisé par la technique de réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (PCR) (Roche, Molecular Biochemichal, Lyon, France). Les sondes fluorescentes étaient marquées à l'extrémité 3' par la fluorescéine (Flu) et à l'extrémité 5' par le LC-red-640 (LC). Les sondes couvraient les sites mutés et étaient modifiées à leur extrémité 3' par une phosphorylation pour éviter le phénomène d'élongation (Tib MolBiol Syntherselabor GmbH, Berlin, Allemagne). Les paires d'amorces s'hybridaient avec l'ADN test avec un espace d'1pb entre elles. La PCR était réalisée avec un mix de 10 µl dans les capillaires en verre du Light-cycler excepté pour l'un des polymorphismes, rs2066844 qui nécessitait un mix de 20 µl. Le mix de réaction comportait 2 µl (4 µl pour le polymorphisme rs2066844) de *Light-Cycler DNA Master Hybridization Probes* (*Fast-start Taq DNA polymerase*, *reaction buffer*, dNTP *mixture* et 10 mM de MgCl2 ; Roche Molecular Biochemicals). Les amorces de PCR étaient ajoutées au mix de réaction à la concentration de 0,5 µM, de même que les sondes marquées à la fluorescéine et au LC-r*ed* à la concentration de 0,2 µM. Deux microlitres (1 µl pour le polymorphisme rs2066844) de solution d'ADN (20 ng/µl) et du *water PCR grade* étaient ajoutés au mix pour obtenir un volume final de 10 µl (20 µl pour le polymorphisme rs2066844). Les amorces de PCR et les sondes Flu et LC sont détaillées dans le tableau II.B.1. Les étapes des cycles thermiques se déroulaient comme suit : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min puis 45 cycles de dénaturation à 95°C pendant 10 s, hybridation à 60°C pendant 10 s et extension à 72°C pendant 10 s. L'augmentation de la température était fixée à 4,4°/s. Une fois l'amplification achevée, les courbes de fusion étaient obtenues en maintenant à 95°C pendant 30s puis à 40°C pendant 60 s avec une décroissance lente de la température de 2,2°C/s jusqu'à 85°C avec captation de la fluorescence à 640 nm. Les courbes de fusion étaient converties en pic de fusion en traçant la dérivée négative de la fluorescence contre la température (dF/dT).

Tableau II.B.1: liste des amorces de PCR, sondes Flu et LC utilisées pour le génotypage des polymorphismes des gènes NOD1 et NOD2

Polymorphisme	rs2066844	rs2066845	rs5743293	rs2907749
Amorce sens	5'AGCCGCACAACCTTCAGATCAC3'	5'GGGAGGAGGACTGTTAGTTCAT3'	5'TCTTCTTTTCCAGGTTGTCCAA3'	5'CTGGGAAAAAACAAAATAACAAGTG3'
Amorce anti-sens	5'GGTGCAGCTGGCGGGAT3'	5'CTGATCTCCCCAAGAAAACTG3'	5'AAAAACTGAGGTTCGGAGAGCTAA3'	5'CGAGCCCCAGTGGTCCT3'
Sonde Flu	5'CCCTGCTCCGGCGCC3'	5'CCACTCTGTTGCCCCAGAA3'	5'AGGCCCCTTGAAAGGAATGAC3'	5'GTACCACATACATCCATCCCCTTC3'
Sonde Red	5'GGCCTGTGCCCGCTGGTGTCT3'	5'CTGAAAAGGCCAAAAGAGTCAACAGACA3'	5'CCATCCTGGAAGTCTGGTAAGGCC3'	5'CTCACCCAACCTCAGAGATTGATTTGCT3'

b. Immunochip

Le génotypage des 3 polymorphismes de NOD2, rs2066844, rs2066845 et rs5743293 pour la cohorte de patients espagnols était réalisé à l'aide d'une puce SNP Immunochip dédiée (Illumina® France Holding, Paris, France). Cette puce prête à l'emploi contient environ 200 000 SNP choisis par un groupe d'experts sur le thème de l'immunologie. Cette technologie permet d'hybrider 12 patients par lame.

La technique se déroule en plusieurs étapes (fig. II.B.2).

Etape 1 : amplification de l'ADN génomique.

Etape 2 : fragmentation enzymatique de l'ADN.

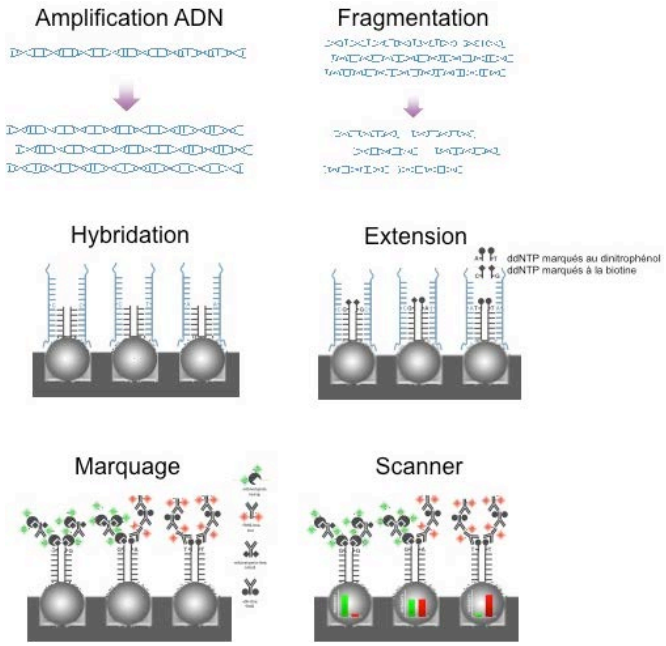
Etape 3 : hybridation sur les puces. C'est au cours de cette étape que l'ADN fragmenté et remis en suspension est déposé sur les « *beadchips* » puis déposé dans les chambres d'hybridation. L'hybridation a lieu dans un four dédié, à 48°C pendant 16 à 24 h.

Etape 4 : Lavage des puces. Deux étapes successives de lavage sont réalisées avec la même solution.

Etape 5 : Extension et marquage. Seules les amorces hybridées sont soumises à l'extension par incorporation de nucléotides marqués.

Etape 6 : lecture des puces pour analyse des données.

Figure II.B.2 : Principe de réalisation d'une puce Illumina.

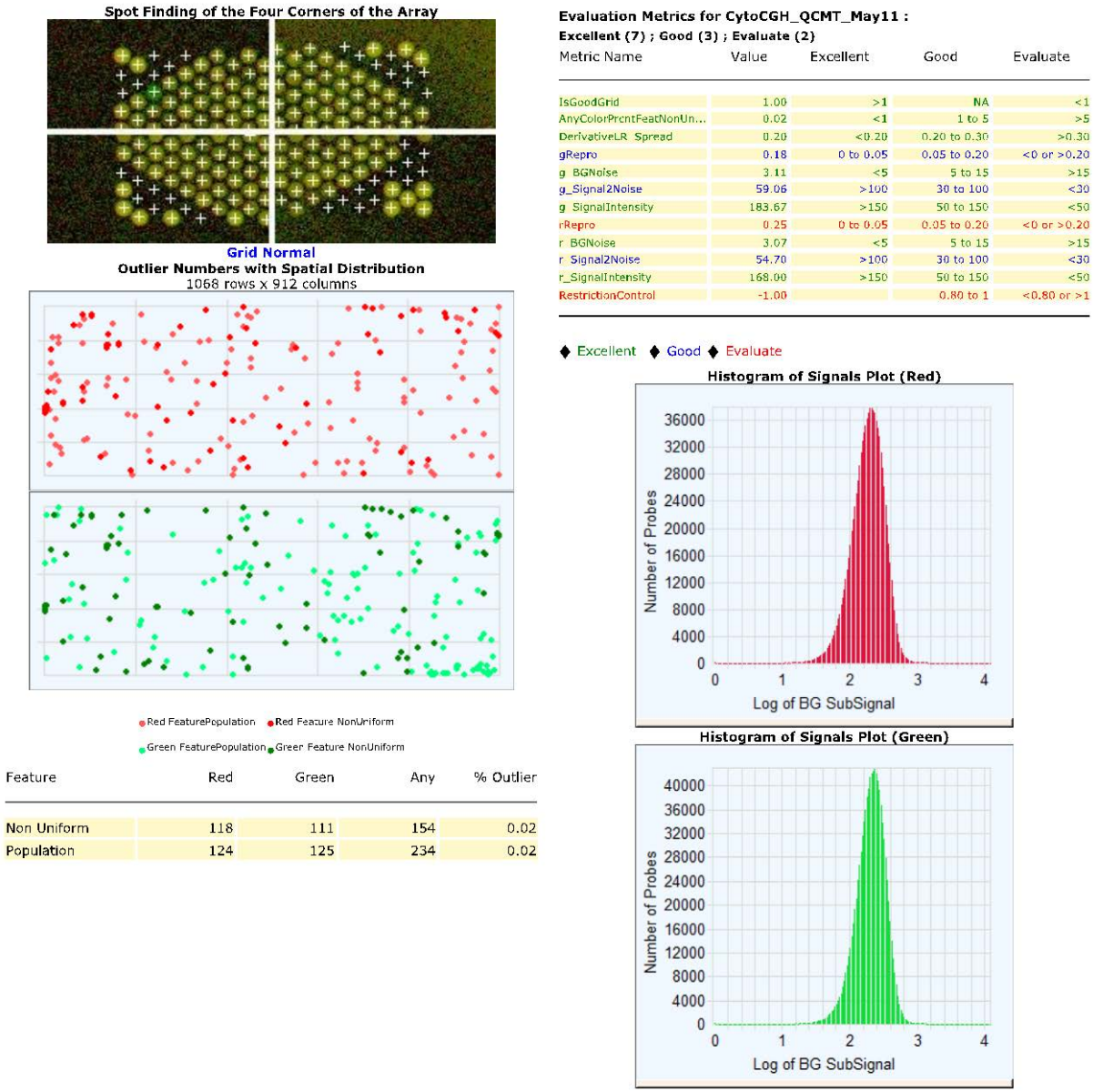


3. Hybridation Comparative Génomique

L'hybridation comparative génomique (CGH) a été réalisée sur des puces à ADN 1M Agilent (Agilent technologies France SAS, Les Ulis, France). Chacune des puces ou microréseaux contient 923 029 oligonucléotides de 60 paires de bases (pb) synthétisés *in situ* et couvrant l'ensemble du génome, régions codantes et non-codantes incluses. La résolution est estimée à 2,1 kb en moyenne (1,8 kb dans les régions géniques). Le marquage et l'hybridation des ADN ont été réalisés conformément aux instructions du fournisseur (fig. II.B.3). En résumé, une digestion enzymatique de 3 µg d'ADN génomique avec 5U d'AluI et 5U de RsaI (Proméga, Charbonnières, France) a été effectuée. Pour ce faire, les ADN des patients étaient placés en présence des enzymes de digestion et mélangés à 2 µl d'eau sans nucléase, à 2,6 µl de tampon 10X et à 0,2 µl de BSA acétylé à 37°C pendant 2h, puis à 65°C pendant 20 minutes afin d'inactiver les enzymes. Le marquage des ADN a été réalisé à l'aide de la technique de *random priming* au cours d'un bain marie à 37°C pendant 2 h comportant 5 µl de primers, 3µl de cyanine 5 ou 3 (à 1mM)), 10 µl de tampon 5X, 5 µl de dNTP 10X et 1 µl de fragment exo-kleenow (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France). Les ADN des patients étaient marqués en cyanine 5 (Cy5) et les témoins en cyanine 3 (Cy3). La purification des échantillons marqués a été effectuée sur colonnes Microcon YM30 (Milipore, Molsheim, France). Le contrôle du taux d'incorporation des cyanines par mesure de l'activité spécifique et le dosage des ADN était réalisé par spectrométrie au Nanodrop ND-100 (Thermo scientific, Courtaboeuf, France). L'activité spécifique devait être inférieure à 45 pmol/µg pour garantir une hybridation ultérieure de qualité. La pré-hybridation était réalisée à l'aide du kit de pré-hybridation fourni par Agilent. Ainsi, l'ADN génomique marqué et purifié était mélangé à 50 µl d'ADN cot-1, 52 µl d'agent bloquant 10X et 260 µl de tampon d'hybridation 2X puis dénaturé pendant 3 minutes à 95°C avant d'être placé au bain marie à 37°C pendant 30 minutes. L'hybridation a été réalisée sur microréseaux 1M dans une chambre d'hybridation SureHyb placée dans un four dédié à 65°C pendant 40 h. Le lavage des lames a été ensuite réalisé conformément aux recommandations du fournisseur. Les étapes de marquage, purification, hybridation et lavage des lames ont été réalisées dans un caisson anti-ozone. Puis les lames ont été scannées dans le scanner DNA microarray (Agilent technologies) et analysées avec le logiciel *Feature Extraction 9.1* (fig.II.B.4). La visualisation des déséquilibres génomiques était réalisée grâce au logiciel *CGH analytics 3.5* (Agilent technologies) à l'aide d'une construction du génome hg18 (UCSC university of Santa Cruz

California, USA) pour les lames hybridées fin 2012 et hg19 pour les lames hybridées en 2013. Pour chaque oligonucléotide, un ratio Cy5/Cy3 a été calculé. La normalisation des données a été réalisée selon la méthode ADM2, avec un seuil fixé à 6 et un minimum de 3 sondes consécutives déviantes pour considérer la variation comme significative.

Figure II.B.3 : Exemple de rapport de lame après passage dans le scanner.



Feature	Red	Green	Any	% Outlier
Non Uniform	118	111	154	0.02
Population	124	125	234	0.02

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00	>1	NA	<1
AnyColorPrcntFeatNonUn...	0.02	<1	1 to 5	>5
DerivativeLR_Spread	0.20	<0.20	0.20 to 0.30	>0.30
gRepro	0.18	0 to 0.05	0.05 to 0.20	<0 or >0.20
g_BGNoise	3.11	<5	5 to 15	>15
g_Signal2Noise	59.06	>100	30 to 100	<30
g_SignalIntensity	183.67	>150	50 to 150	<50
rRepro	0.25	0 to 0.05	0.05 to 0.20	<0 or >0.20
r_BGNoise	3.07	<5	5 to 15	>15
r_Signal2Noise	54.70	>100	30 to 100	<30
r_SignalIntensity	168.00	>150	50 to 150	<50
RestrictionControl	-1.00		0.80 to 1	<0.80 or >1

4. Vérification qPCR

Chaque variation identifiée et jugée comme pertinente après l'analyse *in silico* a été vérifiée par qPCR. Pour cela, des amorces ont été sélectionnées à l'aide du logiciel *Primer Express* V2.0 (Applied Biosystem, Saint Aubin, France). Ces amorces étaient disposées en amont du premier oligonucléotide variant et en aval du dernier oligonucléotide variant. Chaque CNV était donc contrôlé par 2 paires d'amorces (Eurogentec, Angers, France). La réaction de qPCR était réalisée à l'aide du réactif *SYBR green I* sur un système de PCR en temps réel (Applied Biosystem). La courbe d'efficacité était vérifiée pour chaque couple d'amorces avec un ADN référent (référence interne de laboratoire, sujets volontaires sains) et des concentrations variant de 0,1 à 100 ng/µl. Les plaques tests étaient ensuite réalisées avec l'ADN des patients dilué à 2 ng/µl. L'amplification était testée en triplicat pour chaque échantillon d'ADN de patient. Pour chaque réaction, on utilisait 10 µl de Master Mix SYBR Green, 0,8 µl de couple d'amorces (à 10 mM), 4,2µl d'eau et 5 µl d'ADN. Les produits de PCR étaient amplifiés dans les conditions suivantes : 95°C pendant 10 min, puis 40 cycles à 95°c pendant 15 s et 60°C pendant 60 s. Les résultats étaient analysés à l'aide du logiciel *Fast system* (Applied Biosystem).

C. Méthodes d'analyse

1. Analyses statistiques pour les études de polymorphismes

a. Hypersensibilité aux bétalactamines

Deux cohortes de patients avec hypersensibilité immédiate et retardée originaires d'Italie et d'Espage ont été constituées. Le statut atopique était défini par un taux d'IgE totales > 100 kUI/l et un antécédent personnel d'atopie (asthme, rhinite ou conjonctivite saisonnière, dermatite atopique).

Les études statistiques étaient réalisées pour évaluer l'association entre l'allergie aux bétalactamines, les polymorphismes des gènes étudiés et le taux d'IgE totales. Ces tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel STATA 12.1 (College station, Texas, USA). La taille minimale de l'échantillon était estimée à 364 patients pour une puissance $1-\beta = 0,8$ et un risque $\alpha = 0,05$ avec l'hypothèse d'une différence de 2,5 fois pour l'allèle le plus rare entre patients et contrôles.

b. Toxidermies médicamenteuses, cohorte française

Une cohorte de patients français ayant présenté une toxidermie médicamenteuse a été constituée et comparée à des témoins de même origine, appariés en âge et en sexe.

Considérant un modèle dominant, l'échantillon comprenant 236 contrôles et 118 cas était suffisant pour détecter une augmentation de 0,10 fois de l'allèle mineur chez les patients avec un risque $\alpha = 0,05$ et une puissance de 90%, 72% et 60% lorsque la fréquence allélique chez les témoins était respectivement de 0,10, 0,20 et 0,30.

Considérant le modèle dominant, 220 contrôles et 17 patients étaient suffisants pour détecter une différence de 100% de l'allèle mineur chez les cas avec un risque $\alpha = 0,05$ et une puissance d'environ 60%.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Les fréquences alléliques étaient estimées par comptage génique et la répartition selon l'équilibre d'Hardy-Weinberg testée à l'aide du test du chi2 avec un degré de liberté. Les génotypes et fréquences alléliques étaient comparés entre les cas et les contrôles à l'aide d'un test du chi2. Les OR et intervalles de confiance étaient calculés par régression logistique après ajustement sur le sexe et l'âge. Le déséquilibre de liaison entre les polymorphismes de l'IL1-α, IL1-β et IL1-RN était estimé et exprimé en terme de statistiques D' et r2 comme implémenté dans le logiciel THESIAS. Le logiciel THESIAS était utilisé pour comparer la distribution des fréquences haplotypiques chez les cas et les contrôles à l'aide d'un ratio de probabilité.

2. Analyse des hybridations comparatives en microréseau

Pour l'analyse des variations en nombre de copies (CNV), nous avons défini comme significative toute variation (i) incluant 3 oligonucléotides consécutifs, (ii) avec des bornes différentes pour chaque variation (CNV d'intersection), (iii) partagée par au moins 2 patients et (iv) obtenue avec au moins 2 témoins différents. Chaque variation était ensuite vérifiée dans les bases de données en ligne : *Database of Chromosomal Inbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER, https://decipher.sanger.ac.uk), *Database Genomic Variants* (DGV, projects.tcag.ca/variation/), *University of California Santa Cruz genome browser* (UCSC, genome.ucsc.edu/) et la base de données locale, PECAMORE qui est un registre de l'ensemble des CNV identifiées à Nancy pour les patients ayant bénéficié d'une *CGH array* pour l'inter-région est de la France (incluant les centres hospitaliers et universitaires de Nancy, Strasbourg, Reims, Dijon et Besançon). Cette dernière base de données contient toutes les variations identifiées chez environ 3000 patients dont la majorité ont un retard mental syndromique et un caryotype normal. Parmi ces patients près de 300 ont un traitement par anticonvulsivant bien toléré.

Résultats

A. Hypersensibilité aux bétalactamines

Les bétalactamines sont les antibiotiques les plus fréquemment prescrits. L'allergie aux bétalactamines est la plus fréquente des toxidermies.

Plusieurs études se sont intéressées au terrain génétique sous jacent à ces toxidermies et ont identifié des polymorphismes à risque dans les gènes tels que HLA-DBR (Yang et al., 2006), IL4 (Apter et al., 2008), IL4R (Cornejo-Garcia et al., 2012 ; Guéant-Rodriguez et al., 2006 ; Guglielmi et al., 2006 ; Huang et al., 2009 ; Qiao et al., 2005), IL10 (Guglielmi et al., 2006, Qiao et al., 2007), IL13 (Guéant-Rodriguez et al., 2006 ; Cornejo-Garcia et al., 2012), Fcεriβ (Qiao et al., 2004), INFR1 (Gao et al., 2008) ou TNFα (Guéant-Rodriguez et al., 2008), tous impliqués dans l'atopie. En outre, un lien entre atopie et allergie aux bétalactamines est discuté depuis quelques années (Apter et al., 2008 ; Cornejo-Garcia et al. 2012 ; Guéant-Rodriguez et al., 2006 ; Guglielmi et al., 2006 ; Ponvert et al., 2011).

Les gènes NOD1 et NOD2 ont été impliqués dans des maladies inflammatoires et immunologiques telles que la maladie de Crohn (Hugot et al., 2001) ou la réaction du greffon contre l'hôte (Holler et al., 2004). Ces 2 gènes sont responsables de la reconnaissance de petites molécules bactériennes intracellulaires et modulent les voies de signalisation inflammatoires et la balance cellulaire T régulateur/T-*helper* 2 (Corréa et al., 2012). Certains polymorphismes de ces gènes ont été associés à l'atopie et à un taux élevé d'IgE (Kabesch et al., 2003 ; Hysi et al., 2005 ; Weidinger et al., 2005a ; Weidinger et al., 2005b ; Eder et al., 2006 ; Macaluso et al., 2007 ; Reijmerink et al., 2010). Enfin, il a été récemment montré que l'IFN-γ induisait l'expression de NOD2 dans des kératinocytes de patients atteints de dermatite atopique (Rebane et al., 2012).

Nous avons donc souhaité évaluer l'association entre des polymorphismes de NOD1 et NOD2 et l'allergie immédiate ou retardée aux bétalactamines.

Deux populations, l'une italienne constituée de patients avec allergie immédiate ou retardée, l'autre espagnole constituée de patients avec uniquement allergie immédiate aux bétalactamines ont été recrutées. Il s'agissait d'étude cas-témoins, chaque patient étant apparié en âge et en sexe à un volontaire sain recrutés dans les mêmes centres.

Les résultats sont détaillés dans les tableaux III.A.1 et 2.

Nous avons mis en évidence une association entre le génotype CC/CT du polymorphisme rs2066845 de NOD2 et un faible risque d'hypersensibilité immédiate aux bétalactamines uniquement chez les patients italiens (OR=0,28, 95% I.C. 0,10-0,70, p=0,003). Le génotype WT/insC du polymorphisme rs5743293 de NOD2 était quant à lui associé à un risque augmenté d'hypersensibilité immédiate aux bétalactamines chez les patients espagnols (OR=6,08, 95% I.C. 1,37-55,40, p=0,007). L'allèle G en position rs2066845 était associé à un taux élevé d'IgE dans la population italienne (p=0,047). Aucune association avec le polymorphisme de NOD1 n'était identifiée.

Tableau III.A.1 : Résultats des polymorphismes des gènes NOD1 et 2 dans la cohorte italienne.

	Allergie Immédiate aux bétalactamines (AIB) n=210	Allergie Retardée aux bétalactamines (ARB) n=158	Allergie aux bétalactamines (ABL) n=368	Contrôles n=368	p ABL vs contrôles	p AIB vs contrôles	p ARB vs contrôles
	n (%, 95% I.C.)	n (%, 95% I.C.)	N (%, 95% I.C.)	n (%, 95% I.C.)			
rs2066844					0,150	0,244	0,204
CC	170 (93,9, 90,4-97,4)	146 (93,6, 89,7-97,4)	316 (93,7, 91,0-96,3)	349 (96,1, 94,2-98,1)			
CT	11 (6,1, 2,6-9,6)	10 (6,4, 2,5-10,2)	21 (6,3, 3,7-9,0)	14 (3,9, 1,9-5,8)			
rs2066845					0,003	0,006	0,150
GG	179 (98,8, 97,3-100,0)	153 (92,7, 90,2-95,3)	322 (97,9, 96,4-99,4)	343 (93,2, 90,8-96,0)			
GC	1 (0,5, 0,1-2,8)	4 (2,6, 0,1-5,0)	5 (1,5, 0,1-2,8)	24 (6,5, 3,8-8,8)			
CC	2 (0,6, 0,0-1,4)	1 (0,6, 0,1-1,8)	2 (0,6, 0,0-1,4)	1 (0,3, 2,8-8,7)			
rs5743293					0,738	0,804	0,707
WT	177 (97,8, 95,3-99,3)	154 (98,1, 95,9-100,0)	331 (97,9, 96,4-99,4)	359 (97,6, 95,9-99,1)			
WT/insC	4 (2,2, 0,01-4,4)	3 (1,9, 0,4-5,0)	7 (2,1, 0,6-3,6)	9 (2,4, 0,9-4,0)			
rs2907749					0,605	0,904	0,748
TT	96 (49,5, 42,4-56,6)	66 (42,3, 34,5-50,1)	162 (46,3, 40,4-51,1)	185 (50,3, 45,2-55,4)			
CT	83 (42,8, 35,7-49,8)	76 (48,7, 40,8-56,6)	159 (45,4, 40,3-50,1)	155 (42,1, 37,0-47,2)			
CC	15 (7,7, 3,9-11,5)	14 (9,0, 4,5-13,4)	29 (8,3, 5,4-11,4)	28 (7,6, 4,7-10,1)			

Tableau III.A.2 : Résultats des polymorphismes des gènes NOD1 et 2 dans la cohorte espagnole.

	Allergie aux bétalactamines (ABL) n=387 n (%, 95% I.C.)	Contrôles n=326 n (%, 95% I.C.)	p ABL vs contrôles
rs2066844			0,748
CC	348 (90,9, 87,9-93,7)	292 (91,0, 87,8-94,1)	
CT	34 (8,9, 6,2-11,7)	27 (8,4, 5,3-11,4)	
TT	1 (0,2, 0,2-0,7)	2 (0,6, 0,2-1,7)	
rs2066845			0,275
GG	380 (98,2, 96,8-99,5)	316 (96,9, 95,1-98,8)	
GC	7 (1,8, 0,4-3,1)	10 (3,1, 1,1-4,9)	
rs5743293			0,007
WT	373 (96,4, 94,5-98,2)	324 (99,4, 98,5-100,0)	
WT/insC	14 (3,6, 1,7-5,5)	2 (0,6, 0,2-1,4)	

Allergy EUROPEAN JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY

EAACI

Allergy

BRIEF COMMUNICATION

Allergy to betalactams and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) gene polymorphisms

A. C. Bursztejn[1,2], A. Romano[3,4,*], R. M. Guéant-Rodriguez[1,*], J. A. Cornejo[5], A. Oussalah[1], C. Chery[1], I. Gastin[1], F. Gaeta[3], A. Barbaud[1,2], M. Blanca[5,*] & J. L. Guéant[1]

[1]Inserm U954 N-GERE (Nutrition-Génétique-Exposition aux risques environnementaux), Faculté de Médecine et Centre Hospitalier Universitaire, Université de Lorraine, Nancy; [2]Dermatology Department, Dermato-allergy Unit, ADERME, Batiment des spécialités médicales, Hôpitaux Brabois, Universite de Lorraine, Vandoeuvre les Nancy, France; [3]Allergy Unit, Complesso Integrato Columbus, Rome; [4]IRCCS Oasi Maria S.S., Troina, Italy; [5]Research Laboratory for Allergic Diseases and Allergy Service, Carlos Haya Hospital, Malaga, Spain

To cite this article: Bursztejn AC, Romano A, Guéant-Rodriguez RM, Cornejo JA, Oussalah A, Chery C, Gastin I, Gaeta F, Barbaud A, Blanca M, Guéant JL. Allergy to betalactams and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) gene polymorphisms. *Allergy* 2013; DOI: 10.1111/all.12196.

Keywords
betalactam allergy; IgE; NOD gene; polymorphism.

Correspondence
Prof. Jean-Louis Guéant and Dr Anne-Claire Bursztejn, Inserm U954, University of Lorraine and University Hospital of Nancy, 9 Rue de la Forêt de Haye, 54505 Nancy-Vandoeuvre, France.
Tel.: +33 383683292
Fax: +33 383683279
E-mail: jean-louis.gueant@medecine.uhp-nancy.fr and ac.bursztejn@chu-nancy.fr

*These authors contributed equally to this work.

Accepted for publication 4 May 2013

DOI:10.1111/all.12196

Edited by: Pascal Demoly

Abstract

Background: Polymorphisms of interleukin genes related to IgE production and inflammation are predictors of hypersensitivity to betalactam, but nothing is known on the influence of NOD genes, despite their association with inflammation and atopy.
Objective: To evaluate the association of NOD2 and NOD1 polymorphisms with betalactam allergy.
Method: We genotyped 3 polymorphisms of NOD2 and 1 of NOD1 in 368 Italian and 387 Spanish patients, compared with 368 and 326 controls, respectively.
Results: CT/TT genotypes of rs2066845 of NOD2 predicted a lower risk in Italy ($P = 0.003$), while WT/insC genotype of rs5743293 (also in leucine-rich repeat domain) predicted a higher risk in Spain ($P = 0.007$). G allele of rs2066845 was associated with a higher level of IgE in the Italian population.
Conclusion: The mirrored influence of these NOD2 polymorphisms on betalactam allergy in two populations suggests a link with pathways of inflammation and/or atopy through mechanisms, which need to be clarified.

Betalactam antibiotics (BL) are frequently involved in drug hypersensitivity (HS) through immediate-type HS mediated by IgE or delayed-type reactions mediated by T cells (1). Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) genes are implicated in immunological and inflammatory diseases such as graft-versus-host and Crohn's diseases (2). They are implicated in the recognition of intracellular bacterial small molecules and modulate inflammatory pathways and T-regulator/T-helper 2 cells' balance (2). NOD2 and NOD1 polymorphisms are associated with atopy and high total IgE in serum (3–5). Moreover, IFN-γ induces NOD2 expression in keratinocytes from patients with atopic dermatitis (6). Recent studies suggested a link between genetic determinants of atopy and immediate-type allergy to betalactams (7–10). Therefore, the objective of this study was to determine whether 3 polymorphisms in NOD2 gene and 1 polymorphism in NOD1 gene were associated with the occurrence of immediate or delayed BL HS.

Abbreviations
BL, betalactam; BP, penicillin G (benzylpenicillin); HS, hypersensitivty; IgE, immunoglobulin E; IL, interleukin; IL4R, receptor of interleukin 4; LACTB, serine betalactamase-like protein; NOD, nucleotide-binding oligomerization domain; TNF, tumor necrosis factor.

Methods

We studied two populations with case–control design. The first study was performed in 368 Italian patients with BL allergy and 368 paired controls. It included 210 cases with

© 2013 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

immediate-type reaction (occurring < 1 h after drug administration, with positive skin tests and/or serum-specific IgE assays) and 158 patients with delayed hypersensitivity (occurring more than 1 h after drug administration, delayed positive intradermal tests with or without patch test confirmation). The second study, performed in Southern Spain, included 387 cases with immediate-type allergic reaction compared with 326 controls. The inclusion criteria were similar to those from the Italian study. The allergologic work-up was performed according to the ENDA (European Network for Drug Allergy) guidelines (11, 12). Atopy was defined as total serum IgE >100 kUI/l and a personal history of allergy (i.e., asthma, rhinitis or atopic dermatitis). The age- and gender-paired volunteers were recruited in preventive care consultations. They had no history of allergic disease nor dermatological or respiratory diseases. Subjects with a C-reactive protein blood concentration higher than 5 mg/l were excluded. All patients and controls were of Caucasian origin. The local ethical committees approved the protocols. The study was approved by the institutional board, and informed consent was obtained from participants, as described previously (7, 8). We extracted genomic DNA from serum samples of Italian subjects and from blood buffy coat of Spanish subjects, respectively (Qiagen, Courtaboeuf, France). The polymorphisms in NOD2 (rs2066844 (p.R702W c.C2104T), rs2066845 (p.G908R c.G2722C), rs5743293 (p.L1007 fs c.3020insC)) and in NOD1 (rs2907749, c.T2453 + 16C) were genotyped by real-time polymerase chain reaction (PCR) (Roche Molecular Biochemical, Lyon, France) in the Italian study, as previously described (7, 13). The genotypes of 3 polymorphisms in NOD2, rs2066844, rs2066845, and rs5743293 (Leu1007fsinsC) were genotyped with the Immunochip custom array (Illumina® France Holding, Paris, France) in the Spanish population. Statistical analyses were performed as described previously (8) using STATA 12.1 software (College station, Texas, USA). The minimal size of our sample was estimated at 364 patients, with a study power 1-β = 0.8 and α = 0.05, assuming a 2.5-fold difference in the less frequent alleles between controls and patients.

Results

The clinical and biological characteristics of the Italian and Spanish populations are summarized in Table 1 and Table 2, respectively. HS patients had a significant higher concentration of total serum IgE than controls. The CT/TT genotype at position rs2066845 of NOD2 predicted a lower risk to develop HS in the Italian population (odds ratio = 0.28, 95% confidence interval: 0.10–0.70, P = 0.003, Table 1), while it had no significant influence in the Spanish population (P = 0.275, Table 2). This association was significant in Italian patients with immediate HS, but not in those with delayed HS (Table 1). In contrast, the WT/insC genotype at position rs5743293 of NOD2 predicted a higher risk of BL HS in Spanish (odds ratio = 6.08, 95% confidence interval: 1.37–55.40, P = 0.007, Table 2) but not in Italian population (P = 0.738, Table 1). The G allele at position rs2066845 was associated with a higher level of IgE >100 IU/ml in the Italian population (P = 0.047). No significant association could be identified with rs2907749 of NOD1 regarding HS and total IgE.

Discussion

We report an association of NOD2 polymorphisms in BL HS, in two populations from Italy and Spain. The rs2066845 of NOD2 predicted a lower risk of BL HS in the Italian cohort, in which its frequency was, respectively, 2-fold and 3-fold higher in controls than in our Spanish population and in a German population (4–6) and similar to that reported in another Italian study (Table 1) (14). In contrast, rs5743293 predicted a higher risk of BL HS in Southern Spain, where its frequency was 8-fold lower in controls than in Italian controls (Table 2). Such mirrored associations of both NOD2 polymorphisms with BL HS have been previously observed for the risk of coronary artery diseases (14). They need to be clarified at the mechanistic level, including the respective consequences of the two polymorphisms on protein functionality (2–5) and gene–environment interactions (8, 14, 15). The p.L1007 fs rs5743293 polymorphism produces a protein truncation in the leucine-rich repeat (LRR) domain. Some studies in transgenic mice and human macrophages suggest that this leads to a 'gain-of-function', with hyperactivation of NF-κB and caspase-1 and enhanced release of tumor necrosis factor-α (TNFα). In contrast, the p.G908R missense rs2066845 polymorphism in the LRR domain decreases responsiveness of phagocytic cells to bacterial glycopeptides, with reduced cytokine production (2).

Besides its strong association with inflammatory diseases, NOD2 has been also associated with atopy and asthma in some, but not in all population studies (4–6). Other polymorphisms associated with atopy and/or inflammation have been previously identified as risk factors for BL HS, in Caucasian populations (7–10, 13, 15). They belong to genes encoding interleukin IL-4, IL-4R, IL-10, IL-13, lactamase B (LACTB), and TNFα, which is a target of NOD2. Recently, Cornejo-Garcia et al. (8) suggested that a structural homology between target human proteins of BL haptenization and environmental allergen could contribute to the link between atopy and BL allergy. We hypothesize that NOD2 gene is involved in this puzzle.

Conclusion

We described a mirrored influence of two NOD2 polymorphisms on BL HS, in two populations. These associations may be related to mechanisms, which need to be clarified.

Acknowledgments

Dr Cornejo-García is a postdoctoral researcher of the Juan de la Cierva Program (Spanish Ministry of Science and Innovation). Pr Miguel Blanca is visiting Full Professor at the Medical Faculty, University of Nancy. Manuscript was supported in part by grants from Inserm, the Lorraine Region,

© 2013 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

Table 1 Clinical and biological characteristics of controls and patients with betalactam allergy, in Italy

Characteristics	Controls *n* = 368 *n* (%, 95% C.I.)	Betalactam allergy (BLA) *n* = 368 *n* (%, 95% C.I.)	Immediate betalactam allergy (IBA) *n* = 210 n (%, 95% C.I.)	Delayed betalactam allergy (DBA) *n* = 158 *n* (%, 95% C.I.)	*P*-value BLA *vs* controls	*P*-value IBA *vs* controls	*P*-value DBA *vs* controls
Age	44 (28–59)	42 (26–55)	40 (24–55)	41 (28–53)	0.258	0.282	0.441
Female gender	242 (65.6, 61.1–70.8),	144 (68.6, 62.2–74.9)	144 (68.6, 62.2 74.9)	115 (72.3, 64.9–8.7)	0.248	0.531	0.149
Time interval (months)	NA	12 (3–60)	6 (2–18)	24 (6– 108)	NA	NA	NA
Personal history of atopy	0	102 (27.8, 23.1–32.4)	57 (27.1, 21.6–33.5)	47 (29.6, 23.0–37.0)			
Family history of allergy	0	120 (32.8,	69 (33.9, 26.5–39.3)	68 (42.7, 59.5–69.9)			
Total serum IgE	31.7 ± 2.4	202.2 ± 18.4	263.2 ± 341.3	82.31 ± 10.5	<0.001	<0.001	<0.001
IgE >100 kUI/l	16 (8.1, 4.3–11.9)	147 (35.5, 35.3–45.7)	109 (49.3, 42.4–56.1)	38 (24.6, 17.8–31.5)	<0.001	<0.001	<0.001
Allergy to penicillins	0	276 (75.0, 70.5–79.4)	123 (59.0, 52.3–65.5)	153 (91.1, 86.7–95.5)			
Allergy to cephalosporins	0	92 (25.0, 20.5–29.4)	87 (41.0, 34.5–47.7)	5 (3.1, 0.4–5.9)			
Skin tests, positive to							
Culprit drug*	NA	287 (78.2, 73.9–82.4)	144 (78.3, 72.2–84.2)	143 (96.6, 92.3–8.5)	NA	NA	NA
Penicilloyl polylysine	NA	61 (16.6, 12.8–20.4)	55 (26.2, 20.2–32.2)	6 (3.8, 1.8–8.0)	NA	NA	NA
Minor determinant mixture	NA	69 (18.8, 14.8–22.8)	53 (25.2, 19,3–31.2)	16 (10.0, 6.3–15.7)	NA	NA	NA
Benzylpenicillin	NA	131 (35.7, 30.8–40.6)	56 (26.7, 20,6–32.6)	75 (47.2, 39.5–54.9)	NA	NA	NA
Ampicillin	NA	227 (61.9, 56.9–66.8)	76 (36.2, 29.6–42.7)	151 (95.6, 91.1–7.8)	NA	NA	NA
Amoxicillin	NA	227 (61.9, 56.9–66.8)	75 (35.7, 29.2 42.2)	151 (95.6, 91.1–7.8)	NA	NA	NA
NOD2 rs2066844							
CC	349 (96.1, 94.2–98.1,)	316 (93.7, 91.0–96.3)	170 (93.9, 90.4–97.4))	146 (93.6, 89.7–97.4))	0.150	0.244	0.204
CT	14 (3.9, 1.9–5.8)	21 (6.3, 3.7–9.0)	11 (6.1, 2.6–9.6)	10 (6.4, 2.5–10.2))			
NOD2 rs2066845							
GG	343 (93.2, 90.8–96.0)	332 (97.9, 96.4–99.4)	179 (98.8, 97.3–100.0)	153 (92.7, 90.2–95.3)	0.003	0.006	0.150
GC	24 (6.5, 3.8–8.8)	5 (1.5, 0.1–2.8)	1 (0.5, 0.1–1.6)	4 (2.6, 0.1–5.0)			
CC	1 (0.3, –2.8–8.7)	2 (0.6, 0.0–1.4)	1 (0.5, 0.1–1.6)	1 (0.6, 0.1–1.8)			
NOD2 rs5743293							
WT	359 (97.6, 95.9–99.1)	331 (97.9, 96.4–99.4)	177 (97.8, 95.3–99.3)	154 (98.1, 95.9–100.0)	0.738	0.804	0.707
WT/insC	9 (2.4, 0.9–4.0)	7 (2.1, 0.6–3.6)	4 (2.2, 0.01–4.4)	3 (1.9, 0.4–5.0))			
NOD1 rs2907749							
TT	185 (50.3, 45.2–55.4)	162 (46.3, 40.4–51.1)	96 (49.5, 42.4–56.6)	66 (42.3, 34.5–50.1)	0.605	0.984	0.748
TC	155 (42.1, 37.0–47.2)	159 (45.4, 40.3–50.1)	83 (42.8, 35.7–49.8)	76 (48.7, 40.8–56.6)			
CC	28 (7.6, 4.7–10.1)	29 (8.3, 5.4–11.4)	15 (7.7, 3.9–11.5)	14 (9.0, 4.5–13.4)			

NA: not applicable.

*Performed only in 184 patients with immediate betalactam allergy.

© 2013 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

Table 2 Clinical and biological characteristics of controls and patients with betalactam allergy, in Spain

Characteristics	Controls $n = 326$ n (%, 95% C.I.)	Betalactam allergy (BLA) $n = 387$ n (%, 95% C.I.)	P-value BLA *vs* controls
Age	43 (33–53)	49 (37–57)	<0.001
Female gender	198 (60.2, 54.8–65.5),	208 (56.9, 51.9–62.1)	0.394
Time interval (months)	NA	5 (2–10)	NA
Personal history of atopy	39 (11.9, 8.3–15.3)	52 (14.3, 10.6–17.9)	0.344
Total serum IgE	123.0 ± 13.9	195.2 ± 21.8	<0.001
IgE >100 kUI/l	82 (25.3, 20.4–29.9)	115 (49.8, 43.3–56.2)	<0.001
Allergy to penicillins	0	343 (93.9, 91.5–96.4)	
Allergy to cephalosporins	0	22 (6.1, 3.6–8.4)	
NOD2 rs2066844			
CC	292 (91.0, 87.8–94.1,)	348 (90.9, 87.9–93.7)	0.748
CT	27 (8.4, 5.3–11.4)	34 (8.9, 6.2–11.7)	
TT	2 (0.6, −0.2-1.7)	1 (0.2, −0.2-0.7)	
NOD2 rs2066845			
GG	316 (96.9, 95.1–98.8)	380 (98.2, 96.8–99.5)	0.275
GC	10 (3.1, 1.1–4.9)	7 (1.8, 0.4 –3.1)	
NOD2 rs5743293			
WT	324 (99.4, 98.5–100.0)	373 (96.4, 94.5–98.2)	0.007
WT/insC	2 (0.6, −0.2-1.4)	14 (3.6, 1.7–5.5)	

and PHRC (hospital clinical research program, 2012) and from Spanish Ministry Fund for Health in Spain (FIS) network RIRAAF (RD07/0064) and PS09/02419.

Author contributions

ACB performed genotyping, analyzed the data, did statistical analyses, and wrote the article; RMGR supervised the genotyping analyses, analyzed the data, did the statistical analyses, wrote the article, and had primary responsibility for final content; AR and MB conducted and performed recruitment and subject testing of the Italian and Spanish populations, respectively, revised the article, and had primary responsibility for final content; JAC and FG performed recruitment and subject testing of the Italian population, and revised the article; AO analyzed the data and did the statistical analysis of the Spanish study; CC and IG supervised the genotyping analyses, and revised the article; AB conducted the research, and wrote the article; JLG designed and conducted the research, analyzed the data, wrote the article, supervised the whole project, and had primary responsibility for final content.

Conflicts of interest

No conflicts of interest are declared.

Sources of funding

This study was funded by grants from INSERM, the Lorraine Region, and PHRC (hospital clinical research program, 2012).

References

1. Vandebriel RJ. Gene polymorphisms within the immune system that may underlie drug allergy. *Arch Pharmacol* 2004;**369**:125–132.
2. Correa RG, Milutinovic S, Reed JC. Roles of NOD1 (NLRC1 and NOD2 (NLRC2 in innate immunity and inflammatory diseases. *Biosci Rep* 2012;**32**:597–608.
3. Kabesch M, Peters W, Carr D, Leupold W, Weiland SK, von Mutius E. Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing 15 and allergy in two German populations. *J Allergy Clin Immunol* 2003;**111**:813–817.
4. Weidinger S, Klopp N, Rümmler L, Wagenpfeil S, Baurecht HJ, Gauger A et al. Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population based cohort of Caucasian adults. *Clin Exper Allergy* 2005;**35**:866–872.
5. Weidinger S, Klopp N, Rümmler L, Wagenpfeil S, Novak N, Baurecht HJ et al. Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2005;**116**:177–184.
6. Rebane A, Zimmermann M, Aab A, Baurecht H, Koreck A, Karelson M et al. Mechanisms of IFN-γ-induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;**129**:1297–1306.
7. Gueant-Rodriguez RM, Romano A, Beri-Derxheimer M, Viola M, Gaeta F, Gueant JL. Gene-gene interactions of IL13 and IL4RA variants in immediate allergic reactions to betalactam antibiotics. *Pharmacogenet Genomics* 2006;**16**:713–719.
8. Cornejo-Garcia JA, Gueant-Rodriguez RM, Torres MJ, Blanca-Lopez N, Tramoy D, Romano A et al. Biological and genetic determinants of atopy are predictors of immediate-type allergy to betalactams, in Spain. *Allergy* 2012;**67**:1181–1185.
9. Guglielmi L, Fontaine C, Gougat C, Avinens O, Eliaou JF, Guglielmi P et al. IL-10 promoter and IL4-Rα gene SNPS are associated with immediate β-lactam allergy in atopic women. *Allergy* 2006;**61**:921–927.

© 2013 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

10. Apter AJ, Schelleman H, Walker A, Addya K, Rebbeck T. Clinical and genetic risk factors of self-reported penicillin allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**:152–158.
11. Torres MJ, Blanca M, Fernandez J, Romano A, Weck A, Aberer W et al. ENDA; EAACI Interest Group on Drug Hypersensitivity. Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy* 2003;**58**:961–972.
12. Romano A, Blanca M, Torres MJ, Bircher A, Aberer W, Brockow K et al. ENDA; EAACI. Diagnosis of non-immediate reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy* 2004;**59**:1153–1160.
13. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Viola M, Tramoy D, Gaeta F, Romano A. Association of tumor necrosis factor-α -308G>A polymorphism with IgE-mediated allergy to betalactams in an Italian population. *Pharmacogenomics J* 2008;**8**:162–168.
14. Galluzzo S, Patti G, Dicuonzo G, Di Sciascio G, Tonini G, Ferraro E et al. Association between NOD2/CARD15 polymorphisms and coronary artery disease: a case-control study. *Hum Immunol* 2011;**72**:636–640.
15. Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Cornejo-Garcia JA, Viola M, Blanca M, Romano A. Gene variants of IL13, IL4, and IL4RA are predictors of beta-lactam allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2009;**123**:509–510.

© 2013 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

B. Toxidermie médicamenteuse, cohorte française

L'hypersensibilité médicamenteuse se manifeste par différentes toxidermies. Les plus fréquentes d'entre elles sont les EMP et les urticaires ou angioedèmes. Certaines sont beaucoup plus rares telles que les DRESS.
Les études génétiques à la recherche de facteurs de risque pour ces hypersensibilités se sont beaucoup focalisées sur les gènes codant pour les molécules d'histocompatibilité et en particulier les gènes du groupage HLA. Ces études ont montré des associations entre certains groupage HLA et un type de toxidermie médicamenteuse induite par un médicament dans certains groupes ethniques (Kaniwa et al., 2010 ; Lonjou et al., 2008 ; McCormack et al., 2011). D'autres gènes, en particulier ceux codant pour des régulateurs de la production cytokinique, largement impliqués dans la physiopathologie des accidents médicamenteux, ont été évalués chez des patients ayant présenté des hypersensibilités immédiates aux bétalactamines. Ainsi, des associations avec des polymorphismes des gènes codant pour les cytokines IL13 et IL4 (Yang et al., 2005), le TNF-α (Guéant-Rodriguez et al., 2008) et l'IL-10 (Guglielmi et al., 2006 ; Qiao et al., 2007) ont été montrées.

L'objectif de cette étude était d'évaluer les polymorphismes de 9 gènes cytokiniques dans une large population de patients ayant présenté une toxidermie immédiate ou retardée, indépendamment de la classe médicamenteuse suspectée.
Il s'agissait d'une étude cas-témoin incluant 118 patients et 236 contrôles tous de même origine.

Les résultats sont détaillés dans les tableaux III.B.1 et 2.

Tableau III.B.1 : Résultats des polymorphismes cytokiniques.

		Témoins (T)	Toxidermies (tout type)	EMP	HSI	DRESS	p, Modèle catégoriel		p, Modèle dominant			
							Cas vs T	EMP vs T	Cas vs T	EMP vs T	HSI vs T	DRESS T
rs1800587	CC	50,4	51,7	48,6	67,7	35,3	0,612	0,917	0,822	0,785	0,069	0,228
	CT	39,8	35,7	40,0	22,6	41,2						
	TT	9,8	12,6	11,4	9,7	23,5						
rs16944	CC	47,0	55,9	52,9	51,6	76,5	0,285	0,635	0,105	0,372	0,612	0,018
	CT	43,2	35,6	37,1	38,7	23,5						
	TT	9,8	8,5	10,0	9,7	0						
rs2234663	A1A1	65,9	51,8	54,5	48,3	47,1	0,009	-	0,013	0,094	0,063	0,117
	A1A2	27,2	43,7	40,9	48,3	47,1						
	A2A2	6,9	4,5	4,6	3,4	5,8						
rs2069762	TT	49,1	51,7	51,4	48,4	58,8	0,281	0,316	0,650	0,711	0,957	0,429
	TG	40,8	43,2	44,3	45,2	35,3						
	GG	10,1	5,1	4,3	6,4	5,9						
rs2070874	CC	74,2	77,9	77,1	87,1	64,7	-	-	0,431	0,610	0,114	0,396
	CT	23,6	15,3	15,7	6,4	29,4						
	TT	2,2	6,8	7,2	6,5	5,9						
rs2069812	CC	48,6	51,7	48,6	48,4	70,6	0,428	0,688	0,559	0,973	0,996	0,077
	CT	42,0	35,6	38,6	38,7	17,6						
	TT	9,4	12,7	12,8	12,9	11,8						
rs1800872	CC	61,1	55,6	62,3	51,6	35,3	0,077	-	0,301	0,886	0,299	0,035
	CA	34,8	34,2	27,6	41,9	47,1						
	AA	4,1	10,2	10,1	6,5	17,6						
rs4778889	TT	65,4	66,9	68,6	67,7	58,8	-	-	0,753	0,610	0,784	0,594
	TC	32,2	32,2	30,0	32,3	41,2						
	CC	2,4	0,9	1,4	0	0						
rs1800629	GG	77,4	75,4	75,7	74,2	76,5	-	-	0,686	0,775	0,694	0,933
	GA	20,9	20,4	18,6	22,6	23,5						
	AA	1,7	4,2	5,7	3,2	0						

T : témoins, EMP : exanthème maculo-papuleux, HSI : hypersensibilité immédiate, DRESS : *Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms*, Modèle catégoriel : test chacun des génotypes contre les autres, Modèle dominant, test génotype le plus fréquent par rapport aux 2 autres.

Tableaux III.B.2 : Résultats de l'analyse par haplotypes pour IL1-RN VNTR et IL1-β-511C>T (rs2234663 et rs16944). N : nombre, OR : odds ratio, IC : intervalle de confiance, EMP : exanthème maculo-papuleux, HSI : hypersensibilité immédiate, DRESS : *Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms*.

Haplotypes IL1-RN VNTR-IL1-β-511C>T	Témoins N=216	Toxidermies (tout type) N=112	p	OR (IC 95%)	EMP N=66	p	OR (IC 95%)	HSI N=29	p	OR (IC 95%)	DRESS N=17	p	OR (IC 95%)
A1-C	0,594	0,581		1,00	0,566		1,00	0,522		1,00	0,602		1,00
A1-T	0,200	0,181	0,852		0,183	0,855		0,201	0,795		0,104	0,411	
A2-C	0,087	0,176	0,007	2,13 (1,23-3,70)	0,145	0,120		0,167	0,127		0,280	0,016	3,22 (1,23-8,41)
A2-T	0,119	0,086	0,396		0,104	0,727		0,109	0,928		0,014	0,715	

La loi d'Hardy-Weinberg était respectée chez les témoins comme chez les patients pour les 9 polymorphismes étudiés.

Nous avons identifié que la présence d'au moins un allèle A2 pour le polymorphisme rs2234663 était associé à un sur-risque de toxidermie (p=0,018, OR=1,80, IC 95% [1,10-2,94]. Cette association était significative quel que soit le modèle testé, dominant ou catégoriel, p=0,013 et 0,009 respectivement.
Nous avons mis en évidence une fréquence augmentée de l'allèle C (allèle majoritaire) du polymorphisme rs16944 chez les patients DRESS (p=0,018) ; l'allèle minoritaire étant protecteur pour cette toxidermie grave (p=0,025, OR=0,26, IC 95% [0,08-0,85]). Chez ces mêmes patients, l'allèle minoritaire du polymorphisme rs1800872 était, au contraire, associé à un sur-risque de DRESS d'après le modèle dominant (CC vs CA+AA, p=0,035).
Aucune autre association significative n'était démontrée pour les autres polymorphismes quel que soit le type de toxidermie considéré.

Concernant l'analyse par haplotype, il était noté un déséquilibre de liaison entre IL1-β (rs16944) et IL1-RN (rs2234663) (D'=0,26, p≤0,001), alors que IL1-α (rs1800587) et IL1-RN (rs2234663) n'étaient pas en déséquilibre de liaison (D'=-0,07, p=0,514). Nous avons donc uniquement considéré les polymorphismes rs16944 et rs2234663 pour cette analyse.
Nous avons démontré l'association entre l'haplotype A2-C pour les 2 polymorphismes considérés et les toxidermies tous types confondus (p=0,007, OR=2,13, IC 95% [1,23-3,70], mais également l'association entre ce même haplotype et le risque de DRESS (p=0,016, OR=3,22, IC 95% [1,23-8,41].

Nous montrons un effet synergique de l'IL1-Ra et de l'IL1-β, l'allèle T de l'IL1-β étant protecteur de DRESS tandis que l'haplotype A2-C pour ces 2 gènes est un facteur de risque de DRESS.

Nous montrons également que l'allèle A du polymorphisme étudié de l'IL10 est majoritaire chez les patients DRESS.

ORIGINAL ARTICLE

Comparison of cytokine gene polymorphism in drug-induced maculopapular eruption, urticaria and drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS)

A. Barbaud,[1,2,3,*] J. Waton,[1] B. Herbeth,[4,5] A.C. Bursztejn,[1,2,3] M. Bollaert,[1] J.L. Schmutz,[1] R.M. Guéant-Rodriguez,[2,3,4] F. Namour,[2,3,4] J.L. Guéant,[2,3,4] I. Aimone-Gastin[3,4]

[1]CHU Nancy, Service de Dermatologie and INGRES research Unit, pôle des Spécialités médicales, Vandoeuvre les Nancy, France
[2]INSERM, U954, Vandoeuvre les Nancy, France
[3]Université de Lorraine, Faculté de Médecine, Vandoeuvre les Nancy, France
[4]CHU Nancy, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Nutrition et Métabolisme, Vandoeuvre les Nancy, France
[5]Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, Nancy, France
*Correspondence: A. Barbaud. E-mail: a.barbaud@chu-nancy.fr

Abstract

Background Polymorphisms of genes controlling cytokine production have not been studied in the genetic susceptibility to cutaneous adverse drug reactions (CADR).

Objectives The objective was to determine whether polymorphisms in nine cytokine genes were associated to the occurrence of drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) compared to drug-induced maculopapular eruption or urticaria and to controls without drug intolerance.

Methods Results from 118 patients with a well-defined CADR were compared to 236 controls without drug intolerance living in the same area of France. We assessed nine polymorphisms: interleukin (IL)1-alpha-889C>T (rs 1800587), IL1-beta-511C>T (rs 16944), IL1-RN intron-2-VNTR (rs2234663), IL2-330T>G (rs 2069762), IL4-33C>T (rs 2070874), IL5-745C>T (rs 2069812), IL10-592C>A (rs 1800872), IL16-295T>C (rs 4778889) and tumour necrosis factor-alpha-308G>A (rs 1800629).

Results Three polymorphisms exhibited a significant association with CADR ($P < 0.05$). The combination of the IL1-RN-A2 and IL1-beta-511C alleles was statistically different between cases and controls ($P = 0.007$) and the A2C haplotype was associated with susceptibility to CADR, particularly in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) patients (odds ratio = 3.22; 95% confidence interval = 1.23–8.41; $P = 0.016$). The frequency of the IL10-592A allele was higher in DRESS patients than in controls (dominant model CC vs. CA + AA: $P = 0.035$). These abnormalities were not evident in maculopapular eruptions or urticaria.

Conclusions This is the first study showing that IL1-cluster polymorphisms and haplotypes and the IL10-592A allele (a low IL10 producer) are associated with DRESS. These gene variants may decrease drug tolerance and promote herpes virus reactivation.

Received: 7 September 2012; Accepted: 4 February 2013

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests as defined by the Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, or other interests that might be perceived to influence the results and discussion reported in this article.

Funding sources

This study was sustained by regional research funds from the University Hospital of Nancy (PHRC: UF 9793).

Introduction

Hypersensitivity to drugs can induce heterogeneous cutaneous adverse drug reactions (CADR); some, such as urticaria or maculopapular eruption (MPE), occur frequently, whereas others, such as the drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS), are rare and severe. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from subjects with drug sensitization contained Th2 cells producing interleukin (IL) 4 in immediate reactions but Th1 cells in delayed reactions are accompanied by a drug-specific increase in the secretion of IL2, 5, 13 and interferon (IFN)-γ.[1]

In DRESS, drugs could interact with different targets and thus be involved in both drug hypersensitivity and the modification of host defence against human herpes viruses (HHV).[2–5] Thus, a

© 2013 The Authors

genetically predisposed deficiency in cytokine-mediated immunoregulation could be involved in delayed hypersensitivity to drugs, and anti-human herpes virus (HHV) family host defence in DRESS.

In delayed reactions, drug-specific T cells recognize drugs through their T-cell receptors. Some drugs need to bind covalently to the major histocompatibility-peptide complex (MHC) to trigger an immune response, but others may bind directly and reversibly to immune receptors (p-i concept).[6] Studies on genetic susceptibility to drug-induced cutaneous hypersensitivity have focused mainly on the MHC, especially on the human leucocyte antigen [HLA] B genotypes that were restricted to only one drug or ethnical group.[7–9] However, some other genes, particularly those that control cytokine production, could also modulate the intensity of this immunological response. Studies regarding cytokine gene polymorphisms showed that immediate allergic reactions to betalactam are influenced by genes of the IL13 and IL4 pathways, by TNF-alpha GG genotype and, in a subgroup of atopic women, by IL10-592A.[10–16]

The objective of this study was to determine whether polymorphisms in nine cytokine genes were associated with the occurrence of DRESS compared to drug-induced MPE or urticaria and to controls without drug intolerance.

Materials and methods

Study population

This unicentre, case-control study was conducted from November 2006 to December 2011. A total of 118 patients were prospectively included, based on the following eligibility criteria: (i) Age of 18 years or older; (ii) previous diagnosis with a well-defined CADR (urticaria, MPE or DRESS) as evaluated by a dermatologist; (iii) an urticaria with or without angio-oedema, a MPE (due to either only one new, recently introduced drug or positive systemic re-administration of a drug with progressively increased dosages under hospital surveillance), or a DRESS scored as plausible (class 4 or more according to the criteria of Kardaun *et al.*[10] and (iv) a well-known chronology of the intake of each drug.

The study was also performed on 236 healthy controls (Table 1), including 132 subjects attending a health check-up at a local Centre for Preventive Medicine and 104 patients referred for a diagnostic coronary angiography in the context of suspected coronary artery disease but with a normal coronary angiogram.[11] All control subjects had no history of drug intolerance or hypersensitivity, no inflammatory and autoimmune diseases.

This study was approved by the ethic committee of Nancy (Comité de Protection des Personnes de Lorraine). All experimental procedures were conducted with written informed consent obtained from each patient, in accordance with the Ethical Principles of Helsinki's Declaration.

Drug skin tests and systemic provocation tests

The methods used are summarized in Table 2, following previously published methods.[12,13] Briefly, all patients had drug patch tests and, when negative, prick tests. Except in patients with DRESS, intradermal tests (IDTs) followed by re-challenges were done when other tests were negative.

Assays and DNA genotyping procedures

Fasting venous blood was collected in EDTA-containing tubes, immediately centrifuged, and stored at −20°C until analysis. DNA was isolated from a lymphocyte-enriched fraction of whole blood using the NUCLEON BACC3 genomic DNA extraction kit (Amersham Pharmacia Biotech, Milan, Italy) and stored at −20°C for genetic analyses.

To investigate cytokines involved in immediate drug hypersensitization[14–20] or delayed cutaneous hypersensitivity,[21] nine cytokine polymorphisms were assessed: IL1-alpha-889C>T (rs 1800587), IL1-beta-511C>T (rs 16944), IL1-RN intron 2-VNTR (four repeats = allele A1; two repeats = allele A2; rs2234663), IL2-330T>G (rs 2069762), IL4-33C>T (rs 2070874), IL5-745C>T (rs 2069812), IL10-592C>A (rs 1800872), IL16-295T>C (rs 4778889) and TNF-alpha-308G>A (rs 1800629). Eight of these sequence-validated gene variants were identified by hybridization probes using LC 480 real-time polymerase chain reaction (PCR) followed by melting curve analysis (Light Cycler® 480, Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The IL1-RN intron 2-VNTR polymorphism was characterized by variable tandem repeats composed most often by two or four 86-bp units. Analysis of this IL1-RN polymorphism was adapted from a previously described method[22] and performed using an SYBR Green PCR restriction fragment length polymorphism. For a few subjects, data for polymorphisms were missing because of technical problems during determination. Therefore, the number of cases and controls varied for each class of polymorphisms.

Power calculation

Using a dominant model, our sample of 236 controls and 118 cases is sufficient for detecting an increase of 0.10 in the minor allelic frequency in cases with an alpha risk of 0.05 and a power of 90%, 72% and 60% when the allelic frequency of controls is 0.10, 0.20 and 0.30 respectively. Using a dominant model, our sample of 220 controls and 17 DRESS cases is sufficient for detecting a difference of 100% in the minor allelic frequency in cases with an alpha risk of 0.05 and a power of approximately 60%.

Statistical analysis

Basic statistical analyses were performed using SAS 9.2 statistical software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Allele frequencies were estimated by gene counting, and departure from Hardy–Weinberg (HW) equilibrium was tested using a chi-squared test

© 2013 The Authors

Table 1 Characteristics of controls and patients with cutaneous adverse drug reactions

	Controls	Patients with cutaneous adverse drug reactions			
		All cases	MPE	Urticaria and angioedema	DRESS
Number (*N*)	236	118	70	31	17
Age (y)*	64.5 ± 12.0	58.7 ± 14.9	61.8 ± 14.3	53.6 ± 13	55.1 ± 17.6
Sex †					
Males	163 (69.1)	45 (38.1)	35 (50.0)	4 (12.9)	6 (35.3)
Females	73 (30.9)	73 (61.9)	35 (50.0)	27 (87.1)	11 (64.7)
Blood sample taken after the CADR or OPT+		88	55	27	6
Drug responsibility determined by:					
Positive skin tests		82	53	16	13
Positive re-challenge		9	3	6	–
Only one recently introduced drug		27	14	9	4
Responsible drugs:					
Betalactam		34	20	10	4
Radiocontrast media		38	32	6	0
Pristinamycin		4	–	–	4
Vancomycin		3	–	–	3
Carbamazepine		3	–	–	3
Allopurinol		3	–	–	3
Aminoside		1	–	–	1
Minocyclin		1	–	–	1
Corticosteroid		1	–	–	1
Other classes		35	18	15	2

*Mean ± standard deviation.
†N (%). With respect to the drug classes involved in DRESS, some patients had two responsible classes. These multi-sensitizations were demonstrated by chronological criteria but also by specific positive drug skin tests in all cases.
CADR, cutaneous adverse drug reaction; DRESS, drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms; OPT, oral provocation test; MPE, maculo-papular eruption.

with one degree of freedom. Genotype and allele frequencies were compared between cases and controls using a chi-squared test. Odds ratios (ORs) and a 95% confidence interval (CI) were calculated using logistic regression analysis after adjustment for sex and age. Pairwise linkage disequilibria between polymorphisms of IL1-alpha, IL1-beta and IL1-RN were estimated and expressed in terms of the D′ and r2 statistics, as implemented in THESIAS software.[23] THESIAS software was used to compare the haplotype frequency distributions of cases and controls using a likelihood ratio test and haplotype effects (95% CIs were expressed as haplotypic OR).

Results

Subject characteristics are shown in Tables 1 and 3. The control group included 73 females and 163 males (mean age = 64.5 ± 12.0 years); the patient group consisted of 73 females and 45 males (mean age = 58.7 ± 14.9 years). Seventy patients presented with MPE (mean age = 61.8 ± 14.3 years; 35 females vs. 35 males); 31 patients with an urticaria (mean age = 53.6 ± 13 years; 27 females vs. 4 males); and 17 subjects with DRESS were enrolled (mean age 55.1 ± 17.6 years; 11 females vs. 6 males), all of them were categorized as class 4 or greater according to the criteria of Kardaun *et al.*[10] PCR detected herpes virus DNA in the blood of 11 of 13 patients with DRESS, including Epstein–Barr virus (EBV) in five cases, human herpes virus 6 (HHV6) in five cases and cytomegalovirus (CMV) in one case; two cases were negative for EBV, CMV and HHV 6 and 7.

Genotypes of each of the nine polymorphisms were in Hardy–Weinberg equilibrium in cases and control subjects. For the nine gene variants, genotype and allelic frequencies were not significantly different in males and females in both cases and controls. For the eight gene variants IL1-alpha-889C>T, IL1-beta-511C>T, IL2-330T>G, IL4-33C>T, IL5-745C>T, IL10-592C>A, IL16-295T>C and TNF-alpha-308G>A, there was no significant difference between cytokine polymorphisms when comparing the CADR population and controls (Table 4).

The frequency of the IL1-beta-511C allele was higher in DRESS patients than in controls, with the presence of at least one IL1-beta-511T allele associated with a lower risk of DRESS

© 2013 The Authors

Table 2 Methods used for immuno-allergological investigations (drug skin tests and provocation tests)

Undertaken at least 6 weeks after clinical symptoms of the suspected CADR were resolved Patients were denied beta-blockers, antihistamines and systemic corticosteroids for 7 days and 1 month respectively
Patch tests:
When the active compound was available it was diluted at 10% in petrolatum. The commercialized form of the drug was diluted at 30% in water, petrolatum and alcohol Readings were done at 20 min, 48 h and 96 h
Prick test
Done on the volar forearm skin with the commercial form of the drugThe positive prick test control was histamine diluted at 10 mg/mL Reactions were considered positive at 20 min if the weal of the reaction had a diameter at least 3 mm greater than that obtained with negative control (0.9% saline) A prick test reading done at 24 h was considered positive if an erythematous weal was present
Intradermal tests (IDTs)
Performed only if: (i) prick tests showed negative results; (ii) in non-severe CADR and; (iii) if an injectable form of the drug was availableDone using a sterile solution of the suspected drug diluted sequentially in salineThe negative control was saline (0.9% NaCl). Performed on the extensor surface of the armThe injected volume (0.02 ml) was that which produced an immediate weal of 3–5 mm in diameterConsidered positive on immediate reading when the diameter at 20 min was equal to or more than twice the diameter of the injection weal Delayed reactions occurring >24 h after challenge were considered positive if an infiltrated erythematous reaction was observed
Re-challenges:
Performed only when skin test results were negative and only in patients with maculopapular eruption or urticaria, not in cases of DRESSThe drug was given at six dosages, starting at 1.10–4 × the dosage, to full dosage, vs. placebo, conditioned like the other dosagesRe-challenges were stopped if abnormal cutaneous or general signs appearedRe-challenge was considered positive if any clinical reaction occurred

(sex- and age-adjusted OR = 0.26; 95% CI = 0.08–0.85; P = 0.025, data not shown).

For the IL1-RN intron2-VNTR (rs2234663) polymorphism analysis, we used only A1A1, A1A2 and A2A2 genotypes. The comparison between 112 cases and 217 controls showed statistically significant differences both when comparing genotype frequencies (P = 0.009) and in the dominant model, A1A1 vs. A1A2 + A2A2 (P = 0.013), with a higher frequency of allele A2 in CADR patients than in controls. The presence of at least one A2 allele was associated with a higher risk of CADR without partition (sex- and age-adjusted OR = 1.80; 95% CI = 1.10–2.94; P = 0.018).

When we compared the frequency of IL1-beta-511C and of IL1-RN-A2 between DRESS patients and other cases (MPE, urticaria and angioedema), no significant difference was shown: P = 0.065 and 0.671 respectively (data not shown).

The polymorphisms of IL1-beta and IL1-RN showed strong linkage disequilibria among patients and control subjects (D′ = 0.26, $P \leq 0.001$); conversely, IL1-alpha and IL1-RN polymorphisms were not in linkage disequilibrium (D′ = −0.07, P = 0.514; data not shown). Haplotype analysis was done only on IL1-beta and IL1-RN polymorphisms.

We found an association between the haplotypes for IL1-RN intron2-VNTR and IL1-beta-511C>T and CADR. The combination of the IL1-RN-A2 and IL1-beta-511C alleles was statistically different between cases and controls (OR = 2.13; 95% CI = 1.23–3.70; P = 0.007) and the A2C haplotype was associated with susceptibility to DRESS (OR = 3.22; 95% CI = 1.23–8.41; P = 0.016; Table 5).

The frequency of the IL10-592A allele was higher in DRESS patients than in controls (dominant model CC vs. CA + AA: P = 0.035).

Discussion

In a very select and well-defined CADR population and in a control population living in the same area, there were no statistically significant differences between MPE patients and controls for 9 nucleotide cytokine polymorphisms. Maybe due to geographical diversity, in contrast to previous studies focused on immediate allergic reactions to betalactams[18,19] we did not observe any difference between the IL4 polymorphism genotype (rs 2070874) or the TNF-alpha-308GG genotype (rs 1800629) in our French urticaria patients (betalactams, n = 10) and controls. In another French study, there was no difference between the same IL4 polymorphism genotype between patients with immediate hypersensitivity to betalactam antibiotics and controls.[16]

An association between immediate hypersensitivity to betalactams and some SNPs of IL4-Ralpha (on chromosome 16p12.1) has also been reported.[14–16,20] However, we identified three cytokine gene polymorphisms, IL1-beta-511C>T, IL1-RN (intron2-VNTR) and IL10-592C>A, exhibiting significant positive associations ($P \leq 0.05$) with DRESS compared to controls.

In MPE and urticaria cytokine polymorphisms are comparable to those of controls. Phenotypes i.e. cytokine levels are probably different but it is not due to a genetically induced over or sub production of some cytokines. Moreover, even if some IL4 gene polymorphisms have been associated with urticaria due to betalactams, maybe due to geographical diversity, diversity of the responsible drugs and a limited number of patients we did not observe any difference between the IL4 polymorphism genotype in our urticaria patients.

The frequency of the IL1-beta-511C allele was higher in DRESS patients than in control subjects. In the chromosome 2q12-q21 region, the A2C haplotype was associated with susceptibility to DRESS [OR = 3.22 (1.23–8.41), P = 0.016; Table 4]. If the −511C allele is associated with normal production of IL1-beta, the IL1-RN-A2 allele probably is functionally significant to the regulation of IL1-Ra production.[24]

The term 'IL1' usually designates a group of three molecules; two of these molecules, IL1-alpha and IL1-beta, are known to be involved in inflammation and host defence. The third, IL1-Ra or

© 2013 The Authors

Table 3 Characteristics of 17 patients with DRESS

	Sexe	Age	Skin rash	Fever	ELN	Eosinophil max	Hepatic failure	Other organ failure	DRESS score	Virus reactivation	Highest suspected drugs or classes	IL1 -beta -511C>T	IL1-RN intron 2-VNTR	IL10 -592C>A
1	M	56	+	+	+	4156	ALP × 1.5 N		6	nd	Corticosteroid*	CC	A1A1	AC
2	F	40	+	+		320 with atypical lymphopenia	T × 4 N		4	nd	Pristinamycin*	CC	A1A2	AC
3	F	51	+	+	+	800			4	nd	Glycopeptides*, and proton pump inhibitor*	CC	A2A2	AC
4	F	75	+	+		7400	T × 1.5 N	Renal dysfunction	6	–	Strontium ranelate, betalactams*	CC	A1A2	CC
5	M	55	+	–	+	1400	T × 2 N	Renal dysfunction	5	–	Pristinamycin*	CT	A1A1	AA
6	M	61	+	+	+	1310			4	EBV, HHV7	Betalactams*	CC	A1A1	AC
7	F	69	+	+		1580	T × 15N; ALP × 3N	Renal dysfunction	6	EBV, HHV6, HHV7	Allopurinol	CC	A1A2	AA
8	F	63	+	+	+	1750			5	HHV7	Aminosids* and glycopeptides*	CC	A1A2	CC
9	M	41	+	+	+	3020	T × 15 N		6	EBV	Betalactams*	CC	A1A2	CC
10	M	63	+	+	+		T × 6 N, ALP × 2 N		4	EBV, HHV7	Carbamazepine*	CC	A1A1	CC
11	F	60	+	+		3570	T × 10N; ALP × 5N		5	nd	Carbamazepine*	CT	A1A1	AA
12	F	47	+	+		742	ALP: 85 GGT: 87		4 score during the 2nd onset	IgM anti-CMV	Pristinamycin and macrolides 2nd onset of DRESS due to pristinamycin	CT	A1A2	AC
13	F	91	+	+	+	2700	ALP × 2N	Renal dysfunction	7	CMV, HHV6	Allopurinol	CC	A1A2	CC
14	F	29	+	+	+	1040	ALP × 1.7N		5	HHV7	Betalactams*	CC	A1A1	AC
15	M	18	+	+	+	2950	T × 9N; ALP × 4N	Pericarditis on echography	7	HHV6	Minocyclin	CC	A1A2	AC
16	F	71	+	–		3190	T × 8 N		4	EBV	Carbamazepine*	CC	A1A1	CC
17	F	46	+	+	+	2480	T × 4N; ALP × 3N		6	EBV, HHV7	Pristinamycin* and glycopeptides*	CT	A1A1	AC

The score has been calculated according to Kardaun *et al.* criterias (10), value of transaminases or alkaline phosphatases are given compared to normal ranges.
Virus reactivations have been studies by polymerase chain reaction on total blood for human herpes virus (HHV) 6 and 7, cytomegalovirus (CMV), Epstein–Barr Virus (EBV).
*Positive results on drug patch tests. Biological abnormalities were observed at least twice in all case but one (case #12). In case 12, biological abnormalities were transient because it was a 2nd onset of DRESS, the 1st onset occurred 8 years before.
ELN, enlarged lymph nodes; eosinophil max, highest eosinophil count, eosinophil count done at least three times; T, transaminases; ALP, alkaline phosphatases; nd, not done; –, done with negative results.

© 2013 The Authors
Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology © 2013 European Academy of Dermatology and Venereology

Table 4 Association of cytokine gene polymorphisms with cutaneous adverse drug reactions*

IL1Alpha (-889C>T) rs1800587 (Chr 2q14)	**Controls (*N* = 234)**	**All cases (*N* = 118)**	**MPE (*N* = 70)**	**Urticaria + angioedema (*N* = 31)**	**DRESS (*N* = 17)**
CC	50.4	51.7	48.6	67.7	35.3
CT	39.8	35.7	40.0	22.6	41.2
TT	9.8	12.6	11.4	9.7	23.5
Test for difference (cases vs. controls)†					
Categorical model: CC vs. CT vs. TT	–	0.612	0.917	–	–‡
Dominant model CC vs. CT + TT	–	0.822	0.785	0.069	0.228
IL1-beta (-511C>T) rs16944 (Chr 2q14)	Controls (*N* = 234)	All cases (*N* = 118)	MPE (*N* = 70)	Urticaria + angioedema (*N* = 31)	DRESS (*N* = 17)
CC	47.0	55.9	52.9	51.6	76.5
CT	43.2	35.6	37.1	38.7	23.5
TT	9.8	8.5	10.0	9.7	0.0
Test for difference (cases vs. controls)					
Categorical model: CC vs. CT vs. TT	–	0.285	0.635	–	–
Dominant model: CC vs. CT + TT	–	0.105	0.372	0.612	0.018
IL1-RN (intron 2-VNTR)§ rs2234663 (Chr 2q13–14)	Controls (*N* = 217)	All cases (*N* = 112)	MPE (*N* = 66)	Urticaria + angioedema (*N* = 29)	DRESS (*N* = 17)
A1A1	65.9	51.8	54.5	48.3	47.1
A1A2	27.2	43.7	40.9	48.3	47.1
A2A2	6.9	4.5	4.6	3.4	5.8
Test for difference (cases vs. controls)					
Categorical model: A1A1 vs. A1A2 vs. A2A2	–	0.009	–	–	–
Dominant model: A1A1 vs. A1A2 + A2A2	–	0.013	0.094	0.063	0.117
IL2 (-330T>G) rs2069762 (Chr 4q26–27)	Controls (*N* = 228)	All cases (*N* = 118)	MPE (*N* = 70)	Urticaria + angioedema (*N* = 31)	DRESS (*N* = 17)
TT	49.1	51.7	51.4	48.4	58.8
TG	40.8	43.2	44.3	45.2	35.3
GG	10.1	5.1	4.3	6.4	5.9
Test for difference (cases vs. controls)					
Categorical model: TT vs. TG vs. GG	–	0.281	0.316	–	–
Dominant model: TT vs. TG + GG	–	0.650	0.711	0.957	0.429
IL4 (-33C>T) rs2070874 (Chr 5q31.1)	Controls (*N* = 229)	All cases (*N* = 118)	MPE (*N* = 70)	Urticaria + angioedema (*N* = 31)	DRESS (*N* = 17)
CC	74.2	77.9	77.1	87.1	64.7
CT	23.6	15.3	15.7	6.4	29.4
TT	2.2	6.8	7.2	6.5	5.9
Test for difference (cases vs. controls)					
Categorical model: CC vs. CT vs. TT	–	–	–	–	–
Dominant model: CC vs. CT + TT	–	0.431	0.610	0.114	0.396
IL5 (–745C>T) rs2069812 (Chr 5q31.1)	Controls (*N* = 212)	All cases (*N* = 118)	MPE (*N* = 70)	Urticaria + angioedema (*N* = 31)	DRESS (*N* = 17)
CC	48.6	51.7	48.6	48.4	70.6
CT	42.0	35.6	38.6	38.7	17.6
TT	9.4	12.7	12.8	12.9	11.8
Test for difference (cases vs. controls)					
Categorical model: CC vs. CT vs. TT	–	0.428	0.688	–	–
Dominant model: CC vs. CT + TT	–	0.559	0.973	0.996	0.077

© 2013 The Authors

Table 4 *Continued*

IL10 (-592C>A) rs1800872 (Chr 1q31–32)	Controls (*N* = 221)	All cases (*N* = 117)	MPE (*N* = 69)	Urticaria + angioedema (*N* = 31)	DRESS (*N* = 17)
CC	61.1	55.6	62.3	51.6	35.3
CA	34.8	34.2	27.6	41.9	47.1
AA	4.1	10.2	10.1	6.5	17.6
Test for difference (cases vs. controls)					
Categorical model: CC vs. CA vs. AA	–	0.077	–	–	–
Dominant model: CC vs. CA + AA	–	0.301	0.886	0.299	0.035
IL16 (-295T>C) rs4778889 (Chr 15q26.3)	Controls (*N* = 211)	All cases (*N* = 118)	MPE (*N* = 70)	Urticaria + angioedema (*N* = 31)	DRESS (*N* = 17)
TT	65.4	66.9	68.6	67.7	58.8
TC	32.2	32.2	30.0	32.3	41.2
CC	2.4	0.9	1.4	0	0
Test for difference (cases vs. controls)					
Categorical model: TT vs. TC vs. CC	–	–	–	–	–
Dominant model: TT vs. TC + CC	–	0.753	0.610	0.784	0.594
TNF Alpha (-308G>A) rs1800629 (Chr 6q21.3)	Controls (*N* = 234)	All cases (*N* = 118)	MPE (*N* = 70)	Urticaria + angioedema (*N* = 31)	DRESS (*N* = 17)
GG	77.4	75.4	75.7	74.2	76.5
GA	20.9	20.4	18.6	22.6	23.5
AA	1.7	4.2	5.7	3.2	0
Test for difference (cases vs. controls)					
Categorical model: GG vs. GA vs. AA	–	–	–	–	–
Dominant model: GG vs. GA + AA	–	0.686	0.775	0.694	0.933

*Frequency
†chi-squared test
‡only dominant models were tested for rare alleles and when expected cell sizes were ≤ 5
§only A1 and A2 alleles were taken into account. DRESS: drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms, IL: interleukin, MPE: maculopapular eruption.

RN, is a receptor antagonist that moderates the effects of the main secreted form of IL1, that is, IL1-beta.[21] Interleukin1-RN-A2 allele may be associated with decreased IL1-Ra levels, and lower IL1-Ra inhibitory activity.[24] Our data correspond to these previous reports describing a synergistic effect between IL1-beta-511 and IL1-RN polymorphisms.

Interleukin1 may be involved in pathogenesis of atopic dermatitis, asthma,[25] delayed-type hypersensitivity and/or contact sensitization.[26] The highly active pro-inflammatory cytokine IL1-beta is essential in antiviral host defence.[27] Over-production of IL1 can enhance viral pathogenesis by triggering a 'cytokine storm' that drives a massive and toxic inflammatory response.[28] These polymorphic variants in the IL1 gene cluster may affect the responses in viral infections caused by CMV, EBV.[29] Mechanisms related to the IL1-RN-A2 allele may be responsible for an overall increase of IL1 production in DRESS patients.

For the first time, we report a significantly higher frequency of the IL10-592A allele in DRESS patients compared to controls ($P = 0.035$). In our controls, the allele percentages were close to those observed by others.[30] IL10 ubiquitously expressed among innate and adaptive immune cells inhibits both Th1 and Th2 production, which limits the ability of antigen-presenting cells to promote the activation of CD4 + T cells, inhibits antigen-specific cytotoxic T cells and makes T cells irreversibly tolerant.[17,31]

The IL10 gene, located on chromosome 1q31–q32, is regulated primarily by transcription, 75% of the variation in IL10 production is genetically determined.[31] Three gene variants in the IL10 promoter located at positions −1082 G/A, −819 **C/T** and −592 C/A are reported to be correlated with IL10 production.[31] Due to complete linkage disequilibrium with the −592 C/A polymorphism, these alleles combine to form three possible haplotypes: GCC, ACC and ATA. The presence of these haplotypes can be determined by analysing the −592 C/A polymorphism, the ATA haplotype is associated with lower IL10 levels both *in vitro* and *in vivo*.[32] Penicillin allergy was not associated with the IL10 promoter genes rs1800871 C/T or with rs1800872 G/T polymorphisms in American patients.[19] In 44 French

© 2013 The Authors

Table 5 Association of haplotypes for IL1-RN VNTR and IL1-beta-511C>T with cutaneous adverse drug reactions

All cases IL1-RN rs2234663 (intron 2-VNTR)	IL1-beta rs16944 (−511C>T)	Controls *N* = 216	All cases *N* = 112	OR (95% CI)*	*P* value
A1	C	0.584	0.581	1.00†	–
A1	T	0.200	0.181	0.95 (0.60–1.52)	0.852
A2	C	0.087	0.176	2.13 (1.23–3.70)	0.007
A2	T	0.119	0.086	0.74 (0.37–1.46)	0.396
MPE IL1-RN rs2234663 (intron 2-VNTR)	IL1-beta rs16944 (−511C>T)	Controls *N* = 216	MPE *N* = 66	OR (95% CI)	*P* value
A1	C	0.594	0.566	1.00	–
A1	T	0.200	0.183	0.95 (0.56–1.61)	0.855
A2	C	0.089	0.145	1.71 (0.86–3.39)	0.120
A2	T	0.119	0.104	0.87 (0.41–1.87)	0.727
Urticaria + angioedema IL1-RN rs2234663 (intron 2-VNTR)	IL1-beta rs16944 (−511C>T)	Controls *N* = 216	Urticaria + angioedema *N* = 29	OR (95% CI)	*P* value
A1	C	0.594	0.522	1.00	–
A1	T	0.200	0.201	1.11 (0.48–2.60)	0.795
A2	C	0.087	0.167	2.02 (0.81–5.00)	0.127
A2	T	0.119	0.109	0.95 (0.30–2.91)	0.928
DRESS IL1-RN rs2234663 (intron 2-VNTR)	IL1-beta rs16944 (−511C>T)	Controls *N* = 216	DRESS *N* = 17	OR (95% CI)	*P* value
A1	C	0.591	0.602	1.00	–
A1	T	0.202	0.104	0.55 (0.13–2.29)	0.411
A2	C	0.089	0.280	3.22 (1.23–8.41)	0.016
A2	T	0.117	0.014	0.48 (0.01–24.06)	0.715

*OR (95% confidence interval).
†Reference.
DRESS, drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms; IL, interleukin; MPE, maculopapular eruption.

patients allergic to betalactam, matched for sex and atopy to 44 patients with bad tolerance to betalactam but without positive skin or provocation tests, the IL10 −819 CT/TT and IL10 −592 CA/AA genotypes were associated with immediate betalactam allergy only in a limited subgroup of atopic women.[16]

IL10 suppresses the ability of effector T cells to prolong inflammatory responses; moreover, it influences viral disease progression.[31] The ATA haplotype has been associated with the seroconversion, severity or the re-activation of EBV infections in children.[33] IL10 −592 C/C carriers can more easily clear EBV than can IL10 −592A allele carriers.[34] As some viruses such as CMV or EBV express a gene that encodes a viral IL10 and produce an IL10 analogue, this study has some limitations.[35,36] Our patients had a different sex ratio than did controls. However, because the genes studied are autosomal, sex differences would not be expected.

In conclusion, we hypothesize that in DRESS, a genetically induced defect in the production of IL10 and a special pattern of IL1-beta production could facilitate hypogammaglobulinemia, the failure of drug tolerance and low antivirus host-defence capacity against HHV family reactivation. Moreover, a disturbance in IL1 control could trigger a cytokine storm that drives a massive and toxic inflammatory response.[28] These abnormalities have not been elucidated in patients with drug-induced MPE.

Acknowledgements

The authors wish to thank D. Forest Tramoy, T. Josse, C. Masson and A. Collet for their excellent technical assistance. The biological assays and genotypes used in this publication were processed on samples kept in the Biobank of the Biochemistry and Molecular Biology Laboratory of the University Hospital of Nancy (54 500, Vandoeuvre les Nancy, France).

Contributions

Recruitment and selection of patients (AB, JW, ACB, BM, JFC, JLS), genetic methods and analyses (IA-G, RG-R, FN, JLG),

© 2013 The Authors
Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology © 2013 European Academy of Dermatology and Venereology

recruitment of controls (BH, RG-R, JLG), Statistical analyses (BH, IA-G), writing of the manuscript (AB, IA-G, BH, JLG), corrections of the manuscript (AB, JW, BH, ACB, MB, JFC, JLS, RG-R, FN, JLG, IA-G).

References

1 Lochmatter P, Beeler A, Kawabata TT *et al.* Drug-specific *in vitro* release of IL-2, IL-5, IL-13, and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy* 2009; **64**: 1269–1278.
2 Hausmann O, Schnyder B, Pichler WJ. Drug hypersensitivity reactions involving skin. *Handb Exp Pharmacol* 2010; **196**: 29–55.
3 Picard D, Janela B, Descamps V *et al.* Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): a multiorgan antiviral T cell response. *Sci Transl Med* 2010; **2**: 46ra62.
4 Kano Y, Inaoka M, Shiohara T. Association between anticonvulsant hypersensitivity syndrome and human herpesvirus 6 reactivation and hypogammaglobulinemia. *Arch Dermatol* 2004; **140**: 183–188.
5 Mardivirin L, Valeyrie-Allanore L, Branlant-Redon E *et al.* Amoxicillin-induced flare in patients with DRESS (Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms): report of seven cases and demonstration of a direct effect of amoxicillin on human herpesvirus 6 replication *in vitro*. *Eur J Dermatol* 2010; **20**: 68–73.
6 Pichler WJ, Beeler A, Keller M *et al.* Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergol Int* 2006; **55**: 17–25.
7 Kaniwa N, Saito Y, Aihara M *et al.* HLA-B*1511 is a risk factor for carbamazepine-induced Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. *Epilepsia* 2010; **51**: 2461–2465.
8 Lonjou C, Borot N, Sekula P *et al.* A European study of HLA-B in Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis related to five high-risk drugs. *Pharmacogenet Genomics* 2008; **18**: 99–107.
9 McCormack M, Alfirevic A, Bourgeois S *et al.* HLA-A*3101 and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans. *N Engl J Med* 2011; **364**: 1134–1143.
10 Kardaun SH, Sidoroff A, Valeyrie-Allanore L *et al.* Variability in the clinical pattern of cutaneous side-effects of drugs with systemic symptoms: does a DRESS syndrome really exist? *Br J Dermatol* 2007; **156**: 609–611.
11 Guéant-Rodriguez RM, Juillière Y, Battaglia-Hsu SF *et al.* Association of IL1B polymorphism with left ventricular systolic dysfunction: a relation with the release of interleukin-1β in stress condition. *Pharmacogenet Genomics* 2011; **21**: 579–586.
12 Barbaud A. Skin testing in delayed reactions to drugs. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009; **29**: 517–535.
13 Brockow K, Romano A, Blanca M *et al.* General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2002; **57**: 45–51.
14 Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Cornejo-Garcia JA *et al.* Gene variants of IL13, IL4, and IL4RA are predictors of beta-lactam allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **122**: 152–158.
15 Cornejo-Garcia JA, Fernandez TD, Torres MJ *et al.* Differential cytokine and transcription factor expression in patients with allergic reactions to drugs. *Allergy* 2007; **62**: 1429–1438.
16 Guglielmi L, Fontaine C, Gougat C *et al.* IL-10 promoter and IL4-Ralpha gene SNPs are associated with immediate beta-lactam allergy in atopic women. *Allergy* 2006; **61**: 921–927.
17 Qiao HL, Wen Q, Gao N *et al.* Association of IL-10 level and IL-10 promoter SNPs with specific antibodies in penicillin-allergic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; **63**: 263–269.
18 Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Viola M *et al.* Association of tumor necrosis factor-alpha -308G>A polymorphism with IgE-mediated allergy to betalactams in an Italian population. *Pharmacogenomics J* 2008; **8**: 162–168.
19 Apter AJ, Schelleman H, Walker A *et al.* Clinical and genetic risk factors of self-reported penicillin allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **122**: 152–158.
20 Huang CZ, Yang J, Qiao HL, Jia LJ. Polymorphisms and haplotype analysis of IL-4Ralpha Q576R and I75V in patients with penicillin allergy. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; **65**: 895–902.
21 Schnuch A, Westphal G, Mössner R, Uter W, Reich K. Genetic factors in contact allergy–review and future goals. *Contact Dermatitis* 2011; **6**: 2–23.
22 Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A *et al.* Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993; **91**: 403–404.
23 Tregouet DA, Garelle V. A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing haplotype effects in association studies. *Bioinformatics* 2007; **23**: 1038–1039.
24 Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 519–550.
25 Zeyrek D, Demir E, Alpman A *et al.* Association of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Turkish children with atopic asthma. *Allergy Asthma Proc* 2008; **29**: 468–474.
26 Nambu A, Nakae S. IL-1 and allergy. *Allergol Int* 2010; **59**: 125–135.
27 Sergerie Y, Rivest S, Boivin G. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. *J Infect Dis* 2007; **196**: 853–860.
28 Poeck H, Ruland J. From virus to inflammation: mechanisms of RIG-I-induced IL-1β production. *Eur J Cell Biol* 2012; **91**: 59–64.
29 Hurme M, Helminen M. Resistance to human cytomegalovirus infection may be influenced by genetic polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Scand J Infect Dis* 1998; **30**: 447–449.
30 de Jongh CM, John SM, Bruynzeel DP *et al.* Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to chronic irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 2008; **58**: 269–277.
31 Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 2008; **226**: 205–218.
32 Eder T, Mayer R, Langsenlehner U *et al.* Interleukin-10 [ATA] promoter haplotype and prostate cancer risk: a population-based study. *Eur J Cancer* 2007; **43**: 472–475.
33 Hurme M, Haanpää M, Nurmikko T *et al.* IL-10 gene polymorphism and herpesvirus infections. *J Med Virol* 2003; **70**: S48–S50.
34 Cheong JY, Cho SW, Hwang IL *et al.* Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; **21**: 1163–1169.
35 Spencer JV, Lockridge KM, Barry PA *et al.* Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* 2002; **76**: 1285–1292.
36 Chao Y, Jing Y, Jia Y *et al.* Conservation and mutation of viral interleukin-10 gene in gastric carcinomas and nasopharyngeal carcinomas. *J Med Virol* 2011; **83**: 644–650.

© 2013 The Authors

C. DRESS

Le DRESS (*Drug Reaction with eosinophilia and systemic symptoms*) est une toxidermie rare mais grave. Il associe habituellement un exanthème cutané, un œdème de la face, de la fièvre, des adénopathies, une éosinophilie et d'autres défaillances multiviscérales survenant au moins 2 semaines après une prise médicamenteuse. Des réactivations de virus de la famille des *herpes viridae* (HHV) sont constatées au cours et au décours des poussées, parfois multiples, du DRESS (Descamps et al., 2001 ; Descamps et al., 2003). Un score permettant d'affirmer le diagnostic avec plus ou moins de certitude a été établi récemment (Kardaun et al, 2007).

Plusieurs hypothèses physiopathologiques ont été proposées pour expliquer la survenue de ce syndrome dont la pathogénie reste cependant largement méconnue.
Comme les autres toxidermies, l'hypothèse d'un déficit immunitaire de la réponse cellulaire T est suspecté, probablement secondaire à la prise médicamenteuse. L'implication directe des virus de la famille herpès est largement suspectée. Quelques auteurs ont montré que le DRESS était lié à une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD8+ dirigés contre les antigènes des virus herpès (Picard et al., 2010). Le médicament serait l'initiateur de cette réaction et induirait les réactivations virales (Mardivirin et al., 2009 ; Mardivirin et al., 2010). La majorité des symptômes cliniques serait directement liée aux réactivations virales. Certains auteurs avaient d'ailleurs proposé d'inclure comme critère diagnostique une PCR pour l'un (au moins) des virus herpès (Shiohara et al., 2007).
Pour autant, il a été récemment montré que ces réactivations virales pouvaient également être détectées au cours d'autres toxidermies telles que les EMP ou la NET, sans évolution vers un DRESS (Bollaert et al., données non publiées ; Teraki et al., 2008). De plus, il a été démontré qu'une hypersensibilité médicamenteuse authentifiée par des tests cutanés positifs peut persister plusieurs années après le DRESS a été démontrée (Barbaud et al, 2013).

Un terrain génétique propice à la survenue d'accidents médicamenteux est suspecté depuis la description de quelques rares cas familiaux d'allergies médicamenteuses ou de récurrences de toxidermies chez des jumeaux monozygotes (Pirmohamed, 2006). La majorité des études génétiques dans le cadre des toxidermies se concentrent sur les toxidermies aux bétalactamines, en particulier immédiates, et étudient des polymorphismes cytokiniques ou le phénotypage HLA dans le cadre d'une approche gène-candidat.

Récemment, certaines associations fortes et spécifiques ont été démontrées, notamment l'association entre HLA-B*1502 et le SSJ secondaire à la carbamazépine chez les chinois Han (Chung et al., 2004) ou l'association entre HLA-B*5701 et l'hypersensibilité induite par l'abacavir dans les populations caucasiennes (Hetherington et al., 2002). Ces associations fortes semblent être spécifiques d'un type de toxidermie induit par un médicament en particulier et dépendantes de l'origine ethnique du patient. Récemment, nous avons identifié, dans une population sélectionnée de patients ayant présenté une toxidermie, 3 polymorphismes cytokiniques associés avec le DRESS : IL1-beta-511 C>T, IL1-RN intron2-VNTR et IL10-592 C>A (chapitre II.B).

Dans le cadre d'une approche innovante, non dépendante de la sélection de gènes candidats, nous avons utilisé la technique d'hybridation génomique comparative sur microréseaux chez des patients DRESS sélectionnés. L'objectif était de déterminer si des variations en nombre de copies (CNV) étaient associées avec la survenue du DRESS.

Parmi 28 patients ayant présenté un DRESS au cours des 6 dernières années, 18 ont été testés à l'aide d'une puce *Agilent* 1M (tableau III.C.1). Treize femmes et 5 hommes ont été inclus avec un âge moyen de 52,1 ans. Cinq patients avaient un score de Kardaun calculé à 5, 7 patients avaient un score de 6 et 6 patients un score de 7 (Kardaun et al., 2007). Les PCR virales étaient positives chez 12/18 patients ; 8 cas pour Epstein-Barr virus, 6 et 5 cas respectivement pour HHV6 et HHV7 et 1 cas pour le cytomegalovirus. Aucune PCR virale n'était positive chez 2 patients. Les médicaments responsables du DRESS étaient majoritairement les bétalactamines ou la pristinamycine (4 patients pour chaque molécule). La carbamazépine était incriminée dans 3 cas et l'allopurinol dans 1 cas.

Au total, nous avons identifié 674 variations chez l'ensemble des patients et disséminées sur tous les chromosomes lors de l'analyse initiale.
Le premier filtre a consisté à vérifier les variations d'intersection communes à au moins 2 patients. Ceci a permis de retenir 54 variations (tableau III.C.1). Nous avons ensuite vérifié si ces variations étaient identifiées chez des patients hybridés avec au moins 2 témoins différents. Vingt sept variations étaient partagées par plusieurs patients hybridés avec le même témoin et avec des bornes très proches. Ces variations correspondent probablement à un « effet miroir », c'est à dire l'identification d'une variation exclusive au seul témoin. Six autres variations n'ont pas été retenues dans la suite de l'analyse car partagées par plusieurs patients mais

hybridés avec le même témoin. Il est à noter que la variabilité des bornes de ces variations et le sens parfois inverse des variations ne permettent pas de supposer qu'il s'agit d'un effet miroir. Le choix de ne retenir que les variations identifiées avec plusieurs témoins renforce le caractère spécifique des variations retenues. Qui plus est, la majorité de ces variations n'était présente que chez 2 patients, ce qui ne les rend pas prioritaire.
Ainsi, 23 variations étaient retenues (tableau III.C.2).
Nous avons ensuite vérifié chacune de ces variations à l'aide des bases de données en ligne, DGV, UCSC et DECIPHER et évalué les gènes d'intérêt éventuellement contenus au sein de ces variations.
Nous avons utilisé les critères suivants pour retenir comme « prioritaire » l'une ou l'autre variation : (i) variation partagée par au moins 3 voire 4 patients et (ii) contenant des gènes OMIM (donnant la possibilité d'études de validation au niveau protéique, par exemple).
La vérification de chacune de ces variations en comparaison avec les bases de données est rendue difficile par le fait que, dans la très grande majorité des cas, les variations rapportées n'ont pas exactement les mêmes bornes et qu'elles ont été identifiées à l'aide de techniques différentes. Le tableau III.C.3 précise si les variations identifiées dans cette étude sont notifiées dans les bases de données, ainsi que leurs fréquences rapportées. Lorsque les bornes des variations étaient trop différentes, il ne nous est pas paru pertinent de préciser la fréquence rapportée dans DGV. Quelques phénotypes délétères sont rapportés dans DECIPHER, incluant certaines CNV identifiées, mais tous ces phénotypes étaient en fait associés à des délétions ou des duplications beaucoup plus larges.

Deux variations sont apparues comme d'un intérêt très prioritaire.

La première, portée par le chromosome 12, était un CNV de type amplification, partagée par 4 patients (identifiée avec 2 témoins). Cette variation comprise entre 21,7 et 41,3 kb et contenant le gène KLRC2, n'est pas rapportée dans la base locale PECAMORE. Une variation de plus grande taille avec une fréquence de 1/95 est notée dans DGV et une duplication beaucoup plus grande associée à un phénotype délétère dans DECIPHER est associée à une variation sur le chromosome 4.
Nous avons également noté que 2 autres patients présentaient une variation dans la même région du chromosome 12, comportant, comme la précédente le gène KLRC2. Cette 2ème variation était présente chez 2 patients hybridés avec le même témoin (donc initialement éliminée). Elle mesurait entre 15,5 et 24,5 kb. La plus petite de ces variations était identifiée

chez 2 patients PECAMORE (0,07%).
Au total, une variation contenant le gène KLRC2 a été identifiée chez 6/18 patients DRESS (33%), alors que sa fréquence dans la base PECAMORE est au maximum de 0,07% et de 1% dans DGV.

La seconde variation, portée par le chromosome 16, était un CNV partagé par 4 patients (hybridés avec 2 témoins), de type amplification pour 3 patients et délétion pour le dernier. La variation était comprise entre 25,9 et 46,5 kb. L'amplification n'était pas notée dans PECAMORE et la délétion était identifiée chez 1 patient (0,08%). Des délétions et variations plus larges étaient rapportées dans DGV avec une fréquence maximale estimée à 1/6 (17%). Plusieurs patients avec des duplications non concordantes (bornes beaucoup plus larges) sont rapportés dans DECIPHER. Cette variation contenait le gène CESP1.
Dans cette même région, nous avons également identifié une amplification de 3 à 41,6 kb partagée par 5 patients hybridés avec le même témoin et contenant également le gène CESP1 ainsi qu'une délétion de 8,6 à 20,7 kb chez 2 patients, rapportée chez 2 patients PECAMORE (0,07%) emportant le gène CES1.
Au total, 9/18 patients (50%) présentaient une variation dans cette région dont 6 amplifications de CESP1, 2 amplifications de CESP1 et délétions de CES1 et 1 délétion de CESP1, alors que la fréquence de ces variations était au maximum de 17% dans DGV et 0,08% dans PECAMORE.

Tableau III.C.1 : Caractéristiques des patients DRESS et résultats de la CGH. NR : non réalisé, CGH : hybridation comparative génomique, CNV : variation en nombre de copies, 1 : groupement ester, 2 : groupement amide, 3 : groupement élargi.

	Sexe	Age	Score DRESS	Réactivation virale	Médicament ou classe médicamenteuse suspect	Formule chimique	CGH control	CNV identifiées	CD4/CD8	Dosage pondéral Ig
1	M	56	6	NR	Corticostéroides*		H1	a-KLRC2	1,78	N
2	F	40	5	NR	Pristinamycine*	1	F1	a-CESP1	3,92	
3	F	75	6	-	Ranélate de strontium, bétalactamine*	2 _ 0	F1	d-CES1, a-CESP1	9,71	N
4	M	55	5	-	Pristinamycine*	3	H1	a-KLRC2	1,84	IgM=0,30 IgG et IgA N
5	F	69	7	EBV, HHV6, HHV7	Allopurinol	0	F2	d-CES1, a-CESP1	2,19	IgG=5,8 IgA et IgM N
6	M	41	7	EBV	Bétalactamine*	2	H2			IgM=3,01 IgA=5,68 IgG N
7	M	63	5	EBV, HHV7	Carbamazépine*	3	H1		4,93	N
8	F	60	6	NR	Carbamazépine*	3	F1	a-KLRC2, a-CESP1	2,24	IgG=4,22 IgA=0,37 IgM<0,2
9	F	47	5	IgM anti-CMV	Pristinamycine et macrolide (2 poussées)	1	F1		3,94	IgM=3,2 IgG et IgA N
10	F	91	7	CMV, HHV6	Allopurinol	0	F1	a-CESP1	ND	N
11	F	29	6	HHV7	Bétalactamine*	2	F1	a-KLRC2, a-CESP1	3,5	N
12	M	18	7	HHV6	Minocycline	2	H1			IgG=23 IgM=2,61 IgA N
13	F	71	5	EBV	Carbamazépine*	3	F1		3,5	IgM=0,34 IgA=0,45 IgG N
14	F	46	7	EBV, HHV7	Pristinamycine* et glycopeptide*	1 _ 2	F2	a-CESP1	0,9	N
15	F	23	6	HHV6, HHV7	Salazopyrine	0	F2	a-CESP1	3,14	IgG=19 IgM et IgA N
16	F	31	6	EBV, HHV6, HHV7	Inhibiteur de pompe à protons*	0	F3	a-KLRC2	1,55	IgG=17,6 IgM et IgA N
17	F	65	6	EBV	Bétalactamine* and quinolone*	2 _ 0	F3	d-CESP1	ND	ND
18	F	57	7	EBV	Produit de contraste iodé*	3	F3	a-KLRC2	?	?

Tableau III.C.2 : Variations d'intersection. Chr : chromosome, Nb : nombre, Ampli, A : amplification, Del, D : délétion, DGV : database genomic variation, diff : différentes, EM : effet miroir.

Chr	Bande	Nb de sondes déviantes	Taille de la variation (min-max) pb	Ampli/Del	Nb de patients	Nb de témoins	PECAMORE Nb (%)	DGV	Conclusion
1	p.36.33	3-24	4143-48348	D	3	2	0	D plus larges	
2	p.24.3	12-14	75726-87411	D	6	1	0	D (bornes diff)	Probable EM
3	p.11.1	12-13	23829-27590	A	6	1	1 (0,08)	Pas d'A	Probable EM
4	p.16.3	3-14	7211-59696	A	4	2	0	Pas d'A (bornes très diff)	
4	p.16.1	3-5	4839-13788	A	3	1	0	A plus larges	Probable EM
5	q.11.2	3-4	3567-14461	A	3	1	0	Pas d'A	Probable EM
5	q.33.1	7-17	17470-57781	A	8	4	0	rapporté	
5	q.35.3	62-78	142140-184124	D	7	1	0	D décrite	Probable EM
6	q.23.2	3-4	3231-8688	A	2	1	0	A plus large	Probable EM
6	q.23.2	4-5	4137-11097	A	3	1	0	Pas d'A	Probable EM
7	p.22.3	12-200	27382-766125	D	2	1	0	rapporté	Non Retenu
7	p.22.3	5-23	11631-28175	A/D	4	2	4 (0,32)	A plus larges, D plus courtes	
7	p.22.3	6-80	12888-185994	D	2	2	3 (0,10)	rapporté	
7	p.15.2	4-44	4212-43326	D	3	3	1 (0,08)	D plus larges	
7	p.13	5-6	10081-18199	A/D	2	2	1 (0,08)	A plus larges	
7	q.21.12	3-5	340418736	A/D	4	2	0/1 (0,08)	A/D plus larges	
7	q.36.3	4-11	3754-18233	A/D	3	2	1 (0,08)/3 (0,24)	D plus larges, pas d'A	
8	p.22	5-6	38727-61985	A	4	1	1 (0,08)	A plus larges	Probable EM
8	p.22	6-7	12314-15877	A	8	1	1 (0,08)	A plus larges	Probable EM
8	q.24.23	31-32	16569-182854	A	4	1	2 (0,16)	rapporté	Probable EM
9	p.21.3	4	22070-39605	A/D	4	3	2 (0,16)/0	D décrite	
9	q.34.3	9-32	24074-74991	D	2	2	0	D plus larges	
11	p.15.1	3-6	4180-17655	A	2	1	0	Pas d'A	Probable EM
11	q.12.2	7-9	10117-15103	A/D	2	1	1 (0,08)/0	Rapportées (bornes diff)	Non retenu
11	q.13.1	5-11	6312-26915	D	2	1	0	D plus larges	Non retenu

12	p.13.2	10-15	21689-41318	A	4	2	0	A plus larges	
12	p.13.2	6-7	15485-24490	A	2	1	2 (0,07)	A plus larges	Probable EM
12	q.21.32	3-4	5181-10485	A	4	1	0	Pas d'A	Probable EM
12	q.24.31	11-12	17207-22631	D	4	1	0	D plus petites	Probable EM
13	q.12.11	13-14	28993-43928	D	3	1	1 (0,03)	D (bornes diff)	Probable EM
14	q.21.1	7-8	39881-65263	A	4	1	1 (0,08)	A plus larges	Probable EM
14	q.21.1	7-8	39881-65263	A	2	1	1 (0,03)	A plus larges	Probable EM
16	p.13.3	5-6	11258-18925	D	2	2	0	D plus larges	
16	p.13.2-p.13.1	11-22	53287-354780	A	2	2	2 (0,16)	A plus petites	
16	p.11.2-p.11.1	105-106	67491-12041025	D	3	1	0	D (bornes diff)	Probable EM
16	q.12.2	3-11	3093-41601	A	5	1	0	A plus larges	Non retenu
16	q.12.2	10-12	25920-46487	A/D	4	2	0/2 (0,07)	A/D plus larges	
16	q.24.3	31-62	73756-148070	A/D	2	2	1 (0,08)/0	A/D plus larges	
17	p.13.1	3-4	5275-18541	A	3	1	0	A plus larges	Probable EM
17	q.21.32	20-97	19533-94112	A/D	2	2	0/0	A/D plus larges	
18	q.23	4-43	4912-118662	A/D	2	1	1/1 (0,08)	A/D plus larges	Non retenu
19	p.13.2	10-11	23501-35889	D	2	1	0	D (bornes diff)	Probable EM
20	p.12.3-p.12.2	34-36	79164-88715	D	4	1	0	D plus petites	Probable EM
20	p.12.2	17-20	35201-45911	D	4	1	0	Pas de D	Probable EM
20	q.13.11	4-5	5250-12655	A	5	1	0	Pas d'A	Probable EM
20	q.13.33	3-4	4003-9666	D	2	2	1 (0,08)	D plus larges	
20	q.13.33	3-37	6980-84859	A/D	3	2	2 (0,16)/0	A plus larges/ D (bornes diff)	
20	q.13.33	4-8	3770-10716	D	2	2	0	Pas de D	
22	q.11.21	95-159	600739-792275	D	3	1	2 (0,07)	D (bornes diff)	Non retenu
22	q.13.33	3-4	4572-9853	D	2	1	6 (0,47)	D plus larges	Probable EM
22	q.13.33	3-9	3719-17962	A/D	2	2	0/6 (0,47)	A/D plus larges	
X	p.22.33	4-35	2611-99603	A/D	6	3	0/2 (0,06)	A/D plus petites	
X	q.22.2	35-39	125451-169667	D	7	1	4 (0,32)	rapportée	Probable EM
X	q.26.2	4-5	16062-34740	D	4	1	5 (0,39)	Pas de D	Probable EM
X	q.26.2	34-37	71862-87425	D	4	1	5 (0,39)	D (bornes diff)	Probable EM

Tableau III.C.3 : Variations partagées par au moins 2 témoins. Chr : chromosome, Ampli, A : amplification, Del, D : délétion, Nb : nombre, DGV : database genomic variant, diff : différentes, dup : duplication, NC : non concordant.

Chr	Bande	Taille de la variation (min-max) pb	Ampli/ Del	Nb de patients	Nb de témoins	PECAMORE Nb (%)	DGV		DECIPHER	Gènes	Conclusion
1	p.36.33	4143-48348	D	3	2	0	D plus larges	1 à 3/443	Del1p36 NC	-	Non prioritaire
4	p.16.3	7211-59696	A	4	2	0	Pas d'A (bornes très diff)		Dup4p NC	-	Non prioritaire
5	q.33.1	17470-57781	A	8	4	0	Rapporté	20/90	Del NC	-	Non prioritaire
7	p.22.3	11631-28175	A/D	4	2	4 (0,32)	A plus larges, D plus courtes		Del/Dup NC	C7orf50	Non prioritaire
7	p.22.3	12888-185994	D	2	2	3 (0,10)	Rapporté	1/6	Del NC	C7orf50	Non prioritaire
7	p.15.2	4212-43326	D	3	3	1 (0,08)	D plus larges	1/6	Del/Dup NC	HOXA11-AS	Non prioritaire
7	p.13	10081-18199	A/D	2	2	1 (0,08)	A plus larges	1/6	Del NC	CAMK2B	Non prioritaire
7	q.21.12	340418736	A/D	4	2	0/1 (0,08)	A/D plus larges	D 1/6, A A/1557	Del NC	-	Non prioritaire
7	q.36.3	3754-18233	A/D	3	2	1 (0,08)/3 (0,24)	D plus larges, pas d'A	1/6	Del/Dup NC	DNAJB6	Non prioritaire
9	p.21.3	22070-39605	A/D	4	3	2 (0,16)/0	D décrite, A (bornes très diff)	D 2/4	Del/Dup NC	-	Non prioritaire
9	q.34.3	24074-74991	D	2	2	0	D plus larges	4/95	Del/Dup NC	KCNT1	Non prioritaire
12	p.13.2	21689-41318	A	4	2	0	A plus larges	1/95	Dup NC	**KLRC2**	
16	p.13.3	11258-18925	D	2	2	0	D plus larges	1/6	Del/Dup NC	TRAF7	Non prioritaire
16	p.13.2-p.13.1	53287-354780	A	2	2	2 (0,16)	A plus petites		Del/Dup NC	PDXDC1	Non prioritaire
16	q.12.2	25920-46487	A/D	4	2	0/2 (0,07)	A/D plus larges	A et D 1/6	Dup NC	**CESP1**	
16	q.24.3	73756-148070	A/D	2	2	1 (0,08)/0	A/D plus larges	A 1/6, D 2/6	Del/Dup NC	CDH15, ACSF3, LINC00304	Non prioritaire
17	q.21.32	19533-94112	A/D	2	2	0/0	A/D plus larges	A 1/95, D 1/186	-	HOXB5, HOXB6, HOXB7	Non prioritaire
20	q.13.33	4003-9666	D	2	2	1 (0,08)	D plus larges	7/95	Del/Dup NC	SLCO4A1	Non prioritaire
20	q.13.33	6980-84859	A/D	3	2	2 (0,16)/0	A plus larges/ D plus larges	A 1/6, D 13/95	Del/Dup NC	KCNQ2	Non prioritaire
20	q.13.33	3770-10716	D	2	2	0	D (bornes très diff)		Del/Dup NC	UCKL1	Non prioritaire
22	q.13.33	3719-17962	A/D	2	2	0/6 (0,47)	A/D plus larges	A 4/31, D 1/6	Del/Dup NC	FAM19A5	Non prioritaire
X	p.22.33	2611-99603	A/D	6	3	0/2 (0,06)	A/D plus petites		Del/Dup NC	PPP2R3B	Non prioritaire

Discussion

Au cours de ce travail, nous avons identifié plusieurs gènes de susceptibilité des hypersensibilités médicamenteuses :

i. Le gène NOD2 en association avec l'hypersensibilité aux bétalactamines
ii. Les gènes IL1-RA, IL1β et IL10 dans les DRESS
iii. Les gènes KLRC2 et CESP1 dans les DRESS.

A. Hypersensibilités aux bétalactamines

Nous rapportons l'association de polymorphismes de NOD2 chez des patients ayant présenté une HS aux BL dans 2 populations différentes, italienne et espagnole.
Le polymorphisme rs2066845 était associé avec un effet protecteur en cas d'HS aux BL, en particulier immédiate.
La fréquence de ce polymorphisme dans la population testée était inférieure à

- celle de la population témoin (2 à 3x inférieure),
- celle rapportée dans des populations allemandes (Weidinger et al., 2005a ; Weidinger et al., 2005b ; Rebane et al., 2012), ou dans une population italienne (Galluzzo et al., 2011),
- celle constatée dans la seconde cohorte étudiée, espagnole.

Au contraire, le polymorphisme rs5743293 était associé à un risque d'HS aux BL dans la population espagnole avec une fréquence 8 fois supérieure à celle constatée dans la population témoin, mais également supérieure à la fréquence constatée dans la cohorte italienne étudiée.
Ce type d'association en miroir pour 2 polymorphismes de NOD2 a déjà été mis en évidence dans des maladies coronariennes (Galluzzo et al., 2011).
L'association de polymorphismes du gène NOD2 avec l'hypersensibilité aux bétalactamines montrée ici dans 2 populations européennes devrait être confirmée dans des populations d'origines ethniques différentes. En outre, le rôle de ce gène dans ces hypersensibilités pourrait être évalué d'un point de vue fonctionnel, notamment grâce à l'analyse des voies de signalisation *in vitro*, par la constitution d'un modèle animal ou l'analyse du modèle murin

existant (Rozieres et al., 2012). Les conséquences fonctionnelles de ces polymorphismes sur la protéine nod2 et les interactions gène-environnement devraient être précisées.

A ce jour, le polymorphisme rs5743293 est déjà précisé comme étant responsable de la production d'une protéine tronquée dans sa région riche en répétitions de leucine. Quelques études sur des modèles murins ou sur des macrophages humains ont suggéré que cela conduisait à un gain de fonction de la protéine avec hyperactivation du facteur NFκB et de la caspase-1 ainsi qu'à une majoration de la sécrétion de TNFα. A l'inverse, le polymorphisme rs2066845 également localisé dans le même domaine (riche en répétitions de leucines) est associé avec une réponse moins importante des cellules phagocytaires lors de la détection de particules bactériennes et une production cytokinique diminuée (Corréa et al., 2012).

Le gène NOD2, hormis son association forte avec les maladies inflammatoires du colon, est associé à l'asthme et l'atopie. Cette association n'a été démontrée que dans des populations allemandes, autrichiennes ou néerlandaises (Kabesch et al., 2003 ; Weidinger et al., 2005a ; Eder et al., 2006 ; Reijmerink et al., 2010). D'autres polymorphismes associés à l'atopie ou l'inflammation ont été identifiés comme facteurs de risque pour l'HS aux BL, tels que les gènes codant pour l'IL4, IL4R, IL10, IL13, LACTB ou le TNFα ; ce dernier étant même une cible du gène NDOD2 (Apter et al., 2008 ; Cornejo-Garcia et al., 2012 ; Guglielmi et al., 2006 ; Guéant-Rodriguez et al., 2006 ; Guéant-Rodriguez et al., 2008). Plus récemment, l'hypothèse d'une homologie entre les allergènes de l'environnement et les haptènes des BL pour expliquer le lien entre atopie et HS aux BL a été proposée (Cornejo-Garcia et al., 2012). Cette étude confirme le rôle possible des gènes impliqués dans l'atopie dans l'hypersensibilité médicamenteuse et, en particulier l'hypersensibilité aux bétalactamines.

B. Toxidermies médicamenteuses, cohorte française

Au cours de la seconde étude, nous avons mis en évidence l'association entre 3 polymorphismes (rs16944, rs2234663, rs1800872) et les DRESS en comparaison avec les témoins.

La fréquence du polymorphisme rs16944 (IL1β) était supérieure chez les patients DRESS par rapport à la population contrôle (p=0,018). Au locus 2q12-q21, l'haplotype A2C (combinant les polymorphismes rs16944 et rs2234663) était associé avec la survenue d'un DRESS (OR=3,22, p=0,016).

Si le polymorphisme rs16944 est associé à une production normale d'IL1β, le polymorphisme rs2234663 aurait un impact sur la production d'IL1-Ra (Dinarello, 2009). L'IL1-Ra est un antagoniste du récepteur de l'IL1. Se liant au récepteur, il bloque l'accès de l'IL1 et tout particulièrement de l'IL1-β qui est la forme majoritairement sécrétée de l'IL1 (Schnuch et al., 2011). Cette protéine module et modère donc les effets pro-inflammatoires de l'IL1. En cas d'allèle A2, la production d'IL1-Ra serait diminuée impactant ainsi son activité inhibitrice (Dinarello, 2009).

Les données de cette étude corroborent l'effet synergique déjà décrit de ces 2 polymorphismes.

Dans le cadre du modèle physiopathologique du DRESS, il est intéressant de noter que l'IL1β est une cytokine proinflammatoire très active qui joue un rôle essentiel dans la défense anti-virale. En effet, les polymorphismes de l'IL1, désignant à la fois les gènes codant pour l'IL1α, IL1β et l'ILA-Ra (ou IL1-RN) moduleraient les réponses aux infections virales par CMV ou EBV (Hurme et al., 1998 ; Sergerie et al., 2007). En cas d'haplotype A2-C, l'IL1-Ra jouerait de façon moins importante son rôle de régulateur négatif de l'IL1-β à l'occasion d'une infection par les virus du groupe herpès tels que le CMV ou l'EBV induisant une surproduction d'IL1, un « orage cytokinique », une augmentation de l'effet pathogène viral et une réponse inflammatoire toxique massive (Poeck et al., 2012).

Au cours de cette étude, nous avons également constaté une fréquence significativement élevée du polymorphisme rs1800872 (IL10) chez les patients DRESS comparés à la population contrôle (p=0,035). La fréquence allélique calculée dans la population témoin était proche de celle rapportée précédemment (de Jongh et al., 2008). L'IL10 est une interleukine

d'expression ubiquitaire dans les cellules de l'immunité innée et adaptative. Elle inhibe à la fois la production Th1 et Th2, limite ainsi l'activation des lymphocytes T CD4+ par les cellules présentatrices d'antigènes, inhibe les cellules cytotoxiques antigènes-spécifiques et rend les cellules T tolérantes de façon irréversible (Qiao et al., 2007 ; Mosser et al., 2008). Son expression est très majoritairement génétiquement prédéterminée (Mosser et al., 2008).

Trois variants du promoteur de l'IL10, rs1800896 (-1082G/A), rs1800871 (-819C/T) et rs1800872 (-592C/A) sont corrélés à la production d'IL10 (Mosser et al., 2008). Ces 3 variants sont en déséquilibre de liaison. Trois haplotypes sont décrits : GCC, ACC et ATA et l'analyse du polymorphisme rs1800872 permet de déterminer l'haplotype du patient étudié. L'haplotype ATA est associé avec le plus faible niveau d'expression de l'IL10 tant *in vivo* que *in vitro* (Eder et al., 2007).

L'IL10 empêche les cellules T effectrices de prolonger la réponse inflammatoire et influe sur la progression de l'infection virale (Mosser et al., 2008). Il a été démontré que l'haplotype ATA était associé à des séroconversions plus tardives chez l'enfant et des infections plus sévères à EBV (Hurme et al., 2003). De même, les patients porteurs de l'allèle A pour le polymorphisme rs1800872 (soit porteur de l'haplotype ATA), sont reconnus comme étant moins « efficaces » pour développer une immunité anti-HBV (Cheong et al., 2006). Au final, l'haplotype ATA augmenterait la séroconversion de l'EBV, accentuerait la sévérité de l'infection à EBV et favoriserait la réactivation de ce virus (Cheong et al., 2006 ; Mosser et al., 2008).

Une fois encore, ces considérations sont tout à fait conformes au modèle actuel de DRESS au cours duquel de multiples réactivations virales sont constatées.

En conclusion, il existerait au cours du DRESS une prédisposition génétique responsable,
(i) d'une réponse inflammatoire majeure liée, notamment, à un patron spécifique de production de l'IL1-β pouvant faciliter l'hypogammaglobulinémie,
(ii) d'un défaut de production de l'IL10, suivi d'une rupture de tolérance médicamenteuse, d'une faible défense anti-virale et de réactivations virales, en particulier à EBV.
Ces éléments concordent tout à fait avec la vision actuelle de la physiopathologie de cette maladie.
Ainsi, le défaut de contrôle de l'IL1 et les réactivations virales induiraient un « orage cytokinique » responsable d'une réponse inflammatoire massive et toxique au cours du DRESS.

Ces résultats devraient être confirmés dans une plus large cohorte. La validation de ces résultats d'un point de vue fonctionnel est également importante.

C. DRESS

La réalisation d'hybridation comparative en microréseau chez 18 patients sélectionnés ayant présenté un DRESS syndrome nous a permis d'identifier 2 CNV particulièrement pertinentes, chacune partagée par 4 patients. L'analyse d'autres CNV localisées dans la même région que ces 2 CNV nous a permis d'identifier, respectivement, 2 et 5 patients supplémentaires présentant des variations impliquant les gènes CESP1 et KLRC2.

A notre connaissance, cette étude est la première à utiliser la CGH pour évaluer des patients atteints d'hypersensibilité médicamenteuse. Malgré le faible nombre de patients de cette étude, nous avons pu identifier de nouveaux gènes d'intérêt pour ce type de pathologie.
La pertinence des CNV identifiés est d'abord liée à leur fréquence dans la population étudiée : 33 et 50% versus 0 et 0,7% dans la base PECAMORE ; versus 1 et 16,7% dans la base DGV (en tenant compte de variations de tailles plus importantes dans cette dernière base de données). Les gènes contenus dans ces CNV, KLRC2 et CESP1, sont des gènes codant pour un modulateur immunitaire impliqué dans la réponse aux infections des virus du groupe herpès et pour un régulateur de la carboxylestérase 1. Or, les infections des virus du groupe herpès, de même que les voies de métabolisation des médicaments semblent jouer un rôle très important dans la physiopathologie du DRESS. En effet, des réactivations virales et une rupture de tolérance du médicament sont probablement en jeux dans cet accident médicamenteux.

Le gène KLRC2, également appelé NKG2C, code pour un récepteur de type lectine C, de la famille des récepteurs *natural killer* (NK), qui confèrent aux lymphocytes T des propriétés et une activité cytotoxique (Jost et al., 2013). Ces récepteurs sont HLA-E dépendants et vont détruire les cellules cibles par la reconnaissance de molécules HLA-E qui appartiennent au complexe majeur d'histocompatibilité non classique Ib (Adams et al., 2013). Ils forment des hétérodimères avec le CD94 : CD94/NKG2A ou CD94/NKG2C exprimés à la surface des cellules NK. Le récepteur NKG2A est le récepteur inhibiteur qui a une liaison covalente forte avec HLA-E ; tandis que NKG2C est le récepteur activateur portant un motif activateur de tyrosinase dans sa partie intracellulaire. Ces 2 récepteurs sont portés par des populations différentes de lymphocytes T cytotoxiques. La proportion de ces 2 populations varie en fonction notamment, d'un contexte infectieux (Jost et al., 2013).

Par ailleurs, il a été montré que les récepteurs NKG2A étaient portés par des cellules plus immatures que les récepteurs NKG2C lesquels sont portés par des cellules en voie terminale de différenciation, avec alors de plus faibles capacités de prolifération (Arlettaz et al., 2004 ; Sundström et al., 2007).

Dans les conditions « habituelles » d'une infection à HHV et en particulier à CMV, il a été démontré que la proportion de LT cytotoxiques présentant un récepteur NKG2C passait de 2 à 25% afin d'activer la voie Th2 et de provoquer la lyse cellulaire des cellules infectées. Parallèlement, le CMV produisait un peptide mimant HLA-E afin de maintenir une réponse inhibitrice (Guma et al., 2006 ; Pietra et al., 2003). Au cours de la primo-infection à EBV, la durée des symptômes coïncide avec la proportion de lymphocytes T CD8+. Or, un terrain génétique particulier pourrait prédisposer certains individus à une réponse T CD8+ excessive au cours de ce type d'infection (Hislop et al., 2007).

Par ailleurs, il a été récemment montré que dans les SSJ et les NET, une expression accrue de HLA-E existait dans les kératinocytes. Une augmentation de l'expression de NKG2C dans les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK au niveau épidermique (liquide extrait à partir des bulles intraépidermiques) et dans le sang circulant était également notée chez ces patients. Ces données seraient en faveur d'une lyse kératinocytaire HLA-E dépendante, par les cellules cytotoxiques porteuses du récepteur NKG2C, au cours de certains accidents médicamenteux (Morel et al., 2010).

Au cours des SSJ et NET, la présence de HLA-E à la surface des kératinocytes pourrait être induite par l'IFN-γ et le TNF-α. Dans les DRESS, les LT cytotoxiques seraient majoritairement des LT CD8+ spécifiques de l'EBV sécrétant d'importantes quantités de TNF-α, IFN-γ et IL2.

Enfin, une expression élevée de granulysine dans les lymphocytes T NKG2C+ a été rapportée. La granulysine est une molécule cytotoxique sécrétée par les lymphocytes T et les cellules NK au cours des SSJ ou NET et dont l'expression augmente parallèlement à la sévérité de la toxidermie et des nécrolyses épidermiques (Meresse et al., 2006 ; Morel et al., 2010).

Or, lors d'une récente étude, nous avons pu montrer une sécrétion de granulysine d'intensité et de localisation variable au cours de différentes hypersensibilités médicamenteuses, EMP, DRESS, SSJ et NET (Weinborn, données non publiées). Récemment encore, une sécrétion de granulysine avait déjà été démontrée dans différentes toxidermies, probablement en lien avec des cellules NK (Schlapbach et al., 2011).

Au cours des DRESS, le marquage était situé au niveau épidermique et dermique, tandis qu'il était principalement dermique superficiel dans les EMP et épidermique ou dermique superficiel dans les SSJ et NET. L'intensité était également notée comme croissante entre les EMP et les SSJ et NET en passant par les DRESS (Weinborn, données non publiées).
La granulysine étant en particulier, sécrétée par des lymphocytes NKG2C+, ces éléments nous semblent être une première confirmation fonctionnelle de nos résultats.

De plus, de récentes études portant sur l'analyse histologique de prélèvements cutanés de différentes hypersensibilités semblent plaider pour des lésions similaires, notamment au cours des hypersensibilités médiées par les lymphocytes T (Verneuil et al., 2011). Cependant, il était noté des lésions endothéliales ou de nécrose d'intensités variables et situées à des niveaux différents au sein du revêtement cutané (épiderme, derme superficiel ou profond). Des données similaires ont été constatées lors de l'étude de Weinborn et al. (Weinborn et al., données non publiées). Ceci est également concordant avec l' « impression clinique » d'un continuum ou parfois d'un chevauchement entre certaines toxidermies (Bouvresse et al., 2012 ; Kardaun et al., 2013 ; Pichler, 2003 ; Teraki et al., 2009).
L'hypothèse de facteurs génétiques déterminant notamment les mécanismes immunologiques, les réactions inflammatoires ou cytotoxiques, en cas de rupture de tolérance d'un médicament, pour induire un accident médicamenteux plutôt qu'un autre, à l'occasion de la prise d'une molécule donnée paraît assez séduisante. Elle paraît soutenue par :
(i) l'identification de facteurs génétiques communs à un type de toxidermie quelle que soit la molécule donnée,
(ii) la notion d'un continuum clinique entre différentes toxidermies,
(iii) sans être en contradiction avec l'identification de facteurs génétiques prédisposant à la survenue d'accidents médicamenteux variés lors de la prise d'une molécule donnée.

La carboxylestérase 1 (CES1) est une des principales enzymes du métabolisme des médicaments. Il s'agit d'une enzyme principalement hépatique. Elle métabolise les médicaments comportant un groupement ester, thio-ester, carbamate ou amide et les substrats de cet enzyme ont généralement un petit groupement alcool et un large groupement acyl (Laizure et al., 2013). Cependant, il n'existe pas de spécificité des substrats pour cette enzyme. Si chacun des médicaments listés ci-après sont principalement métabolisés par la CES1, ils peuvent également l'être par d'autres enzymes. Parmi les médicaments habituellement métabolisés par cette enzyme, on trouve : le clopidogrel, certains inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, l'oseltamivir, le mycophenolate mofetil ou des traitements anticancéreux tels que l'irinotécan. Ces médicaments sont métabolisés sous des formes actives de la molécule tandis que d'autres, tels que le methylphénidate, sont métabolisés par la même enzyme en agents inactifs (Fujiyama et al., 2010).

Cette enzyme a une expression et une activité variables, augmentant notamment avec l'âge (Yang et al., 2009 ; Zhu et al., 2009). Son niveau d'expression est contrôlé par des récepteurs nucléaires, en particulier, le *Pregnane X Receptor* (PXR) ou le récepteur constitutif de l'androstane (CAR), qui contrôlent également d'autres enzymes impliquées dans la détoxification cellulaire et le métabolisme des médicaments comme le cytochrome P450 (Jones et al., 2013 ; Staudinger et al., 2010). Cependant, la corrélation entre son niveau d'expression et son activité est débattue.

Deux variants (SNP) ayant un impact fonctionnel sur la protéine sont d'ores et déjà identifiés, dont celui localisé en position 428, remplaçant une guanine par une adénosine responsable d'une modification des acides aminés (acide glutamique remplaçant une glycine) qui affecterait les capacités d'hydrolyse, notamment du methylphenydate, du clopidogrel ou de l'oseltamivir (Lewis et al., 2013 ; Tarkiainen et al., 2012 ; Zhu et al., 2013). Une délétion de l'exon 6 avec décalage du cadre de lecture et production d'une protéine tronquée serait responsable d'une perte de fonction de la protéine.

D'autres facteurs semblent influencer son activité, notamment des médicaments tels que l'amoxicilline, la ciprofloxacine et l'érythromycine, le lopéramide, les statines, certains antidiabétiques oraux ou les analogues du cholestérol, mais également, les dérivés sulfonamide qui auraient une action inhibitrice tandis que d'autres médicaments tels que le diclofénac ou la ticlopidine seraient des activateurs de cette même enzyme (Fukami et al., 2010 ; Tsurkan et al., 2013 ; Wadkins et al., 2004 ; Zhu et al., 2010). L'IL6 pourrait également moduler l'expression de CES1 en la diminuant.

En outre, il a été démontré que l'expression et l'activité de cette enzyme pouvait être

modulées par une infection virale, notamment à HVC, et qu'elle modifiait l'évolution d'une infection à HVC (Blais et al., 2010).

Le gène CESP1 ne code pas pour une protéine tandis que sa séquence est identique à celle de CES1. Il s'agit donc d'un pseudogène (Fukami et al., 2008) dont le rôle, qui n'est pas précisément connu, pourrait être celui d'inhiber le gène CES1.

Le rôle des gènes codant pour le métabolisme des médicaments a déjà été suspecté mais n'a jusqu'ici jamais été mis en évidence.

Actuellement, l'implication du médicament dans le déclenchement d'un accident médicamenteux tel que le DRESS pourrait être lié :

(i) à la présence d'HLA spécifique lors de la reconnaissance du médicament (susceptibilité génétique) ou,

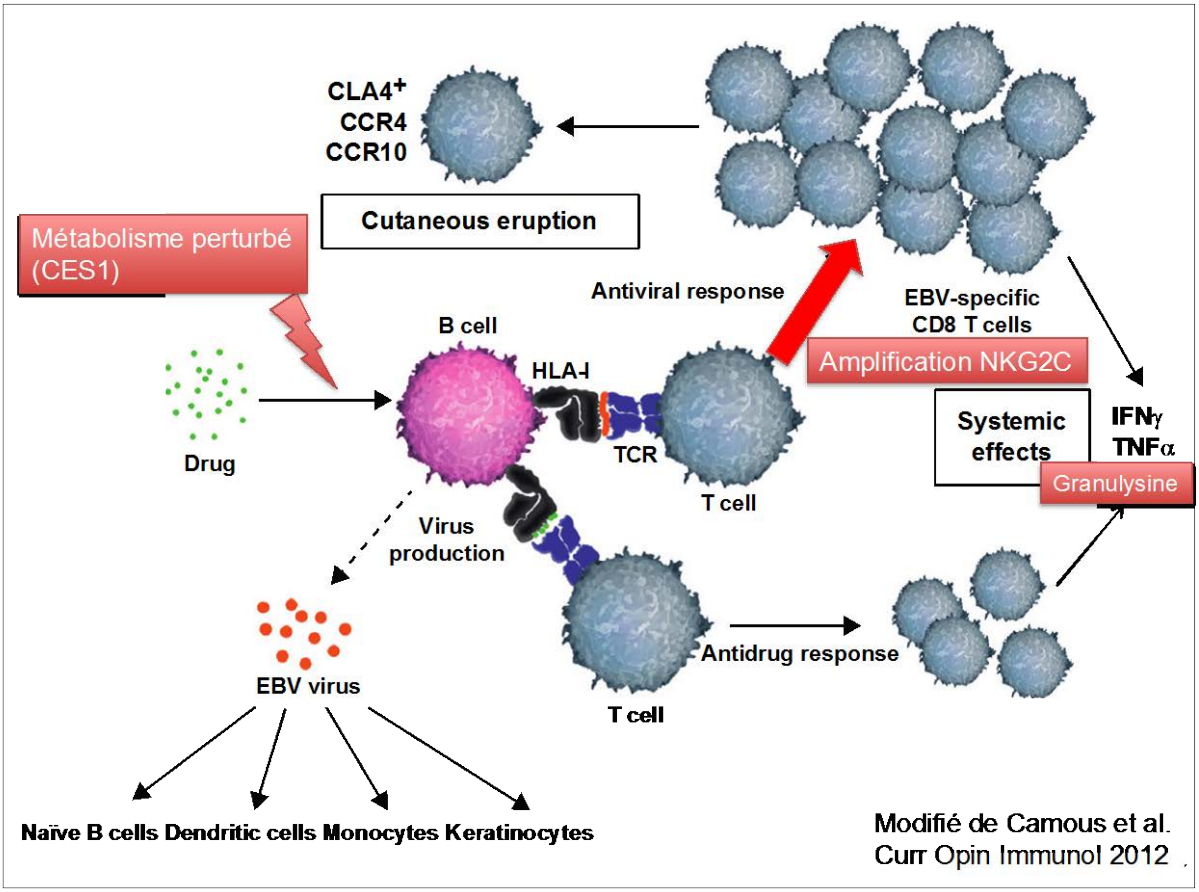
(ii) à l'induction d'un « signal danger » par la présence d'adduits sur le médicament, ces derniers s'étant accumulés du fait d'un stress oxydatif et de la présence de médiateurs tels que l'IL6, l'IFN-γ ou le TNF-α (Camous et al., 2012).

L'activité de la carboxylestérase, qui a une expression très majoritairement hépatique, pourrait être dosée au niveau cutané (Prusakiewicz et al., 2006). Cependant, l'hypothèse formulée ici serait celle d'une activité diminuée. La mesure de l'activité périphérique de cette enzyme déjà faible paraît dès lors difficile à effectuer. La mesure de son activité hépatique n'est pas réalisable, en l'absence de prélèvements hépatiques disponibles et du caractère invasif de ces prélèvements.

La mise en évidence, au cours de notre étude, d'un nombre important de patients ayant une amplification du gène NKG2C (KLRC2) et/ou du gène CESP1, nous conduit à proposer plusieurs hypothèses physiopathologiques concernant la survenue de DRESS. A l'occasion d'un traitement médicamenteux, les médicaments sont métabolisés par différentes voies, dont celle de la carboxylestérase 1. En cas d'amplification du gène inhibiteur de la carboxylestérase ou de délétion du gène codant pour l'enzyme, le métabolisme passant par cette voie serait perturbé et déficient. D'autres voies de métabolisation prendraient le relais mais cette métabolisation pourrait être moins efficace ou produire des peptides présentés aux cellules de l'immunité déclenchant une réaction d'hypersensibilité. Ce phénomène pourrait être amplifié par la production de cytokines qui augmenterait le « signal danger » et stimulerait les cellules cytotoxiques. On sait aujourd'hui que certains médicaments responsables de DRESS induisent et facilitent des réactivations virales. Ces dernières seraient elle mêmes responsables d'une partie, au moins, des symptômes constatés au cours du DRESS tels que l'hépatotoxicité. La réponse antivirale, faisant intervenir les lymphocytes T cytotoxiques pourrait être amplifiée par la présence de NKG2C en excès, augmentant encore l'effet cytotoxique, notamment par la sécrétion de granulysine au niveau cutané (fig IV.1).
Le DRESS est une conjonction d'évènements : hypersensibilité médicamenteuse, réactivations virales, activation de LT cytotoxiques détruisant certains organes. Notre étude semble confirmer à la fois le rôle du médicament et celui du système immunitaire dans la survenue de ce type d'accident.

L'intérêt de cette étude tient également au fait qu'elle s'est intéressée à des patients ayant présenté un DRESS déclenché par différents médicaments alors que jusqu'ici, la très grande majorité des études conduites sur le sujet s'est focalisée sur des patients de même origine ethnique ayant présenté une toxidermie à un médicament particulier. Les CNV mises en évidence au cours de cette étude pourraient donc constituer des éléments communs aux patients à risque de DRESS quelle que soit la molécule déclenchante, et constituer par conséquent un facteur de risque génétique commun, alors que les déterminants génétiques jusqu'ici démontrés l'étaient pour une ethnie particulière et/ou pour un type d'accident à une molécule donnée.
En outre, l'utilisation de puces CNV pangénomiques nous a permis de ne pas formuler d'hypothèse *a priori* sur les gènes candidats et de ne pas nous limiter aux connaissances préalables du terrain génétique des hypersensibilités médicamenteuses.

Figure IV.1 : Schéma adapté de Camous et al., 2012, représentant le déroulement d'un DRESS.



Bien entendu, ces résultats doivent être confirmés

1. sur une plus large population de patients DRESS
2. chez des patients avec une origine ethnique différente
3. à l'échelle fonctionnelle.

Conclusion et Perspectives

Au cours de ce travail, nous avons pu identifier de nouveaux gènes impliqués dans les toxidermies à la fois par une approche de gènes candidats et par une approche pangénomique innovante.
Nous avons, pour la première fois, évalué l'association des gènes NOD 1 et 2 avec des hypersensibilités médicamenteuses dans 2 larges populations.
Nous avons, pour la première fois, montré l'association de polymorphismes de gènes codant pour l'IL1β et IL1-RN et du gène codant pour l'IL10 avec le DRESS.
Enfin, nous avons pu identifier 2 nouveaux gènes candidats, KLRC2 et CESP1 grâce à une analyse pangénomique CNV chez 18 patients DRESS sélectionnés.

Il est intéressant de noter que l'ensemble de ces résultats ne sont pas en contradictions les uns avec les autres. Les gènes NOD1 et NOD2 vont notamment moduler la sécrétion de l'IL1β et de l'IL10. Les lymphoxytes T cytotoxiques porteurs du récepteur NKG2C vont être responsables d'une réponse inflammatoire majeure via l'induction de diverses cytokines. La carboxylestérase 1, ubiquitaire est particulièrement exprimée dans les monocytes et les macrophages, tout comme le gène NOD2. Or, ces cellules sont les sentinelles épidermiques largement impliquées dans l'immunité innée et adaptative.

Ces résultats devraient être confirmés dans des cohortes de même origine ethnique ou d'autre origine. En effet, les fréquences alléliques des SNP et les fréquences des CNV varient en fonction de l'origine ethnique. Nos études ont inclus des patients européens dans des régions telles que la Lorraine où le brassage ethnique peut être important. Pour autant, il est important de noter que l'ensemble des patients inclus était caucasien. Il est donc important de vérifier si les associations identifiées sont, ou non, spécifiques des caucasiens.
La confirmation de ces résultats pourra être réalisée par le séquençage des gènes candidats, par l'analyse exhaustive des SNP de ces mêmes gènes voire par l'étude des cofacteurs et régulateurs de ces gènes.

Les mécanismes sous-tendant les associations que nous avons décrites mériteraient d'être précisés à l'échelle fonctionnelle.
Plusieurs approches peuvent être pour cela envisagées.
En particulier, l'analyse de modèles murins doit être effectuée.
A notre connaissance, peu de modèles murins d'hypersensibilité médicamenteuse ont été développés. L'un d'entre eux est spécifique des hypersensibilités aux bétalactamines (Rozières et al., 2010). Un autre modèle de NET et SSJ a été développé par l'injection des LT CD8+ de patients avec administration du médicament responsable (Saito et al., 2013).
Le peu de modèles disponible pourrait nous inciter à développer d'autres modèles, notamment un modèle de DRESS.
L'utilisation de souris ko pourrait également être utile, notamment pour évaluer l'importance des gènes candidats identifés.
Un modèle intégrant les différents gènes étudiés devrait être également construit.

Une étude immuno-histochimique des prélèvements cutanés de patients DRESS pour certains marqueurs identifiés tels que NKG2C serait très pertinente. Une expression de ce marqueur est déjà connue dans les EMP ou les SSJ/NET (Morel et al., 2010). Le caractère non spécifique de la granulysine vis à vis des SSJ/NET et la sécrétion probable de cette molécule par des LT CD8+ NKG2C+ sont des arguments indirects pour l'identification d'un tel marquage.

Le dosage des enzymes de métabolisation des médicaments telles que la carboxylestérase ne paraît pas très aisé, en particulier dans une situation où une diminution de cette activité, déjà faible, est attendue. L'analyse des métabolites produits chez les patients, en comparaison avec ceux de sujets volontaires sains pourrait confirmer l'impact des variations identifiées sur le métabolisme des médicaments.
L'analyse du pseudogène de la carboxylestérase, de son rôle et de son mode d'action devra être effectuée.

Enfin, si nous avons pu identifier de nouveaux gènes candidats, notamment pour les DRESS, il reste certainement d'autres facteurs de risque à découvrir pour les hypersensibilités médicamenteuses. De nouveaux outils, tels que les outils de séquençage à haut débit, sont aujourd'hui disponibles pour tenter de comprendre plus avant la physiopathologie complexe de ces accidents.

Bibliographie

Adams EJ, Luoma AM. The adaptable major histocompatibility complex (MHC) fold: structure and function of nonclassical and MHC class I-like molecules. Annu Rev Immunol 2013;31:529-561.

Alfirevic A, Pirmohamed M. Drug-induced hypersensitivity reactions and pharmacogenomics: past, present and future. Pharmacogenomics 2010;11:497-499.

Almal SH, Padh H. Implications of gene copy-number variation in health and diseases. J Hum Genet 2012;57:6-13.

Amstutz U, Ross CJD, Castro-Pastrana LI, Rieder MJ, Shear NH, Hayden MR, et al. HLA-A*31:01 and HLA-B*15:02 as genetic markers for carbamazepine hypersensitivity in children. Clin Pharmacol Ther 2013;94:142-149.

Apter AJ, Schelleman H, Walker A, Addya K, Rebbeck T. Clinical and genetic risk factors of self-reported penicillin allergy. J Allergy Clin Immunol 2008;122:152-158.

Arlettaz L, Villard J, de Rham C, Degermann S, Chapuis B, Huard B, et al. Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by disctinc subsets of committed CD8+ TCR αβ lymphocytes. Eur J Immunol 2004;34:3456-3464.

Arlt MF, Wilson TE, Glover TW. Replication stress and mechanisms of CNV formation. Curr Opin Genet Dev 2012;22:204-210.

Bansal K, Balaji KN. Intracellular pathogen sensor NOD2 programs macrophages to trigger Notch1 activation. J Biol Chem 2011;287:5823-5835.

Barbaud A, Reichert-Penetrat S, Tréchot P, Jacquin-Petit MA, Ehlinger A, Noirez V, et al. The use of skin testing in the investigation of cutaneous adverse drug-reactions. Br J Dermatol 1998;139:49-58.

Barbaud A. Skin testing in delayed reactions ti drugs. Immunol Allergy Clin North Am 2009;29:517-535.

Barbaud A, Collet E, Milpied B, Assier H, Staumont D, Avenel-AudranM et al. A multicenter study to determine the value and safety of drug patch tests for the three main classes of severe cutaneous adverse drug reactions. Br J Dermatol 2013;168:555-562.

Billmann-Born S, Till A, Arlt A, Lipinski S, Sina C, Latiano A, et al. Genome-wide expression profiling identifies an impairment of negative feedback signals in the Crohn's disease-associated NOD2 variant L1007fsinsC. J Immunol 2011;186:4027-4038.

Blais DR, Lyn RK, Joyce MA, Rouleau Y, Steenbergen R, Barsby N et al. Activity-based protein profilingidentifies a host-enzyme, carboxylesterase 1, which is differentially active during hepatitis C virus infection. J Biol Chem 2010;285:25602-25612.

Bouvresse S, Valeyrie-Allanore L, Ortonne N, Konstantinou MP, Kardaun SH, Bagot M, et al. Toxic epidermal necrolysis, DRESS, AGEP: do overlap cases exists? Orphanet J Rare Dis 2012;7:72.

Britschgi M, Steiner UC, Schmid S, Depta JP, Senti G, Bircher A, et al. T-cell involvement in drug-induced acute generalized exanthematous pustulosis. J Clin Invest. 2001;107:1433-41.

Brockow K, Romano A, Blanca M, Ring J, Pichler WJ, Demoly P. General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. Allergy 2002;57:45-51.

Calligaris L, Stocco G, De ludicibus S, Marino S, Decorti G, Barbi E, et al. Carbamazepine hypersensitivity syndrome triggered by a human herpes virus reactivation in a genetically predisposed patient. Int Arch Allergy Immunol 2009;149:173-177.

Camous X, Calbo S, Picard D, Musette P. Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms: an update on pathogenesis. Curr Opin Immunol 2012;24:730-735.

Cantsilieris S, White SJ. Correlating multiallelic copy number polymorphisms with disease susceptibility. Hum Mutat 2013;34:1-13.

Carneiro LAM, Magalhaes JG, Tattoli I, Philpott DJ, Travassos LH. Nod-like proteins in inflammation and disease. J Pathol 2008;214:136-148.

Chantarangsu S, Mushiroda T, Mahasirimongkol S, Kiertiburanakul S, Sungkanuparph S, Manosuthi W, et al. HLA-B*3505 allele is a strong predictor for nevirapine-induced skin adverse drug reactions in HIV-infected Thaï patients. Pharmacogenet Genomics 2009;19:139-146.

Cheong JY, Cho SW, Hwang Il, Yoon SK, Lee JH, Park CS, et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-α gene promoter polymorphisms. J Gastroenterol Hepatol 2006;21:1163-1169.

Chessman D, Kostenko L, Lethborg T, Purcell AW, Williamson NA, Chen Z et al. Human leukocyte antigen class I-restricted activation of CD8+ T cells provides the immunogenetic basis of a systemic drug hypersensitivity. Immunity 2008;28:822-832.

Chung WH, Hung SJ, Hong HS, Hsih MS, Yang LC, Ho HC et al. A marker of Stevens-Jonhson syndrome. Nature 2004;428:486.

Cornejo-Garcia JA, Gueant-Rodriguez RM, Torres MJ, Blanca-Lopez N, Tramoy D, Romano A, et al. Biological and genetic determinants of atopy are predictors of immediate-type allergy to betalactams, in Spain. Allergy 2012;67:1181-1185.

Correa RG, Milutinovic S, Reed JC. Roles of NOD1 (NLRC1 and NOD2 (NLRC2 in innat immunity and inflammatory diesases. Biosci Rep 2012;32:597-608.

Daley D, Lemire M, Akhabir L, Chan-Yeung M, He JQ, McDonald T et al. Analyses of associations with asthma in four asthma population samples from Canada and Australia. Hum Genet 2009;125:445-459.

Demoly P, Viola M, Gomes E, Romano A. Epidemiology and causes of drug hypersensitivity. In Pichler WJn ed. Drug Hypersensitivity. Basel: Karger 2007:2-17.

Demoly P, Hillaire-Buys D, Raison-Peyron N, Godard P, Michel FB, Bousquet J. Identifier et comprendre les allergies médicamenteuses. Med Sci 2003;19:327-336.

Descamps V, Valance A, Edlinger C, Fillet AM, Grossin M, Lebrun-Vignes B, et al. Association of Human herpesvirus 6 infection with drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms. Arch Dermatol 2001;137:301-304.

Descamps V, Mahé E, Houhou N, Abramowitz L, Rozenberg F, Ranger-Rogez S et al. Drug induced hypersensitivity syndrome associated with Epstein-Barr virus infection. Br J Dermatol 2003;148:1032-1034.

Descamps V, Ben Saïd B, Sassolas B, Truchetet F, Avenel-Audran M, Girardin P, et al. Prise en charge du drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). Ann Dermatol Venereol 2010;137:703-708.

Descotes J, Choquet-Kastylevsky G. Gell and Coombs classification: is it still valid? Toxicology 2001;158:43-49.

de Jongh CM, John SM, Bruynzeel DP, Calkoen F, van Dijk FJ, Khrenova L, et al. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to chronic irritant contact dermatitis. Contact Dermatitis 2008;58:267-277.

Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu Rev Immunol 2009;27:519-550.

Duan W, Mehta AK, Magalhaes JG, Ziegler SF, Dong C, Philpott DJ et al. Innate signals from Nod2 Block respiratory tolerance and program Th2 driven allergic inflammation. J Allergy Clin Immunol 2010;126:1284-1293.

Eder T, Mayer R, Langsenlehner U, Renner W, Krippi P, Wascher TC, et al. Interleukin-10 [ATA] promotor haplotype and prostate cancer risk: a population-based study. Eur J Cancer 2007;43:472-475.

Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrländer C et al. Association between exposure to farming, allergies and genetic variation in CARD4/NOD1. Allergy 2006;71:1117-1124.

Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptative immunity. Immunity 2007;26:445-459.

Fujiyama N, Miura M, Kato S, Sone T, Isobe M, Satoh S. Carboxylesterase 1 and 2 in the hydrolysis of mycofenolate mofetil. Drug Metab Dis 2010;38:2210-2217.

Fukami T, Nakajima M, Maruichi T, Takahashi S, Takamiya M, Aoki Y, et al. Structure and characterization of human carboxylesterase 1A1, 1A2 and 1A3 genes. Pharmacogenet Genomics 2008;18:911-920.

Fukami T, Takahashi S, Nakagawa N, Maruichi T, Nakajima M, Yokoi T. In vitro evaluation of inhibitory effects of antidiabetic and antihyperlipidemic drug on human carboxylesterase activities. Drug Metab Dis 2010;38:2174-2178.

Gao N, Qiao HL, Jia LJ, Tian X, Zhang YW. Relationships between specific serum IgE, IgG, IFN-γ level and IFN-γ, IFNR1 polymorphisms in patients with penicillin allergy. Eur J Clin Pharmacol 2008;64:971-977.

Galluzzo S, Patti G, Dicuonzo G, Di Sciascio G, Tonini G, Ferraro E, et al. Association between NOD2/CARD15 polymorphisms and coronary artery disease: a case-control study. Hum Immunol 2011;72:636-640.

Gatanaga H, Yazaki H, Tanuma J, Honda M, Genka I, Teruya K, et al. HLA-Cw8 primarily associated with hypersensitivity to nevirapine. AIDS 2007;21:264-265.

Génin E, Schumacher M, Roujeau JC, Naldi L, Liss Y, Kazma R, et al. Genome-wide association study of Steven-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Europe. Orphanet J Rare Dis 2011;6:52.

Gennis MA, Vemuri R, Burns EA, Hill JV, Miller MA, Spielberg SP. Familial occurrence of hypersensitivity to phenytoin. Am J Med. 1991;91:631-634.

Gerber BO, Pichler WJ. Cellular mechanism of T-cell mediated drug hypersensitivity. Curr Opin Immunol 2004;16:732-737.

Gonçalo M, Coutinho I, Teixeira V, Gameiro AR, Brites MM, Nunes R, et al. HLA-B*58:01 is a risk factor for allopurinol induced DRESS and SJS/TEN in a Portuguese population. Br J Dermatol 2013.doi: 10.1111/bjd.12389.

Green VJ, Pirrmohamed M, Kitteringham NR, Gaedigk A, Grant DM, Boxer M, et al. Genetic analysis of microsomal epoxide hydrolase in patients with carbamazepine hypersensitivity. Biochem Pharmacol 1995;50:1353-1359.

Gueant-Rodriguez RM, Romano A, Beri-Derxheimer M, Viola M, Gaeta F, Gueant JL. Gene-gene interactions of IL13 and IL4RA variants in immediate allergic reactions to betalactam antibiotics. Pharmacogenet Genomics 2006;16:713-719.

Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Viola M, Tramoy D, Gaeta F, Romano A. Assocation of tumor necrosis factor-α -308G>A polymorphism with IgE-mediated allergy to betalactams in an Italian population. Pharmacogenomics J 2008;8:162-168.

Guéant-Rodriguez RM, Julière Y, Battaglia-Hsu SF, Debard R, Gérard P, Reyes P, et al. Association of IL1B polymorphism with left ventricular systolic dysfunction: a relation with the release of interleukin-1β in stress condition. Pharmacogenet Genomics 2011;21:579-581.

Guglielmi L, Fontaine C, Gougat C, Avinens O, Eliaou JF, Guglielmi P, et al. IL-10 promoter and IL4-Rα gene SNPS are associated with immediate β-lactam allergy in atopic women. Allergy 2006;61:921-927.

Guma M, Cabrera C, Erkizia I, Bofill M, Clotet B, Ruiz L, et al. Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. J Infect Dis 2006;194:38-41.

Hetherington S, Hughes AR, Mosteller M, Shortino D, Baker KL, Spreen W, et al. Genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir. Lancet 2002;359:1121-1122.

Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, et al. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associated with transplant-related mortality and GvHD following allogenic stem cell transplantation. Blood 2004;104:889-894.

Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr Virus. Annu Rev Immuno 2007;25:587-617.

Huang CZ, Yang J, Qiao HL, Jia LJ. Polymorphisms and haplotype analysis of IL-4Rα Q576R and I75V in patients with penicillin allergy. Eur J Clin Pharmacol 2009;65:895-902.

Huang CZ, Zou D, Yang J, Qiao HL. Polymorphisms of STAT6 and specific serum IgE levels in patients with penicillin allergy. Int J Clin Pharmacol Ther 2012;50:461-467.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2-leucine rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;441:599-602.

Hung SI, Chung WH, Liou LB, Chu CC, Lin M, Huang HP, et al. HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse drug reactions caused by allopurinol. PNAS 2005;102:4134-4139.

Hurme M, Helminen M. resistance to human cytomegalovirus infection may be influenced by genetic polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor antagonist genes. Scand J Infect Dis 1998;30:447-449.

Hurme M, Haanpää M, Nurmikko T, Wang XY, Virta M, Pessi T, et al. IL10 gene polymorphism and herpes virus infections. J Med Virol 2003;70:S48-50.

Hysi P, Kabesch M, Moffatt MF, Schedel M, Carr D, Zhang Y, et al. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. Hum Mol Genet 2005;14:935-941.

Illing PT, Vivian JP, Dudek NL, Kostenko L, Chen Z, Bharadwaj M, et al. Immune self-reactivity triggered by drig-modified HLA-peptide repertoire. Nature 2012;486:554-558.

Johansson SGO, Hourihane JOB, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy: an EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. Allergy 2001;56:813-824.

Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the nomenclature review committee of the world allergy organization, October 2003. J Allergy Clin Immunol 2004;113:832-836.

Johnson-Reagan L, Bahna SL. Severe drug rashes in three siblings simultaneously. Allergy 2003;58:445-447.

Jones RD, Taylor AM, Tong EY, Repa JJ. Carboxylesterases are uniquely expressed among tissues and regulated by nuclear hormone receptors in the mouse. Drug Metab Dispos 2013;41:40-49.

Jost S, Atfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells. Annu Rev Immunol 2013;31:163-194.

Kabesch M, Peters W, Carr D, Leupold W, Weiland SK, von Mutius E. Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing 15 and allergy in two German populations. J Allergy Clin Immunol 2003;111:813-817.

Kang HR, Jee YK, Kim YS, Lee CH, Jung JW, Kim SH, et al. Positive and negative associations of HLA class I alleles with allopurinol-induced SCARs in Koreans. Pharmacogenet Genomics 2011;21:303-307.

Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Tohkin M, Kurose K, et al. HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptics and allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. Pharmacogenomics 2008;9:1617-1622.

Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G. Intracellular NOD-like receptors in host-defense and disease. Immuntiy 2007;27:549-559.

Kardaun SH, Sidoroff A, Valeyrie-Allanore L, Halevy S, Davidovici BB, Mockenhaupt M, et al. Variability in the clinical pattern of cutaneous side-effects of drugs with systemic symptoms: does a DRESS syndrome really exist. Br J Dermatol 2007;156:609-611.

Kardaun SH, Sekula P, Valeyrie-Allanore L, Liss Y, Chu CY, Creamer D, et al. Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS): an original multisystem adverse drug reaction. Results from the prospective RegiSCAR study. Br J Dermatol 2013;doi:10.1111/bjd.12501.

Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Sampas N, Braves T, et al. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. Nature 2008;453:56-64.

Kim SH, Lee SK, Kim SH, Park HW, Chang YS, Lee KW et al. Tuberculosis drug-induced hypersensitivity syndrome and its association with human leukocyte antigen. Tuberculosis 2013;93:270-274.

Ku CS, Tan EK, Cooper DN. From the periphery to centre stage: de novo single nucleotide variants play a key role in human genetic disease. J Med Genet 2013;50:203-211.

Laizure SC, Herring V, Hu Z, Witbrodt K, Parker RB. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? Pharmacotherapy 2013;33:210-222.

Le Bourhis L, Benko S, Girardin SE. Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. Biochem S Trans 2007;35:1479-1484.

Lewis JP, Horenstein RB, Ryan K, O'Connel JR, Gibson Q, Mitchell BD, et al. The functional G143E variant of carboxylesterase 1 is associated with increased clopidogrel active metabolite levels and greater clopidogrel response. Pharmacogenet Genomics 2013;23:1-8.

Lilja G, Wickman M. Allergy – atopy – hypersensitivity- a matter of definition. Allergy 1998;53:1011-1012.

Littera R, Carcassi C, Masala A, Piano P, Serra P, Ortu F, et al. HLA-dependent hypersensitivity to nevirapine in Sardinian HIV patients. AIDS 2006;20:1621-1626.

Lonjou C, Thomas L, Borot N, Ledger N, de Toma C, LeLouet H, et al. A marker for Stevens-Johnson syndrome ...: ethnicity matters. Pharmacogenomics J. 2006;6:265-268.

Lonjou C, Borot N, Sekula P, Ledger N, Thomas L, Halevy S, et al. European study of HLA-B in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis related to five high-risk drugs. Pharmacogenet Genomics 2008;18:99-107.

Macaluso F, Nothnagel M, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Bechara FG, Epplen JT, et al. Polymorphisms in NACHT-LRR (NLR) genes in atopic dermatitis. Exp Dermatol 2007;16:692-698.

Mallal S, Nolan S, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7 and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. Lancet 2002;359:727-732.

Manuyakorn W, Siripool K, Kamchaisatian W, Pakakasama S, Visudtibhan A, Vilaiyuk S, et al. Phenobarbital-induced severe cutaneous adverse drug reactions are associated with CYP2C19*2 in Thaï children. Pediatr Allergy Immunol 2013;24:299-303.

Mardivirin L, Descamps V, Lacroix A, Delebassée S. Early effects of drugs responsible for DRESS on HHV-6 replication in vitro. J Clin Virol 2009;49:300-302.

Mardivirin L, Valeyrie-Allanore L, Branlant-Redon E, Beneton N, Jidar K, Barbaud A, et al. Amoxicillin-induced flare in patients with DRESS (Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms): report of seven cases and demonstration of a direct effect of amoxicillin on Human Herpesvirus 6 replication in vitro. Eur J Dermatol 2010;20:68-73.

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: 462-472.

McCormack M, Alfirevic A, Bourgeois S, Farrell JJ, Kasperaviciute D, Carrington M, et al., HLA-A*3101 and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans. N Engl J Med 2011;364:1134-1143.

Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, et al. Repromming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease J Exp Med 2006;203:1343-1455.

Micelli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, Prieur AM, Manouvrier-Hanu S, Häfner R, et al. CARD15 mutations in Blau syndrome. Nat Genet 2001;29:19-20.

Ming L, Wen Q, Qiao HL, Dong ZM. Interleukin-18 and IL18 -607A/C and -137G/C gene polymorphisms in patient with penicillin allergy. J Int Med Res 2011;39:388-398.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 2001;19:683-765.

Morel E, Escamochero S, Cabanas R, Diaz R, Fiandor A, Bellon F. CD94/NKG2C is a killor effector molecule in patients with Stevens-Jonhson syndrome and toxic epidermal necrolysis. J Allergy Clin Immunol 2010;125:703-710.

Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. Immunol Rev 2008;226:205-218.

Naisbitt DJ, Gordon SF, Pirmohamed M, Park K. Immunological principles of adverse drug reactions. Drg Saf 2000;23:483-507.

Nelson MR, Bacanu SA, Mosteller M, Li L, Bowman CE, Roses AD, et al. Genome-wide approaches to identify pharmacogenetic contributions to adverse drug reactions. Pharmacogenomics J 2009;9:23-33.

Nemos C, Bursztejn AC, Jonveaux P. Gestion des variations du nombre de sequences génomiques (CNV) en génétique humaine constitutionnelle utilisant l'hybridation génomique comparative en microréseau d'AND (HGCM). Pathol Biol 2008;56:354-361.

Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Werts C, Boneca IG, Jéhanno M, et al. The frameshift mutation in Nod2 results in unresponsiveness not only to nod2- but also nod1-activating peptidoglycan agonists. J Biol Chem 2005;280:35859-35867.

Niihira H, Kakamu T, Fujita Y, Kaneko S, Morita E. HLA-A31 strongly associates with carbamazepine-induced adverse drug reactions but not carbamazepine-induced lymphocyte proliferation in a Japanese population. J Dermatol 2012;39:594-601.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease Nature 2001;411:603-606.

Onuma H, Tohyama M, Imagawa A, Hanafusa T, Kobayashi T, Kano Y, et al. High frequency of HLA B62 in fulminant type 1 diabetes with the drug-induced hypersensitivity syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2012;97:E2277-E2281.

Ozeki T, Mushiroda T, Yowang A, Takahashi A, Kubo M, Shirakata Y, et al. Genome-wide association study identifies HLA-A*3101 allele as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population Hum Mol Genet 2011;20:1034-1041.

Phillips EJ, Mallal SA. Pharmacogenetics of drug hypersensitivity. Pharmacogenomics 2010;11:973-987.

Picard D, Janela B, Descamps V, D'incan M, Courville P, Jacquot S, et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic cymptoms (DRESS): a multiorgan antiviral T cell response. Sci Transl Med 2010;2:46ra62.

Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions. Ann Intern Med 2003,139:683-693.

Pichler WJ. Direct T-cell stimulations by drugs-bypassing the innate immune system. Toxicology 2005;09:95-100.

Pichler WJ, Naisbitt DJ, Park K. Immune pathomechanism of drug hypersensitivity reactions. J Allergy Clin Immunol 2011;127:S74-81.

Pietra G, Romagnani C, Mazzarino P, Falco M, Millo E, Moretta A, et al. HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes. PNAS 2003;100:10896-10901.

Pirmohamed M. Genetic factors in the predisposition to drug-induced hypersensitivity reactions. AAPS J 2006;8:E20-26.

Poeck H, Ruland J. From virus to inflammation: mechanisms of RIG-I-induced IL-1β production. Eur J Cell Biol 2012;91:59-64.

Pompeu YA, Stewart JD, Mallal S, Philipps E, Peters B, Ostrov DA. The structural basis of HLA-associated drug hypersensitivity syndromes. Immunol Rev 2012;250:158-166.

Ponvert C, Perrin Y, Bados-Albiero A, Le Bourgeois M, Karila C, Delacourt C et al. Allergy to betalactam antibiotics in children: results of a 20-year study based on clinical history, skin and challenge tests. Pediatr Allergy Immunol 2011 ;22 :411-418.

Prusakiewicz JJ, Ackermann C, Voorman. Comparison of skin esterase activities from different species. Pharmaceutical Res 2006 ;23 :1517-1524.

Qiao HL, Yang J, Zhang YW. Specific serum IgE levels and FcεRIβ genetic polymorphism in patients with penicillins allergy. Allergy 2004;59:1326-1332.

Qiao HL, Yang J, Zhang YW. Relationships between specific serum IgE, cytokines and polymorphisms in the IL-4, IL-4Rα in patients with penicillins allergy. Allergy 2005;60:1053-1059.

Qiao HL, Wen Q, Gao N, Tian X, Jia LJ. Association of IL-10 level and IL-10 promoter SNPs with specific antibodies in penicillin-allergic patients. Eur J Clin Pharmacol 2007;63:263-269.

Rebane A, Zimmermann M, Aab A, Baurecht H, Koreck A, Karelson M et al. Mechanisms of IFN-γ-induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 2012;129:1297-1306.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. Nature 2006;444:444-454.

Reijmerink NE, Bottema RWB, Kerkhof M, Gerritsen J, Stelma FF, Thijs C, et al. TLR-related pathway analysis: novel gene-gene interactions in the development of asthma and atopy. Allergy 2010;65:199-207.

Romano A, De Santis A, Romito A, Di Fonso M, Venuti A, Gasbarrini GB, et al. Delayed hypersensitivity to aminopenicillins is related to major histocompatibility complex genes. Ann Allergy Asthma Immunol 1998;80:433-437.

Romano A, Blanca M, Torres MJ, Bircher A, Aberer W, Brockow K, et al; ENDA; EAACI. Diagnosis of non-immediate reactions to beta-lactam antibiotics. Allergy.2004;59:1153-60.

Romano A, Demoly P. Recent advances in the diagnosis of drug allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2007;7:299-303.

Rozières A, Vocanson M, Rodet K, Benetiere J, Bienvenu J, Berard F, et al. CD8+ T cells mediate skin allergy to amoxicillin in a mouse model. Allergy 2010;65:996-1003.

Sacco JC, Abouraya M, Motsinger-Reif A, Yale SH, Mc Carty CA, Trepanier LA. Evaluation of polymorphisms in the sulfonamide detoxification genes NAT2, CYB5A, CYB5R3 in patients with sulfonamide hypersensitivity. Pharmacogenet Genomics 2012;22:733-740.

Saito N, Yoshioka N, Abe R, Qiao H, Fujita Y, Hoshina D, et al. Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis mouse model generated by using PBMCs and the skin of patients. J Allergy Clin Immunol 2013;131:434-441.

Schlapabach C, Zawodniak A, Irla A, Adam J, Hunger RE, Yerly D, et al. NKp46+ cells express granulysin in multiple cutaneous adverse drug reactions. Allergy 2011;66:1469-1476.

Schnuch A, Westphal G, Mössner R, Uter W, Reich K. Genetic factors in contact allergy-review and future goals. Contact Dermatitis 2011;6:2-23.

Schnyder B, Pichler WJ. Mechanisms of drug-induced allergy. Mayo Clin Proc 2009;84:268-272.

Sergerie Y, Rivest S, Boivin G. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. J Infect Dis 2007;196:853-860.

Shen Y, Nicoletti P, Floratos A, Pirrmohamed M, Molokhia M, Geppetti P, et al. Genome-wide association study of serious blistering skin rash caused by drugs. Pharmacogenomics J 2012;12:96-104.

Shiohara T, Ijima M, Ikezawa Z, Hashimoto K. The diagnosis of a DRESS syndrome has been sufficiently established on the basis of typical clinical features and viral reactivation. Br J Dermatol 2007;156:1083-1084.

Staudinger JL, Xu C, Cui YJ, Klaassen CD. Nuclear receptor-mediated regulation of carboxylesterase expression and activity. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2010;6:261-271.

Sundström Y, Nilsson C, Lilja G, Kärre K, Troye-Blomberg M, Berg L. The expression of human natural killer cell receptors in early life. Scand J Immunol 2007;66:335-344.

Tada H, Aiba S, Shibata KI, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of nod1 and nod2 agonists with toll-like receptors agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. Infect Immun 2005;73:7967-7976.

Tang YC, Amon A. Gene copy number alterations: a cost-benefic analysis. Cell 2013;152:394-405.

Tarkiainen EK, Backman JT, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Schwab M, Niemi M. Carboxylesterase 1 polymorphism impairs oseltamivir bioactivation in humans. Clin Pharmacol Ther 2012;92:68-71.

Tassaneevakul W, Jantararougtong T, Chen P, Lin P, Tiamkao S, Khunarkornsiri U, et al. Strong association between HLA-B*5801 and allopurinol-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in a Thaï population. Pharmacogenet Genomics 2009;19:704-709.

Teraki Y, Murota H, Izaki S. Toxic epidermal necrolysis due to zonisamise associated with reactivation of human herpesvirus 6. Arch Dermatol 2008;144:232-234.

Teraki Y, Shibuya M, Izaki S. Stevens-Johnson and toxic epidermal necrolysis due to anticonvulsivants share certain clinical and laboratory features with drug-induced

hypersensitivity syndrome, despite differences in cutaneous presentations. Clin Exp Dermatol 2009;35:723-728.

Thomas PE, Klinger R, Furlong LI, Homann-Apitius M, Friedrich CM. Challenges in the association of human single nucleotide polymorphism mentions with unique database identifiers. BMC Bioinformatics 2011;12:S4.

Tigno-Aranjuez JT, Abbott DW. Ubiquitination and phosphorylation in the regulation of NOD2 signaling and NOD2-mediated disease. Biochim Biophys Acta 2012;1823:2022-2028.

Torres MJ, Blanca M, Fernandez J, Romano A, Weck A, Aberer W, et al; ENDA; EAACI Interest Group on Drug Hypersensitivity. Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics. Allergy.2003;58:961-72.

Tsurkan LG, Hatfield MJ, Edwards CC, Hyatt JL, Potter PM. Inhibition of human carboxylesterases hCE1 and hiCE by cholinesterase inhibitors. Chem Biol Interact 2013;203:226-230.

Vandebriel RJ Gene polymorphisms within the immune system that may underlie drug allergy. Arch Pharmacol 2004;369:125-132.

Verneuil L, Leboeuf C, Vidal S, Ratajczak P, Comoz F, Ameisen JC et al. Endothelial damage in all types of T-lymphocyte-mediated drug-induced eruptions. Arch Dermatol 2011 ;147 :579-584.

Wadkins RM, Lyatt JL, Yoon KJP, Morton CL, Lee RE, Damodaran K, et al. Discovery of novel selective inhibitors of human intestinal carboxylesterase for the amelioration of irinotecan-induced diarrhea: synthesis, quantitative structure-activity relationship analysis, and activity. Mol Pharmacol 2004;65:1336-1343.

Waton J, Tréchot P, Loss-Ayav C, Schmutz JL, Barbaud A. Negative predictive value of drug skin tests in investigating cutaneous adverse drug reactions. Br J Dermatol 2009;160:786-794.

Waton J, Pouget-Jasson C, Loos-Ayav C, Trechot P, Bursztejn AC, Schmutz JL, Barbaud A. Drug re-challenges in cutaneous adverse drug-reactions: information and effectiveness in the long-term management of patients. Allergy 2011;66:941-947.

Weidinger S, Klopp N, Rümmler L, Wagenpfeil S, Baurecht HJ, Gauger A, et al. Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related trats in a population based cohort of Caucasian adults. Clin Expert Allergy 2005a;35:866-872.

Weidinger S, Klopp N, Rümmler L, Wagenpfeil S, Novak N, Baurecht HJ, et al. Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. J Allergy Clin Immunol 2005b;116:177-184.

Westphal GA, Schnuch A, Moessner R, Konig IR, Kranke B, Hallier E, et al. Cytokine gene polymorphisms in allergic contact dermatitis. Contact Dermatitis 2003;48:93-98.

Wu J, Jiang R. Prediction of deleterious nonsynonymous single-nucleotide polymorphism for human diseases. ScientificWorldJournal 2013. doi:10.1155/2013/67851.

Yang D, Pearce RE, Wang X, Gaedigk R, Wan YJY, Yan B. Human carboxylesterases HCE1 and HCE2: ontogenic exression, inter-individual variability and differential hydrolysis of oseltamivir, aspirin, deltamethrin and permethrin. Biochem Pharmacol 2009;77:238-247.

Yang J, Qiao HL, Dong ZM. Polymorphisms of IL-13 and IL-4-IL13-SNPs in patients with penicillin allergies. Eur J Clin Pharmacol 2005;61:803-809.

Yang J, Qiao HL, Zhang YW, Jia LJ, Tian X, Gao N. HLA-DRB genotype and specific IgE responses in patients with allergies to penicillins. Chin Med J 2006;119:458-466.

Yawalkar N, Egli F, Hari Y, Nievergelt H, Braathen LR, Pichler WJ. Infiltration of cytotoxic T cells in drug-induced cutaneous eruptions. Clin Exp Allergy 2000;30:847-55.

Zanni MP, Mauri-Hellweg D, Brander C, Wendland T, Schnyder B, Frei E, et al. Characterization of lidocaine-specific T cells. J Immunol 1997;158:1139-1148.

Zanni MP, von Greyerz S, Schnyder B, Wendland T, Pichler WJ. Allele-unrestricted presentation of lidocaine by HLA-DR molecules to specific alphabeta+ T cell clones. Int Immunol 1998;10:507-515.

Zhu JH, Appel DI, Iang Y, Markowitz JS. Age- and sex-related expression and activity of carboxylesterase 1 and 2 in mouse and human liver. Dug Metab Dispos 2009;37:1819-1825.

Zhu HJ, Appel DI, Peterson YK, Wang Z, Markowitz JS. Identification of selected therapeutic agents as inhibitors of carboxylesterase 1: potential sources of metabolic drug interactions. Toxicology 2010;270:59-65.

Zhu HJ, Wang X, Gawronski BE, Brinda BJ, Angiolillo DJ, Markowitz JS. Carboxylesterase 1 as a determinant of clopidogrel metabolism and activation. J Pharmacol Exp Ther 2013;344:665-672.

Liste des publications

- Bursztejn AC, Romano A, Guéant-Rodriguez RM, Gastin I, Gaeta F, Barbaud A, Guéant JL. Allergy to betalactams and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) gene polymorphisms. Allergy 2013. Doi 10.1111/all.12196.
- Barbaud A, Waton J, Herbeth B, Bursztejn AC, Bollaert M, Schmutz JL, Guéant-Rodriguez RM, Namour F, Guéant JL, Aimone-Gastin I. Comparison of cytokine gene polymorphism in drug-induced maculopapular eruption, urticaria and drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). J Eur Acad Dermatol Venereol. 2013. doi: 10.1111/jdv.12130.

- Bursztejn AC, Guéant RM, Gastin I, Romano A, Barbaud A, Guéant JL. Etude de polymorphismes de NOD2 dans des états d'hyperréactivité cutanée. Congrès Annuel de Recherche en Dermatologie, Marseille 21-22/06/10 (CO)
- Bursztejn A-C, Guéant RM, Gastin I, Corneo-Garcia JA, Romano A, Barbaud A, Guéant JL. NOD1 and NOD2 polymorphisms in cutaneous adverse drug reactions to betalactam antibiotics. ENDA, Nancy, 4/11/2010 (CO)
- Waton J, Aimone-Gastin I, Bollaert M, Bursztejn AC, Cuny JF, Schmutz JL, Guéant JL, Barbaud A. Polymorphismes génétiques des cytokines dans les toxidermies : un profil particulier dans les DRESS ? Journées Dermatologiques de Paris, 7-11/12/2010 (CO)

- Bursztejn AC, Guéant RM, Gastin I, Corneo-Garcia JA, Romano N, Barbaud A, Guéant JL. Etude des polymorphismes de NOD1 et NOD2 chez des patients ayant présenté une toxidermie aux bétalactamines. VIè Journée Claude Huriet de la Recherche Médicale, Nancy 17/12/2010 (CA)

Evaluation du terrain génétique des hypersensibilités.
Les mécanismes physiopathologiques des hypersensibilités (HS) médicamenteuses ne sont que partiellement connus. Un terrain génétique favorisant est connu de longue date, mais peu de facteurs de risques sont formellement identifiés.
A l'aide d'une approche par gènes candidats, nous avons évalué l'association entre des polymorphismes des gènes NOD1 et 2 et l'HS aux bétalactamines ; l'association entre plusieurs polymorphismes cytokiniques et différentes HS médicamenteuses. Enfin, nous avons utilisé une approche pangénomique à la recherche de gènes candidats au cours d'une HS spécifique, le DRESS.
Parmi 368 cas et autant de contrôles italiens ainsi que 387 cas et 326 contrôles espagnols, nous avons mis en évidence une association entre l'un des polymorphismes de NOD2 et un faible risque d'HS immédiate aux bétalactamines chez les patients italiens, tandis qu'un autre polymorphisme de NOD2 était associé à un risque augmenté d'HS immédiate aux bétalactamines chez les patients espagnols. Aucune association avec le polymorphisme de NOD1 n'était identifiée.
Parmi 118 patients et 236 contrôles, nous avons identifiés l'association entre les polymorphismes de l'IL1 (IL1-RN-A2 et IL1-β -511) et de l'IL10 (-592A) avec le risque de DRESS.
Enfin, parmi 18 DRESS, l'analyse de puces CNV pangénomique nous a permis d'identifier des variations comportant les gènes KLRC2 et CESP1.
Au total, nous avons pu démontrer l'implication de gènes modulant l'inflammation, la réponse antivirale ou le métabolisme des médicaments dans différentes HS médicamenteuses. Une confirmation à l'étage fonctionnelle de ces résultats est nécessaire.
Mots clés : hypersensibilité médicamenteuse, gènes candidats, pangénomique, variation en nombre de copies, DRESS

Genetic background of hypersensitivities.
The physiopathology of drug hypersensitivity (HS) are only partially known. A genetic background for such drug allergy is still demonstrated but only few genes are identified.
Using a candidate gene approach, we tested the association of NOD1 and 2 genes with betalactam HS and the association of several cytokines genes with some drug HS. Using a whole genome approach, we tried to discover new candidate gene for DRESS.
Among 368 italian cases and controls and 387 spanish cases and 326 controls, we identified one polymorphism of NOD2 gene associated with a protective effect for italians and another polymorphism associated with higher risk of druh HS for spanians. No association with NOD1 polymorphims was identified.
Among 118 cases and 236 controls, we noticed that IL1 polymorphisms (IL1-RN-A2 and IL1-β -511) and IL10 polymorphism (-592A) were associated with DRESS.
Ending, among 18 DRESS, a whole-genome array let us identify variations containing KLRC2 and CESP1 genes.
These studies demonstrate the implication of several genes involved in inflammation, antivirus response or drug metabolism in different drug HS.
Fonctionnal studies are needed to confirm these results.
Key words : drug hypersensitivity, candidate gene, whole-genome, copy number variation, DRESS