



HAL
open science

Identification de lymphocytes T spécifiques des médicaments chez des individus non allergiques

Cathy Nhim

► **To cite this version:**

Cathy Nhim. Identification de lymphocytes T spécifiques des médicaments chez des individus non allergiques. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114834 . tel-00769921

HAL Id: tel-00769921

<https://theses.hal.science/tel-00769921>

Submitted on 4 Jan 2013

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 PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

DISCIPLINE : Immunologie

ANNÉE 2011 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1183

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 24/09/2012

par

Cathy NHIM

<p>IDENTIFICATION DE LYMPHOCYTES T SPECIFIQUES DES MEDICAMENTS CHEZ DES INDIVIDUS NON ALLERGIQUES</p>
--

Directeur de thèse : Pr. Marc PALLARDY

Composition du jury :

Rapporteurs :	Pr. Vincent DESCAMPS	Professeur d'Université (UMR-S 976, Univ. Paris VII) et Praticien Hospitalier (Hôpital Bichat)
	Pr. Philippe SAAS	Professeur d'Université (Faculté de Médecine et Pharmacie, Besançon) et Directeur d'unité (UMR-S 1098)
Examineurs :	Dr. Marc VOCANSON	Ingénieur de Recherche (Univ. Lyon 1, UMR-S 851)
	Dr. Bernard MAILLÈRE	Chef d'équipe (CEA Saclay)
	Dr. Richard WEAVER	Chercheur (Biologie Servier, Gidy)
Membre invité :	Dr. Raphaël TERREUX	Maître de Conférence (Faculté de Pharmacie, Lyon)

*A MES GRANDS-PARENTS,
A MES PARENTS, SOPHAL ET ANNIE,
A MES SŒURS, ALICE ET SOPHIE,
A MON FRÈRE, LEON,*

« En essayant continuellement on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chance que ça marche »

Jacques Rouxel (Devise Shadok)

« La musique donne une âme à nos cœurs, des ailes à notre pensée et un essor à l'imagination »

Platon

« Quand je suis allé à l'école, ils m'ont demandé ce que je voulais être quand je serais grand. J'ai répondu "heureux." Ils m'ont dit que je n'avais pas compris la consigne et je leur ai dit qu'ils n'avaient pas compris la vie. »

John Lennon

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements aux membres du jury qui ont bien voulu juger cette thèse. Merci au Pr. Philippe Saas et au Pr. Vincent Descamps d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Merci au Dr. Marc Vocanson, au Dr. Bernard Maillère et au Dr. Richard Weaver d'avoir accepté d'examiner ce travail et merci au Dr. Raphaël Terreux d'avoir accepté notre invitation.

Je remercie mon directeur de thèse, le Pr. Marc Pallardy pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Merci pour la confiance et pour la liberté que tu m'as accordées tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir laissée très rapidement voler de mes propres ailes. Merci pour toutes nos discussions scientifiques si instructives ! Merci pour ta rigueur scientifique, ton enthousiasme, tes encouragements, ta bonne humeur et ton humour ! Malgré tous les obstacles rencontrés, cette thèse restera une très belle expérience scientifique et humaine : j'en ressors grandie !

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr. Nancy Claude pour avoir développé ce projet au sein de Biologie Servier. Merci pour m'avoir accordé ta confiance sur ce projet. Thank you to Dr. Richard Weaver for all the follow-up meetings, your support and your optimism about this project!

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe que j'ai côtoyés durant ma thèse : Armelle, Aude, Aurélie, Camille, Catherine, Christophe, Diane, Isabelle B., Isabelle T., Lorena, Luc, Marie, Marie-Alix, Marie-Eliane, Marie-Hélène, Muriel, Natacha, Perle, Romain, Roseline, Sabrina, Saadia, Sophie, Sylvie, Yann, Viviana, et Zeina. Merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur, votre aide au quotidien, nos discussions quotidiennes et la bonne ambiance qui règne au sein de cette équipe ! Sans oublier toutes ces superbes soirées hors du labo ! J'ai pris plaisir à travailler et à évoluer parmi vous !

Plus particulièrement, Diane, merci de m'avoir initiée au DC ! Perlita, merci pour ta générosité, ta sérénité et ton soutien même après ton départ du labo ! Aurélie, merci pour nos discussions ! SaSa, merci pour ta gentillesse et ton humour décapant ! CamCam, merci pour ta gentillesse, ta positive attitude, tes encouragements et ton soutien au quotidien même quand je menais mes manip loin du labo et pour toutes nos discussions et nos fou-rires ! Mes deux

Maries (MdeB et MAE), merci pour votre gentillesse, votre soutien et pour ce grain de folie que vous avez apporté au labo ! Je vous souhaite encore plein de fou-rires et plein de courage pour la suite de vos thèses respectives ! Lorena, merci pour ta sympathie et pour m'avoir permis de pratiquer mon espagnol ! Bon courage à toi aussi pour la suite de ta thèse ! Je souhaite plein de courage à Zeina pour terminer sa thèse sereinement : et oui, la prochaine, c'est toi ! Armelle, merci pour nos discussions et ta bienveillance à mon égard surtout à la fin de ma thèse ! Saadia, merci pour nos échanges et les bons moments passés en congrès ! Natacha, merci pour ta gentillesse, ta zénitude, tes conseils et nos discussions ! A Marie-Eliane, Yann et Romain, je vous souhaite plein de courage pour votre thèse ! Marie-Eliane, j'espère que tu t'amuseras sur ce projet ! Charlotte, merci d'avoir été ma première stagiaire !

Cette thèse m'a également donné l'opportunité d'évoluer dans d'autres laboratoires et je tiens à remercier chaleureusement tous les collaborateurs qui ont participé à ce projet.

Merci au Pr. Delphine Joseph de m'avoir accueillie au sein de son équipe ! Merci d'avoir réussi à me faire aimer un peu plus la chimie ! Merci pour ta disponibilité, ton soutien, ta gentillesse, ton enthousiasme, ton optimisme sans faille et ta bonne humeur ! Sandrine, merci pour ta persévérance sur la synthèse de ce monomère lysine-pénicilline ! Youssef, merci pour la synthèse du nitroso-sulfaméthoxazole ! Anaïs, Franck, Manue, et Zac, merci pour votre bonne humeur, votre aide au quotidien et nos discussions ! Anaïs, merci d'avoir continué à m'encourager même après ton départ du labo !

Je remercie le Dr. Bernard Maillère pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire ! Merci pour ta disponibilité, ton enthousiasme, tes conseils, ta bonne humeur et pour nos discussions scientifiques. Merci au Dr. Stéphanie Delluc pour t'être impliquée dans ce projet. Merci de m'avoir montré la méthodologie et merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, ton enthousiasme, tes conseils, et ton soutien. Ca a été un plaisir de travailler avec toi à la paillasse ! Amélie, Anaïs, Anne, Caroline, Florence, Françoise, Julien, Mounia, Manu, Nicolas, Neetu, Patrick et Sylvain, merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur, votre aide au quotidien, nos discussions et la bonne ambiance du sous-sol. Plus particulièrement, mention spéciale pour Caro et son accueil chaleureux à mon arrivée et pour M&M's et Madame plus plus et leurs cinq secondes de retard : fou-rires garantis à chaque fois !

Je remercie le Dr. Raphaël Terreux et le Dr. Julie-Anne Chemelle pour l'étude concernant la modélisation des protéines sériques fixant la pénicilline.

Je remercie également le Dr. Frédéric Halgand pour l'étude concernant la caractérisation des bio-conjugués par spectrométrie de masse.

Merci au Pr. Sylvie Chollet-Martin, au Dr. Luc de Chaisemartin et au Dr. Pascale Nicaise pour le dosage des anticorps spécifiques de la pénicilline dans le sérum des donneurs, avec une mention très spéciale pour le Dr. Camille Migdal, qui est allée récupérer mes sérums à chaque fois ! Merci CamCam !

Je remercie également tous les membres de l'Unité 996.

Je n'oublie pas non plus nos anciens collègues de l'Unité 749 : Merci Joël pour nos discussions philosophiques et ta gentillesse ! Aurélie, Lynn, Richard, Aida et Virginie, merci pour toutes les soirées en dehors du labo et votre bonne humeur!

Un remerciement tout spécial à toutes les personnes qui ont eu la gentillesse de me covoiturier, surtout par temps de grèves des transports ou de neige! Merci à Aurélie, CamCam et Ludo, Caro, Catherine, Isabelle, Marc, MAE, MdB, Roseline, SaSa, Stèph, Zeina ...

Je remercie également mes compagnons doctorants de l'ADIT avec lesquels j'ai passé deux superbes années au sein de l'association des doctorants! Merci à Elise, Floriane, Gaël, Hélène, Katia, Matthieu, Marion et Sophie. Bon courage pour vos thèses respectives!

Comme disait Jean de La Bruyère, « Etre avec des gens qu'on aime, cela suffit ». Je remercie mes proches de tout mon cœur: ma famille et mes amis pour leur soutien, leurs encouragements quotidiens et pour avoir fait en sorte que je ne sois pas tout le temps la tête sur mes cellules! ☺ Merci pour tous ces bons moments passés ensemble! Merci à Amandine, Amélie, Anne-Marie, Bona, Céline, Claire, Elise, Emilie, Evelyne, Fanny, Florent, Françoise, Guillemette, Hasna et Waheb, Isabelle, Jennifer, Juliette, Maëlen, Marine, Marion, Martin, Mélanie, Mélodie, Naïma, Perrine et Tony, Stéphane, Sophie, Sovannerey, Yohan...

Je remercie du fond de mon cœur mes parents, pour leur confiance et leur soutien sans faille et pour leurs encouragements au quotidien. C'est grâce à vous que j'ai pu en arriver jusque là! Merci à Alice, Sophie et Léon, qui me soutiennent depuis déjà tant d'années! Cette thèse, c'est à vous cinq que je la dédie!

Merci à tous ceux qui m'ont soutenue de près ou de loin et que je n'ai pas cités ici.

SOMMAIRE :

LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	11
PRINCIPALES ABBREVIATIONS	12
AVANT-PROPOS	15
INTRODUCTION	17
ILLES ALLERGIES MEDICAMENTEUSES	18
1.1.DEFINITION DES ALLERGIES MEDICAMENTEUSES ET PREVALENCE DES ALLERGIES AUX ANTIBIOTIQUES DANS LA POPULATION HUMAINE	18
1.2.SYMPATOMATOLOGIE DES ALLERGIES MEDICAMENTEUSES:	20
1.3.TESTS DIAGNOSTICS	27
1.4.PRÉSENTATION DES ANTIBIOTIQUES ÉTUDIÉS	32
1.4.1. LA PENICILLINE ET L'AMOXICILLINE	32
1.4.1.1. DECOUVERTE DE LA PENICILLINE ET DE L' AMOXICILLINE.....	32
1.4.1.2 CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES DE LA FAMILLE DES BETA-LACTAMES ET SPECTRE D' ACTION.....	34
1.4.1.3. STRUCTURE CHIMIQUE DE LA PENICILLINE G ET DE L'AMOXICILLINE.....	36
1.4.1.4. MODE D' ACTION DES B-LACTAMINES.....	37
1.4.1.5. PREVALENCE DES ALLERGIES A LA PENICILLINE ET A L' AMOXICILLINE ET SYMPTOMATOLOGIE LES PLUS FREQUENTES.....	38
1.4.2 .Le SULFAMETHOXAZOLE	39
1.4.2.1. DECOUVERTE DU PROTONSIL ET ESSOR DES SULFAMIDES.....	39
1.4.2.2. LA FAMILLE DES SULFAMIDES: STRUCTURE CHIMIQUE.....	40
1.4.2.3.MODE D' ACTION ET SPECTRE D' ACTION.....	41
1.4.2.4.METABOLISME DU SULFAMETHOXAZOLE.....	42
1.4.2.5.PREVALENCE DES ALLERGIES AU SULFAMETHOXAZOLE ET SYMPTOMATOLOGIES LES PLUS FREQUENTES.....	43
II. LES MECANISMES MOLECULAIRES ET CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LES ALLERGIES MEDICAMENTEUSES	46
2.1. PHASE DE SENSIBILISATION	46
2.1.1.DEFINITION	46
2.1.2.REACTIVITE DU MEDICAMENT	47
2.1.3.LES CELLULES DENDRITIQUES, CELLULES CLES DANS LE REMANIEMENT DE L'ANTIGENE ET LA PRESENTATION AU LYMPHOCYTES T	54
2.1.3.1. LOCALISATION ET CLASSIFICATION DES CELLULES DENDRITIQUES.....	55
2.1.3.2. ACTIVATION DES CELLULES DENDRITIQUES PAR LES SIGNAUX DE DANGER.....	58
2.1.3.3. CAPTURE DES ANTIGENES PAR LES CELLULES DENDRITIQUES.....	59
2.1.3.4. REMANIEMENT DE L' ANTIGENE ET PRESENTATION DU MEDICAMENT DANS LA POCHES DES MOLECULES DU COMPLEXE D' HISTOCOMPATIBILITE MAJEUR.....	60
2.1.3.4.1. GENERALITES SUR LES MOLECULES DU COMPLEXE D' HISCOMPATIBILITE MAJEUR.....	60
2.1.3.4.2. APPRETEMENT DE L' ANTIGENE VIA LES MOLECULES DU COMPLEXE D' HISTOCOMPATIBILITE MAJEUR.....	63
2.1.3.4.3. DES CAS DE RESTRICTION AUX MOLECULES DU CMH POUR CERTAINES ALLERGIES MEDICAMENTEUSES.....	65
2.1.3.5. MATURATION DES DC : EXPRESSION DE MARQUEURS DE CO-STIMULATION ET SECRETION DE CYTOKINES.....	71
2.1.4.PRESENTATION DE L'ANTIGENE AU LYMPHOCYTE T	74
2.1.4.1 RECEPTEUR DES LYMPHOCYTES T, RECONNAISSANCE DE L' ANTIGENE.....	74
2.1.4.2. LES DIFFERENTS MODES DE PRESENTATION.....	77
2.1.4.3. LA FORMATION DE LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE ET ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T.....	78
2.1.5.DEVELOPPEMENT DE LA REPOSE LYMPHOCYTAIRE EN REPOSE A LA PRESENTATION DE L'ANTIGENE	80
2.1.5.1.DIFFERENCIATION ET SELECTION DES LYMPHOCYTES T.....	80
2.1.5.2. POLARISATION DE LA REPOSE LYMPHOCYTAIRE.....	82
2.1.6.MODELES D'ETUDE DU REPERTOIRE LYMPHOCYTAIRE ET DE LA FREQUENCE DES LYMPHOCYTES T SPECIFIQUES D'UN ANTIGENE	91
2.1.6.1. ETUDE DU REPERTOIRE.....	92
2.1.6.2. ETUDE DE LA FREQUENCE DE LYMPHOCYTES T SPECIFIQUES D'UN ANTIGENE DONNE :.....	96
2.2. PHASE D'ELICITATION :.....	101
2.2.1 LES LYMPHOCYTES T MEMOIRES :.....	101
2.2.2 Pi-CONCEPT :.....	102

RESULTATS	105
<i>ARTICLE 1 : FREQUENCE DES LT SPECIFIQUES DE LA BP CHEZ DES DONNEURS NON ALLERGIQUES</i>	109
RESULTATS	134
<i>IDENTIFICATION DES PEPTIDES HAPTENISES DE LA HSA POTENTIELLEMENT PRESENTES AUX LYMPHOCYTES T</i>	135
<i>IDENTIFICATION DES PROTEINES DU SERUM FIXANT LA BP PAR MODELISATION ET DES PEPTIDES POTENTIELLEMENT PRESENTES AUX LYMPHOCYTES</i>	135
<i>EFFET DES MEDICAMENTS SUR LA MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES</i>	153
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	182
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	185

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Exemple de manifestation d'une nécrolyse épidermique et d'un syndrome DRESS	24
Figure 2: Structure chimique des antibiotiques de la famille des β - lactames	35
Figure 3: Structure chimique de la Pénicilline G et de l'Amoxicilline	37
Figure 4: Quelques exemples d'antibiotiques sulfamidés	40
Figure 5: Voie de synthèse des acides nucléiques chez les bactéries et structure comparative de l'acide p-aminobenzoïque avec le Sulfaméthoxazole.	41
Figure 6: Métabolisme du Sulfaméthoxazole, autre que la N-acétylation	43
Figure 7: Schéma de la phase de sensibilisation	47
Figure 8: La Pénicilline, exemple d'haptène	49
Figure 9: Le Sulfaméthoxazole, exemple de pro-haptène	51
Figure 10: Formation d'adduits protéines-Nitroso-sulfaméthoxazole dans des splénocytes, observée en microscopie confocale	52
Figure 11: La reconnaissance de l'antigène par la cellule dendritique et l'initiation d'une réponse immunitaire	54
Figure 12: Morphologie des cellules dendritiques	55
Figure 13: Classification des cellules dendritiques en cinq sous-types majeurs	57
Figure 14: Différents mécanismes de capture d'antigène par la cellule dendritique	60
Figure 15: Nomenclature des molécules du complexe d'histocompatibilité majeur humain	62
Figure 16: Structure des molécules du complexe d'histocompatibilité majeur de classe I et II	63
Figure 17: Présentation antigénique par les molécules du complexe d'histocompatibilité majeur de classe I	64
Figure 18: Présentation antigénique par les molécules du complexe d'histocompatibilité majeur de classe II	65
Figure 19: Modèle proposé par Martin et al, concernant le mécanisme immunopathologique de l'hypersensibilité à l'abacavir	68
Figure 20: Maturation des cellules dendritiques	72
Figure 21: Schéma de la structure du récepteur des lymphocytes T	74
Figure 22: Schéma du réarrangement du récepteur des lymphocytes T $\alpha:\beta$	75
Figure 23: Structure de la Pénicilline G, la Pénicilline V et l'Ampicilline	76
Figure 24: Les différents modes de présentation d'un antigène au lymphocyte T	77
Figure 25: Schéma de la présentation de l'antigène au lymphocyte T	78
Figure 26: Schéma de la synapse immunologique	79
Figure 27: Développement et survie des lymphocytes T	83
Figure 28: Polarisation de la réponse lymphocytaire de type CD4 ⁺	84
Figure 29: Quelques mécanismes de l'inhibition des réponses lymphocytaires par les lymphocytes régulateurs	86
Figure 30: Détection de lymphocytes T spécifiques d'un peptide dérivé d'un antigène par l'utilisation de tétramères	93
Figure 31: Principe de l'Immunoscope	95
Figure 32: Obtention d'une librairie de lymphocytes T amplifiés et test de criblage de plusieurs antigènes	97
Figure 33: Loi statistique de Poisson, appliquée à la détermination des fréquences de lymphocytes T spécifiques d'un antigène donné	97
Figure 34: Induction de lignées lymphocytaires et Identification de lignées lymphocytaires spécifiques de l'antigène testé.	98

Figure 35: Schéma des phases de sensibilisation et d'élicitation	101
Figure 36: Différence du type de liaisons dans la présentation de l'antigène selon le principe de l'haptène et le Pi-concept	103
Figure 37: Démarche expérimentale concernant l'implication des lymphocytes T dans les allergies médicamenteuses	108
Figure 38: Représentation schématique de la fixation de la benzyl-pénicilline sur une lysine	145
Figure 39: Retrosynthèse du monomère Lysine-Benzyl-Pénicilline	147
Figure 40: Protection de la fonction acide de la Benzyl-Pénicilline.....	147
Figure 41: Protection de la lysine Fmoc	148
Figure 42: Synthèse du monomère Lysine-Benzyl-Pénicilline.....	149
Figure 43: Cytotoxicité de la Benzyl-Pénicilline sur les cellules dendritiques murines (n ≥ 3) et humaines (n=5).....	159
Figure 44: Cytotoxicité du Sulfaméthoxazole sur les cellules dendritiques murines (n=4) et humaines (n=5).....	160
Figure 45: Cytotoxicité du Nitroso-Sulfaméthoxazole et du Sulfaméthoxazole hydroxylamine sur les DC murines à 24h (n= 1)	160
Figure 46: Profils d'expression des différents marqueurs sur les cellules dendritiques humaines après stimulation par les médicaments	162
Figure 47: Profils d'expression des différents marqueurs sur les cellules dendritiques humaines après stimulation par les médicaments	164
Figure 48: Profils d'expression des différents marqueurs sur les cellules dendritiques murines après stimulation par les métabolites du Sulfaméthoxazole.....	166

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classement des dix médicaments induisant le plus de réaction cutanées allergiques par ordre décroissant de prévalence.....	19
Tableau 2 : Classification de Gells et Coombs des hypersensibilités médicamenteuses.....	26
Tableau 3 : Les β -lactamines ou antibiotiques de la famille des β -lactames.....	34
Tableau 4 : Sites de fixations de médicaments sur l'albumine humaine	53
Tableau 5 : Fréquence des sept plus importants allèles HLA-DRB1 dans la population française.	61
Tableau 6 : Sites de fixation putatifs de la benzyl-pénicilline sur l'albumine humaine	138
Tableau 7 : Séquences des peptides testés sous TEPITOPE.....	143
Tableau 8 : Liste des peptides choisis pour la synthèse et les tests biologiques.....	144
Tableau 9 : Banque de molécules du complexe d'histocompatibilité humaine.....	151
Tableau 10 : Expression des marqueurs de maturation suite un traitement des cellules dendritiques humaines (n=3) par de la Benzyl-Pénicilline et du Sulfaméthoxazole.....	163
Tableau 11 : Expression des marqueurs de maturation après traitement des cellules dendritiques murines par la Benzyl-Pénicilline et le Sulfaméthoxazole (n=3).....	165
Tableau 12 : Expression des marqueurs de maturation après traitement des cellules dendritiques murines par les métabolites du Sulfaméthoxazole	166

PRINCIPALES ABBREVIATIONS

Ac : Anticorps

ADCC : Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens

Ag : Antigène

APC/ CPA : Antigen Presenting Cells / Cellules Présentatrices d'Antigène

BM-DC : Bone Marrow-Dendritic Cell

BP : Benzyl-Pénicilline (ou Pénicilline G)

CDR3 : Complementarity Determining Region 3

CDX : Cluster of Differentiation X

CFSE : 5,6-Carboxyl-Fluorescein diacetate Succinimidyl Ester

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMH I ou II : CMH de classe I ou II

CTL : Cytotoxic T lymphocytes

CYP : Cytochromes (P450)

DC : Cellules Dendritiques

DRESS : Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms

ELISpot : Enzyme-Linked Immunosorbent Spot

FasL: Fas Ligand

Fc : Fraction constante (des anticorps)

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

HER2/neu : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HLA : Human Leucocyte Antigen

HSA : Human Serum Albumin

IFN- γ : Interféron-gamma

IgX : Immunoglobulines de type X

IL-X : Interleukine X

Inf-DC : DC inflammatoires, dérivées de monocytes

KLH : Keyhole Limpet Hemocyanin

LB : Lymphocytes B

LC : Cellules de Langerhans

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocytes T

Mo-DC : Monocyte derived Dendritic Cell

NK : Natural Killer

NKT : Natural Killer T cells

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PCR : Polymerase Chain Reaction

pDC : DC plasmacytoïde

P-i concept : Pharmacological interaction of drugs with the Immune system

PHA : Phytohémagglutinine

PBP : Penicillin Binding Proteins

RE : Réticulum endoplasmique

SJS : Syndrome de Stevens-Johnson

SMX : Sulfaméthoxazole

SMX-NHOH : Sulfaméthoxazole hydroxylamine

SMX-NO : Nitroso hydroxylamine

TAP : Transporter associated Antigen Presentation

TCC : T cells clones

TGF- β : Transforming Growth Factor

TTL: Test de Transformation Lymphocytaire

TcR : T-cell Receptor

TEN : Toxic Epidermic Necrolysis

ThX : T helper cells X

TLR : Toll-like Receptor

TMP : Trimétroprime

TNF : Tumor Necrosis Factor

Treg : T régulateurs

VEGF-a : Vascular endothelial growth factor a

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

AVANT-PROPOS

Les allergies médicamenteuses constituent un problème de santé publique et ne peuvent être prédites lors du développement des médicaments. En effet, à l'heure actuelle, aucun test de prédiction du « potentiel allergique » des médicaments n'est disponible. Les allergies médicamenteuses ne sont alors visibles qu'une fois le médicament mis sur le marché et prescrit aux patients. Ainsi, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement des allergies médicamenteuses afin d'être capable de mieux les prédire.

Les allergies médicamenteuses sont définies par l'Académie Européenne d'allergologie et d'immunologie clinique, comme étant des « réactions d'hypersensibilité initiées par des mécanismes immunologiques », à médiation humorale ou cellulaire. En effet, chez des patients allergiques, il est possible de retrouver dans leur sérum des anticorps spécifiques du médicament (IgE) et dans leur sang des lymphocytes T spécifiques du médicament. La présence de lymphocytes T spécifiques du médicament chez des patients allergiques suggère la présentation du médicament par des cellules présentatrices d'antigène telles que les cellules dendritiques.

Nous nous sommes alors intéressés à mieux comprendre l'implication des lymphocytes T et des cellules dendritiques dans le développement des allergies médicamenteuses, et plus particulièrement des allergies aux antibiotiques tels que la pénicilline G ou le sulfaméthoxazole. Nous avons cherché à répondre à un certain nombre de questions afin de mieux comprendre le rôle des lymphocytes T et des cellules dendritiques lors de la phase de sensibilisation :

1. Est-il possible de détecter des lymphocytes T spécifiques de la pénicilline G chez des donneurs non allergiques ? si oui, quelle est leur fréquence ?
2. Quelles sont les protéines sériques sur lesquelles se fixe la pénicilline G ? et quels sont les épitopes et plus précisément les peptides couplés de manière covalente à la pénicilline G, qui sont présentés à ces lymphocytes T ?
3. Les médicaments comme la pénicilline G ou le sulfaméthoxazole sont-ils capables d'induire la maturation des cellules dendritiques comme cela a été montré pour d'autres haptènes tels que certains sensibilisants de contact (DNCB, Nickel...) ?

L'objectif de ce travail de thèse a donc été de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement des allergies à l'échelle des

lymphocytes T et des cellules dendritiques afin de pouvoir mieux prédire les allergies médicamenteuses lors du développement des médicaments.

INTRODUCTION

I. Les allergies médicamenteuses:

1.1 Définition des allergies médicamenteuses et prévalence des allergies aux antibiotiques dans la population humaine

Les effets secondaires ou indésirables des médicaments, dont font partie les allergies médicamenteuses, constituent un problème important de santé publique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (*Rapport de l'OMS technique n ° 498 de 1972*), les effets indésirables des médicaments correspondent à « une réponse qui est nocive et non voulue, se produisant aux posologies normalement utilisées chez l'homme pour la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement de la maladie, ou pour la modification d'une fonction physiologique ». Cette définition a pour but d'exclure les effets indésirables liés à une surdose accidentelle ou délibérée.

Les effets indésirables médicamenteux peuvent être divisés en deux catégories selon Rawlins and Thompson : ceux de type A (Augmented) qui sont prévisibles et ceux de type B (Bizarre), qui ne le sont pas. Les réactions de type A, qui représentent environ 80% des effets secondaires, sont généralement dose dépendantes et liées à la pharmacologie du médicament, au contraire des réactions de type B. Les réactions de type B comprennent les intolérances médicamenteuses, les réactions pseudo-allergiques, et les allergies médicamenteuses (Solensky et al. 2010).

Le terme d'allergie vient du grec « allos » pour autre et « ergia » pour action et désigne une réaction inhabituelle de l'organisme à un stimulus généralement inoffensif. En 2004, une nouvelle nomenclature concernant l'Allergie a été proposée par l'Académie Européenne d'allergologie et d'immunologie clinique. Les allergies médicamenteuses sont définies comme étant « des réactions d'hypersensibilité initiées par des mécanismes immunologiques », à médiation humorale (IgE par exemple) ou cellulaire (présence de lymphocytes T spécifiques). L'hypersensibilité est définie comme provoquant « des symptômes ou des signes cliniques reproductibles objectivement, initiés par une exposition à un stimulus défini, à une dose tolérée par des sujets normaux » (Johansson et al. 2001).

Il existe plusieurs études épidémiologiques concernant les hypersensibilités médicamenteuses allergiques, qui diffèrent en fonction des populations étudiées (patients hospitalisés ou non, adultes, enfants...), de la méthodologie employée (constatations cliniques via un questionnaire ou confirmées par un dermatologue par exemple ...) et des médicaments étudiés. La plupart des études d'incidences ou de prévalences des allergies médicamenteuses

sont réalisées chez des patients hospitalisés, il en existe très peu qui soient réalisées dans la population générale.

Dans le cadre du Boston Collaborative Drug Surveillance Programme, la prévalence des réactions cutanées allergiques (urticaires, éruptions érythémateuses, prurits généralisés) aux médicaments chez 15438 patients, hospitalisés de 1975 à 1982 a été analysée; 358 réactions cutanées ont été confirmées par un dermatologue, correspondant à une prévalence globale de 2,3%. La prévalence par médicament a ensuite été calculée en attribuant chaque réaction cutanée au médicament correspondant. Avec une prévalence de 5,1%, l'amoxicilline est le médicament induisant le plus de réactions cutanées dans cette étude. Suivent ensuite la combinaison triméthoprime-sulfaméthoxazole avec une prévalence de 3,4%, puis l'ampicilline avec une prévalence de 3,3%. La pénicilline G se trouve en dixième position avec une prévalence de 1,8%. On retrouve 7 antibiotiques, parmi les 10 premiers médicaments, classés par ordre décroissant de prévalence (*cf. Tableau 1*) (Bigby et al. 1986).

MEDICAMENTS	PRÉVALENCE (%)
Amoxicilline	5,1
Triméthoprime-sulfaméthoxazole	3,4
Ampicilline	3,3
Sodium Iopodate	2,8
Produits dérivés du sang	2,2
Erythromycine	2,0
Céphalosporines	2,1
Pénicillines semi-synthétiques	2,1
Dihydralazine hydrochloride	1,9
Pénicillin G	1,9

Tableau 1 : Classement des dix médicaments induisant le plus de réactions cutanées allergiques par ordre décroissant de prévalence (Bigby et al. 1986)

Une étude prospective de six mois a été réalisée à l'hôpital Bichât, sur des patients hospitalisés de novembre 2000 à mai 2001 et présentant de possibles réactions cutanées allergiques. Un examen médical des patients a été effectué par un dermatologue qui remplit ensuite un questionnaire standard. Sur 13294 hospitalisations, 48 cas d'allergies médicamenteuses ont été détectées soit une prévalence de 0,36% ; 56% de ces 48 cas

d'allergies médicamenteuses sont dus à des antibiotiques, en particulier les pénicillines (23%), dont 21% sont à attribuer à l'amoxicilline (Fiszenson-Albala et al. 2003).

Une étude de cohorte concernant les allergies aux antibiotiques a été réalisée chez des enfants, ayant été vus en consultation du 1^{ier} mars au 31 juillet 1996, dans un centre pédiatrique privé du Nord de la Virginie au USA. Les antibiotiques ont été répartis en quatre groupes : les pénicillines, les sulfamides, le céfaclor et les autres céphalosporines. Une fréquence de 7,3% de réactions cutanées allergiques est observée chez les enfants, ayant reçu ces antibiotiques. Par médicament, la prévalence pour le céfaclor est de 12,3%, celle pour les sulfamides est de 8,5%, celle pour les pénicillines est de 7,4% et enfin, celle pour les autres céphalosporines est de 2,6% (Ibia et al. 2000).

Une étude, cette fois-ci dans la population générale, consistant à évaluer la prévalence des hypersensibilités aux médicaments, a été réalisée au Portugal en 2002. Elle montre une prévalence de 7,8% (181/2309) aux allergies médicamenteuses, rapportée par des patients non hospitalisés via un questionnaire. La prévalence des pénicillines et autres β -lactames est de 4,5%, celle de l'aspirine et des Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) est de 1,9 (Gomes et al. 2004).

Ainsi, au travers de ces études, il paraît correct d'estimer la prévalence des hypersensibilités médicamenteuses entre 0,3 et 8%, tout en ayant à l'esprit que cette prévalence varie en fonction des populations étudiées mais également en fonction des médicaments étudiés. En effet, les antibiotiques sont responsables d'une grande majorité des hypersensibilités médicamenteuses et présente souvent une prévalence plus élevée que les autres classes de médicaments (Gomes et al. 2005).

1.2 Symptomatologie des allergies médicamenteuses:

Les manifestations cliniques des allergies médicamenteuses sont très variables : urticaire, angio-œdème ou œdème de Quincke, exanthèmes maculopapuleux, bulleux ou pustuleux, eczéma de contact, syndrome DRESS (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms), syndrome de Stevens-Johnson (SJS), choc anaphylactique, atteintes rénales, atteintes hépatiques, vascularites etc... Elles sont souvent d'ordre cutané, lié à un effet local ou à un effet systémique. Par exemple, dans l'étude menée en 2002 au Portugal, 63% des manifestations cliniques des allergies auto-déclarées, liées aux antibiotiques de la famille des

β -lactames sont des symptômes cutanées tels que l'urticaire, les éruptions cutanées, les démangeaisons, les gonflements ou les angio-œdèmes... (Gomes et al. 2004).

Il est possible de classer les allergies médicamenteuses, en fonction des symptômes cliniques observés et des mécanismes impliqués, en utilisant la classification de Gell et Coombs, mise en place en 1963. Cette classification comprend quatre types de réactions d'hypersensibilité (*cf. tableau 2*):

- Les hypersensibilités de type I dites « réactions immédiates »
- Les hypersensibilités de type II dites « réactions cytotoxiques »
- Les hypersensibilités de type III dites « réactions à complexes immuns »
- Les hypersensibilités de type IV dites « réactions retardées »

Dans le cas des hypersensibilités de type I, les symptômes apparaissent rapidement (de quelques minutes à quelques heures) après la prise du médicament. Les symptômes caractéristiques de ce type d'hypersensibilité sont l'urticaire, l'œdème de Quincke, le choc anaphylactique, l'asthme, les rhinites, ou les conjonctivites. Ces réactions sont médiées par des immunoglobulines E (IgE) qui en se fixant aux récepteurs de la Fraction Constante (Fc) des IgE, situés sur les mastocytes et les basophiles, entraînent leur dégranulation et la sécrétion de médiateurs vaso-actifs pré-synthétisés tels que l'histamine ou nouvellement synthétisés tels que les prostaglandines, les leucotriènes ou les thromboxanes. Les antibiotiques sont les médicaments qui sont responsables de la grande majorité des hypersensibilités immédiates (Descotes et al. 2001; Solensky et al. 2010).

Dans le cas des hypersensibilités de type II, les symptômes les plus couramment observés sont des anomalies hématologiques telles que des cytopénies sanguines comme des granulocytopenies, des thrombocytopenies ou des anémies hémolytiques. Ces réactions cytotoxiques sont très sérieuses et peuvent mettre en danger la vie des patients. Elles sont médiées par des anticorps cytotoxiques, principalement les IgG et les IgM. Les dommages cellulaires résultent principalement de l'activation du complément, qui conduit à la lyse des cellules cibles, par fixation du fragment C3b du complément à la surface des cellules cibles ou par fixation du complexe membranaire C5b-C9 du complément. La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity), peut également jouer un rôle dans l'hypersensibilité de type II : les cellules cibles présentent à leur surface des épitopes reconnus par les IgG ou IgM, qui se fixent alors à

leur surface. Les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles se fixent alors à ces cellules via le récepteur Fc de ces anticorps et éliminent les cellules cibles. (Descotes et al. 2001; Solensky et al. 2010)

Les hypersensibilités de type III sont médiées par la formation de complexes immuns (Anticorps-Antigène (Ac-Ag)), dû à un excès d'antigènes. La maladie sérique est la maladie la plus caractéristique des hypersensibilités de type III. C'est une maladie qui était autrefois fréquente, du fait de l'utilisation de sérum de cheval (antitétanique, antidiphtérique) mais qui est rare aujourd'hui du fait de l'utilisation de sérum d'origine humaine. Néanmoins, certains médicaments tels que les pénicillines, les sulfonamides, la phénytoïne, certains anticorps monoclonaux thérapeutiques (influximab, rituximab, natalizumab, omalizumab), peuvent provoquer cette pathologie (Descotes et al. 2001; Gamarra et al. 2006; Schutgens 2006; Krumbholz et al. 2007; Pilette et al. 2007; Hellwig et al. 2008). Les manifestations cliniques de la maladie sérique, qui apparaissent 1 à 3 semaines après la prise du médicament, sont la fièvre, les éruptions cutanées, l'urticaire, l'adénopathie (hypertrophie des ganglions lymphatiques), l'arthralgie (douleurs articulaires). La réponse se déclenche quand l'Ag réagit dans des espaces tissulaires avec des Ac, souvent des IgM, pour former des complexes immuns. Quand l'Ag est en excès, des complexes immuns solubles se forment et se déposent dans la couche endothéliale des parois des vaisseaux sanguins et se fixent au complément, causant une inflammation locale. Les complexes immuns se déposent principalement dans les poumons, les reins, la peau et les articulations. Les dommages tissulaires sont initiés par la réponse à l'inflammation locale, impliquant l'activation du complément. De nombreuses cellules du système immunitaire telles que les macrophages, les neutrophiles ou les plaquettes sont de ce fait, attirées sur le site de l'inflammation et contribuent aux dommages tissulaires. (Descotes et al. 2001; Solensky et al. 2010)

Les hypersensibilités de type IV dites retardées mettent en jeu des lymphocytes T (LT) spécifiques du médicament. En effet, le médicament est présenté aux LT sous la forme d'un Ag par les cellules présentatrice d'antigène (CPA), telles que les cellules dendritiques (DC), via leur molécule du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), ce qui va induire la stimulation des LT spécifiques et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, résultant en une réponse immunitaire effectrice dirigée contre le médicament. Les manifestations cliniques les plus classiques d'une hypersensibilité médicamenteuse de type IV sont des éruptions cutanées retardées comme les exanthèmes maculopapuleux dus aux antibiotiques

(amoxicillines, sulfonamides), les pustuloses exanthémateuses aiguës généralisées ou les dermatites de contact. Moins d'une quarantaine de médicaments sont responsables de la plupart des cas de dermatites de contact allergiques, en particulier les formulations topiques de la bacitracine (antibiotique), de la néomycine (antibiotique), les glucocorticoïdes, les anesthésiques locaux et les antihistaminiques (Descotes et al. 2001; Solensky et al. 2010).

La classification de Gell et Coombs a été mise en place avant que les connaissances sur les sous-types de populations de LT et leurs fonctions soient connues. Une sous-classification plus précise des hypersensibilités de type IV en quatre sous-catégories a alors été proposée par Werner Pichler en 2003 (Pichler 2003; Posadas et al. 2007). Elle tient compte des sous-types de populations de LT et des cellules effectrices impliquées (*cf. tableau 2*) :

- IV-a : Réponse Th1 et activation et recrutement des macrophages
- IV-b : Réponse Th2 et activation et recrutement des éosinophiles
- IV-c : Réponse lymphocytaire cytotoxique (CD4⁺ ou CD8⁺)
- IV-d : Réponse lymphocytaire et activation et recrutement des neutrophiles

Les hypersensibilités de type IV-a correspondent aux réactions immunitaires impliquant une réponse de type Th1 : les LT de type Th1 activent les macrophages en sécrétant de larges quantités d'interféron-gamma (IFN- γ) et activent également le complément. Ils jouent le rôle de co-stimulateurs de réponses pro-inflammatoires (sécrétion de TNF : Tumor Necrosis Factor et d'IL-12 : Interleukine 12) et de réponses effectrices par l'activation de LT de type CD8⁺ (Pichler 2003; Posadas et al. 2007).

Les hypersensibilités de type IV-b correspondent aux réactions immunitaires impliquant une réponse de type Th2 : les LT de type Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-13 et de l'IL-15, qui activent la production d'IgE et d'IgG4 par les lymphocytes B (LB) et activent en particulier, les éosinophiles mais également les macrophages et les mastocytes (Pichler 2003; Posadas et al. 2007).

Dans le cas des hypersensibilités de type IV-c, les LT effecteurs cytotoxiques migrent dans les tissus et tuent les cellules, telles que les hépatocytes ou les kératinocytes, via les mécanismes de perforine/granzyme B ou du FasL (Fas-Ligand). Ces réactions sont à mettre en parallèle avec d'autres mécanismes d'hypersensibilités médicamenteuses retardées, de type IV, impliquant également les monocytes, les éosinophiles et le recrutement et l'activation des polynucléaires neutrophiles. (Pichler 2003; Posadas et al. 2007)

Dans le cas des hypersensibilités de type IV-d, les lymphocytes T, ayant reconnu leur antigène, sont capables de recruter des neutrophiles, induisant alors une inflammation. Un exemple typique, est la pustulose exanthématique aiguë généralisée où les LT sécrètent de l'interleukine 8 (IL-8 ou CXCL8), qui permet le recrutement de neutrophiles et du GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), qui empêche leur apoptose. Ce type de mécanisme se retrouve également dans la maladie de Behçet et dans le psoriasis pustuleux (Pichler 2003; Posadas et al. 2007).

Certaines réactions allergiques avec des syndromes caractéristiques, ne rentrent pas spécifiquement dans une des catégories (ou sous-catégorie) de la classification de Gell et Coombs. Il s'agit par exemple des syndromes de DRESS, de Lyell et de Steven-Johnson (*cf. figure 1*).

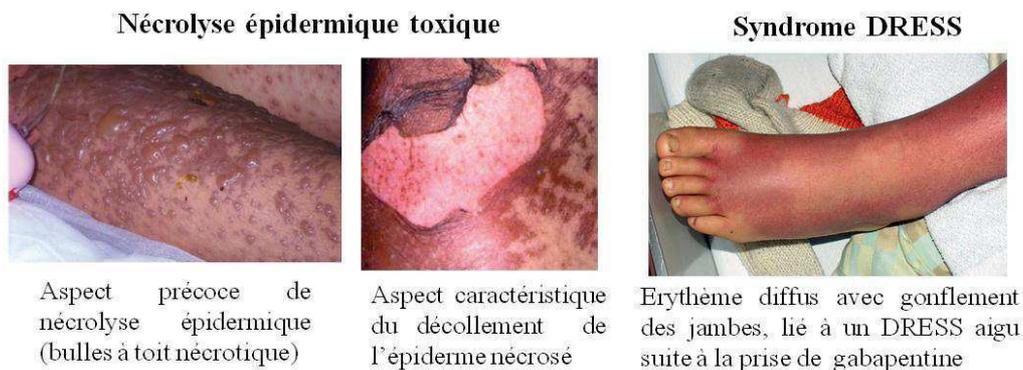


Figure 1: Exemple de manifestations d'une nécrolyse épidermique et d'un syndrome DRESS (Roujeau 2007; Solensky et al. 2010)

Les nécrolyses épidermiques toxiques (TEN) sont des maladies dermatologiques aiguës et très graves. Le terme de syndrome de Lyell est utilisée pour les formes les plus étendues de nécrolyse (plus de 30% de l'épiderme détaché) et le terme de syndrome de Stevens-Johnson (SJS) pour les formes les plus limitées (moins de 10% de l'épiderme détaché), qui peuvent par la suite évoluer vers un syndrome de Lyell. Elles sont rares et touchent environ 2 personnes par million d'habitants par an, en Europe. Le pronostic vital est mis en jeu à la phase aiguë et la mortalité est évaluée à 20 à 25% pendant l'hospitalisation. Elles se caractérisent par la destruction brutale de la couche superficielle de la peau (épiderme) et des muqueuses (épithélium). En effet, lymphocytes T CD8⁺ activés, tuent les kératinocytes. Le diagnostic clinique doit être confirmé par une biopsie cutanée montrant une nécrose de l'épiderme. Moins d'une dizaine de médicaments tel que l'allopurinol (hypo-

uricémiant), les sulfamides anti-infectieux, la névirapine [traitement du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine)], la carbamazépine (traitement de l'épilepsie), la lamotrigine (traitement de l'épilepsie), la phénytoïne (traitement de l'épilepsie) et les AINS dérivés de l'oxicam, sont responsables de la moitié des cas (Roujeau 2007; Solensky et al. 2010).

Le syndrome DRESS (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms) est une réaction systémique inflammatoire, induite par certains médicaments, en particulier les anti-convulsants (phénytoïne, carbamazépine, lamotrigine), les sulfamides (dapsons, sulfasalazine, sulfaméthoxazole), l'allopurinol, la minocycline (antibiotique), la névirapine et l'abacavir (traitement du VIH), qui induit également des cas de syndromes de Steven-Johnson (Cacoub et al. 2011; Pichler 2011). C'est une réaction grave, qui peut être mortelle et qui provoque des éruptions cutanées (exanthème, érythème polymorphe), de la fièvre, de l'éosinophilie (mais pas dans tous les cas), des dysfonctionnements hépatique et rénal, une lymphadénopathie (hypertrophie des ganglions lymphatiques). Les symptômes se développent 2 à 8 semaines après la première prise du médicament et peuvent persister plusieurs semaines voire plusieurs mois après l'arrêt du traitement. L'inflammation, souvent due aux éosinophiles, touche différents organes et les lymphocytes T activés, sécrètent de grandes quantités d'IFN- γ et d'IL-2 et sont cytotoxiques : ils détruisent les hépatocytes et les kératinocytes (Solensky et al. 2010; Pichler 2011)

Type de Réactions	Noms des réactions	Symptômes cliniques	Mécanismes immunologiques impliqués	Schémas	
I	Réactions de type immédiat	Urticaire, Angio-œdème, Choc anaphylactique	IgE spécifiques du médicament	<p>Ag → L'antigène (Ag-médicament) est reconnu par des IgE → Fixation aux récepteurs membranaires des mastocytes → Récepteurs de haute affinité pour la Fc des IgE → Dégranulation → Sécrétion de médiateurs (histamines...)</p>	
II	Réactions cytotoxiques	Dyscrasie et/ou Cytopénie sanguines, Néphrite, Hépatite	IgG ou IgM spécifiques du médicament ADCC et activation du complément	<p>1- Ag présenté par les cellules cibles → 2- Reconnaissance de l'Ag par les Anticorps (Ac) → 3- Activation du complément et /ou ADCC (NK cells ...) → LYSÉ DES CELLULES CIBLES</p>	
III	Réactions du complexe immun	Maladie sérique	Complexes immuns (Ac-Ag) Activation du complément	<p>Ag en excès + Anticorps (IgM...) → Formation de complexes immuns → Dépôt sur la paroi des vaisseaux sanguins → Cellules endothéliales → Activation du complément, Recrutement des macrophages, des neutrophiles, des plaquettes → INFLAMMATION LOCALE → Dommages tissulaires</p>	
IV	a	Dermatite de contact	LT spécifiques du médicament	<p>Présentation de l'Ag au LT spécifique → Activation du LT spécifique → Activation de LT spécifiques → Sécrétion de cytokines</p>	
	b	Exanthème maculopapuleux			LT de type Th2 (IL-4,5 et 13) Activation des éosinophiles
	c	Dermatite de contact, Exanthème bulleux et maculopapuleux, Hépatite			LT cytotoxiques (Perforines, Granzyme B, FasL)
	d	Pustulose exanthémateuse aiguë généralisée			LT (CXCL-8, GM-CSF) Activation des neutrophiles
Autres		Syndromes de Lyell, Steven-Johnson, DRESS		<p>Réponse Th1 et Recrutement de monocytes → IV a</p> <p>Réponse Th2 et Recrutement des éosinophiles → IV b</p> <p>Réponse lymphocytaire cytotoxique → Granzyme, perforine → Mort de la Cellule cible → IV c</p> <p>Activation de lymphocytes T et Recrutement des neutrophiles → IL-8, GM-CSF → IV d</p>	

Tableau 2 : Classification de Gells et Coombs des hypersensibilités médicamenteuses (Descotes et al. 2001; Pichler 2003; Ponvert 2007; Posadas et al. 2007; Caubet et al. 2011)

1.3 Tests diagnostiques:

Dans un premier temps, l'interrogatoire médical précis reste le premier outil d'investigation dans l'établissement du diagnostic allergique d'un patient. L'interrogatoire médical répose sur plusieurs points importants tels que la liste des médicaments pris, l'anamnèse (l'histoire des symptômes de l'allergie : la nature et la localisation des symptômes, la chronologie d'apparitions des symptômes, la durée des symptômes, etc...), la prise ou non d'un traitement médical contre l'allergie, l'état de santé général, les autres antécédents personnels (allergie(s) connue(s) à d'autres médicaments, traitements antérieurs bien tolérés pour le même médicament ou d'autres médicaments de la même famille ...), les antécédents familiaux (existence d'autres personnes allergiques dans la famille). Un examen clinique des lésions est ensuite réalisé. Toutes ces informations (interrogatoire, anamnèse, examen clinique) permettent d'orienter le diagnostic allergique vers un type immédiat ou retardé (Demoly et al. 2002).

Dans un deuxième temps, des tests cutanés et/ou biologiques sont réalisés en fonction du type de réactions d'hypersensibilités suspectées.

Concernant les tests cutanés, des prick tests, des tests intradermiques ou des patch tests peuvent être réalisés, sous contrôle médicale.

Les prick tests et les tests intradermiques sont réalisés dans les cas où une hypersensibilité immédiates, médiées par des IgE est soupçonnée. Les prick-tests sont généralement réalisés sur l'avant-bras du patient mais peuvent aussi l'être sur le dos. Ils consistent à déposer une goutte d'allergène à tester ou une goutte de solution contrôle sur la peau et à faire passer une aiguille hypodermique à travers la goutte jusque dans l'épiderme. Après environ vingt minutes d'exposition, une lecture des tests est réalisée. Un test est négatif s'il n'y a pas d'apparition de papules ou d'érythèmes (cela n'exclut pour autant pas une allergie). Dans le cas contraire, le diamètre de la papule ou de l'érythème est mesuré et comparé à celui obtenu avec des témoins négatifs et positifs, afin de déterminer si le test est positif. (Brockow et al. 2002; Demoly et al. 2002; Co Minh 2005; Nicolas et al. 2005).

Dans le cas d'un résultat négatif, un test intradermique peut être réalisé, en utilisant la même solution utilisée dans le prick-test mais plus diluée (d'un facteur 100 à 1000). Le test intradermique consiste à injecter la solution d'allergène dans la peau avec une seringue à tuberculine comportant une aiguille, ce qui induit une papule de 3 à 5 mm de diamètre. Vingt minutes après l'injection, une mesure du diamètre de la papule est réalisée. S'il est augmenté

d'au moins 3 mm par rapport au diamètre initial, le test est considéré comme positif (Brockow et al. 2002; Demoly et al. 2002; Co Minh 2005; Nicolas et al. 2005).

La sensibilité de ces tests cutanés (prick test et test intradermal) dans le cas du diagnostic des hypersensibilités immédiates aux pénicillines a été évalué chez 290 patients, ayant développé de l'urticaire ou des réactions d'anaphylaxie en réponse à la prise des pénicillines (amoxicilline, pénicilline G, ampicilline...). Sur les 290 patients testés, 209 ont présenté un résultat positif en prenant en compte les quatre molécules testées (ampicilline, amoxicilline, benzyl-pénicilloyl, minor determinant mixture (MDM, composé de pénicilline G et d'acide benzyl-pénicilloïque), résultant en une sensibilité de 70% pour ces tests cutanés. Des tests cutanés ont également été réalisés chez des patients non allergiques aux pénicillines afin de déterminer la spécificité de ces tests cutanés, qui est de l'ordre de 97 à 99% (Torres et al. 2001).

Dans le cas d'une hypersensibilité retardée, médiées par les lymphocytes, des patch tests ou des tests intradermiques (à lecture retardée) sont réalisés sur le dos du patient. Le patch test consiste à appliquer le médicament sous patch occlusif ou semi-occlusif sur le dos du patient. La lecture est réalisée deux à trois jours après l'application du patch. Après le retrait du patch, s'il n'y pas de symptômes observés, le test est considéré comme négatif. Dans le contraire, les symptômes (érythèmes, œdème, pustules ...) sont observés par un médecin, et un score est attribué, permettant de déterminer l'intensité de la réaction positive (faible, forte, extrême).

Lorsqu'un test cutané est positif, le patient est considéré comme allergique et le médicament est formellement contre-indiqué.

Si la forme réactive d'un médicament (lorsque c'est le métabolite qui est immunogène) n'est pas disponible pour pouvoir réaliser un patch test ou si les tests cutanés pratiqués se révèlent négatifs malgré des symptômes cliniques évocateurs d'une allergie, un test de provocation est nécessaire pour établir le diagnostic d'allergie ou non du patient. Les tests de provocation ont une très bonne sensibilité mais doivent être effectués, sous une surveillance médicale accrue, dans des centres spécialisés, possédant des unités de réanimation. Ils sont particulièrement utilisés lorsque le médicament soupçonné est un AINS, un anesthésique local, un antibiotique autre que les pénicillines ou dans le cas d'une allergie supposée aux pénicillines ayant donné des tests cutanés négatifs chez le patient. Ils sont réalisés au minimum 1 mois après la dernière réaction d'hypersensibilité, en utilisant le même

médicament et la même voie d'administration. Les tests de provocation ne doivent pas être réalisés si le médicament soupçonné est peu utilisé, ou si d'autres alternatives médicamenteuses existent pour remplacer le médicament soupçonné ou bien si la réaction d'hypersensibilité était associée à un SJS, ou à un syndrome Lyell ou à une atteinte d'un organe en particulier (Brockow et al. 2002; Torres et al. 2003; Romano et al. 2004; Blanca et al. 2009).

En complément des tests cutanés, des tests biologiques peuvent être réalisés. Les tests biologiques consistent majoritairement en la détection d'anticorps, en particulier les IgE, spécifiques du médicament dans le cas, par exemple, d'allergies aux pénicillines. Un résultat négatif ne signifie pas qu'il ne s'agit pas d'une allergie et un résultat positif seul ne permet pas de diagnostiquer une allergie médicamenteuse. La validation du diagnostic allergique se fait en conjonction avec les symptômes cliniques observés et les résultats des tests cutanés. La mesure du taux IgE spécifiques du médicament n'est pas disponible pour tous les médicaments. Des mesures du taux d'IgG et d'IgM spécifiques d'un médicament peuvent être réalisés dans les cas de cytopénies par exemple (Demoly et al. 2002; Torres et al. 2003; Blanca et al. 2009).

Des études complémentaires *in vitro* peuvent également être réalisées, en particulier, dans le cas d'allergies à certains médicaments tels que les antibiotiques de la famille des β -lactames ou les myorelaxants. Ainsi, la quantification de l'histamine ou de la tryptase, sécrétées par les basophiles et les mastocytes, peut apporter des informations supplémentaires. Un autre test concernant les basophiles a été proposé. Il consiste à mesurer par cytométrie en flux, l'expression de marqueurs d'activation (CD63) des basophiles du patient après les avoir mis au contact du médicament (Torres et al. 2003; Beeler et al. 2008).

Des tests *in vitro* sur les LT provenant du sang périphérique de patients allergiques sont également réalisés en complément des tests cutanés. En effet, plusieurs études ont montré la présence de LT spécifiques du médicament responsable de l'allergie, au sein des tissus affectés mais également dans le sang périphérique de patients allergiques. De plus, une étude a montré que la fréquence de ces LT mémoires spécifiques du médicament est élevée dans le sang périphérique de patients en rémission et que ces LT mémoires spécifiques du médicament étaient toujours présents même douze ans après la réaction aiguë (Beeler et al. 2006). Cette étude a été menée sur cinq patients allergiques à cinq médicaments différents :

amoxicilline, vancomycine, sulfaméthoxazole, phénytoïne et carbamazépine. La fréquence des LT mémoires spécifiques de ces médicaments dans le sang périphérique de ces cinq patients a été évaluée soit par mesure de leur prolifération (CFSE : 5,6-carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester) soit par mesure des cytokines secrétées (ELISpot : Enzyme-Linked Immunosorbent Spot, pour les cytokines comme l'interleukine 2 (IL-2), l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13, et l'interféron γ (IFN γ)). La fréquence obtenue par mesure de la prolifération est de 200 à 4000 LT spécifiques par million de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) et la fréquence obtenue par mesure de la cytokine la plus sécrétée est de 100 à 400 LT spécifiques par million de PBMC. Ces fréquences sont du même ordre que celle obtenue pour l'anatoxine tétanique (Beeler et al. 2006).

Le TTL (Test de transformation lymphocytaire) consiste à étudier la prolifération *in vitro* des LT spécifiques d'un médicament impliqué et constitue le test *in vitro* le plus utilisé pour le diagnostic d'une hypersensibilité retardée, aux β -lactames. En effet, il permet de détecter une sensibilisation *in vivo* des LT du sang périphérique de patients allergiques, dans le cas d'hypersensibilités retardées. C'est un test rapide (moins d'une semaine) et qui évite tout risque pour le patient, contrairement aux tests cutanés. Le test est considéré comme positif lorsque l'index de stimulation (rapport de la prolifération des LT observée en présence du médicament sur la prolifération des LT observée en absence du médicament) est supérieur à 2. Sa spécificité a été démontrée en obtenant des lignées de LT et des clones de LT spécifiques des médicaments impliqués, provenant de cultures de PBMC de patients allergiques, et stimulés avec des médicaments tels que les β -lactames, en particulier **la pénicilline G** (Brander et al. 1995; Mauri-Hellweg et al. 1996; Padovan et al. 1996; Padovan et al. 1997; Weltzien et al. 1998; Padovan et al. 1999) ; **la lidocaïne** (Zanni et al. 1997; Zanni et al. 1998; Zanni et al. 1999) ; **le sulfaméthoxazole (SMX)** (Schnyder et al. 2000; Farrell et al. 2003; Castrejon et al. 2010) ; **la carbamazépine** (Mauri-Hellweg et al. 1995; Naisbitt et al. 2003; Wu et al. 2006) . Aucun de ces médicaments n'induit de prolifération des LT chez des individus non sensibilisés.

De plus, dans le cas des allergies retardées aux β -lactames, de nombreuses études chez des patients, ont montré une bonne sensibilité (de l'ordre de 60 à 70%) du TTL, comparé aux tests cutanés et une bonne spécificité. Par exemple, sur une étude réalisée sur 78 patients présentant une allergie suspectée à la pénicilline, les résultats avec le TTL ont montré une sensibilité de 78%, ce qui est plus élevée qu'avec les tests cutanés (62%) et une spécificité de

85%. Néanmoins, l'inconvénient de ce test réside dans l'utilisation de la radioactivité pour la mesure de la prolifération des LT (Pichler et al. 2004; Romano et al. 2004).

D'autres tests ont également été proposés pour aider au diagnostic des allergies médicamenteuses avec par exemple, la détection et la quantification des LT spécifiques du médicament impliqué, via l'étude de la sécrétion d'IFN γ par les LT via la technique de l'ELISpot, en particulier dans le cas d'hypersensibilité retardée aux antibiotiques β -lactames (Rozières et al. 2009) ou l'étude de l'augmentation de l'expression du marqueur précoce CD69 des LT par cytométrie en flux (Beeler et al. 2008).

Concernant la détection et la quantification des LT circulants spécifiques de l'amoxicilline, via un ELISpot IFN γ , une étude a été menée sur 22 patients présentant un exanthème maculopapuleux lié à une réaction allergique à l'amoxicilline et un patch test positif pour l'amoxicilline (Rozières et al. 2009). Les résultats de cette étude montrent que des LT circulants spécifiques de l'amoxicilline sont détectés chez vingt patients sur les vingt-deux étudiés et que leur fréquence varie entre 30 à 125 LT spécifiques par million de PBMC. Aucun LT spécifique de l'amoxicilline n'a été détecté chez les quarante-six patients contrôle, comprenant des patients présentant une réaction allergique à l'amoxicilline médiée par des IgE, des patients avec un historique d'exanthème maculopapuleux mais tolérant à l'amoxicilline et des individus en bonne santé. Ce test présente une bonne sensibilité (91%) et une bonne spécificité (95%) par rapport aux résultats obtenus avec les patch tests. De plus, il présente une corrélation partielle mais significative avec les résultats obtenus avec le TTL. La sensibilité et la spécificité sont même meilleures que celles obtenues avec le TTL sur ces patients (sensibilité de 68% et spécificité de 85% pour le LTT). Enfin, l'étude montre que la détection de LT spécifiques de l'amoxicilline est même possible vingt ans après l'apparition des symptômes liée à la réaction allergique. Ce test permettrait également d'étudier les réactions croisées des LT face à des médicaments aux structures similaires à celui ayant induit l'épisode allergique. En effet, l'analyse des LT spécifiques de la ticarcilline, antibiotique de la famille des β -lactames, montre que ces LT sécrètent également de l'IFN γ en présence d'autres antibiotiques β -lactames tels que la pénicilline, l'ampicilline, la bacampicilline, pour lesquels le patch test était également positifs. Ce test semble constituer ainsi une bonne alternative au TTL, dans le diagnostic des allergies retardées, en particulier à β -lactames (Rozières et al. 2009).

Enfin, l'étude de l'expression du marqueur d'activation précoce, le CD69 sur les LT CD4⁺ par cytométrie en flux, après deux jours de culture en présence du médicament, a également été proposée, comme marqueur des hypersensibilités retardées. En effet, ce test présente de nombreux avantages: facilité et rapidité du test (2 jours), pas d'utilisation de radioactivité et surtout une bonne corrélation avec le TTL (Beeler et al. 2008). En effet, une étude a été menée sur quinze patients présentant des réactions allergiques médiées par des LT à différents médicaments: des antiépileptiques (phénytoïne, carbamazépine), des β-lactames (amoxicilline, acide clavulanique), des sulfanilamides (sulfaméthoxazole, sulfapyridine), des quinolones (céfuroxime, moxifloxacine) et de la vancomycine. Les quinze patients présentent un TTL positif pour le médicament impliqué. Les résultats montrent une augmentation de l'expression du CD69 pour environ 0.5 à 3% des LT CD4⁺ provenant des PBMC des quinze patients allergiques après 48h d'incubation avec le médicament impliqué, démontrant une bonne corrélation de ce test avec le TTL. Un index de stimulation de 2 permet de bien discriminer les patients allergiques des patients non allergiques. Ainsi, la mesure de l'expression du CD69 de LT CD4⁺ provenant de patients allergiques semble être un outil prometteur pour le diagnostic des allergies médicamenteuses retardées (Beeler et al. 2008).

1.4 Présentation des antibiotiques étudiés :

Les antibiotiques, du grec « anti » pour contre et « bio » pour vie, désignent des molécules qui agissent de manière ciblée sur les bactéries, en empêchant leur croissance (effet bactériostatique) ou en les détruisant complètement (effet bactéricide). Il peut s'agir de molécules produites par des champignons, des bactéries ou obtenus par synthèse.

Notre étude s'est portée sur trois antibiotiques : la pénicilline G, l'amoxicilline et le sulfaméthoxazole, qui sont décrits en détail dans cette partie.

1.4.1. La Pénicilline et l'Amoxicilline

1.4.1.1. Découverte de la Pénicilline et de l'Amoxicilline

En 1897, le médecin français, Ernest Duchesne avait évoqué l'effet bactériostatique *in vitro* et *in vivo* de certaines moisissures (en particulier, *Penicillium glaucum*) sur des cultures d'*Escherichia coli*. Pendant son doctorat, il avait montré qu'une co-injection d'une dose

normalement létale de *Salmonella typhi* (agent responsable de la fièvre typhoïde) et de *Penicillium glaucum* permettait aux animaux de ne pas contracter la typhoïde (Kong et al. 2010).

En 1928, le docteur écossais Alexander Fleming découvre par hasard lui-aussi ces effets bactériostatiques de moisissures. En effet, il rentre de vacances et retourne dans son laboratoire où il travaille sur ses cultures de staphylocoques. Il découvre alors une contamination de ces cultures par un champignon, *Penicillium notatum*. En observant ces cultures, il constate que les staphylocoques ne se développent pas à proximité du champignon. Il émet alors l'hypothèse que le champignon synthétise une substance qui empêche le développement de la bactérie, qu'il appelle « Pénicilline ». Alexander Fleming publie sa découverte en 1929, en signalant que la pénicilline peut être utilisée en doses massives sans risque de toxicité et qu'il serait possible de l'utiliser comme antiseptique. Cependant, la purification et l'isolement de la pénicilline en grandes quantités est difficile, ce qui fait qu'elle est oubliée pendant une dizaine d'années.

En 1939, le pharmacologiste Howard Florey et le biochimiste Ernst Chain reprennent les travaux sur la pénicilline d'Alexander Fleming et parviennent à purifier la pénicilline et à augmenter les quantités de production de la pénicilline. En 1940, ils démontrent que la pénicilline permet de soigner les infections chez les souris, les rats et les chats. Un an après, une étude clinique est menée chez dix patients souffrant d'une infection à *Staphylocoques aureus* et démontre l'effet bénéfique de la pénicilline dans le traitement des infections. Elle est alors produite en quantité industrielle en 1942 et utilisée pour lutter contre les maladies infectieuses, en particulier par les soldats pendant la deuxième guerre mondiale.

En 1945, Alexander Fleming, Howard Florey et Ernst Chain reçoivent le prix Nobel de physiologie-médecine pour la découverte de la pénicilline et ses effets curatifs de nombreuses maladies infectieuses (Bentley 2009; Kong et al. 2010).

Du fait du spectre d'action étroit de la pénicilline G, de nombreux antibiotiques semi-synthétiques dérivés de la pénicilline ont été développés, telle que l'ampicilline, développée en 1961 ou l'amoxicilline, développée en 1964 et mise sur le marché en 1972, qui présentent un spectre d'action plus large (Bentley 2009).

1.4.1.2 Classification des antibiotiques de la famille des β -lactames et spectre d'action

La pénicilline G ou Benzyl-Pénicilline (Pénicilline découverte par Alexander Fleming) et l'amoxicilline font partie des β -lactamines ou antibiotiques de la famille des β -lactames.

Les antibiotiques de la famille des β -lactames regroupent les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs des β -lactames (*cf. tableau 3*).

Groupes	Sous-Groupes	Antibiotiques représentatifs
Pénicillines	Groupe G	Pénicilline G, Pénicilline V
	Groupe M	Oxacilline, Cloxacilline
	Groupe A	Ampicilline, Amoxicilline, Bacampicilline, Métampicilline, Pivampicilline
	Uréido-Pénicillines	Azlocilline, Mezlocilline, Pipéracilline
	Carboxy-Pénicillines	Ticarcilline
	Amidino-Pénicillines	Pivmécillinam
Céphalosporines	Première génération	Céfalexine, Céfactor, Céfadroxil, Céfatrizine, Céfalotine, Céfapyrine, Céfazoline
	Deuxième génération	Céfoxidine, Céfamandole, Céfotiam, Céfotétan, Céfuroxime
	Troisième génération	Céfotaxime, Cefsulodine, Céfopérazone, Ceftazidime, Ceftriaxone, Céfixime, Cefpodoxime,
	Quatrième génération	Céfépime, Cefpirome
Carbapénèmes		Imipénème
Monobactames		Aztréoname
Inhibiteurs des β-lactames		Acide clavulanique, Sulbactam, Tazobactam

Tableau 3: Les β -lactamines ou antibiotiques de la famille des β -lactames

Tous ces antibiotiques possèdent une structure commune : un noyau β -lactame, qui leur confère leur activité antimicrobienne (*cf. figure 2*).

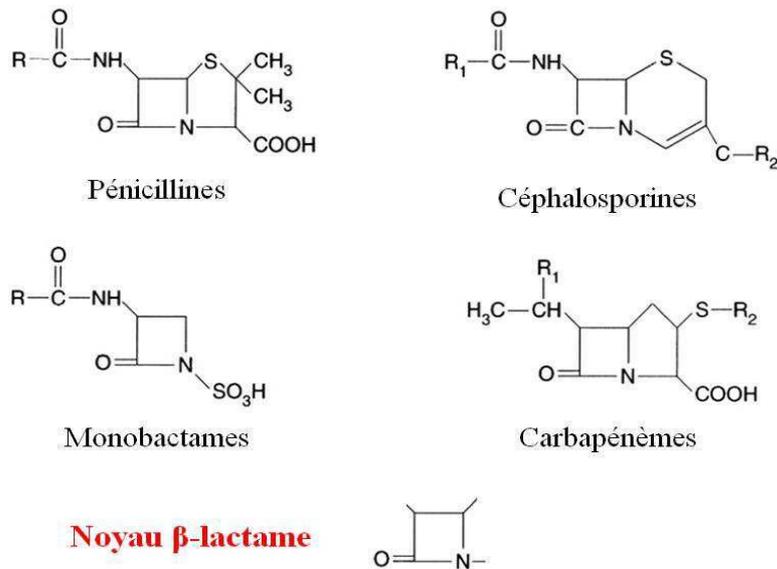


Figure 2: Structure chimique des antibiotiques de la famille des β - lactames (d'après Solensky 2010)
 (Le radical R correspond aux chaînes latérales qui diffèrent en fonction des composés)

Les pénicillines possèdent en plus du noyau β -lactame, un noyau thiazolidine. Elles sont divisées en plusieurs sous-groupes : les pénicillines du groupe G ou les benzyl-pénicillines (issues de la pénicilline G); les pénicillines du groupe M ou les isoxazoly-pénicillines (anti-staphylococciques); les pénicillines du groupe A ou les amino-pénicillines (issues de l'Ampicilline); les uréido-pénicillines; les carboxy-pénicillines et les amidino-pénicillines. Les pénicillines de groupe G ont une activité microbienne contre les cocci à gram négatif et positif et contre les bacilles gram négatif. Néanmoins, certains staphylocoques ont développé un mécanisme de résistance face aux pénicillines, en produisant des pénicillinases qui sont des enzymes produites par les bactéries et qui inhibent préférentiellement, l'activité antimicrobienne des benzyl-pénicillines, des amino-pénicillines, des uréido-pénicillines et des carboxy-pénicillines. Dans le cas d'une infection à ce type de staphylocoques, il convient d'utiliser les pénicillines du groupe M, qui ont le même spectre d'action que ceux du groupe G mais qui résistent mieux aux pénicillinases produites par ces staphylocoques. Les pénicillines du groupe A ont un spectre d'action un peu plus large que celui des pénicillines du groupe G et M, en pouvant être employés sur les cocci gram négatif et positif et les bacilles à gram positif mais également sur certains bacilles à gram négatifs. Les uréido-pénicillines et les carboxy-pénicillines ont également un spectre d'action plus élargi, similaire à celui des pénicillines du groupe A mais sont capables en plus, de résister à certaines céphalosporinases, enzymes produites par certaines souches. Enfin, les amidino-pénicillines ont un spectre d'action limité uniquement aux bacilles à gram négatif.

Les céphalosporines possèdent en plus du noyau β -lactame, un noyau thiazine et sont divisées en quatre sous-groupes, en fonction de leur date de développement mais surtout en fonction de leur spectre d'action et de leur résistance vis-à-vis des céphalosporinases, (enzyme produites par certaines bactéries, capables d'inhiber l'action antimicrobienne de certaines céphalosporines) : les céphalosporines de première génération, de deuxième génération, de troisième génération et de quatrième génération. Les céphalosporines ont un spectre d'action élargi, en particulier sur les bacilles à gram négatif et sont résistantes aux pénicillinases. Les céphalosporines de quatrième génération présente une résistance plus importante face à celles de première, deuxième et troisième génération.

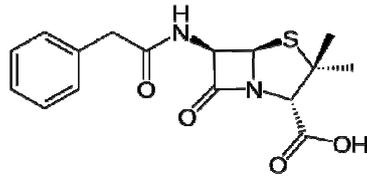
Les carbapénèmes associent un noyau pénème au noyau β -lactame et présentent un large spectre d'action. Ils conservent leur activité antimicrobienne face à diverses β -lactamases (enzymes capable d'hydrolyser le noyau β -lactame).

Les monobactames ne possèdent pas d'autres cycles que le noyau β -lactame et ne sont actifs que sur les bacilles à gram négatif.

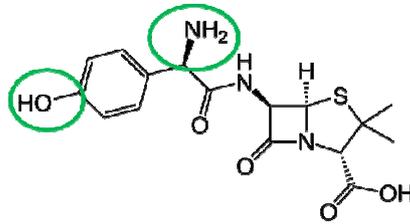
Les inhibiteurs des β -lactamases ne présentent pas d'activité antimicrobienne mais sont capables d'inhiber les β -lactamases (en particulier, les pénicillinases et certaines céphalosporinases) en jouant le rôle de substrat « suicide », qui va se fixer sur ces enzymes de manière irréversible et limiter leur action sur les autres antibiotiques. C'est pourquoi, les inhibiteurs des β -lactamases tels que l'acide clavulanique, sont associés à des pénicillines telles que l'amoxicilline ou la ticarcilline (Decoster 2008).

1.4.1.3. Structure chimique de la Pénicilline G et de l'Amoxicilline

La Pénicilline G est une β -lactamine naturelle synthétisée par des champignons (*les pénicilliums*) alors que l'amoxicilline est une β -lactamine semi-synthétique car elle dérive de la pénicilline G et que des chaînes latérales ont été rajoutées. En effet, comparé à la pénicilline G, l'amoxicilline possède un groupement NH_2 et un groupement OH en plus, indiqués en vert sur la figure 3.



Pénicilline G ou Benzyl-Pénicilline



Amoxicilline

Figure 3: Structure chimique de la Pénicilline G et de l'Amoxicilline

1.4.1.4. Mode d'action des β -lactamines

Les β -lactamines telles que les pénicillines sont des antibiotiques à effet bactériostatique. En effet, elles bloquent la synthèse de la paroi bactérienne, par inhibition de la synthèse du peptidoglycane, composant principal de la paroi bactérienne.

Chez les bactéries à gram négatif, le peptidoglycane est protégé par une membrane extérieure, ce qui n'est pas le cas chez les bactéries à gram positif où le peptidoglycane est en contact direct avec le milieu extérieur, ce qui permet une pénétration plus facile des pénicillines chez ces bactéries.

Le peptidoglycane confère à la bactérie sa forme et sa rigidité et lui permet de résister à la pression osmotique intracellulaire. C'est un polymère de chaînes linéaires polyosidiques, dont le motif de base est un disaccharide pentapeptide, composé de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique sur lequel est additionné le pentapeptide, courte chaîne peptidique. La synthèse du peptidoglycane nécessite plusieurs enzymes, telles que les glycosyltransférases, les transpeptidases, les carboxypeptidases etc....

Les pénicillines vont se fixer sur les protéines de liaison à la pénicilline (PLP), qui correspondent aux transpeptidases et aux carboxypeptidases. En se fixant de manière covalente à ces enzymes, les pénicillines inhibent leur action et la synthèse du peptidoglycane ne peut avoir lieu, ce qui inhibe la croissance de la bactérie (Kong et al. 2010).

1.4.1.5 Prévalence des allergies à la pénicilline et à l'amoxicilline et symptomatologie les plus fréquentes

Les allergies aux antibiotiques, et plus particulièrement, aux β -lactames sont les plus fréquentes. Si l'on reprend les études épidémiologiques présentés dans la première sous-partie, on constate que dans l'étude du Boston Collaborative Drug Surveillance Programme, 7 antibiotiques dont 5 appartenant à la famille des β -lactames, figurent parmi les 10 médicaments qui induisent le plus de réactions cutanées allergiques. L'amoxicilline arrive en tête avec une incidence de 5,1 % et la pénicilline G en dixième position avec 1,9%. Dans l'étude réalisée au Portugal, sur la prévalence de 7,8% d'allergies médicamenteuses, 4,5% sont dues aux β -lactames.

Les pénicillines sont capables d'induire tous les types d'hypersensibilités (de type I, II, III et IV) et tous les symptômes associés (érythèmes, rashes maculopapuleux, chocs anaphylactiques, angio-œdèmes, urticaire, cytopénies sanguines, maladies sériques, dermatites de contact, syndrome DRESS, syndrome de Steven-Johnson, syndrome de Lyell...). Les chocs anaphylactiques mortels restent tout de même rares. Néanmoins, le nombre de décès dus à des chocs anaphylactiques aux β -lactamines est proche de 500 décès par an aux Etats-Unis et représente les trois quarts des chocs mortels d'origine médicamenteuse (Ponvert et al. 2003).

Cependant, les manifestations les plus courantes restent cutanées. Par exemple, une étude a été menée au sein de la population de Seine-Saint-Denis (93, France) et visait à déterminer la fréquence de l'allergie à la pénicilline auto-déclarée et les manifestations cliniques les plus fréquentes. Cette étude rapporte une fréquence d'allergie à la pénicilline auto-déclarée de 9,4% (99 sur 1051). Concernant les manifestations cliniques, l'épisode allergique s'est manifesté le plus souvent sous la forme d'une éruption cutanée maculopapuleuse (58 patients sur 99), d'un purit (49 patients sur 99) ou d'un œdème (42 patients sur 99) (Branellec et al. 2008).

De la même manière, dans une étude menée sur 1865 enfants présentant une réaction allergique présumée à aux β -lactames, seuls 227 enfant présentaient réellement une réaction allergique aux β -lactames, diagnostiquée par un test cutané ou un test de provocation positif en plus de leur histoire clinique (Ponvert et al. 2011). Les manifestations cliniques les plus fréquentes sont l'urticaire et les œdèmes avec une prévalence de 55,5% (126 cas sur 227). Vient ensuite l'anaphylaxie avec une prévalence de 22% (50 cas sur 227). Suivent ensuite les rashes maculopapuleux, avec une prévalence de 12,3% (28 cas sur 227). La (pseudo)-maladie sérique se retrouve en quatrième position avec une prévalence de 4,8% (11 cas sur 227). En

dernière position, se trouvent les toxidermies sévères telles que les érythèmes multiformes avec une fréquence de 1,8% (4 cas sur 227), les syndromes de Stevens-Johnson avec également une fréquence de 1,8% (4 cas sur 227), les pustuloses exanthémateuses aiguës généralisées avec une fréquence de 1,3% (3 cas sur 227), et le syndrome DRESS avec une fréquence 0,4% (1 cas sur 227) (Ponvert et al. 2011).

Des réactions croisées existent dans le cas des allergies aux β -lactames. Par exemple, le risque d'allergies aux céphalosporines, est augmenté chez les patients allergiques aux pénicillines. Les réactions croisées se manifestent cliniquement lorsqu'un médicament qui n'a jamais été administré auparavant, induit une réaction d'hypersensibilité lors de la première administration, du fait d'une sensibilisation préexistante à un composé présentant une structure similaire (Romano et al. 2005). Dans le cas des β -lactames, les antibiotiques de cette famille présentent tous une structure commune du fait de la présence du noyau β -lactame et certains antibiotiques parmi les quatre sous-familles présentent des chaînes latérales similaires, pouvant expliquer la présence des réactions croisées. Ainsi, chez les patients allergiques à la pénicilline G, des réactions croisées avec d'autres pénicillines telles que l'oracilline (pénicilline V), l'amoxicilline, l'ampicilline, la bacampicilline, la pivampicilline (pénicilline A) et des céphalosporines telles que la céfamandole (céphalosporine de deuxième génération), la céfalotine (céphalosporine de première génération) et la céfaloridine (céphalosporine de première génération) sont observées (Ponvert et al. 2003). De la même manière, des réactions croisées chez des patients allergiques à l'amoxicilline, sont également observées, avec d'autres pénicillines comme l'ampicilline, la bacampicilline, la pivampicilline, la pénicilline G et avec des céphalosporines de première génération telles que la céfadroxyl et des carbapénèmes comme l'imipénème (Ponvert et al. 2003).

1.4.2. Le Sulfaméthoxazole

Le sulfaméthoxazole (SMX) est un antibiotique à effet bactériostatique, qui appartient à la famille des sulfamides ou sulfonamides.

1.4.2.1. Découverte du Protonsil et essor des sulfamides

De 1932 à 1935, le médecin allemand Gerhard Domagk découvre les propriétés antibactériennes d'un colorant, le protonsil. Dans un article publié en 1935, il montre que le

protonsil protège les souris infectées par des streptocoques. Dès 1936, le protonsil est utilisé pour le traitement des infections bactériennes dues aux streptocoques chez l'Homme. En particulier, Gerhard Domagk l'utilise chez sa fille pour la sauver de l'amputation de son bras. En 1935, une équipe française à l'Institut Pasteur démontre que le protonsil se métabolise en sulfanilamide et que le sulfanilamide est le principe actif du protonsil, responsable de son activité antibactérienne. Dès 1937, le sulfanilamide se retrouve sur le marché en France, en Grande-Bretagne et aux Etats-Unis. Dès lors, de nombreuses molécules dérivées du sulfanilamide sont développées telles que le sulfapyridine ou le sulfathiazole (*cf. figure 4*), utilisées pour le traitement de la pneumonie.

En 1939, Gerhard Domagk reçoit le prix Nobel de médecine pour la découverte des effets antibactériens du protonsil (Bentley 2009).

1.4.2.2. La famille des sulfamides: structure chimique

Les sulfamides sont donc des antibiotiques synthétiques dérivés du sulfanilamide, qui est responsable de l'activité antibactérienne de ces antibiotiques. Les sulfamides ont donc une structure chimique commune dérivée du sulfanilamide, auxquelles divers groupements chimiques ont été ajoutés sur l'atome d'azote lié au soufre (*cf. figure 4*). C'est ainsi qu'ont été obtenus le sulfaméthoxazole (SMX), le sulfapyridine et le sulfathiazole.

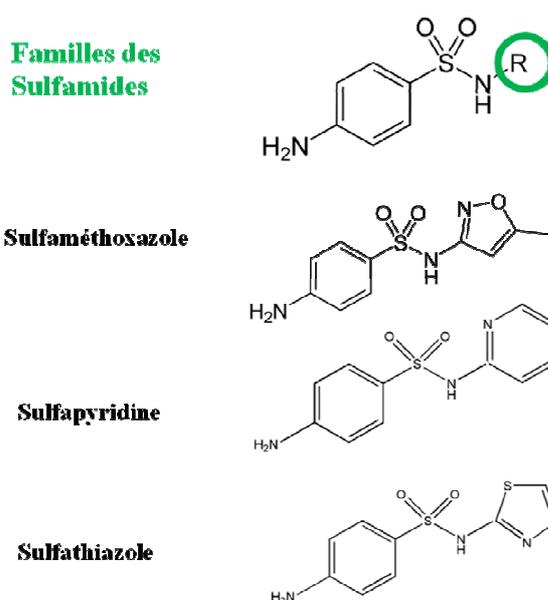


Figure 4: Quelques exemples d'antibiotiques sulfamidés (Bentley 2009)
Le R correspond aux radicaux chimiques qui sont différents d'un sulfamide à un autre.

1.4.2.3. Mode d'action et spectre d'action

Les sulfamides sont des antibiotiques à effet bactériostatique. En effet, ils inhibent la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, composé indispensable dans la synthèse des bases nucléiques (puriques et pyrimidiques). Sans lui, les bactéries ne peuvent plus synthétiser de bases nucléiques et se multiplier. Les sulfamides sont des analogues structuraux de l'acide para-aminobenzoïque et se fixent sur l'enzyme, la dihydroptéroate synthétase qui métabolise l'acide para-aminobenzoïque. Ils agissent donc par inhibition compétitive sur la dihydroptéroate synthétase et bloquent une étape de synthèse indispensable à la synthèse des acides nucléiques (cf. figure 5).

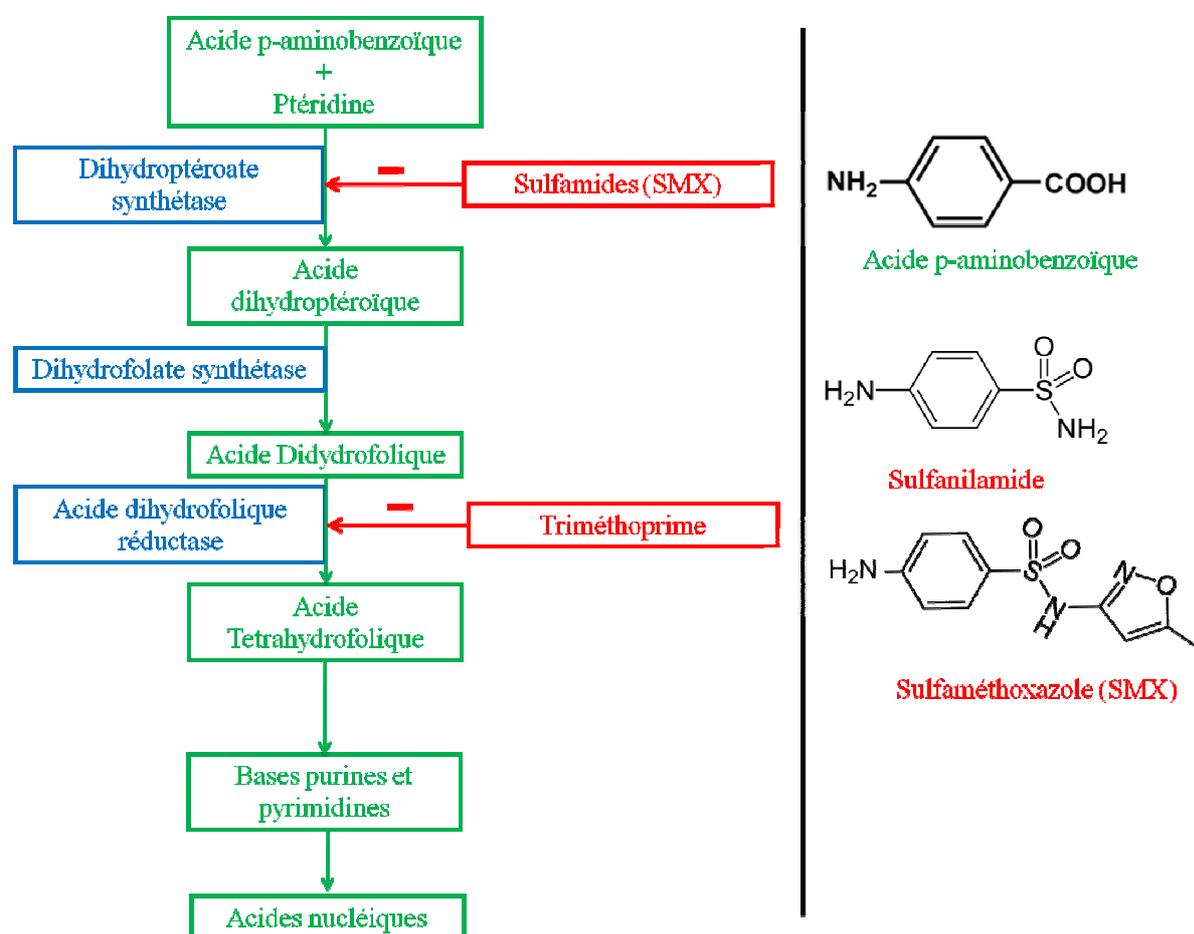


Figure 5: Voie de synthèse des acides nucléiques chez les bactéries et structure comparative du PABA (Acide p-aminobenzoïque) avec le SMX (Sulfaméthoxazole). (Les enzymes sont indiqués en bleu, et les inhibitions des enzymes sont indiquées par un trait rouge).

Les sulfamides ont un spectre d'action large sur les cocci à gram positif et négatif, sur certains bacilles à gram positif et négatif et sur quelques parasites.

Ils sont généralement associés aux diaminopyridines, antibactériens de synthèse, tels que le triméthoprim, afin de potentialiser l'effet antibactérien. En effet, le triméthoprim bloque l'action de la dihydrofolate réductase, une autre enzyme impliquée dans la synthèse de l'acide tétrahydrofolique (*cf. figure 5*).

1.4.2.4. Métabolisme du SMX

Le SMX est en grande partie métabolisé dans le foie, par N-acétylation principalement. C'est une voie de détoxification qui conduit à la production de métabolites N-acétylés non toxiques. Il existe un polymorphisme génétique concernant l'acétylation hépatique, on parle alors d'acétyleurs lents ou d'acétyleurs rapides.

Une autre voie de métabolisation a été mise en évidence pour le sulfaméthoxazole, qui met en jeu les cytochromes P450, en particulier le CYP2C9 (*cf. figure 6*). En effet, sous l'action des cytochromes P450 ou de la myéloperoxydase, le sulfaméthoxazole peut être métabolisé en sulfaméthoxazole hydroxylamine (SMX-NHOH), composé toxique. Par oxydation ou auto-oxydation, le SMX-NHOH peut donner du nitroso-sulfaméthoxazole (SMX-NO), métabolite très réactif. Le SMX-NO est alors capable de jouer le rôle d'haptène et de se fixer aux protéines. En présence de glutathion, le SMX-NO est reconverti en SMX-NHOH (Farrell et al. 2003; Roychowdhury et al. 2005; Sanderson et al. 2007).

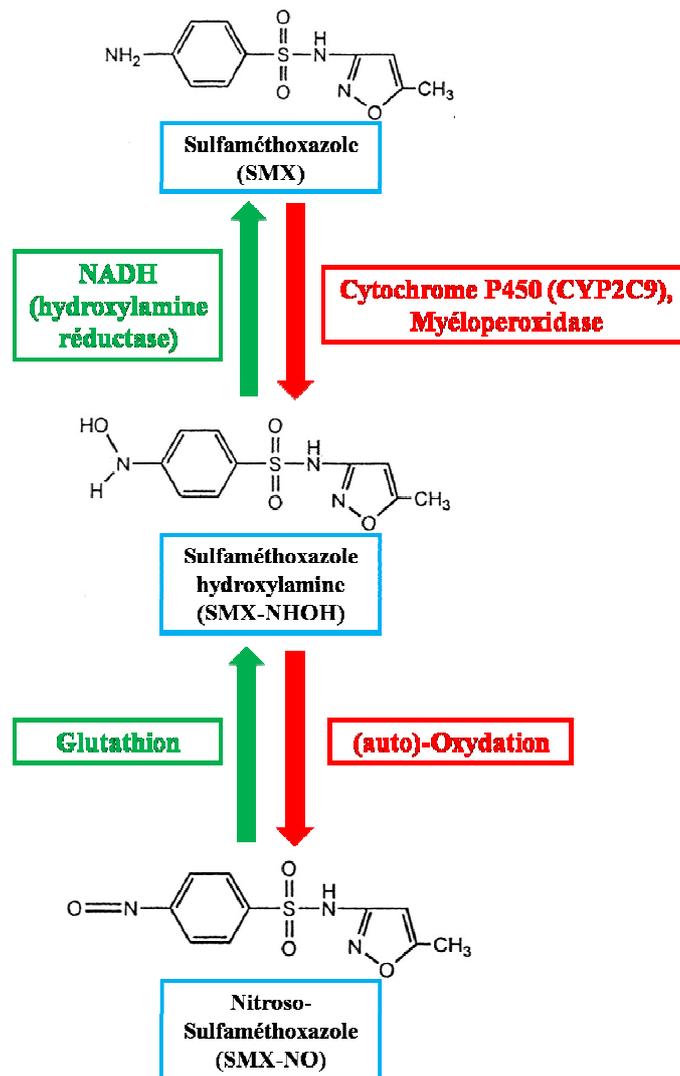


Figure 6: Métabolisme du SMX, autre que la N-acétylation (Farrell et al. 2003; Sanderson et al. 2007)

1.4.2.5. Prévalence des allergies au SMX et symptomatologies les plus fréquentes

Dans l'étude du Boston Collaborative Drug Surveillance Programme, la combinaison Triméthoprime-Sulfaméthoxazole était le deuxième médicament à induire le plus de réactions cutanées allergiques (urticaires, éruptions érythémateuses, prurits généralisés), avec une incidence de 3,4%. Chez les patients atteints du VIH où le Triméthoprime-Sulfaméthoxazole est utilisé pour le traitement et la prévention de la pneumonie à *Pneumocystis Carinii*, l'incidence est beaucoup plus élevée (de l'ordre de 40%).

Le SMX est capable d'induire de nombreux symptômes tels que des éruptions maculopapuleuses, des érythèmes, de l'urticaire, des syndromes de Steven-Johnson ou de

Lyell, des thrombopénies, et des anémies hémolytiques. Une étude concernant les cas d'allergies médicamenteuses à l'association Triméthoprim-Sulfaméthoxazole chez les enfants révèle que les manifestations les plus courantes sont l'urticaire et les rashes maculopapuleux (Karpman and Kurzrock 2004).

Une étude concernant le co-trimoxazole [association SMX-Triméthoprim (TMP)], a été réalisée sur 191 patients thaïlandais, en 2011, afin d'évaluer les manifestations d'hypersensibilités cutanées associées à ce médicament. La prévalence des réactions d'hypersensibilité du co-trimoxazole est de 1 à 3% dans la population générale. Cette prévalence est beaucoup plus élevée (jusqu'à 34%) chez les patients infectés par le virus du SIDA (Chantachaeng et al. 2011). Plusieurs facteurs sont évoqués quant à l'augmentation de cette prévalence, telle que la prise de plusieurs médicaments chez les patients infectés par le VIH ou les faibles niveaux de glutathion intracellulaire (Eck et al. 1989; Staal 1998). Sur les 191 patients, 177 sont classés comme ayant eu une possible réaction d'hypersensibilité cutanée liée à l'administration de co-trimoxazole et 14 sont classés comme ayant une probable réaction d'hypersensibilité cutanée liée à l'administration de co-trimoxazole, selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization, WHO). La manifestation cutanée la plus fréquente liée à la prise de co-trimoxazole est le rash maculopapuleux avec une prévalence de 36,6% (70 patients sur 191). Vient ensuite l'érythème pigmenté fixe, avec une prévalence de 22% (42 patients sur 191). Suit ensuite l'angio-œdème avec ou sans urticaire, avec une prévalence de 12,6% (24 patients sur 191). L'urticaire seul se retrouve en quatrième position avec une prévalence de 12% (23 patients sur 191). Suivent ensuite le syndrome de Stevens-Johnson avec une prévalence de 8,4% (16 patients sur 191), puis le syndrome DRESS avec une prévalence de 3,1% (6 patients sur 191), et l'érythème multiforme avec une prévalence de 2,1% (4 patients sur 191) et enfin, l'anaphylaxie avec une prévalence de 1% (2 patients sur 191). Quatre patients ont été classés dans une catégorie « autre » : 3 ont développé des purpurs et 1 une photosensibilité (Chantachaeng et al. 2011). Dans cette étude, 42 patients sont HIV-positifs et 27 patients sont HIV-négatifs et 122 patients ont un statut HIV non déterminé. Parmi le groupe des HIV-négatifs, la manifestation la plus commune est l'érythème pigmenté fixe (33.3%), suivie par les rashes maculopapuleux (29,6%) et l'angio-œdème avec ou sans urticaire (18.5%). Parmi le groupe des HIV-positifs, les rashes maculopapuleux (58.5%) sont les manifestations cutanées les plus fréquentes, suivis par les syndromes de Stevens-Johnson (21.4%), le syndrome DRESS (7.1%) et les érythèmes pigmentés fixes (7.1%) (Chantachaeng et al. 2011).

Plusieurs facteurs ont été suggérés pour expliquer la fréquence élevée de réactions d'hypersensibilité aux TMP-SMX chez les patients HIV positifs, comme la faible capacité d'acétylation (Naisbitt 1996; O'Neil et al. 1997), l'augmentation du stress oxydatif, et le faible taux de glutathion (Eck et al. 1989; Staal 1998). En effet, comme vu précédemment, la voie d'acétylation est la voie principale de détoxification du SMX. Cependant, le phénotype acétyleur lent ne semble pas prédictif du développement de réactions d'hypersensibilité aux TMP-SMX chez les patients HIV-positif (Alfirevic et al. 2003). La réplication du virus HIV est stimulée par la protéine Tat, dont l'expression est associée avec une augmentation du stress oxydatif et une diminution de la synthèse de glutathion et de sa concentration cellulaire (Martin et al. 2007). En effet, une étude montre une augmentation de la toxicité du SMX-NHOH dans des lymphocytes transfectés avec le gène codant pour la protéine Tat du VIH (Karpman et al. 2004). Dans le cas du SMX, le glutathion protège les cellules, en empêchant la formation de métabolites réactifs et toxiques. En effet, le glutathion empêche l'oxydation du SMX-NHOH en SMX-NO, qui est très réactif et très toxique. Néanmoins, l'utilisation de N-acétylcystéine pour augmenter le taux de glutathion intracellulaire, dans le but de prévenir ou d'atténuer les réactions d'hypersensibilité chez les patients HIV positif ne montre aucun effet « protecteur » dans deux essais contrôlés randomisés (Akerlund et al. 1997; Walmsley et al. 1998). Des études récentes suggèrent que des interactions plus complexes entre des facteurs métaboliques et immunorégulateurs seraient à l'origine du développement des réactions d'hypersensibilité à SMX, avec par exemple l'induction d'un état de maturation partielle des DC par le SMX-NO, démontrée *in vitro* par l'augmentation d'un marqueur membranaire de maturation, le CD40, dans un modèle de DC humaines (Sanderson et al. 2007).

II- Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les allergies médicamenteuses

2.1 Phase de sensibilisation

2.1.1 Définition

La réaction immunopathologique des allergies médicamenteuses se déroulent en deux phases : la phase de sensibilisation et la phase d'élicitation.

La phase de sensibilisation (*cf. figure 7*) correspond à la première exposition de l'organisme au médicament. En fonction du mode d'administration du médicament, l'exposition peut être cutanée (application cutanée), systémique (voie orale et parentale) etc...

La phase de sensibilisation est cliniquement muette. Durant cette phase, les APC, telles que les DC, sont activées et vont capturer l'Ag, afin de le présenter aux LT. En effet, les DC migrent dans les ganglions lymphatiques et présentent l'Ag aux LT naïfs. Seuls les LT spécifiques de l'Ag prolifèrent et une partie d'entre eux va participer à la réponse effectrice vis-à-vis de l'Ag. L'autre partie des LT spécifiques de l'Ag va constituer le pool de LT mémoires, qui sont activés en cas de réexposition au médicament lors de la phase d'élicitation (Pichler 2003).

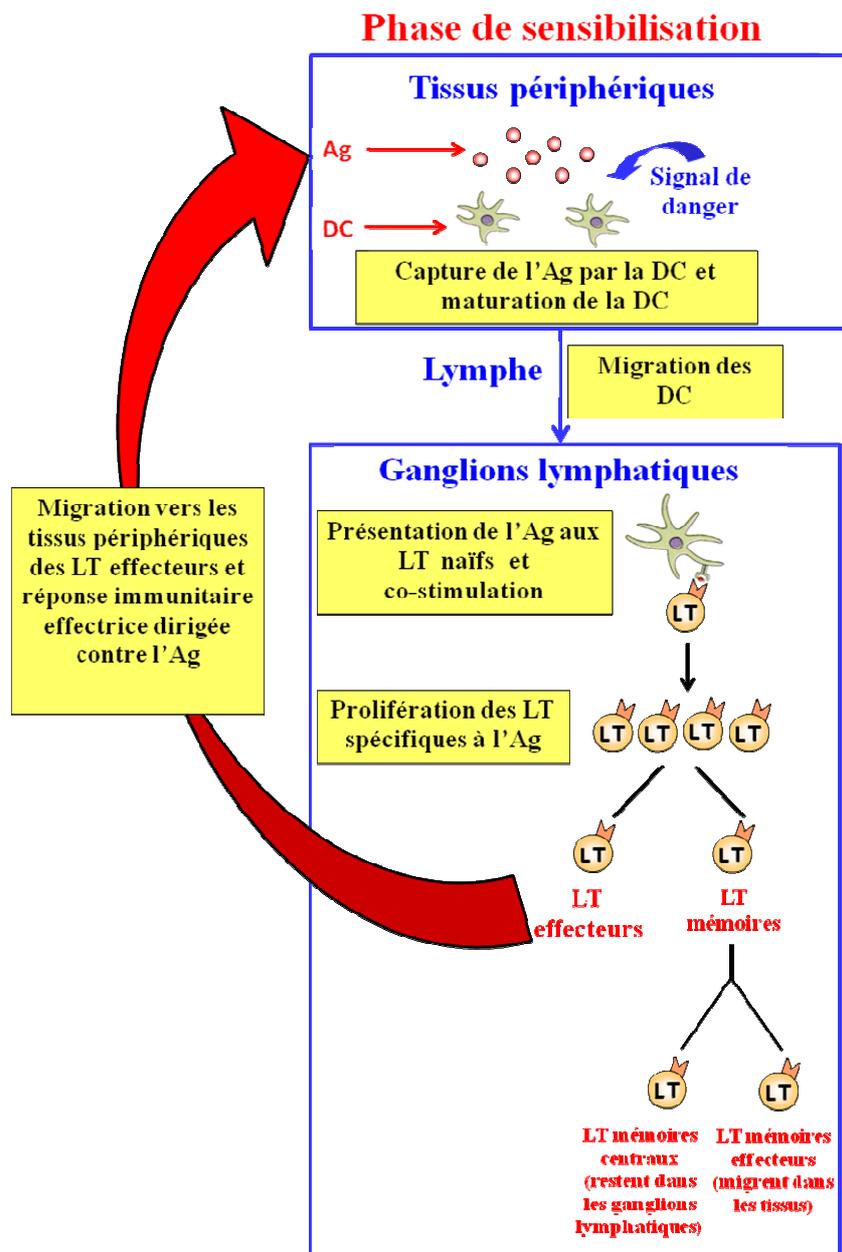


Figure 7: Schéma de la phase de sensibilisation

2.1.2 Réactivité du médicament

L'origine du concept de l'haptène provient des études de Karl Landsteiner et de John Jacobs (1935), qui ont identifié une relation entre la réactivité des allergènes chimiques électrophiles envers les résidus nucléophiles des protéines et leur potentiel sensibilisant, c'est-à-dire leur capacité à provoquer une réponse immune adaptative.

Un haptène est une molécule de faible poids moléculaire, qui a la capacité de se fixer de manière covalente aux protéines. D'après la théorie de l'haptène, les médicaments ayant un

poids moléculaire inférieur à 1000 Da, ne sont pas capables d'induire seuls une réaction immunitaire. Ils doivent jouer le rôle d'haptène et se fixer à une protéine, pour pouvoir être reconnus comme étant immunogènes par le système immunitaire et induire une réponse immunitaire (innée et/ou adaptative). En effet, la fixation du médicament sur la protéine crée un nouvel épitope (néo-antigène), qui est alors reconnu par le système immunitaire (Posadas et al. 2007).

Ainsi, dans le cas de réactions immunitaires médiées par les lymphocytes, le conjugué haptène (ici, le médicament)-protéine est capturé et digéré en fragments peptidiques par les DC et apprêté à leur surface via les molécules du CMH. Ces peptides contenant le médicament sont alors présentés aux récepteurs des LT (TcR), ce qui va induire une réponse immunitaire (effectrice ou tolérogène).

En fonction du type de leur réactivité chimique (directe ou indirecte), les allergènes peuvent être divisés en 3 groupes :

- Les haptènes : ils sont réactifs et peuvent se fixer directement à une protéine sans modification préalable.
- Les pro-haptènes : ils ne sont pas réactifs et ont besoin d'être transformés en métabolites réactifs par l'intervention d'enzymes (enzymes du foie, de la peau...). Les métabolites réactifs sont alors capables de se fixer aux protéines.
- Les pré-haptènes : ce sont des molécules non réactives mais qui suite à de simples transformations chimiques (oxydation par exemple), ne nécessitant pas l'intervention de systèmes enzymatiques spécifiques, peuvent devenir des haptènes et se fixer aux protéines.

Les β -lactamines sont des exemples typiques d'haptènes, présentant une réactivité chimique directe. En effet, par ouverture de leur noyau β -lactame, elles sont capables de se fixer aux protéines, en particulier sur les résidus amines nucléophiles des lysines. Ainsi, dans le cas des allergies à la pénicilline G, le déterminant antigénique majeur est le motif pénicilloyl. Des déterminants mineurs sont également mis en cause dans certains cas d'allergies : il s'agit des déterminants pénicillamine et pénicillényl, qui proviennent de la formation de ponts disulfures avec les résidus thiols des cystéines des protéines (*cf. figure 8*).

voie d'acétylation (patients VIH par exemple), ce qui peut expliquer que chez ces sujets, la prévalence d'hypersensibilité au SMX est plus importante que chez des sujets sains. De plus, le SMX peut être métabolisé ailleurs que dans le foie, comme dans la peau, où il a été montré que les kératinocytes et les fibroblastes dermaux ont une capacité, certes, modérée, à bioactiver le SMX via leur enzymes, conduisant à une hapténisation intracellulaire. De la même manière, les DC seraient également capables de métaboliser le SMX en SMX-NO. En effet, l'expression de gènes codant pour plusieurs enzymes métaboliques a été quantifiée par RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction), sur des extraits d'ARNm provenant de DC humaines, différenciées à partir de PBMC du sang périphérique de dix donneurs sains. Cette étude montre que des ARNm de la myéloperoxydase et du cytochrome CYP1B1 sont présents dans les DC, en quantité plus importante que celle trouvée dans les PBMC ou les hépatocytes. La traduction de l'ARNm de la myéloperoxydase en protéine permettrait alors à la DC de métaboliser le SMX en SMX-NO (Naisbitt 2004; Posadas et al. 2007).

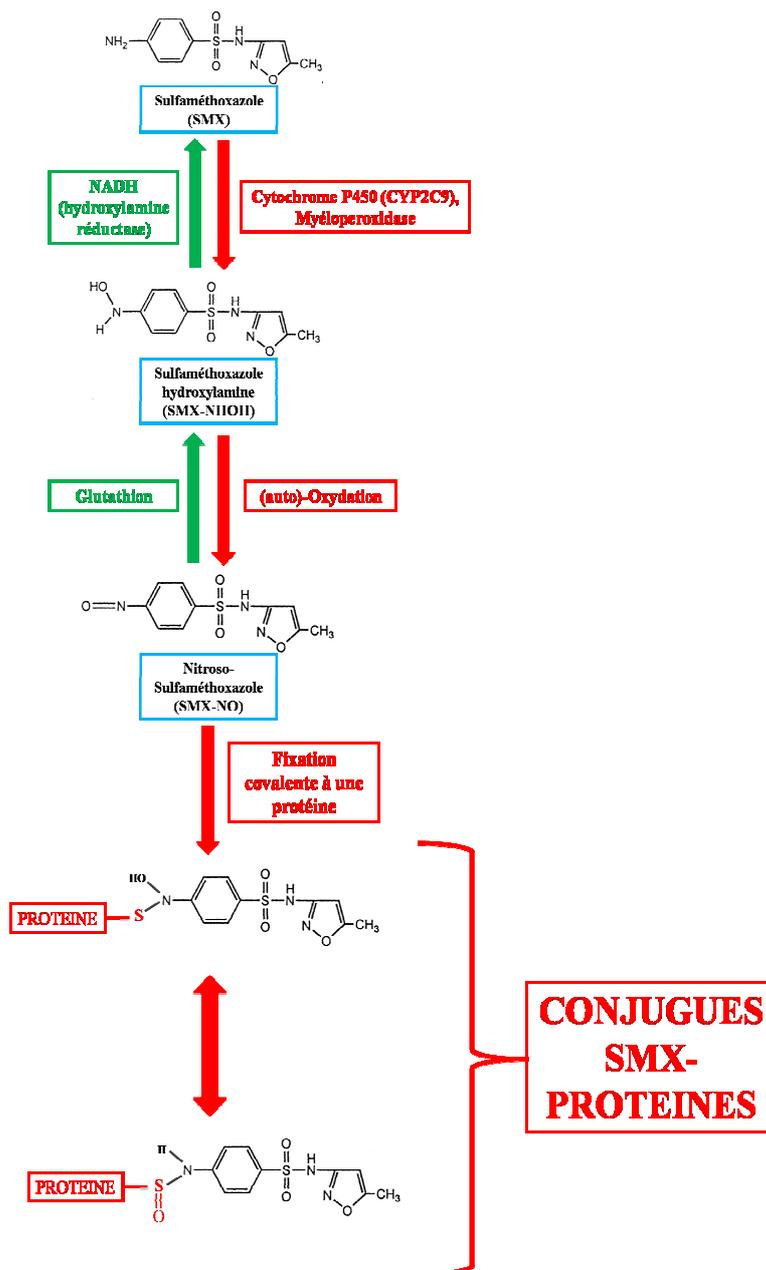


Figure 9: SMX, exemple de pro-haptène (Farrell et al. 2003; Sanderson et al. 2007)

Ainsi, la présence d'adduits protéines-SMX a été observée dans plusieurs études, en particulier dans des splénocytes murins et dans des Mo-DC humaines (DC dérivées de monocytes humains) exposés à du SMX ou du SMX-NO. La formation d'adduits protéines-SMX-NO, observés en microscopie confocale et quantifiée par ELISA (utilisation d'un anticorps anti-SMX) est dépendante de la concentration et du temps d'incubation (Elsheikh et al. 2010) (*cf. figure 10*). De part sa réactivité, le SMX-NO est capable de se fixer aux protéines cellulaires et sériques au niveau des cystéines (Naisbitt et al. 2001; Manchanda et al. 2002; Callan et al. 2009). Des études ont montré que des adduits provenant de protéines

modifiées par le SMX-NO sont capables de stimuler des LT et des clones lymphocytaires de patients allergiques (Schnyder et al. 2000; Farrell et al. 2003; Callan et al. 2009; Castrejon et al. 2010).

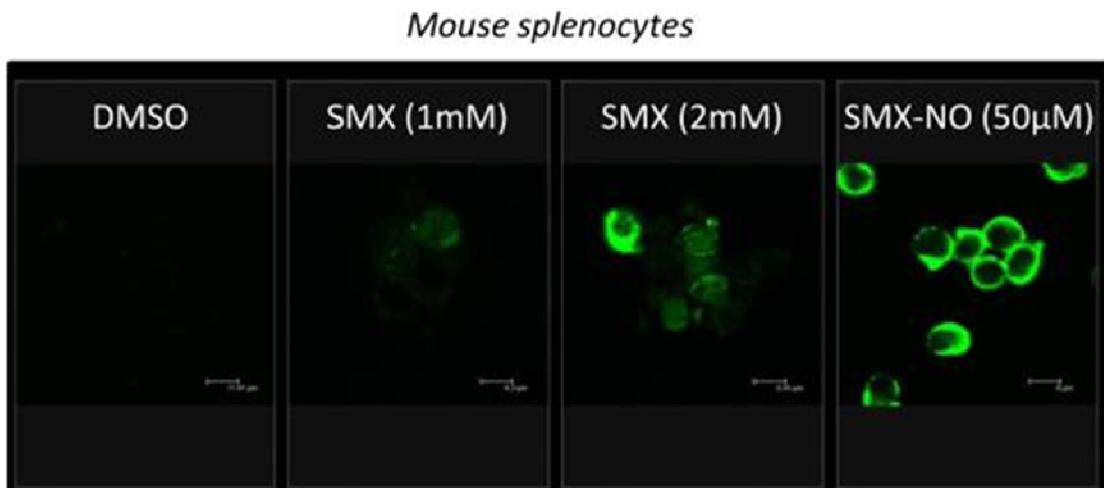


Figure 10: Formation d'adduits protéines-SMX-NO (en vert) dans des splénocytes exposés à du SMX ou du SMX-NO, observée en microscopie confocale (le DMSO est le véhicule du SMX et SMX-NO) (Elsheikh et al. 2010)

Les haptènes médicamenteux peuvent se fixer sur toutes les protéines, telles que des protéines solubles comme l'albumine humaine (HSA pour Human Serum Albumin), des protéines membranaires comme les molécules du CMH ou les TcR, récepteurs des LT, voire même sur les peptides présentés aux LT par les CMH (*cf. partie II.1.4 sur la présentation antigénique*). Le complexe médicament-protéine peut alors activer le système immunitaire (Posadas et al. 2007).

Ainsi, plusieurs études *in vitro* (caractérisation de bio-conjugués protéines-médicaments synthétisés) et *in vivo* (caractérisation de sérum de patients allergiques) ont montré que certains médicaments tels que la pénicilline G, la flucloxacilline, la pipéracilline, le SMX sont capable de se fixer à la HSA, formant ainsi des bio-conjugués. Les sites de fixations identifiés, souvent des lysines ou des cystéines, sont reportés dans le tableau 4.

Médicaments étudiés	Matériels biologiques utilisés	Sites identifiés	Références
Pénicilline G	Sérum de patients et Bio-conjugués	Lysines 190, 195, 199, 432, 541, 545	(Yvon et al. 1988; Yvon et al. 1989; Yvon et al. 1990)
	Sérum de patients	Lysines 20, 137, 159, 190, 195, 199, 212, 351, 372, 432, 436, 525, 541, 545	(Meng et al. 2011)
	Bio-conjugués	Lysines 20, 137, 159, 190, 195, 199, 212, 351, 432, 525, 541, 545	(Meng et al. 2011)
Flucloxacilline	Bio-conjugués	Lysines 162, 190, 195, 199, 212, 351, 432, 525, 541, 545	(Jenkins et al. 2009)
	Sérum de patients	Lysines 137, 162, 190, 195, 199, 212, 351, 432, 525, 541	(Jenkins et al. 2009)
Pipéracilline	Bio-conjugués	Lysines 4, 12, 137, 162, 190, 195, 199, 212, 351, 432, 525, 541, 545	(Whitaker et al. 2011; El-Ghaiesh et al. 2012)
	Sérum de patients	Lysines 190, 195, 432, 541	(Whitaker et al. 2011)
SMX	Bio-conjugués	Cystéine 34	(Callan et al. 2009)

Tableau 4: Sites de fixation de médicaments sur la HSA

2.1.3 Les DC, cellules clés dans le remaniement de l'Ag et la présentation au LT

La reconnaissance du complexe protéine-médicament (ou métabolite) comme étant immunogène par le système immunitaire adaptatif, s'effectue d'abord au niveau des DC qui vont ensuite présenter l'Ag médicamenteux aux LT naïfs spécifiques, au niveau des synapses immunologiques. Les DC sont également capables d'activer des cellules de l'immunité innée, tels que les NK (Natural Killer) et les NKT (Natural Killer T cells).

Plusieurs étapes sont nécessaires à cette reconnaissance (*cf. figure 11*) :

- Activation des DC par des signaux de danger et capture de l'Ag
- Remaniement de l'Ag et présentation du peptide couplé au médicament dans la poche des molécules du CMH de classe II des DC
- Processus de maturation des DC et migration des DC
- Formation de la synapse immunologique et activation des lymphocytes naïfs spécifiques

(Ces étapes seront présentées plus en détail dans les parties suivantes).

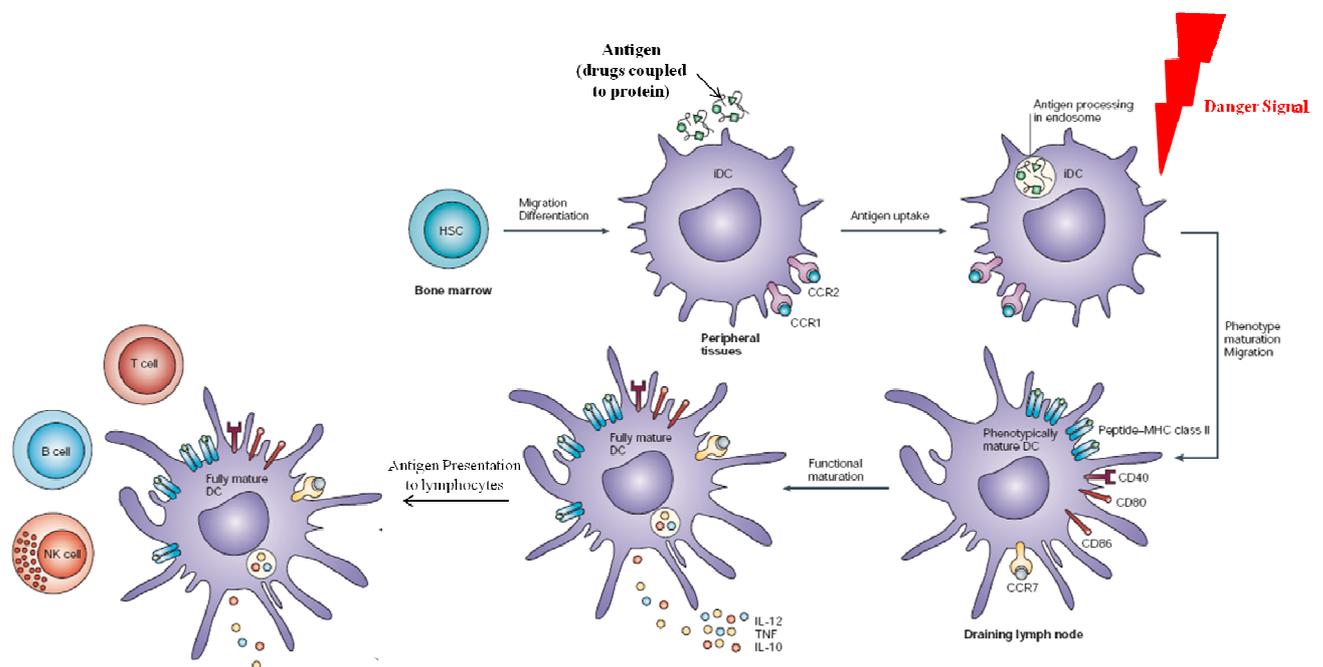
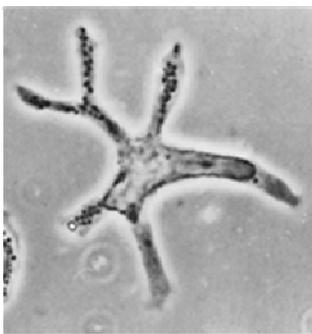


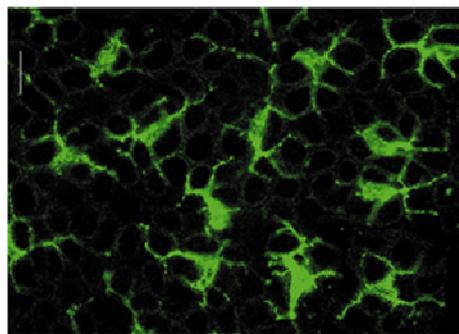
Figure 11: La reconnaissance de l'antigène par la DC et l'initiation d'une réponse immunitaire (Hackstein et al. 2004)

Les DC sont des APC professionnelles. Elles sont spécialisées dans la capture, le remaniement, l'apprêtement, le transport de l'Ag des tissus périphériques aux ganglions lymphatiques et la présentation de l'Ag aux LT naïfs. Elles exercent ainsi un rôle majeur dans l'initiation de la réponse immunitaire primaire et dans le maintien de la tolérance au soi (Banchereau et al. 1998; Ueno et al. 2007).

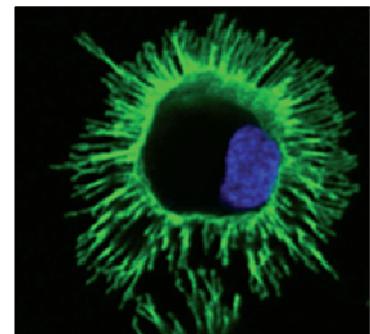
Elles ont été décrites pour la première fois par Paul Langerhans en 1868 dans l'épiderme humain [les DC situées dans la peau ont été alors appelées cellules de Langerhans (LC)] et dans les ganglions lymphatiques murins par Raph Steinman en 1973. Le nom des DC est dû à leurs prolongements cytoplasmiques mobiles, les dendrites (*cf. figure 12*).



DC murine isolée de la rate (microscopie en contraste de phase)
(*Steinman et al. 1973*)



Cellules de Langerhans murines (en vert : marquage du CMH II) au niveau de la peau (microscopie confocale à immunofluorescence)
(*Mellman et al. 1998*)



DC humaines issues de monocytes (marquage en vert du CMH II, microscopie confocale)
(*Zitvogel et al. 2011*)

Figure 12: Morphologie des DC
(*Steinman et al. 1973; Mellman et al. 1998; Zitvogel et al. 2011*)

2.1.3.1. Localisation et classification des DC

Les DC sont présentes dans tout l'organisme. Il est possible de les classer en fonction de leur localisation :

- Les DC des tissus non lymphoïdes (ou DC périphériques) : elles sont à l'état immature et présentent de grandes capacités à capturer les Ag. Elles jouent ainsi leur rôle de sentinelles du système immunitaire. On les retrouve en particulier dans la peau, dans les muqueuses (intestinales, respiratoires...) et les tissus interstitiels des organes (foie, cœur, reins...). Il s'agit par exemple des LC ou des DC dermales, présentes dans la peau.

- Les DC des tissus lymphoïdes : il existe des DC dites « migrantes », qui sont à l'état mature et proviennent d'autres tissus où elles ont capté un Ag et où elles ont subi leur processus de maturation. Elles présentent l'Ag capté aux LT présents dans les tissus lymphoïdes, tels que dans les ganglions lymphatiques. Il existe également des DC résidentes, qui captent et présentent les Ag présents dans les organes lymphoïdes. Dans le thymus, les DC semblent impliquées dans la sélection négative des LT lors de leur développement.

Des études récentes ont montré qu'il existe de nombreux sous-type de DC, qui peuvent être classées en fonction des marqueurs exprimés à leur surface et de leurs fonctions. L'équipe de Bernard Malissen suggère qu'il est possible de classer les DC humaines et murines, en cinq sous-types majeurs, indépendamment de leur localisation (*cf. figure 13*). Les cinq sous-types correspondent aux LC (*en vert*), les CD11b⁺ DC (*en bleu*), les CD8α⁺ DC (*en violet*), les DC plasmacytoïdes (*pDC, en marron*) et les DC inflammatoires dérivées de monocytes (*les inf-DC, en orange*). Les CD11b⁺ DC semblent participer aux réponses innées contre des parasites extracellulaires, à l'induction des réponses CD4⁺ et à l'induction des réponses humorales. Les CD8α⁺ DC sont quant à eux, impliquées dans les présentations croisées et dans l'activation des réponses médiées par les LT CD8⁺. Les pDC jouent un rôle dans les défenses innées de l'organisme face aux virus, par la sécrétion d'IFN-α et γ, en réponse à l'activation de leur TLR (Toll-Like Receptor) 7 et 9. Les inf-DC jouent un rôle clé lors des infections, en sécrétant du TNF (Tumor Necrosis Factor) et en produisant des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (Guilliams et al. 2010).

Ainsi, si l'on prend l'exemple de la peau comme tissus périphériques, des études réalisées chez la souris, ont montré que plusieurs sous-types de DC sont présents dans la peau. En effet, les LC constituent les DC de l'épiderme et cinq sous-types de DC sont retrouvés dans le derme à l'état basal. Il y a les CD207⁺ CD103⁻ DC, correspondant aux LC migratoires, et il y a quatre sous-types de DC dermales (DDC) : les CD207⁻ CD11b⁺ DDC, qui sont majoritaires et les CD207⁺ CD103⁺ DDC, les CD207⁺ CD103⁻ DDC et les CD207⁻ CD11b⁻ DDC, qui sont trois populations minoritaires (Henri et al. 2009; Guilliams et al. 2010).

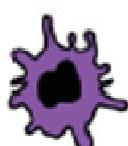
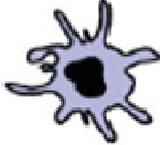
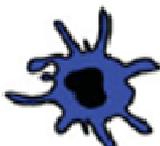
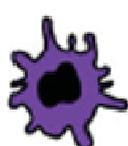
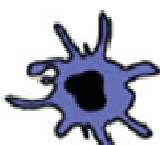
SPECIES	ORGAN	DC SUBSETS				
		LC	CD11b-like DC	CD8 α^+ -like DC	pDC	inf-DC
HUMAN	SECONDARY LYMPHOID ORGANS					
		CD207 ⁺ CD14 ⁺	BDCA1 ⁺ CD11c ^{high}	BDCA3 ⁺ CD11c ^{high}	BDCA2 ⁺ CD11c ⁺	?
	NON LYMPHOID TISSUE PARENCHYMA					
		CD207 ⁺ CD14 ⁺	CD207 ⁺ CD14 ⁺ BDCA1 ⁺ CD11c ^{high} ?	CD207 ⁺ CD14 ⁺ CD1a ⁺ BDCA3 ⁺ CD11c ^{high} ?	BDCA2 ⁺ CD11c ⁺	?
MOUSE	SECONDARY LYMPHOID ORGANS					
		CD207 ⁺ CD103 ⁺ CD11b ⁺	CD207 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ^{high}	CD207 ⁺ CD8 α^+ and/or CD103 ⁺ CD11b ^{high} CD11c ^{high}	SiglecH ⁺ CD11c ^{high}	Ly6C ⁺ MAC3 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺
	NON LYMPHOID TISSUE PARENCHYMA					
		CD207 ⁺ CD103 ⁺ CD11b ⁺	CD207 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ^{high}	CD207 ⁺ CD103 ⁺ CD11b ^{high} CD11c ^{high}	SiglecH ⁺ CD11c ^{high}	Ly6C ⁺ MAC3 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺
HUMAN & MOUSE	Proposed unified phenotypic definition					
		CD207 ⁺ CD11b ⁺	CADM1 ⁺ CLEC9A ⁺ SIRP α^+ CD11c ^{high}	CADM1 ⁺ CLEC9A ⁺ SIRP α^+ CD11c ^{high}	None?	Awaiting human inf-DC identification
	Typical PRR	?	RIG-I/MDA5/DAI- NOD/NALP ^{high} ?	TLR3 ^{high} ?	TLR7/9 ^{high}	TLR4/8 ^{high} , NOD/NALP ^{high} ?
	Proposed functional specialization	?	CD4 T cell activation, humoral immunity, response to extracellular parasites	Cross-presentation, CD8 T cell activation, IL-12p70	Innate defenses against viruses, IFN- α/β	Innate defenses against infections, TNF & ROI/NOI

Figure 13: Classification des DC en cinq sous-types majeurs (Guilliams et al. 2010)
 (BDCA :Blood Dendritic Cell Antigen ; PRR : Pattern Recognition Receptor; CADM1 :Cell Adhesion Molecule 1; CLEC9A : C-Type Lectin Domain Family 9, Member A; SIRP : Signal-Regulatory Protein; RIG-I : Retinoic Acid Inducible Gene-1; MDA5 : Melanoma differentiation associated antigen-5; NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Like Receptor; TLR :toll like receptor; IFN :Interferon; ROI : radical oxygen intermediates; NOI : nitric oxygen intermediates, SiglecH : Sialic acid binding Ig-like lectin H)

2.1.3.2. Activation des DC par les signaux de danger

Les DC existent sous deux états : un état basal immature et un état mature. Les DC immatures sont localisées dans les tissus périphériques et sont caractérisées par une grande capacité d'endocytose leur permettant de capturer les Ag présents. Les DC matures sont quant à elles, caractérisées par l'expression de molécules de co-stimulation et de présentation de l'Ag à leur surface et par la sécrétion de cytokines permettant d'initier une réponse immunitaire en activant les LT lors de la formation d'une synapse immunologique (Banchereau et al. 1998).

D'après l'hypothèse des signaux de danger, proposée par Polly Matzinger en 1994, la maturation des DC nécessite certes, la capture d'Ag mais également la présence de signaux de danger, qui sont des signaux d'activation des DC, les alertant sur le « contexte dangereux » dans lequel elles se trouvent. Ces signaux de danger, reconnus par les DC, sont des molécules qui peuvent être endogènes (produites par les cellules de l'organisme) ou exogènes (produites par le pathogène), et qui sont regroupées sous le terme des DAMP (Damage associated molecular pattern) (Matzinger 2007).

Les signaux de danger endogènes regroupent les molécules sécrétées par des cellules subissant un stress ou en train de mourir, mais également des molécules, en particulier des cytokines, sécrétées par les cellules du système immunitaire inné qui sont activées suite à une infection par un pathogène par exemple ou sécrétées par des cellules des tissus périphériques telles que les kératinocytes. Les protéines de choc thermique (HSP pour Heat Shock Protein), la protéine HMGB1 (high mobility group box 1 protein) sécrétée par des cellules nécrotiques, les β -défensines sécrétées par des neutrophiles activés, l'acide urique, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par des cellules subissant un stress, l'interféron α (IFN- α), l'interleukine 1- β (IL-1 β), le TNF- α constituent des exemples de signaux de danger endogènes (Matzinger 2002; Ueno et al. 2007).

Les signaux de danger exogènes proviennent de pathogènes, tels que les bactéries et les virus. En effet, les DC sont capables de reconnaître les microorganismes via leurs récepteurs PR (PRR pour pattern recognition receptor). Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires spécifiques des microorganismes, appelés PAMP (pathogen-associated molecular pattern). Parmi les PRR, se trouvent entre autre, les TLR; les récepteurs à domaine intracytoplasmique d'oligomérisation de nucléotide (NOD pour Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Like Receptor) et les récepteurs de la famille des lectines de type C (CLR).

Les TLR (10 TLR identifiés chez l'Homme) reconnaissent des acides nucléiques ou des structures lipidiques microbiennes comme le lipopolysaccharide (LPS) alors que les CLR tels DEC-205 (CD205), MMR (Récepteur au mannose ou CD206), Langérine (CD207), DC-SIGN (CD209), reconnaissent la partie carbohydre des glycoprotéines des microorganismes pathogènes (virus, bactéries, parasites, champignons). Les CLR permettent également l'internalisation de ces micro-organismes à l'intérieur des DC. Les NOD reconnaissent quant à eux des composants intracellulaires microbiens tels que de l'ARN bactériens ou des muropeptides, qui sont des petits fragments de peptidoglycanes (Ueno et al. 2007).

Ainsi, les DC peuvent être activées directement par les microorganismes ou par des produits issus de la nécrose ou de l'apoptose de cellules exposées à ces microorganismes pathogènes, via les récepteurs PRR (Matzinger 2002; Matzinger 2007; Ueno et al. 2007).

2.1.3.3. Capture des Ag par les DC

De part leur localisation dans tout l'organisme et en particulier au niveau des tissus périphériques en contact avec le milieu extérieur, les DC jouent donc un rôle de « sentinelles » du système immunitaire (Banchereau et al. 1998).

A l'état immature, la DC est capable de capter l'Ag en utilisant principalement trois mécanismes différents : la phagocytose, la macropinocytose et l'endocytose médiée par des récepteurs (*cf. figure 14*).

La phagocytose permet l'ingestion de larges particules ou de cellules de plus de 1µm de diamètre, telles que des bactéries, des pathogènes, des débris de cellules nécrotiques et nécessite la fixation à des récepteurs spécifiques, tels que les FcR. C'est un mécanisme dépendant du réarrangement de l'actine qui va permettre la formation de pseudopodes au niveau de la membrane plasmique et l'internalisation de la particule ou cellule phagocytée (Trombetta et al. 2005).

La macropinocytose est un mécanisme d'internalisation non spécifique et massive de grands volumes de fluides extracellulaires, permettant à la DC de capter les Ag solubles. C'est un mécanisme qui est également dépendant de l'actine (Trombetta et al. 2005).

L'endocytose médiée par des récepteurs, comme les CLR, est un mécanisme d'internalisation spécifique, qui permet l'internalisation d'Ag donné. Ce mécanisme peut faire intervenir la formation de vésicule de clathrine ou cavéoline (Trombetta et al. 2005).

Les Ag internalisés par ces mécanismes vont rejoindre le compartiment endosomal et/ou lysosomal, où ils seront digérés par des protéases et présentés sur les molécules du CMH, à la surface des DC.

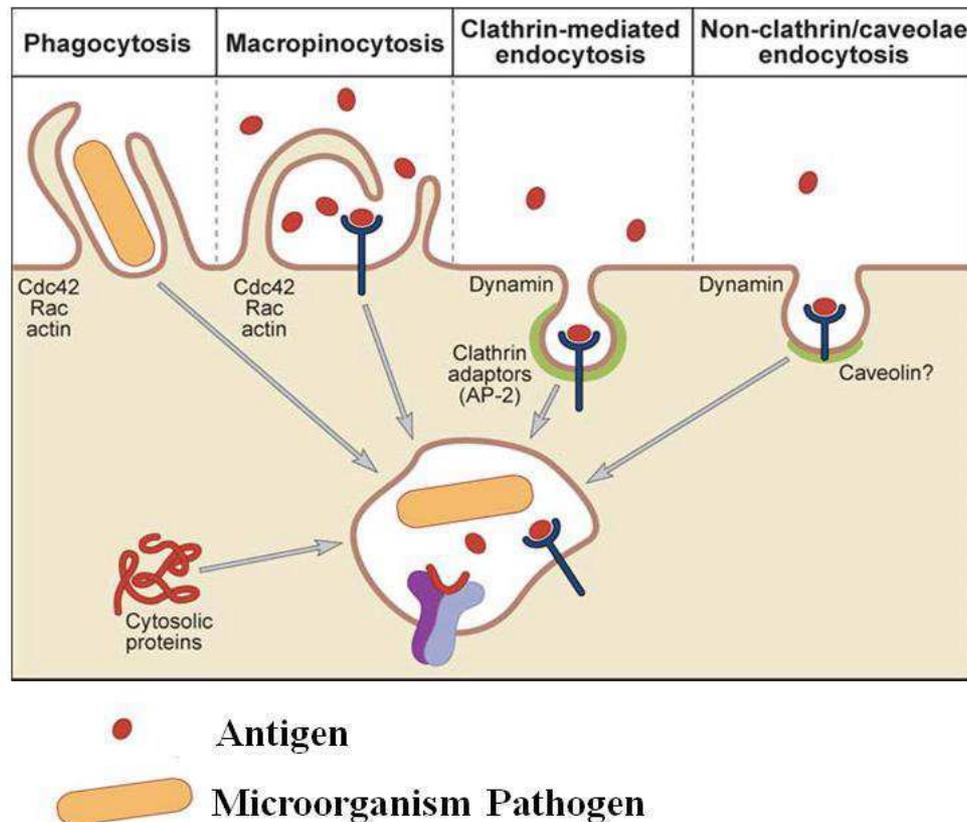


Figure 14: Différents mécanismes de capture d'Ag par la DC (Trombetta et al. 2005)

2.1.3.4. Remaniement de l'Ag et présentation du peptide médicamenteux dans la poche des molécules du CMH

2.1.3.4.1. Généralités sur les molécules HLA :

Les Ag (ici, complexe protéine-médicament) internalisés ou présents dans la cellule sont digérés par les systèmes enzymatiques de la DC, afin d'obtenir des fragments peptidiques. Ces fragments peptidiques se fixent dans la poche des molécules du CMH et sont présentés à la surface des DC aux LT.

Chez l'Homme, les CMH correspondent aux HLA (Human Leucocyte Antigen). Il existe deux classes de CMH : les CMH de classe I (CMH I) et les CMH de classe II (CMH

II). Les CMH I sont exprimés à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme alors que les CMH II ne sont exprimés que sur les APC, c'est-à-dire les DC, les lymphocytes B (LB), les macrophages et les monocytes.

Chez l'Homme, les chaînes lourdes des molécules du CMH de classe I, sont principalement codées par trois gènes : HLA-A, HLA-B et HLA-C. Ces trois gènes sont polymorphes. Quant aux molécules de classe II, elles sont essentiellement codées par cinq gènes : HLA-DM, HLA-DO, HLA-DR, HLA-DP, et HLA-DQ. La lettre D correspond à la classe et la deuxième lettre correspond à la famille. Les molécules HLA-DR, HLA-DP et HLA-DQ sont présentes à la surface des cellules et présentent dans leur poche un Ag au LT alors que les molécules HLA-DM et HLA-DO ne sont pas présentes à la surface des cellules mais jouent à un rôle important dans la stabilité du complexe formé par les trois autres molécules du CMH II avec leur Ag.

Les gènes codant pour les molécules du complexe HLA présente un polymorphisme très important. Les fréquences des allèles pour les molécules HLA, en particulier pour les HLA de classe II, varient en fonction de populations étudiées. Par exemple, dans la population caucasienne, seuls sept allèles HLA-DRB1 ont une fréquence supérieure à 5%, il s'agit des allèles DRB1 *0101, *0301,*0401,*0701,*1101,*1301 et 1501 (*cf. tableau 5*) (Colombani 1993).

DRB1*	Fréquences des allèles HLA-DRB1 dans la population française (N=158) (en %)
0701	14.0
0301	10.9
0101	9.3
1101	9.2
1501	8.0
1301	6.0
0401	5.6

Tableau 5: Fréquence des sept plus importants allèles HLA-DRB1 dans la population française. L'étude a été réalisée sur 158 individus (Colombani 1993)

Au vue du polymorphisme important des molécules HLA, une nomenclature a été mise en place pour décrire les allèles HLA d'un individu (*cf. figure 15*)

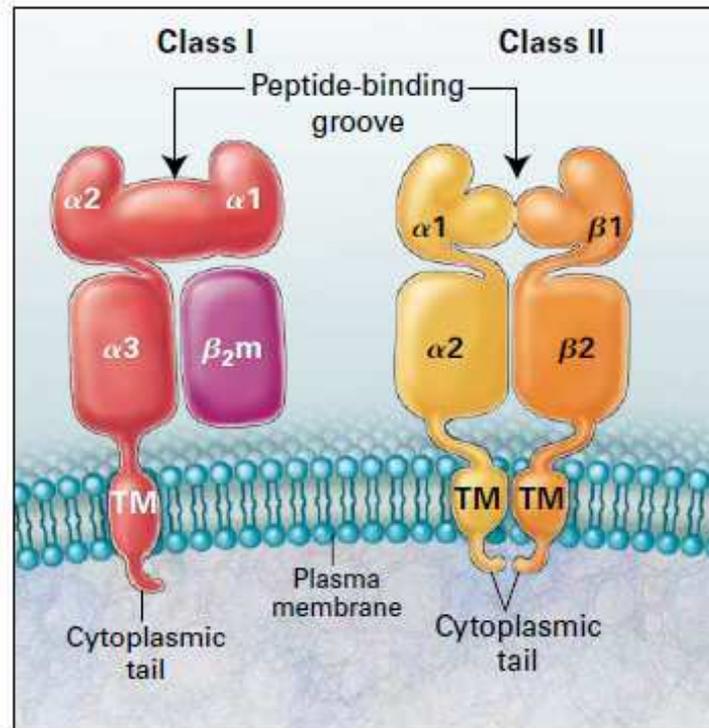


Figure 16: Structure des HLA de classe I et II (Klein et al. 2000)

2.1.3.4.2. Apprêtement de l'Ag via les molécules du CMH

Les peptides qui proviennent des protéines endogènes synthétisées et dégradées dans le cytosol, sont présentés via les molécules du CMH I et activent les LT CD8⁺. Les LT CD8⁺ activés, qui sont dit « cytotoxiques », sont alors capables de tuer les cellules présentant à leur surface des peptides étrangers provenant de pathogènes cytosoliques tels que les virus.

En effet, dans le cas d'une présentation par les molécules du CMH I, les antigènes sont dégradés via la voie du protéasome. Les peptides obtenus sont alors transférés dans le réticulum endoplasmique (RE) par des transporteurs associés à la présentation antigénique, TAP (Transporter associated Antigen Presentation) afin d'être associés aux CMH I. Le complexe CMH I – peptide est alors formé, et quitte le RE pour se retrouver à la surface des DC (cf. figure 17).

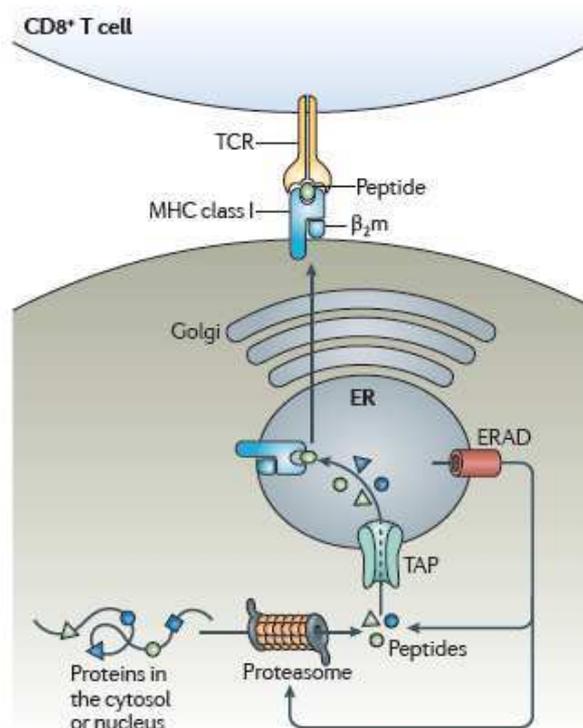


Figure 17: Présentation antigénique par les molécules du CMH I (Neeffjes et al. 2011)
 (ER: Endoplasmic Reticulum; ERAD: ER associated protein degradation; TAP :Transporter associated Antigen Presentation)

Les CMH II présentent des peptides provenant des protéines exogènes, dégradées dans des vésicules de la voie endocytaire (phagocytose, endocytose et macropinocytose). Les CMH II interagissent avec les LT CD4⁺, qui via la sécrétion de cytokines, activent d'autres cellules immunitaires effectrices telles que des macrophages, des LB, ou des LT CD8⁺. Les LT CD4⁺ peuvent aussi être cytotoxiques (Pichler 2003; Posadas et al. 2007; Neeffjes et al. 2011).

Les chaînes transmembranaires α et β des molécules du CMH II sont assemblées dans le RE et associées à la chaîne invariante (Ii). Le complexe ainsi obtenu est transporté dans le compartiment des endosomes tardifs, correspondant au compartiment des molécules du CMH II (MIIC). Dans ce compartiment, la chaîne Ii est digérée en peptide par des protéases résidentes et le peptide se fixe dans la poche des molécules du CMH II, donnant naissance au complexe CLIP (class II associated Ii peptide). Dans le MIIC, la présence de la molécule HLA-DM est requise pour procéder à l'échange du peptide issu de la digestion de la chaîne Ii par un peptide spécifique issu des protéines dégradées par les protéases de la voie endosomale. Les molécules du CMH II contenant dans sa poche, ce peptide spécifique, sont

alors transportées à la surface de la membrane plasmique des DC, pour la présentation aux LT CD4⁺ (cf. figure 18) (Neeffjes et al. 2011).

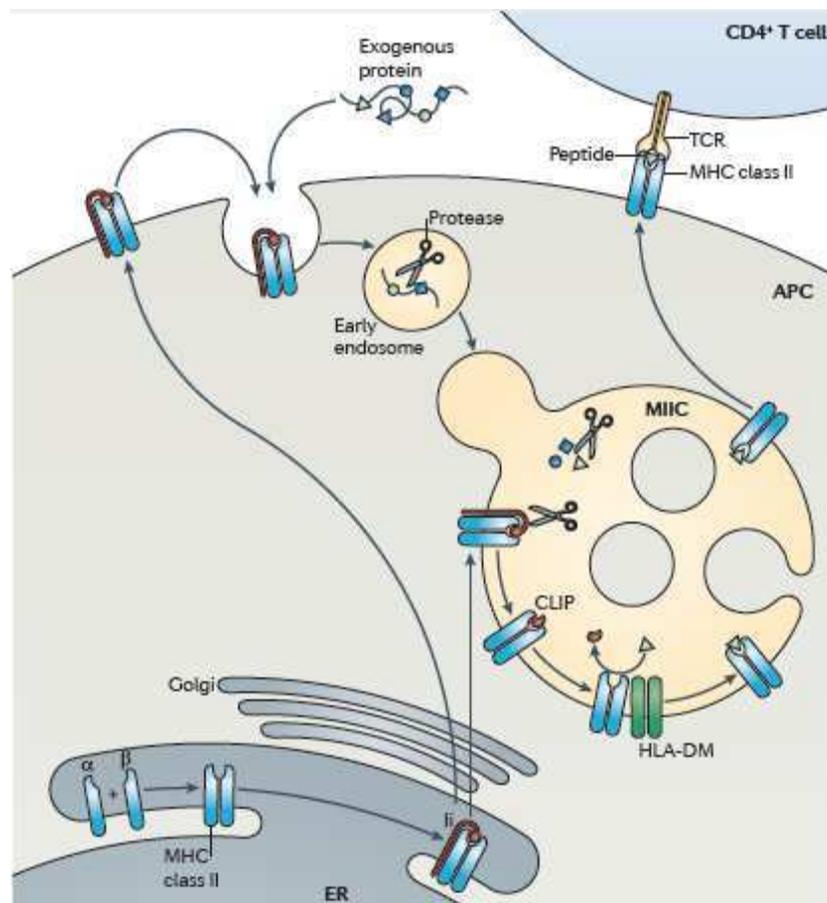


Figure 18: Présentation antigénique par les molécules du CMH II (Neeffjes et al. 2011)
 (ER : Endoplasmic Reticulum ; Ii : invariant chain; CLIP: class II associated li peptide ; MIIC: MHC class II compartment)

La dichotomie protéine endogène et CMH I et protéine exogène et CMH II, n'est pas aussi stricte, puisque des phénomènes de présentation antigénique croisée ont été mis en évidence. Ils consistent en la présentation d'antigènes exogènes par les CMH I aux LT CD8+.

2.1.3.4.3. Des cas de restriction aux molécules du CMH pour certaines allergies médicamenteuses

Pour certains cas d'allergies médicamenteuses, le développement des symptômes peut être mis en corrélation avec la présence d'un allotype particulier d'une molécule HLA chez le patient : il s'agit alors d'une restriction aux molécules HLA. En effet, plusieurs associations HLA-médicaments ont été mises en évidence, en particulier avec l'abacavir (utilisé dans le

traitement du VIH), la carbamazepine (utilisé dans le traitement de l'épilepsie), l'allopurinol (utilisé comme hypo-uricémiant) et la flucloxacilline (antibiotique β -lactame).

Ainsi, il a été observé, au sein de la population Caucasienne, que l'association HLA-B*5701 et abacavir conduit au développement du syndrome d'hypersensibilité associé à l'abacavir (AHS). De la même manière, dans les populations asiatiques (chinoise, indienne, thaïlandaise), l'association HLA-B*1502 et carbamazepine favorise le développement de TEN et de SJS. D'autres études dans les populations chinoise et thaïlandaise, ont également montré que l'association HLA-B*5801 et allopurinol favorisent des symptômes d'hypersensibilité, des TEN et des SJS. Enfin, l'association HLA-B*5701 et flucloxacilline est associée à des syndromes d'hépatites liées à l'allergie médicamenteuse (Aihara 2011; Bharadwaj et al. 2011).

Concernant l'abacavir, inhibiteur de la reverse transcriptase du VIH, la prévalence des réactions d'hypersensibilité est d'environ 5% chez les patients traités. L'hypersensibilité à l'abacavir se manifeste par des rashes cutanés, de la fièvre, une léthargie, des manifestations gastro-intestinales (nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales) ou par d'autres symptômes moins fréquents telles que des manifestations respiratoires (maux de gorges, toux, dyspnées), des troubles ostéomusculaires (myalgies, arthalgies), des céphalées, des paresthésies, des œdèmes ou des défaillances hépatiques ou rénales. Ces symptômes apparaissent généralement dans les six premières semaines de traitement. L'arrêt du traitement permet de stopper ces symptômes mais sa ré-administration induit des symptômes plus sévères, pouvant être mortels (Martin et al. 2004; Aihara 2011).

L'abacavir est une pro-drogue, qui est métabolisé en son métabolite réactif, le carbovir triphosphate, au niveau intracellulaire. Plusieurs enzymes participent à cette transformation chimique, telles que l'alcool déshydrogénase. Le carbovir triphosphate est un analogue de la guanosine triphosphate, et bloque alors l'élongation de la chaîne d'ADN, au niveau de la transcriptase inverse, inhibant ainsi de la réplication du virus (Servonnet et al. 2010).

L'association du syndrome d'hypersensibilité associé à l'abacavir a été identifiée en 2002 (Hetherington et al. 2002; Mallal et al. 2002). En effet, dans une étude portant sur 200 patients traités à l'abacavir, dix-huit cas d'hypersensibilité ont été recensés, donnant une prévalence de 9%. L'étude des allèles HLA des dix-huit patients ayant connu un épisode d'hypersensibilité, montre que les allèles HLA-B*5701, HLA-DR7 et HLA-DQ3, constituant l'haplotype 57.1, sont présents en plus grande proportion chez les patients allergiques à l'abacavir que chez les patients tolérants. En effet, la présence de ces allèles a une valeur

prédictive positive concernant le développement d'hypersensibilité à l'abacavir de 100% et leur absence a une valeur prédictive négative de 97% (Mallal et al. 2002). Une autre étude confirme cette forte corrélation entre le développement du syndrome d'hypersensibilité associé à l'abacavir et la présence de l'allèle HLA-B*5701. En effet, dans cette étude, des patients présentant un syndrome d'hypersensibilité à l'abacavir et un patch test positif à l'abacavir, ont été génotypés pour les allèles HLA. Tous ces patients présentent l'allèle HLA-B*5701, démontrant une sensibilité de 100% du screening de l'allèle HLA-B*5701 dans le développement du syndrome d'hypersensibilité associé à l'abacavir (Saag et al. 2008).

Le criblage des patients pour l'allèle HLA-B*57:01, recommandé par la FDA (Food and Drug Administration) avant leur traitement à l'abacavir a permis de réduire la prévalence du syndrome d'hypersensibilité associé à l'abacavir chez les patients traités (Mallal et al. 2008).

Une étude de Martin et al, apporte des éléments concernant le mécanisme immunopathologique de l'hypersensibilité à l'abacavir (Martin et al. 2004). En réalisant et en comparant les cartes haplotypes recombinantes de la partie du chromosome 6, portant les gènes codant pour les molécules HLA, des dix-huit patients hypersensibles à l'abacavir et de douze patients tolérants à l'abacavir, un autre gène de prédisposition à l'hypersensibilité à l'abacavir a été mis en évidence. Il s'agit du gène Hsp70-Hom M493T, codant pour une protéine chaperonne. La combinaison des deux facteurs de prédisposition : allèle HLA-B*5701 et gène Hsp70-Hom M493T, retrouvée chez 94,4% des patients hypersensibles contre 0,4% des patients tolérants, permet ainsi une très bonne discrimination. Les protéines Hsp 70 sont connues pour pouvoir se fixer à des peptides et pour jouer un rôle dans la présentation antigénique et plus particulièrement dans la présentation croisée d'Ag exogènes aux LT CD8⁺. Les auteurs suggèrent une coopération nécessaire entre la molécule HLA codée par l'allèle HLA-B*5701 et la protéine de choc thermique Hsp70-Hom, qui faciliterait la fixation des peptides modifiés par l'abacavir, lors du remaniement et lors de la présentation de l'Ag, chez les patients hypersensibles. Le modèle proposé est la fixation des métabolites de l'abacavir à des peptides endogènes et la présentation de ces peptides modifiés, grâce à la coopération entre les deux protéines, évoquées ci-dessus, aux LT CD8⁺ cytotoxiques (Martin et al. 2004) (*cf. figure 19*). L'implication des LT CD8⁺ est en lien avec leur présence dans les infiltrats cellulaires provenant des rashes cutanés et des patch tests de patients hypersensibles à l'abacavir (Martin et al. 2004).

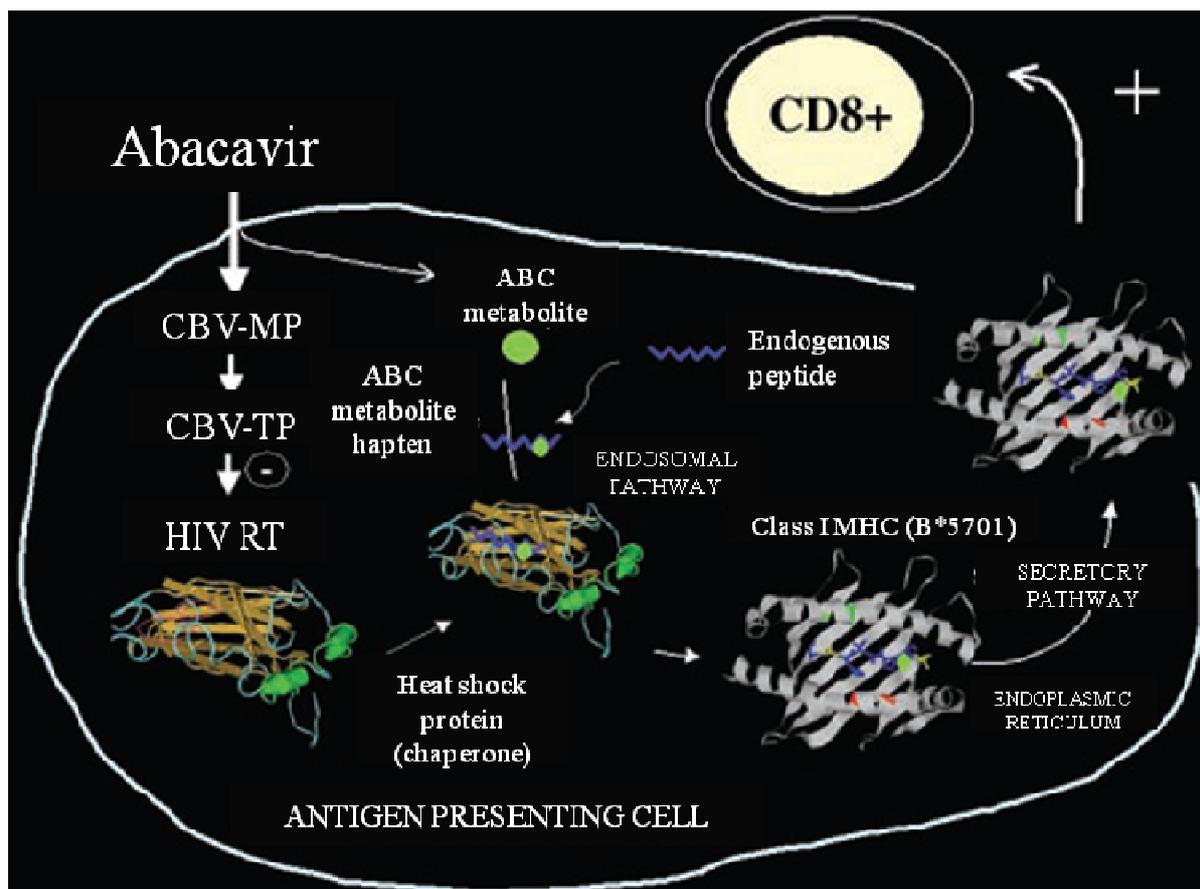


Figure 19: Modèle proposé par Martin et al, concernant le mécanisme immunopathologique de l'hypersensibilité à l'abacavir (Martin et al. 2004). L'abacavir est métabolisé en carbovir monophosphate (CBC-MP) puis en carbovir triphosphate (CBV-TP) et inhibe l'activité de la reverse transcriptase du VIH (HIV-RT). Cependant, une partie des métabolites de l'abacavir se fixe à un peptide endogène, qui est pris en charge dans la voie endosomale. La protéine Hsp70-Hom pourrait alors favoriser la fixation du peptide modifié par les métabolites de l'abacavir sur la molécule HLA codée par l'allèle HLA-B*5701. Le peptide modifié par les métabolites de l'abacavir est alors présenté aux LT CD8⁺ cytotoxiques.

Une autre étude apporte des éléments complémentaires concernant les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement du syndrome d'hypersensibilité associé à l'abacavir chez des patients, portant l'allotype HLA-B*5701. Elle montre tout d'abord que ce sont des LT CD8⁺ du sang périphérique de patients allergiques à l'abacavir et présentant l'allotype HLA-B*5701, qui prolifèrent *in vitro* en réponse à l'abacavir et qu'ils sécrètent du TNF α et de l'INF γ alors que les LT CD4⁺ ne sont pas activés suite à l'exposition à l'abacavir (Chessman et al. 2008). Cette étude montre également que chez des individus sains, non infectés par le VIH, mais présentant l'allotype HLA-B*5701 et non exposés auparavant à l'abacavir, une prolifération *in vitro* des LT CD8⁺ du sang périphérique est également observée et est accompagnée d'une sécrétion de TNF α et d'INF γ (Chessman et al. 2008). Ce résultat suggère que le syndrome d'hypersensibilité associé à l'abacavir n'est pas directement lié à l'infection au VIH. Cette prolifération n'est pas observée chez des individus

sains ne présentant pas l'allotype HLA-B*5701. Cette étude démontre que l'hypersensibilité à l'abacavir est médiée par les LT CD8⁺ et qu'elle est bien restreinte à l'allotype HLA-B*5701 (Chessman et al. 2008).

De plus, l'observation que des APC, présentant l'allotype HLA-B*5701, fixées à l'aldéhyde et mises en présence d'abacavir ne puissent pas induire la prolifération de LT CD8⁺, suggèrent qu'une métabolisation intracellulaire de l'abacavir en métabolite réactif, afin qu'il soit présenté au LT via la molécule HLA-B*5701, est nécessaire. La protéine TAP, qui participe au transfert des peptides dans le RE (*cf. partie Apprêtement de l'Ag via les molécules du CMH*) et la protéine chaperonne Tapasine, sont nécessaires à la présentation de l'abacavir au LT CD8⁺ et à l'activation de ces derniers. En effet, des expériences où ses deux protéines sont inhibées dans des APC présentant l'allotype HLA-B*5701, montrent que ces APC ne sont plus capables d'activer les LT CD8⁺ (Chessman et al. 2008).

Des expériences ont également été menées sur des APC présentant des allotypes de molécules HLA proches de la molécule HLA-B*5701, qui ne diffèrent que de quelques acides aminés, au niveau de la poche d'ancrage, par rapport à l'allotype HLA-B*5701. Ces APC, stimulées par de l'abacavir, ne sont pas capables d'activer les LT CD8⁺. Seules les APC présentant l'allotype HLA-B*5701 sont capables de présenter l'abacavir aux LT CD8⁺ et d'induire leur activation, expliquant la forte prévalence des individus portant l'allotype HLA-B*5701 à développer un syndrome d'hypersensibilité associé à l'abacavir. De plus, le changement d'un seul acide aminé, en particulier en position 116 (changement de la serine en tyrosine) de la molécule HLA-B*5701, provoque la suppression de l'activation des LT CD8⁺ par des APC traitées avec de l'abacavir. Cet acide aminé joue donc un rôle déterminant dans la présentation du peptide couplé à l'abacavir, aux LT CD8⁺ (Chessman et al. 2008; Bharadwaj et al. 2011).

Des études récentes apportent un complément d'informations sur l'association molécule HLA-B*5701 et syndrome d'hypersensibilité associé à l'abacavir. Ces études (Illing et al. 2012; Ostrov et al. 2012) montrent que l'abacavir est capable de se fixer à la poche F-pocket des molécules HLA-B*5701, modifiant leur spécificité vis-à-vis des peptides du soi qu'elles présentent. En effet, la fixation de l'abacavir dans cette poche F-pocket altère le répertoire des peptides du soi présentés habituellement par les molécules HLA-B*5701, conduisant à une réponse lymphocytaire. Ainsi, des études de modélisation ont montré qu'en absence d'abacavir, les molécules HLA-B*5701 fixent de préférence des peptides qui possèdent en position C-terminale des résidus hydrophobes tels que du tryptophane ou de la phénylalanine alors qu'en présence d'abacavir, les molécules HLA-B*5701 fixent de

préférence des peptides possédant en position C-terminale une valine ou une alanine ou une isoleucine (Ostrov et al. 2012). Un peptide de neuf acides aminés avec en position C-terminale un tryptophane (pep-W) et un autre peptide de neuf acides aminés avec en position C-terminale une valine (pep-V) ont été synthétisés. Des tests de liaisons des ces deux peptides aux molécules HLA-B*5701 ont confirmé les résultats obtenus par modélisation : le peptide pep-V nécessite la présence d'abacavir pour se fixer aux molécules HLA-B*5701 alors que le peptide pep-W se fixe aux molécules HLA-B*5701 en présence ou en absence d'abacavir (Ostrov et al. 2012). Des études de modélisation indiquent que le site potentiel de fixation de l'abacavir se situerait au niveau de la F-pocket, à proximité de la sérine-116, qui comme vu précédemment joue un rôle primordial dans la reconnaissance de l'abacavir par les LT. La structure cristallographique du complexe HLA-B*5701-abacavir-pep-V montre que l'abacavir réalise des liaisons de van der Waals à la fois avec la molécule HLA-B*5701 et le peptide pep-V (Ostrov et al. 2012). Des cellules humaines (lignée cellulaire 721.221 transfectées avec l'ADNc du gène codant pour les molécules HLA-B*5701) exprimant uniquement les molécules HLA-B*5701 ont été cultivées en présence ou en absence d'abacavir et les peptides présentées par les molécules HLA-B*5701 ont été élués et analysés. 539 et 682 peptides ont été respectivement élués en présence et en absence d'abacavir, dont 287 sont en commun. Aucun peptide présentant une valine en position C-terminale n'a été identifié lorsque les cellules sont cultivées en absence d'abacavir alors que 15 peptides présentant une valine en position C-terminale ont été identifiés lorsque les cellules sont cultivés en présence d'abacavir (Ostrov et al. 2012). En présence d'abacavir, un enrichissement des peptides présentant en position C-terminale une isoleucine (Illing et al. 2012; Ostrov et al. 2012) est également observé alors qu'il y a une diminution significative des peptides présentant en position C-terminale un tryptophane ou une phénylalanine (Ostrov et al. 2012). Des PBMC de patients HLA-B*5701 allergiques à l'abacavir ont été mis en présence d'abacavir et des peptides présentant une valine en position C-terminale qui ont identifiés précédemment. Les résultats d'ELISpot montrent que la sécrétion d'IFN- γ est plus importante lorsque les PBMC sont cultivés en présence d'abacavir et du peptide VTDDIQVKV qu'en présence seulement d'abacavir ou seulement du peptide VTDDIQVKV (Ostrov et al. 2012). Ainsi, ces expériences montrent qu'en présence d'abacavir d'autres peptides du soi sont présentés par les molécules HLA-B*5701, ce qui peut induire une activation des LT CD8⁺ et conduire au développement du syndrome d'hypersensibilité à l'abacavir (Ostrov et al. 2012).

L'allotype HLA-B*5701 est également associé au développement de syndromes d'hépatites liées à une allergie médicamenteuse (DILI pour Drug-Induced Liver Injury), suite à un traitement par la flucloxacilline. La flucloxacilline est un antibiotique de la famille des β -lactames, utilisé dans le traitement des infections liées aux staphylocoques. Au Royaume-Uni, les cas de DILI associés à la flucloxacilline, se déclarant entre le premier jour et le quarante-cinquième jour après le début du traitement, sont estimés à 8,5 cas tous les 100 000 nouveaux patients traités. Une étude portant sur cinquante et un patients ayant développé un DILI suite à un traitement à la flucloxacilline, et sept patients ayant également développé un DILI suite à un traitement à la flucloxacilline et le coamoxiclav (association de l'amoxicilline avec l'acide clavulinique) et 282 patients contrôle, a permis de mettre en évidence que l'allotype HLA*B5701 constitue un facteur de risque génétique majeur dans le développement de DILI liés à la flucloxacilline (Daly et al. 2009) . En effet, sur les cinquante-huit patients ayant développé un DILI suite à un traitement à la flucloxacilline, quarante-trois patients, soit 84% présentent l'allotype HLA*B5701 contre une fréquence de 5% dans le groupe contrôle. Cette fréquence de 5% est généralement celle retrouvée dans les populations européennes. Cependant, les auteurs estiment que malgré la forte association avec l'allotype HLA*B5701, seul 1 patient porteur de cet allotype sur 500 à 1000 patients traités à la flucloxacilline, développera un cas de DILI. L'étude met également en évidence la possibilité que d'autres gènes soient impliqués dans le développement de DILI liés à la flucloxacilline et qu'ils pourraient constituer des facteurs de risque additionnels. Le gène *ST6GALI*, codant pour l'enzyme β -galactoside α -2,6-sialyltransférase 1, qui joue un rôle dans la glycosylation des protéines en étant capable de transférer des acides sialiques, a été ainsi identifié. Néanmoins, la taille de la population étudiée ne permet pas de mettre en évidence une différence statistique entre le groupe des patients ayant développé un DILI lié à la flucloxacilline et le groupe contrôle, concernant l'implication du gène *ST6GALI*. Les mécanismes du DILI lié à la flucloxacilline ne sont pas aussi bien connus que dans le cas de l'abacavir (Daly et al. 2009).

2.1.3.5. Maturation des DC : expression de marqueurs de co-stimulation et sécrétion de cytokines

Lorsque les DC captent l'Ag et reçoivent des signaux de danger, elles vont connaître un processus complexe de maturation. Durant cette maturation, les DC digèrent l'Ag en petits fragments peptidiques, les associent aux molécules du CMH et expriment ces complexes

CMH-fragments peptidiques, à la surface de leur membrane. L'expression des molécules du CMH II en surface est augmentée et cela va être également le cas pour d'autres molécules membranaires telles que des récepteurs de chimiokines comme le CCR7 (récepteurs des chimiokines CCL19 et CCL21), permettant aux DC de migrer des tissus périphériques aux ganglions lymphatiques via des gradients de chimiokines ; des molécules d'adhésion (CD54) permettant de renforcer la liaison des DC aux LT et des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD83, CD86...) qui vont permettre l'activation des LT. De plus, les DC sécrètent diverses cytokines permettant d'activer les LT et de polariser la réponse immunitaire.

Lors du processus de maturation, les capacités des DC à capter des Ag diminuent donc au profit d'une amélioration de ses capacités à présenter l'Ag au LT et à induire une réponse immunitaire spécifique de l'Ag (cf. figure 19).

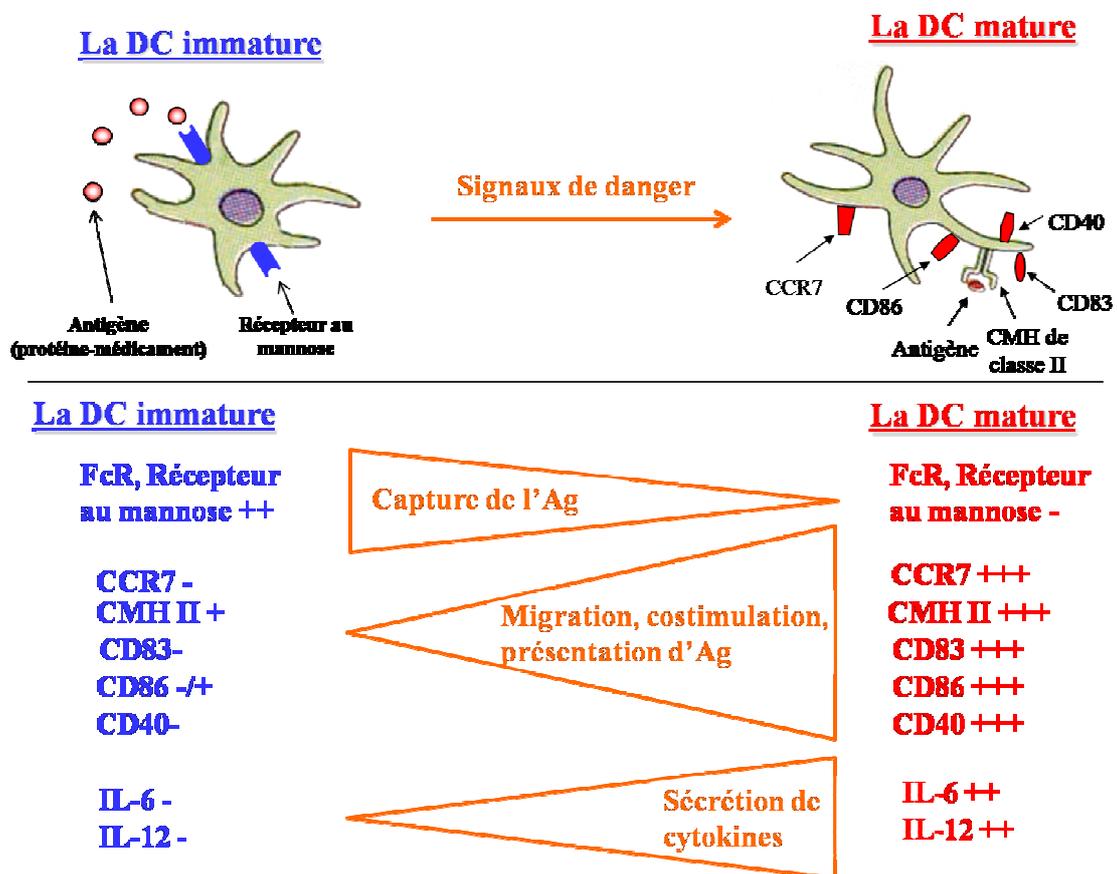


Figure 20: Maturation des DC
 (- : expression faible ; -/+ : expression modérée ; + : expression forte)

Dans certains cas, l'antigène peut également constituer un signal de danger et induire la maturation de la DC. C'est le cas pour de nombreux sensibilisants de contact, tels que le DNCB (2-4 dinitrobenzène), le nickel ou le cobalt par exemple. Ainsi, des travaux réalisés au laboratoire ont montré que le nickel et le DNCB sont capables d'induire la maturation de DC

(issues de progéniteurs du sang de cordon CD34⁺) en augmentant l'expression de certains marqueurs membranaires : CD83, CD86, CCR7, CD40 et HLA-DR et en induisant la sécrétion de cytokines par la DC : IL-6, IL-8 et IL-12p40 en présence de nickel, et d'IL-8 en présence de DNCB (Boisleve et al. 2004; Boisleve et al. 2005; Ade et al. 2007; Antonios et al. 2009). Le nickel est capable de se fixer directement aux TLR4 des DC, induisant l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B (Rothenberg 2010; Schmidt et al. 2010; Martin et al. 2011).

Concernant les médicaments, il semblerait qu'ils (ou leurs métabolites réactifs) puissent également induire une maturation partielle des DC en jouant à la fois le rôle d'Ag et de signal de danger. Par exemple, le SMX-NO et le SMX (dans une moindre mesure) sont capables d'induire *in vitro* une augmentation de l'expression du CD40 dans des DC humaines dérivées de monocytes (Mo-DC) de donneurs non allergiques au SMX, mais ne sont pas capables d'induire une augmentation des molécules de co-stimulation CD80, CD83 et CD86 (Sanderson et al. 2007). Néanmoins, dans le cas du modèle de DC murines issues de progéniteurs de la moelle osseuse, (BM-DC pour Bone Marrow Dendritic Cells), le SMX-NO et le SMX ne sont pas capables d'induire directement une augmentation de l'expression de marqueurs de maturation tels que CD40, CD86 et CMH II, ni d'induire la sécrétion de cytokines telles que TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-12. Mais, si elles sont cultivées en présence de splénocytes prétraités avec du SMX-NO, une augmentation de l'expression des trois marqueurs de maturation (CD40, CD86 et CMH II) ainsi qu'une sécrétion de TNF- α et IL-6 sont observées. Cette maturation des BM-DC est corrélée à la concentration de SMX-NO utilisée et à la présence de cellules nécrotiques, qui apporte sans doute le signal de danger nécessaire (Elsheikh et al. 2010).

Dans le cas de l'amoxicilline, une étude a été menée sur les DC de neuf patients, ayant connu un épisode d'hypersensibilité retardée à l'amoxicilline (test intra-cutané à lecture retardée positif, exanthème maculopapuleux lors de l'épisode allergique) et de huit donneurs sains non allergiques à l'amoxicilline. Il semblerait que les DC issues des patients allergiques soient capables d'augmenter l'expression du CD80, du CD86 et de HLA-DR en présence d'amoxicilline alors qu'aucun changement phénotypique n'est observé sur les DC issues de donneurs non allergiques lorsqu'elles sont cultivées en présence d'amoxicilline. Ainsi, l'amoxicilline serait également capable d'induire une maturation partielle des DC mais uniquement chez des patients allergiques à l'amoxicilline (Rodriguez-Pena et al. 2006).

2.1.4. Présentation de l'Ag au LT

2.1.4.1 TcR, reconnaissance de l'Ag

Une des fonctions principales des LT est la reconnaissance de l'Ag grâce à son TcR. En effet, chaque LT possède un TcR spécifique capable de reconnaître un épitope donné d'un Ag. Chaque TcR est composé de deux chaînes polypeptidiques : la chaîne α et la chaîne β , pour la majorité de LT ou la chaîne γ et la chaîne δ , pour une minorité de LT, reliées dans les deux cas, par un pont disulfure. Les chaînes α et β sont constituées d'une région amino-terminale variable (V) qui interagit avec l'Ag, d'une région constante (C), d'une courte région charnière contenant un résidu cystéine qui permet la formation du pont disulfure, d'un domaine transmembranaire hydrophobe et d'une queue cytoplasmique (*cf. figure 21*).

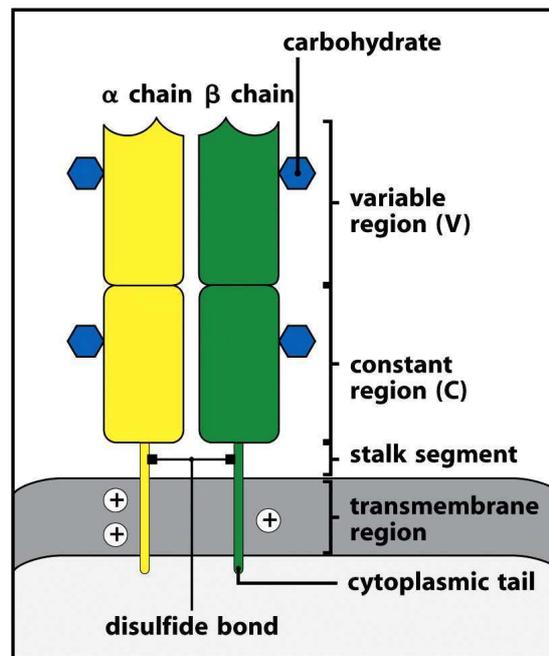


Figure 21: Schéma de la structure d'un TcR (Janeway 2009)

La spécificité des TcR d'un LT donné provient du réarrangement génique des chaînes α et β du TcR. En effet, le locus du TcR α contient des segments géniques codant pour la partie variable (V_α , environ 70), pour la jonction (J_α , 61) et d'un segment constant (C). Le locus du TcR β contient lui aussi des segments géniques codant pour la partie variable V (V_β , 52), pour la partie jonction J (J_β , 13), pour la partie constante C mais également des segments codant pour la partie D (Diversité, D_β , 2). Un TcR $\alpha\beta$ provient d'un réarrangement unique de tous ces segments géniques, et est ainsi composé d'une combinaison unique de V_α , J_α , et C

pour la chaîne α et de V_β , J_β , D_β et C pour la chaîne β (cf. figure 22). La diversité des TcR d'un individu donné (supérieur à 10^7), est quant à elle liée au nombre des recombinaisons géniques. Chaque LT présente à sa surface des milliers de TcR identiques, capables de reconnaître un seul et unique épitope d'un Ag, présenté à la surface des APC via les molécules du CMH (Posadas et al. 2007; Janeway 2009; Broere et al. 2011).

Le répertoire des LT associé à un Ag correspond donc, à l'ensemble des récepteurs TcR des LT d'un individu donné, capables de reconnaître cet Ag. Le répertoire des LT est ainsi dépendant des réarrangements géniques des deux chaînes du TcR et de la double sélection (positive et négative) lors du développement des LT (cf. partie II.1.5.1). La fréquence des LT spécifique d'un Ag donné varie en fonction de l'Ag et correspond au nombre de LT spécifiques de cet Ag sur le nombre total de LT.

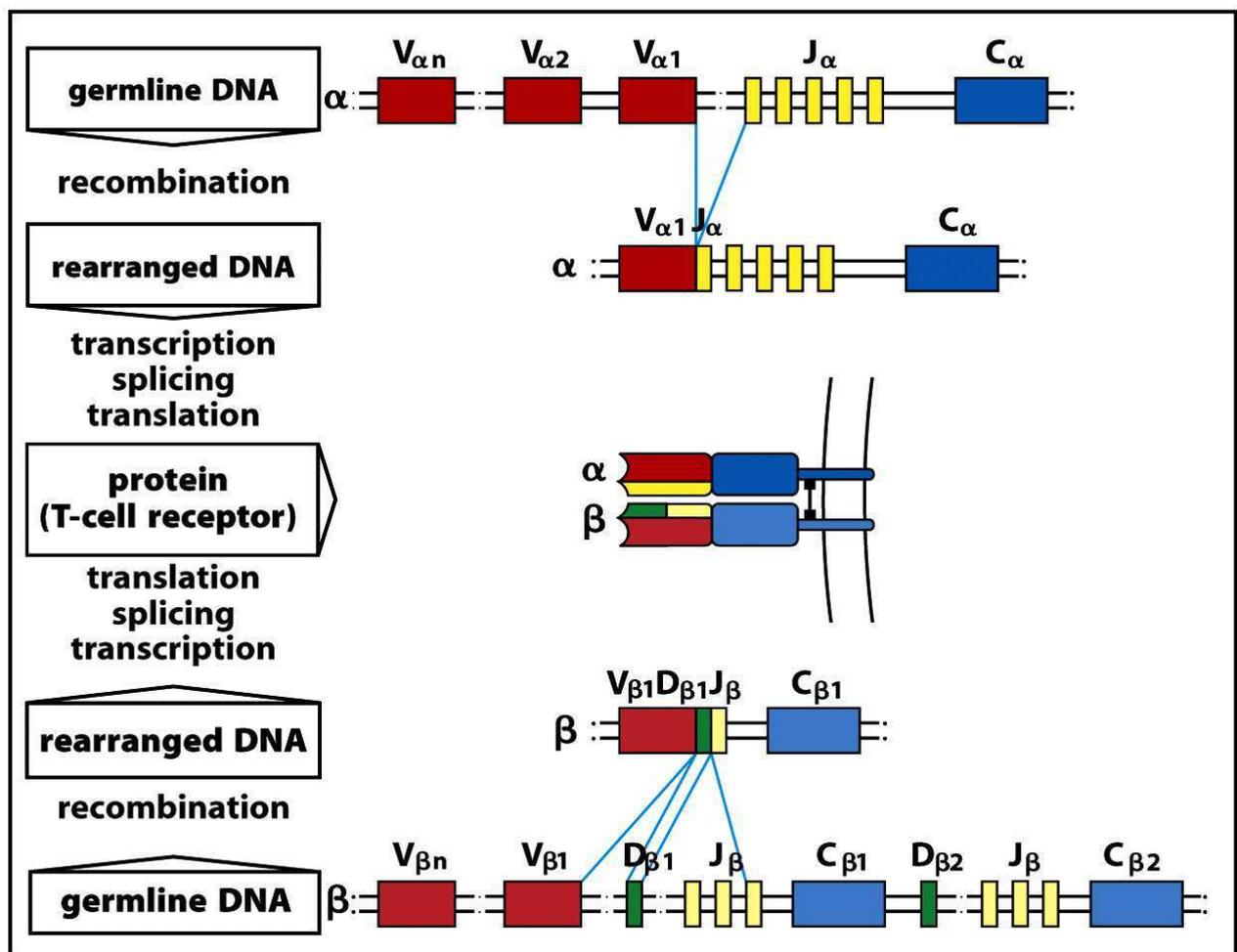


Figure 22: Schéma du réarrangement du TcR $\alpha:\beta$ (Janeway 2009)

Néanmoins, des molécules présentant des structures chimiques similaires peuvent être reconnues par le même LT. Il s'agit du phénomène de réactivité croisée (*cf. partie 1.4.1.5 sur la cross-réactivité des pénicillines*). Par exemple, dans une étude portant sur quatre donneurs allergiques à la pénicilline G, sur les vingt clones lymphocytaires produits en présence de pénicilline G, sept ne prolifèrent qu'en présence de pénicilline G alors que sept autres prolifèrent en présence de pénicilline G mais également en présence de pénicilline V et d'ampicilline, qui appartiennent également à la famille des β -lactames. Dans ces cas là, l'épitope reconnu se situerait plutôt sur la partie commune des pénicillines, correspondant à l'acide 6-amino-pénicillanique, que sur les chaînes latérales, différentes pour ces trois antibiotiques (*cf. figure 23*). Dans la même étude, trois clones ne prolifèrent qu'en présence de pénicilline G et d'ampicilline et les trois derniers ne prolifèrent qu'en présence de pénicilline G et de pénicilline V. Dans ces cas-là, l'épitope reconnu semble faire intervenir à la fois la partie commune des β -lactames et les chaînes latérales (Padovan et al. 1996). Une autre étude où des clones lymphocytaires, ont été isolés à partir du sang périphérique de patients allergiques et produits en présence soit de pénicilline G, soit d'un bio-conjugué HSA-Pénicilline G, soit d'amoxicilline ou soit d'ampicilline montre également des phénomènes de cross-réactivité pour certains clones (Mauri-Hellweg et al. 1996).

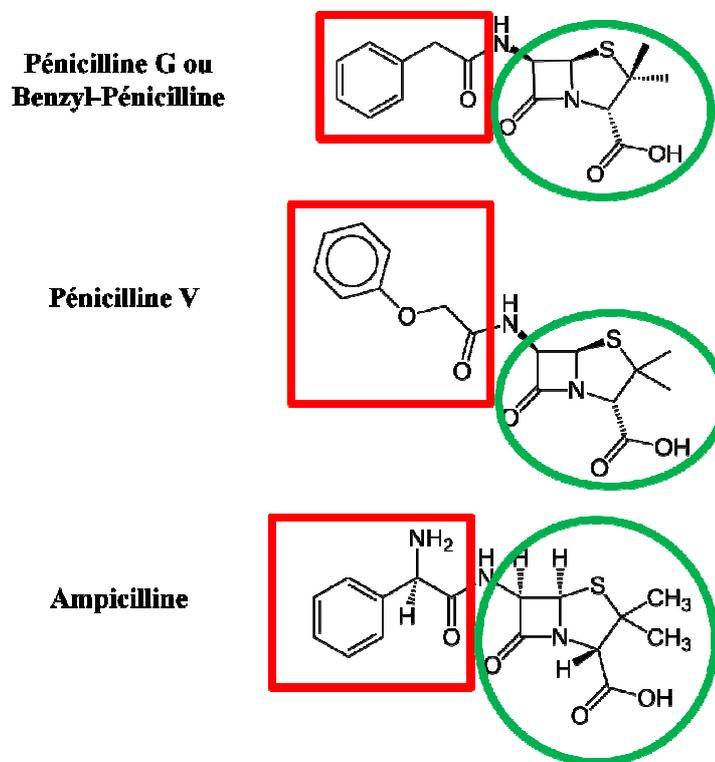


Figure 23: Structure de la Pénicilline G, la Pénicilline V et l'Ampicilline
(La partie commune est encadrée en vert et les chaînes latérales sont indiquées en rouge pour les trois antibiotiques)

De la même manière, des clones produits en présence de SMX ou SMX-NO ou SMX-NHOH (3 molécules aux structures similaires, *cf. figure 6*) à partir du sang périphérique d'individus allergiques sont soit spécifiques du composé à partir duquel ils ont été produits ou sont soit capables de proliférer en présence des deux autres composés. Par exemple, des clones produits en présence de SMX sont également capables de proliférer en présence de SMX-NO et inversement, des clones produits en présence de SMX-NO ou SMX-NHOH sont capables de proliférer en présence de SMX (Castrejon et al. 2010).

2.1.4.2. Les différents modes de présentation

Il existe quatre modes décrits de présentation d'un haptène au LT (*cf. figure 24*). Le premier mode de présentation est lié à la théorie de l'haptène : l'haptène est présenté en étant fixé de manière covalente au peptide présenté par les molécules HLA de l'APC, au TcR du LT. Le deuxième mode de présentation correspond au cas des super-antigènes, comme le nickel par exemple. Le nickel réalise des liaisons de coordination, qui sont des liaisons non covalentes, avec le TcR des LT et les molécules HLA des APC, de manière indépendante des peptides qui se trouvent dans la poche des molécules HLA. Le troisième mode de présentation correspondant au p-i concept (Pharmacological interaction with the Immune system), (*présenté dans la partie 2.2*) où l'haptène se lie directement au TcR des LT en réalisant des liaisons non covalentes avec celui-ci mais également avec les molécules HLA. Un dernier mode de présentation a été proposé, où l'haptène est ancré dans les poches des molécules HLA et modifie le peptide présenté par les molécules HLA, résultant en une altération du peptide présenté (Bharadwaj et al. 2011).

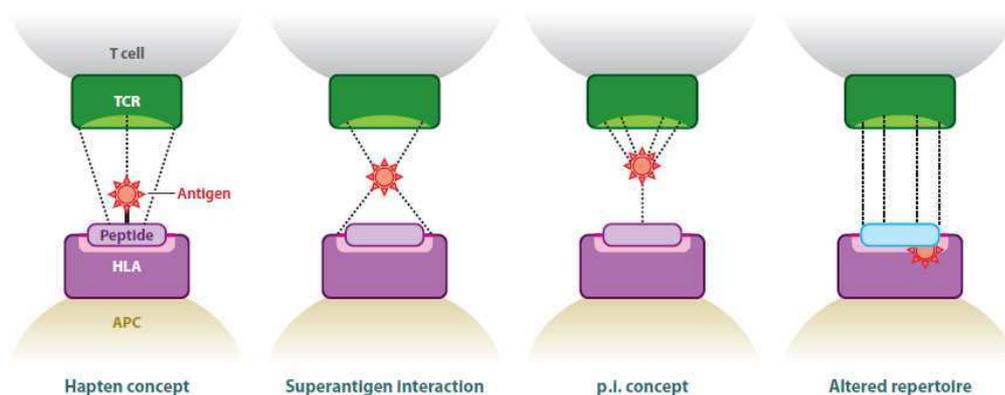


Figure 24: Les différents modes de présentation d'un Ag au LT (Bharadwaj et al. 2011)
Les traits en pointillés indiquent des liaisons non covalentes et les traits pleins, des liaisons covalentes.

Concernant les deux médicaments étudiés, la pénicilline G (*cf. figure 25*), se comporte en haptène et se fixe à des protéines solubles ou membranaires mais peut également se fixer au peptide présenté dans la poche des molécules HLA. Le complexe pénicilline G-protéine est pris en charge par les DC et digéré en peptides dont certains présentent la pénicilline G fixée de manière covalente à des lysines. Ces peptides se retrouvent ensuite dans la poche des molécules HLA (*cf. II.1.3.4.2 Apprêtement de l'Ag via les molécules du CMH*) et sont présentés aux LT (Posadas et al. 2007).

Un pro-haptène tel que le SMX, nécessite une étape de métabolisation pour être transformé en SMX-NO, molécule réactive, qui va se fixer aux protéines présentes dans les cellules. Ensuite, de la même manière qu'avec la pénicilline G, le complexe SMX-NO-protéine est digéré en peptides, qui se retrouvent dans la poche des molécules HLA et ces peptides sont présentés aux TcR des LT (Posadas et al. 2007). Cependant, le SMX peut également être présenté au LT via le pi-concept (*cf. partie 2.2 pi-concept*).

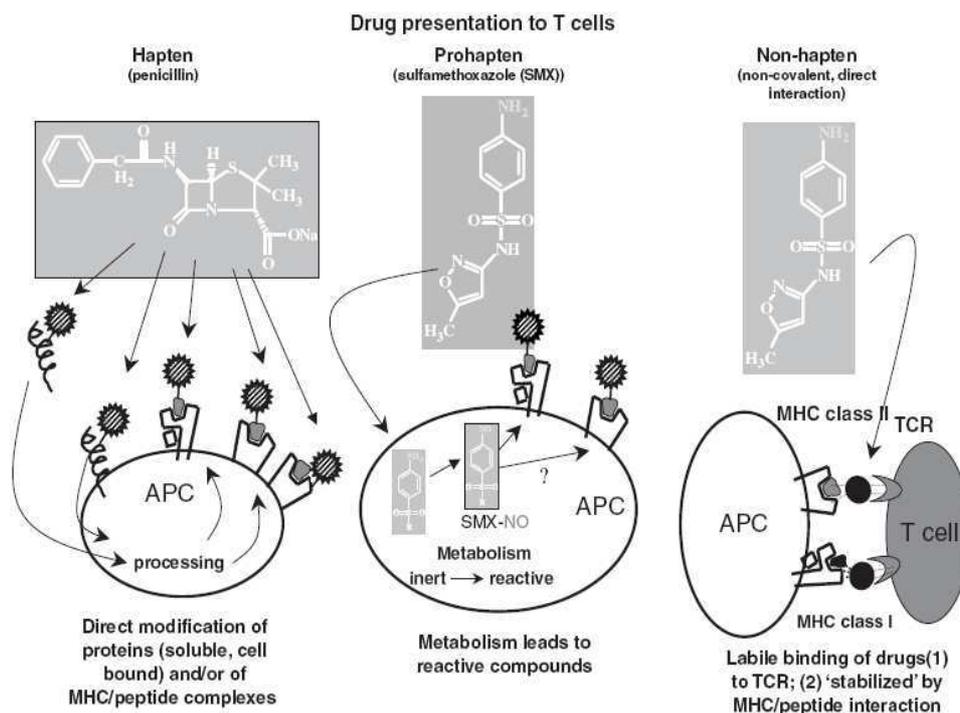


Figure 25: Schéma de la présentation de l'Ag aux LT (Posadas et al. 2007)

2.1.4.3. La formation de la synapse immunologique et activation des LT

L'activation des LT par les DC se fait au niveau de la synapse immunologique, zone de contact entre les deux membranes plasmiques, et nécessite trois signaux (*cf. figure 26*) :

- Le premier signal correspond à la présentation du peptide, dérivé de l'Ag, lié au CMH de la DC, au TcR du LT.
- Le deuxième signal est apporté par les molécules de co-stimulation
- Le troisième signal correspond aux cytokines sécrétées par les DC qui vont activer les LT et polariser la réponse immunitaire.

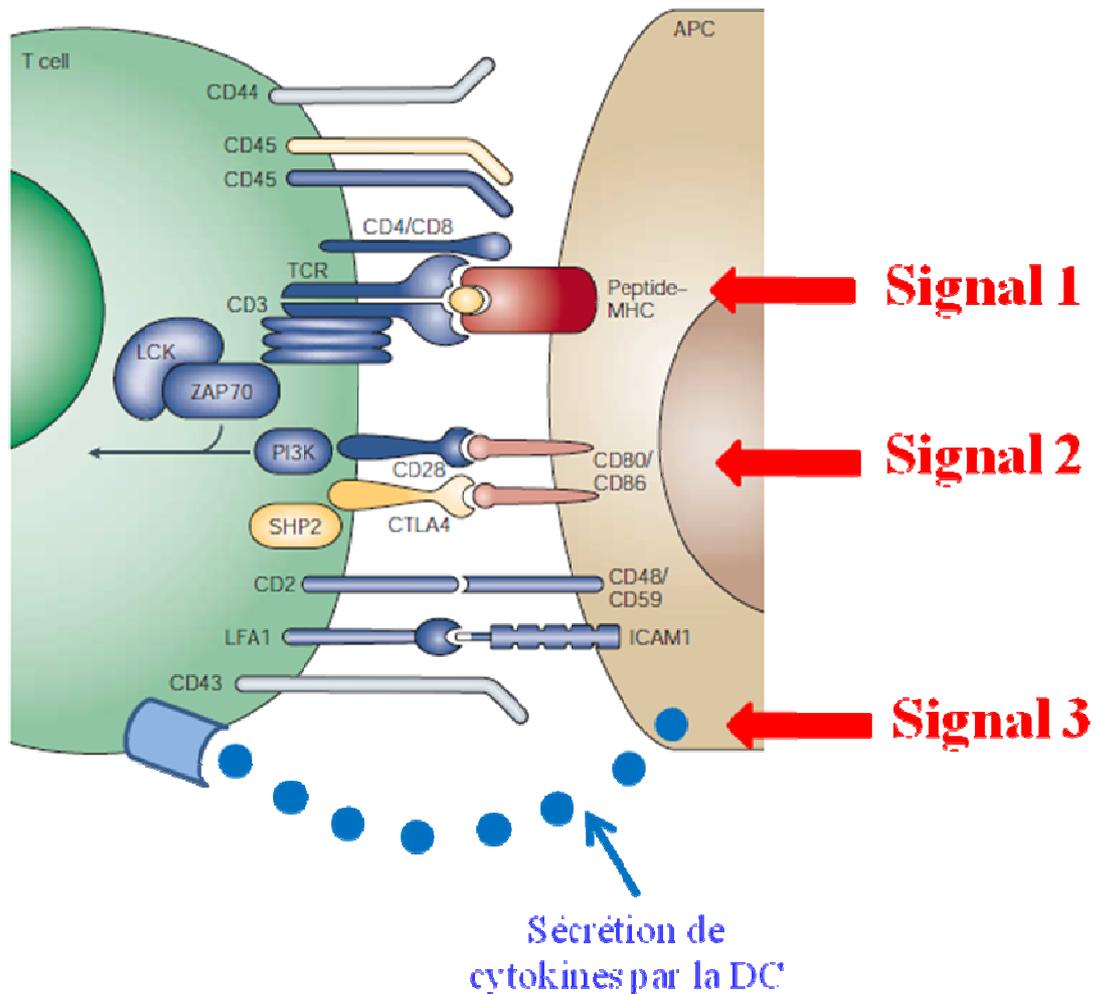


Figure 26: Schéma de la synapse immunologique (Huppa et al. 2003)

La synapse immunologique est composée du complexe TcR/CMH, et d'un ensemble de molécules d'adhésion et de molécules de co-stimulation.

Les deux cellules interagissent tout d'abord via leurs molécules d'adhésion : LFA-1 (Leucocyte Function-associated Antigen 1) pour les LT et ICAM-1 (IntraCellular Adhesion Molecule 1, correspondant au CD54) pour les DC. La liaison de ces molécules d'adhésion va permettre un rapprochement des deux cellules (Huppa et al. 2003).

Le premier signal d'activation des LT naïfs est alors apporté par la reconnaissance de l'Ag appréhendé par les CMH de la DC, par le TcR du LT, qui assure une réponse immunitaire spécifique. Le TcR du LT est lié au complexe moléculaire CD3 et le complexe TcR/CD3 est également associé aux molécules CD4 et CD8, qui interagissent respectivement avec les CMH II et I. Ces molécules CD4 et CD8, ainsi que le CD3 participent à la transduction des signaux d'activation du LT, notamment à la production d'IL-2, qui est une cytokine indispensable à la prolifération des LT (Friedl et al. 2005).

L'activation complète du LT naïf nécessite un contact prolongé avec la DC, assuré par les molécules de costimulation. Les interactions entre les molécules de co-stimulation CD28 et CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4) des LT et les molécules de co-stimulation CD80, CD86 de la famille B7 des DC se mettent en place. L'expression de CD40L (ou CD154) est alors augmentée au niveau des LT. La reconnaissance du CD40 des DC par le CD40L des LT renforce le processus d'activation des LT (Huppa et al. 2003; Friedl et al. 2005).

Enfin, la sécrétion de cytokines par la DC, qui constitue le troisième signal, va permettre de polariser la réponse immunitaire, en faisant intervenir différents sous-type de LT : Th1, Th2, Th17 ou Treg (régulateurs) (*cf. partie suivante*).

2.1.5. Développement de la réponse lymphocytaire en réponse à la présentation de l'Ag

L'implication des lymphocytes dans l'immunopathologie de la réaction allergique a été mise en évidence par la présence d'anticorps (IgE, produits par les LB) dans le sérum et de LT spécifiques de médicaments dans le sang et les organes affectés, chez des patients allergiques.

En effet, des LT spécifiques de nombreux médicaments ont été isolés à partir du sang de patients allergiques et sont capables de proliférer *in vitro* en présence du médicament responsable de l'allergie, tels que les β -lactames (Pénicilline G ou l'Amoxicilline), le SMX, la Lidocaïne et la Carbamazépine.

2.1.5.1. Différenciation et sélection des LT

Dans cette partie, ne sera traité que le développement des LT, cellules sur lesquelles porte notre étude expérimentale.

Les progéniteurs des LT quittent la moelle osseuse, contrairement aux progéniteurs des LB, et migrent vers le thymus. Ils vont alors proliférer et se différencier en LT matures. Cette phase de différenciation est caractérisée par des changements d'expression de gènes (chaînes α , β , γ ou δ du TcR) et de protéines à la surface membranaire telles que le complexe CD3, les protéines co-réceptrices CD4 et CD8, qui sont utilisées pour l'identification des sous-populations de thymocytes.

En effet, quand les progéniteurs lymphoïdes entrent dans le thymus, ils n'expriment pas les marqueurs de surface caractéristiques des cellules T matures et les gènes du TcR ne sont pas réarrangés. Ils sont appelés thymocytes double négatifs car ils n'expriment ni le CD4 ni le CD8. Ces précurseurs donnent naissance à deux lignées distinctes, différant par leur type de TcR : la lignée majoritaire T α : β et la lignée minoritaire T γ : δ (qui représente environ 5% des LT circulants). Les cellules de la lignée T γ : δ n'expriment pas les marqueurs CD4 et CD8 à l'état mature alors que les cellules de la lignée T α : β vont passer par un stade où les deux marqueurs sont exprimés, d'où le nom de thymocytes double positifs par la suite (*cf. figure 27*).

Une sélection positive s'opère et consiste en la présentation de peptides antigéniques via des molécules du CMH par les cellules épithéliales du cortex thymique, aux thymocytes double positifs. Seuls les thymocytes double positifs dont les récepteurs TcR peuvent interagir avec suffisamment d'affinité, avec le complexe CMH (I ou II), reçoivent un signal de survie et vont perdre l'expression soit du CD8 (si fixation au CMH II) soit du CD4 (si fixation au CMH I). Ils passent alors au stade de thymocytes simple positif et augmentent également la densité de l'expression des TcR. Les thymocytes dont le réarrangement du TcR n'est pas correct ou dont le TcR ne possèdent pas une affinité suffisante pour le complexe CMH, ne reçoivent aucun signal de survie et meurent par apoptose : il s'agit d'une mort par négligence (« death by neglect ») (Chung et al. 2002).

Une sélection négative a ensuite lieu et permet d'éliminer les thymocytes « auto-réactifs » afin d'assurer une tolérance des LT aux peptides du soi. Elle consiste en la présentation d'auto-antigènes, qui sont des peptides issus du soi, par des DC par exemple, via leurs molécules du CMH aux TcR des thymocytes simple positifs. Les thymocytes simples positifs dont le TcR interagit trop fortement avec ces auto-antigènes sont éliminés.

Environ 2% des thymocytes double positifs survivent à cette double sélection et arrivent à maturité comme LT simple positive CD4⁺ ou CD8⁺, qui sont par la suite exportés du thymus

vers la périphérie et forment ainsi un répertoire périphérique de LT (Janeway 2009). Tant qu'ils n'ont pas rencontré leur Ag, les LT sont qualifiés de naïfs et une fois qu'ils rencontrent leur Ag, ils vont proliférer et donner naissance à des LT dits « effecteurs », qui sont responsables de la réponse immunitaire effectrice et des LT dits « mémoires », qui sont activés lors d'une rencontre ultérieure avec l'Ag, au moment de la phase d'élicitation (*cf. figure 33*). Les LT naïfs finissent par mourir s'ils ne rencontrent pas leur antigène. Des systèmes de régulation se mettent en place au niveau des LT effecteurs, qui meurent une fois que la réponse immunitaire effectrice est terminée. Les LT mémoires présentent quant à eux une durée de vie plus longue que les LT naïfs (*cf. partie suivante*).

2.1.5.2. Polarisation de la réponse lymphocytaire

Comme vu précédemment, les LT se repartissent selon deux grandes sous-populations : les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺.

Les LT CD4⁺ se différencient en plusieurs cellules T effectrices différentes exerçant diverses fonctions. Les principales sous-populations fonctionnelles connues des LT CD4⁺ effectrices sont les Th1, Th2, Th17, définies sur la base des différentes cytokines secrétées, et les LT régulateurs. Les LT CD4 reconnaissent des Ag présentés via les molécules du CMH II et le CD4 joue un rôle de co-récepteur lors de la reconnaissance de l'Ag, en s'associant au TcR et en se liant aux molécules du CMH II.

Comme vu précédemment, les cytokines secrétées par des DC, correspondant au signal 3, lors de l'activation des LT, au niveau des synapses immunologiques, permettent de polariser le sous-type de LT CD4⁺. Ainsi, une réponse de type Th1 est favorisée par une sécrétion d'IL-12 alors qu'une réponse de type Th2 est favorisée en présence de l'IL-4 et qu'une réponse de type Th17 est favorisée en présence de TGF- β , d'IL-6 et d'IL-23. Les LT régulateurs (Treg) sont induits en présence de TGF- β et d'IL-10 (*cf. figure 28*).

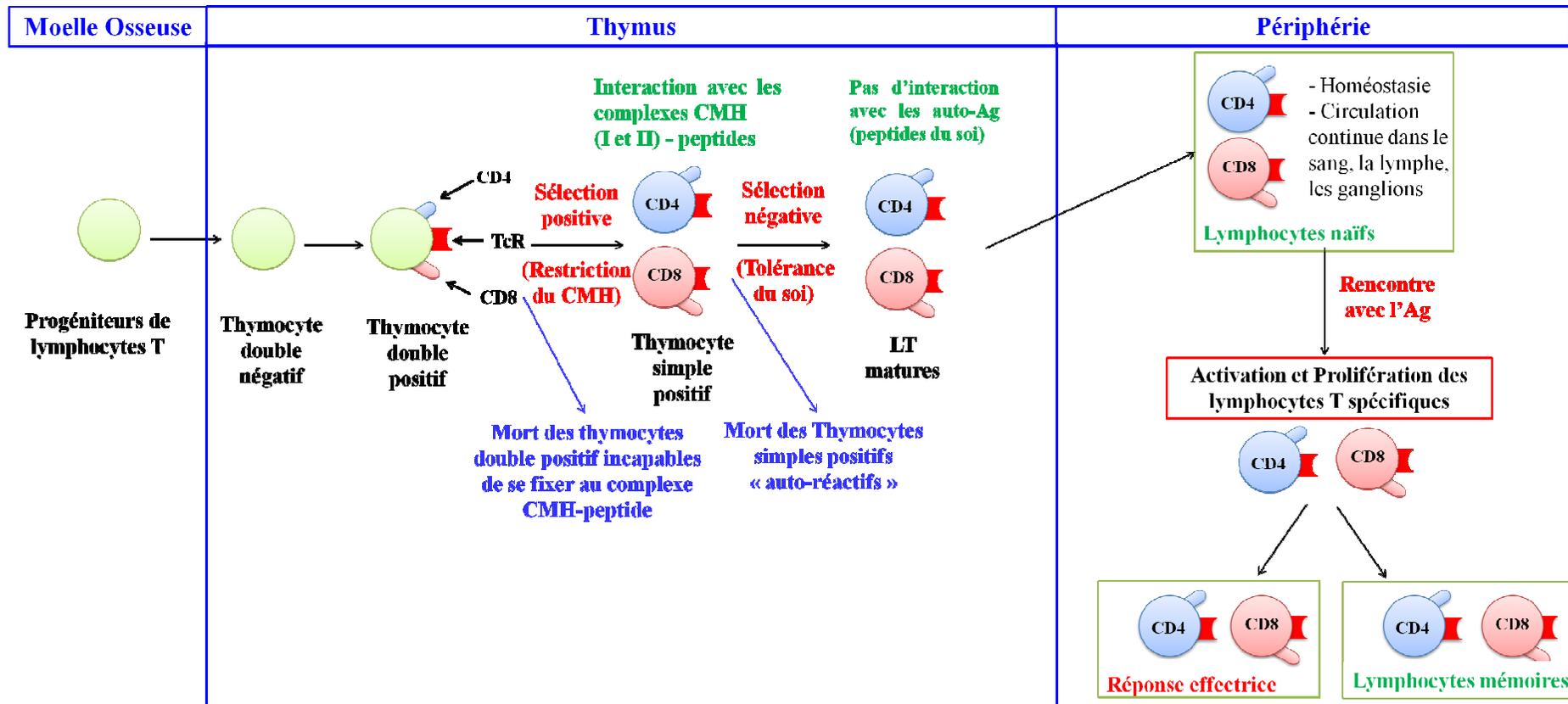


Figure 27: Développement et survie des LT

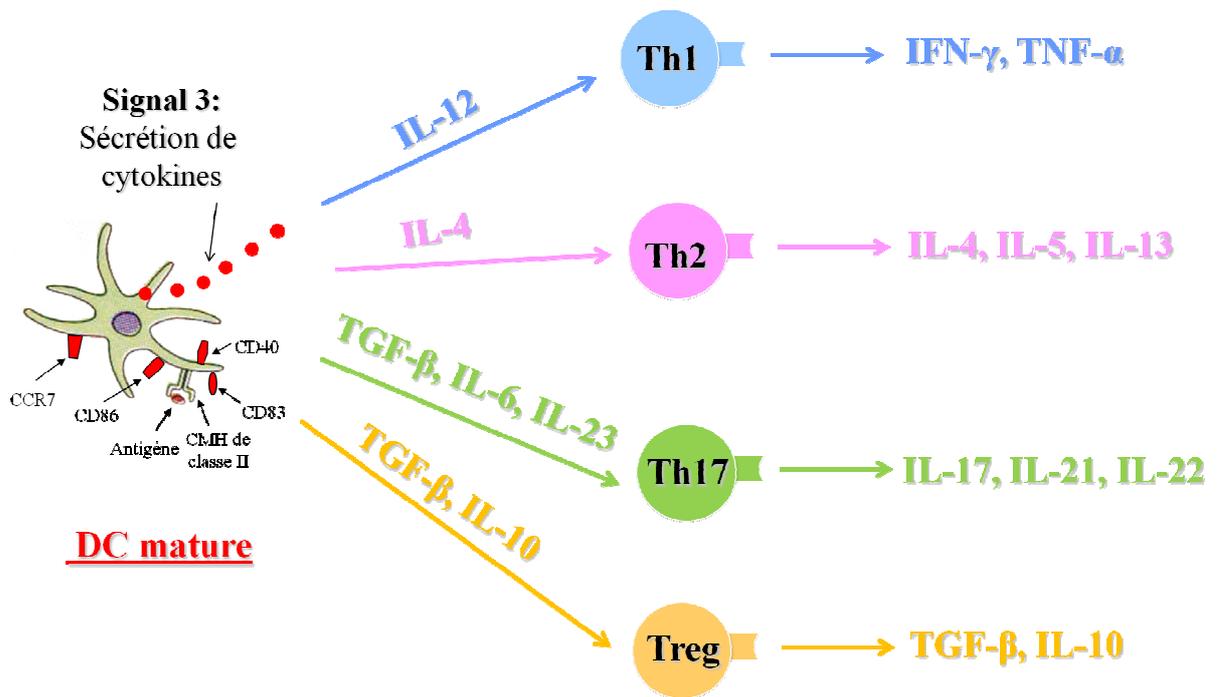


Figure 28: Polarisation de la réponse LT CD4⁺ (Gutcher et al. 2007)

Les LT CD4⁺ de type Th1 sécrètent de l'IFN- γ et du TNF- α , et participent aux réponses immunitaire à médiation cellulaire, en activant les LT CD8⁺ cytotoxiques et les cellules de l'immunité innée telles que les macrophages ou les cellules NK. Ils sont impliqués dans l'élimination des pathogènes intracellulaires.

Les LT CD4⁺ de type Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 et participent aux réponses humorales, en activant les LB producteurs d'IgE et d'IgG. Ils sont impliqués dans les maladies de type allergique et parasitaires.

Les LT CD4⁺ de type Th17 sécrètent de l'IL-17, cytokine pro-inflammatoire et sont impliqués dans la défense de l'organisme contre les infections (bactéries et champignons) et dans certaines maladies inflammatoires auto-immunes, telles que la maladie de Crohn ou le psoriasis (Bettelli et al. 2007; Dong 2008).

Les LT régulateurs (Treg) jouent un rôle clé dans la maintenance de la tolérance périphérique, dans la régulation de réponses inflammatoires et dans la prévention des

réponses auto-immunes. Ils participent au maintien de l'homéostasie lymphocytaire (Broere et al. 2011).

Il existe principalement deux sous-types de Treg qui expriment le marqueur CD25 (chaîne α à haute affinité du récepteur de l'IL-2) et le facteur de transcription Foxp3 : les CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ nTreg et les CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ iTreg. Le facteur de transcription Foxp3 constitue un marqueur spécifique des Treg chez la souris mais chez l'homme, il est également exprimé de façon transitoire par les LT activés (Ziegler 2006; Allan *et al.* 2007; Tran *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007; Miyao *et al.* 2012)

A ces deux sous-types s'ajoutent d'autres sous-populations de Treg, qui n'expriment ni le marqueur CD25 ni le facteur de transcription, Foxp3, tels que les Treg de type Tr1 et les Treg de type Th3 (Honda et al. 2011; Loser et al. 2012).

Les nTreg, qui constituent environ 5 à 10 % des LT CD4⁺ totaux chez les individus en bonne santé (Loser et al. 2012), se développent dans le thymus et jouent un rôle important dans la tolérance au soi et l'homéostasie immunitaire. Les iTreg sont induits à partir des LT naïfs en présence de TGF- β et se développent à la périphérie. Les Tr1 et les Th3 sont également induits à la périphérie. Les Tr1 sont induits *in vitro* à partir des LT naïfs stimulés par leur antigène en présence d'IL-10. L'IL-27 joue également un rôle important dans la différenciation des LT en Treg de type Tr1 (Apetoh *et al.* 2010). En effet, le récepteur aryl-hydrocarbène est induit en présence d'IL-27 et s'associe alors au facteur de transcription c-Maf. Le complexe ainsi formé se fixe alors sur les promoteurs des gènes codant pour l'IL-10 et l'IL-21, ce qui induit leur transcription et la différenciation des LT en Treg de type Tr1 (Apetoh *et al.* 2010). Les Tr1 présentent des propriétés suppressives en sécrétant de grandes quantités d'IL-10 et de TGF- β , ce qui permet de supprimer la prolifération et la différenciation des LT effecteurs mais également de supprimer les fonctions effectrices de nombreuses cellules du système immunitaire telles que les LB, les NK, les NKT, les macrophages ou les DC. De la même manière, les Th3 produisent du TGF- β , après avoir été stimulés par leur Ag et présentent également des propriétés suppressives (Honda et al. 2011).

Les Treg sont capables *in vitro* d'inhiber les réactions immunitaires à travers plusieurs mécanismes (*cf. figure 29*) (Honda et al. 2011; Jutel et al. 2011; Loser et al. 2012):

- Sécrétion de cytokines inhibitrices (IL-10, TGF- β , IL-35), inhibant la prolifération des LT
- Absorption de l'IL-2 présente dans l'environnement, en particulier via l'expression du CD25 (chaîne α à haute affinité du récepteur de l'IL-2) par les Treg, induisant l'apoptose des LT par déprivation en facteur de croissance

- Lyse des LT naïfs et des LT effecteurs par les Treg via la sécrétion de granzymes et de perforines
- Inhibition indirecte de la prolifération des LT, en inhibant les capacités stimulatrices des APC: liaison des Treg à la DC via le LFA-1 (Lymphocyte Function-associated antigen), empêchant la liaison des DC aux LT naïfs et effecteurs; liaison des Treg au DC via le CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen) et diminution de l'expression des marqueurs de co-stimulation CD80 et CD86; stimulation par les Treg de l'expression de l'IDO (Indoléamine 2,3-dioxygénase), enzyme catabolisant la conversion du tryptophane en kynurénine qui est un facteur toxique pour les LT, dans les DC.

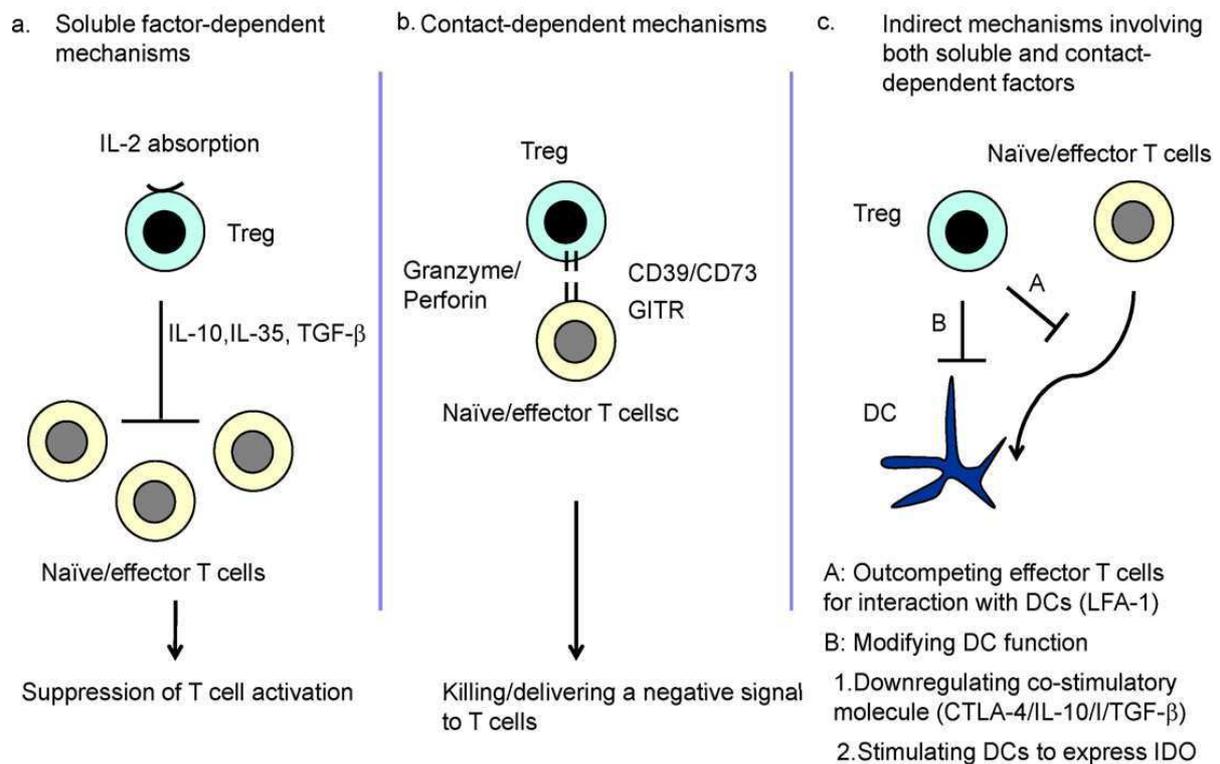


Figure 29: Quelques mécanismes de l'inhibition des réponses lymphocytaires par les Treg (Honda et al. 2011)

(CTLA-4: Cytotoxic T lymphocyte antigen; LFA-1: Lymphocyte Function-associated antigen; IDO: Indoléamine 2,3-dioxygénase; GITR: glucocorticoid-induced TNFR-related protein, TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor)

Dans le cas de l'eczéma de contact, les lymphocytes Treg semblent empêcher l'activation et/ou l'expansion des précurseurs des LT spécifiques du sensibilisant de contact. En effet, la déplétion des cellules CD25⁺ des PBMC permet de mieux détecter le potentiel immunogène des sensibilisants de contact (Vocanson et al. 2008; Dietz et al. 2010).

Les LT CD8⁺ se différencient en cellules effectrices après avoir été stimulés par leur Ag, en LT cytotoxiques (ou CTL pour Cytotoxic T cells), qui vont tuer les cellules cibles telles que des cellules infectées par un virus, qui présentent l'Ag, à leur surface via leur molécule du CMH I. En effet, le CD8 joue un rôle de co-récepteur lors de la reconnaissance de l'Ag, en s'associant au TcR et en se liant au molécule du CMH I, ce qui est nécessaire pour l'activation des LT. Les LT CD8⁺ tuent leurs cellules cibles par différents mécanismes : libération de perforines et de granzymes (protéases, qui sont activées dans les cellules cibles et induisent leur apoptose) et liaison du ligand de Fas (CD178) au récepteur Fas de la cellule cible provoquant l'apoptose de celle-ci.

De nombreuses études ont été réalisées sur la caractérisation de la réponse lymphocytaire dirigée contre le médicament impliqué, en terme de phénotype (CD4, CD8) des lymphocytes T et de sécrétion de cytokines, chez des patients allergiques.

Par exemple, chez des patients allergiques à la pénicilline G, les clones lymphocytaires obtenus, présentent un phénotype (CD4⁺ ou CD8⁺) et un profil de sécrétion de cytokines très hétérogènes les uns des autres. En effet, les lymphocytes T provenant des lésions cutanées allergiques sont préférentiellement de type CD8⁺ et lorsqu'ils sont cultivés *in vitro*, ils expriment une activité cytolytique contre les kératinocytes. Néanmoins, la majorité des LT spécifiques de la pénicilline, sont de type CD4⁺ lorsqu'ils sont isolés du sang périphérique (Weltzien et al. 1998). En effet, dans une étude portant sur quatre donneurs allergiques à la pénicilline G, vingt clones lymphocytaires ont pu être isolés à partir de leur sang et sur ces vingt clones, dix-neuf expriment le corécepteur CD4 contre un pour le corécepteur CD8 (Padovan et al. 1996).

Une étude consistant à étudier le profil de sécrétion de cytokines de PBMC de patients allergiques, stimulés en présence du médicament impliqué, a permis de mettre en évidence que la sécrétion de certaines cytokines telles que l'IL-2, IL-5, IL-13 et IFN- γ , est augmentée dans les PBMC de patients allergiques comparé aux patients non allergiques (Lochmatter et al. 2009). Dans cette étude, les PBMC de cinq patients allergiques à l'amoxicilline, cinq patients allergiques à des sulfamides (trois au SMX et deux au sulfapyridine) et de cinq donneurs non allergiques, sont cultivés en présence des médicaments impliqués pendant trois jours. Un criblage portant sur dix-sept cytokines et chimiokines [IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) GM-CSF, IFN- γ , CCL4 (Chemokine C-C motif Ligand 4), CCL2 (Chemokine C-C motif Ligand 2), TNF- α]

est réalisé sur les surnageants issus de ces cultures cellulaires. Concernant les patients allergiques aux sulfamides, une augmentation de la sécrétion d'IL-13, d'IFN- γ et d'IL-2 est observée, avec des rapports d'induction moyens allant de 40 à 195, dépendant de la cytokine étudiée. Une augmentation plus faible de la sécrétion d'IL-5, d'IL-1 β , d'IL-10, d'IL-17, d'IL-6, de TNF- α , de GM-CSF, de CCL4 et de G-CSF est également observée, avec des rapports d'induction moyens, allant de 3 à 12. Concernant les patients allergiques à l'amoxicilline, une forte sécrétion d'IL-5, d'IL-13, d'IFN- γ , de TNF- α et de G-CSF est observée, avec des rapports d'induction moyens, allant de 12 à 48. Une plus faible augmentation de la sécrétion d'IL-2, d'IL-4, d'IL-6, d'IL-10, de CCL4 et d'IL-1 β est également observée, avec des rapports d'induction moyens allant de 3 à 5. Des études statistiques montrent une différence statistique dans l'augmentation de la sécrétion d'IL-5, d'IFN- γ , d'IL-13 et d'IL-2, induite par les sulfamides et l'amoxicilline chez les patients allergiques comparés aux individus non-allergiques. Chez les patients allergiques à l'amoxicilline, l'augmentation de la sécrétion de TNF- α , induite par l'amoxicilline est également statistiquement différente de la sécrétion de TNF- α , présente chez les individus non allergiques. Pour vérifier que la sécrétion des ces cytokines est dépendante de la présence de lymphocytes spécifiques au médicament impliqué, des déplétions des LT (cellules CD3⁺) ont été réalisées sur les PBMC des patients allergiques. L'augmentation de la sécrétion d'IL-5, d'IFN- γ , d'IL-13 et d'IL-2 observée, lors de la stimulation des PBMC de patients allergiques, avec le médicament impliqué, disparaît si les cellules CD3⁺ sont déplétées auparavant. Les auteurs suggèrent alors que l'étude de la sécrétion d'IL-5, d'IFN- γ , d'IL-13 et d'IL-2 par des PBMC stimulés par le médicament à étudier, pourrait constituer un test de détection *in vitro* des allergies médicamenteuses, mais les résultats observés doivent néanmoins être confirmés sur un nombre de patients plus important (Lochmatter et al. 2009).

Une autre étude concernant les LT spécifiques de médicaments a été menée chez deux patients allergiques ayant développé un exanthème suite à la prise respectivement d'amoxicilline et de ceftriaxone et dont l'état allergique a été confirmé par des tests cutanés et des TTL positifs au médicament impliqué (Yawalkar et al. 2000). Des expériences d'immunohistochimie ont été réalisées sur les biopsies de peau, provenant des tests cutanés positifs à chacun des médicaments, chez les deux patients. Ces expériences montrent une infiltration lymphocytaire, dont deux tiers expriment les marqueurs CD4 et CD45RO et un tiers les marqueurs CD8 et CD45RO. Ces LT mémoires, infiltrés dans le derme et présents dans la jonction dermo-épidermale, présentent de la perforine dans leur cytoplasme, laissant à penser qu'il s'agit de lymphocytes cytotoxiques (Yawalkar et al. 2000). Des clones

lymphocytaires ont été obtenus à partir de LT isolés des tests cutanés positifs : trente-six clones spécifiques de l'amoxicilline et dix clones spécifiques de la ceftriaxone ont pu ainsi être produits à partir des deux patients allergiques. Des tests ELISA ont été réalisés afin d'étudier les cytokines sécrétées par ces clones spécifiques des médicaments (quatre clones étudiés pour l'amoxicilline et trois pour la ceftriaxone). Les résultats montrent une forte sécrétion d'IL-5 (de 34 à 930 pg/ml) et de TNF α (de 40 à 334 pg/ml) mais peu de sécrétion d'IL-4 (13 à 40 pg/ml) et d'IFN γ (6 à 31 pg/ml) (Yawalkar et al. 2000), confirmant certains résultats de la précédente étude présentée ci-dessus.

Dans une autre étude, la sécrétion de cytokines par des PBMC provenant de patients allergiques au SMX et stimulés en présence de SMX a été analysée par des tests ELISA, sur plusieurs jours de culture (Mauri-Hellweg et al. 1995). Durant les deux premiers jours de culture, une sécrétion importante d'IL-2 (environ 400 pg/ml) est observée. De la même manière, une sécrétion de TNF- α (environ 360 pg/ml) est observée uniquement lors du premier voire du deuxième jour de culture. Une sécrétion d'IFN- γ est également observée et elle augmente faiblement avec le temps (de 130 pg/ml à 520 pg/ml). Aucune sécrétion d'IL-4 n'est observée alors qu'une forte sécrétion d'IL-5 est détectée après 5 à 7 jours de culture (de 660 à 65130 pg/ml). L'augmentation de la sécrétion d'IL-5, en présence du médicament impliqué, est également retrouvée lors de la stimulation de PBMC provenant de patients allergiques à la phénytoïne et à la carbamazépine, mais également chez des patients allergiques à l'amoxicilline, comme mentionné précédemment. Concernant le phénotype CD4 ou CD8 des LT spécifiques du SMX, quarante-deux clones lymphocytaires spécifiques du SMX ont été obtenus par dilution limite à partir des PBMC d'un patient allergique au SMX et la majorité de ces clones sont CD4⁺ (30 sur 42) (Mauri-Hellweg et al. 1995), tout comme le cas des clones générés à partir du sang de patients allergiques à la pénicilline G. D'autres études concernant le SMX-NO ont confirmé que la majorité des LT spécifiques du SMX-NO étaient de type CD4⁺ (Schnyder et al. 2000; Burkhart et al. 2001; Castrejon et al. 2010).

Une étude portant sur quatre patients allergiques à la lidocaïne révèle également une réponse lymphocytaire très hétérogène en terme de phénotype CD4/CD8 et de sécrétion de cytokines (Zanni et al. 1997). En effet, cinquante-sept clones spécifiques de la lidocaïne ont été générés à partir de PBMC d'un patient allergique à la lidocaïne. Sur ces cinquante-sept clones, quarante-huit sont CD4⁺, sept sont CD8⁺ et deux sont CD3⁺ γ/δ . De la même manière que précédemment, la majorité des clones spécifiques de la lidocaïne présente un phénotype CD4⁺. Concernant la sécrétion de cytokines, une forte sécrétion d'IL-5 est également

retrouvée lorsque les PBMC de patients allergiques à la lidocaïne, sont stimulés par de la lidocaïne (Zanni et al. 1997), tout comme dans le cas des allergies à la pénicilline G, à l'amoxicilline et au SMX. Néanmoins, concernant les clones lymphocytaires spécifiques de la lidocaïne, différents profils en terme de sécrétion de cytokines sont observés. Sur treize clones CD4⁺ testés, trois présentent un profil de type Th1, avec des concentrations élevées d'IFN- γ (autour de 200 ng/ml) et des concentrations faibles à modérées d'IL-4 (autour de 20 ng/ml) et d'IL-5 (autour de 30 ng/ml), alors que les dix autres clones, présentent un profil de type Th2 avec des concentrations faibles d'IFN- γ (inférieur à 50 ng/ml), des concentrations modérées à très élevées d'IL-5 (entre 10 à 400 ng/ml) et des concentrations élevées d'IL-4 (entre 5 à 180 ng/ml). Les sept clones CD8⁺ présentent un profil de type Tc1 (lymphocytes T cytotoxiques 1, lymphocytes T CD8⁺ présentant un profil de sécrétion de cytokines ressemblant au profil Th1 des lymphocytes T CD4⁺) avec une forte sécrétion d'IFN γ (entre 50 à 200 ng/ml) et une faible sécrétion d'IL-4 (inférieur à 20 ng/ml) et d'IL-5 (inférieur à 25 ng/ml) (Zanni et al. 1997).

Des travaux portant sur l'étude de l'induction de l'expression de l'ARNm de l'IL-4 et de l'IFN γ sur des PBMC de patients allergiques à la pénicilline G ou à l'amoxicilline, stimulés par le médicament responsable de l'allergie ou par des bio-conjugués HSA-Pénicilline ou HSA-Amoxicilline, ont été réalisés au sein du laboratoire, il y a quelques années (Gaspard et al. 2000; Lebrech et al. 2001). Cette étude a été réalisée sur dix-neuf patients allergiques dont onze présentaient une hypersensibilité immédiate [chocs anaphylactiques (n=4), Œdème de Quincke (n=2) ou urticaire (n=5)] et huit une hypersensibilité retardée [rash maculopapuleux (n=5), pustulose exanthématique aiguë généralisée (n=2), dermatite de contact (n=1)]. Les résultats montrent une induction de l'expression de l'ARNm de l'IL-4 chez la majorité des patients ayant développé une hypersensibilité immédiate, lorsque les PBMC sont stimulés par les médicaments impliqués mais pas par les bio-conjugués HSA-médicaments. Cette induction de l'expression de l'ARNm de l'IL-4 n'est pas retrouvée chez les patients ayant développé une hypersensibilité retardée ou chez les volontaires sains non allergiques, quel que soit l'antigène utilisé (médicaments libres ou conjugué à la HSA). Une induction de l'expression de l'ARNm de l'IFN γ est observée chez les patients ayant développé une hypersensibilité immédiate lorsque les PBMC sont stimulés avec le médicament libre ou le bio-conjugué HSA-médicament correspondant. Cette induction de l'expression de l'ARNm de l'IFN γ est également retrouvée chez les patients ayant développé une hypersensibilité retardée uniquement lorsque les PBMC sont stimulés avec le bio-conjugué HSA-médicament. Des expériences portant soit uniquement sur les LT CD4⁺ soit uniquement sur les LT CD8⁺ ont également été menées dans

cette étude : suite à la stimulation des PBMC avec le médicament impliqué dans le développement de l'hypersensibilité ou le bio-conjugué HSA-médicament correspondant, des billes sur lesquelles sont coâtés des anticorps anti-CD4 ou anti-CD8 sont ajoutées au milieu de culture, afin de ne sélectionner qu'une sous-population de LT. Les résultats de ces expériences montrent que l'expression de l'ARNm de l'IFN γ chez un patient ayant développé une hypersensibilité immédiate est à attribuer aux LT CD4⁺ lorsqu'ils sont stimulés avec le bio-conjugué HSA-médicament alors qu'elle est à attribuer aux LT CD8⁺ lorsqu'ils sont stimulés par le médicament. Chez un patient ayant développé une hypersensibilité retardée, cette expression de l'ARNm de l'IFN γ est induite uniquement chez les LT CD4⁺. Ainsi, l'ensemble de ces résultats de cette étude suggère que la réponse lymphocytaire impliquée dans les hypersensibilités immédiates, provient de l'activation de plusieurs sous-types de LT : Th1, Tc1 et Tc2, aboutissant à une sécrétion d'IL-4 et d'IFN- γ alors que la réponse lymphocytaire impliquée dans les hypersensibilités retardées est de type Th1, avec une production d'IFN γ par les LT CD4⁺ (Gaspard et al. 2000; Lebrec et al. 2001).

Un modèle murin d'étude des allergies médicamenteuses non-immédiates induites par une sensibilisation cutanée a été développé par l'équipe du Pr. Jean-François Nicolas (Rozieres et al. 2009). Ces souris sont déplétées en LT CD4⁺ et sont sensibilisées à l'amoxicilline par voie cutanée via trois applications épicutanées quotidiennes consécutives. Cinq jours après, elles sont à nouveau exposées à l'amoxicilline au niveau de l'oreille. L'étude montre qu'aucune réponse allergique cutanée ne se développe chez des souris sauvages alors qu'il est possible d'induire une réaction allergique cutanée chez des souris déplétées en LT CD4⁺ (Rozieres et al. 2009). Les LT CD4⁺ semblent donc jouer un rôle dans l'inhibition de la sensibilisation par voie cutanée à l'amoxicilline. La réaction allergique cutanée observée est médiée par des LT CD8⁺ effecteurs sécrétant de l'IFN γ , qui ont été amplifiés dans les ganglions lymphatiques lors de la phase de sensibilisation et qui ont été ensuite recrutés au niveau de la peau (Rozieres et al. 2009).

2.1.6. Modèles d'étude du répertoire lymphocytaire et de la fréquence des LT spécifique d'un Ag

Il existe plusieurs méthodes d'étude du répertoire de LT humains pour un Ag donné, telles que l'utilisation de tétramères HLA couplés à l'Ag ou l'immunoscope. D'autres méthodes permettent de calculer les fréquences des LT humains spécifiques de l'Ag telles que

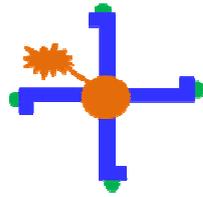
l'amplification de LT périphériques et l'étude de leur prolifération en présence de l'Ag ou l'étude de la sécrétion de cytokines comme l'IFN γ en présence de l'Ag présenté par des DC.

2.1.6.1. Etude du répertoire

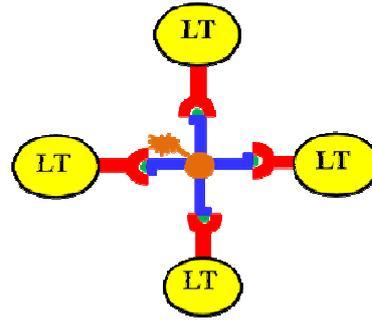
Un répertoire de LT spécifique d'un Ag donné peut être détecté par la technique des tétramère ou la technique de l'immunoscope.

Un tétramère de molécules HLA consiste en 4 molécules HLA qui sont biotinylées et fixées à une molécule de streptavidine, elle-même couplée à un fluorochrome (*cf. figure 30*). Le peptide issu de l'Ag, qui est reconnu par les LT est fixé sur chaque molécule HLA. Les tétramères HLA sont mis en présence des LT et les LT capables de reconnaître le peptide présenté par les tétramères sont détectés par cytométrie en flux. Il est possible également de déterminer une fréquence de LT spécifiques de cet épitope. Pour utiliser cette méthode, il est nécessaire de connaître l'épitope reconnu par les LT et responsable de leur activation. De plus, cette méthode ne permet de tester qu'un seul épitope à la fois et qu'une seule présentation de l'épitope par un seul type de molécules HLA, molécules qui diffèrent en fonction des patients, du fait du polymorphisme génétique.

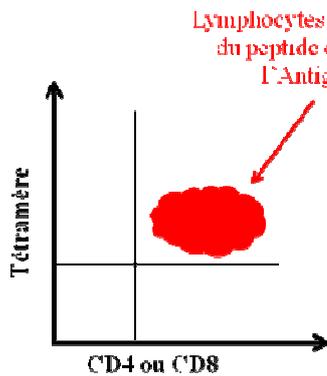
Représentation schématique d'un tétramère:



Fixation des LT spécifiques du peptide, au tétramère:



Représentation schématique de la détection de LT spécifiques du peptide dérivé de l'Antigène, par cytométrie en flux:



Légende:

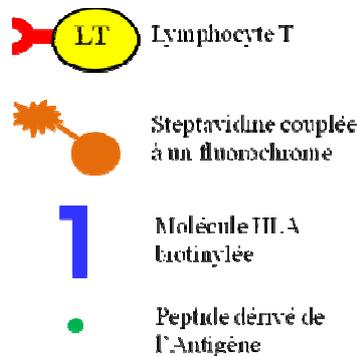
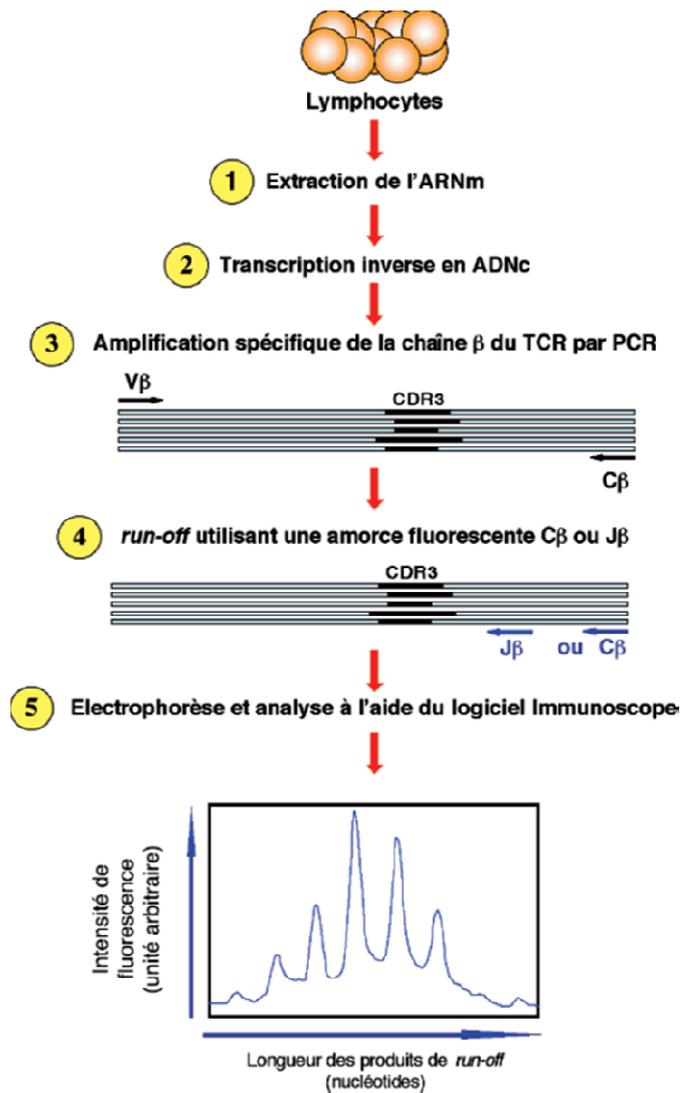


Figure 30: Détection de LT spécifiques d'un peptide dérivé d'un antigène par l'utilisation de tétramères (Ferrari-Lacraz et al. 2006)

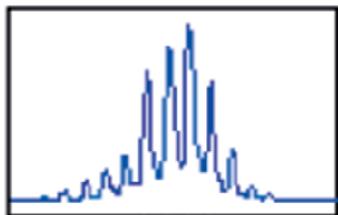
Dans l'exemple donné en figure 30, un peptide provenant de l'Ag à tester est fixé sur les molécules HLA (classe I ou II) et seuls les LT ($CD8^+$ ou $CD4^+$) spécifiques de ce peptide sont capables de se fixer au tétramère. Ces LT spécifiques sont détectés par cytométrie en flux par double marquage : un marquage positif au CD8 ou CD4 par exemple, et un marquage positif au tétramère, qui est couplé à un fluorochrome.

La technique de l'immunoscope (*cf. figure 31*) permet d'étudier la diversité du répertoire lymphocytaire, liées à la recombinaison des segments variables V(D)J. Les régions hypervariables (CDR3, Complementarity Determining Region 3) des chaînes α et β du TcR, résultent de ces réarrangements et correspondent aux régions de jonction des ces segments variables. La longueur des régions CDR3 est variable suivant les LT. En utilisant des amorces spécifiques des régions V et C, les régions hypervariables CDR3, peuvent être amplifiées par PCR (Polymerase Chain Reaction), à partir des ARN messagers extraits des LT qui ont par exemple, été mis en présence de l'antigène à tester, et retranscrits en ADN complémentaires. Les fragments obtenus subissent une élongation ou run-off, en utilisant une

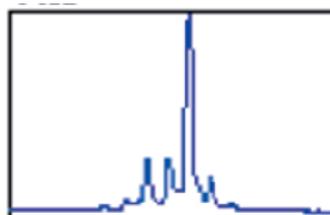
amorce spécifique de la région C ou de la région J, marquée en C-terminal par un composé fluorescent. La distribution de la taille de ces fragments d'ADN codant pour les régions hypervariables CDR3 est ensuite analysée par électrophorèse, sur un gel de polyacrylamide. Les LT présentant le même CDR3 sont issus de l'amplification d'un même clone. Ainsi, si le profil de distribution de la taille de fragments CDR3 suit une distribution gaussienne (8 pics en moyenne), la population lymphocytaire est hétérogène, avec une absence d'expansion clonale. Par contre, si un écart par rapport à la distribution gaussienne est observé, du fait par exemple, de la présence d'un pic majoritaire, une expansion clonale a eu lieu et un clone est alors devenu majoritaire, suite à l'exposition à l'Ag testé. Cette technique, basée sur l'utilisation de la technique de PCR, présente une sensibilité importante. Un LT spécifique de l'antigène donné peut être détecté parmi 200000 LT testés (Pannetier et al. 1995; Bercovici et al. 2000; Currier et al. 2001). Cette technique permet ainsi de détecter si une expansion clonale a eu lieu après avoir exposé les LT à l'Ag étudié.



Deux exemples de profils :



**Distribution gaussienne
Population hétérogène**



**Distribution non gaussienne
Présence d'un pic majoritaire,
due à une expansion clonale**

Figure 31: Principe de l'Immunoscope
(Boudinot et al. 2007)

2.1.6.2. Etude de la fréquence de LT spécifique d'un Ag donné :

Pour déterminer les fréquences des LT d'un Ag donné, tout en ne connaissant pas le ou les épitopes issus de cet Ag qui sont reconnu(s) par les LT et en s'affranchissant du paramètre molécule HLA, il est possible de présenter l'Ag par des DC autologues aux LT. Ces DC peuvent provenir du sang de cordon ou du sang périphérique d'un individu donné. En effet, les DC mises en présence de l'Ag et de signaux de danger (tels que du LPS par exemple) vont capter l'Ag et le digérer en peptides qui sont alors présentés en surface via les molécules HLA, identiques à celles des LT testés, car issus du même individu. Les LT capables de reconnaître spécifiquement cet Ag vont alors proliférer ou sécréter des cytokines particulières, ce qui permet de les identifier.

Une étape préalable d'amplification polyclonale des LT avec de la PHA (Phytohaemagglutinin) peut être également réalisée, ce qui permet d'augmenter la sensibilité du test en amplifiant les LT spécifiques de l'Ag, qui peuvent ainsi être mieux détectés. De plus, il est également possible de tester plusieurs Ag sur le même individu, contrairement à la méthode de tétramères (Geiger et al. 2009). L'étude du répertoire de LT peut porter sur tous les LT ou sur des sous-types de LT (LT CD4⁺ ou CD8⁺, LT naïfs ou LT mémoires...)

Les LT étudiés, sont alors mis en culture dans des plaques à 384 puits à raison de 2000 cellules par puits et sont stimulés avec de la PHA, en présence d'IL-2, ce qui induit leur multiplication. Après quatorze jours d'amplification, qui permet d'atteindre des facteurs d'amplification de 1000 à 5000, la librairie de LT est alors constituée et les tests de criblage des LT spécifiques pour un ou plusieurs Ag donné(s) peuvent être effectués sur un même individu. Les LT sont mis en présence de monocytes autologues, qui ont été ou non préalablement chargés pendant 3h avec le ou les différent(s) Ag à tester. La prolifération des LT dans chacun des puits est mesurée quatre jours après la stimulation antigénique, par incorporation de thymidine tritiée (*cf. figure 32*) (Geiger et al. 2009).

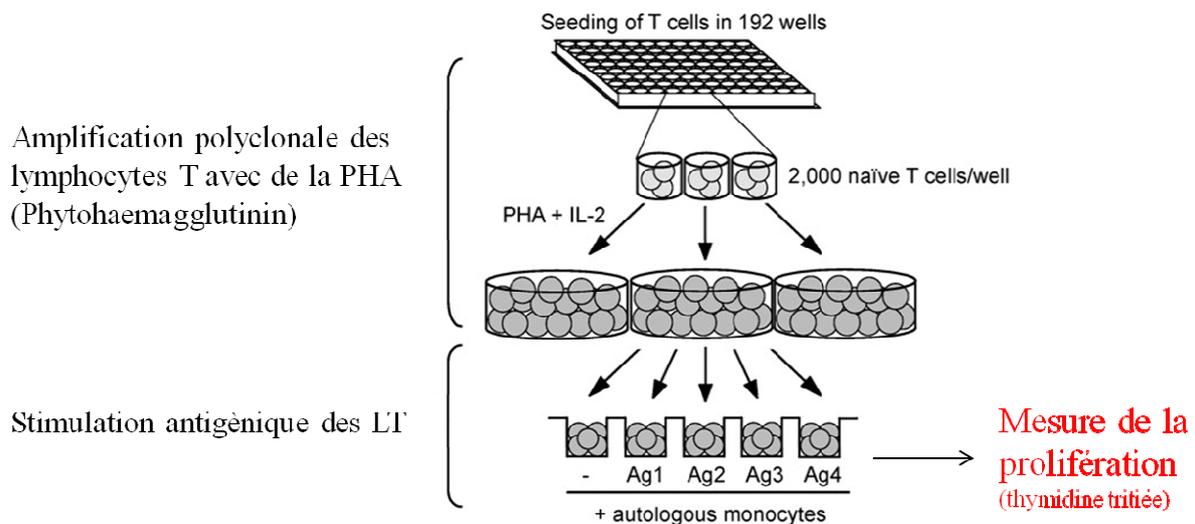


Figure 32: Obtention d'une librairie de LT amplifiés et test de criblage de plusieurs Ag (Geiger et al. 2009)

La fréquence des LT est alors calculée, en fonction des résultats de prolifération des LT, selon la loi statistique de Poisson et exprimée en millions de LT (*cf. figure 33*) (Geiger et al. 2009).

$$\text{Fréquence lymphocytes T spécifiques} = \frac{-\text{Ln} \left(\frac{\text{Nombre de lignées non spécifiques}}{\text{Nombre total de lignées testées}} \right)}{\text{Nombre de lymphocytes T par puit}}$$

Figure 33: Loi statistique de Poisson, appliquée à la détermination des fréquences de LT spécifiques d'un Ag donné

Cette méthode a été utilisée pour calculer les fréquences des LT spécifiques de deux antigènes « primaires » : la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) et la PA (Protective Antigen) provenant de *Bacillus anthracis*. Ces deux Ag sont des Ag « primaires » car il est considéré que nous ne sommes pas exposés naturellement ou via l'environnement à ces deux antigènes. La KLH est une hémocyanine provenant d'un mollusque, la patelle, et la PA est un composant d'une toxine de *Bacillus anthracis*. Concernant la KLH, la fréquence obtenue sur sept donneurs est de 10 à 70 LT spécifiques par million de LT CD4⁺ naïfs, issus du sang périphérique. Celle de la PA est de 10 à 26 LT spécifiques par million de LT CD4⁺ naïfs, issus du sang périphérique. L'étude a également été réalisée sur le sang de cordon de cinq

donneurs pour la KLH et la fréquence obtenue est de 5 à 40 LT spécifiques par million de LT CD4⁺ naïfs, issus du sang de cordon (Geiger et al. 2009).

Une fois que les puits contenant les LT spécifiques à l'Ag sont identifiés, il est alors possible de cloner les LT spécifiques ou encore de réaliser des études sur la spécificité du TcR, en effectuant des expériences de doses-réponses avec l'Ag ou avec des peptides issus de l'Ag, ce qui permet en plus de déterminer l'épitope reconnu (Geiger et al. 2009).

Néanmoins, il est tout à fait possible de se passer de l'étape d'amplification polyclonale et de l'utilisation de radioactivité pour étudier le répertoire de LT d'un Ag donné. Pour cela, les LT sont mis en culture en plaque 96 puits à raison de 100 000 à 300 000 LT par puits et sont stimulés à quatre reprises pendant quatre semaines par des DC autologues, qui ont été préalablement chargées avec l'Ag à tester. Chaque puits de LT est alors considéré comme une lignée lymphocytaire. Les lignées lymphocytaires spécifiques de l'Ag sont ensuite déterminées par la sécrétion d'une cytokine telle que l'IFN- γ , par un ELISpot. L'IFN- γ est considéré dans ce test comme un marqueur d'activation des LT spécifiques car les LT sont cultivés dans un environnement cytokinique qui favorise une réponse de type Th1 (*cf. figure 34*). La fréquence des LT spécifiques de l'Ag est également déterminée en utilisant la loi de Poisson (Delluc et al. 2010; Delluc et al. 2011).

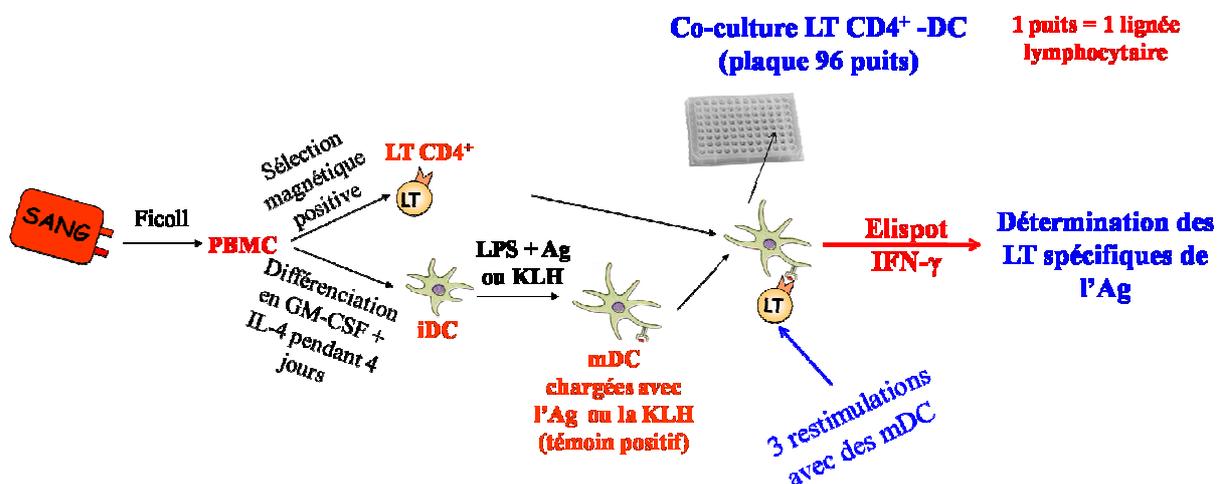


Figure 34: Induction de lignées lymphocytaires et Identification de lignées lymphocytaires spécifiques de l'Ag testé. Les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont isolés du sang périphérique de chaque donneur par un ficoll. Une sélection positive avec des billes magnétiques CD4⁺ est réalisée sur les PBMC afin de récupérer les LT CD4⁺ alors que les iDC autologues (immature DC) sont obtenues par différenciation des monocytes contenus dans les PBMC, en présence d'IL-4 et de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) pendant 4 jours. Les iDC sont alors chargés avec l'Ag à tester ou la KLH (témoin positif), en présence de LPS afin d'obtenir des mDC (matures DC), présentant des peptides de l'Ag à sa surface. Les LT CD4⁺ sont mis en culture en présence de ces mDC et sont restimulés avec de nouvelles mDC à trois reprises. Une semaine après la dernière re-stimulation, un ELISpot IFN- γ est réalisé afin de déterminer les lignées lymphocytaires spécifiques de l'Ag.

En utilisant cette méthode, les fréquences des LT naïfs spécifiques de la KLH qui constitue le témoin positif de l'expérience, d'anticorps monoclonaux thérapeutiques et de l'érythropoïétine ont été déterminées sur des LT CD4⁺ totaux issus du sang périphérique de donneurs sains. La fréquence des LT de la KLH obtenue en utilisant cette méthode, sur du sang périphérique de donneurs sains, est de 5 à 30 LT spécifiques par million de LTCD4⁺ totaux. Elle est légèrement plus faible que celle obtenue avec l'amplification polyclonale, du fait que le nombre de donneurs testés dans cette étude est plus faible et que les lignées lymphocytaires obtenus en présence de KLH sont généralement toutes sécrétrices d'IFN γ pour un grand nombre de donneurs. Le calcul des fréquences étant basé sur le nombre de lignées non spécifiques de l'antigène, une sous-estimation de la fréquence pour la KLH est observée avec cette méthode, en comparaison à la méthodologie utilisant l'amplification polyclonale.

L'EPO est une protéine synthétisée par l'organisme et elle joue un rôle fondamental dans le développement des érythrocytes. L'EPO recombinante est utilisée dans le traitement des anémies et peut dans de très rares cas donner lieu à une production d'anticorps anti-EPO, qui vont neutraliser à la fois l'EPO recombinante mais également la faible quantité d'EPO produite par le patient, donnant lieu à de sérieux cas d'anémies réfractaires. Au milieu des années 2000, une augmentation des cas d'anémies réfractaires chroniques a été observée et a été reliée avec le changement de la composition du bouchon des flacons, dont un des composants provoquait la formation d'agrégats, alors reconnus par les APC, telles que les DC (Schellekens et al. 2006; Tamilvanan et al. 2010). Concernant l'étude sur l'EPO, sur les neuf donneurs sains testés, quatre donneurs ont présenté des lignées lymphocytaires spécifiques de l'EPO contre cinq donneurs non-répondants. La fréquence moyenne est de 0,53 LT spécifique de l'EPO par million de LT CD4⁺ périphériques alors qu'elle est beaucoup plus élevée pour des protéines exogènes telles que l'ovalbumine (fréquence moyenne de 2,16). Néanmoins, contrairement à l'EPO, d'autres protéines endogènes telles que l'insuline ou l'antithrombine III ou l' α_1 antitrypsine, n'induisent pas de réponse lymphocytaire *in vitro*. Les auteurs suggèrent alors que l'EPO endogène est partiellement ignoré par le système immunitaire, c'est-à-dire qu'il existe effectivement des LT spécifiques de l'EPO mais ces LT ne sont pas capables d'induire une réponse fonctionnelle en présence d'EPO du fait d'un manque de signaux d'activation. Il semblerait donc que l'EPO endogène ne soit pas parvenue à réduire de manière drastique la taille du répertoire T spécifique de l'EPO, par la sélection thymique. Ainsi, une réponse lymphocytaire dirigée contre l'EPO exogène, peut se développer, de part la présence de ces LT spécifiques de l'EPO dans le sang des patients, et en présence de

signaux de costimulation, fournis par l'altération des lots d'EPO dont la formulation a été modifiée, conduisant à la production d'anticorps neutralisant l'EPO endogène et recombinante (Delluc et al. 2010).

Concernant les anticorps monoclonaux thérapeutiques, il a été observé que certains d'entre eux sont immunogènes, malgré leur humanisation et induisent la production d'Ac dirigés contre eux, ce qui diminue considérablement leur efficacité clinique (Baert et al. 2003; Bendtzen et al. 2006; Bartelds et al. 2007; Radstake et al. 2009). C'est le cas de deux anticorps chimériques (partie constante humaine et partie variable murine) : le rituximab (anti-CD20) et l'infliximab (anti-TNF- α) alors que les anticorps humanisés tels que le bévacizumab (anti-VEGF-A) et le trastuzumab (anti-HER2/neu) sont plutôt bien tolérés. Néanmoins, l'adalimumab (anti-TNF- α), anticorps totalement humanisé, est connu pour être immunogène chez un pourcentage significatif de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Bender et al. 2007). Les fréquences de LT CD4⁺ spécifiques des ces anticorps thérapeutiques ont été déterminés et sont différentes selon les anticorps. Le rituximab, l'adalimumab et l'infliximab, ont une fréquence respective de 0,35 ; 0,33 et 0,2 LT spécifique par million de LT CD4⁺ périphériques alors que le bevacizumab et le trastuzumab ont des fréquences plus faibles, qui sont respectivement de 0,1 et 0,02 LT spécifique par million de LT CD4⁺ périphériques. L'étanercept (anti-TNF- α) qui est une protéine de fusion, présente une fréquence encore plus faible : 0,01 LT spécifique par million de LT CD4⁺ périphériques. Cette étude montre qu'il est possible de relier l'immunogénicité des protéines thérapeutiques avec la fréquence des LT qui leur sont spécifiques (Delluc et al. 2011).

Cette méthode a été utilisée dans le cadre de notre étude de la fréquence des LT naïfs spécifiques des antibiotiques étudiés, en collaboration avec Bernard Maillère (CEA, Saclay) et Stéphanie Delluc (Indicia, Lyon).

D'autres méthodes similaires, mettant en jeu des co-cultures de LT (non préalablement amplifiés) et de DC matures présentant l'Ag et des mesures de la prolifération des LT ou des mesures de l'IFN- γ intracellulaire par cytométrie en flux, sont utilisées pour l'étude de l'activation des LT spécifiques de molécules sensibilisantes tels que le DNCB (2,4-dinitrochlorobenzène) et sa forme soluble, le DNBS (acide 2-4-dinitrobenzène sulfonique) (Dietz et al. 2010; Martin et al. 2010).

2.2. Phase d'éllicitation :

La phase d'éllicitation intervient lors d'une deuxième rencontre avec l'Ag et fait intervenir les LT mémoires, produits lors de la phase de sensibilisation. En effet, lors d'un deuxième contact avec l'Ag, les DC le prennent en charge et le présentent aux LT mémoires circulants (*cf. figure 35*).

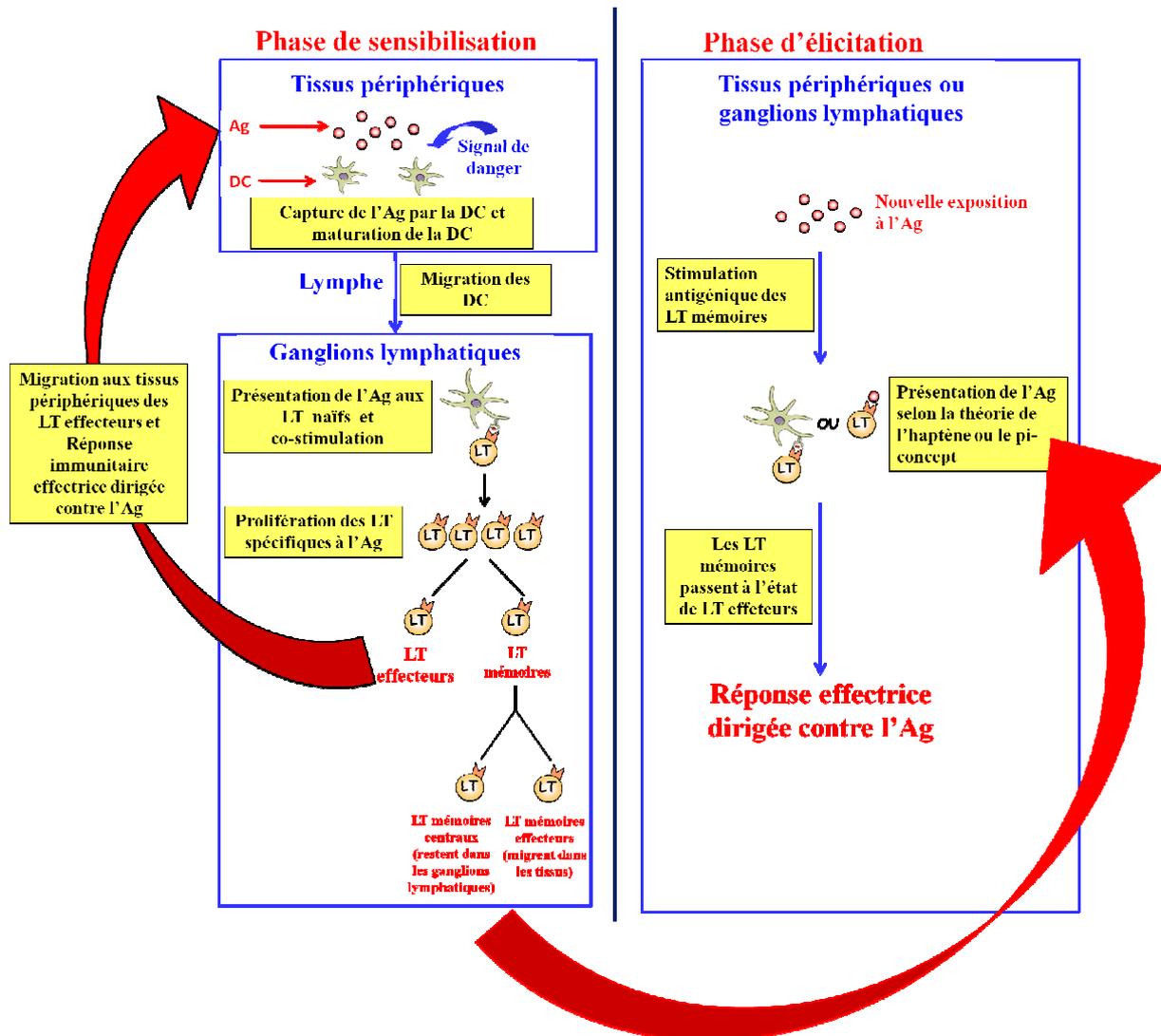


Figure 35: Schéma des phases de sensibilisation et d'éllicitation

2.2.1 Les LT mémoires :

Les LT mémoires sont des cellules à longue durée de vie, liée à l'expression de gènes de survie. Ils requièrent une re-stimulation additionnelle avant de pouvoir passer à l'état de LT effecteurs et d'agir sur leurs cellules cibles. Les LT mémoires expriment entre autre le marqueur membranaire CD45RO, isoforme du CD45RA (présent sur les LT naifs). La survie

des LT CD4 mémoires nécessitent une stimulation par des cytokines telles que l'IL-7 et l'IL-15 (Janeway 2009).

Il est possible de classer les LT mémoires en deux catégories : les LT mémoires effecteurs et les LT mémoires centraux. Les LT mémoires centraux expriment des récepteurs de localisation ou homing, tels que CCR7 ou la L-sélectine (CD62L) comme les LT naïfs, qui leur permettent de circuler dans les ganglions lymphatiques et la rate. Au contraire, les LT mémoires effecteurs n'expriment pas le récepteur CCR7 et le CD62L et peuvent circuler vers les tissus non-lymphoïdes. Les LT mémoires effecteurs peuvent se différencier rapidement en LT effecteurs et sécréter de grandes quantités de cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-5) après leur re-stimulation par l'Ag alors que les LT mémoires centraux ont besoin de plus de temps pour sécréter des cytokines après la re-stimulation par l'Ag (Boyman et al. 2009; Janeway 2009; Broere et al. 2011).

Ainsi, les LT mémoires, produits lors de la phase de sensibilisation et présents dans les tissus ciblés par l'Ag et dans les ganglions lymphatiques, sont mobilisés lors d'une réexposition à l'Ag. En effet, l'Ag peut être présenté à ces LT mémoires selon l'hypothèse de l'haptène en étant fixé aux molécules du CMH des APC ou il peut être présenté selon le pi-concept (*présenté dans le paragraphe suivant*), en interagissant de manière non covalente avec le TcR de ces LT mémoires. Seuls les LT mémoires spécifiques de cet Ag sont stimulés. Ils passent alors à l'état de LT effecteurs et exercent rapidement une réponse immunitaire effectrice dirigée contre cet Ag.

2.2.2 Pi-concept :

Une hypothèse différente de l'hypothèse de l'haptène, a été proposée, concernant la présentation de l'Ag aux LT mémoires. Il s'agit du Pi-concept pour Pharmacological interaction of drugs with the Immune system, proposé par Werner Pichler (*cf.* figures 24 et 25). Ce concept fait suite à l'observation que certains médicaments considérés comme chimiquement non réactifs (sans métabolisation préalable) tels que le SMX, la lidocaïne, la mépivacaïne (anesthésique), le celecoxib (AINS), la lamotrigine (anti-épileptique), la ciproxine (antibiotique), la moxifloxacine (antibiotique), l'allopurinol et la carbamazépine sont capables d'activer directement via leur TcR, des LT provenant de patients allergiques (Pichler 2002; Pichler 2002; Pichler et al. 2006).

Ainsi, d'après le pi-concept, le médicament serait capable d'interagir directement avec le TcR des LT via des liaisons non covalentes et d'induire son activation. Néanmoins, il semblerait que la présence d'interactions labiles avec les molécules du CMH d'une APC soit nécessaire pour que l'activation des LT soit complète (*cf. figure 36*). Ainsi, contrairement à la théorie de l'haptène (ou pro-haptène), le médicament n'a pas besoin de se fixer à une protéine pour être immunogène ni d'être métabolisé, digéré, ou apprêté par des APC pour activer les LT.

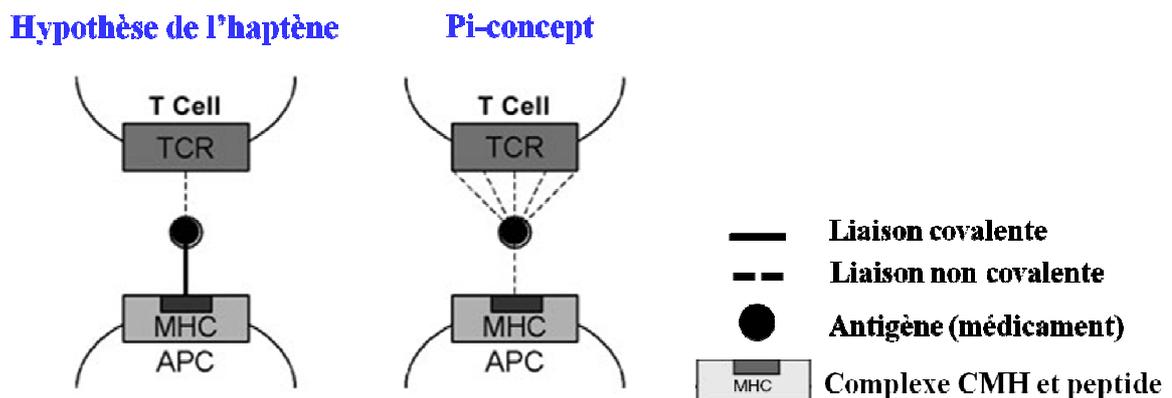


Figure 36: Différence du type de liaisons dans la présentation de l'Ag selon le principe de l'haptène et le pi-concept (Gerber et al. 2006)

Plusieurs observations expérimentales tendent à confirmer la validité du pi-concept. Tout d'abord, comme mentionné précédemment, certains médicaments sont capables de stimuler directement via le TcR, les clones de LT (TCC : T-cell clones) provenant de patients allergiques, (Schnyder et al. 2000; Farrell et al. 2003). Cependant, les LT provenant de patients exposés au SMX mais n'ayant pas développé de réactions allergiques ou d'individu non exposés aux SMX, ne prolifèrent pas en présence de SMX ou de son métabolite réactif, le SMX-NO (Farrell et al. 2003). Ainsi, le pi-concept semble plus s'appliquer aux LT mémoires.

De plus, les TCC spécifiques réagissent avec le médicament, même si les APC sont fixées au glutaraldéhyde, excluant ainsi toute implication d'apprêtement et de métabolisme intracellulaire, quant à l'activation de ces TCC (Castrejon et al. 2010).

Puis, la cinétique d'activation des TCC par ces médicaments est très rapide et incompatible avec des étapes de métabolisme intracellulaire et d'apprêtement à la surface des APC. En effet, la lidocaïne et le SMX activent les TCC quasi immédiatement, comme le montre l'augmentation rapide du calcium intracellulaire alors que le temps nécessaire pour métaboliser et apprêter le médicament à la surface des APC est d'au moins soixante minutes.

Ensuite, les liaisons sont labiles entre le médicament et le TcR mais également entre le médicament et les molécules du CMH (*cf. figure 36*). En effet, si les APC mises en présence du médicament pendant 1h sont lavées à deux reprises, ce qui détache et élimine le médicament, la stimulation des TCC n'est plus observée pour la lidocaïne, la lamotrigine, la carbamazépine la cirpoxine et le SMX. Par contre, si l'expérience est réalisée avec le SMX-NO, métabolite du SMX qui se comporte comme un haptène, les lavages n'empêchent pas la stimulation des TCC, mettant en évidence des liaisons covalentes entre le médicament et le complexe CMH-peptide, dans le cas de l'hypothèse de l'haptène (Schnyder et al. 2000; Farrell et al. 2003).

Enfin, dans le cas du pi-concept, aucune restriction au CMH n'est observée et il semblerait que l'activation des TCC par le SMX ne nécessite pas la présence d'un peptide donné avec une séquence d'acides aminés déterminée, dans la poche des molécules du CMH des APC (Burkhart et al. 2002; Pichler et al. 2006). Au contraire, dans le cas de l'hypothèse de l'haptène, des restrictions aux molécules HLA ont été démontrées. Par exemple, des restrictions aux molécules HLA-DR ont été observées pour la majorité des clones lymphocytaires spécifiques de la pénicilline G, isolés à partir du sang périphérique de patients allergiques (Padovan et al. 1996) et chez des individus allergiques à la pénicilline G (Yang et al. 2006). D'autres restrictions aux molécules HLA ont été mises en évidence avec d'autres médicaments tels que la flucloxacilline, l'abacavir, l'allopurinol et la carbamazépine (*cf. partie 2.1.3.4.3 sur la restriction aux molécules HLA dans le cas d'allergies à certains médicaments*).

Néanmoins, le pi-concept semble plutôt s'appliquer aux LT mémoires du fait que toutes les observations expérimentales ont été effectuées sur des patients allergiques et que la rapidité de leur activation peut être expliquée par le fait que le seuil de réactivité à l'Ag des LT mémoires est plus bas que celui des LT naïfs.

RESULTATS

Présentation du travail

Plusieurs études ont montré que des LT isolés à partir de sang périphérique de patients allergiques à la BP ou au SMX sont capables de proliférer *in vitro* en présence du médicament impliqué (Brander et al. 1995; Padovan et al. 1996; Padovan et al. 1997; Weltzien et al. 1998; Schnyder et al. 2000; Farrell et al. 2003; Castrejon et al. 2010; Meng et al. 2011).

D'autres études portant sur l'effet de médicaments comme le SMX ou l'amoxicilline sur les DC humaines, ont montré que ces médicaments sont capables d'augmenter l'expression de certaines molécules de co-stimulation telles que le CD40, le CD80 et le CD86, qui permettent aux DC de stimuler les LT (Rodriguez-Pena et al. 2006; Sanderson et al. 2007; Elsheikh et al. 2010).

Les objectifs de ce travail de recherche sont de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les allergies médicamenteuses, en particulier en étudiant l'implication des LT et en déterminant les épitopes qui leur sont présentés et en étudiant l'effet des médicaments sur l'état de maturation des DC (*cf. figure 37*). Ce travail de recherche s'est porté sur deux antibiotiques : la BP et le SMX, connus pour induire des allergies chez un nombre élevé de patients. En effet, l'incidence des allergies à la BP est évaluée à 1,9% et celle du SMX à 3,4% (Bigby et al. 1986).

Dans un premier temps, la première question posée est de savoir si chez des donneurs non-allergiques, il existe des LT spécifiques de la BP et si oui, quelle est leur fréquence (*cf. article 1 et figure 37*).

A cet effet, des LT CD4⁺ de donneurs sains non allergiques à la BP ont été stimulés par des DC autologues matures chargés avec des bio-conjugués HSA-BP. En effet, d'après la théorie de l'haptène, la BP a besoin de se fixer à une protéine pour être reconnu par le système immunitaire comme étant immunogène. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible de détecter des LT CD4⁺ spécifiques de la BP chez des donneurs non allergiques à une fréquence moyenne de 0,29 LT CD4⁺ spécifiques de la BP par million de LT CD4⁺. Les expériences réalisées sur les LT CD4⁺ naïfs et mémoires montrent une origine naïve de ces LT spécifiques de la BP.

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité identifier les peptides issus du bio-conjugués HSA-BP qui sont présentés aux LT CD4⁺ (*cf. partie 1 des résultats*

complémentaires et figure 37). L'identification des sites de fixation de la BP à la HSA est en cours de réalisation.

En parallèle, nous nous sommes posés la question de la pertinence du choix de la HSA comme protéine sérique cible de la BP et avons cherché à identifier d'autres protéines sériques capables de fixer la BP via une démarche employant la modélisation moléculaire (*cf. partie 1 des résultats complémentaires et figure 37*). Cinq protéines sériques dont la HSA ont été identifiées par modélisation et treize peptides provenant de ces cinq protéines et capables de se fixer *in silico* aux molécules HLA-DR ont été identifiés. Ces peptides seront synthétisés afin de tester leur capacité à induire la prolifération de LT provenant de patients allergiques. La synthèse de ces peptides couplés à la BP est en cours.

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'effet de la BP, du SMX et de ses métabolites (SMX-NO et SMX-NHOH) sur la maturation des DC (*cf. partie 2 des résultats complémentaire*) afin de mieux comprendre le rôle joué par les DC dans les allergies à ces médicaments. Nous avons utilisés deux modèles de DC : les Mo-DC humaines et les BM-DC murines (modèle mis en place durant mon doctorat). Les résultats de ces expériences montrent que ces médicaments ne sont pas capables d'induire une maturation partielle ou totale des DC, comme cela avait été décrit dans la littérature, excepté pour un marqueur, le CD40 dont l'expression est augmentée lorsque les Mo-DC sont stimulée avec le SMX et le SMX-NO.

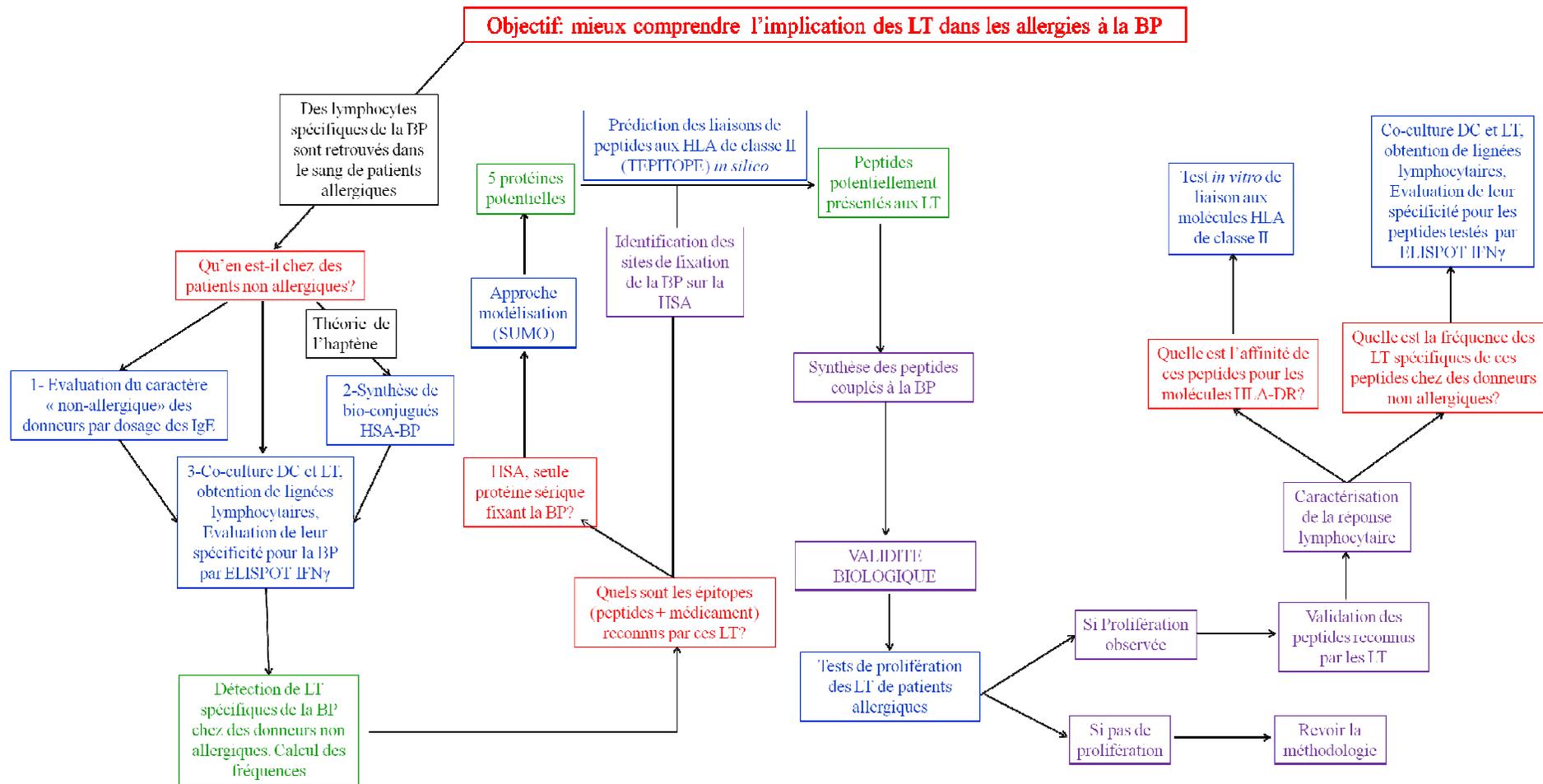


Figure 37: Démarche expérimentale concernant l'implication des LT dans les allergies médicamenteuses

(noir: données de la littérature, rouge : questions posées, bleu : méthodologie utilisée, vert : résultats obtenus, violet : expériences en cours ou à réaliser)

ARTICLE 1 :
FREQUENCE DES LT SPECIFIQUES DE LA BP
CHEZ DES DONNEURS NON ALLERGIQUES

Objectifs du travail:

Dans cette partie du projet, la question posée est de savoir si chez des donneurs non-allergiques, il est possible de détecter des LT spécifiques de la BP et de déterminer leur fréquence.

Le caractère « non allergique » des donneurs vis-à-vis de la BP a été évalué en dosant les taux d'IgE présents dans leurs sérums et en les comparant à ceux d'un groupe contrôle, qui ne présente pas d'historique médical d'allergies aux pénicillines.

D'après le principe de l'haptène, la BP a besoin de se fixer à une protéine pour former un complexe immunogène qui sera reconnu par le système immunitaire. C'est pourquoi, des bio-conjugués HSA-BP ont été synthétisés au laboratoire : un à pH physiologique, pour mimer des conditions *in vivo* et un à pH basique, afin de fixer un maximum de BP par molécule d'HSA. En effet, à pH basique, les résidus nucléophiles des lysines ne sont pas protonés, ce qui conduit à l'ouverture du noyau β -lactame et facilite la fixation de la BP sur la HSA. La HSA a été choisie comme protéine cible de la BP parce qu'il s'agit de la protéine la plus abondante dans le sérum et qu'elle est connue pour avoir des sites de fixation à la BP (Yvon et al. 1988; Yvon et al. 1989; Yvon et al. 1990; Meng et al. 2011). De plus, des bio-conjugués HSA-BP sont retrouvés dans le sang de patients allergiques (Meng et al. 2011). Ces bio-conjugués ont été caractérisés par spectrométrie de masse et western-blot, afin de s'assurer de la fixation covalente de la BP sur la HSA. Le bio-conjugué à pH basique présenterait ainsi dix-sept molécules de BP fixées par molécule d'HSA alors que le bio-conjugué à pH physiologique n'en présenterait qu'une.

Afin d'étudier les LT CD4⁺ spécifiques de la BP et de déterminer leur fréquence, nous avons développée une collaboration avec le Dr. Stéphanie Delluc (Indicia, Lyon) et le Dr. Bernard Maillère (CEA, Saclay). Nous avons utilisée leur méthodologie d'induction de lignées lymphocytaires et de détection des lignées lymphocytaires spécifiques par ELISpot IFN γ . Brièvement, les monocytes sont isolés d'un prélèvement de sang périphérique de donneurs non allergiques et différenciés en Mo-DC en présence d'IL-4 et de GM-CSF pendant quatre jours. Les LT CD4⁺ ont quant à eux été isolés par purification magnétique positive, en utilisant des billes anti-CD4⁺. Les Mo-DC sont maturées en présence de LPS et chargées avec du bio-conjugués HSA-BP synthétisé à pH basique pendant une nuit et sont ensuite mises en culture en présence des LT CD4⁺ (*cf. figure 34*). Trois restimulations des LT CD4⁺ sont réalisées avec des Mo-DC autologues chargées avec le bio-conjugué HSA-BP obtenu à pH basique et maturées en présence de LPS. Une semaine après la dernière

restimulation, un ELISpot IFN γ est réalisé et les lignées lymphocytaires spécifiques de la BP sont détectées. La fréquence des LT spécifiques de la BP est alors calculée en utilisant la loi statistique de Poisson.

Les résultats montrent qu'il est possible de détecter des LT CD4⁺ spécifiques de la BP chez des donneurs non allergiques à une fréquence moyenne de 0,29 LT CD4⁺ spécifiques de la BP par million de LT CD4⁺. De plus, des expériences sur les LT CD4⁺ CD45RA⁺ naifs et sur les LT CD4⁺ CD45RO⁺ mémoires ont été réalisées et montrent que les LT CD4⁺ spécifiques de la BP détectés chez ces donneurs non allergiques sont des LT CD4⁺ CD45RA⁺ naifs.

CD4⁺ T lymphocytes specific for Benzyl-Penicillin pre-exist in healthy donors

Cathy Nhim¹, MSc, Stéphanie Delluc², PhD, Frédéric Halgand³, PhD, Luc de Chaisemartin^{1,4}, PhD, Richard J. Weaver⁵, PhD, Nancy Claude⁵, PhD, Delphine Joseph⁶, PhD, Bernard Maillère⁷, PhD, and Marc Pallardy¹, PhD

¹ UniverSud, INSERM UMR-S 996, UFR Pharmacie, 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

²Indicia Biotechnology, 33 avenue de la Californie, 69600 Oullins, France

³Plate-forme Protéomique Biogenouest, IRSET, Inserm U1085, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France

⁴Unité Fonctionnelle d'Immunologie 'Autoimmunité et Hypersensibilités', AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France

⁵Institut de Recherches Internationales Servier, 50 rue Carnot, 92284 Suresnes, Cedex, France

⁶UMR CNRS 8076, Université Paris-Sud, UFR Pharmacie, 5, rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

⁷Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, Institut de Biologie et de Technologies de Saclay, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Gif-sur-Yvette, France

Corresponding author: Pr. Marc Pallardy, tel: 00 33 (0)1 46 83 54 92; mail: marc.pallardy@u-psud.fr, adress: INSERM UMR-S 996, Université Paris-Sud, UFR Pharmacie, 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

Source of funding: This work has been supported by the "Institut de Recherches Internationales Servier".

Abstract:

Background: Drug hypersensitivity is known to rely on a drug-specific T-cell response. Amplitude of antigen-specific T cell response is partly controlled by the size of the antigen-specific naïve CD4⁺ T-cell repertoire but estimate of this repertoire has never been investigated for allergenic drugs.

Objective: The purpose of this present study was to evaluate the frequency of benzyl-penicillin-specific CD4⁺ T lymphocytes in a population of CD4⁺ T cells from non-allergic donors, collected from an anonymous blood-bank.

Methods: Co-cultures were established with CD4⁺ T lymphocytes from non-allergic donors and mature autologous dendritic cells (DCs) loaded with benzyl-penicillin (BP) coupled to human albumin (HSA). CD4⁺ T lymphocytes were weekly stimulated with HSA-BP. The CD4⁺ T-cell response was measured using an interferon γ (IFN γ) ELISPOT assay. Frequency of BP-specific CD4⁺ T lymphocytes was then calculated using the Poisson distribution law.

Results: Results showed the presence of BP-specific CD4⁺ T lymphocytes in all tested donors irrespective of their HLA typing, with a mean frequency of 0.29 cells per million of CD4⁺ T

cells. Experiments performed on naive (CD45RA⁺) and on memory (CD45RO⁺) CD4⁺ T lymphocytes showed that these BP-specific CD4⁺ T lymphocytes belonged to the naive T-cell subpopulation.

Conclusion: This study showed for the first time the pre-existence of naive CD4⁺ T lymphocytes specific for BP in non-allergic donors.

Key messages:

Frequency of benzyl-penicillin specific CD4⁺ T-cells were quantified in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of non-allergic donors.

Capsule summary:

Pre-existing naive peripheral CD4⁺ T lymphocytes specific for benzyl-penicillin are present in the blood of non-allergic patients.

Key words: Drug allergy, Benzyl-Penicillin, T lymphocytes

Abbreviations:

BP: Benzyl-Penicillin (or Penicillin G)

DCs: Dendritic Cells

HSA: Human Serum Albumin

IFN γ : Interferon γ

PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells

INTRODUCTION

Penicillin G or Benzyl Penicillin (BP), an antibiotic of the β -lactam family, is well known to provoke immune-mediated allergic reactions in treated patients with a prevalence around 1,9% (Bigby et al. 1986). Clinical manifestations of BP allergy include weak to moderate symptoms such as urticaria, angioedema, and bullous skin eruptions but include also severe reactions like anaphylactic shock, causing the death of treated patients (Ponvert et al. 2011). Allergic reactions to BP are mainly mediated by IgE antibodies responsible for the most severe clinical manifestations. However, cutaneous manifestations, mediated by BP-specific T lymphocytes are also observed. Then, human T lymphocytes specific for BP have been isolated from peripheral blood of allergic patients (Brander et al. 1995; Padovan et al. 1996; Padovan et al. 1997; Weltzien et al. 1998). These T lymphocytes were able to proliferate *in vitro* in response to BP stimulation, demonstrating their involvement in hypersensitivity reactions (Meng et al. 2011). They however do not recognize BP in a direct manner but probably self-peptides haptenized by BP and presented by HLA class II molecules.

Due to its low molecular weight, BP is not immunogenic by itself and is therefore considered as a hapten. Indeed, BP can bind covalently to the nucleophilic primary amine function of lysine residues of targeted proteins through the opening of the β -lactam ring forming bioconjugates detected *in vivo* (Weltzien et al. 1998; Meng et al. 2011). These bioconjugates are mainly composed of benzyl penicilloyl groups that are the major antigenic determinant characterized in BP allergy (Padovan et al. 1997; Weltzien et al. 1998). BP binding to Human Serum Albumin (HSA) on different lysines have been found both *in vivo* using sera of allergic patients and *in vitro* by synthesizing bioconjugates (Yvon et al. 1988; Yvon et al. 1989; Yvon et al. 1990; Meng et al. 2011). T cells from allergic patients were also found to react to HSA-BP but the question remains how does emerge this T-cell specificity to such particular and artificial molecules.

Indeed, the CD4⁺ T-cell repertoire is mainly shaped by positive and negative thymic selections which lead to the generation of functionally CD4⁺ T cells able to recognize foreign peptides presented by HLA class II molecules (Jenkins et al. 2010). Because of the artificial nature of BP-T-cell epitopes, it is not clear whether selection of BP-specific T cells is a common phenomenon or remains limited to few donors. Selection of BP-specific T cells could be a relatively rare event accounting for the low occurrence of BP allergy. On the other hand, a large T cell repertoire found in multiple donors would underline the potential of BP to

be recognized by many donors. To shed some lights on the shaping of BP-specific T-cell repertoire, we therefore investigated the frequency of the CD4⁺ T lymphocytes specific for HSA-BP in healthy donors. We applied the cellular approach that was recently used to evaluate the CD4⁺ T cell response to therapeutic proteins with the final attempt to understand their immunogenicity in humans (Delluc et al. 2010; Delluc et al. 2011) . T lymphocytes were stimulated by weekly rounds of stimulation with autologous dendritic cells (DC) loaded with HSA-BP in order to amplify HSA-BP-specific T cells. HSA-BP-specific T cells were subsequently detected by Elispot and their frequency at the initiation of the culture was calculated using the Poisson distribution law.

METHODS

Synthesis of Human Serum Albumin– Benzyl-Penicillin bioconjugates

Bioconjugates of HSA-BP were produced by mixing 100 mg of HSA with 229 mg of BP in 6 ml of carbonate buffer (0.1M, pH=11; Sigma) during 18h at 37°C. HSA-BP was dialyzed for five days against phosphate buffer (0.07M; pH=8.1) and then, for one day against distilled water. A negative control (HSA basic) was produced using 100 mg of HSA in the same conditions, without BP. All bioconjugates were lyophilised for conservation.

Detection of BP binding to HSA using Western Blot:

Twenty micrograms of denaturated proteins was loaded onto 10% SDS-PAGE polyacrylamide gel and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, UK). The PVDF membrane was washed in deionized water and blocked in Tris/Saline/Tween (TST) buffer (138mMNaCl, 15mM Tris-HCl, 0.2% Tween 20, pH 7.6) containing 3% Bovine Serum Albumin (BSA; PAA, Pasching, Austria), for 24h at 4°C. The membrane was then washed in TST buffer and incubated with a mouse anti-penicillin monoclonal antibody (Serotec, Oxford, UK) in TST buffer and 3% BSA for 1 h. The membrane was washed in TST buffer and incubated with horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG antibody (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) in TST buffer and 3% BSA for an additional 1 h. After repeated washes, immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (EZ-ECL detection kit; Clinisciences, Nanterre, France) on Chemidoc™ XRS⁺ apparatus (Biorad, Hercules, USA), using the ImageLab™ software.

Blood collection and measurement of antibodies specific for BP

Blood was collected from the Etablissement Français du Sang (EFS, Rungis, France) from anonymous healthy donors after informed consent and following EFS guidelines. The clinical history of these donors was not known. Sera were also aliquoted and stored at -80°C until use. Specific IgE directed against BP were quantified using a fluorescence enzyme immunoassay (ImmunoCAP, Thermo-Fisher Scientific) on the ImmunoCAP 250 apparatus, as previously described (Laroche et al. 2011). Limit of IgE quantification was 0.1 kU/L.

HLA-DRB1 genotyping of healthy donors

PBMCs from healthy donors, were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hyperpaque gradients (Sigma) and DNA was extracted using the NucleoSpin Blood L kit (Macherey-

Nagel, Düren, Germany) as described by procedure manufacturer. HLA-DRB1 genotyping was performed using the All Set Gold SSP DRB1 typing kit (Invitrogen), according to the manufacturer protocol.

Generation of HSA-BP specific CD4⁺ and CD4⁺ CD45RA⁺ T-cell lines

PBMCs were isolated from the blood of healthy donors as described above. Monocyte-derived dendritic cells (DCs) were generated from plastic-adherent PBMCs after four days of culture in AIM-V medium (Invitrogen) supplemented with 1000 U/mL human recombinant IL-4 and GM-CSF (R&D Systems, Minneapolis, USA). CD4⁺ T lymphocytes were isolated from autologous PBMCs by positive selection using anti-CD4 monoclonal antibody coupled to magnetic microbeads, as recommended by the manufacturer (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Naive CD4⁺ CD45RA⁺ and memory CD4⁺ CD45RO⁺ T lymphocytes were isolated from autologous PBMCs by negative selection using specific microbeads (Miltenyi Biotech).

Percentage of CD4⁺, CD4⁺ CD45RA⁺ and CD4⁺ CD45RO⁺ positive cells was evaluated by flow cytometry. Cells were resuspended at 2.5×10^5 cells in PBS with 2% Fetal Bovine Serum and incubated with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies. After one wash in PBS, cells were fixed in 1% paraformaldehyde diluted in PBS. The following monoclonal antibodies were used: CD4-FITC, CD8-PE, CD45RA-PE, CD45RO-PE (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) and appropriate isotopes controls were also used to determinate the non-specific staining. Cells were analyzed on a FACSCalibur cell analyzer using the CellQuest software (Becton Dickinson) to determine the percentage of CD4⁺ T cells, naive CD4⁺ CD45RA⁺ T cells and memory CD4⁺ CD45RO⁺ T cells.

For T-cell stimulation, DCs were loaded with 10 μ M of HSA-BP bioconjugate or with KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin; Thermo-Fisher Scientific), as a positive control. After DC maturation using 1 μ g/mL of LPS (Sigma) overnight, $10^4 - 3 \times 10^4$ loaded DCs were then added to $10^5 - 3 \times 10^5$ autologous CD4⁺ T lymphocytes per round-bottom microwell containing 200 μ l Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM) supplemented by 10% human AB serum (Lonza, Basel, Switzerland), 1000 U/mL of rh-IL-6 and 10 ng/mL rh-IL-12 (R&D Systems). Co-cultures were incubated at 37°C in 5% CO₂. CD4⁺ T lymphocytes were restimulated on day 7, 14, and 21, with fresh autologous DCs loaded with the KLH or HSA-BP bioconjugate, and with 10 U/mL of rh-IL-2 and 5 ng/mL rh-IL-7 (R&D Systems). Specificity of the CD4 T-cell lines was investigated using IFN γ ELISPOT assay at day 27.

IFN- γ ELISPOT Assay

Nitrocellulose plates (96-well; Millipore, Bedford, MA, USA) were coated with capture mouse IgG1 anti-human IFN- γ monoclonal antibody (1-D1K; Mabtech, Nacka, Sweden) and saturated with IMDM, supplemented with 10% of AB serum. After 16 h of co-culture of CD4⁺ T cells and DCs loaded with KLH or HSA-BP conjugates, biotinylated mouse IgG1 anti-human IFN- γ monoclonal antibody (7B6-1; Mabtech) was added for 2 h. Backgrounds were the following: unloaded DCs or DCs loaded with native HSA or HSA treated at basic pH. Spots were revealed by the addition of extravidin conjugate and BCIP substrate (Sigma Aldrich). Spots were counted with a computer-assisted video image analyzer (AID, Strassberg, Germany). Only T-cell lines with a spot count of minimum 30 spots was analyzed.

Statistics

CD4⁺ T cells frequency was estimated using the Poisson distribution according to the following formula:

$$Frequency = -Ln \left[\frac{\text{Number of negative T - cell lines / Total number of T - cell lines tested}}{\text{number of CD4 + T cells per well}} \right]$$

RESULTS

Donor characterization

Blood was collected from ten anonymous healthy donors after their informed consent. The levels of specific IgE against BP were quantified to determine whether the studied donors were recently immunized to BP or not (*Table I*). Moreover, five other volunteers, who did not experienced any allergic medical history with penicillins, constituted the non-allergic control group. Results showed that no anti-BP-specific IgE could be detected in the ten studied donors nor in the control group. Then, the ten studied anonymous healthy donors were thus considered as non-sensitized to BP, as far as specific IgE detection is concerned.

HLA-DRB1 genotyping was performed for these ten studied donors. Results showed that these ten donors harboured different HLA-DRB1 allotypes. The seven most frequent HLA-DRB1 allotypes of the Caucasian population: HLA-DR01, DR03, DR04, DR07, DR11, DR13 and DR15, were all present in our panel of donors (*Table I*).

Characterisation of the bioconjugates HSA-BP

We synthesized HSA-BP bioconjugates since HSA is the most abundant protein found in the serum and since HSA-BP bioconjugates have been found in patient's sera (Yvon et al. 1988; Yvon et al. 1989; Yvon et al. 1990; Meng et al. 2011). At basic pH, nucleophilic lysine residues are not protonated leading to the opening of the β -lactam ring and facilitating the binding of the penicilloyl group to HSA.

To detect the presence of BP covalently bound to HSA, we then performed western blotting experiment on our HSA-BP bioconjugates using a mouse anti-penicillin monoclonal antibody (*figure 1*). Immunoreactive bands were detected for BP-HSA bioconjugates, revealing the presence of BP covalently bound to HSA. No immunoreactive bands were detected for the controls: HSA obtained at neutral pH and native HSA. To confirm this result, we also performed MALDI-TOF mass spectrometry to determine the number of BP molecules bound to HSA. Accordingly, mass spectrometry profiles showed an average of seventeen BP molecules per HSA molecule in HSA-BP bioconjugate (*data not shown*).

Detection of BP-specific CD4⁺ T-cell lines

BP CD4⁺ T-cell lines from healthy donors were generated after three weekly repeated stimulations by autologous mature DCs loaded with HSA-BP bioconjugates. IFN γ Elispot assay was then performed to detect CD4⁺ T-cell lines specific for HSA-BP. CD4⁺ T-cell line

was considered positive when the number of spots obtained in the presence of DCs loaded with HSA-BP was at least twice the number of spots obtained with the controls (unloaded DCs, DCs loaded with native HSA and DCs loaded with HSA treated at basic pH without BP). Non-BP-specific CD4⁺ T cell lines did not produce IFN- γ or produce IFN- γ both in controls and when DCs were loaded with HSA-BP. Results from donor 917 are shown as a representative result for the ten studied donors (*figure 2*). For donor 917, three T-cell lines (number 12, 14 and 24) were found positive for HSA-BP bioconjugates among the forty-eight T-cell lines tested. Non-BP-specific CD4⁺ T-cell lines were not shown.

For all the donors tested, KLH T-cell lines were generated as a positive control. Indeed, these KLH sensitized CD4⁺ T-cell lines were able to secrete specifically IFN γ in the presence of autologous DC loaded with KLH compared to background (unloaded DC). Results from donor 917 are shown as an example of a representative result from the ten studied donors (*figure 2*).

Quantification of the frequency of BP-specific CD4⁺ T lymphocytes found in PBMC

Frequency of BP-specific CD4⁺ T lymphocytes was determined using the Poisson distribution law, for the ten studied donors (*figure 3*). CD4⁺ T lymphocytes specific for BP were detected for all donors tested, excepted for donor 982, which was the only non-responding donor found. Frequency of CD4⁺ T lymphocytes specific for BP varied depending on the donor from 0 to 0.53 BP-specific CD4⁺ T lymphocytes per million of CD4⁺ T cells corresponding to a mean value of 0.29.

BP-specific CD4⁺ T-lymphocytes are from the naive compartment

To determine if BP-specific CD4⁺ T lymphocytes involved in the immune response were naive or memory T lymphocytes, these two subsets of CD4 T cells were studied.

Naive CD4⁺ T lymphocytes characterized by the expression of CD45RA were isolated from the PBMC of five donors from the ten healthy studied. BP CD4⁺ CD45RA⁺ T-cell lines were generated using the same methodology as described above for the generation of BP CD4⁺ T-cell lines. KLH CD4⁺ CD45RA⁺ T-cell lines were also generated. All the *in vitro* sensitized KLH naive T-cell lines were able to secrete IFN- γ specifically in presence of DC loaded with KLH. This result was obtained for all the five studied donors (data not shown).

Results from the five donors tested showed that at least two to nine CD45RA⁺ CD4⁺ T-cell lines out of thirty-six to ninety-six T-cell lines tested were able to secrete IFN γ in the presence of DC loaded with HSA-BP bioconjugates (*numbers indicated in brackets figure 4*).

Only one donor (number 966) was negative with no BP-specific naive CD4⁺ T-cell lines detected.

Frequency of BP-specific naive CD4⁺ T lymphocytes was then calculated for each donor tested using the Poisson distribution law (*figure 4A*). CD4⁺ CD45RA⁺ T-cell lines specific for BP were detected in four donors among the five tested. The calculated frequency varied from 0 to 2.23 BP-specific naive T lymphocytes per million of naive CD4⁺ T cells corresponding to a mean value of 0.69 BP-specific naive CD4⁺ CD45RA⁺ T cells per million of naive CD4⁺ CD45RA⁺ T cells for the five studied donors.

To confirm that BP-specific T-cells were originated from the naive compartment, memory CD4⁺ T lymphocytes characterized by the expression of CD45RO were also isolated from PBMCs of two non-allergic donors from the ten studied. BP CD4⁺ CD45RO⁺ T-cell lines were generated using the same methodology as described above for the generation of BP CD4⁺ T-cell lines. For the two studied donors (donors 981 and 982), for which one hundred and thirty-six T-cell lines were generated respectively, no memory CD4⁺ T-cell lines were detected (*figure 4B*). Interestingly, for these two donors, BP-specific CD4⁺ T cells were found when using CD4⁺ T lymphocytes from PBMCs or from only the naive CD4⁺ CD45RA⁺ sub-population.

DISCUSSION

BP is one of the major β -lactam antibiotics inducing allergies with a prevalence of 1.9% in treated patients (Bigby et al. 1986). Human CD4⁺ T lymphocytes specific for BP and isolated from peripheral blood of allergic patients were shown to proliferate *in vitro* in response to BP stimulation, demonstrating the presence of BP-specific T cells (Brander et al. 1995; Padovan et al. 1996; Weltzien et al. 1998). The objective of this study was to analyse and identify the presence of CD4⁺ T cells specific for BP in healthy donors.

In this study, CD4⁺ T cells were harvested from non-allergic donors to evaluate the capacity of BP bound by seric proteins to prime naive CD4⁺ T cells and to reproduce the *in vivo* induction of an immune response by BP-haptenized proteins. Measurement of pre-existing anti-BP-specific IgE for each donor was performed to confirm their non-recent sensitized status (Torres et al. 1999; Blanca et al. 2001; Torres et al. 2003; Blanca et al. 2009). HLA class II polymorphism was also taken into account; the ten donors tested harboured different HLA-DRB1 allotypes and the most frequent HLA-DRB1 allotypes in the Caucasian population were represented in our donors' panel.

In vitro amplification of BP-specific CD4⁺ T lymphocytes was performed using autologous DCs previously loaded with HSA-BP bioconjugates. T-cell frequency determination does not require identifying T-cell epitopes and HLA class II molecules, in contrast to techniques using HLA class II multimers (Hataye et al. 2006; Moon et al. 2007). Indeed, by using antigen-presenting cell (APC) such as DCs (Delluc et al. 2010; Delluc et al. 2011) or monocytes (Geiger et al. 2009), the antigen tested is digested into peptides, presented through their HLA molecules to CD4⁺ T cells. Another approach based on polyclonal amplification shares with our approach this advantage (Geiger et al. 2009). Our methodology has been previously used to determine the frequency of CD4⁺ T cells specific for different therapeutic antibodies (Delluc et al. 2011) and for recombinant erythropoietin (Delluc et al. 2010).

In our study, we used HSA as the BP carrier protein. HSA is the most abundant protein in the serum and past studies have shown the presence of HSA-BP bioconjugates in the serum of BP-allergic patients (Yvon et al. 1988; Yvon et al. 1989; Yvon et al. 1990; Meng et al. 2011). Moreover, HSA-BP bioconjugates have been found to activate BP-specific T cells from allergic patients (Brander et al. 1995). Our HSA-BP bioconjugate displayed seventeen BP molecules covalently bound per one HSA molecule, corresponding to a modification rate observed *in vivo*. Indeed, Meng et al. (Meng et al. 2011) found fourteen BP

binding sites on HSA purified from a pool of plasma samples taken from BP treated patients. In this latter study, a HSA-BP bioconjugate was also synthesized at neutral pH and displayed fourteen BP molecules bound per one HSA molecule (Meng et al. 2011). For other β -lactam antibiotics such as flucloxacillin or piperacillin, drug-HSA bioconjugates have also been found in the serum of treated patients (Jenkins et al. 2009; Whitaker et al. 2011).

Our results showed for the first time the presence of naive BP-specific CD4⁺ T cells in non-allergic donors. The mean frequency of BP-specific CD4⁺ T cell was 0.29 BP-specific CD4⁺ T cells per million of PBMC. This frequency was in the same range as those found for Rituximab, Infliximab and Adalimumab (Delluc et al. 2011). These three therapeutic antibodies have been described to induce the production of ADA (Anti-Drug-Antibody) (Baert et al. 2003; Bendtzen et al. 2006; Bartelds et al. 2007; Bender et al. 2007; Radstake et al. 2009). The frequencies were 0.35; 0.33 and 0.20 of specific CD4⁺ T cells per million of CD4⁺ T cells for Rituximab, Infliximab and Adalimumab respectively. This work on the quantification of pre-existing T cells specific for therapeutic antibodies also showed a correlation between the size of the pre-existing naive CD4⁺ T-cell repertoire specific for therapeutic antibodies, evaluated by the frequency of naive specific CD4⁺ T cells, and their potential immunogenicity (Delluc et al. 2011).

In this study, we confirmed that BP-specific CD4⁺ T cells were naive T cells in the non-allergic donors tested. When experiments were performed on naive CD4⁺ T cells, BP-specific naive CD4⁺ T cells were detected at a mean frequency of 0.69 BP-specific naive CD4⁺ T cells per million of PBMC whereas no BP-specific memory CD4⁺ T cells were detected when experiments were performed on memory CD4⁺ T cells in non-allergic donors. Moreover, for donor 982, no CD4⁺ BP-specific T cell-lines were detected among the thirty-seven CD4⁺ T-cell lines tested when using all CD4⁺ T lymphocytes (*figure 3*) whereas two naive CD4⁺ CD45RA⁺ BP-specific T cell-lines were detected among the thirty-six naive CD4⁺ CD45RA⁺ T-cell lines tested for this donor. This result suggested that the naive T cells subset was enriched with BP-specific T lymphocytes compared to the total CD4⁺ T cells population. Previous works performed on patients allergic to amoxicillin showed a frequency varying from 30 to 125 drug-specific T lymphocytes per million of PBMCs (Rozieres et al. 2009). These drug-memory T cells were a consequence of an important amplification of pre-existing naive T cells specific for BP with an amplification factor of about 40 to 180.

In our study, BP-specific CD4⁺ or CD4⁺ CD4RA⁺ T cells were detected in all the non-allergic donors tested. This observation strongly suggests that most people can be sensitized

to penicillins but only a few individuals show allergic response due to additional factors besides the expression of BP-specific CD4⁺ or CD4⁺ CD4RA⁺ T cells.

In conclusion, our study shows for the first time a quantification of the frequency of pre-existing naive CD4⁺ T lymphocytes specific for BP in non-allergic donors, using an *in vitro* T-cell assay to evaluate the potential immunogenicity of drugs and demonstrated the capacity of HSA-BP to be recognized by multiple donors, irrespective of their HLA typing.

Acknowledgment:

We thank Dr. Camille Migdal, Dr. Sylvie Chollet-Martin and Dr. Pascal Nicaise-Roland for technical and scientific support on the measurement of anti-BP antibodies.

REFERENCES

1. Bigby, M., et al., *Drug-induced cutaneous reactions. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program on 15,438 consecutive inpatients, 1975 to 1982.* *Jama*, 1986. **256**(24): p. 3358-63.
2. Ponvert, 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**(4): p. 411-8.
3. Weltzien, H.U. and E. Padovan, *Molecular features of penicillin allergy.* *J Invest Dermatol*, 1998. **110**(3): p. 203-6.
4. Padovan, E., et al., *Penicilloyl peptides are recognized as T cell antigenic determinants in penicillin allergy.* *Eur J Immunol*, 1997. **27**(6): p. 1303-7.
5. Padovan, E., et al., *T cell recognition of penicillin G: structural features determining antigenic specificity.* *Eur J Immunol*, 1996. **26**(1): p. 42-8.
6. Brander, C., et al., *Heterogeneous T cell responses to beta-lactam-modified self-structures are observed in penicillin-allergic individuals.* *J Immunol*, 1995. **155**(5): p. 2670-8.
7. Meng, X., et al., *Direct evidence for the formation of diastereoisomeric benzylpenicilloyl haptens from benzylpenicillin and benzylpenicillic acid in patients.* *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. **338**(3): p. 841-9.
8. Yvon, M. and J.M. Wal, *Identification of lysine residue 199 of human serum albumin as a binding site for benzylpenicilloyl groups.* *FEBS Lett*, 1988. **239**(2): p. 237-40.
9. Yvon, M., P. Anglade, and J.M. Wal, *Binding of benzyl penicilloyl to human serum albumin. Evidence for a highly reactive region at the junction of domains 1 and 2 of the albumin molecule.* *FEBS Lett*, 1989. **247**(2): p. 273-8.
10. Yvon, M., P. Anglade, and J.M. Wal, *Identification of the binding sites of benzyl penicilloyl, the allergenic metabolite of penicillin, on the serum albumin molecule.* *FEBS Lett*, 1990. **263**(2): p. 237-40.
11. Jenkins, M.K., et al., *On the composition of the preimmune repertoire of T cells specific for Peptide-major histocompatibility complex ligands.* *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 275-94.
12. Delluc, S., G. Ravot, and B. Maillere, *Quantitative analysis of the CD4 T-cell repertoire specific to therapeutic antibodies in healthy donors.* *Faseb J*, 2011. **25**(6): p. 2040-8.
13. Delluc, S., G. Ravot, and B. Maillere, *Quantification of the preexisting CD4 T-cell repertoire specific for human erythropoietin reveals its immunogenicity potential.* *Blood*, 2010. **116**(22): p. 4542-5.
14. Laroche, D., et al., *Evaluation of a new routine diagnostic test for immunoglobulin e sensitization to neuromuscular blocking agents.* *Anesthesiology*, 2011. **114**(1): p. 91-7.
15. Torres, M.J., et al., *Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics.* *Allergy*, 2003. **58**(10): p. 961-72.
16. Torres, M.J., et al., *Immunologic response to different determinants of benzylpenicillin, amoxicillin, and ampicillin. Comparison between urticaria and anaphylactic shock.* *Allergy*, 1999. **54**(9): p. 936-43.
17. Blanca, M., et al., *Clinical evaluation of Pharmacia CAP System RAST FEIA amoxicilloyl and benzylpenicilloyl in patients with penicillin allergy.* *Allergy*, 2001. **56**(9): p. 862-70.

18. Blanca, M., et al., *Update on the evaluation of hypersensitivity reactions to betalactams*. Allergy, 2009. **64**(2): p. 183-93.
19. Moon, J.J., et al., *Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude*. Immunity, 2007. **27**(2): p. 203-13.
20. Hataye, J., et al., *Naive and memory CD4+ T cell survival controlled by clonal abundance*. Science, 2006. **312**(5770): p. 114-6.
21. Geiger, R., et al., *Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1525-34.
22. Jenkins, R.E., et al., *Characterisation of flucloxacillin and 5-hydroxymethyl flucloxacillin haptenated HSA in vitro and in vivo*. Proteomics Clin Appl, 2009. **3**(6): p. 720-9.
23. Whitaker, P., et al., *Mass spectrometric characterization of circulating and functional antigens derived from piperacillin in patients with cystic fibrosis*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 200-11.
24. Bendtzen, K., et al., *Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(12): p. 3782-9.
25. Radstake, T.R., et al., *Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(11): p. 1739-45.
26. Baert, F., et al., *Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease*. N Engl J Med, 2003. **348**(7): p. 601-8.
27. Bartelds, G.M., et al., *Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(7): p. 921-6.
28. Bender, N.K., et al., *Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients*. Rheumatol Int, 2007. **27**(3): p. 269-74.
29. Rozieres, A., et al., *Detection and quantification of drug-specific T cells in penicillin allergy*. Allergy, 2009. **64**(4): p. 534-42.

TABLE LEGEND

Table I: Donors' HLA-DR genotype and anti-BP antibodies: HLA-DRB1 genotype was performed using the All Set Gold SSP DRB1 typing kit, from Invitrogen. IgE specific to BP were measured in the sera of each donor using the ImmunoCap Test from ThermoFisher. (ND: Not determined)

TABLE

Donor numbers	IgE (kU/L)	HLA-DRB1 genotyping
874	< 0,1	DR01; DR07
887	< 0,1	DR01; DR11
903	< 0,1	DR13; DR14
904	< 0,1	DR03; DR10
917	< 0,1	DR04; DR15
919	< 0,1	DR07; DR13
966	< 0,1	DR03; DR04
967	< 0,1	DR15; DR16
981	< 0,1	DR11; DR15
982	< 0,1	DR03; DR13
Non-allergic control group (n=5)	< 0,1	ND
	< 0,1	
	< 0,1	
	< 0,1	
	< 0,1	

Table I

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Detection of BP binding to HSA by Western Blot

Twenty micrograms of HSA-BP bioconjugates or HAS treated at basic pH were loaded onto 10% SDS-PAGE polyacrylamide gel and transferred onto a PVDF membrane. BP binding to HSA was detected using a mouse anti-penicillin monoclonal antibody. (MW: Molecular Weight)

Figure 2: Generation of CD4⁺ T-cell lines specific for HSA-BP and for KLH (positive control). **A.** IFN- γ Elispot response of CD4⁺ T-cells from donor 917 stimulated with unloaded DC or DC loaded with HSA or HSA-BP bioconjugates or KLH. **B.** Spots number for each CD4⁺ T-cell lines specific for HSA-BP or for KLH.

Figure 3: Frequency of human CD4⁺ T lymphocytes specific for HSA-BP. Frequency of T-cells specific for BP was calculated for each donor using the Poisson distribution law (*see material and methods*). For the ten donors tested, the number of T-cell lines specific for HSA-BP, out of the number of T-cell lines tested is indicated in brackets.

Figure 4: Naive CD4⁺ CD45RA⁺ T-cell lines specific for HSA-BP. **A.** Frequency of CD4⁺ CD45RA⁺ T cells (five donors tested). **B.** Frequency of memory CD4⁺ CD45RO⁺ T cells (two donors tested). The number of HSA-BP specific T-cell lines out of the number of T-cell lines tested is indicated in brackets.

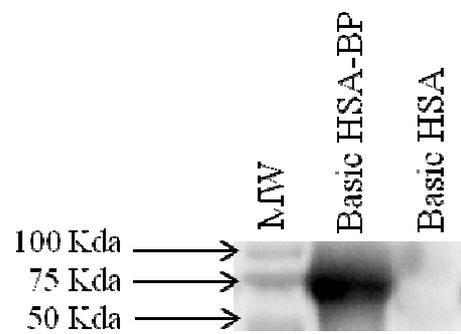
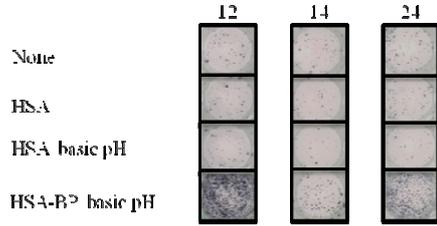


Figure 1

A CD4+ T-cell lines specific for HSA-BP from donor 917



CD4+ T-cell lines specific for KLH from donor 917

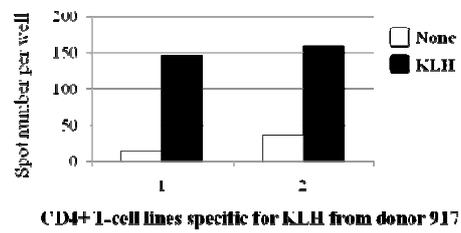
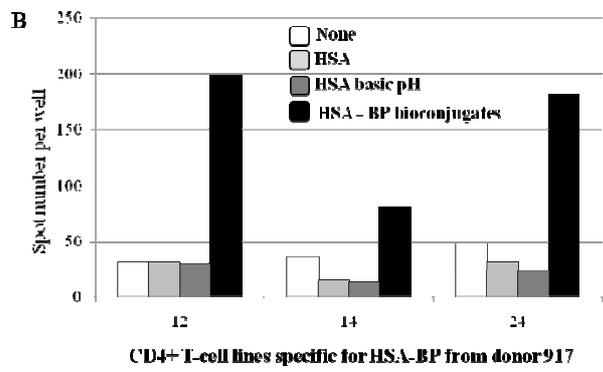
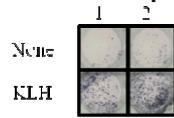


Figure 2

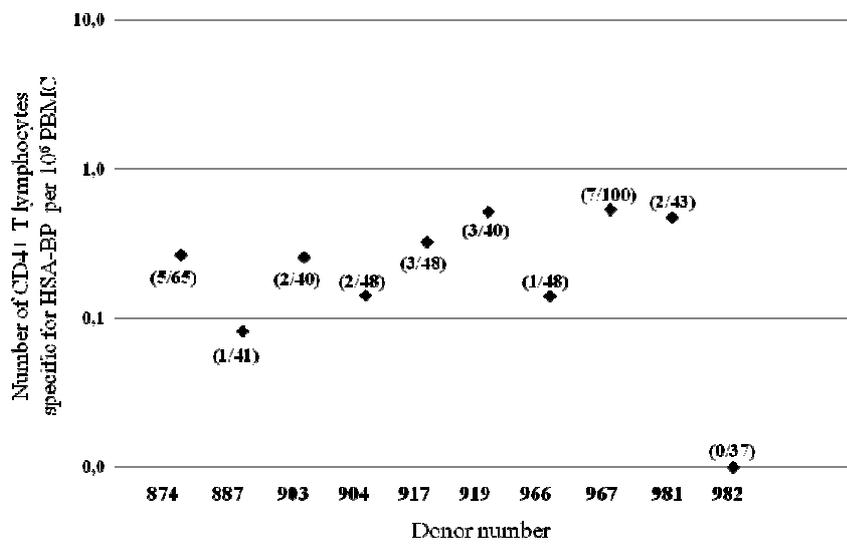
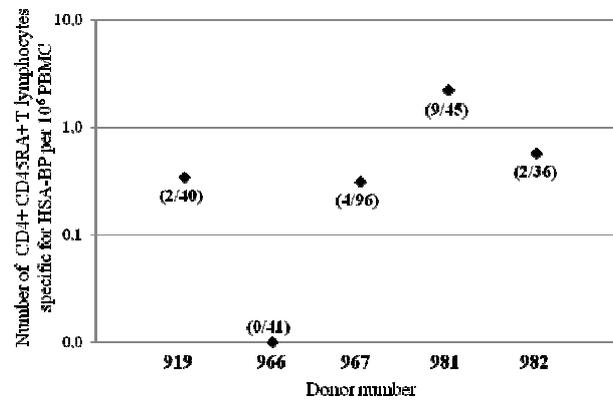


Figure 3

A Frequency of naive CD4+ CD45RA+ T lymphocytes specific for HSA-BP



B Frequency of memory CD4+ CD45RO+ T lymphocytes specific for HSA-BP

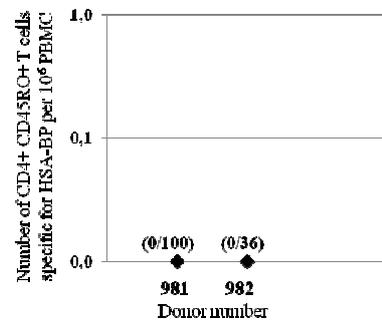


Figure 4

RESULTATS

✓ **IDENTIFICATION DES PEPTIDES HAPTENISES DE LA HSA POTENTIELLEMENT PRESENTES AUX LYMPHOCYTES T**

✓ **IDENTIFICATION DES PROTEINES DU SERUM FIXANT LA BP PAR MODELISATION ET DES PEPTIDES POTENTIELLEMENT PRESENTES AUX LYMPHOCYTES**

Introduction

Dans la première partie du projet, nous avons montré qu'il était possible de détecter des LT CD4⁺ spécifiques de bio-conjugués HSA-BP, chez des donneurs sains non allergiques. La HSA a été choisie comme protéine cible de la BP parce qu'il s'agit de la protéine la plus abondante dans le sérum et parce qu'il a été montré *in vitro*, via la synthèse de bio-conjugués, et *in vivo*, en analysant les sera de patients allergiques à la BP, que la BP est capable de se fixer à la HSA au niveau de certaines de ces lysines (Yvon et al. 1988; Yvon et al. 1989; Yvon et al. 1990; Meng et al. 2011). Néanmoins, il est tout à fait probable que la HSA ne soit pas l'unique protéine sur laquelle se fixe la BP et que d'autres protéines du sérum soient impliquées.

L'objectif de cette deuxième partie du projet est dans un premier temps, d'identifier les peptides dérivant de nos bio-conjugués HSA-BP qui pourraient être présentés aux LT CD4⁺ et dans un deuxième temps, d'identifier d'autres protéines sériques fixant la BP et les peptides dérivant de ces protéines sériques fixant la BP, qui sont potentiellement présentés aux LT CD4⁺, dans le cas des allergies à la BP.

Concernant le premier objectif de ce projet, des analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées sur nos bio-conjugués HSA-BP afin de déterminer les sites de fixation de la BP sur la HSA. A partir de ces sites de fixation, une approche utilisant TEPITOPE, un logiciel de prédiction de liaison des peptides aux molécules HLA de classe II, permettra d'identifier des peptides potentiels, qui pourraient être présentés aux LT CD4⁺.

Concernant le deuxième objectif de ce projet, une approche utilisant la modélisation a été développée : l'utilisation du logiciel de modélisation SUMO nous a ainsi permis de déterminer cinq protéines sériques potentiellement ciblées par la BP. Des peptides provenant de ces cinq protéines ont été choisis en utilisant le logiciel TEPITOPE et une dizaine de peptides qui pourraient potentiellement être présentés aux LT CD4⁺ ont été identifiés.

Le défi a alors été de synthétiser ces peptides avec la BP couplée de manière covalente au niveau de l'acide aminé de fixation, identifié par modélisation.

L'implication de ces peptides dans les allergies à la BP sera ensuite démontrée en étudiant la réponse lymphocytaire secondaire par des tests de prolifération sur des PBMC de patients allergiques à la BP, en présence de ces peptides. Des tests de liaison aux molécules HLA de classe II les plus représentées dans la population caucasienne seront aussi réalisés avec les peptides ayant induit la prolifération des LT de patients allergiques à la BP. Ces tests de liaison aux molécules HLA permettront ainsi de connaître l'affinité de ces peptides pour

différentes molécules HLA de classe II. Ces résultats pourront également être comparés aux résultats obtenus avec le logiciel de prédiction TEPITOPE. Enfin, une quantification de la fréquence des LT spécifiques de ces peptides sera réalisée chez des donneurs sains non allergiques en utilisant une méthodologie similaire à celle employée lors de la détermination des fréquences de LT spécifiques au bio-conjugué HSA-BP.

1.1 Identification des sites de fixation de la BP sur la HSA :

L'identification des sites de fixation de la BP sur la HSA a été réalisée en collaboration avec le Dr. Frédéric Halgand (Plate-forme Protéomique Biogenouest, IRSET, INSERM U1085).

Dans un premier temps, les deux bio-conjugués HSA-BP, synthétisés à pH physiologique et à pH basique ont été analysés en spectrométrie de masse (MALDI). Des solutions de ces bio-conjugués et des contrôles (HSA, HSA pH physiologique, HSA pH basique) à 10 μ M ont été préparées dans de l'acétate d'ammonium 25 mM. Les échantillons sont mélangés à volume égal à de la matrice MALDI (acide sinapinique à 10 mg/ml) et déposés, selon la méthode de la goutte sèche, sur une plaque pour les analyser en spectrométrie de masse (MALDI). Les spectres montrent un incrément de masse de 567 Da pour le bio-conjugué HSA-BP en pH physiologique et un incrément de masse de 5879 Da pour le bio-conjugué HSA-BP en pH basique. La BP ayant une masse molaire de 334 Da, le bio-conjugué HSA-BP à pH physiologique présenterait donc un site de fixation alors que le bio-conjugué HSA-BP à pH basique présenterait dix-sept sites de fixation.

Dans un deuxième temps, afin d'identifier ces sites de fixation, des digestions enzymatiques ont été réalisées et une cartographie des peptides obtenus est réalisée par spectrométrie en masse (MALDI). Pour cela, les bio-conjugués sont d'abord réduits par le DiThioThréitol (DTT) et l'alkylation est réalisée en utilisant de l'iodoacétamide. Les échantillons sont ensuite digérés par la protéase choisie. Plusieurs protéases ont été testées :

- Trypsine (coupure après les lysines et les arginines)
- Endoprotéase Glu C (coupure après les acides glutamiques)
- Endoprotéase Arg C (coupure après les arginines)

Après digestion, les échantillons sont dessalés sur phase Poros. Ils sont ensuite mélangés à volume égal à de la matrice MALDI et déposés sur une plaque MALDI selon la méthode de la goutte sèche. Les spectres de masse sont dépouillés manuellement.

L'attribution des séquences peptidiques pour les pics visualisés sur les spectres de masse est réalisée par comparaison des masses expérimentales aux masses théoriques obtenues par digestion *in silico* de la séquence de la HSA à l'aide du logiciel PeptideMass présent sur le site web d'Expasy et pour l'enzyme choisie. La modification par la BP correspond à des incréments de masse de 334,4 Da.

Pour chacune des digestions, le recouvrement global de la HSA est de l'ordre de 60% mais avec des zones de recouvrements complémentaires entre les trois digestions. L'analyse des spectres obtenus permet de déterminer la localisation des sites de fixation potentiels de la BP sur la HSA (*cf. tableau 6*)

Protéase	Trypsine	Endoprotéase Glu C	Endoprotéase Arg C
HSA-BP pH physiologique	Q404	K262	485-585 : 1 modification
HSA-BP pH basique	K136 ou K137 / K159 / K212 / K414 / K519	K262 / K271 / K281 / K313 / R336 ou 337 / K372 / K444	429-445 : 2 à 3 modifications 446-472 : 2 à 3 modifications 446-484 : 1 modification

Tableau 6: Sites de fixation putatifs de la BP à la HSA
(Q :Glutamine ; K : Lysine; R :Arginine)

La digestion par la trypsine met en évidence pour le bio-conjugué HSA-BP synthétisé à pH physiologique, un site de fixation potentiel au niveau de la glutamine 404 de la HSA alors que la digestion par l'endoprotéase Glu C révèle un autre site de fixation potentiel au niveau de la lysine 262. Concernant le bio-conjugué HSA-BP synthétisé à pH basique, la digestion par la trypsine met en évidence cinq sites de fixation potentiels, uniquement au niveau de lysines (lysine 136 ou 137, lysine 159, lysine 212, lysine 414 et lysine 519) et la digestion par l'endoprotéase Glu C révèle sept autres sites de fixation potentiels au niveau de lysines (lysines 262, lysine 271, lysine 281, lysine 313, lysine 372 et lysine 444) et au niveau d'une arginine (arginine 336 ou 337). Dans la littérature, ni la glutamine ni l'arginine n'ont été décrits comme pouvant fixer la BP. Chimiquement, la BP ne peut pas se fixer à la glutamine mais peut se fixer à l'arginine. La digestion à l'endoprotéase Arg C génère des fragments de grande taille, ce qui empêche de proposer la localisation précise de la BP.

En plus de ces digestions enzymatiques, des coupures au CNBr ont été réalisées mais ont conduit à la précipitation des peptides, empêchant l'analyse en spectrométrie de masse. La coupure au CNBr a donc été abandonnée.

Ainsi, pour les trois digestions, différents sites putatifs de fixation de la BP à la HSA ont été identifiés. Malheureusement aucun consensus quant à la localisation des sites n'existe entre les trois protéases. Ce résultat peut suggérer une hétérogénéité du marquage. En effet, chacun des échantillons ayant été digéré par les trois protéases différentes, un, voire deux sites de fixation consensuels pour un même échantillon, auraient dû être identifiés avec les trois digestions, ce qui n'est pas le cas. De ce fait, ce résultat peut suggérer que la fixation de la BP à la HSA n'est pas homogène d'une molécule d'HSA à une autre. Une autre explication possible pourrait être que les pics putatifs porteurs des modifications identifiées correspondraient non pas à des peptides théoriquement issus des clivages par les protéases mais à des coupures aspécifiques. Cependant, en ce qui concerne la digestion par la trypsine, il semble que les peptides porteurs d'un groupement BP correspondent à des fragments avec des « miscleavage ». Les lysines correspondantes étant modifiées par la BP, la trypsine ne reconnaît alors pas le site de coupure de l'endoprotéase. Il est bien entendu que les sites potentiels identifiés ne sont que putatifs et doivent être identifiés par spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) afin de vérifier leur présence.

Ainsi, pour le moment seuls ces sites putatifs ont été identifiés et seront donc confirmés par spectrométrie de masse en tandem. De nouveaux lots de bio-conjugués ont également été synthétisés afin de vérifier la reproductibilité de la fixation de la BP à la HSA. Et enfin, les peptides digérés avec l'endoprotéase Arg C seront digérés par la trypsine et analysés par spectrométrie de masse afin de déterminer plus précisément les sites de modification potentiels.

Une fois les sites de modification identifiés, les peptides potentiellement présentés aux LT CD4⁺ seront déterminés en utilisant le logiciel Tepitope (*cf. sous-partie 1.3*).

1.2 Identification des protéines sériques potentielles sur lesquelles se fixerait la BP par une approche de modélisation :

Ce travail de modélisation a été réalisé par le Dr. Julie-Anne Chemelle et le Dr. Raphaël Terreux (IBCP : Institute of Biology and Chemistry of Proteins, Lyon), en utilisant le logiciel SuMO pour « Surfing Molecules ». Ce logiciel a été développé en 2000 à l'IBCP et permet de comparer et de déterminer des similarités entre la surface d'une protéine

donnée, décrite par des « objets SuMO », à celle d'autres protéines présentes dans des bases de données, telles que la base de données de protéines sériques humaines (Human Serum Data Bank) ou la base de données de protéines (Protein Data Bank). En effet, la surface des protéines est décrite par des « objets SuMO », qui prend en compte deux paramètres :

- la nature de la fonction chimique, comme par exemple, la fonction hydroxyl, la fonction thiol, la fonction amide, la présence d'un groupement hydrophobe aromatique etc...., correspondant au type d'objet. Il existe dix types d'objets « SuMo ».
- la position de la fonction chimique, correspondant à la localisation de l'objet.

Le logiciel SuMo effectue alors des comparaisons de triplets d'objets contigus provenant de la surface de la protéine étudiée et de celles des protéines présentes dans la base de données testée. Le logiciel SuMO fournit ensuite un score, qui traduit la similarité des objets, en terme de nature et de position, présents sur la surface des protéines.

Ainsi, dans le cadre de notre étude, les PBP (Penicillin-Binding Proteins), protéines bactériennes cibles des β -lactames, ont constitué les protéines de référence. En effet, les PBP sont des enzymes bactériennes qui permettent la synthèse du peptidoglycane et sur lesquelles se fixe la BP. La surface de ces PBP a été décrite avec des « objets SuMO » et a été comparée à celle de toutes les protéines présentes dans la base de données Human Serum Data Bank, constituées de 56 000 modèles, en utilisant le logiciel SuMO.

L'analyse des résultats obtenus avec le logiciel SuMO a permis d'identifier cinq protéines sériques humaines susceptibles de fixer la BP et les sites potentiels de fixation de la BP sur ces cinq protéines (*indiqués en rouge*):

- **la diméthylglycine déhydrogénase (Lysine 481 et Tyrosine 695)**
- **la Ficoline 2 (ou L-ficoline) (Sérine 18)**
- **l'albumine humaine (Lysine 130)**
- **la protéine 5 associée à la multi-résistance (MRP-5 : multidrug resistance-associated protein 5) (Lysine 1040)**
- **la protéine C4-A du complément (Lysine 375)**

Dans la littérature, la lysine constitue l'acide aminé sur lequel se fixe préférentiellement la BP (Yvon et al. 1988; Yvon et al. 1989; Yvon et al. 1990; Meng et al. 2011), bien que des études aient révélé que la BP pourrait également se fixer sur des histidines (Lafaye et al. 1987; Lafaye et al. 1988). Par contre, la sérine et la tyrosine n'ont jusqu'à présent jamais été décrites comme pouvant réaliser des liaisons covalentes avec la BP.

Chimiquement, la BP peut se fixer à la sérine et former une liaison stable. La BP peut également se fixer à la tyrosine mais il semblerait que la liaison formée ne soit pas très stable.

La HSA se trouve parmi les cinq protéines susceptibles de fixer la BP provenant de notre étude de modélisation ce qui conforte notre démarche d'avoir choisi dans un premier temps la HSA comme protéine cible de la BP. La HSA est produite par le foie et constitue la protéine la plus abondante dans le sérum (concentration d'environ 40 g/l de sang). Elle joue entre autre un rôle majeur dans le maintien de l'équilibre hydrique du sang et dans le transport de nombreuses molécules (ions calcium, hormones, acides gras libres, médicaments ...).

La diméthylglycine déhydrogénase est une enzyme permettant la conversion de la N,N-diméthylglycine en sarcosine, qui sera ensuite convertie en glycine par la sarcosine déhydrogénase. Ces réactions ont lieu dans les mitochondries des cellules (Moolenaar et al. 1999; Binzak et al. 2000; Binzak et al. 2001).

La ficoline 2 (ou I-Ficoline) est une protéine synthétisée dans le foie et sécrétée dans le sang. Il s'agit d'une molécule de reconnaissance soluble de l'immunité innée du plasma. En effet, elle joue le rôle de sentinelles de l'environnement extracellulaire, en étant capable de reconnaître des motifs microbiens et d'activer le complément par la voie des lectines, permettant l'élimination des pathogènes (Kilpatrick et al. 2011).

La protéine 5 associée à la multi-résistance (MRP-5) des médicaments est un transporteur membranaire d'anions organiques [cGMP (cyclic guanosine monophosphate) ; analogues de nucléosides monophosphates ; composés de métaux lourds ; fluorochromes], appartenant à la grande famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Des études de l'expression de l'ARNm de la MRP5 ont montré que cette protéine est exprimée de manière ubiquitaire dans tous les tissus humains (Borst et al. 2007; Stojic et al. 2007).

La protéine C4a du complément correspond à une sous-unité fonctionnelle de la protéine C4 du complément. En effet, la protéine C4 du complément circule dans le sang sous forme inactive et lorsqu'elle est activée via la voie classique, par la protéine C1 du complément, elle se dissocie par clivage protéolytique, en deux sous-unités fonctionnelles : la C4a et la C4b. La C4a, anaphylatoxine, est un médiateur de l'inflammation locale et la C4b se lie à d'autres sous-unités de protéines du complément pour former la C3 convertase et la C5 convertase qui sont deux enzymes de la voie classique du complément (Stoermer et al. 2011).

Afin de confirmer la validité de ces résultats obtenus par modélisation, nous envisageons également de récupérer le sérum de patients allergiques et de déterminer par une approche protéomique si la BP se retrouve bien fixée de manière covalente sur ces cinq protéines. Il est également possible de récupérer du sérum de donneurs sains non allergiques,

de les mettre en présence de BP, et de déterminer par une approche protéomique quelles sont les protéines qui fixent la BP et de voir si les cinq protéines, issues de cette approche de modélisation, se retrouvent parmi ces protéines. En effet, certaines de ces protéines, en particulier, la diméthylglycine déhydrogénase et la protéine 5 associée à la multi-résistance, ne sont pas documentées comme présentes dans le sérum. Nous aimerions confirmer ces résultats par une approche expérimentale.

1.3 Détermination des peptides potentiellement présentés aux LT CD4⁺ :

Ce travail de prédiction a été réalisé en collaboration avec le Dr. Bernard Maillère (CEA, Saclay).

A partir des résultats obtenus via le logiciel SuMO, tous les peptides de quinze acides aminés, incluant l'acide aminé de fixation à la BP de chacune des cinq protéines, ont été analysés avec le logiciel de prédiction TEPITOPE, afin déterminer ceux qui sont susceptibles de se fixer aux molécules HLA (*cf. tableau 7 avec la liste des peptides testés sous TEPITOPE*).

En utilisant TEPITOPE, nous avons testé la possibilité de fixation des ces peptides aux allotypes HLA-DR suivants : HLA-DRB1*0101, *0301, *0401, *0701, *0801, *1101, *1501 et HLA-DRB5*0101, en fixant un pourcentage de stringence égal à 6%.

Le logiciel permet de mettre en évidence le résidu P1, résidu d'ancrage principal de la poche de la molécule HLA et détermine la zone d'interaction possible entre le peptide testé et la molécule HLA-DR testée sur une longueur de neuf résidus. Les peptides de neuf résidus qui ont été mis en évidence avec TEPITOPE comme pouvant se fixer aux huit molécules HLA-DR testées figurent dans le tableau 7.

Il convient de remarquer que pour l'albumine humaine, aucun peptide de neuf résidus comportant la lysine 130 de l'albumine humaine et capable de se fixer aux molécules HLA de classe II testées n'a pu être mis en évidence avec le logiciel TEPITOPE. Il se peut que la lysine 130 ne soit pas l'acide aminé de fixation de la BP de la HSA, sachant qu'elle n'a jamais été décrite dans la littérature comme fixant la BP (*cf. tableau 4 de l'introduction*).

Human dimethylglycine dehydrogenase (Lysine 481)	Human dimethylglycine dehydrogenase (Tyrosine 695)	Human Ficolin-2-Precursor (Sérine 18)	Human Serum Albumin (Lysine 130)	Human multidrug resistance-associated protein 5 (Lysine 1040)	Human complement C4-A precursor (Lysine 375)
PTQRVSGLYQRLES K	GWELYHRREDSVAL Y	DRAVGVLGAATLLLS S	AKQEPERNECFLQH K	SVLHIVSRVLIREL K	YFVSSPFSLDLSKT K
TQRVSGLYQRLES KC	WELYHRREDSVAL YD	RAVGVLGAATLLLS SF	KQEPERNECFLQH KD	VLHIVSRVLIREL KR	FVSSPFSLDLSKT KR
QRVSGLYQRLES KCS	ELYHRREDSVAL YDA	AVGVLGAATLLLS SFL	QEPERNECFLQH KDD	LHIVSRVLIREL KRL	VSSPFSLDLSKT KRH
RVSGLYQRLES KCSM	LYHRREDSVAL YDAI	VGVLGAATLLLS SFLG	EPERNECFLQH KDDN	HIVSRVLIREL KRLD	SSPFSLDLSKT KRHL
VSGLYQRLES KCSMG	YHRREDSVAL YDAIM	GVLGAATLLLS SFLGM	PERNECFLQH KDDNP	IVSRVLIREL KRLDN	SPFSLDLSKT KRHLV
SGLYQRLES KCSMGF	HRREDSVAL YDAIMN	VLGAATLLLS SFLGMA	ERNECFLQH KDDNPN	VSRVLIREL KRLDNI	PFSLDLSKT KRHLVP
GLYQRLES KCSMGFH	RREDSVAL YDAIMNA	LGAATLLLS SFLGMAW	RNECFLQH KDDNPNL	SRVLIREL KRLDNIT	FSLDLSKT KRHLVPG
LYQRLES KCSMGFHA	REDSVAL YDAIMNAG	GAATLLLS SFLGMAWA	NECFLQH KDDNPNLP	RVLIREL KRLDNITQ	SLDLSKT KRHLVPGA
YQRLES KCSMGFHAG	EDSVAL YDAIMNAGQ	AATLLLS SFLGMAWAL	ECFLQH KDDNPNLPR	VLIREL KRLDNITQS	LDLSKT KRHLVPGAP
QRLES KCSMGFHAGW	DSVAL YDAIMNAGQE	ATLLLS SFLGMAWALQ	CFLQH KDDNPNLPRL	LIREL KRLDNITQSP	DLSKT KRHLVPGAPF
RLES KCSMGFHAGWE	SVAL YDAIMNAGQEE	TLLLS SFLGMAWALQA	FLQH KDDNPNLPRLV	IREL KRLDNITQSPF	LSKT KRHLVPGAPFL
LES KCSMGFHAGWEQ	VAL YDAIMNAGQEEG	LLS SFLGMAWALQAA	LQH KDDNPNLPRLVR	REL KRLDNITQSPFL	SKT KRHLVPGAPFLL
ES KCSMGFHAGWEQP	AL YDAIMNAGQEEGI	LLS SFLGMAWALQAAD	QH KDDNPNLPRLVRP	EL KRLDNITQSPFLS	KT KRHLVPGAPFLLQ
S KCSMGFHAGWEQPH	LY DAIMNAGQEEGID	LS SFLGMAWALQAADT	H KDDNPNLPRLVRPE	L KRLDNITQSPFLSH	T KRHLVPGAPFLLQA
KCSMGFHAGWEQPHW	YDAIMNAGQEEGIDN	SFLGMAWALQAADTC	KDDNPNLPRLVRPEV	KRLDNITQSPFLSHI	KRHLVPGAPFLLQAL

Tableau 7: Séquences des peptides testés sous TEPITOPE

S'agissant de molécules de classe II, il manque à ces séquences d'interaction, des régions flanquantes, composées de 6 acides aminés afin d'obtenir des peptides de 15 acides aminés. Le résidu P1 pouvant être placé entre la position 3 et la position 6 du peptide de 15 acides aminés, il est alors possible de rajouter 2 à 5 acides aminés en position N-terminale de ce résidu P1. Nous avons choisi aléatoirement de rajouter en position C- et N- terminale de ces peptides de 9 acides aminés, 3 acides aminés provenant de la protéine en question, afin d'obtenir des peptides de 15 acides aminés (*cf. tableau 8*).

PROTEINES	ZONE D'INTERACTION (9 résidus)	PEPTIDE RETENU (15 résidus)
Human dimethylglycine dehydrogenase (Lysine 481)	YQRLES KCS	SGLYQRLES KCS MGF
	LES KCS MGF	YQRLES KCS MGFHAG
Human dimethylglycine dehydrogenase (Tyrosine 695)	Y DAIMNAGQ	VAL Y DAIMNAGQEEG
	VAL Y DAIMN	EDSV Y DAIMNAGQ
Human Ficolin-2- Precursor (Sérine 18)	LL S FLGMA	AATLL S FLGMAWAL
	LGAATLL S	VGVLGAATLL S FLG
	LL S FLGMAW	ATLL S FLGMAWALQ
Human Serum Albumin (Lysine 130)	Pas de zone d'interaction	Pas de peptides
Human multidrug resistance-associated protein 5 (Lysine 1040)	LK RLDNITQ	IRE LK RLDNITQSPF
	VLIRE LK R	VSRVLIRE LK RLDNI
	LIRE LK RLD	SRVLIRE LK RLDNIT
	IRE LK RLDN	RVLIRE LK RLDNITQ
Human complement C4-A precursor (Lysine 375)	FSLDLS KTK	SSPFSLDLS KTK RHL
	LDLS KTK RH	PFSLDLS KTK RHLVP

Tableau 8: Liste des peptides choisis pour la synthèse et les tests biologiques

Une approche similaire sera également utilisée avec les bio-conjugués HSA-BP lorsque les sites de fixation seront déterminés (*cf. sous-partie 1*).

1.4 Synthèse des peptides couplés à la BP :

Dans un premier temps, nous avons choisi de nous focaliser sur la synthèse des peptides où la lysine est l'acide aminé fixant la BP, étant donné qu'il s'agit de l'acide aminé préférentiellement décrit dans la littérature comme fixant la BP (*cf. figure 38*). Les peptides où les acides aminés de fixation à la BP sont la sérine et la tyrosine seront synthétisés dans un second temps.

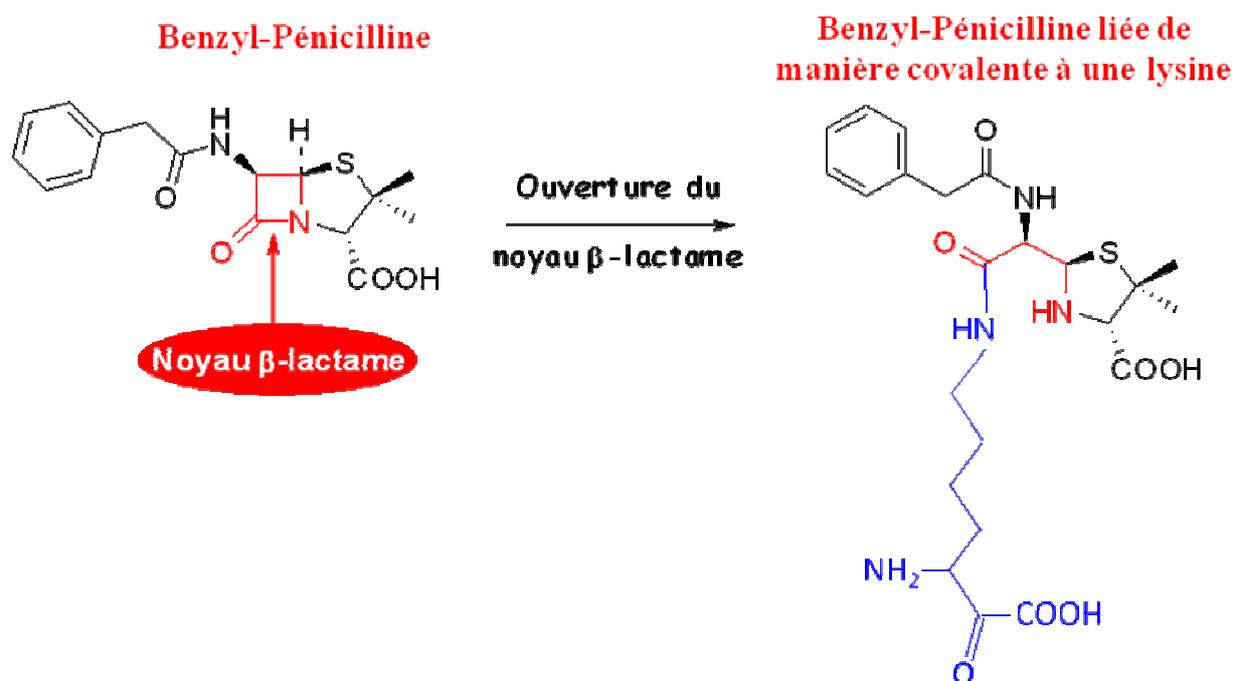


Figure 38: Représentation schématique de la fixation de la benzyl-pénicilline sur une lysine

La synthèse de peptides couplés à la BP sur une lysine peut se réaliser de trois manières différentes :

- Synthèse du peptide sans la BP dans un premier temps et dans un deuxième temps, synthèse du bio-conjugué peptides-pénicilline en suivant la même méthodologie que celle employée avec la synthèse de bio-conjugués HSA-BP
- Synthèse du peptide sur support solide par la technique dite « Fmoc » en utilisant des lysines protégées « orthogonalement » (qui portent des groupements protecteurs qui peuvent être clivés sélectivement). Ainsi, une fois la synthèse du peptide réalisée sur résine, le groupement protecteur de la fonction amine du résidu lysine

est clivé sélectivement. Il est alors possible de fixer la BP uniquement sur les lysines déprotégées sélectivement et ensuite de réaliser l'étape finale de déprotection du peptide et de clivage de la résine.

- Synthèse d'un monomère lysine-BP et introduction régiométrisée de ce monomère lors de la synthèse du peptide sur support solide via la méthodologie Fmoc.

La première méthode ne permet pas de garantir la fixation sélective de la BP sur la lysine d'intérêt, en particulier lorsque le peptide comporte plusieurs lysines ou d'autres fonctions chimiques nucléophiles capables de s'additionner et d'ouvrir le noyau β -lactame. Nous avons néanmoins essayé d'employer cette méthode pour fixer la BP sur un peptide test mais l'essai n'a pas été fructueux.

La deuxième méthode permet de fixer sélectivement la BP sur la lysine d'intérêt mais elle requiert un choix adéquat et judicieux de groupements protecteurs pour chaque peptide. Cette démarche est donc complexe et contraignante.

Nous avons ainsi choisi d'utiliser la troisième méthode qui permet de réaliser la liaison de la BP sur la lysine d'intérêt du peptide de manière sélective et qui apporte une grande flexibilité dans la synthèse des peptides modifiés. En effet, en synthétisant le monomère lysine-BP, il est ensuite possible d'automatiser la synthèse de ces peptides, en utilisant ce monomère comme un acide aminé classique. Néanmoins, le monomère lysine-BP se doit d'être protégé avec des groupements protecteurs afin d'éviter des couplages croisés non désirés.

Ce travail concernant la synthèse du monomère lysine-BP a été effectué en collaboration avec le Pr. Delphine Joseph et le Dr. Sandrine Delarue-Cochin (UMR CNRS 8076, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry).

La technologie Fmoc étant envisagée pour la synthèse des peptides modifiés, il est nécessaire de protéger les fonctions amines et les fonctions carboxyliques du monomère lysine-BP avec des groupements protecteurs, afin d'éviter les couplages croisés non désirés. Au cours de la synthèse du peptide, les groupements choisis doivent pouvoir se cliver lors de la déprotection des peptides en méthodologie Fmoc. Le groupement Cbz (*R sur la figure 39*) est envisagé pour la protection de la fonction amine du noyau thiazolidine obtenu après

ouverture du noyau β -lactame alors que le groupement PMB est envisagé pour la protection de la fonction carboxylique de ce même hétérocycle. La rétrosynthèse du monomère lysine-BP est présentée en figure 39 :

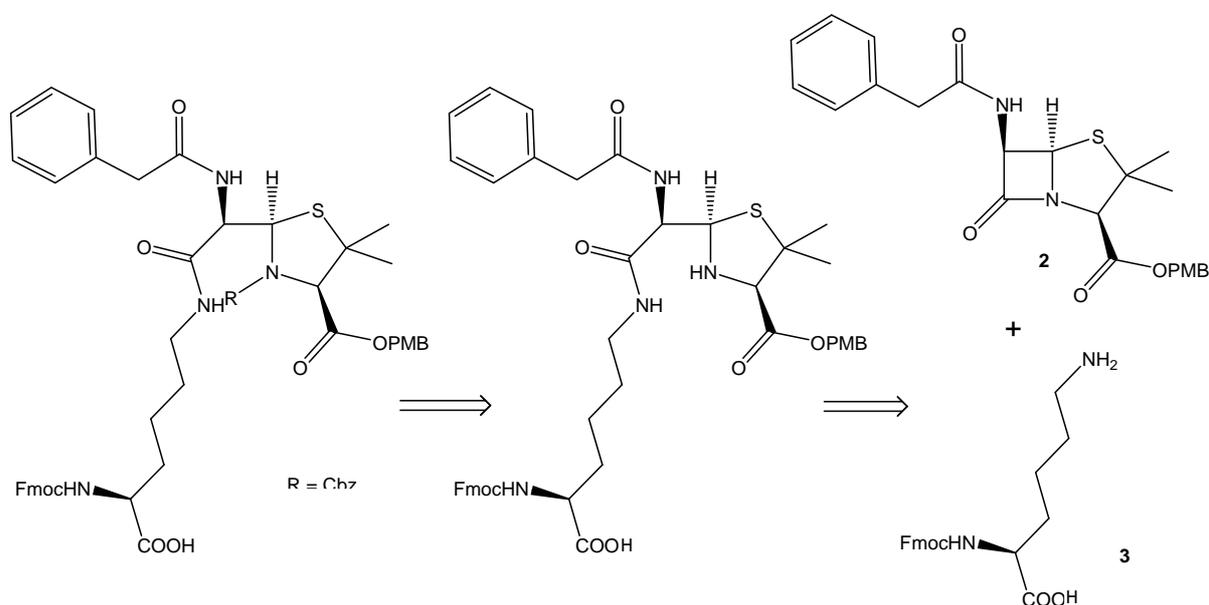


Figure 39: Retrosynthèse du monomère lysine-BP

Afin d'éviter les couplages croisés non désirés entre la fonction acide de la BP et les fonctions amines des autres acides aminés, la première étape a consisté à protéger la fonction acide de la BP sous la forme d'un ester via le groupement protecteur PMB (*cf. figure 39 : composé 2 et figure 40*). Pour cela, la benzyl-pénicilline G commerciale étant sous forme de carboxylate de sodium, est directement mise en réaction avec du bromure de 4-méthoxybenzyle (*cf. figure 40*).

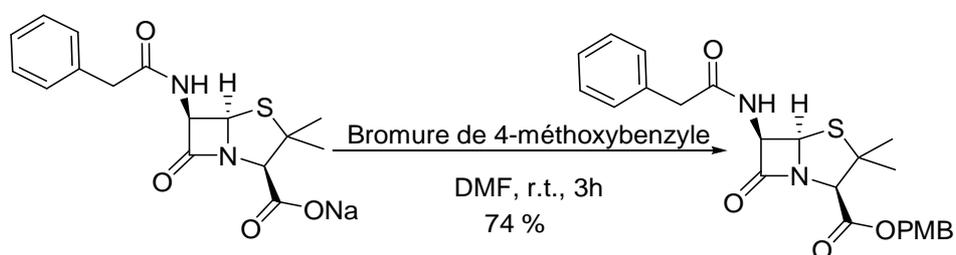
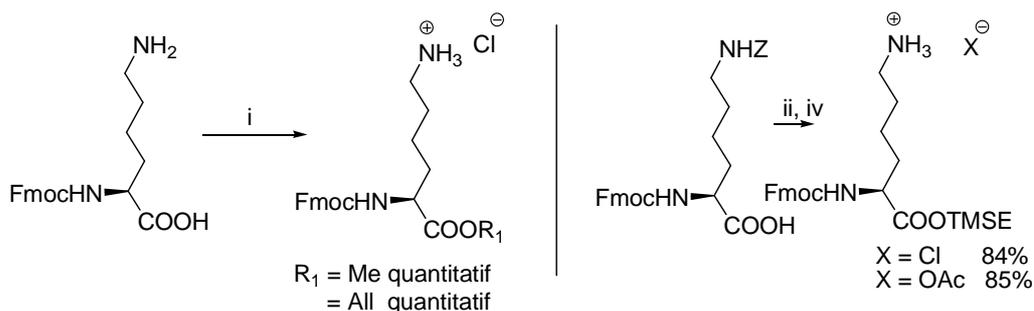


Figure 40: Protection de la fonction acide de la BP

Plusieurs essais d'ouverture directe de la BP protégée par le chlorhydrate de la N-Fmoc lysine commerciale se sont avérés peu efficaces. En effet, le chlorhydrate de la N-Fmoc lysine est

peu soluble sous sa forme zwitterionique dans les milieux organiques et les réactions en sont particulièrement ralenties. Ces essais d'ouverture ont été réalisés dans l'eau ou dans des solvants très polaires (DMF) en présence de base afin de libérer l'amine de son chlorhydrate. Néanmoins, les rendements en lysine-BP restent très faibles et des réactions secondaires de déprotection de la lysine sont systématiquement observées. C'est pourquoi, la deuxième étape a consisté à préparer une lysine Fmoc plus soluble en milieu organique en protégeant la fonction carboxylique de la lysine. Par ailleurs, cette protection permettra d'employer des quantités moindres de base pour le couplage de la BP à la lysine et d'éviter les réactions de déprotection du groupement Fmoc. Plusieurs groupements protecteurs ont été introduits (*cf. figure 41*). Après les séquences de fixation de la lysine à la BP et de libération de la fonction acide de la lysine pour le couplage peptidique, c'est la protection par l'allyl-alcool qui a été retenue puisque les clivages de l'ester de méthyle ou du dérivé silylé se sont montrés difficiles et sont accompagnés d'une déprotection partielle non désirée du groupement Fmoc.



(i) SOCl_2 , méthanol or allyl alcohol, reflux, 3h; (ii) SOCl_2 , DCM, reflux, 3h puis 2-triméthylsilyléthanol, DCM, r.t., 24 h; (iii) H_2 1 atm, Pd/C catal., HCl ou AcOH, EtOH, r.t., 3h.

Figure 41: Protection de la lysine Fmoc

La troisième étape a consisté en l'ouverture du noyau β -lactame de la BP par la lysine Fmoc modifiée (*cf. étape i sur la figure 42*). Pour finir, la fonction amine du cycle thiazolidine est protégée avec un groupement Cbz (*cf. étape ii sur la figure 42*). Et enfin, le groupement protecteur allyl-alcool de la fonction carboxylique de la lysine est clivé sélectivement sans affecter les deux autres groupements protecteurs du monomère (groupement Cbz et PMB) ni le groupement Fmoc (*cf. étape iii sur la figure 42*). De cette manière, il est alors possible de fixer ce monomère à d'autres acides aminés afin de synthétiser les peptides désirés. La synthèse a été optimisée afin de préparer plus de 5g du monomère lysine-BP protégé.

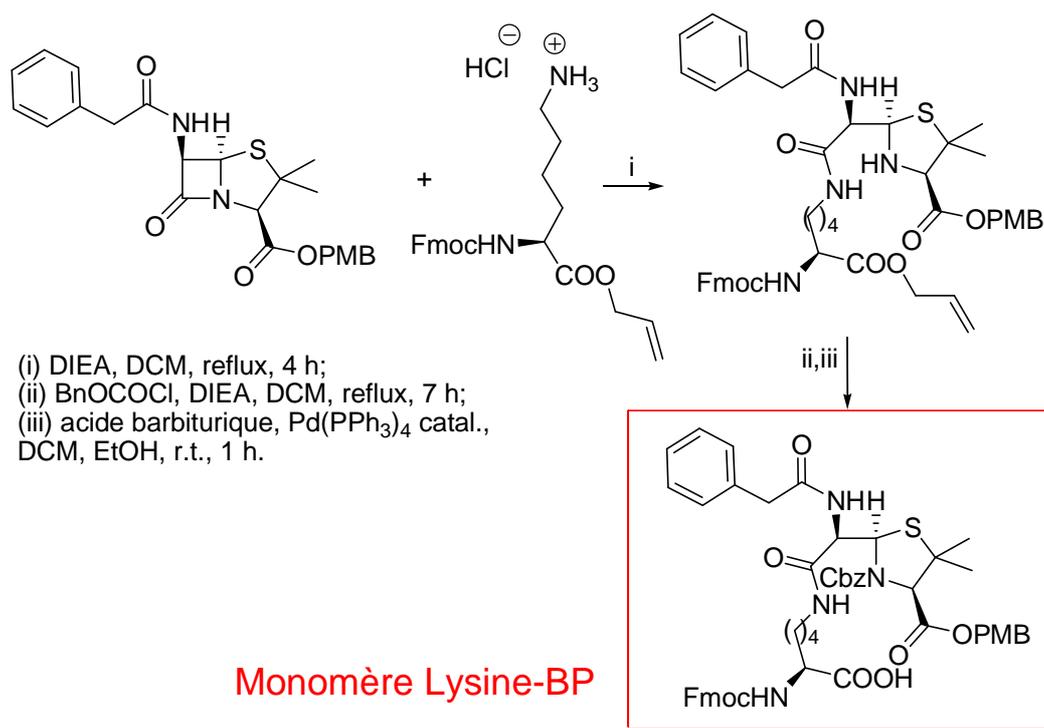


Figure 42: Synthèse du monomère Lysine-BP

Ce monomère a été envoyé à la société Protéogénix (Oberhausbergen, France), qui a réalisé la synthèse des peptides. La synthèse des peptides obtenus par modélisation sur lesquels la BP est fixée à une lysine a été réalisée avec ce monomère. L'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse des peptides obtenus révèle que le monomère a bien été inséré à la bonne place pour tous les peptides synthétisés, validant ainsi notre approche expérimentale. Néanmoins, le groupement Cbz de l'amine endocyclique demeure insensible aux réactions de déprotection. Plusieurs protocoles de déprotection ont été essayés afin d'éliminer ce groupement protecteur sans altérer le peptide mais aucun n'a fonctionné.

Un second monomère lysine-BP est en cours de synthèse : sur ce monomère, il a été décidé de ne pas protéger la fonction amine endocyclique, en espérant que de part son encombrement stérique, elle ne puisse pas réagir avec les fonctions acides des autres acides aminés et qu'elle ne puisse pas générer des couplages croisés non désirés. Le monomère sera envoyé à la société Protéogénix pour re-synthétiser les peptides modifiés. Dans l'hypothèse où cette stratégie ne fonctionnerait pas, il sera envisagé d'utiliser l'approche des « lysines protégées orthogonalement ».

1.5 Tests biologiques:

Plusieurs tests biologiques seront réalisés afin de déterminer la validité de ces résultats issus de l'approche de modélisation par le logiciel SUMO et de l'étude des sites de fixation des bio-conjugués HSA-BP et de confirmer l'implication des peptides choisis dans les allergies à la BP.

Dans un premier temps, la réponse lymphocytaire secondaire de ces peptides sera étudiée sur des PBMC du sang périphérique de patients allergiques à la BP, en réalisant un TTL (Test de Transformation Lymphocytaire). A cet effet, des patients allergiques à la BP sont en train d'être recrutés via une collaboration avec le Pr. Sylvie Chollet-Martin (Service d'immunologie, Hôpital Bichat, Paris). Des tests de prolifération de ces PBMC en présence des peptides synthétisés, de la pénicilline libre et des bio-conjugués seront réalisés. La prolifération sera mesurée par cytométrie en flux en utilisant le fluorochrome CFSE (CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester), qui permettra d'identifier les peptides susceptibles d'être impliqués dans les allergies à la BP. Si nous observons que des peptides, issus de notre approche de modélisation, sont capables d'induire une prolifération des LT de patients allergiques à la BP, cela permettra de valider notre approche de modélisation, dans le cas contraire, notre approche sera sans doute à améliorer.

Dans un deuxième temps, si des peptides ont induit la prolifération de LT de patients allergiques à la BP, des tests de liaison *in vitro* aux molécules HLA de classe II seront réalisés avec ces peptides. Ces tests de liaison seront réalisés en collaboration avec le Dr. Bernard Maillère. En effet, Bernard Maillère dispose au sein de son laboratoire, d'une banque de molécules HLA de classe II, représentative de la population Caucasienne (*cf. Tableau 9*). Ces molécules HLA de classe II sont purifiées sur une colonne d'affinité à partir de lysats de cellules EBV homozygotes pour les gènes HLA. Des peptides traceurs biotinylés, présentant une forte affinité pour chacune des molécules de classe II, ont été synthétisés. Le test de liaison fonctionne comme un ELISA de compétition : les molécules HLA de classe II sont incubées en solution avec le peptide traceur biotinylé correspondant à une concentration donnée et le peptide compétiteur à tester à différentes concentrations, pendant 24 à 72 heures. Les complexes HLA de classe II – peptides sont capturés par des anticorps anti-HLA de classe II, préalablement adsorbés sur une plaque ELISA à 96 puits. Le peptide traceur biotinylé est alors détecté par l'ajout d'un conjugué streptavidine-enzyme. La dégradation du substrat de l'enzyme forme un produit fluorescent, qui est détecté. Les propriétés de liaison de chaque peptide testé est caractérisé par son IC50 qui correspond à la concentration du peptide

pour laquelle 50% de la liaison HLA de classe II – peptide traceur est inhibée. Ainsi, en réalisant ces tests de liaison avec les peptides induisant la prolifération de LT de patients allergiques à la BP, il sera alors possible de déterminer l’affinité de ces peptides pour les molécules HLA de classe II. De plus, les résultats de ces tests de liaison pourront être comparés aux prédictions obtenues avec TEPITOPE, étant donné qu’avec TEPITOPE, la fixation de la BP au peptide ne peut pas être prise en compte dans la prédiction de liaison aux molécules HLA de classe II.

Alleles	Fréquences	Traceurs	Séquences	IC50 (nM)
DRB1*0101	9,3	HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	5
DRB1*0401	5,6	HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	44
DRB1*1101	9,2	HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	38
DRB1*0701	14,0	YKL	AAAYAAKAAALAA	34
DRB1*0301	10,9	MT 2-16	AKTIAYDEEARRGLE	100
DRB1*1301	6,0	B1 21-36	TERVRLVTRHIYNREE	330
DRB1*1501	8,0	A3 152-166	EAEQLRRAYLDGTGVE	14
DRB5*0101	7,9	HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	7
DRB3*0101	9,2	LoI 191-120	ESWGAVWRIDTPDKLTGPFT	5
DRB4*0101	28	E2/E168	AGDLLAIETDKATI	2
DPB1*0401	40	Oxy 271-287	EKKYFAATQFEPLAARL	10
DPB1*0402	11	Oxy 271-287	EKKYFAATQFEPLAARL	10

Tableau 9: Banque de molécules HLA (CEA)

Dans un troisième temps, des tests de stimulation de LT de donneurs sains non allergiques seront ensuite réalisés, avec les peptides ayant induit la prolifération de LT de donneurs allergiques à la BP, en utilisant une méthodologie similaire à celle employée avec les bio-conjugués. Ainsi, la fréquence des LT spécifiques de chacun des peptides pourra être déterminée et il sera possible de savoir si un ou plusieurs peptides sont impliqués dans les allergies à la BP en fonction des fréquences déterminées.

Conclusions - Perspectives:

Au jour d'aujourd'hui, cette partie du projet n'a pas pu être menée à son terme étant donné que nous avons rencontré des difficultés dans la synthèse du monomère lysine-BP. En effet, un monomère lysine-BP a été synthétisé et inséré aux peptides choisis suite à la modélisation via SuMO et via TEPITOPE mais à la fin de la synthèse, un des groupements protecteurs du monomère lysine-BP n'a pas pu être retiré par des voies classiques de déprotection. D'autres méthodes de déprotection de ce groupement protecteur sont en train d'être testées et l'utilisation d'un monomère lysine-BP avec d'autres groupements protecteurs est envisagée.

Les tests biologiques présentés ci-dessus seront alors réalisés une fois la synthèse des peptides réalisés et permettront dans un premier temps de valider ou d'invalider notre approche de modélisation et peut-être d'identifier des peptides reconnus par les LT dans le cas des allergies à la BP.

Il convient également de noter que lorsque le monomère lysine-BP sera synthétisé, des synthèses d'autres peptides pourront être réalisées. En effet, par exemple, lorsque les sites de fixation de la BP sur la HSA de nos bio-conjugués seront déterminés, nous souhaiterions vivement synthétiser des peptides contenant les acides aminés de fixation, couplés à la BP et réaliser les tests biologiques présentés ci-dessus. En effet, comme nous avons montré que nos bio-conjugués HSA-PB sont capables d'activer des LT de patients sains non allergiques, il nous paraît judicieux de tester ces peptides issus de nos bio-conjugués et qui ont de fortes chances d'être impliqués dans les allergies à la BP, même si la HSA n'a pas donné de résultats positifs avec TEPITOPE.

**EFFET DES MEDICAMENTS SUR LA
MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES**

Effet des médicaments sur la maturation des cellules dendritiques

INTRODUCTION :

Chez des patients allergiques, des lymphocytes T spécifiques de médicaments tels que la benzyl-Pénicilline (BP) (Brander et al. 1995; Mauri-Hellweg et al. 1996; Padovan et al. 1996; Padovan et al. 1997; Weltzien et al. 1998; Meng et al. 2011) ou le SMX (Schnyder et al. 1997; von Greyerz et al. 1999; Farrell et al. 2003), ont été mis en évidence, suggérant la présence de récepteurs de LT et la présentation de ces médicaments par des APC.

Les DC, étant des APC professionnelles, peuvent stimuler des LT naïfs pendant une réponse immunitaire primaire. Lorsque les DC capturent des Ag et reconnaissent des signaux de danger, elles entrent dans un processus de maturation, conduisant entre autre à l'expression de protéines membranaires, comme le CD40, le CD80, le CD83, le CD86, HLA-DR leur permettant de stimuler les LT.

Deux études ont montré une augmentation *in vitro* de l'expression du CD40 dans des DC humaines dérivées de monocytes (Mo-DC) de donneurs non allergiques, exposées au SMX et à son métabolite, le SMX-NO (Sanderson et al. 2007) et une augmentation de l'expression du CD80, du CD86 et de HLA-DR dans des mo-DC provenant de patients allergiques à l'amoxicilline lorsqu'elles sont exposées à l'amoxicilline (Rodriguez-Pena et al. 2006).

Nous avons alors émis l'hypothèse que les médicaments tels que la BP et le SMX pourraient induire la maturation des DC en jouant à la fois le rôle d'Ag et le rôle de signaux de danger, comme cela a été démontré pour des sensibilisants de contact tels que le nickel ou le DNCB, au sein de notre laboratoire (Boisleve et al. 2004; Ade et al. 2007; Antonios et al. 2009).

Pour cela, deux modèles de DC ont été utilisés. Les mo-DC humaines ont été isolées à partir de monocytes du sang périphérique après une sélection magnétique positive via le marqueur CD14 et différenciées en présence de GM-CSF et d'IL-4 pendant cinq jours et les BM-DC murines, proviennent de la différenciation des progéniteurs de moelle osseuse de souris C57Black6, en utilisant du GM-CSF pendant dix jours.

Les DC immatures ont été ensuite stimulées avec ces deux médicaments et les métabolites du SMX, le nitroso-SMX (SMX-NO) et le SMX hydroxylamine (SMX-NHOH). L'expression des marqueurs de maturation (CD40, CD86, CD83, CMH de classe II) a été mesurée par cytométrie en flux via l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes.

MATERIELS ET METHODES

Médicaments et synthèse des métabolites du SMX

Les deux antibiotiques testés sont la BP (Sigma, St Louis, USA) et le SMX (Sigma). Les métabolites du SMX, le SMX-NO et le SMX-NHOH ont également été testés. Ils ont été synthétisés par le Dr. Youssef Hajbi et le Pr. Delphine Joseph (UMR CNRS 8076, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry), selon le protocole publié par l'équipe de Kevin Park (Naisbitt 1996).

La BP est mise en suspension dans de l'eau distillée et le SMX et ses métabolites (SMX-NO et SMX-NHOH) sont dissous dans du DMSO pour les stimulations des DC.

Différenciation des DC humaines dérivés de monocytes de sang périphérique (Mo-DC)

Les PBMC ont été purifiés par une centrifugation sur gradient de Ficoll (Eurobio, Les Ulis, France) de couches leucoplaquettaires, provenant de volontaires sains, et obtenues via l'Etablissement Français du sang (EFS, Rungis, France). Les monocytes sont isolés des PBMC par une sélection magnétique positive en utilisant des anticorps anti-CD14⁺ adsorbés sur des billes magnétiques (Miltenyi Biotec, Bergish Glabash, Allemagne). Les monocytes sont cultivés à $1 \cdot 10^6$ cellules par ml en présence de GM-CSF (550 U/ml) et d'IL-4 (550 U/ml) dans du RPMI 1640 contenant du glutamax I supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal inactivé et 1mM de pyruvate de sodium, sans antibiotiques (=RPMIc) (Gibco Invitrogen, Paisley, UK). En cinq jours, les monocytes se différencient en cellules dendritiques présentant un phénotype immature (iDC).

Différenciation des DC murines issues de progéniteurs de la moelle osseuse (BM-DC)

Ma première année de thèse a été consacrée au développement de ce modèle murin de BM-DC et à sa mise en place au sein du laboratoire.

La différenciation des DC murines immatures à partir de progéniteurs de la moelle osseuse a été réalisée en suivant les protocoles décrits dans les publications suivantes (Inaba et al. 1992; Lutz et al. 1999; Pepin et al. 2007), et en y apportant quelques modifications.

Des souris femelles C57 Black 6 âgées de 6 semaines ont été utilisées pour la production des BM-DC (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). A J0, Les tibias et les fémurs des souris sont prélevés, nettoyés rapidement dans de l'éthanol à 70% et rincés dans du PBS

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les extrémités des os sont coupées et à l'aide d'une seringue remplie d'IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen) munie d'une aiguille 26G, la moelle osseuse est flushée dans un falcon de 50 ml contenant de l'IMDM. Les cellules sont centrifugées à 4°C à 1200 rpm pendant 10 min. Le culot est repris dans 2 ml de tampon de lyse des globules rouges (0.156 M NH₄Cl, 9.76 mM NaHCO₃, 0.116 mM EDTA) pendant 2 min et après ajout d'IMDM, les cellules sont centrifugées à 1200 rpm pendant 10 min à 4°C. Une numération des cellules est réalisée sur une cellule de Malassez en utilisant du bleu trypan (Sigma). Les cellules sont alors mises en culture dans des boîtes de pétri non traitée pour la culture cellulaire (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), à raison de 5. 10⁶ cellules dans 10 ml de milieu de culture complet (=IMDMc) par boîte de pétri. L'IMDMc correspond à de l'IMDM auquel est ajouté 10% de SVF inactivé (Sérum de Veau Foetal, Invitrogen), 50 µM de β-mercaptoéthanol et 10% de surnageant de J558 contenant du GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor). Les cellules J558 nous ont été fournies par l'équipe du Pr. Sebastien Amigorena (Institut Curie, Paris). Ce sont des plasmacytomes X63-Ag8 transfectés avec le vecteur d'expression BCMGSNeo contenant l'ADNc du GM-CSF murin. Ces cellules J558 sécrètent ainsi dans leur milieu de culture du GM-CSF. Le surnageant de culture contenant le GM-CSF est alors utilisé dans le milieu de culture des progéniteurs de la moelle osseuse afin de les différencier en BM-DC. Chaque lot de surnageant J558 est dosé en ELISA (R&D systems, Minneapolis, USA) afin de connaître la concentration en GM-CSF. Un test de différenciation des progéniteurs de la moelle osseuse en BM-DC est également réalisé en utilisant des concentrations différentes de surnageant afin d'évaluer l'activité du lot de surnageant J558 sur la différenciation des progéniteurs de la moelle osseuse en DC immatures. Le pourcentage de surnageant J558 à ajouter au milieu de culture est déterminé en fonction des résultats de ces deux tests.

A J3, 5 ml de milieu complet sont ajoutés à chacune des boîtes de pétri. A J6, la fraction cellulaire non adhérente (FNA) de chaque boîte de pétri est récupérée et 10 ml de milieu complet sont ajoutés dans chaque boîte de pétri. A J10, les cellules adhérentes des boîtes de pétri sont récupérées. Les cellules sont lavées et comptées. Un phénotypage du marqueur CD11c, marqueur de BM-DC est réalisé. Le pourcentage des cellules CD11c⁺ est alors généralement supérieur à 90%. Les BM-DC sont alors reprises à 1. 10⁶ cellules par ml dans des petites boîtes de culture Corning© (ThermoFisher Scientific) dans de l'IMDMc sans surnageant J558 et sont stimulées avec les différents médicaments.

Lors de la mise au point du modèle, nous avons observé qu'il est possible de différencier des BM-DC à partir de la fraction cellulaire non adhérente obtenue à J6. Dans ce

cas-là, un comptage de la FNA est réalisé et les cellules sont réensemencées dans de nouvelles boîtes de culture à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules par boîte de pétri contenant 10 ml d'IMDMc. A J10, 5 ml d'IMDMc sont ajoutés dans chaque boîte. A J13, les cellules adhérentes sont alors récupérées et comptées. Un phénotypage du marqueur CD11c est réalisé. Le pourcentage des cellules CD11c⁺ est alors généralement supérieur à 90%. Les cellules sont alors reprises à $1 \cdot 10^6$ cellules par ml et sont stimulées avec les différents médicaments.

Traitement des DC immatures (iDC) par les médicaments

Les Mo-DC (après 5 jours de différenciation) et les BM-DC (après 10 jours de différenciation) sont repris en RPMIc pour les Mo-DC et en IMDMc sans surnageant J558 pour les BM-DC à $1 \cdot 10^6$ cellules par ml. Ces iDC sont stimulés ou non avec de la BP, du SMX, du SMX-NO et du SMX-NHOH à différentes concentrations et du LPS (provenant de la souche *Escherichia coli* 055:B5, 25ng/ml, Sigma).

Mesure de la cytotoxicité de la BP, du SMX et du SMX-NO

Après 24h de traitement, la cytotoxicité des médicaments est évaluée par comptage des cellules au bleu trypan.

Mesure de l'expression des marqueurs de maturation

Après 24h de traitement avec les médicaments, le phénotype des DC a été analysé par cytométrie en flux. Les DC ont été resuspendues dans du tampon phosphate (PBS : Phosphate Saline Buffer ; Gibco Invitrogen), supplémenté avec 0,5% d'albumine bovine (BSA : Bovine Serum Albumin) et 250000 DC sont incubées avec l'anticorps monoclonal couplé à un fluorochrome correspondant pendant 20 min à 4°C. Après 2 lavages en PBS-BSA 0,5%, les cellules sont fixées dans du PBS-Paraformaldéhyde 1%. Les anticorps humains suivants ont été utilisés : CD86-PE (Diaclone), CD83-PE (BD Biosciences), CD40-FITC (Beckman Coulter), CCR7-PE (BD Biosciences) et HLA-DR-FITC (Beckman Coulter). Les anticorps murins suivants ont été utilisés CD40-APC, CD86-FITC et I-ab-FITC (CMH de classe II pour les C57Black 6) (tous provenant de BD Biosciences). Les anticorps isotypes contrôle correspondants ont également été utilisés dans les mêmes concentrations afin de déterminer les fixations non spécifiques. 10000 cellules ont été analysées sur le FACS Calibur, en utilisant le logiciel Cell Quest (BD Biosciences). Les cellules vivantes ont été identifiées sur la base de leurs caractéristiques physiques [FSC : Forward Scatter (granulométrie) et SSC : Side Scatter]. Les résultats sont exprimés en MFIC correspondant à l'intensité moyenne de

fluorescence corrigée. La MF_{ic} est égale à $MF_{ic} = MFI \text{ des cellules traitées ou non} / MFI \text{ du contrôle isotypique des cellules traitées ou non}$.

Analyse statistique:

Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés avec une p-value inférieure à 0.05 comme critère de significativité, en utilisant le logiciel Statistica (StatSoft, Inc., Tulsa, USA)

RESULTATS

- Etude de la cytotoxicité des médicaments

Les Mo-DC et les BM-DC immatures sont stimulées pendant 24h avec les médicaments (SMX, Pénicilline). Différentes concentrations ont été testées : 250, 500 et 1000 μM pour la pénicilline G et 250 et 500 μM pour le SMX. Un comptage des cellules est réalisé et la viabilité est déterminée en utilisant du bleu trypan.

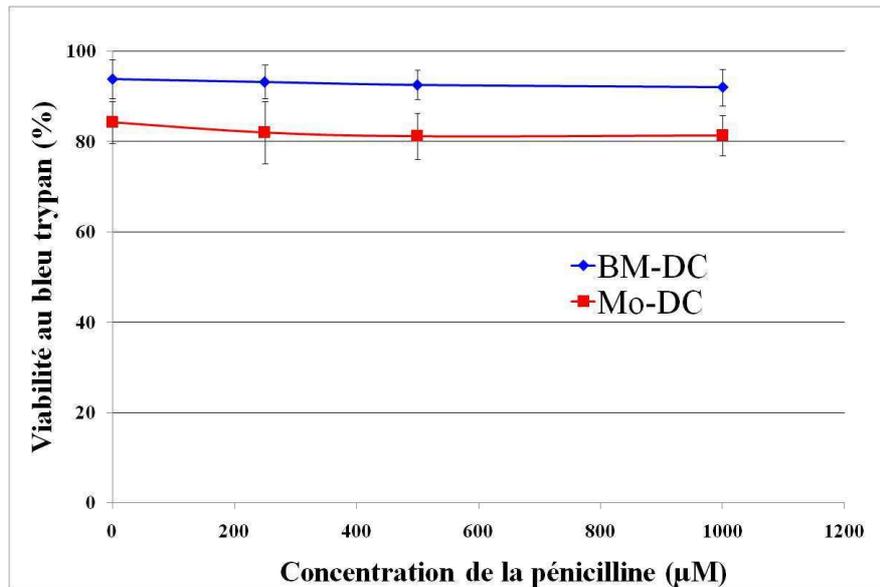


Figure 43: Cytotoxicité de la BP sur les BM-DC ($n \geq 3$) et les Mo-DC ($n=5$)

En ce qui concerne la BP, quelque soit la concentration testée (jusqu'à 1000 μM) et quelque soit le modèle cellulaire de DC utilisé (BM-DC et Mo-DC), la viabilité cellulaire est au moins supérieure ou égale à 80% (*cf. figure 43*). La pénicilline G ne semble donc pas toxique ni pour les BM-DC ni pour les Mo-DC aux doses testées.

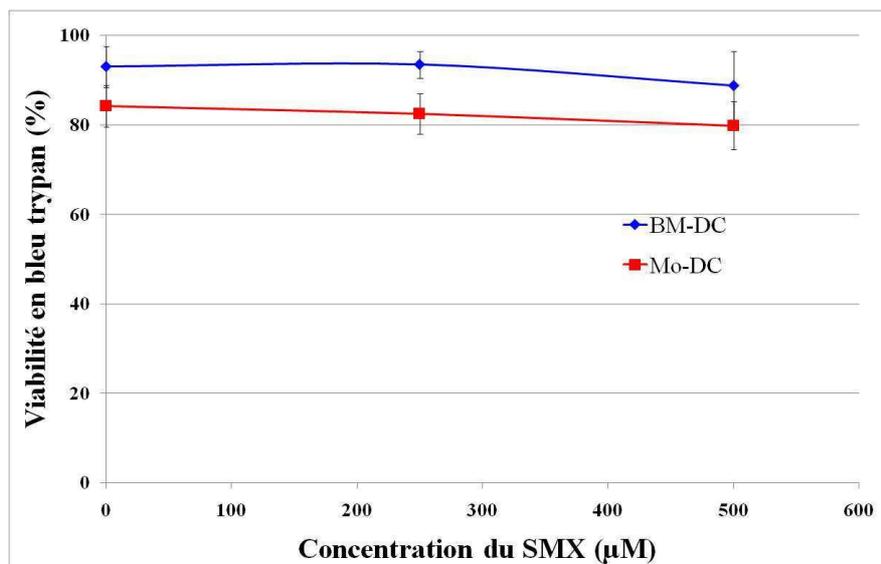


Figure 44: Cytotoxicité du SMX sur les BM-DC (n=4) et les Mo-DC (n=5)

Concernant le SMX, quelque soit la concentration utilisée (jusqu'à 500 µM) et quelque soit le modèle cellulaire de DC utilisé, la viabilité cellulaire est au moins supérieure ou égale à 80% (cf. figure 44). Le SMX tout comme la BP n'est donc pas toxique ni pour le BM-DC ni pour les Mo-DC aux doses testées.

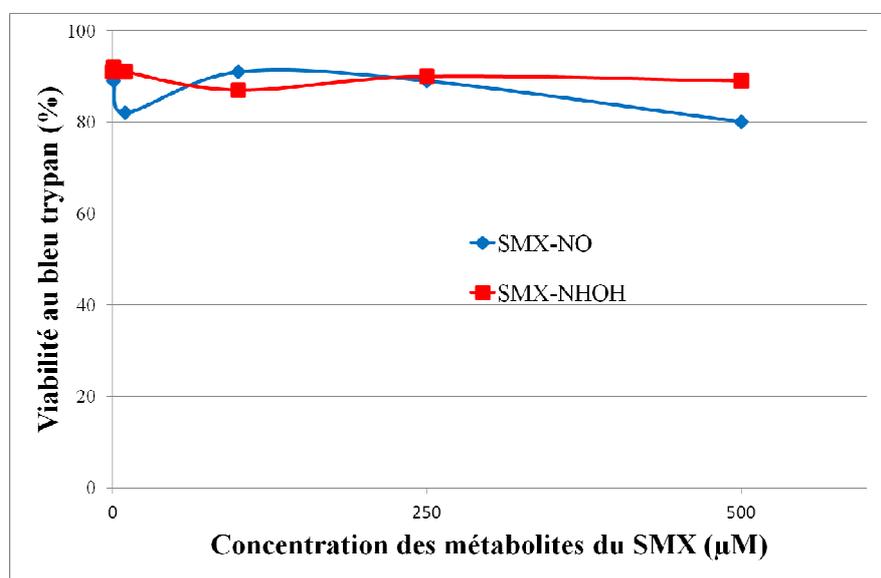


Figure 45: Cytotoxicité du SMX-NO et du SMX-NHOH sur les BM-DC à 24h (n= 1)

La cytotoxicité des deux métabolites du SMX, le SMX-NO et le SMX-NHOH a été évaluée sur des BM-DC. Quelque soit la concentration testée (jusqu'à 500µM), la viabilité pour le SMX-NO est supérieure ou égale à 80% et celle pour le SMX-NHOH est supérieure ou égale

à 85% (*cf. figure 45*). Ainsi, pour les concentrations testées, les deux métabolites ne semblent pas toxiques pour les BM-DC.

- **Etude de l'expression des marqueurs de maturation**

Pour l'étude de l'expression des marqueurs de maturation, les Mo-DC et les BM-DC ont été stimulées avec 500 μ M de pénicilline G et 500 μ M de SMX pendant 24h. L'expression de ces marqueurs de surface de maturation [CD40, CD83, CD86, CCR7, HLA-DR pour les Mo-DC et CD40, CD86 et I-ab (molécules de classe II chez la souris C57Black6)] est mesurée par cytométrie en flux en utilisant des anticorps dirigés contre ces marqueurs de surface couplés à un fluorochrome

L'expression de ces marqueurs de surface de maturation est exprimée en fonction de deux paramètres :

- Pourcentage de cellules positives exprimant le marqueur étudié
- Intensité moyenne de fluorescence corrigée (MFIc)

Les profils d'expression des marqueurs obtenus sur les BM-DC et les Mo-DC après les avoir stimulées avec la pénicilline G et le SMX sont présentés dans les figures 46 et 47. Deux tableaux récapitulant les résultats obtenus sur l'ensemble des donneurs et des souris testés sont présentés dans le tableau 10 pour les Mo-DC et le tableau 11 pour les BM-DC.

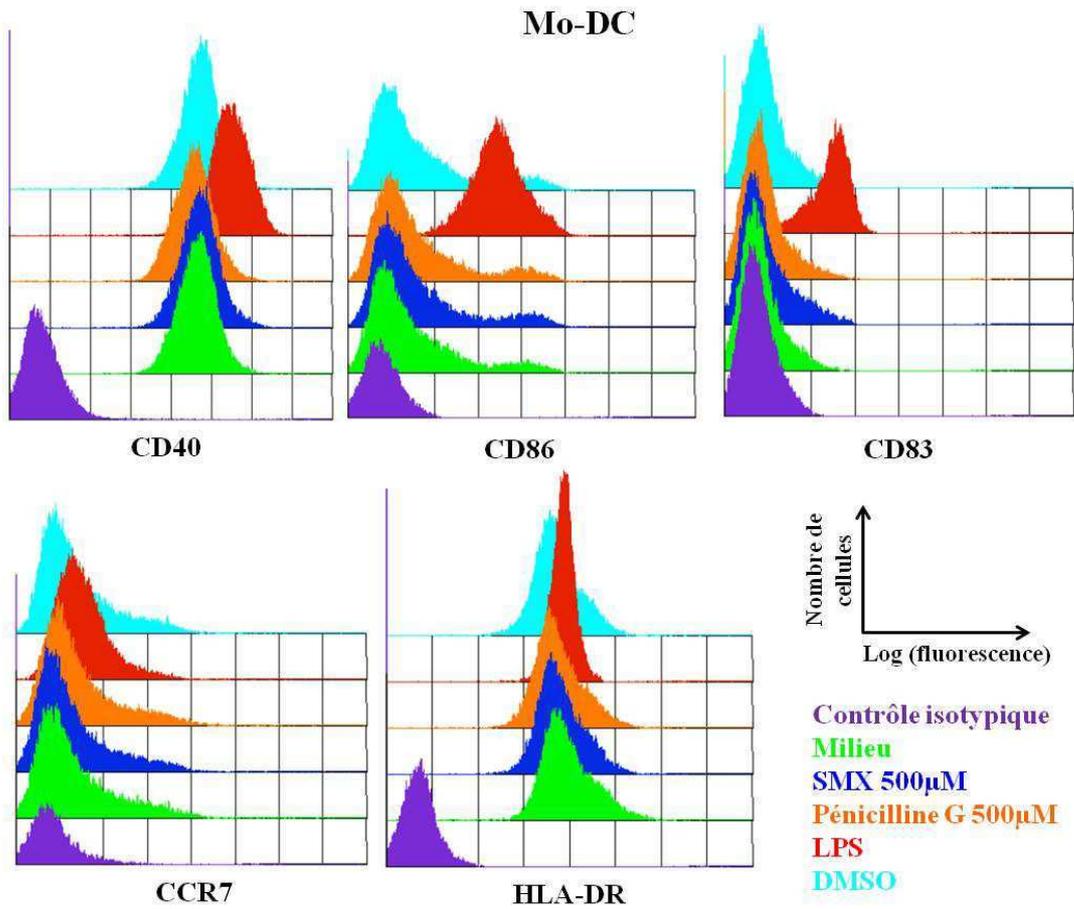


Figure 46: Profils d'expression des différents marqueurs sur les Mo-DC après stimulation par les médicaments (Pénicilline G ou SMX) ou par le LPS (témoin positif)

Marqueurs de surface (Mo-DC)	CD86		CD40		CD83		HLA-DR		CCR7	
	% de cellules positives	MFic	% de cellules positives	MFic	% de cellules positives	MFic	% de cellules positives	MFic	% de cellules positives	MFic
Milieu	29 ± 10	3,2 ± 1,8	100 ± 0,2	77 ± 20	5,2 ± 2,3	1,1 ± 0,1	100 ± 0,5	49 ± 8,1	11 ± 10	1,7 ± 0,4
SMX 500µM	30 ± 8,7	3,2 ± 1,5	100 ± 0,3	82 ± 23	7,4 ± 2,1	1,2 ± 0,1	100 ± 0,3	40 ± 5,6	11 ± 9,4	1,7 ± 0,4
Péni 500µM	29 ± 6,1	3,1 ± 1,4	100 ± 0,3	70 ± 19	6,6 ± 2,3	1,2 ± 0,1	100 ± 0,3	38 ± 4,7	11 ± 8,4	1,8 ± 0,6
LPS 25ng/ml	88 ± 18 *	34 ± 37 *	100 ± 0,3	217 ± 130 *	60 ± 31 *	4,4 ± 2,2 *	100 ± 0,1	36 ± 1,7 *	21 ± 20	2,6 ± 0,9
DMSO	28 ± 4,3	2,8 ± 0,9	100 ± 0,1	81 ± 17	5,5 ± 2,6	1,2 ± 0,1	100 ± 1,0	33 ± 4,0 *	9,0 ± 5,8	1,4 ± 0,2

Tableau 10: Expression des marqueurs de maturation suite un traitement des Mo-DC (n=3) par de la BP et du SMX. Le pourcentage (%) des cellules positives et l'intensité moyenne de fluorescence corrigée (MFic) sont indiqués. Les différences statistiquement significatives par rapport au milieu et au DMSO (pour le SMX uniquement) sont également indiquées : p<0,05*.

A l'état basal, les Mo-DC expriment fortement le CD40 et les molécules du CMH de classe II, HLA-DR (100% de cellules positives), moins fortement le CD86 (29% de cellules positives) et très faiblement le CD83 (5% de cellules positives) et le CCR7 (10% de cellules positives). Les profils d'expression des différents marqueurs étudiés (CD86, CD40, CD83, HLA-DR, CCR7) obtenus en fonction des différents traitements sur les Mo-DC [présence de SMX ou de Pénicilline G, présence de LPS (témoin positif) ou de DMSO (témoin négatif, véhicule du SMX)] montrent une différence de l'expression de ces marqueurs uniquement en présence de LPS. En effet, lorsque les Mo-DC sont cultivées en présence des deux médicaments, aucun changement dans l'expression de ces cinq marqueurs, que ce soit en terme de pourcentage de cellules positive ou de MFIC, n'est observé. Ainsi, seul le LPS induit une augmentation significative de l'expression du marqueur CD86 à la fois en terme de pourcentage de cellules positives et de MFIC, du marqueur CD40 en terme de MFIC, du marqueur CD83 à la fois en terme de pourcentage de cellules positives et de MFIC et une diminution de l'expression des molécules du CMH de classe II, uniquement en terme de MFIC, ce qui est assez surprenant.

BM-DC

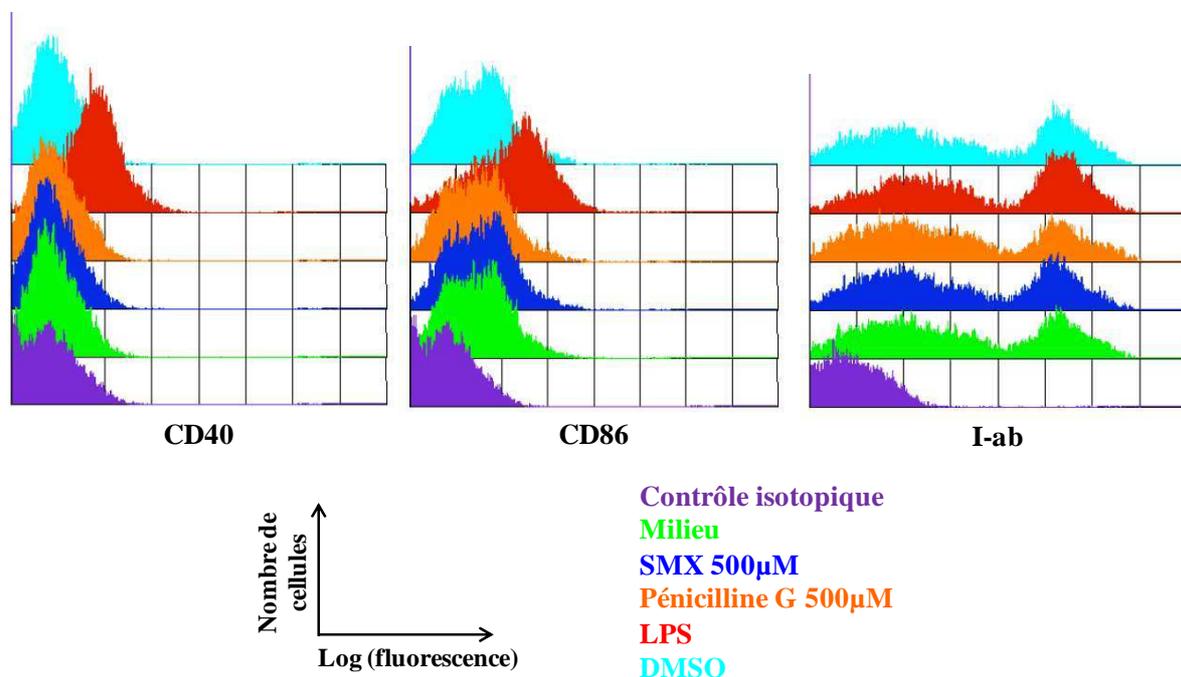


Figure 47: Profils d'expression des différents marqueurs sur les BM-DC après stimulation par les médicaments (Pénicilline G ou SMX) ou par le LPS (témoin positif) ou par le DMSO (véhicule du SMX)

Marqueur de surface	CD86		CD40		I-ab	
	% de cellules positives	MFic	% de cellules positives	MFic	% de cellules positives	MFic
Milieu	10 ± 4,8	2,0 ± 0,6	1,2 ± 0,7	1,2 ± 0,2	55 ± 12	16 ± 9,7
SMX 500µM	10 ± 5,2	2,0 ± 0,7	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	55 ± 12	16 ± 9,0
Péni 500µM	9,4 ± 5,5	2,0 ± 0,8	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,2	57 ± 15	17 ± 10
LPS 25ng/ml	45 ± 22 *	4,9 ± 2,4	32 ± 7,2 *	3,8 ± 1,0 *	72 ± 13	32 ± 18
DMSO	11 ± 4,6	2,1 ± 0,7	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,2	54 ± 12	15 ± 9,6

Tableau 11: Expression des marqueurs de maturation après traitement des BM-DC par la BP et le SMX (n=3). Les différences statistiquement significatives sont indiquées : p<0,05*.

A l'état basal, les BM-DC expriment faiblement le CD40 (1% de cellules positives) et le CD86 (10% de cellules positives) et concernant l'expression des molécules de classe II, Iab, il existe une population de cellules qui l'expriment fortement et une population de cellules qui l'expriment plus faiblement. Tout comme pour les Mo-DC, les profils d'expression des trois marqueurs étudiés (CD40, CD86 et I-ab) ne sont pas modifiés lorsque les BM-DC sont cultivés en présence de SMX ou de BP. En effet, aucun changement en terme de pourcentage de cellules positives ou de MFic n'est observé. Seule la stimulation par le LPS induit des changements de l'expression de ces marqueurs, en particulier une augmentation significative de l'expression du CD86 en terme de pourcentage de cellules positives et de l'expression du CD40 à la fois en terme de pourcentage de cellules positives et de MFic.

Les BM-DC ont été ensuite stimulées par les métabolites du SMX et les résultats préliminaires montrent qu'ils n'induisent pas de changements dans l'expression des marqueurs étudiés. Seul le LPS induit une augmentation significative de l'expression des marqueurs étudiés, en particulier des marqueurs CD40 et CD86 (*cf. figure 48 et tableau 12*).

BM-DC

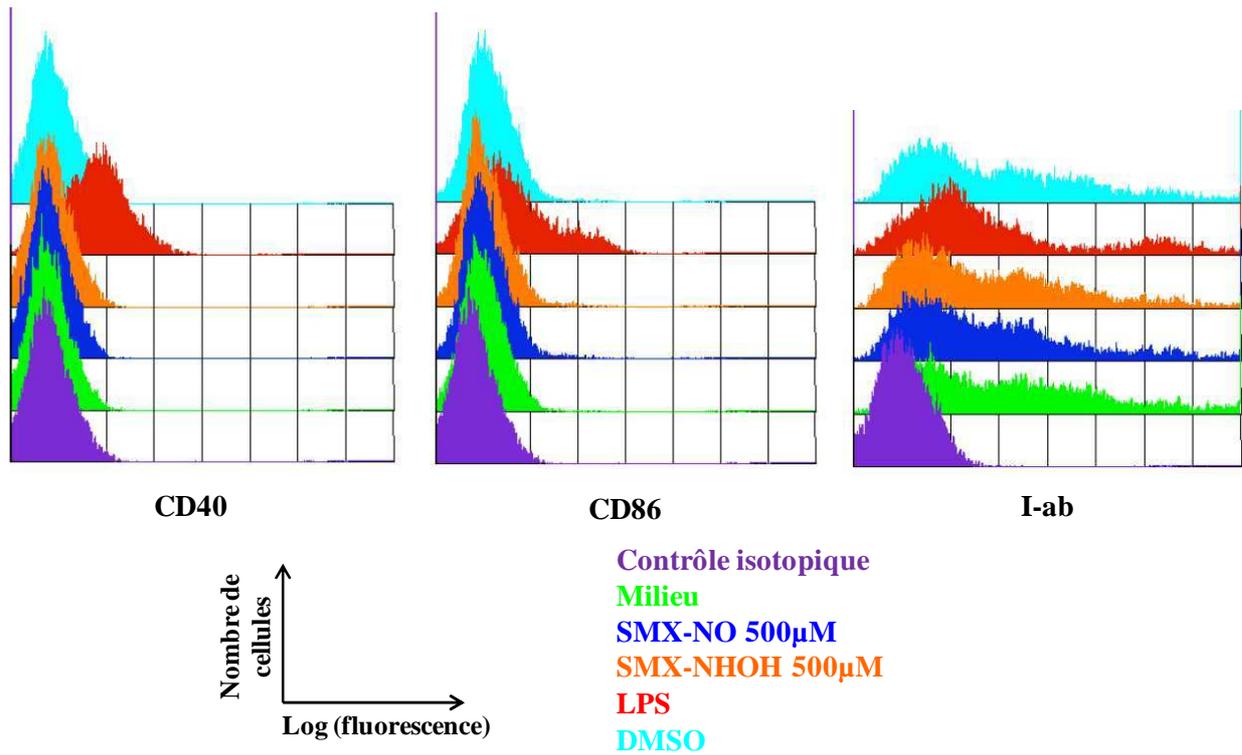


Figure 48: Profils d'expression des différents marqueurs sur les BM-DC après stimulation par les métabolites du SMX (SMX-NO et SMX-NHOH)

Marqueur de surface	CD86		CD40		I-ab	
	% de cellules positives	MFic	% de cellules positives	MFic	% de cellules positives	MFic
Milieu	2,03	1,26	0,41	0,99	57,10	11,0
SMX-NO 500µM	2,08	1,13	0,05	0,85	52,36	7,57
SMX-NHOH 500µM	3,07	1,22	0,54	0,95	48,47	6,79
LPS 25ng/ml	34,63	2,83	51,93	3,54	61,60	11,02
DMSO	5,33	1,41	0,91	1,02	53,92	8,92

Tableau 12: Expression des marqueurs de maturation après traitement des BM-DC par le SMX-NO et le SMX-NHOH (n=1)

DISCUSSION :

Dans un premier temps, nous avons étudié la cytotoxicité de la Pénicilline G et du SMX sur les BM-DC et les MO-DC et des deux métabolites du SMX, le SMX-NHOH et le SMX-NO sur les BM-DC. Ces études ont montré qu'aux concentrations étudiées, la viabilité cellulaire est supérieure à 80%. Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, des études réalisées sur les Mo-DC montrent qu'aucune toxicité n'est observée pour des concentrations de SMX allant jusqu'à 4mM et pour des concentrations de SMX-NO allant jusqu'à 500µM. Pour des concentrations de SMX-NO supérieures à 500µM, un pourcentage significatif de cellules nécrotiques est observé (Sanderson et al. 2007). Des études réalisées sur les BM-DC montrent que le SMX et le SMX-NO n'induisent pas de toxicité pour des concentrations allant respectivement jusqu'à 2 mM et jusqu'à 250 µM (Elsheikh et al. 2010), confirmant les résultats que nous avons obtenus. Néanmoins, au delà de 250 µM de SMX-NO, une forte mortalité des BM-DC est observée avec une viabilité inférieure à 70% alors que nous avons observé une viabilité de 80% pour une concentration de 500µM.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de ces composés sur l'expression de certains marqueurs de maturation des DC sur deux modèles de DC : les Mo-DC, modèle humain et les BM-DC, modèle murin. L'expression de cinq marqueurs a été étudiée sur les Mo-DC : CD86, CD40, CD83, HLA-DR et CCR7 et l'expression de trois marqueurs a été étudiée sur les BM-DC : CD86, CD40 et I-ab.

A l'état basal, les Mo-DC expriment fortement le CD40 et les molécules de classe II, HLA-DR, moins fortement le CD86 et faiblement le CD83 et le CCR7. A l'état basal, les BM-DC expriment faiblement le CD40 et le CD86 et présentent deux populations de cellules dont l'une exprime fortement les molécules de classe II, I-ab et l'autre plus faiblement. Ainsi, pour étudier les changements d'expression de ces marqueurs, nous avons pris en compte deux paramètres : le pourcentage de cellules positives et l'intensité moyenne de fluorescence corrigée par rapport au contrôle isotypique.

Les résultats montrent qu'aucun des médicaments (Pénicilline G, SMX et métabolites du SMX) n'induit de changements de l'expression des marqueurs étudiés sur les deux modèles de DC, contrairement au LPS, témoin positif, qui induit des changements de l'expression des marqueurs étudiés, en particulier du CD40, du CD83 et du CD86.

Concernant les BM-DC, une étude réalisée par l'équipe du Pr. Kevin Park apporte des résultats confirmant nos observations sur les BM-DC. En effet, lorsque les BM-DC sont

exposés au SMX ou au SMX-NO à des concentrations toxiques ou non toxiques, l'expression des marqueurs de maturation CD40, CD86 et molécules de classe II n'est pas augmentée (Elsheikh et al. 2010)

Concernant les Mo-DC, une autre étude réalisée par l'équipe du Pr. Kevin Park, a montré une augmentation de l'expression du CD40 lorsque les Mo-DC sont stimulées avec du SMX ou du SMX-NO. L'augmentation maximale de l'expression du CD40 est observée pour des concentrations de SMX comprises entre 250 et 500 μ M et une concentration de SMX-NO de 1 μ M (Sanderson et al. 2007). Nous ne retrouvons pas cette augmentation de l'expression du CD40 lorsque les Mo-DC sont cultivées en présence de SMX à 500 μ M. L'effet du SMX-NO sur les Mo-DC n'a pas été évaluée dans notre étude. Néanmoins, l'étude montre également que le SMX et le SMX-NO n'induisent pas de changement de l'expression du CD80, CD83 et CD86. Nous retrouvons ce résultat pour les deux marqueurs CD83 et CD86. Pour les auteurs, le SMX et le SMX-NO induisent un état semi-mature des Mo-DC puisque seule l'expression d'un marqueur de co-stimulation, le CD40 est augmentée et que l'expression des autres marqueurs de co-stimulation (CD80, CD83 et CD86) ne l'est pas.

Concernant l'effet des antibiotiques de la famille des β -lactames sur la maturation des DC, une étude portant sur les Mo-DC provenant de patients présentant une hypersensibilité de type retardée à l'amoxicilline et d'un groupe contrôle constitué de donneurs ne présentant pas d'historique d'hypersensibilités aux pénicillines a été réalisée par l'équipe du Dr. Miguel Blanca. Lorsque les Mo-DC de patients allergiques ou du groupe contrôle sont cultivées en présence de LPS ou de TNF- α , une augmentation de l'expression des molécules de classe II, HLA-DR et des marqueurs de co-stimulation CD80, CD83 et CD86 est observée. Lorsque les Mo-DC des patients allergiques sont cultivés en présence d'amoxicilline à 50 et 250 μ g/ml, une augmentation significative du pourcentage de cellules positives et de la MFI est observée pour les molécules de classe II, HLA-DR et les molécules de co-stimulation CD86 et CD80 mais l'expression du CD83 n'est pas modifiée en présence d'amoxicilline (Rodriguez-Pena et al. 2006). L'amoxicilline induit donc une maturation partielle uniquement des Mo-DC de patients allergiques à l'amoxicilline. En effet, l'expression de ces quatre marqueurs membranaires n'est pas augmentée chez les Mo-DC du groupe contrôle, cultivées en présence d'amoxicilline pendant 72h. Si les Mo-DC des patients allergiques sont cultivées à la fois en présence d'amoxicilline et de LPS ou de TNF- α , l'augmentation de l'expression des molécules de classe II, HLA-DR est plus importante que si les Mo-DC sont cultivés seulement avec le LPS ou le TNF- α , ce qui n'est pas le cas pour les marqueurs CD80 et CD86 (Rodriguez-Pena et al. 2006). Les Mo-DC de patients allergiques, cultivées en présence

d'amoxicilline sont alors capables d'induire la prolifération des LT autologues périphériques chez huit patients sur neuf, ce qui n'est pas le cas des Mo-DC du groupe contrôle (Rodriguez-Pena et al. 2006). Les auteurs suggèrent que cette différence peut être liée à des propriétés intrinsèques des Mo-DC des patients allergiques ou à d'autres facteurs présents dans le sérum des patients, tels que des cytokines, des chimiokines, des anticorps, des cellules nécrotiques ou apoptotiques etc..., facteurs pouvant moduler la maturation de la DC (Rodriguez-Pena et al. 2006). Une autre étude concernant la sécrétion d'IL-6 a été réalisée sur les DC isolées du sang périphérique d'une patiente ayant développé un exanthème maculopapuleux généralisé et une angio-œdème facial suite à un traitement à l'amoxicilline (Lima et al. 2010). Les DC plasmacytoïdes (pDC) caractérisées par l'expression du marqueur BDCA-2 (blood DC antigen 2) et les DC myéloïdes (mDC) caractérisées par l'expression du marqueur BDCA-1 (blood DC antigen 1) ont été isolées à partir d'un prélèvement de sang périphérique de la patiente. Lorsque les pDC sont stimulées par de l'amoxicilline ou de la BP, médicament pour lequel la patiente n'a jamais développé de réaction allergique, une augmentation de la sécrétion d'IL-6 est observée alors que lorsque les mDC sont stimulées par ces médicaments, aucun changement dans la sécrétion d'IL-6 n'est observé comparé au Mo-DC non stimulées. La sécrétion d'IL-6 est beaucoup plus importante lorsque les pDC sont stimulées avec la BP qu'avec l'amoxicilline. Ces résultats ayant été obtenus uniquement sur une patiente, les auteurs envisagent de confirmer leurs observations sur un nombre plus important de patients (Lima et al. 2010).

Ainsi, au vu de ces études, il semblerait que certains médicaments tels que le SMX, la BP ou l'amoxicilline et certains de leurs métabolites comme le SMX-NO, soient capables d'induire des changements phénotypiques (expression des molécules de co-stimulation comme le CD40) et/ou fonctionnels (sécrétion de cytokines comme l'IL-6) sur les DC humaines de donneurs allergiques mais également non allergiques, en particulier pour la modification de l'expression du CD40 par du SMX ou du SMX-NO. Ces modifications phénotypiques et fonctionnelles conduisent à l'induction d'une maturation partielle des DC humaines, suggérant que ces médicaments sont capables de jouer à la fois le rôle d'antigène et de signaux de danger même si ce ne sont pas des inducteurs forts de la maturation des DC.

Néanmoins, nos résultats ne confirment pas ces observations puisque ni le SMX et ni la BP ne sont capables d'induire une maturation partielle ou totale des DC humaines aux doses testées. Nos résultats montrent également que la BP et le SMX ainsi que ses métabolites n'induisent également pas la maturation des DC murines, résultats en accord avec la littérature (Elsheikh et al. 2010). Cependant, il serait intéressant de tester le SMX-NO sur les

Mo-DC afin de déterminer s'il induit ou non une augmentation du CD40. Si tel est le cas, les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation impliquées dans cette augmentation de l'expression du CD40 pourraient être par la suite étudiés.

DISCUSSION GENERALE

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués à l'échelle des LT et des DC, dans les allergies aux médicaments, en particulier à la BP et au SMX. Trois axes de recherche ont été développés au cours de mon doctorat et constitueront les trois sous-parties de la discussion (*cf. figure 37 dans les objectifs des résultats*):

- 1- Détermination de la fréquence des LT spécifiques des médicaments chez des donneurs non allergiques
- 2- Détermination des peptides couplés aux médicaments et présentés aux LT
- 3- Effet des médicaments sur l'état de maturation des DC

1- Détermination de la fréquence des LT chez des donneurs non allergiques

L'objectif de cette première sous-partie du projet était de savoir si chez des patients non allergiques, il existait des LT spécifiques de la BP et si oui, quelle était leur fréquence. En effet, il semblerait que la taille du répertoire des LT CD4⁺ spécifiques d'un Ag donné contrôle en partie l'intensité de la réponse lymphocytaire CD4⁺ dirigée contre cet Ag (Moon et al. 2007). Cette observation laisse à penser que le potentiel immunogène d'un Ag donné peut être évalué en déterminant la fréquence des LT CD4⁺ naïfs spécifiques de cet Ag. Une étude menée sur les anticorps monoclonaux thérapeutiques tend à confirmer cette hypothèse (Delluc et al. 2011). Nous avons ainsi décidé d'évaluer la fréquence des LT CD4⁺ naïfs spécifiques de la BP chez des donneurs non allergiques.

Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la méthodologie développée par le Dr. Stéphanie Delluc (Indicia, Lyon) et le Dr. Bernard Maillère (CEA, Saclay) (Delluc et al. 2010; Delluc et al. 2011) (*cf. figure 34*) pour plusieurs raisons :

- En utilisant des DC autologues pour la présentation de l'Ag (bio-conjugués HSA-BP) aux LT, il n'est pas nécessaire de connaître le ou les épitopes issus de cet Ag qui sont reconnu(s) par les LT, contrairement à la méthodologie des tétramères. En effet, les DC vont capturer l'Ag et le digérer en peptides dont certains porteront la BP et seront présentés aux LT via les molécules HLA de classe II
- Les possibles restrictions aux molécules HLA de classe II sur la reconnaissance de l'Ag par les LT CD4⁺ peuvent être étudiées en testant plusieurs donneurs, qui présentent des molécules HLA de classe II différentes.
- Les restimulations successives par des DC autologues matures chargées avec l'Ag permettent d'amplifier uniquement les LT spécifiques de l'Ag, améliorant la

sensibilité de l'approche et permettant ainsi de détecter des LT spécifiques de l'Ag, présents même à de faibles fréquences.

- La possibilité de déterminer la fréquence des LT spécifiques de l'Ag en utilisant la loi statistique de Poisson.

Néanmoins, nous aurions très bien pu utiliser la méthodologie développée par l'équipe du Dr. Federica Sallusto (Geiger et al. 2009) (*cf. figure 32 dans la partie Introduction*). Dans cette méthodologie, une étape préalable d'amplification polyclonale des LT avec de la PHA (Phytohaemagglutinine) est réalisée, ce qui permet d'augmenter la sensibilité de la méthodologie en amplifiant les LT spécifiques de l'Ag, qui peuvent être ainsi mieux détectés. L'amplification dure quatorze jours et permet d'atteindre des facteurs d'amplification de 1000 à 5000. Il est alors possible pour un même individu de cribler un ou plusieurs Ag donné(s). Le ou les Ag est/sont présentés par des monocytes autologues, ce qui permet d'étudier de possibles restrictions aux molécules HLA de classe II. De plus, en utilisant des CPA, il n'est également pas nécessaire de connaître le ou les épitopes issus de l'Ag qui sont reconnu(s) par les LT. La spécificité des LT pour un Ag donné est évaluée par mesure de leur prolifération (incorporation de thymidine tritiée), quatre jours après la stimulation antigénique. La fréquence des LT CD4⁺ spécifiques de l'Ag testé est aussi calculée en employant la loi statistique de Poisson. L'équipe du Pr. Kevin Park a développé une méthodologie similaire afin de mieux caractériser la réponse lymphocytaire induite par un médicament (Faulkner et al. 2012). Cette méthodologie consiste à cultiver des LT en présence de Mo-DC immatures et du médicament à tester pendant une semaine. Une semaine après, les LT sont restimulés en présence de Mo-DC et du médicament à tester et plusieurs caractéristiques de la réponse lymphocytaire sont alors évaluées : la prolifération est mesurée par CFSE et par incorporation de thymidine tritiée, la sécrétion de certaines cytokines a été évaluée par ELISpot et le phénotype des LT a été caractérisé. Dans le cas du SMX-NO, une prolifération des LT CD4⁺ et des LT CD4⁺ naïfs est observée lorsqu'ils sont restimulés par des Mo-DC en présence de SMX-NO. Ces LT en prolifération en réponse au SMX-NO, sont CFSE⁻ et expriment le marqueur CD45RO. Ainsi, les LT spécifiques du SMX-NO sont passés d'un phénotype de LT naïf CD45RO⁻ à un phénotype de LT mémoires CD45RO⁺. L'étude de la sécrétion de trois cytokines : IFN γ , IL-5 et IL-13 a été évaluée par ELISpot. L'IFN- γ et l'IL-13 sont sécrétées par les LT des trois donneurs testés alors que l'IL-5 est sécrétée uniquement par deux des trois donneurs (Faulkner et al. 2012). Dans le cadre de la méthodologie que nous avons utilisée, la sécrétion d'IFN γ est utilisée comme marqueur d'activation des LT spécifique de l'Ag testé. Les LT sont ainsi cultivés en présence d'un cocktail cytokinique qui induit une différenciation

arbitraire de type Th1, ce qui n'est pas le cas de la technique développée par l'équipe de Kevin Park (Faulkner et al. 2012). Une autre méthodologie similaire concernant l'étude du potentiel immunogène des sensibilisants de contact tel que le DNBS a également été développée par l'équipe du Pr. Stefan Martin (Dietz et al. 2010). Elle consiste à réaliser des co-cultures de LT naïfs ($CD4^+$ ou $CD8^+$) avec des DC autologues matures préalablement mises en présence du sensibilisant de contact à tester. Après une semaine, une nouvelle stimulation des LT naïfs est réalisée avec des DC autologues matures et la prolifération des LT est mesurée par thymidine tritiée ainsi que la production d'IFN- γ et de TNF- α par marquage intracellulaire et détection par cytométrie en flux. Cette méthode permet alors d'étudier l'activation des LT naïfs spécifiques d'un sensibilisant de contact, par la mesure du pourcentage de LT $CD4^+$ ou $CD8^+$ sécrétrices d'IFN- γ (Dietz et al. 2010). Avec ces quatre méthodologies, il est possible également de s'intéresser à différentes sous-populations de LT telles que les LT totaux, les LT $CD4^+$, les $CD8^+$, les LT naïfs ou les LT mémoires par exemple.

Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi d'étudier les LT $CD4^+$ totaux, les LT $CD4^+$ naïfs et les LT $CD4^+$ mémoires. En effet, plusieurs études ont montré que la majorité des LT spécifiques de la BP sont de type $CD4^+$ lorsqu'ils sont isolés du sang périphérique (Brander et al. 1995; Padovan et al. 1996; Weltzien et al. 1998). Nous avons montré qu'il existe chez des donneurs non-allergiques des LT $CD4^+$ spécifiques de la BP, à une fréquence moyenne de 0,29 LT spécifique de la BP par million de LT $CD4^+$. Lorsque les expériences ont été réalisées sur les LT $CD4^+$ naïfs, la fréquence moyenne est de 0,69 LT spécifique de la BP par million de LT $CD4^+$ naïfs (*cf. article 1*). Cette différence n'est pas statistiquement significative du fait du faible nombre de donneurs testés en particulier pour les LT naïfs. Ces fréquences sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour des Ac thérapeutiques comme le rituximab (anti-CD20), l'adalimumab (anti-TNF- α) et l'infliximab (anti-TNF- α). Ces trois Ac présentent des fréquences respectives de 0,35 ; 0,33 et 0,2 LT spécifique par million de LT $CD4^+$ périphériques et sont connus pour être immunogènes et pour induire la production d'Ac anti-Ac thérapeutiques chez un nombre significatif de patients (Delluc et al. 2011). D'autres Ac thérapeutiques comme le bevacizumab (anti-VEGF-A), le trastuzumab (anti-HER2/neu) et l'étanercept (anti-TNF α , protéine de fusion) présentent des fréquences plus faibles, qui sont respectivement de 0,1 ; 0,02 ; 0,01 LT spécifique par million de LT $CD4^+$ périphériques et sont plutôt bien tolérés chez les patients (Delluc et al. 2011). Cette étude montre qu'il est possible de relier l'immunogénicité des protéines thérapeutiques avec la fréquence des LT qui leur sont spécifiques (Delluc et al. 2011). Cette méthodologie a

également été employée pour déterminer la fréquence des LT spécifiques de l'EPO chez des volontaires sains afin de comprendre l'augmentation des cas d'anémies réfractaires observées au début des années 2000 chez des patients traités avec de l'EPO recombinante (Delluc et al. 2010). Des LT spécifiques de l'EPO ont été détectés chez 4 des 9 donneurs testés, correspondant à une fréquence moyenne de 0,53 LT spécifique de l'EPO par million de LT CD4⁺ périphériques, en considérant les 5 donneurs non répondeurs. La fréquence des LT spécifiques de l'EPO est également du même ordre de grandeur que celle obtenue pour la BP. Pour des protéines très immunogènes comme la KLH, des fréquences beaucoup plus élevées sont retrouvées : 5 à 30 LT spécifiques de la KLH par million de LT CD4⁺ totaux en utilisant notre méthodologie (Delluc et al. 2011; Maillere et al. 2012). En utilisant la méthodologie développée par l'équipe du Dr. Federica Sallusto, la fréquence des LT spécifiques de la KLH est un peu plus élevée : de l'ordre de 10 à 70 LT spécifiques par million de LT CD4⁺ naïfs issus du sang périphérique (Geiger et al. 2009). Ainsi, la fréquence élevée de LT spécifiques de la BP détectées chez des donneurs non allergiques peut constituer un élément de réponse permettant d'expliquer la forte incidence des allergies à la BP.

Chez les patients allergiques, deux études ont été publiées quant à la détermination de la fréquence des LT mémoires spécifiques de médicaments (Beeler et al. 2006; Rozieres et al. 2009). Dans une première étude menée sur cinq patients allergiques à cinq médicaments différents (amoxicilline, vancomycine, sulfaméthoxazole, phénytoïne et carbamazépine), la fréquence de LT mémoires spécifiques de ces médicaments dans le sang périphérique de ces cinq patients a été évaluée soit par mesure de leur prolifération ou soit par mesure des cytokines secrétées (ELISpot). La fréquence obtenue par mesure de la prolifération est de 200 à 4000 LT spécifiques par million de PBMC et la fréquence obtenue par mesure de la cytokine la plus sécrétée est de 100 à 400 LT spécifiques. Ces fréquences sont du même ordre que celle obtenue pour l'anatoxine tétanique (Beeler et al. 2006). Dans la deuxième étude menée sur vingt-deux patients présentant un exanthème maculo-papuleux lié à une réaction allergique à l'amoxicilline et un patch test positif pour l'amoxicilline, la fréquence des LT circulants spécifiques de l'amoxicilline a été évaluée avec un ELISpot IFN γ (Rozieres et al. 2009). Dans cette étude, des LT circulants spécifiques de l'amoxicilline sont détectés chez vingt patients sur les vingt-deux étudiés et la fréquence des LT mémoires spécifiques de l'amoxicilline varie entre 30 à 125 LT spécifiques par million de PBMC du sang périphérique. Ainsi, chez des patients allergiques, la fréquence des LT spécifiques du médicament impliqué est beaucoup plus élevée que celle obtenue chez des donneurs non allergiques (environ 10 à 13000 fois plus élevée en fonction de l'étude et de la méthode

utilisée) et est liée à l'amplification des LT naïfs préexistants spécifiques du médicament impliqué.

Il est également intéressant de noter que dans notre étude, chez tous les donneurs testés, des LT CD4⁺ ou CD4⁺ naïfs spécifiques de la BP ont été détectés. L'incidence des allergies à la BP n'est pas de 100% et nous observons la présence de LT spécifiques de la BP chez 100% des donneurs testés, qui ne sont ni sensibilisés, ni allergiques à la BP au vue des dosages d'IgE et d'IgG. Ainsi, la seule présence de LT spécifiques de la BP est certes un facteur nécessaire mais ne constitue pas un facteur suffisant au développement d'allergies à la BP. D'autres facteurs semblent donc nécessaires au développement des allergies à la BP. L'activation des LT nécessite trois signaux : la présentation au TcR d'un peptide dérivé de l'Ag lié au CMH de la DC, le signal apporté par les molécules de co-stimulation et le dernier signal apporté par les cytokines sécrétées par les DC. Il paraît évident que la DC en présence du médicament et des signaux de danger adéquats joue un rôle important dans le développement des allergies à la BP en permettant l'activation de ces LT spécifiques de la BP (*ce thème sera développé dans la troisième partie*).

La réactivité de la BP est également un facteur à prendre en considération : un médicament qui présente une réactivité lui permettant de se fixer à de nombreuses protéines, pourra à priori produire de nombreux épitopes et présentera ainsi une probabilité plus importante d'être présenté aux LT. C'est pourquoi dans le cadre de notre étude, nous avons choisi d'induire les lignées lymphocytaires en utilisant le bio-conjugué HSA-BP synthétisé à pH basique plutôt que celui synthétisé à pH physiologique. En effet, les analyses en spectrométrie de masse montrent que le bio-conjugué synthétisé à pH basique présente environ dix-sept molécules de BP fixées par molécule d'HSA alors que le bio-conjugué HSA-BP synthétisé à pH physiologique n'en présente qu'une. En chargeant les DC avec le bio-conjugué HSA-BP synthétisé à pH basique, la probabilité qu'elle présente via leurs molécules HLA de classe II des peptides issus de ce bio-conjugués et comportant la BP fixée de manière covalente est alors plus grande. De ce fait, la probabilité de pouvoir détecter des LT spécifiques de la BP est augmentée en utilisant le bio-conjugué synthétisé à pH basique plutôt que celui synthétisé à pH physiologique. Néanmoins, la question de la validité biologique de l'utilisation d'un pH basique se pose. Est-il possible de trouver au sein de l'organisme un endroit ou un microenvironnement avec un pH basique proche de 10 ? La question reste ouverte ! Cependant, l'équipe de Kevin Park a récemment publié une étude démontrant la possibilité de synthétiser un bio-conjugué HSA-BP à pH physiologique présentant quatorze molécules de BP fixées par molécule d'HSA (Meng et al. 2011). Sur ce bio-conjugué, douze

sites de fixation sur la HSA ont été identifiés correspondant aux lysines : 20, 137, 159, 190, 195, 199, 212, 351, 432, 525, 541, 545. Ces douze sites de fixation sont également retrouvés sur les bio-conjugués isolés du sérum de patients allergiques à la BP, auxquels il faut également ajouter deux sites supplémentaires, correspondant aux lysines 372 et 436 (Meng et al. 2011). Sur ces douze sites de fixation identifiés, six (lysines 190, 195, 199, 432, 541, 545) avaient déjà été mis en évidence par l'équipe de Jean-Michel Wal à la fin des années 90 (Yvon et al. 1988; Yvon et al. 1989; Yvon et al. 1990). Certaines de ces lysines ont également été identifiées comme pouvant fixer *in vitro* (synthèse de bio-conjugués) et *in vivo* (bio-conjugués isolés du sérum de patients allergiques) d'autres antibiotiques de la famille des β -lactames comme la flucloxacilline et la pipéracilline. Il s'agit des lysines 190, 195, 432 et 541 de la HSA (*cf. tableau 4 de la partie introduction*). Il nous paraît alors probable de retrouver ces lysines ou au moins une partie de ces lysines parmi celles sur lesquelles se fixe la BP dans les deux bio-conjugués que nous avons synthétisés (*cf. partie I des résultats complémentaires*). L'étude réalisée par l'équipe de Kevin Park met également en évidence que la BP peut se réarranger spontanément en acide pénicillénique en présence d'HSA et cet acide pénicillénique est capable ensuite de se fixer de manière covalente aux lysines de la HSA, donnant lieu à un adduit pénicilloyl diastéréoisomère de celui obtenu avec la BP (Meng et al. 2011). L'adduit pénicilloyl diastéréoisomère obtenu avec l'acide pénicillénique semble être plus immunogène que celui obtenu avec la BP et induit une prolifération plus importante des LT de patients allergiques à la BP (Meng et al. 2011). Nous aurions très bien pu utiliser la méthodologie développée par l'équipe de Kevin Park afin de nous affranchir de l'utilisation d'un pH basique lors de la synthèse du bio-conjugué HSA-BP à pH basique mais nous avons préféré utiliser notre bio-conjugué synthétisé à pH basique car les expériences cellulaires avaient déjà été menées sur un nombre important de donneurs lorsque que la méthodologie développée par l'équipe du Pr. Kevin Park a été publiée.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux restrictions aux molécules HLA de classe II, en particulier les molécules HLA-DR. Plusieurs études ont montré des restrictions aux molécules HLA de classe I lors de la présentation du médicament aux LT CD8⁺, comme dans le cas par exemple, du développement du syndrome d'hypersensibilité associé à l'abacavir (AHS) chez des individus présentant l'allotype HLA-B*5701 (Hetherington et al. 2002; Mallal et al. 2002; Martin et al. 2004; Chessman et al. 2008; Saag et al. 2008; Illing et al. 2012; Ostrov et al. 2012) ou dans le cas du développement de syndromes d'hépatites liées à une allergie à la flucloxacilline chez des individus présentant également l'allotype HLA-B*5701 (Daly et al. 2009). Ces restrictions peuvent être utilisées à profit pour réduire la

prévalence des allergies médicamenteuses. Par exemple, le criblage des patients pour l'allèle HLA-B*57 :01, recommandé par la FDA avant leur traitement à l'abacavir a permis de réduire la prévalence du syndrome d'hypersensibilité associé à l'abacavir chez les patients traités (Mallal et al. 2008). Concernant les allergies à la BP, des études ont montré que la majorité des clones lymphocytaires spécifiques de la pénicilline G, isolés à partir du sang périphérique de patients allergiques présentaient une restriction aux molécules HLA-DR concernant la présentation de la BP (Padovan et al. 1996). Dans le cas de notre étude, un typage des molécules HLA-DR a été réalisé sur tous les donneurs testés et révèle une diversité dans les molécules HLA-DR présentes chez les donneurs testés. Les allotypes les plus fréquents dans la population caucasienne sont présents si l'on considère l'ensemble des donneurs testés. Pour tous les donneurs testés, des LT CD4⁺ ou des LT CD4⁺ CD45RA⁺ spécifiques de la BP sont détectés quelles que soient les molécules HLA-DR du donneur. Les résultats montrent donc qu'il n'y a pas de restrictions particulières aux molécules HLA-DR dans le cas de la reconnaissance de la BP par des LT de donneurs non allergiques.

Enfin, l'approche expérimentale utilisée pour la détermination de la fréquence des LT spécifiques de la BP chez des donneurs non allergique sera appliquée à d'autres médicaments, à commencer par le SMX. En effet, en utilisant le SMX-NO, il est possible de réaliser des bio-conjugués HSA-SMX-NO étant donné que le SMX-NO se fixe à aux résidus thiols des cystéines (Callan et al. 2009) et de les tester sur les LT de donneurs non allergiques. Il sera alors intéressant de voir si des résultats similaires sont retrouvés avec d'autres médicaments : détection de LT spécifiques du médicament chez tous les donneurs testés et obtention d'une fréquence similaire ou non à celle observée avec la BP. Ainsi en testant plusieurs médicaments connus pour induire des allergies chez un nombre significatif de patients traités, il serait possible d'établir une échelle avec les fréquences obtenues et peut-être de l'utiliser comme un outil dans la détection du « potentiel allergisant » des nouveaux médicaments.

2 -Détermination des peptides couplés aux médicaments présentés aux LT

Concernant l'identification des épitopes présentés aux LT spécifiques de la BP, nous avons développé deux démarches originales :

- Une approche de modélisation moléculaire par l'utilisation du logiciel SUMO
- Une approche expérimentale par l'utilisation des bio-conjugués.

Comme mentionné précédemment, nous sommes en attente de la synthèse du monomère lysine couplée à la BP pour synthétiser les peptides et vérifier leur validité biologique, ce qui nous permettrait également de valider nos stratégies expérimentales.

3-Effet des médicaments sur les DC

Nous avons vu que chez des patients allergiques et non allergiques, des LT spécifiques de la BP ont été décrits, suggérant la présence de récepteurs de LT spécifiques de la BP et une présentation de la BP par des APC telles que des DC.

Nous nous sommes alors intéressés aux mécanismes d'activation des DC dans le cadre des allergies médicamenteuses et nous avons plus particulièrement étudié l'effet de deux médicaments : la BP et le SMX, sur l'état de maturation des DC. L'idée était alors de savoir si ces médicaments pouvaient induire la maturation des DC, en jouant à la fois le rôle d'Ag et le rôle de signal de danger, comme cela avait été décrit pour certains sensibilisants de contact tels que le DNCB ou le Nickel.

Des travaux réalisés par l'équipe du Pr. Kevin Park et l'équipe de Dr. Miguel Blanca ont montré que le SMX et le SMX-NO augmentaient l'expression du CD40, molécule de co-stimulation sur des Mo-DC de donneurs sains (Sanderson et al. 2007) et que l'amoxicilline augmentait l'expression des molécules du CMH de classe II (HLA-DR) et des molécules de co-stimulation comme le CD80 et le CD86, uniquement sur des Mo-DC provenant de donneurs hypersensibles (Rodriguez-Pena et al. 2006). Les auteurs évoquent alors la possibilité que les médicaments puissent induire un état semi-mature des DC, caractérisé par l'augmentation de l'expression des molécules du CMH et des molécules de co-stimulation et une faible voire une absence de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Lutz et al. 2002). Dans le cas du SMX et plus particulièrement du SMX-NO, une prolifération des LT spécifiques du SMX-NO est observée lorsque les LT cultivés pendant une semaine en présence de DC et de SMX-NO, sont à nouveau restimulés par des DC et du SMX-NO. Aucun signal de danger n'est ajouté aux cultures cellulaires. De ce fait, le SMX-NO serait donc capable d'induire une maturation des DC, qui vont alors pouvoir présenter le SMX-NO aux LT et induire une prolifération des LT spécifiques (Faulkner et al. 2012). En effet, le rôle des DC est primordial dans l'induction de la réponse primaire lymphocytaire spécifique du SMX-NO puisque l'expansion des LT spécifiques du SMX-NO et le changement du phénotype naïf CD45RO⁻ au phénotype mémoire CD45RO⁺ ne sont plus observés si les Mo-DC ne sont pas présentes dans la co-culture (Faulkner et al. 2012). Dans le cas de

l'amoxicilline, l'effet n'est observé que sur les Mo-DC provenant de patients allergiques, suggérant que l'effet de l'amoxicilline sur ces Mo-DC pourrait être dû à des propriétés intrinsèques des Mo-DC de patients allergiques. De plus, les Mo-DC de patients allergiques, traitées avec de l'amoxicilline sont capables d'induire la prolifération de LT autologues chez huit patients sur neuf. Lorsque d'autres APC comme les monocytes ou les LB sont utilisées à la place des DC, la prolifération des LT autologues n'est observée que chez deux patients sur neuf, démontrant l'efficacité des DC à présenter le médicament et à induire la prolifération des LT (Rodriguez-Pena et al. 2006). L'étude montre également que les Mo-DC traitées avec de l'amoxicilline sont capables d'induire la prolifération des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺ alors que les monocytes ou les LB traitées avec de l'amoxicilline n'induisent que la prolifération des LT CD8⁺. Ainsi, l'amoxicilline semble être à la fois un Ag et un inducteur de la maturation *in vitro* des DC de patients allergiques, et ces DC sont ensuite capables d'activer différentes sous-populations de LT (Rodriguez-Pena et al. 2006). Une autre étude, confirmant cette observation a été réalisée sur dix patients allergiques à des agents neuromusculaires bloquants, pour lesquels les TTL sont négatifs (Aubert et al. 2004). En utilisant des DC matures traitées avec les agents neuromusculaires bloquants, une prolifération des LT est observée pour trois des dix patients alors que lors des TTL, aucune prolifération des LT n'avait été observée pour les dix patients. Les DC sont ainsi capables de présenter des épitopes provenant des agents neuromusculaires bloquants et d'induire une prolifération des LT spécifiques et permettent ainsi une meilleure détection des patients allergiques. Néanmoins, pour sept des dix patients allergiques, aucune prolifération des LT n'est observée, suggérant que des mises au point sont nécessaires afin d'améliorer le seuil de sensibilité de ce test (Aubert et al. 2004).

Nous n'avons pas été en mesure de démontrer que des médicaments comme la BP ou le SMX et ses métabolites (SMX-NHOH et SMX-NO) soient capables d'induire *in vitro* une maturation partielle ou totale des DC. En effet, nous avons étudié l'effet de ces médicaments et de ces métabolites sur deux modèles de DC (Mo-DC et BM-DC) en termes de cytotoxicité et d'expression de marqueurs de maturation (molécules de co-stimulation et molécules HLA-de classe II). Nos résultats montrent que les médicaments seuls n'induisent pas de maturation partielle ou totale des DC.

Un signal de danger en plus des médicaments nous paraît donc nécessaire à la maturation des DC et à la présentation des médicaments aux LT. Il semble envisageable dans le cas des antibiotiques tels que la BP ou le SMX qui sont prescrits en cas d'infections bactériennes, que l'agent pathogène puisse constituer une possible source de signaux de

danger. Dans ce cas, lors du traitement, il est possible que la maturation des DC soit induite par la présence de la BP et de signaux de danger provenant par exemple, de l'agent pathogène, permettant alors aux DC de présenter la BP aux LT. Dans le cas du SMX, une autre hypothèse concernant la source de signaux de danger peut être envisagée : il s'agit de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), connus comme étant capables d'induire la maturation des DC (Rutault et al. 1999). En effet, il semble que l'auto-oxydation du SMX-NHOH en SMX-NO peut induire une production de ROS (Vyas et al. 2005). Aussi, dans le cas du SMX, il a également été montré que certains signaux de danger comme des endotoxines bactériennes (LPS), des protéines virales, des cytokines (IL-1 β ; IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , TGF- β), des inducteurs du stress oxydatif (H₂O₂) favorisent également la formation d'adduits protéines-SMX intracellulaires, qui pourront alors être présentés aux LT (Lavergne et al. 2009).

CONCLUSION

ET PERSPECTIVES

Même si tous les mécanismes impliqués dans le développement des allergies médicamenteuses ne sont pas tous connus au jour d'aujourd'hui, de nombreux progrès ont été récemment effectués dans la compréhension des allergies médicamenteuses. Ainsi, certains éléments semblent jouer un rôle important tels que :

- La réactivité du médicament et sa capacité à se fixer de manière covalente à des protéines formant des bio-conjugués potentiellement immunogènes en quantités plus ou moins importantes (principe de l'haptène)
- Le métabolisme du médicament et l'apparition potentielle de métabolites réactifs (pro-haptène)
- Le polymorphisme génétique, illustré avec l'exemple des restrictions aux molécules HLA
- L'activation et la maturation des cellules dendritiques en présence du médicament avec ou sans signaux de danger, qui sont induits ou non par le médicament
- L'activation des lymphocytes spécifiques du médicament par des cellules dendritiques présentant le médicament via ces molécules HLA (principe de l'haptène) ou directement par fixation au récepteur du lymphocyte (p-I concept)

Ce travail de recherche a permis tout d'abord de mettre en évidence la présence de lymphocytes T spécifique de la pénicilline G dans le sang de donneurs non allergiques et de quantifier leur fréquence. Cette approche expérimentale sera employée avec d'autres médicaments connus pour induire des allergies comme le SMX, l'Amoxicilline, la Flucloxacilline, l'Abacavir, la Carbamazépine, la Lidocaïne etc... En fonction des résultats obtenus, il sera alors possible de déterminer si la mesure de la fréquence des lymphocytes T spécifiques du médicament testé dans le sang de donneurs non allergiques peut être corrélée au pouvoir allergisant des ces molécules.

Ensuite, une caractérisation plus précise de la réponse primaire des LT CD4⁺ naïfs dirigée contre le médicament, en terme de sécrétion de cytokine est également envisagée afin de comprendre plus précisément les mécanismes moléculaires impliqués dans la polarisation de cette réponse lymphocytaire. A cet effet, la méthodologie développée par l'équipe du Pr. Kevin Park (Faulkner et al. 2012) pourra être employée.

Puis, nous avons également développé des approches expérimentales et de modélisation pour déterminer les épitopes potentiellement présentés aux lymphocytes T dans le cas des allergies à la BP. Nos efforts se concentrent actuellement sur la synthèse du monomère lysine couplée à la pénicilline G. Une fois le monomère obtenu, les peptides

seront synthétisés et les tests biologiques pourront être réalisés. Les résultats nous permettront alors de valider ou non notre démarche expérimentale et de modélisation et de déterminer si cette démarche peut s'appliquer à l'étude d'autres épitopes potentiellement présentés aux lymphocytes T dans le cas d'allergies à d'autres médicaments.

Ensuite, nous avons montré que la pénicilline G et le sulfaméthoxazole ne sont pas capables d'induire une maturation des cellules dendritiques, en terme d'expression des marqueurs de co-stimulation et des molécules HLA de classe II.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Ade, N., D. Antonios, et al. (2007). "NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO(4) but not by DNCB." Toxicol Sci **99**(2): 488-501.
- Aihara, M. (2011). "Pharmacogenetics of cutaneous adverse drug reactions." J Dermatol **38**(3): 246-54.
- Akerlund, B., E. Tynell, et al. (1997). "N-acetylcysteine treatment and the risk of toxic reactions to trimethoprim-sulphamethoxazole in primary Pneumocystis carinii prophylaxis in HIV-infected patients." J Infect **35**(2): 143-7.
- Alfirevic, A., A. C. Stalford, et al. (2003). "Slow acetylator phenotype and genotype in HIV-positive patients with sulphamethoxazole hypersensitivity." Br J Clin Pharmacol **55**(2): 158-65.
- Allan, S. E., S. Q. Crome, et al. (2007). "Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production." Int Immunol **19**(4): 345-54.
- Antonios, D., N. Ade, et al. (2009). "Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways." Toxicol In Vitro **23**(2): 227-34.
- Apetoh, L., F. J. Quintana, et al. (2010). "The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27." Nat Immunol **11**(9): 854-61.
- Aubert, N., P. M. Mertes, et al. (2004). "Dendritic cells present neuromuscular blocking agent-related epitopes to T cells from allergic patients." Allergy **59**(9): 1022-3.
- Baert, F., M. Noman, et al. (2003). "Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease." N Engl J Med **348**(7): 601-8.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Bartelds, G. M., C. A. Wijbrandts, et al. (2007). "Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **66**(7): 921-6.
- Beeler, A., O. Engler, et al. (2006). "Long-lasting reactivity and high frequency of drug-specific T cells after severe systemic drug hypersensitivity reactions." J Allergy Clin Immunol **117**(2): 455-62.
- Beeler, A., L. Zaccaria, et al. (2008). "CD69 upregulation on T cells as an in vitro marker for delayed-type drug hypersensitivity." Allergy **63**(2): 181-8.
- Bender, N. K., C. E. Heilig, et al. (2007). "Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients." Rheumatol Int **27**(3): 269-74.
- Bendtsen, K., P. Geborek, et al. (2006). "Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab." Arthritis Rheum **54**(12): 3782-9.
- Bentley, R. (2009). "Different roads to discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence beta-lactams)." J Ind Microbiol Biotechnol **36**(6): 775-86.
- Bercovici, N., M. T. Duffour, et al. (2000). "New methods for assessing T-cell responses." Clin Diagn Lab Immunol **7**(6): 859-64.
- Bettelli, E., M. Oukka, et al. (2007). "T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity." Nat Immunol **8**(4): 345-50.
- Bharadwaj, M., P. Illing, et al. (2011). "Drug hypersensitivity and human leukocyte antigens of the major histocompatibility complex." Annu Rev Pharmacol Toxicol **52**: 401-31.
- Bigby, M., S. Jick, et al. (1986). "Drug-induced cutaneous reactions. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program on 15,438 consecutive inpatients, 1975 to 1982." Jama **256**(24): 3358-63.

- Binzak, B. A., J. G. Vockley, et al. (2000). "Structure and analysis of the human dimethylglycine dehydrogenase gene." *Mol Genet Metab* **69**(3): 181-7.
- Binzak, B. A., R. A. Wevers, et al. (2001). "Cloning of dimethylglycine dehydrogenase and a new human inborn error of metabolism, dimethylglycine dehydrogenase deficiency." *Am J Hum Genet* **68**(4): 839-47.
- Blanca, M., C. Mayorga, et al. (2001). "Clinical evaluation of Pharmacia CAP System RAST FEIA amoxicilloyl and benzylpenicilloyl in patients with penicillin allergy." *Allergy* **56**(9): 862-70.
- Blanca, M., A. Romano, et al. (2009). "Update on the evaluation of hypersensitivity reactions to betalactams." *Allergy* **64**(2): 183-93.
- Boisleve, F., S. Kerdine-Romer, et al. (2005). "Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha." *Toxicology* **206**(2): 233-44.
- Boisleve, F., S. Kerdine-Romer, et al. (2004). "Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK." *J Invest Dermatol* **123**(3): 494-502.
- Borst, P., C. de Wolf, et al. (2007). "Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5." *Pflugers Arch* **453**(5): 661-73.
- Boudinot, P. and A. Benmansour (2007). "Fish responses to viruses: from interferon to T-cells." *Bull. Acad. Vét. France* **Tome 160 - N°1** (www.academie-veterinaire-france.fr).
- Boyman, O., S. Letourneau, et al. (2009). "Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells." *Eur J Immunol* **39**(8): 2088-94.
- Brander, C., D. Mauri-Hellweg, et al. (1995). "Heterogeneous T cell responses to beta-lactam-modified self-structures are observed in penicillin-allergic individuals." *J Immunol* **155**(5): 2670-8.
- Branellec, A., M. Thomas, et al. (2008). "[Frequency of self-reported penicillin allergy in the area of Seine-Saint-Denis (France)]." *Rev Med Interne* **29**(4): 271-6.
- Brockow, K., A. Romano, et al. (2002). "General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity." *Allergy* **57**(1): 45-51.
- Broere, F., S. G. Apasov, et al. (2011). "T cell subsets and T cell-mediated immunity." *Principles of Immunopharmacology: 3rd revised and extended edition*.
- Burkhart, C., M. Britschgi, et al. (2002). "Non-covalent presentation of sulfamethoxazole to human CD4+ T cells is independent of distinct human leucocyte antigen-bound peptides." *Clin Exp Allergy* **32**(11): 1635-43.
- Burkhart, C., S. von Greyerz, et al. (2001). "Influence of reduced glutathione on the proliferative response of sulfamethoxazole-specific and sulfamethoxazole-metabolite-specific human CD4+ T-cells." *Br J Pharmacol* **132**(3): 623-30.
- Cacoub, P., P. Musette, et al. (2011). "The DRESS syndrome: a literature review." *Am J Med* **124**(7): 588-97.
- Callan, H. E., R. E. Jenkins, et al. (2009). "Multiple adduction reactions of nitroso sulfamethoxazole with cysteinyl residues of peptides and proteins: implications for hapten formation." *Chem Res Toxicol* **22**(5): 937-48.
- Castrejon, J. L., N. Berry, et al. (2010). "Stimulation of human T cells with sulfonamides and sulfonamide metabolites." *J Allergy Clin Immunol* **125**(2): 411-418 e4.
- Caubet, J. C., W. J. Pichler, et al. (2011). "Educational case series: Mechanisms of drug allergy." *Pediatr Allergy Immunol* **22**(6): 559-67.
- Chantachaeng, W., L. Chularojanamontri, et al. (2011). "Cutaneous adverse reactions to sulfonamide antibiotics." *Asian Pac J Allergy Immunol* **29**(3): 284-9.

- Chessman, D., L. Kostenko, et al. (2008). "Human leukocyte antigen class I-restricted activation of CD8+ T cells provides the immunogenetic basis of a systemic drug hypersensitivity." *Immunity* **28**(6): 822-32.
- Chung, H., Y. I. Choi, et al. (2002). "Rescuing developing thymocytes from death by neglect." *J Biochem Mol Biol* **35**(1): 7-18.
- Co Minh, H., Demoly, P (2005). "[Méthodologie et préparation des tests cutanés : prick-tests et intradermoréactions à lecture immédiate]." *Diagnostic de l'allergie aux médicaments, John Libbey Eurotext, Paris*: p41-52.
- Colombani, J. (1993). "HLA: Fonctions immunitaires et applications médicales." *clé pour médecine sciences*: p. 107.
- Currier, J. R. and M. A. Robinson (2001). "Spectratype/immunoscope analysis of the expressed TCR repertoire." *Curr Protoc Immunol Chapter 10*: Unit 10 28.
- Daly, A. K., P. T. Donaldson, et al. (2009). "HLA-B*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin." *Nat Genet* **41**(7): 816-9.
- Decoster, A. (2008). "Cours de bactériologie du Pr Anne Decoster, Faculté de médecine de Lille, www.anne.decoster.free.fr, mis à jour le 21/09/2008, consulté en janvier 2012."
- Delluc, S., G. Ravot, et al. (2010). "Quantification of the preexisting CD4 T-cell repertoire specific for human erythropoietin reveals its immunogenicity potential." *Blood* **116**(22): 4542-5.
- Delluc, S., G. Ravot, et al. (2011). "Quantitative analysis of the CD4 T-cell repertoire specific to therapeutic antibodies in healthy donors." *Faseb J* **25**(6): 2040-8.
- Demoly, P. and J. Bousquet (2002). "Drug allergy diagnosis work up." *Allergy* **57 Suppl 72**: 37-40.
- Descotes, J. and G. Choquet-Kastylevsky (2001). "Gell and Coombs's classification: is it still valid?" *Toxicology* **158**(1-2): 43-9.
- Dietz, L., P. R. Esser, et al. (2010). "Tracking human contact allergens: from mass spectrometric identification of peptide-bound reactive small chemicals to chemical-specific naive human T-cell priming." *Toxicol Sci* **117**(2): 336-47.
- Dong, C. (2008). "TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming." *Nat Rev Immunol* **8**(5): 337-48.
- Eck, H. P., H. Gmunder, et al. (1989). "Low concentrations of acid-soluble thiol (cysteine) in the blood plasma of HIV-1-infected patients." *Biol Chem Hoppe Seyler* **370**(2): 101-8.
- El-Ghaiesh, S., M. M. Monshi, et al. (2012). "Characterization of the antigen specificity of T-cell clones from piperacillin-hypersensitive patients with cystic fibrosis." *J Pharmacol Exp Ther* **341**(3): 597-610.
- Elsheikh, A., S. N. Lavergne, et al. (2010). "Drug antigenicity, immunogenicity, and costimulatory signaling: evidence for formation of a functional antigen through immune cell metabolism." *J Immunol* **185**(11): 6448-60.
- Farrell, J., D. J. Naisbitt, et al. (2003). "Characterization of sulfamethoxazole and sulfamethoxazole metabolite-specific T-cell responses in animals and humans." *J Pharmacol Exp Ther* **306**(1): 229-37.
- Faulkner, L., K. Martinsson, et al. (2012). "The development of in vitro culture methods to characterize primary T-cell responses to drugs." *Toxicol Sci* **127**(1): 150-8.
- Ferrari-Lacraz, S. and J. Villard (2006). "[Immunologic monitoring: what's new?]." *Rev Med Suisse* **2**(62): 1034, 1036-8, 1040-1.
- Fiszenson-Albala, F., V. Auzeurie, et al. (2003). "A 6-month prospective survey of cutaneous drug reactions in a hospital setting." *Br J Dermatol* **149**(5): 1018-22.
- Friedl, P., A. T. den Boer, et al. (2005). "Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse." *Nat Rev Immunol* **5**(7): 532-45.

- Gamarra, R. M., S. D. McGraw, et al. (2006). "Serum sickness-like reactions in patients receiving intravenous infliximab." *J Emerg Med* **30**(1): 41-4.
- Gaspard, I., M. T. Guinépain, et al. (2000). "IL-4 and IFN-gamma mRNA induction in human peripheral lymphocytes specific for beta-lactam antibiotics in immediate or delayed hypersensitivity reactions." *J Clin Immunol* **20**(2): 107-16.
- Geiger, R., T. Duhon, et al. (2009). "Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells." *J Exp Med* **206**(7): 1525-34.
- Gerber, B. O. and W. J. Pichler (2006). "Noncovalent interactions of drugs with immune receptors may mediate drug-induced hypersensitivity reactions." *Aaps J* **8**(1): E160-5.
- Gomes, E., M. F. Cardoso, et al. (2004). "Self-reported drug allergy in a general adult Portuguese population." *Clin Exp Allergy* **34**(10): 1597-601.
- Gomes, E. R. and P. Demoly (2005). "Epidemiology of hypersensitivity drug reactions." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **5**(4): 309-16.
- Guilliams, M., S. Henri, et al. (2010). "From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets." *Eur J Immunol* **40**(8): 2089-94.
- Gutcher, I. and B. Becher (2007). "APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation." *J Clin Invest* **117**(5): 1119-27.
- Hackstein, H. and A. W. Thomson (2004). "Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs." *Nat Rev Immunol* **4**(1): 24-34.
- Hataye, J., J. J. Moon, et al. (2006). "Naive and memory CD4+ T cell survival controlled by clonal abundance." *Science* **312**(5770): 114-6.
- Hellwig, K., S. Schimrigk, et al. (2008). "Allergic and nonallergic delayed infusion reactions during natalizumab therapy." *Arch Neurol* **65**(5): 656-8.
- Henri, S., L. F. Poulin, et al. (2009). "CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells." *J Exp Med* **207**(1): 189-206.
- Hetherington, S., A. R. Hughes, et al. (2002). "Genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir." *Lancet* **359**(9312): 1121-2.
- Honda, T., Y. Miyachi, et al. (2011). "Regulatory T cells in cutaneous immune responses." *J Dermatol Sci* **63**(2): 75-82.
- Huppa, J. B. and M. M. Davis (2003). "T-cell-antigen recognition and the immunological synapse." *Nat Rev Immunol* **3**(12): 973-83.
- Ibia, E. O., R. H. Schwartz, et al. (2000). "Antibiotic rashes in children: a survey in a private practice setting." *Arch Dermatol* **136**(7): 849-54.
- Illing, P. T., J. P. Vivian, et al. (2012). "Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire." *Nature* **486**(7404): 554-8.
- Inaba, K., M. Inaba, et al. (1992). "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." *J Exp Med* **176**(6): 1693-702.
- Janeway, M., Travers, Walport (2009). "Immunobiologie." **de Boeck 3e édition - Traduction de la 7e édition anglaise par Pierre L. Masson.**
- Jenkins, M. K., H. H. Chu, et al. (2010). "On the composition of the preimmune repertoire of T cells specific for Peptide-major histocompatibility complex ligands." *Annu Rev Immunol* **28**: 275-94.
- Jenkins, R. E., X. Meng, et al. (2009). "Characterisation of flucloxacillin and 5-hydroxymethyl flucloxacillin haptenated HSA in vitro and in vivo." *Proteomics Clin Appl* **3**(6): 720-9.

- Johansson, S. G., J. O. Hourihane, et al. (2001). "A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force." *Allergy* **56**(9): 813-24.
- Jutel, M. and C. A. Akdis (2011). "T-cell subset regulation in atopy." *Curr Allergy Asthma Rep* **11**(2): 139-45.
- Karpman, E. and E. A. Kurzrock (2004). "Adverse reactions of nitrofurantoin, trimethoprim and sulfamethoxazole in children." *J Urol* **172**(2): 448-53.
- Kilpatrick, D. C. and J. D. Chalmers (2011). "Human L-ficolin (ficolin-2) and its clinical significance." *J Biomed Biotechnol* **2012**: 138797.
- Klein, J. and A. Sato (2000). "The HLA system. First of two parts." *N Engl J Med* **343**(10): 702-9.
- Kong, K. F., L. Schneper, et al. (2010). "Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology." *Apmis* **118**(1): 1-36.
- Krumbholz, M., H. Pellkofer, et al. (2007). "Delayed allergic reaction to natalizumab associated with early formation of neutralizing antibodies." *Arch Neurol* **64**(9): 1331-3.
- Lafaye, P. and C. Lapresle (1987). "Location of penicilloyl groups on CNBr fragments of the albumin from penicillin-treated patients." *FEBS Lett* **220**(1): 206-8.
- Lafaye, P. and C. Lapresle (1988). "Identification of two fixation sites for penicilloyl groups on the albumin molecule from penicillin-treated patients." *FEBS Lett* **234**(2): 305-8.
- Laroche, D., S. Chollet-Martin, et al. (2011). "Evaluation of a new routine diagnostic test for immunoglobulin e sensitization to neuromuscular blocking agents." *Anesthesiology* **114**(1): 91-7.
- Lavergne, S. N., H. Wang, et al. (2009). ""Danger" conditions increase sulfamethoxazole-protein adduct formation in human antigen-presenting cells." *J Pharmacol Exp Ther* **331**(2): 372-81.
- Lebrec, H., S. Kerdine, et al. (2001). "Th(1)/Th(2) responses to drugs." *Toxicology* **158**(1-2): 25-9.
- Lima, C. M., J. T. Schroeder, et al. (2010). "Functional changes of dendritic cells in hypersensitivity reactions to amoxicillin." *Braz J Med Biol Res* **43**(10): 964-8.
- Lochmatter, P., A. Beeler, et al. (2009). "Drug-specific in vitro release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity." *Allergy* **64**(9): 1269-78.
- Loser, K. and S. Beissert (2012). "Regulatory T cells: banned cells for decades." *J Invest Dermatol* **132**(3 Pt 2): 864-71.
- Lutz, M. B., N. Kukutsch, et al. (1999). "An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow." *J Immunol Methods* **223**(1): 77-92.
- Lutz, M. B. and G. Schuler (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" *Trends Immunol* **23**(9): 445-9.
- Maillere, B., S. Delluc, et al. (2012). "[The prediction of immunogenicity of therapeutic proteins]." *Med Sci (Paris)* **28**(1): 82-8.
- Mallal, S., D. Nolan, et al. (2002). "Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir." *Lancet* **359**(9308): 727-32.
- Mallal, S., E. Phillips, et al. (2008). "HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir." *N Engl J Med* **358**(6): 568-79.
- Manchanda, T., D. Hess, et al. (2002). "Haptenation of sulfonamide reactive metabolites to cellular proteins." *Mol Pharmacol* **62**(5): 1011-26.

- Martin, A. M., C. A. Almeida, et al. (2007). "Immune responses to abacavir in antigen-presenting cells from hypersensitive patients." *Aids* **21**(10): 1233-44.
- Martin, A. M., D. Nolan, et al. (2004). "Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B*5701 and a haplotypic Hsp70-Hom variant." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(12): 4180-5.
- Martin, S. F., P. R. Esser, et al. (2010). "T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of in vitro assays." *Cell Mol Life Sci* **67**(24): 4171-84.
- Martin, S. F., P. R. Esser, et al. (2011). "Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis." *Allergy* **66**(9): 1152-63.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." *Science* **296**(5566): 301-5.
- Matzinger, P. (2007). "Friendly and dangerous signals: is the tissue in control?" *Nat Immunol* **8**(1): 11-3.
- Mauri-Hellweg, D., F. Bettens, et al. (1995). "Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine." *J Immunol* **155**(1): 462-72.
- Mauri-Hellweg, D., M. Zanni, et al. (1996). "Cross-reactivity of T cell lines and clones to beta-lactam antibiotics." *J Immunol* **157**(3): 1071-9.
- Mellman, I., S. J. Turley, et al. (1998). "Antigen processing for amateurs and professionals." *Trends Cell Biol* **8**(6): 231-7.
- Meng, X., R. E. Jenkins, et al. (2011). "Direct evidence for the formation of diastereoisomeric benzylpenicilloyl haptens from benzylpenicillin and benzylpenicillenic acid in patients." *J Pharmacol Exp Ther* **338**(3): 841-9.
- Miyao, T., S. Floess, et al. (2012). "Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells." *Immunity* **36**(2): 262-75.
- Moolenaar, S. H., J. Poggi-Bach, et al. (1999). "Defect in dimethylglycine dehydrogenase, a new inborn error of metabolism: NMR spectroscopy study." *Clin Chem* **45**(4): 459-64.
- Moon, J. J., H. H. Chu, et al. (2007). "Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude." *Immunity* **27**(2): 203-13.
- Naisbitt, D. J. (2004). "Drug hypersensitivity reactions in skin: understanding mechanisms and the development of diagnostic and predictive tests." *Toxicology* **194**(3): 179-96.
- Naisbitt, D. J., M. Britschgi, et al. (2003). "Hypersensitivity reactions to carbamazepine: characterization of the specificity, phenotype, and cytokine profile of drug-specific T cell clones." *Mol Pharmacol* **63**(3): 732-41.
- Naisbitt, D. J., S. F. Gordon, et al. (2001). "Antigenicity and immunogenicity of sulphamethoxazole: demonstration of metabolism-dependent haptentation and T-cell proliferation in vivo." *Br J Pharmacol* **133**(2): 295-305.
- Naisbitt, D. J., O'Neill, P.M, Pirmohamed, M., Park, B.K (1996). "Synthesis and Reactions of Nitroso Sulphamethoxazole with Biological Nucleophiles : Implications for Immune Mediated Toxicity." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **Vol. 6**(No. 13): pp. 1511-1516.
- Neefjes, J., M. L. Jongsma, et al. (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." *Nat Rev Immunol* **11**(12): 823-36.
- Nicolas, J., I. Guillot, et al. (2005). "[Diagnostic de l'allergie aux médicaments: place des tests cutanés]." *Le diagnostic de l'allergie aux médicaments, John Libbey Eurotext, Paris*: p7-16.

- O'Neil, W. M., R. K. Drobitch, et al. (1997). "Acetylator phenotype and genotype in patients infected with HIV: discordance between methods for phenotype determination and genotype." *Pharmacogenetics* **10**(2): 171-82.
- Ostrov, D. A., B. J. Grant, et al. (2012). "Drug hypersensitivity caused by alteration of the MHC-presented self-peptide repertoire." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(25): 9959-64.
- Padovan, E., T. Bauer, et al. (1997). "Penicilloyl peptides are recognized as T cell antigenic determinants in penicillin allergy." *Eur J Immunol* **27**(6): 1303-7.
- Padovan, E., D. Mauri-Hellweg, et al. (1996). "T cell recognition of penicillin G: structural features determining antigenic specificity." *Eur J Immunol* **26**(1): 42-8.
- Padovan, E., S. von Greyerz, et al. (1999). "Antigen-dependent and -independent IFN-gamma modulation by penicillins." *J Immunol* **162**(2): 1171-7.
- Pannetier, C., J. Even, et al. (1995). "T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples." *Immunol Today* **16**(4): 176-81.
- Pepin, E., M. Goutet, et al. (2007). "Murine bone marrow-derived dendritic cells as a potential in vitro model for predictive identification of chemical sensitizers." *Toxicol Lett* **175**(1-3): 89-101.
- Pichler, W. J. (2002). "Modes of presentation of chemical neoantigens to the immune system." *Toxicology* **181-182**: 49-54.
- Pichler, W. J. (2002). "Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2**(4): 301-5.
- Pichler, W. J. (2003). "Delayed drug hypersensitivity reactions." *Ann Intern Med* **139**(8): 683-93.
- Pichler, W. J., A. Beeler, et al. (2006). "Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept." *Allergol Int* **55**(1): 17-25.
- Pichler, W. J. and J. Tilch (2004). "The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity." *Allergy* **59**(8): 809-20.
- Pichler, W. J., Wendland, T., Hausmann, O., Schnyder, B., Fricker, M., Pichler, C., Helbling, A. (2011). "Syndrome DRESS (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms)." *Forum Med Suisse*.
- Pilette, C., N. Coppens, et al. (2007). "Severe serum sickness-like syndrome after omalizumab therapy for asthma." *J Allergy Clin Immunol* **120**(4): 972-3.
- Ponvert, C. (2007). "[What's new in drug allergy?]." *Immuno-analyse et biologie spécialisée* **23**: 49—53.
- Ponvert, C., Y. Perrin, et al. (2011). "Allergy to betalactam antibiotics in children: results of a 20-year study based on clinical history, skin and challenge tests." *Pediatr Allergy Immunol* **22**(4): 411-8.
- Ponvert, C. and P. Scheinmann (2003). "[Allergic and pseudo-allergic reactions to betalactam antibiotics]." *Arch Pediatr* **10**(7): 658-65.
- Posadas, S. J. and W. J. Pichler (2007). "Delayed drug hypersensitivity reactions - new concepts." *Clin Exp Allergy* **37**(7): 989-99.
- Radstake, T. R., M. Svenson, et al. (2009). "Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **68**(11): 1739-45.
- Rodriguez-Pena, R., S. Lopez, et al. (2006). "Potential involvement of dendritic cells in delayed-type hypersensitivity reactions to beta-lactams." *J Allergy Clin Immunol* **118**(4): 949-56.
- Romano, A., M. Blanca, et al. (2004). "Diagnosis of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics." *Allergy* **59**(11): 1153-60.
- Romano, A., R. M. Gueant-Rodriguez, et al. (2005). "Cross-reactivity among drugs: clinical problems." *Toxicology* **209**(2): 169-79.

- Rothenberg, M. E. (2010). "Innate sensing of nickel." Nat Immunol **11**(9): 781-2.
- Roujeau, J. C. (2007). "[Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome]." Rev Prat **57**(11): 1165-70.
- Roychowdhury, S., P. M. Vyas, et al. (2005). "Characterization of the formation and localization of sulfamethoxazole and dapsone-associated drug-protein adducts in human epidermal keratinocytes." J Pharmacol Exp Ther **314**(1): 43-52.
- Rozières, A., A. Hennino, et al. (2009). "Detection and quantification of drug-specific T cells in penicillin allergy." Allergy **64**(4): 534-42.
- Rozières, A., M. Vocanson, et al. (2009). "CD8+ T cells mediate skin allergy to amoxicillin in a mouse model." Allergy **65**(8): 996-1003.
- Rutault, K., C. Alderman, et al. (1999). "Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells." Free Radic Biol Med **26**(1-2): 232-8.
- Saag, M., R. Balu, et al. (2008). "High sensitivity of human leukocyte antigen-b*5701 as a marker for immunologically confirmed abacavir hypersensitivity in white and black patients." Clin Infect Dis **46**(7): 1111-8.
- Sanderson, J. P., D. J. Naisbitt, et al. (2007). "Sulfamethoxazole and its metabolite nitroso sulfamethoxazole stimulate dendritic cell costimulatory signaling." J Immunol **178**(9): 5533-42.
- Schellekens, H. and W. Jiskoot (2006). "Erythropoietin-Associated PRCA: Still an Unsolved Mystery." J Immunotoxicol **3**(3): 123-30.
- Schmidt, M., B. Raghavan, et al. (2010). "Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel." Nat Immunol **11**(9): 814-9.
- Schnyder, B., C. Burkhardt, et al. (2000). "Recognition of sulfamethoxazole and its reactive metabolites by drug-specific CD4+ T cells from allergic individuals." J Immunol **164**(12): 6647-54.
- Schnyder, B., D. Mauri-Hellweg, et al. (1997). "Direct, MHC-dependent presentation of the drug sulfamethoxazole to human alphabeta T cell clones." J Clin Invest **100**(1): 136-41.
- Schutgens, R. E. (2006). "Rituximab-induced serum sickness." Br J Haematol **135**(2): 147.
- Servonnet, A., E. Leclercq, et al. (2010). "[HLA-B*5701 and abacavir hypersensitivity reaction]." Pathol Biol (Paris) **58**(6): e95-100.
- Solensky, R. and D. Khan (2010). "Drug allergy: an updated practice parameter." Ann Allergy Asthma Immunol **105**(4): 259-273.
- Staal, F. J. (1998). "Glutathione and HIV infection: reduced reduced, or increased oxidized?" Eur J Clin Invest **28**(3): 194-6.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
- Stoermer, K. A. and T. E. Morrison (2011). "Complement and viral pathogenesis." Virology **411**(2): 362-73.
- Stojic, J., H. Stohr, et al. (2007). "Three novel ABCC5 splice variants in human retina and their role as regulators of ABCC5 gene expression." BMC Mol Biol **8**: 42.
- Tamilvanan, S., N. L. Raja, et al. (2010). "Clinical concerns of immunogenicity produced at cellular levels by biopharmaceuticals following their parenteral administration into human body." J Drug Target **18**(7): 489-98.
- Torres, M. J., M. Blanca, et al. (2003). "Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics." Allergy **58**(10): 961-72.
- Torres, M. J., C. Mayorga, et al. (1999). "Immunologic response to different determinants of benzylpenicillin, amoxicillin, and ampicillin. Comparison between urticaria and anaphylactic shock." Allergy **54**(9): 936-43.

- Torres, M. J., A. Romano, et al. (2001). "Diagnostic evaluation of a large group of patients with immediate allergy to penicillins: the role of skin testing." *Allergy* **56**(9): 850-6.
- Tran, D. Q., H. Ramsey, et al. (2007). "Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype." *Blood* **110**(8): 2983-90.
- Trombetta, E. S. and I. Mellman (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." *Annu Rev Immunol* **23**: 975-1028.
- Ueno, H., E. Klechevsky, et al. (2007). "Dendritic cell subsets in health and disease." *Immunol Rev* **219**: 118-42.
- Vocanson, M., M. Cluzel-Tailhardat, et al. (2008). "Depletion of human peripheral blood lymphocytes in CD25+ cells allows for the sensitive in vitro screening of contact allergens." *J Invest Dermatol* **128**(8): 2119-22.
- von Greyerz, S., M. P. Zanni, et al. (1999). "Interaction of sulfonamide derivatives with the TCR of sulfamethoxazole-specific human alpha beta+ T cell clones." *J Immunol* **162**(1): 595-602.
- Vyas, P. M., S. Roychowdhury, et al. (2005). "Reactive oxygen species generation and its role in the differential cytotoxicity of the arylhydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone in normal human epidermal keratinocytes." *Biochem Pharmacol* **70**(2): 275-86.
- Walmsley, S. L., S. Khorasheh, et al. (1998). "A randomized trial of N-acetylcysteine for prevention of trimethoprim-sulfamethoxazole hypersensitivity reactions in *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis (CTN 057). Canadian HIV Trials Network 057 Study Group." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **19**(5): 498-505.
- Wang, J., A. Ioan-Facsinay, et al. (2007). "Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells." *Eur J Immunol* **37**(1): 129-38.
- Weltzien, H. U. and E. Padovan (1998). "Molecular features of penicillin allergy." *J Invest Dermatol* **110**(3): 203-6.
- Whitaker, P., X. Meng, et al. (2011). "Mass spectrometric characterization of circulating and functional antigens derived from piperacillin in patients with cystic fibrosis." *J Immunol* **187**(1): 200-11.
- Wu, Y., J. P. Sanderson, et al. (2006). "Activation of T cells by carbamazepine and carbamazepine metabolites." *J Allergy Clin Immunol* **118**(1): 233-41.
- Yang, J., H. L. Qiao, et al. (2006). "HLA-DRB genotype and specific IgE responses in patients with allergies to penicillins." *Chin Med J (Engl)* **119**(6): 458-66.
- Yawalkar, N., Y. Hari, et al. (2000). "T cells isolated from positive epicutaneous test reactions to amoxicillin and ceftriaxone are drug specific and cytotoxic." *J Invest Dermatol* **115**(4): 647-52.
- Yvon, M., P. Anglade, et al. (1989). "Binding of benzyl penicilloyl to human serum albumin. Evidence for a highly reactive region at the junction of domains 1 and 2 of the albumin molecule." *FEBS Lett* **247**(2): 273-8.
- Yvon, M., P. Anglade, et al. (1990). "Identification of the binding sites of benzyl penicilloyl, the allergenic metabolite of penicillin, on the serum albumin molecule." *FEBS Lett* **263**(2): 237-40.
- Yvon, M. and J. M. Wal (1988). "Identification of lysine residue 199 of human serum albumin as a binding site for benzylpenicilloyl groups." *FEBS Lett* **239**(2): 237-40.
- Zanni, M. P., D. Mauri-Hellweg, et al. (1997). "Characterization of lidocaine-specific T cells." *J Immunol* **158**(3): 1139-48.
- Zanni, M. P., S. von Greyerz, et al. (1999). "Recognition of local anesthetics by alphabeta+ T cells." *J Invest Dermatol* **112**(2): 197-204.

- Zanni, M. P., S. von Greyerz, et al. (1998). "Allele-unrestricted presentation of lidocaine by HLA-DR molecules to specific alphabeta+ T cell clones." Int Immunol **10**(4): 507-15.
- Ziegler, S. F. (2006). "FOXP3: of mice and men." Annu Rev Immunol **24**: 209-26.
- Zitvogel, L., S. Amigorena, et al. (2011). "[About Ralph M. Steinman and dendritic cells]." Med Sci (Paris) **27**(11): 1028-34.

Résumé :

Chez des patients allergiques, il est possible de retrouver dans leur sérum des anticorps spécifiques du médicament (IgE) et dans leur sang des lymphocytes T spécifiques du médicament. La présence de LT spécifiques du médicament chez des patients allergiques suggère la présentation du médicament par des cellules présentatrices d'antigène telles que les cellules dendritiques.

Nous nous sommes alors intéressés à mieux comprendre l'implication des lymphocytes T et des cellules dendritiques dans le développement des allergies aux antibiotiques comme la pénicilline G (ou Benzyl-Pénicilline) ou le sulfaméthoxazole.

Ce travail de thèse a permis: i) de démontrer la présence de lymphocytes T spécifiques de la pénicilline G dans le sang périphérique de donneurs non allergiques à une fréquence mesurable, ii) de développer deux approches expérimentales et de modélisation pour l'identification des épitopes potentiellement présentés aux lymphocytes T et iii) d'étudier l'effet des médicaments sur les cellules dendritiques.

Les perspectives de ce travail sont de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les allergies médicamenteuses au niveau des lymphocytes T et des cellules dendritiques et de développer des tests de prédiction du « potentiel allergique » des médicaments, afin de mieux prédire les allergies médicamenteuses lors du développement des médicaments.

Mots-clés :

Allergie, antibiotiques, pénicilline G, sulfaméthoxazole, bio-conjugués, haptène, lymphocytes T, cellules dendritiques

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

Laboratoire de rattachement :

INSERM UMR-S 996 « Cytokines, Chimiokines et Immunopathologie »
Equipe 2 « Signalisation en immunotoxicologie et immunopharmacologie »

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR « FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex