



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la  
Recherche Scientifique



Université de Batna 2 – Mostefa Ben Boulaid –  
Faculté des Sciences de La Nature et de La Vie  
Département de Biologie des Organismes

## THESE

Présentée pour l'obtention du titre de :

Docteur en Sciences

Filière : Sciences Biologiques

Option : Physiologie Animale

Sous le thème :

**Polymorphismes génétiques des interleukines dans l'hypersensibilité  
aux bêta-lactamines chez une partie de la population Algérienne**

Présentée par :  
**KSOURI Leila**

Devant le jury composé de :

- |  |    |                             |                           |
|--|----|-----------------------------|---------------------------|
| • M <sup>me</sup> . HAMBABA Leila            | Pr | Université de Batna 2       | <b>Présidente</b>         |
| • M. KASSAH-LAOUAR Ahmed                     | Pr | Université de Batna 2       | <b>Examineur</b>          |
| • M. AYACHI Ammar                            | Pr | Université de Batna 1       | <b>Examineur</b>          |
| • M <sup>me</sup> . BENDJEMANA Katia         | Pr | Université de Khenchela     | <b>Examinatrice</b>       |
| • M <sup>me</sup> . CHAOUI-KHEROUATOU Naouel | Dr | Université de Constantine 1 | <b>Examinatrice</b>       |
| • M. YAHIA Mouloud                           | Pr | Université de Batna 2       | <b>Directeur de thèse</b> |

2018/2019

## REMERCIEMENTS

C'est avec une grande fierté, beaucoup de soulagement et une énorme gratitude que s'achève mon aventure doctorale. Par conséquent, je tiens à utiliser ces quelques lignes afin d'articuler mes remerciements aux personnes qui m'ont offert le soutien moral et technique ayant rendu ce projet possible.

J'aimerais avant tout rendre hommage à mon directeur de thèse Pr. **YAHIAMouloud** qui nous a quitté rapidement, c'est une grande perte pour la communauté scientifique. Que Dieu l'accepte dans son vaste paradis.

Mes remerciements vont au Pr. **Kassah-Laouar Ahmed** qui a accepté de prendre le relais et se présenter en tant que directeur de cette thèse.

Il m'est évidemment très important de remercier tous les membres de mon jury pour avoir si gentiment accepté d'examiner ma thèse. Sachez que votre temps et dévouement sont sincèrement appréciés.

A Madame le Pr. **Hambaba Leila** qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Recevez l'expression de mes plus sincères remerciements.

A Madame le Pr. **Bendjemana Katia**, Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez immédiatement et si gentiment porté au sujet. Vous me faites l'immense honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude et de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Pr. **Ayachi Ammar** Vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de mon plus grand respect et de ma profonde reconnaissance.

AMadame le Dr. **Chaoui- kherouatou Naouel** Vous me faites l'immense honneur de juger mon travail. Je tiens à vous exprimer l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

J'adresse mes remerciements aussi à Madame le Pr. **Nancy Dumais** qui m'a accueillie au sein de son laboratoire. Je voudrais vous signifier toute ma gratitude pour avoir pu réaliser ce travail de thèse grâce à vos conseils et votre aide. J'ai été sensible à votre gentillesse, et votre disponibilité. Votre compétence et votre exigence constituent un modèle pour moi et j'espère pouvoir continuer à me former à vos côtés.

Merci à toute l'équipe du Laboratoire Nancy Dumais à l'Université de Sherbrooke pour leurs conseils, leurs compétences et leur bonne humeur.

Je tiens à remercier Dr. **Bouguernize** et Mme **Chorfi** Lila qui m'ont énormément aidé à la collecte d'échantillons. Ces remerciements ne seraient pas tout à fait complets sans un mot pour toutes les personnes qui m'ont offert leurs temps et leurs sangs précieux.

J'aimerais aussi souligner les innombrables services que j'ai reçu de la part des établissements publics de santé et de proximité (EPSP) de Kais, d'El Rmila, et d'El Hamma.

D'un point de vue plus personnel, merci infiniment à mon père et ma mère d'avoir fait de moi la personne que je suis et comme j'ai beaucoup de mal à trouver les mots justes pour vous remercier comme vous le méritez, j'irais au plus simple : par conséquent, et tout simplement, merci beaucoup papa et maman pour l'irremplaçable et inconditionnel soutien moral. Merci pour votre amour, pour tous vos sacrifices. Sans vous je n'en serai pas là. J'espère de tout cœur que cet accomplissement contribuera à vous rendre fiers.

Merci à mes sœurs et frères pour leurs immense support et leurs belles attentions tout au long de ces années et qui ont apporté l'équilibre nécessaire au maintien de ma persévérance.

Je remercie aussi ma belle-famille pour leur gentillesse, leur soutien et encouragements.

Un dernier merci, et non pas des moindres à mon mari Moncef, et mes deux enfants Yasmine et Wassim. Moncef tu as toujours été présent, notamment dans les moments difficiles. Merci de m'avoir continuellement encouragé et supporté, même lorsque mon travail affectait mon humeur. Merci pour ta présence rassurante et surtout pour ton immense patience devant les heures, les jours passés collée à mon ordinateur. Ce travail n'aurait pu se faire sans tes encouragements et ton aide. Ma grande Yasmine et mon petit Wassim seront les dernières personnes que je remercierai... vous avez apporté du bonheur dans ma vie, et votre présence m'a été d'un grand réconfort pendant les longs mois de travail... que Dieu vous protège...

# TABLE DES MATIÈRES

## REMERCIEMENTS

LISTE DES TABLEAUX.....	I
LISTE DES FIGURES .....	II
LISTE DES ABRÉVÉATIONS.....	III
INTRODUCTION .....	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	4
CHAPITRE I. Allergie et hypersensibilité .....	5
I.1. Allergie médicamenteuse .....	7
I.2. Hypersensibilités allergiques aux bêta-lactamines .....	8
I.3 Épidémiologie des allergies aux bêta-lactamines .....	9
I.4 Facteurs de risques.....	9
I.5 Structure moléculaire des bêta-lactamines.....	10
I.6 Immunogénicité des bêta-lactamines.....	12
I.7 Exploration de l'allergie aux bêta-lactamines.....	14
I.7-1 Explorations in vivo .....	14
I.7-1-1 Les tests cutanés.....	14
I.7-1-2 Sensibilité des tests cutanés.....	16
I.7-1-3 Spécificité des tests cutanés .....	16
I.7-2 Explorations in vitro.....	17
I.7-2-1 Dosage des IgE spécifiques.....	17
I.7-2-2 Test d'activation des basophiles .....	17
I.7-2-3 Test de provocation orale (TPO).....	18
I.8 Le bilan allergologique en cas de suspicion d'allergie aux bêta-lactamines .....	18
I.9 Le traitement des allergies.....	21
I.10 Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'allergie .....	22
I.11 IL-4, IL-13 et leurs récepteurs .....	35
CHAPITRE II : Génétique des hypersensibilités de type I.....	37
II.1 Caractérisation de la composante génétique .....	38
II.1-1 Variation du génome.....	39
II.1-2 Analyses d'association génétique .....	41
II.1-3 Choix de marqueurs et stratégies d'études.....	44

CHAPITRE III: Polymorphismes génétiques et variabilité de l'expression phénotypique des cytokines IL-4 et IL-13 dans l'hypersensibilité aux bêta-lactamines.....	47
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE .....	53
I. Sujets, Matériels & Méthodes .....	54
I.1. Patients et témoins .....	54
I.2. Matériels et Méthodes .....	54
II. Résultats .....	66
II.1. Fréquences alléliques et génotypiques .....	67
II.2. Analyse d'interaction .....	68
II.3. Analyse des haplotypes .....	72
III. Discussion .....	75
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	81
RÉFÉRENCES .....	83
ANNEXES .....	94

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.**Classification des réactions d'hypersensibilité selon Gell et Coombs, et WJ Pichler, adapté de Mirakian et al.

**Tableau 2.**Facteurs de risque de développement de réactions allergiques médicamenteuses, adapté de Mirakian et al.

**Tableau 3.**Études d'association génétique dans l'allergie aux bêta-lactamines.

**Tableau 4.**Caractéristiques cliniques des patients et contrôles.

**Tableau 5.**SNPs et gènes sélectionnés pour notre étude.

**Tableau 6.**Fréquences alléliques des polymorphismes des gènes de l'IL4RA et l'IL13 chez les patients et chez les contrôles ainsi que leur association avec le risque de l'allergie aux bêta-lactamines.

**Tableau 7.**Fréquences génotypiques des polymorphismes des gènes de l'IL4RA et l'IL13 chez les cas et les témoins et leur association avec le risque de l'allergie aux bêta-lactamines.

**Tableau 8.**Taux sériques d'IgE en fonction du génotype chez le groupe des patients.

**Table 9.**Association entre les polymorphismes *IL13* et *IL4RA* et le taux sérique d'IgE totales chez les groupes des patients et témoins.

**Tableau10.**Déséquilibre de liaison des gènes de l'IL4RA (rs1805010, rs1805015 et rs1801275).

**Tableau 11.**Fréquences des haplotypes des polymorphismes du gène *IL4RA* chez les cas et témoins.

**Tableau 12.**Comparaison des fréquences des polymorphismes entre la population d'étude et différentes populations témoins.

**Tableau 13.**Synthèse des associations génétiques rapportées dans différentes populations comparées avec notre étude.

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1.**Définitions des hypersensibilités et allergies en fonction des mécanismes sous-jacents.

**Figure 2.** La Classe d'antibiotiques à base d'anneau bêta-lactame.

**Figure 3.**Déterminants antigéniques des pénicillines.

**Figure 4.**Algorithme pour le diagnostic des allergies immédiates aux bêta-lactamines.

**Figure 5.**Liaison de l'allergène au BCR du lymphocyte B.

**Figure 6.**Présentation de l'allergène par la cellule B et différenciation en plasmocytes sécréteurs d'IgE.

**Figure 7.**Pontage des récepteurs FcεRI par l'allergène liant plusieurs IgE.

**Figure 8.**Phase primaire de la réaction d'hypersensibilité de type I.

**Figure 9.**Physiopathologie de l'hypersensibilité à l'immunoglobuline E (IgE).

**Figure 10.**Mécanismes physiopathologiques de l'hypersensibilité de type I.

**Figure 11.**Structure d'une immunoglobuline de type E.

**Figure 12.**Schéma explicatif du principe de la technologie TaqMan® (d'après le protocole TaqMan® SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems).

**Figure 13.**Résultat graphique de génotypage par TaqMan® obtenu par le logiciel CFX Manager

**Figure 14.**Technique ELISA sandwich.

**Figure 15.**Interaction entre les génotypes de l'IL13 et IL4RA.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

IgE : Immunoglobuline E  
L'IL-4 : Interleukine 4  
L'IL-13 : Interleukine 13  
L'IL-4R $\alpha$  : Sous unité alpha du récepteur à l'interleukine 4  
Th2: Lymphocyte T Helper 2  
SNP: Polymorphisme Mono-Nucléotidique (Single Nucleotide Polymorphism)  
BL: Bêtalactamine  
Fc $\epsilon$ RI: Récepteur de haute affinité  
IFN- $\gamma$ : Interféron  $\gamma$   
TNF- $\alpha$ : Facteur de Nécrose Tumorale (Tumor Necrosis Factor)  
EMP :Exanthème Maculo-Papuleux  
DRESS:Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms  
CXCL-8:Gène de l'interleukine 8  
VIH:Virus de l'Immunodéficience Humaine  
MNI:Mononucléose Infectieuse  
AINS:Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien  
AX : Amoxicilline  
AP : Ampicilline  
G :Pénicilline G  
V: Pénicilline V  
GM-CSF:Facteur Stimulant les Colonies de Granulocytes et de Macrophages  
RAST: Radio Allergo-Sorbent Test  
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay  
IDR: Test Intradermique  
STAT5: Transducteur de Signal et Activateur de Transcription 5  
Fyn: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn  
Lyn: Protéine de type tyrosine kinase dont le gène est le Lyn  
JAK-STAT: Janus Kinase couplée à STAT  
FAM: Carboxyfluorescein  
VIC: Vic fluorophore  
MGB: Minor Groove Binding  
NFQ: Non-Fluorescent quencher

# **INTRODUCTION**

# Introduction

---

## Introduction

La prévalence des maladies allergiques ne cesse d'augmenter dans le monde, si bien que l'allergie est aujourd'hui classée au 4<sup>e</sup> rang des pathologies chroniques mondiales par l'Organisation Mondiale de la Santé et estime d'ici 2025, elle s'étendra à 50 % de la population mondiale (1)

Les hypersensibilités médicamenteuses immunomédiées ou allergies médicamenteuses présentent 5 à 15% des réactions indésirables aux médicaments (1). Ces réactions constituent une part non négligeable de la pathologie iatrogène et peuvent concerner 10% des patients hospitalisés et 7% de la population générale (2).

Les réactions allergiques aux médicaments se traduisent majoritairement par des réactions IgE ou lymphocytes T médiées. Ces réactions peuvent fréquemment se traduire par une manifestation cutanée telle une urticaire, mais peuvent également, plus rarement, aller jusqu'au choc anaphylactique. Les antibiotiques essentiellement les bêta-lactamines sont la principale classe thérapeutique concernée et entraînent le plus fréquemment une allergie immédiate, résultat d'un mécanisme immunologique spécifique mettant en jeu une synthèse exagérée d'immunoglobuline E (IgE)(3).

Les facteurs génétiques impliqués dans la survenue des réactions immédiates ont été essentiellement étudiés chez les patients allergiques aux bêta-lactamines. Les polymorphismes rapportés dans la littérature ciblent des gènes codant des cytokines, des récepteurs des cytokines ou des récepteurs de haute affinité des IgE. Parmi ces gènes, certains pourraient avoir un effet protecteur tandis que d'autres contribueraient à la pathogenèse de la maladie (gènes de susceptibilité).

Mises à part les études d'associations, une des approches prometteuses dans l'étude des allergies aux bêta-lactamines est l'étude d'interaction gène-gène. Comme il est convenu que plusieurs gènes sont impliqués dans le développement de ces allergies, l'effet des uns sur les autres devraient être tenu en compte. Cependant, à ce jour, les études qui se concentrent sur les interactions gène-gène sont relativement rares bien qu'elles soient nécessaires dans l'avancement des connaissances dans la génétique des hypersensibilités aux bêta-lactamines.

## Introduction

---

La première partie de ce travail sera bibliographique et décrira d'une part les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, les réactions d'allergies médicamenteuses dues à ces molécules, les différents acteurs impliqués dans les réactions d'hypersensibilité allergique immédiate aux bêta-lactamines ainsi que les différents aspects composant la diversité génétique; et d'autre part résume brièvement les études épidémiologiques effectuées par plusieurs équipes de recherche à travers le monde dans la génétique des allergies aux bêta-lactamines et fait état des principaux gènes associés à cette allergie ainsi que l'implication de certains polymorphismes dans la variation de synthèse des IgE totales . On y retrouve également les deux gènes candidats ainsi que les polymorphismes sélectionnés dans cette étude d'association ; à savoir l'interleukine 13 (*Arg130Gln*) et le récepteur à l'interleukine 4 (*Ile50Val*, *Gln551Arg*, *Ser478Pro*) ; les interactions possibles entre eux, et leurs implications dans la régulation de la synthèse des IgE chez des patients algériens souffrant d'allergie immédiate aux bêta-lactamines.

Les résultats présentés dans la seconde partie ainsi que la discussion qui les accompagne révèlent que l'utilisation des analyses d'interaction dans la recherche de déterminants génétiques de l'allergie aux bêta-lactamines est une voie intéressante à suivre et qu'elle pourrait constituer un élément-clé dans l'explication des mécanismes physiologiques qui sous-tendent cette pathologie.

À notre connaissance, cette étude est la première enquête investiguant l'association des polymorphismes des gènes de l'IL13 et IL4RA, le risque d'hypersensibilité aux bêta-lactamines et de concentration élevée d'IgE dans la population Algérienne. Cette étude d'association utilise l'approche par gènes candidats et se base sur l'hypothèse que les interactions entre ces gènes sont probablement responsables de la susceptibilité à cette pathologie.

Les principaux objectifs de cette étude sont de :

- Étudier l'influence de différents polymorphismes du gène de la sous-unité alpha du récepteur à l'IL-4, IL4R $\alpha$  (commune aux récepteurs à l'IL-4 et à l'IL-13), à savoir *Ile50Val*, *Ser478Pro*, *Gln551Arg* et du gène d'IL-13, à savoir *Arg130Gln*, dans l'apparition d'une allergie aux bêta-lactamines.

## Introduction

---

- Évaluer les interactions possibles entre ces déterminants génétiques (interaction gène-gène) qui sont probablement responsables de la susceptibilité à l'hypersensibilité aux bêta-lactamines.

Les objectifs secondaires sont, d'une part l'étude de l'influence de ces polymorphismes ainsi que leur association deux à deux sur le taux sérique d'IgE totales, et d'autre part étudier le déséquilibre de liaison et l'analyse des haplotypes de ces gènes afin d'évaluer en profondeur leur rôle dans l'allergie aux bêta-lactamines.

L'IL-4R $\alpha$  possédant des fonctions d'activateur de la transcription et étant nécessaire à la fixation d'IL-13 sur IL-13R $\alpha$ , des mutations ponctuelles sur le gène pourrait altérer les fonctions de la protéine correspondante et interférer dans les mécanismes de régulation des IgE par l'IL-4 et l'IL-13, et donc constituer un facteur de risque de l'allergie, en particulier médicamenteuse. De même, étant donnée l'implication d'IL-13 dans le phénomène étudié, des altérations de sa structure suite à une mutation génique pourraient être pressenties comme une des causes de la réaction d'hypersensibilité observée.

De plus, étant donné que l'IL-13 active le même récepteur membranaire que celui de l'IL-4, il est probable qu'il existe une interaction génétique entre le gène de l'IL-13 et le gène du récepteur (IL4RA).

## **Synthèse Bibliographique**

---

## **SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## Synthèse Bibliographique

### CHAPITRE I. Allergie et hypersensibilité

L'hypersensibilité est un terme utilisé pour décrire des signes ou symptômes reproductibles dans le temps, apparaissant après l'exposition à un stimulus donné à une dose habituellement tolérée par des individus sains (3,4). Ces manifestations peuvent être allergiques ou non. Lorsqu'elles sont allergiques (secondaires à un mécanisme immunologique), elles peuvent être IgE dépendantes ou non (3).

L'allergie est une réaction d'hypersensibilité liée à des mécanismes immunologiques spécifiques (figure 1). En effet, d'autres mécanismes peuvent être en cause dans le cas des hypersensibilités non allergiques tels que des phénomènes pharmacologiques. L'allergie peut être liée à une immunité cellulaire ou humorale (3,4).

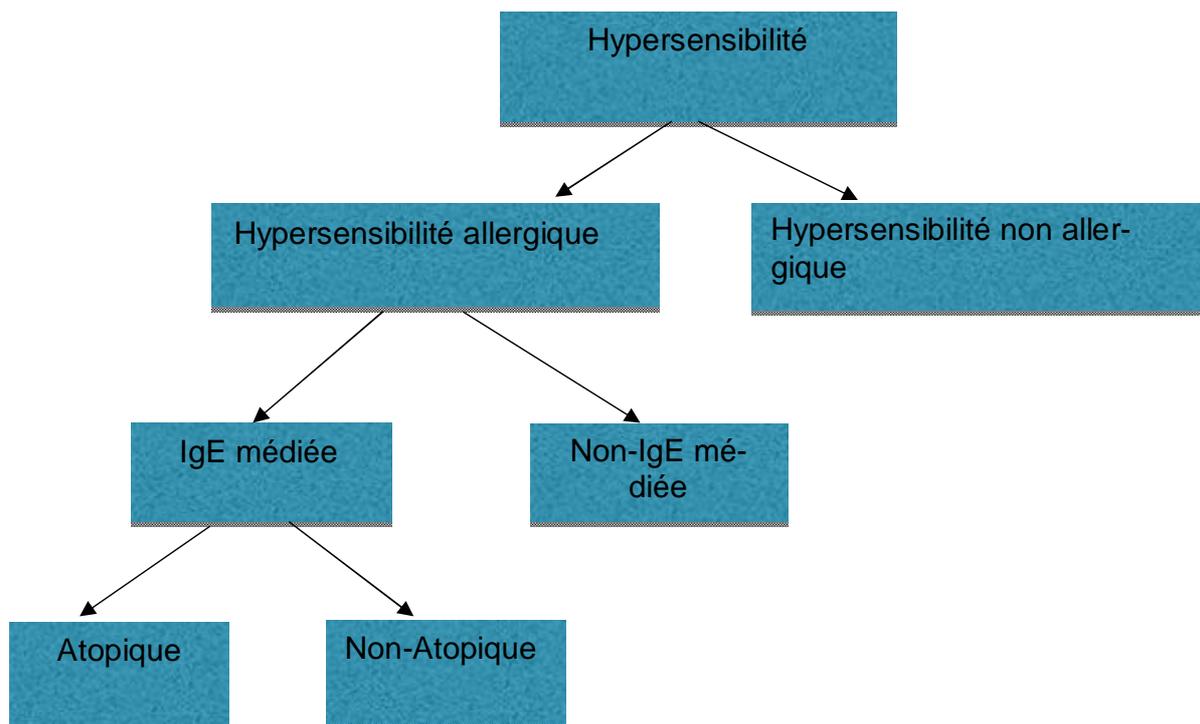


Figure 1. Définitions des hypersensibilités et allergies en fonction des mécanismes sous-jacents (3).

## Synthèse Bibliographique

---

En 1945, Gell et Coombs ont classé les hypersensibilités allergiques en quatre types qui rendent compte de la symptomatologie présentée ainsi que des mécanismes immunologiques impliqués.

On distingue les hypersensibilités allergiques de type I liées aux immunoglobulines de type E, de type II liées aux immunoglobulines de type G, de type III impliquant les complexes immuns et de type IV liées aux lymphocytes T CD4+ et CD8+ cytotoxiques (tableau 1).

Le type I correspond à des réactions médiées par les immunoglobulines E (IgE). Après un premier contact antigénique induisant la production d'IgE spécifiques dirigés contre l'antigène, l'antigène soluble est reconnu à l'occasion d'un second contact par les IgE spécifiques qui vont se lier à leur récepteur de haute affinité (FcεRI) placé à la surface des mastocytes. Cette liaison va provoquer l'activation et la dégranulation des mastocytes. Celle-ci libère différents médiateurs tels que l'histamine et provoque l'apparition de symptômes tels qu'une rhinite allergique, un asthme, une urticaire ou un choc anaphylactique (5).

Le type II est un mécanisme cytotoxique, médié par les IgG. Cette réaction cytotoxique va être dirigée contre la membrane des globules rouges, des globules blancs ou des plaquettes. Elle pourrait également se diriger contre les précurseurs des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse, induisant une anémie hémolytique, une leucopénie ou une thrombopénie. Il peut également s'agir d'anticorps dirigés contre d'autres récepteurs cellulaires tels que les récepteurs de la thyroïde (anticorps anti-thyroglobuline) qui seront alors responsables d'une thyroïdite auto-immune (5).

Le type III est lié à la présence de complexes immuns circulants. Ces complexes immuns pourraient se lier à la cellule endothéliale et provoquer l'activation du complément. Les symptômes classiquement associés à ces phénomènes sont les vascularites immunoallergiques (5).

Enfin, le type IV est lié à des phénomènes d'immunité cellulaire. Il existe différents mécanismes faisant intervenir les lymphocytes T CD4 avec une réponse Th1 ou Th2, ou les lymphocytes T CD8. Les manifestations cliniques sont extrêmement variables : psoriasis, dermatite atopique, pelade ou vitiligo, diabète et asthme allergique chronique, par exemple (4). Pichler a détaillé le type IV en 4 sous-catégories afin de tenir compte des mécanismes cellulaires sous-

## Synthèse Bibliographique

jacents. Le type IVa est lié à une réponse immunitaire Th1, impliquant majoritairement l'IFN $\gamma$ . Le type IVb est associé à une réponse Th2 impliquant l'IL4 et 5. Le type IVc est associé à une réponse lymphocytaire T cytotoxique, impliquant la perforine et le granzyme B. Enfin, le type IVd est associé aux cellules T et tout particulièrement à l'IL8 (6).

### I.1. Allergie médicamenteuse

Une allergie médicamenteuse est toujours associée à une réaction immune où peuvent être mis en évidence des anticorps et/ou des lymphocytes T activés spécifiques du médicament (1). Les mécanismes sont multiples. Les médicaments sont capables d'induire tous les types de réactions immunologiques de la classification de Gell et Coombs (7). Les antibiotiques – essentiellement les bêta-lactamines – sont la principale classe thérapeutique concernée et entraînent le plus fréquemment une allergie immédiate médiée par les immunoglobulines classe E (IgE) (réaction de type I, selon Gell & Coombs). Il s'agit de la manifestation la plus connue, qui résulte de l'interaction entre le médicament et les IgE spécifiques présentes à la surface des mastocytes et des basophiles. Ce mécanisme immunologique est responsable des réactions immédiates anaphylactique (choc anaphylactique, urticaire– angioœdème, bronchospasme) (8)

**Tableau 1. Classification des réactions d'hypersensibilité selon Gell et Coombs, et WJ Pichler, adapté de Mirakian et al, 2015(9).**

	Type de réaction	Délai d'apparition	Mécanisme immunologique	Exemples de signes cliniques
<b>Type I</b>	Immédiate	0 à 1 heure	IgE	Choc anaphylactique Angio- dème/Hypotension/Tachycardie Bronchospasme Urticaire
<b>Type II</b>	Cytotoxique	Environ 6 heures	IgG et complément	Cytopénie
<b>Type III</b>	Complexe immun	24 heures à 3 semaines	IgG-IgM	Glomérulonéphrite Maladie sérique Vascularites

## Synthèse Bibliographique

	Type de réaction	Délai d'apparition	Mécanisme immunologique	Exemples de signes cliniques
<b>Type IV</b>	Hypersensibilité retardée	> 48-72h	Cellule T	
<b>IVa</b>	Th1 activant monocytes/macrophages via IFN- $\gamma$ et TNF- $\alpha$			Dermatite de contact, eczéma
<b>IVb</b>	Th2 entraînant une inflammation (recrutement des éosinophiles) via IL-4 et 5			Exanthème maculo-papuleux (EMP) ou bulleux, DRESS
<b>IVc</b>	Cellules T cytotoxiques CD4 et CD8 (via perforine, granzyme B, FAS-L) entraînant l'apoptose des kératinocytes			Dermatite de contact, exanthèmes maculo-papuleux, pustuleux et bulleux, Syndrome Stevens-Johnson (SJS)
<b>IVd</b>	Cellules T recrutant et activent les neutrophiles via CXCL-8, GM-CSF			Nécrolyse épidermique toxique (Syndrome de Lyell) Pustulose aiguë exanthématique généralisée (PEAG)

### I.2. Hypersensibilités allergiques aux bêta-lactamines

Les bêta-lactamines représentent le traitement de choix dans un grand nombre d'infections. Cependant, leur utilisation est souvent limitée par une suspicion d'histoire allergique aux bêta-lactamines rapportée par le patient. La crainte d'une réaction anaphylactique grave génère un diagnostic porté par excès d'allergie aux bêta-lactamines. Cette surestimation expose au recours fréquent à d'autres alternatives antibiotiques pouvant être source d'altération de l'écologie bactérienne, de dépenses plus coûteuses, de l'émergence de souches bactériennes résistantes, et enfin d'effets indésirables (10).

On classe les allergies médicamenteuses (exp : antibiotique bêta-lactame) en fonction du délai de réaction par rapport à la prise du médicament : allergie immédiate, survenant dans un délai inférieur à quelques heures après la prise médicamenteuse et l'allergie retardée survenant plus tardivement (11). Nous nous concentrons de plus sur les allergies immédiates au bêta-lactamines.

## Synthèse Bibliographique

---

### I.3 Épidémiologie des allergies aux bêta-lactamines

La prévalence réelle des réactions allergiques aux bêta-lactamines dans la population générale reste inconnue en raison de l'absence pour longtemps de moyens diagnostiques objectifs. La fréquence des patients ayant une histoire clinique d'allergie à la pénicilline varie de 1 à 10% selon les études (12,13).

La majorité des réactions présumées allergiques aux bêta-lactamines sont des réactions cutanées. Les plus fréquemment rapportées étant les rashes maculopapuleux représentent ainsi (près de 75% des réactions présumées allergiques aux bêta-lactamines), viennent ensuite les réactions évoquant une hypersensibilité immédiate avec principalement l'urticaire et l'oedème de Quincke (14-18). Le choc anaphylactique survient dans 0,2% des cas avec une mortalité de 0,02% (19,20). On estime, toutefois, que le nombre de décès secondaire à une réaction anaphylactique aux bêta-lactamines représente 75% des chocs mortels d'origine médicamenteuse (21).

### I.4 Facteurs de risques

Le facteur de risque majeur est l'antécédent d'une précédente réaction au même médicament ou à un médicament potentiellement à risque d'allergie croisée.

De nombreux facteurs influencent la survenue de réactions d'hypersensibilité allergique (Tableau 2). Ils relèvent d'une part du caractère immunogène des médicaments, mais aussi du patient lui-même. Concernant les facteurs de risque liés au médicament, on sait que les phénomènes d'allergie seront plus fréquents pour des médicaments dont le poids moléculaire est supérieur à 1000 daltons, lors d'une administration intermittente et répétée, pour une dose antigénique forte (posologie quotidienne importante et/ou durée du traitement longue) et pour une administration par voie parentérale (20). La présence de certaines maladies sous-jacentes peut aussi jouer un rôle (15). Le fait que les bêta-lactamines soient intrinsèquement réactives (hap-tène) explique sans doute leurs implications fréquentes dans la survenue de réactions d'hypersensibilité allergique (2).

Concernant les facteurs de risque liés à l'hôte, notons l'âge : les patients les plus touchés sont les adultes entre 20 et 49 ans (20), le sexe : prévalence plus importante des accidents allergiques chez les femmes (22). De nombreuses études suggèrent l'intrication de facteurs géné-

## Synthèse Bibliographique

tiques et environnementaux dans la survenue des réactions allergiques aux bêta-lactamines. Le terrain atopique ne paraît pas être un facteur de risque, mais serait lié à des réactions plus graves (16).

On donnera plus de détail sur la prédisposition génétique aux réactions allergiques aux bêta-lactamines, essentiellement les allergies immédiates.

**Tableau 2. Facteurs de risque de développement de réactions allergiques médicamenteuses, adapté de Mirakian et al. (9, 23).**

Relatif au patient	Âge Sexe Génétique	Jeunes adultes > nourrissons, personnes âgées Femmes > Hommes Atopie peut entraîner des réactions plus sévères Polymorphisme génétique
Relatif au médicament	Pathologies concomitantes  Chimie Voie d'administration Dose	Virus (VIH, herpès, MNI) mucoviscidose (usage fréquent d'antibiotiques)  Cycle bêta-lactame, AINS, molécules de haut poids moléculaire (>1000 daltons), hap- tènes... Topique > orale/parentérale Traitement séquentiel > dose unique prolongée ou importante

### I.5 Structure moléculaire des bêta-lactamines

Les bêta-lactamines ou antibiotiques  $\beta$ -lactame sont une large classe d'antibiotiques qui comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases. Elles partagent une structure commune qui comprend de façon constante un cycle bêtalactame et, pour la plupart d'entre elles, un second cycle. Ainsi, en fonction des cycles et des chaînes latérales associées, on distingue :

- les pénicillines, également appelées pénames : les molécules de ce groupe comportent un noyau thiazolidine à côté du cycle bêtalactame. Selon la nature des chaînes latérales, on distingue : les pénicillines G, les pénicillines M et les pénicillines A ;

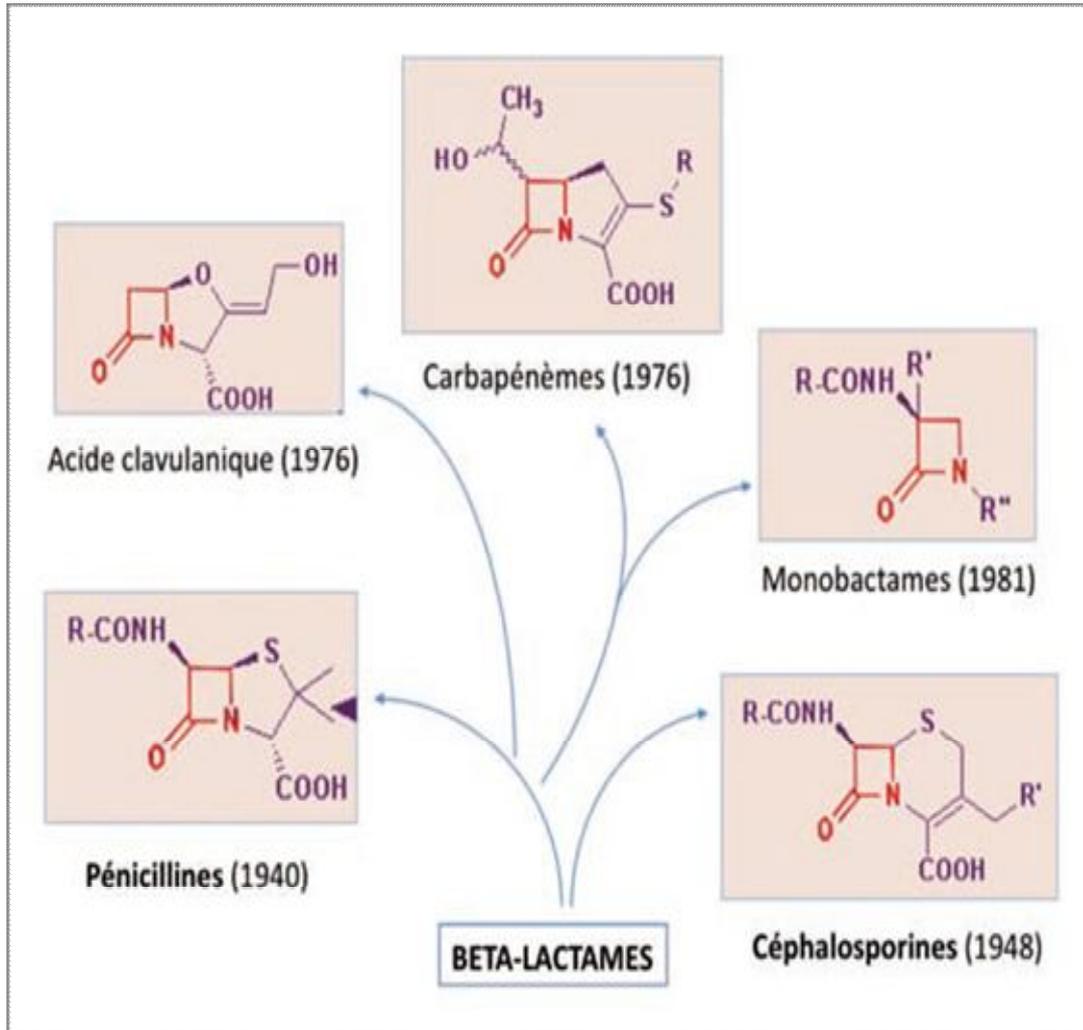
## Synthèse Bibliographique

---

- les céphalosporines : les molécules de ce groupe possèdent un noyau thiazine associé au cycle bêtalactame ;
- les carbapénèmes : leur noyau de base associe un cycle bêtalactame à un noyau pénème. On distingue l'imipénème, le méropénem et l'ertapénem ;
- les monobactames : le noyau est limité au cycle bêtalactame. Seul l'aztréonam est à l'heure actuelle utilisé en clinique humaine ;
- les clavames : leur représentant est l'acide clavulanique.

À l'exception des clavames, toutes les bêta-lactamines possèdent une ou plusieurs chaînes latérales reliées au noyau bêtalactame. Les chaînes latérales peuvent être similaires, voire identiques pour des membres de classes différentes, ce qui expliquerait l'existence de réactions croisées entre molécules de familles différentes (24,25) (figure 2).

Les réactions allergiques croisées entre  $\beta$ -lactamines intéressent plutôt les réactions allergiques de type immédiates. Les réactions croisées pénicillines-céphalosporines sont décrites entre 0,5% et 10% des cas, via le noyau bêtalactame ou une chaîne latérale similaire. Les réactions croisées entre céphalosporines par l'intermédiaire de la chaîne latérale R1 sont rares (5%). Les réactions croisées pénicilline/ carbapénème sont faibles (26).



**Figure 2. La Classe d'antibiotiques à base d'anneau bêta-lactame (27)**

La caractéristique commune à ces antibiotiques est un noyau bêta-lactame (en rouge). En dehors des monobactames, l'anneau bêta-lactame est couplé à un autre cycle propre à chaque classe d'antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes). Au sein d'une classe d'antibiotiques, les chaînes latérales (R, R' et R'') permettent de distinguer les différentes molécules. Il peut exister des chaînes latérales similaires entre différentes classes d'antibiotiques.

### I.6 Immunogénicité des bêta-lactamines

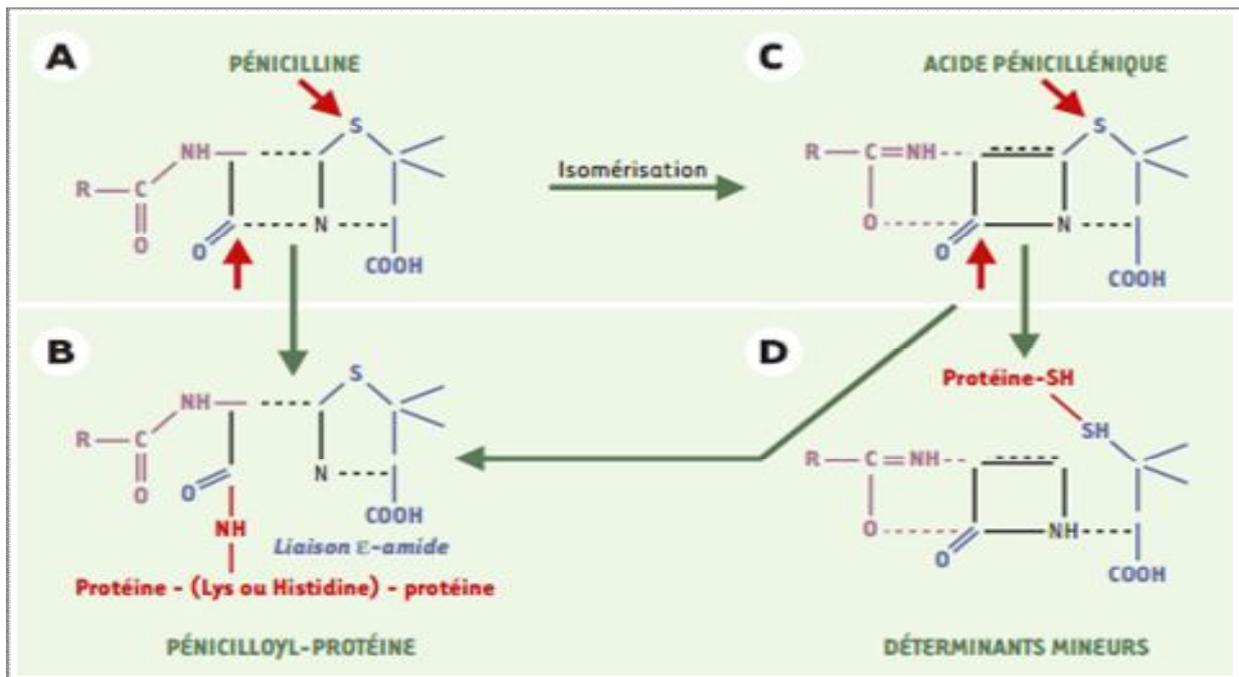
Comme la plupart des médicaments, les molécules de type  $\beta$ -lactamine ont un poids moléculaire inférieur à 1000 Daltons et de ce fait ne sont pas immunogènes en tant que telles. Pour être reconnues par le système immunitaire, elles doivent auparavant se fixer de façon covalente à une protéine porteuse. Les bêta-lactamines sont donc des haptènes. La liaison à une protéine se fait après ouverture du cycle  $\beta$ -lactame. Les déterminants antigéniques reconnus par les immu-

## Synthèse Bibliographique

noglobulines ont été étudiés et identifiés pour la famille des pénicillines, mais, beaucoup moins concernant les céphalosporines (Figure 3).

### I.6-1 Déterminant majeur :

Lorsque la pénicilline pénètre dans l'organisme, elle subira deux types de modifications. On peut observer une ouverture spontanée du cycle  $\beta$ -lactame, exposant ainsi le groupement carbonyle susceptible de réagir chimiquement avec l'amine d'une lysine ou d'une sérine (principalement) de la protéine porteuse. Le groupement pénicilloyl issu de l'ouverture du cycle est appelé déterminant majeur puisqu'il constitue le principal produit de dégradation immunogène et qu'environ 95% de la pénicilline liée aux protéines tissulaires est sous cette forme. Dans le cas de la benzylpénicilline (ou pénicilline G), on parle du BPO pour benzylpénicilloyl. Du point de vue clinique, ce déterminant est responsable de réactions dans 70% des cas (20).



**Figure 3. Déterminants antigéniques des pénicillines (27).**

- A** : Ouverture du cycle bêta-lactame qui expose le groupement carbonyle à une lysine ou une histidine
- B** : Formation d'une liaison covalente amide au sein d'une pénicilloyl-protéine
- C** : Formation de déterminants mineurs (**D**, pénicillamines) : l'acide pénicillénique, produit de l'isomérisation de la pénicilline, réagissant avec des résidus cystéines de chaînes protéiques.

## **Synthèse Bibliographique**

---

### **I.6-2 Déterminants mineurs :**

La pénicilline peut également subir une isomérisation en acide pénicillénique qui se liera de façon covalente à des protéines conduisant ainsi à la formation, dans 5% des cas, de déterminants antigéniques dits mineurs tels que pénicillanyl et pénicillenate. Toutefois, ces déterminants peuvent être à l'origine d'accidents sévères (28).

### **I.7 Exploration de l'allergie aux bêta-lactamines**

#### **I.7-1 Explorations in vivo**

##### **I.7-1-1 Les tests cutanés**

L'objectif des tests cutanés dans les allergies aux pénicillines est de pouvoir déceler les patients qui risquent de développer des réactions immédiates (c'est-à-dire médiées par les IgE) en cas de réintroduction de la pénicilline.

Ces tests sont bien standardisés pour les pénicillines, des produits correspondants aux déterminants antigéniques sont utilisés. Nous avons vu précédemment que le déterminant majeur est le BPO, pour les déterminants mineurs, il en existe plusieurs dont le benzylpénicilline, le benzylpénicilloate et le benzylpénilloate (29). Le déterminant majeur est couplé chimiquement à une protéine porteuse (la polylysine) et forme alors un complexe immunogène le pénicilloyl-polylysine (PPL). Quant aux déterminants mineurs libérés au cours du métabolisme, ils sont labiles et ne peuvent donc être utilisés sous cette forme. C'est pourquoi, selon les recommandations, un mélange de benzylpénicilline, de benzylpénicilloate et de benzylpénilloate devrait être utilisé pour les tests, il est encore appelé Minor Determinant Mixt (MDM)(30). Certaines conditions sont nécessaires pour la réalisation de ces tests :

- Il est recommandé d'effectuer le bilan d'une allergie médicamenteuse six semaines après la réaction allergique car si le test est effectué avant six semaines, il risque d'être faussement négatif surtout pour les réactions de type immédiat.

## Synthèse Bibliographique

---

- Les tests cutanés doivent être réalisés en l'absence de prise de médicaments qui peuvent interférer avec le résultat du test, notamment les antihistaminiques. En général, il est conseillé de les arrêter au moins 5 jours avant la réalisation des tests.
- Les tests doivent être réalisés en milieu hospitalier pour effectuer une surveillance notamment pour assurer la prise en charge en urgence en cas d'effets secondaires au cours du test.
- La positivité des tests doit être interprétée par rapport à des témoins. Pour le témoin positif, c'est de l'histamine à 10 mg/ml ou de la codéine phosphate à 9% qui sont utilisées. En ce qui concerne le témoin négatif, il s'agit du diluant du médicament. Très souvent, c'est du sérum physiologique à 9%, ou du sérum physiologique phénolé (30).

### ➤ **Le prick-test**

Le prick test permet de détecter des hypersensibilités immédiates. Ce test est en général réalisé sur la face antérieure de l'avant-bras ou sur le dos. Il consiste à effectuer une effraction épidermique au moyen d'une pointe de l'ordre du millimètre qui sera enfoncée dans la partie superficielle de la peau au travers d'une goutte d'extrait allergénique en respectant les concentrations recommandées (30-31).

L'allergène présent dans le derme superficiel, va provoquer le pontage de deux IgE spécifiques. Cela va conduire à la dégranulation cellulaire et la libération de médiateurs dont l'histamine. La lecture se fait après 15-20 minutes. Le diamètre de l'érythème est mesuré et surtout celui de la papule éventuellement présente. Un test positif se caractérise par un érythème de 4 à 20 mm et une papule de 3 mm qui permet de traduire la sensibilité des cellules de la peau aux pénicillines. La positivité du test cutané doit être interprétée par rapport à un témoin négatif et un témoin positif (histamine) (30).

### ➤ **Les tests intradermiques (IDR)**

Le test intradermique permet de détecter des hypersensibilités immédiates mais également des hypersensibilités retardées. Ces tests cutanés ne sont possibles seulement lorsque le médicament existe sous forme injectable. Les IDR sont réalisées seulement si les prick-tests sont négatifs en lecture immédiate.

## Synthèse Bibliographique

---

Un volume d'allergène est injecté en intradermique, ce volume doit former une papule de 3 mm environ, ce qui correspond à un faible volume environ 0,05 ml. Les tests sont réalisés à concentration croissante, en général de 0,02 mg/ml à 20 mg/ml pour l'amoxicilline (32). Dans le cas d'une IDR, l'allergène va rejoindre les IgE fixées sur les mastocytes, ce qui va déclencher une réaction d'hypersensibilité immédiate. L'allergène peut également rentrer en contact avec les cellules dendritiques qui vont le présenter aux cellules T, dans ce cas, ce sera une hypersensibilité de type retardé.

Comme pour les prick-tests, la lecture se fait après 15-20 minutes pour les tests de type immédiat et à la 24ème et 48ème heure pour les réactions retardées.

Pour le test immédiat, le résultat est considéré comme positif si la papule de réaction est entourée d'un érythème et si son diamètre est supérieur ou égal à la papule d'injection à savoir 3 mm.

Pour le test retardé, il est considéré comme positif si une lésion eczématiforme apparaît à l'endroit du test. Ces résultats doivent être comparés à un témoin négatif et à un témoin positif(30).

### **I.7-1-2 Sensibilité des tests cutanés**

Plusieurs essais cliniques, incluant plus de 20 000 sujets, ont montré que la sensibilité des tests cutanés en matière de diagnostic des réactions immédiates varie de 96 à 99%.

### **I.7-1-3 Spécificité des tests cutanés**

Contrairement à la sensibilité, la spécificité des tests cutanés est difficilement appréciable pour des considérations éthiques devant la crainte de réintroduire la molécule vis-à-vis de laquelle, le test cutané était positif. Il est tout de même estimé que s'agissant de réactions immédiates, la spécificité des tests cutanés aux bêta-lactamines varie de 50 à 62% (30).

## Synthèse Bibliographique

---

### I.7-2 Explorations in vitro

#### I.7-2-1 Dosage des IgE spécifiques

Le dosage sérique des IgE spécifiques aux  $\beta$ -lactames est souvent réalisé chez les patients qui présentent des tests cutanés négatifs malgré une histoire clinique. Les IgE spécifiques ont été initialement dosés par la technique du « RAST » (Radio Allergo-Sorbent Test). L'isotope radioactif employé a été remplacé par un marqueur enzymatique mais le terme RAST est toujours utilisé, son principe est de coupler le médicament à tester à un dérivé fluorescent et de l'incuber avec le sérum du patient contenant les IgE spécifiques. Toutefois, l'utilisation de cette méthode pour le diagnostic d'allergie aux bêta-lactamines est limitée puisqu'elle n'est disponible que pour un nombre restreint de molécules (AX, AP, pénicilline G, V et le cefaclor). La sensibilité de cette méthode varie de 40 à 74% avec une spécificité de 85% (33-34).

#### I.7-2-2 Test d'activation des basophiles

Le test d'activation des basophiles cherche à reproduire in vitro le déclenchement de la réaction d'hypersensibilité médiée par les IgE en mettant directement en contact la cellule avec les allergènes incriminés. Ce test se déroule en deux étapes :

- la première étape consiste à identifier les basophiles parmi l'ensemble des cellules du sang total grâce au marquage par un anticorps fluorescent anti-CCR3,
- la seconde étape permet d'identifier les basophiles activés. L'activation des basophiles entraîne des modifications phénotypiques, notamment la surexpression du marqueur CD203c ou l'expression de CD63 qui seront identifiés en cytométrie de flux grâce à des anticorps conjugués à un fluorochrome (par exemple la phycoérythrine ou un anticorps CD203c).

La cytométrie en flux est une méthode consistant à mesurer des cellules au sein d'un flux liquidien. La suspension cellulaire est injectée au coeur d'un flux liquidien qui en s'écoulant dans une buse conique de diamètre décroissant va focaliser les cellules et les entraîner, en les orientant, dans un fin capillaire pour les faire défiler à très grande vitesse au travers d'un faisceau lumineux focalisé.

## **Synthèse Bibliographique**

---

En traversant le faisceau lumineux, chaque cellule engendre des signaux lumineux, corrélés à des caractéristiques cellulaires, signaux qui représentent la source de données. Les données sont ensuite traitées et mémorisées informatiquement pour être retranscrites pour donner les résultats sous forme d'histogramme de fréquence (35). Les résultats sont toujours comparés à un témoin négatif et à un témoin positif. La sensibilité de cette méthode est de 50% avec une spécificité de 93% (34).

### **I.7-2-3 Test de provocation orale (TPO)**

Le TPO n'est effectué que si les autres explorations sont négatives. C'est le test de référence, le gold standard pour confirmer le diagnostic d'allergie médicamenteuse. Ce test est potentiellement dangereux et ne doit être entrepris qu'en milieu hospitalier dans un centre spécialisé avec matériel de réanimation à disposition.

Ce test est indiqué pour affirmer ou infirmer le diagnostic d'hypersensibilité chez les patients ayant une suspicion d'allergie avec un bilan cutané négatif ; pour trouver une alternative lorsqu'une allergie est confirmée pour une pénicilline et enfin d'exclure une réaction croisée entre une céphalosporine et une pénicilline lorsqu'une allergie est confirmée pour une pénicilline particulière(36).

Le test consiste à administrer par voie systémique au patient la molécule suspecte, ou une aminopénicilline si le médicament incriminé est inconnu, à intervalle fixe (30 à 60 minutes) et à posologies croissantes jusqu'à une dose cumulée finale correspondant à la posologie thérapeutique quotidienne(34). En cas de survenue de réaction d'hypersensibilité à la bêta-lactamine testée, l'utilisation ultérieure de cette molécule doit être formellement contre-indiquée(30).

### **I.8 Le bilan allergologique en cas de suspicion d'allergie aux bêta-lactamines**

Depuis les recommandations d'un groupe de travail ENDA (European Network for Drug Allergy) de l'Académie Européenne d'Allergologie (EAACI, European Academy of Allergy and Clinical Immunology), il existe désormais une démarche standardisée pour assurer le diagnostic de l'allergie aux bêta-lactamines.

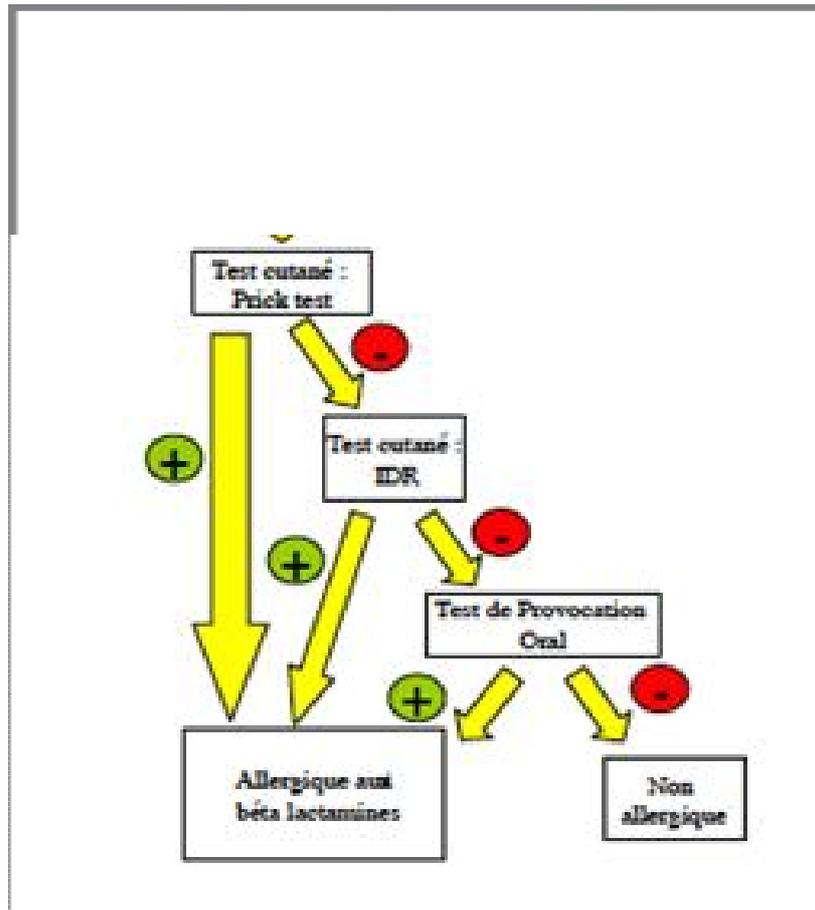
## Synthèse Bibliographique

---

La première étape du diagnostic consiste à savoir si l'histoire clinique est compatible avec une allergie aux bêta-lactamines. Pour cela, les symptômes cliniques présentés par le patient doivent être concordants avec ceux d'une réaction allergique et doivent être survenus dans l'heure après la prise médicamenteuse en cas de réaction allergique immédiate ou bien au-delà en cas de réaction allergique retardée. Pour cela, il convient de réaliser le questionnaire de l'ENDA (annexe n°2), qui ne prend que 5-6 minutes et permet de reprendre l'histoire clinique en détail sur ces différents points :

- symptômes cliniques ;
- délai d'apparition ;
- chronologie des prises médicamenteuses ;
- antécédents personnels et familiaux d'atopie ou d'allergie;
- résultats des examens biologiques réalisés pendant la réaction ou bien au décour;
- résultats des tests allergologiques cutanés et des tests de provocation orale.

## Synthèse Bibliographique



**Figure 4. Algorithme pour le diagnostic des allergies immédiates aux bêta-lactamines (37).**

La seconde étape concerne les tests cutanés qui sont l'outil diagnostique de base. Ils doivent être réalisés à distance de l'épisode suspecté comme allergique avec un délai de 6 semaines au moins. La sensibilité et la spécificité des pricks et des Intra Dermo Réactions (IDR) sont respectivement de 70% et 97% pour les pénicillines et de 86% et 60% pour les céphalosporines. En cas de test cutané positif, le patient est déclaré allergique aux bêta-lactamines. Dans le cas contraire, il faut réaliser un test de provocation.

Cette démarche standardisée (figure 4) permet le diagnostic des patients réellement allergiques aux bêta-lactamines et permet donc aux patients qui ne le sont pas de pouvoir réutiliser les bêta-lactamines sans crainte (37,38).

## Synthèse Bibliographique

---

En complément de tests cutanés, de tests biologiques doivent être effectués(34). Ils consistent en la détection d'anticorps spécifiques du médicament (IgE pour le type I). Seulement le résultat ne peut démontrer à lui seul une allergie. Ces tests sont de faible sensibilité, en particulier dans le cas des pénicillines (39,40). Les tests de dégranulation des basophiles ne sont pas fiables (50% de sensibilité)(41) compte tenu du faible nombre de basophiles circulants (40,42). Les tests de libération des sulfidoleucotriènes restent à valider du fait de leur manque de sensibilité et de spécificité (40,43). Devant une réaction clinique aigüe, un dosage sanguin d'histamine, de tryptase et des dosages urinaires de méthylhistamine précisent le rôle des basophiles et des mastocytes, quelle que soit la cause de la dégranulation (44).

### I.9 Le traitement des allergies

Il existe de nos jours très peu de traitements efficaces pour soigner les allergies. Le plus utilisé est ce que l'on appelle l'éviction de l'allergène(45).

Ce n'est pas réellement un traitement, car il consiste en fait à éviter tout contact avec l'allergène. Pour le cas des pénicillines, l'éviction est plutôt simple puisqu'il existe d'autres antibiotiques qui peuvent remplacer l'action des pénicillines, par exemple un macrolide, une tétracycline ou une quinolone. Les céphalosporines, quant à elles, sont plutôt déconseillées à cause du risque de réactions croisées. Cependant, il est bien connu que les autres antibiotiques sont moins efficaces que les pénicillines, et les  $\beta$ -lactames en général. Ils engendrent des résistances de la part de certaines bactéries, c'est la raison pour laquelle il est fortement conseillé d'effectuer les tests diagnostiques plutôt que de s'autodéclarer allergique à cause d'une mauvaise interprétation d'un phénomène cutané (45).

Lorsque le médicament est indispensable et irremplaçable, un traitement symptomatique peut être administré avant la prise du médicament. Cependant ce traitement ne va agir que sur les signes ou symptômes de l'allergie et pas sur sa cause. Il existe deux types de traitements symptomatiques : les antihistaminiques et les corticoïdes.

Les antihistaminiques réduisent les effets de l'histamine. Ils sont des antagonistes compétitifs des récepteurs de l'histamine de type I (H1). Il existe également un autre type

## Synthèse Bibliographique

---

d'antihistaminique : la tritoqualine, qui est un inhibiteur de l'enzyme L-histidine décarboxylase qui permet la synthèse de l'histamine à partir de la L-histidine.

Les corticoïdes sont des médicaments anti-inflammatoires, ils sont administrés en cas de réaction allergique violente. Il est conseillé d'administrer des corticoïdes en parallèle des antihistaminiques, car ces derniers n'empêchent pas les chocs anaphylactiques et peuvent même en masquer les premiers symptômes. Par contre, les corticoïdes en association avec des antihistaminiques ont pu diminuer l'incidence de certaines réactions allergiques (45).

La désensibilisation, ou immunothérapie spécifique agit sur le système immunitaire en induisant une tolérance de l'organisme vis-à-vis de l'allergène responsable des symptômes (46). Le traitement consiste en des injections de doses croissantes d'allergène au niveau sous-cutané. Elles doivent être réalisées à intervalles réguliers et peuvent durer plusieurs années. Les traitements ne cessent d'évoluer et deviennent plus simples pour le patient grâce à des traitements sublinguaux. La désensibilisation à la pénicilline est effectuée par voie orale, car le risque de réactions graves est amoindri (45).

La désensibilisation est le seul traitement reconnu par l'OMS comme efficace et durable. Elle offre d'excellents résultats sur le long terme, car ce traitement, comme son nom l'indique, désensibilise l'organisme et l'empêche de réagir. À l'heure actuelle, la désensibilisation est le seul traitement curatif de l'allergie. Cependant le risque de réaction grave n'est pas négligeable, une dose même infime de l'allergène peut mettre en jeu la vie du patient. De nouveaux traitements doivent donc être mis en place pour induire une tolérance sans présenter un danger pour le patient (46).

### **I.10 Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'allergie**

Les allergies, ou hypersensibilités allergiques peuvent relever d'un mécanisme cellulaire (impliquant des lymphocytes T) ou humoral (impliquant des immunoglobulines). Dans les hypersensibilités allergiques impliquant des immunoglobulines on distingue les allergies IgE dépendantes des allergies non IgE-dépendantes. La plupart des allergies, ou du moins les plus courantes, telles que la rhinite allergique, l'asthme allergique, la dermatite atopique et l'allergie

## Synthèse Bibliographique

---

alimentaire, sont des hypersensibilités IgE-dépendantes, également appelées "hypersensibilités de type I" ou "hypersensibilités immédiates" d'après la classification de Gell et Coombs.

Nous nous restreindrons ici à la description des mécanismes de l'hypersensibilité de type I.

L'hypersensibilité de type I se déroule en deux phases distinctes séparées dans le temps. La première phase, dite "phase de sensibilisation", est une phase durant laquelle le système immunitaire va identifier une substance comme un allergène et synthétiser des IgE spécifiques. Cette phase de sensibilisation est cliniquement muette. La seconde phase dite "phase effectrice", a lieu lors des contacts ultérieurs avec ce même allergène. Au cours de celle-ci, l'allergène va interagir avec les IgE spécifiques synthétisées lors de la phase de sensibilisation. S'ensuit de cette interaction allergène-IgE, une cascade de réponses cellulaires et moléculaires à l'origine des symptômes d'allergie observés (47).

### **I.10-1 Phase de sensibilisation**

Cette première phase débute par la rencontre de l'allergène avec certaines cellules de l'immunité innée appelées cellules présentatrices d'antigène (CPA). Les cellules présentatrices d'antigènes sont : les cellules dendritiques, les macrophages et monocytes, et les lymphocytes B. Les monocytes sont des cellules présentes au niveau sanguin qui vont pouvoir migrer au niveau des tissus et se différencier en macrophages. Au sein de chaque tissu, il existe des macrophages spécifiques (macrophages pulmonaires, cellules de Kupffer au niveau du foie...). Les CPA ont la particularité de résider au niveau des tissus de l'organisme formant une barrière avec le milieu extérieur : au niveau des muqueuses (nasale, pulmonaire, buccale, digestive, génitale...), mais également au niveau de la peau (épiderme). Elles vont donc pouvoir intercepter les particules étrangères (antigènes) et les capter. C'est ce qui se passe avec les allergènes(47).

Lors de la première exposition à l'allergène, celui-ci va être capté par les CPA et notamment par les cellules dendritiques qui sont les CPA les plus efficaces. Ce contact a lieu au niveau du site d'entrée de l'allergène (épithélium muqueux, tissus...) où sont présentes ces cellules. Les cellules dendritiques possèdent comme leur nom l'indique des "dendrites", qui sont des prolongements cytoplasmiques similaires à ceux observés chez les cellules neuronales, leur permettant de "scanner" l'environnement proche à la recherche d'antigènes(47).

## Synthèse Bibliographique

---

La reconnaissance de certains allergènes par les CPA se fait grâce à un motif présent à leur surface, appelé PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns). Ce PAMP va être reconnu par son récepteur, appartenant à la famille des PRRs (Pattern Recognition Receptors), présent à la surface des CPA. La cellule dendritique ayant capté l'allergène va l'internaliser par endocytose. Au sein de la vésicule d'endocytose, celui-ci va être dégradé en peptides, s'il est de nature protéique (ce qui est le cas de la plupart des allergènes). L'allergène ainsi apprêté va être associé à des molécules du CMH de classe II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Se forme alors un complexe peptide antigénique - CMH II, qui va migrer à l'intérieur de la cellule et venir se placer à la surface de sa membrane(47).

À l'issue de sa rencontre avec l'allergène, la cellule dendritique présentera donc à sa surface les peptides antigéniques liés au CMH II. Ce phénomène va entraîner la maturation de la cellule dendritique qui va alors exprimer à sa surface un ensemble de molécules de coactivation qui lui seront nécessaires par la suite. Celle-ci va quitter le tissu périphérique où elle a rencontré l'allergène et migrer vers les organes lymphoïdes secondaires : les ganglions lymphatiques locaux. C'est au niveau de ces ganglions que la cellule dendritique activée va rencontrer un lymphocyte T naïf possédant un récepteur TCR (T cell receptor) spécifique capable de reconnaître les fragments d'allergène (peptides) apprêtés et associés au CMH II. Un TCR reconnaît uniquement le complexe peptide-CMH II qui lui est spécifique. Le lymphocyte T naïf est un lymphocyte TH (helper) CD4+ (47).

La reconnaissance par le lymphocyte TH CD4+ naïf, via son TCR, du complexe CMH II-peptide présenté par la cellule dendritique, va entraîner un premier signal d'activation pour le lymphocyte. Un second signal va être induit par la stimulation de co-récepteurs exprimés par les deux types de cellules, lymphocyte et cellule dendritique. De plus, l'environnement cellulaire riche en cytokines sécrétées par la cellule dendritique va également contribuer à l'activation du lymphocyte. Ces trois signaux (1. TCR/peptide-CMH II ; 2. Co-récepteurs ; 3. environnement moléculaire (cytokines)) vont donc entraîner l'activation du lymphocyte T qui va alors sécréter de l'IL-2 et augmenter l'expression du gène codant pour la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2. L'IL-2 est une interleukine jouant un rôle majeur dans la prolifération lymphocytaire. Le lymphocyte activé va donc proliférer, formant un clone de lymphocytes T exprimant le même TCR, et se différencier en cellules effectrices TH2. Le phénotype TH2 des lymphocytes est déterminé par

## Synthèse Bibliographique

---

l'allergène, par la nature des cytokines libérées par la CPA et les cellules de son environnement, ainsi que par la nature des cytokines sécrétées par le lymphocyte T en réponse à son activation. À ce propos, l'IL-4 est la principale cytokine polarisante TH2. Dans l'allergie, la différenciation se fait vers la voie TH2(47).

Dès lors, les lymphocytes TH2 vont au niveau des ganglions lymphatiques pouvoir rencontrer des lymphocytes B ayant été partiellement activés par l'allergène. En effet, les allergènes présents au niveau du site d'entrée (muqueuses, peau) vont se retrouver dans l'espace interstitiel et être drainés via le système lymphatique vers les ganglions. Au niveau de ces derniers, ils vont pouvoir entrer en contact avec des lymphocytes B naïfs exprimant des BCR (B cell receptor) spécifiques de l'allergène. Contrairement aux lymphocytes T CD4+ qui ne reconnaissent que les allergènes apprêtés et liés au CMHII, les lymphocytes B peuvent directement reconnaître et lier l'allergène à l'état "natif". Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes(47).

Le lymphocyte B ayant reconnu l'allergène par son BCR spécifique va lier celui-ci et l'internaliser par endocytose. Il sera comme vu précédemment avec les cellules dendritiques, apprêté et associé au CMH de classe II. Puis ce complexe va être exprimé à la surface du lymphocyte B au niveau membranaire. La cellule B est alors partiellement activée et va présenter son complexe peptide-CMH II aux cellules T spécifiques ayant été activées par les cellules dendritiques. Le TCR des lymphocytes T activés va se lier au complexe peptide-CMH II exprimé par le lymphocyte B. Cette liaison va également engager des co-récepteurs (Figure 5)(47).

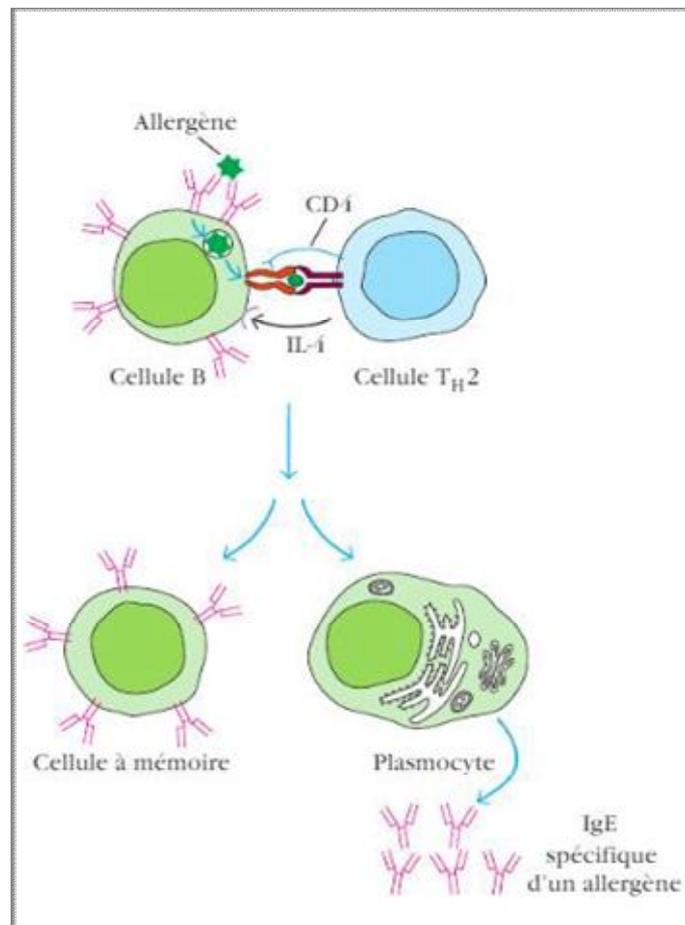
Le lymphocyte B totalement activé va proliférer et se différencier sous l'influence de cytokines libérées par les lymphocytes TH2 activés (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13...). Une partie des lymphocytes B vont se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques de l'allergène. Les plasmocytes produisent initialement des IgM. À la suite des mécanismes d'hypermutation somatique et de switch, les lymphocytes B vont s'orienter vers la production de l'isotype IgE. Les nouveaux plasmocytes différenciés sécrèteront alors des IgE. Cette commutation isotypique est induite par l'environnement cytokinique et la coopération avec les lymphocytes T spécifiques. D'autres lymphocytes B vont persister sous forme de cellules mémoires (Figure 6)(47).



**Figure 5. Liaison de l'allergène au BCR du lymphocyte B (signal 1), puis internalisation et présentation des peptides allergéniques associés au CMH de classe II au lymphocyte T possédant le TCR spécifique (signal 2) (48).**

## Synthèse Bibliographique

Les IgE secrétées par les plasmocytes vont aller se fixer sur leurs cellules cibles : les granulocytes (mastocytes, basophiles, éosinophiles), et en particulier sur les mastocytes. Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs Fc $\epsilon$ R capables de lier la partie constante Fc des IgE. Il existe deux types de récepteurs Fc $\epsilon$ R : les Fc $\epsilon$ RI qui sont des récepteurs de très haute affinité et les Fc $\epsilon$ RII, ou CD23, qui eux ont une faible affinité pour les IgE. Les récepteurs Fc $\epsilon$ RII ne vont lier que les IgE déjà couplés à leur allergène. Les récepteurs Fc $\epsilon$ RI sont des récepteurs tétramériques formés de deux sous-unités  $\gamma$ , d'une sous-unité  $\beta$  et d'une sous-unité  $\alpha$ . C'est cette dernière sous-unité  $\alpha$  qui va lier le Fc des IgE. Les autres sous-unités seront responsables de la transduction du signal. Contrairement aux récepteurs Fc $\epsilon$ RII, les récepteurs Fc $\epsilon$ RI de haute affinité vont lier les IgE seuls, non couplés à l'allergène (47).



**Figure 6. Présentation de l'allergène par la cellule B et différenciation en plasmocytes sécréteurs d'IgE (47).**

## Synthèse Bibliographique

---

Les granulocytes ayant fixé les IgE vont rester "latents" au niveau des tissus périphériques jusqu'à la rencontre de l'allergène lors d'une deuxième exposition. Ainsi cette première phase de sensibilisation à l'allergène est totalement asymptomatique. C'est une phase durant laquelle le système immunitaire met en place les effecteurs qui interviendront dans la genèse de la réponse allergique symptomatique lors de contacts ultérieurs avec l'allergène(47).

### **I.10-2 Phase effectrice de la réaction allergique**

Lors d'une seconde exposition et des expositions ultérieures à l'allergène, l'allergène va se fixer sur les IgE spécifiques portées par les granulocytes basophiles et principalement par les mastocytes, présents au niveau du site d'entrée. La liaison d'un allergène à un seul anticorps n'activera pas le récepteur FcεRI du mastocyte liant le fragment Fc de l'IgE. Pour pouvoir activer les récepteurs FcεRI un même allergène doit être lié par plusieurs IgE portées par les FcεRI d'une même cellule(47).

On observe alors un pontage entre les récepteurs FcεRI qui va entraîner leur agrégation (cross-linking) (Figure 7). Les récepteurs sont alors activés et transmettent un signal positif à la cellule. La transmission de ce signal au sein du mastocyte et des basophiles va entraîner une cascade de signaux moléculaires qui vont induire une réponse primaire et une réponse secondaire(47).

La réponse primaire va se traduire par la dégranulation du mastocyte qui va libérer des substances vasoactives. Ces substances sont préformées et stockées dans des granules. Les principales substances libérées sont l'histamine, l'héparine, le facteur chimio-attractant des éosinophiles (ECF), le facteur chimio-attractant des neutrophiles (NCF) et des protéases.

## Synthèse Bibliographique

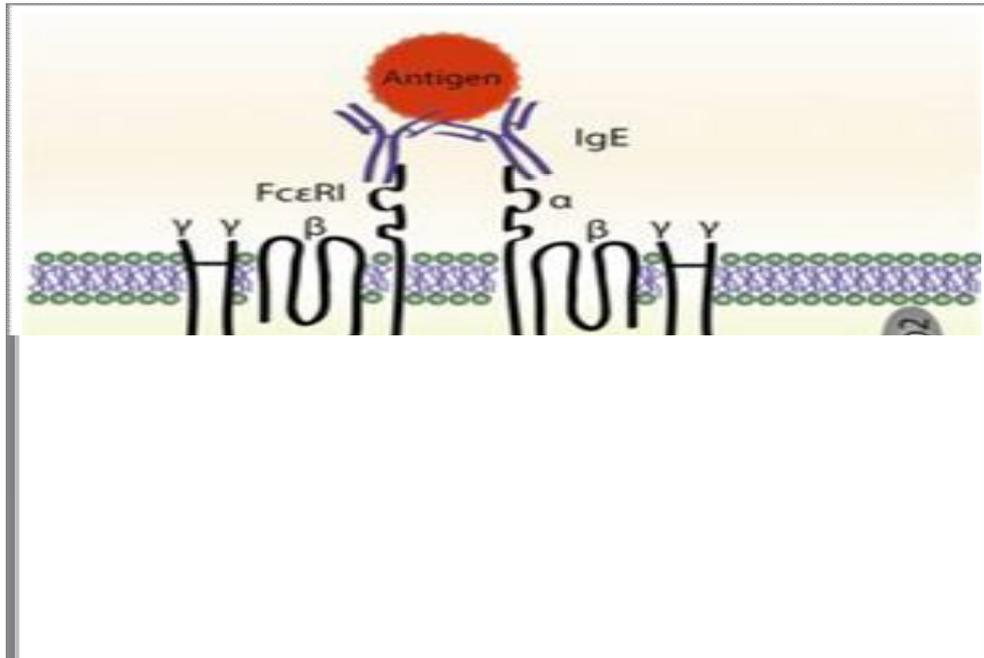


Figure 7. Pontage des récepteurs FcεRI par l'allergène liant plusieurs IgE(49).

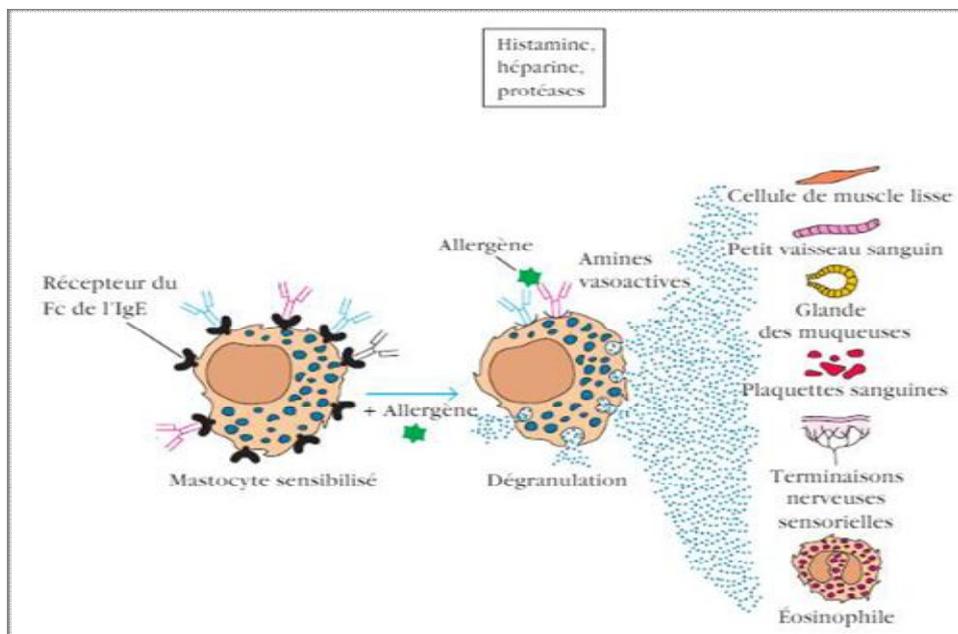


Figure 8. Phase primaire de la réaction d'hypersensibilité de type I(47).

## Synthèse Bibliographique

---

Les effets biologiques induits par ces substances sont observés dans les minutes qui suivent l'exposition à l'allergène (Figure 8)(47).

La réponse secondaire se traduit par la synthèse de médiateurs de l'inflammation par le mastocyte activé: prostaglandines, leucotriènes, bradykinines, facteur d'activation des plaquettes (PAF), chimiokines et cytokines. Cette réponse est qualifiée de secondaire en raison du délai nécessaire à la synthèse de ces médiateurs. Ceux-là ne sont pas préformés et stockés, contrairement aux substances vasoactives, et donc ne seront libérés que plus tard après l'activation du mastocyte par les allergènes(47).

L'ensemble des molécules libérées va être à l'origine des symptômes allergiques. L'histamine, composant majeur des granules des mastocytes, va se fixer sur ses récepteurs H1, H2, H3 et H4. Ses effets biologiques observés dans l'allergie sont dus en grande partie à sa liaison avec les récepteurs H1. Ces derniers sont présents sur de nombreux tissus. La fixation de l'histamine sur les récepteurs H1 situés sur l'endothélium vasculaire va induire une vasodilatation et augmenter la perméabilité vasculaire. En activant les récepteurs H1 présents sur les muscles lisses bronchiques et intestinaux, l'histamine va entraîner la contraction de ces muscles. L'activation des récepteurs H1 induit également la production de mucus. L'activation des récepteurs H2 va induire une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Les récepteurs H2 sont également présents à la surface des mastocytes et des basophiles. Leur activation va entraîner l'arrêt de la dégranulation de ces cellules. Ainsi l'histamine via les récepteurs H2 exerce un rétrocontrôle négatif sur la libération des médiateurs de l'inflammation(47).

Les leucotriènes et les prostaglandines, dont la synthèse est induite après activation et dégranulation des granulocytes, vont entraîner la contraction de muscles lisses (bronchoconstriction notamment). Ils vont également augmenter la perméabilité vasculaire et la sécrétion de mucus. Les granulocytes activés vont synthétiser et sécréter diverses cytokines et chimiokines telles que l'IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, le GM-CSF et le TNF- $\alpha$ . Ces interleukines vont impacter l'environnement local en entraînant l'accumulation de cellules de l'inflammation telles que neutrophiles et éosinophiles. L'IL-5 va activer et mobiliser les éosinophiles. L'IL-8 va attirer de nombreuses cellules vers le site de la réaction : neutrophiles, basophiles et lymphocytes T. Cette interleukine agit donc comme facteur chimio-attractant. Le GM-CSF va induire l'activation et la

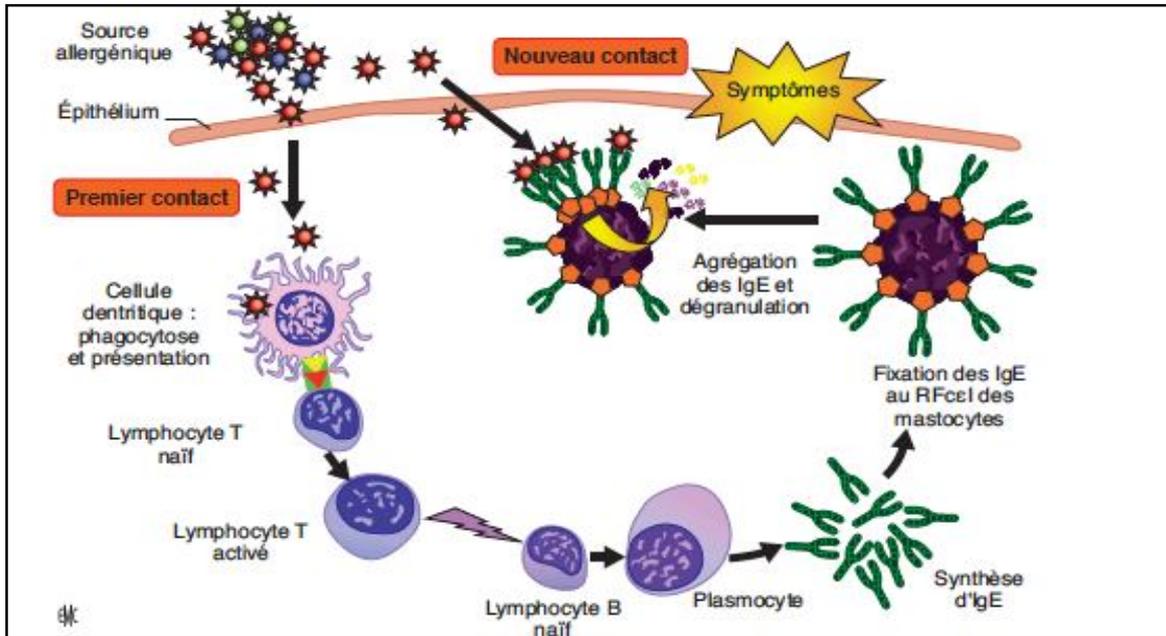
## Synthèse Bibliographique

---

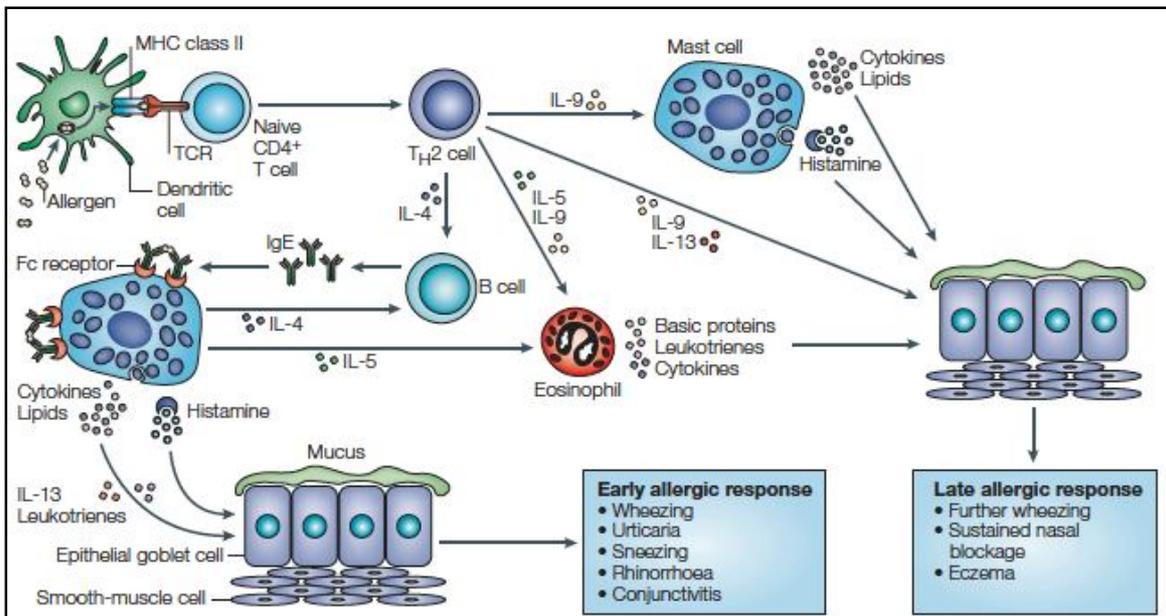
production de granulocytes et de macrophages. Les protéases, tryptase et chymase, vont augmenter la sécrétion de mucus et entraîner la dégradation de la membrane basale des vaisseaux sanguins. Le PAF va provoquer l'agrégation et la dégranulation des plaquettes, ainsi que la contraction des muscles lisses bronchiques. La bradykinine va augmenter la perméabilité vasculaire et la sécrétion de mucus(47).

En résumé, la phase effectrice de l'hypersensibilité immédiate va être déclenchée par l'activation de granulocytes par pontage antigénique des IgE (Figure 9).

## Synthèse Bibliographique



**Figure 9. Physiopathologie de l'hypersensibilité à l'immunoglobuline E (IgE)(50).**  
**RFcε1** : récepteur de haute affinité du fragment constant (Fc) des IgE.



**Figure 10. Mécanismes physiopathologiques de l'hypersensibilité de type I (51).**

## Synthèse Bibliographique

---

L'activation de ces cellules va, via une cascade de signalisation, conduire à la libération de médiateurs préformés stockés dans des granules (phase précoce) à l'origine des symptômes observés dans les minutes suivant l'exposition à l'allergène, et à la synthèse de médiateurs lipidiques et protéiques (phase tardive) qui seront libérés plus tard au cours de la réaction. Ces médiateurs secondaires induisent une inflammation locale soutenue par l'afflux de cellules neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes TH2, et seront à long terme responsables d'altérations tissulaires (Figure 10)(47).

L'IL-4 et l'IL-13 vont induire la production d'IgE par les lymphocytes B. L'IL-4 produites par les mastocytes agit sur les lymphocytes Th2 par un rétrocontrôle positif, entretenant leur production de cytokines (52). L'IL-13, synthétisée par Th2, mais également par Th1 ou les lymphocytes T CD8+, agit en synergie avec IL-4 sur la synthèse d'IgE par les lymphocytes B, notamment lorsque la concentration d'IL-4 est subnormale (53). Ceci montre donc l'importance de ces interleukines dans la régulation de la synthèse des IgE et dans le mécanisme immunologique de l'hypersensibilité immédiate.

Ce travail de thèse s'est penché sur les interactions au niveau moléculaire entre les IgE, interleukines et les bêta-lactamines. Ainsi, il est important de connaître les caractéristiques de ces interleukines, leurs récepteurs, ainsi que ce type d'anticorps, et plus particulièrement la partie hypervariable capable de reconnaître spécifiquement l'antibiotique.

La structure de base des anticorps (type IgG) est un complexe de 4 chaînes protéiques identiques 2 à 2 (2 chaînes lourdes H =Heavy et 2 chaînes légères L=Light), fixées par des ponts disulfure inter et intra-caténaires. Chaque chaîne d'Ig contient des domaines constants (Fc pour Fragment constant formé par les régions constantes des deux chaînes lourdes) et variables (Fab pour Fragment antigen binding formé par les régions variables et hypervariables des quatre chaînes polypeptidiques de la molécule) (54).

**Les immunoglobulines de type E** ont un poids moléculaire de 190 k.Daltons et sont les moins nombreuses des immunoglobulines circulantes. On estime que les IgE sériques correspondent à environ 50% des IgE totales, le reste étant lié aux mastocytes et basophiles via leurs récepteurs à haute affinité Fc $\epsilon$ RI. Elles sont constituées de quatre chaînes protéiques (2 chaînes lourdes epsilon et 2 légères kappa ou lambda) organisées en domaines d'environ 110 acides ami-

## Synthèse Bibliographique

nés chacun. Les IgE ont environ 12% de sucres et présentent une structure similaire à celle des autres immunoglobulines, mais avec un pont disulfure supplémentaire et un domaine constant en plus pour les chaînes lourdes. Elles sont synthétisées par les lymphocytes B après commutation isotypique induite par l'environnement cytokinique provenant des lymphocytes T CD4+. La commutation IgE passe par le réarrangement des gènes du lymphocyte B, jusque-là producteur d'immunoglobulines de type M et qui devient désormais producteur d'IgE. Trois éléments sont requis pour induire cette commutation. D'une part les interleukines 4 et 13. D'autre part, le couple CD40/CD40L et enfin, le CD23/CD21. Les IgE ne fixent pas le complément, mais exercent leurs effets biologiques par liaison de leur domaine constant epsilon 2 et 3 avec les récepteurs cellulaires (FcεR). Il existe deux types de récepteurs à IgE. Le récepteur à IgE de forte affinité, le FcεR1 qui possède une constante de dissociation avec l'IgE de  $10^{-9}$  à  $10^{-10}$ M et le récepteur à IgE de faible affinité, le FcεR2 qui est essentiellement présent sur les éosinophiles, mais aussi sur la paroi des macrophages alvéolaires, les plaquettes, les lymphocytes. Notons que les interactions IgE/ FcεR2 sont faibles et c'est la sommation de liaisons proches qui peut induire une activation cellulaire. La figure 11 ci-après présente la structure d'une IgE (54).

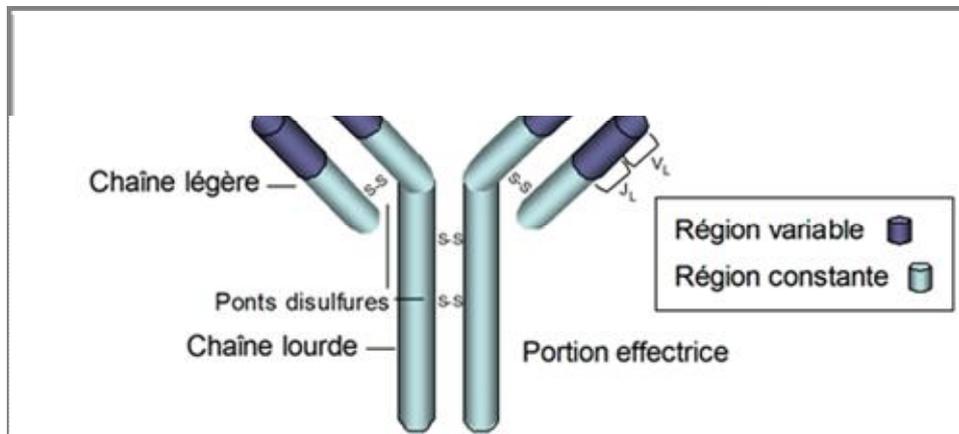


Figure 11 : Structure d'une immunoglobuline de type E (54).

## Synthèse Bibliographique

---

### I.11 IL-4, IL-13 et leurs récepteurs

#### I.11-1 IL-4 et son récepteur

Cette cytokine est codée par un gène situé sur le chromosome 5q31. Il s'agit d'une protéine de 153 acides aminés comportant une séquence signal de 24 acides aminés. Son poids moléculaire est de 17.5 kDa.

Elle est produite par les lymphocytes T activés CD4<sup>+</sup> et TNK (cellules T natural killer) de façon rapide et transitoire et par les lymphocytes Th2 et les mastocytes de façon prolongée. L'interleukine 4 est un facteur de croissance des lymphocytes B et T, indispensable à la commutation des gènes des chaînes lourdes  $\mu \rightarrow \epsilon$ , c'est aussi un facteur de croissance des mastocytes et basophiles, en synergie avec IL-13 et IL-9. Cette cytokine agit par l'intermédiaire de sa liaison à son récepteur composé d'une chaîne IL-4R $\alpha$  de 140 kd et d'une chaîne  $\gamma$  commune à IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 et IL-15 (55).

IL-4R $\alpha$  est codé par un gène localisé sur le chromosome 16p12 constitué de neuf exons et huit introns. Cette protéine est constituée de 825 acides aminés (dont 25 formants le peptide signal). Les récepteurs de l'IL-4 sont présents dans les tissus hématopoïétiques, endothéliaux, épithéliaux, musculaires, dans les fibroblastes, les hépatocytes et dans le cerveau, et sont habituellement exprimés entre 100 et 5000 exemplaires par cellules (56).

Le récepteur de l'IL-4 est une protéine transmembranaire formée d'un hétérodimère d'une chaîne alpha ( $\alpha$ ), de haute affinité et spécifique à l'IL-4, et d'une chaîne gamma ( $\gamma$ ), commune aux récepteurs de plusieurs cytokines. La chaîne IL-4R $\alpha$  lie l'IL-4 et la chaîne IL-4R $\gamma$  forme un autre hétérodimère avec le IL-13R $\alpha$  que l'on nomme récepteur de l'IL-13 (IL-13R) (57, 58). Comme pour d'autres récepteurs de cytokines, les parties cytoplasmiques des sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  du récepteur de l'IL-4 et de l'IL-13 sont associés avec les tyrosines kinases de la famille Janus. La liaison de l'IL-4 avec son récepteur provoque l'activation de ces kinases, lesquelles permettent la phosphorylation des tyrosines du signal de transduction et d'activation STAT-6 (un facteur de transcription cytoplasmique). On appelle cette cascade de signalisation JAK-STAT qui, une fois

## Synthèse Bibliographique

---

activée, permet au STAT-6 de migrer jusqu'au noyau des cellules et de s'attacher aux séquences consensus trouvées dans les régions « promoteur » des gènes régulés par l'IL-4 et l'IL-13 (59).

L'IL-4R $\alpha$  est un élément essentiel dans les mécanismes immunologiques de l'hypersensibilité immédiate, car il permet à l'IL-4 et à l'IL-13 d'exercer leurs effets biologiques par leur attachement avec leur(s) récepteur(s) respectifs dans les différentes cellules cibles. L'activation des voies de signalisation résulte en une voie unique de réponse cellulaire à l'IL-4 (49). Le gène IL4RA est un candidat idéal parce qu'il active la signalisation intracellulaire de ses principaux ligands, IL-4 et IL-13, ce qui lui permet de jouer un rôle-clé dans l'inflammation allergique (60).

IL4RA est un gène exceptionnellement polymorphe avec un nombre important de SNPs qui ont été rapportés (51). Parmi eux, quelques-uns ont été associés à l'asthme et à l'atopie (55) et huit sont codants et décrits comme résultant en un changement de conformation de la protéine mature (58,62). Ces altérations structurales dans la région extracellulaire du IL-4R $\alpha$  résultent en des capacités de signalisation altérées. Par exemple, le polymorphisme Ile50Val, qui résulte de la substitution d'une Isoleucine (Ile) pour une Valine (Val) au 50<sup>e</sup> codon, a été isolé chez les individus atopiques et associé à une plus grande activité du signal de transduction provoquant une augmentation de la production d'IgE (56).

### I.11-2 IL-13 et son récepteur

Le gène codant pour cette protéine de 12 kDa (132 acides aminés) est composé de quatre exons et trois introns. Cette cytokine est synthétisée à un niveau relativement élevé par les lymphocytes Th2 CD4<sup>+</sup> après activation ainsi que par les lymphocytes Th0, T CD8<sup>+</sup> et en moindre quantité par les cellules T CD45RA<sup>+</sup> naïves et Th1 à faible taux (63).

Le gène IL13 est situé dans la portion proximale du chromosome 5q31. Étant donné que le gène IL13 est situé à seulement 25 kilobases (kb) en amont du gène IL-4 dans la même orientation, cela mène à la spéculation que ces deux gènes seraient nés d'une duplication au cours de l'évolution (64). D'ailleurs, ces deux gènes codent pour des cytokines (IL-13 et IL-4) qui partagent 25 % d'homologie au niveau de leurs acides aminés (65). L'IL-13 est considéré comme un médiateur critique de la phase tardive de la réponse allergique (66).

## Synthèse Bibliographique

---

Plusieurs évidences supportent l'implication de l'IL-13 dans la pathogenèse de l'allergie bien que les mécanismes physiologiques qui sous-tendent soient encore incertains. L'IL-13 possède plusieurs fonctions similaires à celles de l'IL-4, mais possède quand même ses particularités (66). Ce regroupement de fonctions biologiques de l'IL-4 et de l'IL-13 est dû au fait que leur récepteur, respectivement IL-4R et IL-13R, partagent la chaîne IL-4R $\alpha$ , ce qui induit l'activation du STAT6 par la voie de signalisation JAK-STAT (55). Donc, tout comme pour l'IL-4, l'IL-13 active cette cascade de signalisation dans les cellules cibles pour exercer ses effets. Ainsi, l'IL-13 joue un rôle dans la commutation et la production d'IgE (67).

### CHAPITRE II : Génétique des hypersensibilités de type I

L'hypersensibilité de type I est une maladie complexe à caractère familial qui se heurte :

- A l'hétérogénéité des cas : une allergie correspond à plusieurs phénotypes ;
- Au nombre de gènes de susceptibilité : chaque gène ayant une aire peu étendue mais un effet significatif sur la susceptibilité de la pathologie, il est probable que les gènes aient des actions synergiques ou des effets additifs.

Les études de génétique se heurtent à des difficultés méthodologiques ainsi qu'à des résultats manquant de cohérence, car tirés de groupes inhomogènes de patients. Ceci explique pourquoi certaines études selon leurs critères d'inclusion (souvent fondés sur des questionnaires manquant de précision) et leurs seuils de positivité (positivité de tests cutanés, élévation des IgE sériques, présence d'IgE spécifiques...) aboutissent à des résultats difficiles à reproduire, voire contradictoires (68).

L'importance de réaliser des groupes ethniques ne doit pas être négligée, car la fréquence de certains allèles peut être différente entre deux groupes ethniques. L'absence d'un allèle n'est pas significative d'une non-responsabilité dans la pathologie : il est possible que l'allèle soit tout simplement absent du génome. Tout le pouvoir statistique d'une étude génétique tient donc grandement dans le choix des groupes, des critères d'inclusion et de positivité des tests réalisés (69).

Cela étant, certains gènes ou groupes de gènes ressortent de ces études, notamment ceux impliqués dans la polarisation de la réponse immune vers un phénotype TH2 favorisant les réac-

## Synthèse Bibliographique

---

tions allergiques (70). Les mutations génétiques peuvent être dues à des interactions gène-gène, gène-environnement ou à des modifications épigénétiques.

Les interactions gène-gène sont une source de variabilité : une seule mutation n'a qu'un impact mineur, alors qu'une combinaison de plusieurs mutations peut avoir un effet significatif sur un phénotype.

Dans l'asthme par exemple, une synergie de mutations portant sur les gènes codant pour l'IL-4 (C-589T), l'IL-13 (C/T), l'IL-4R (A/C/G) et STAT6 (C/T) multiplie par 10.8 le risque d'avoir un taux élevé d'IgE et par 16.8 le risque de développer de l'asthme (71). A l'inverse, la simple mutation de l'IL-13 n'est pas associée à une augmentation du risque allergique (72).

Une étude allemande a testé 6 variants potentiellement fonctionnels des gènes IL-4 (C-590T), IL-13 (C-1055T et Arg130Gln) et IL-4R (Ile50Val, Ser478Pro, Gln551Arg), susceptibles d'augmenter le risque de sensibilisation à l'alimentation, aux mites, aux poils de chat et aux allergènes extérieurs (73). Il apparaît que le variant C-1055T de l'IL-13 est associé de manière significative à une augmentation du risque de sensibilisation aux allergènes alimentaires et extérieurs. Cependant les effets du génotype TT de l'IL-4 sur la sensibilisation aux allergènes alimentaires sont différents suivant le génotype de l'IL-4R auquel il est associé.

Cela montre que certains variants jouent un rôle important dans le contrôle de la réponse IgE spécifique, et ce de manière individuelle ou synergique.

### II.1 Caractérisation de la composante génétique

Il existe deux approches méthodologiques, basées fondamentalement sur le même principe, permettant de détecter des facteurs génétiques de maladies : les études de liaison et les études d'associations. Ces approches sont des outils puissants et complémentaires pour caractériser la composante génétique des maladies.

Généralement, on utilise dans un premier temps les études de liaison pour localiser des régions chromosomiques pouvant contenir un gène expliquant une part de la variabilité du trait. Puis, dans un deuxième temps, les études d'association pour préciser plus finement

## Synthèse Bibliographique

---

l'emplacement du gène ou du locus étudié. Un marqueur génétique peut apporter de l'information, de manière globale, à deux niveaux :

- Au niveau familial, si les allèles des deux loci se transmettent de façon non indépendante au cours des générations. On évalue l'indépendance de transmission des allèles à l'aide d'une analyse de liaison génétique. Les marqueurs utilisés pour l'analyse de liaison sont en général des marqueurs très polymorphes comme par exemple les microsatellites.
- Au niveau de la population, s'il existe une association préférentielle (déséquilibre de liaison) entre les allèles du variant génétique causal et les allèles de marqueurs génétiques. On évalue la force de cette association à l'aide d'une analyse d'association, qui est définie comme « l'analyse de l'association d'un variant avec le phénotype étudié par comparaison de la fréquence allélique du variant chez les cas et chez les témoins ». On utilise en général des SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms).

### II.1-1 Variation du génome

La caractérisation et la compréhension des variations génétiques constituent un véritable challenge en génétique humaine tant pour les individus indemnes de toute pathologie que les personnes malades. Les progrès n'ont été possibles qu'à partir du séquençage de l'ensemble du génome et des avancées technologiques nécessaires à ces travaux. La variabilité génétique se présente sous différentes formes en sachant que les consensus concernant sa nomenclature évoluent. Le niveau le plus simple est représenté par des variations d'une seule base nucléotidique (A, T, G, C) correspondant aux substitutions nucléotidiques ou en langage anglo-saxon "Single Nucleotide Polymorphism" ou SNP. Les variations de structure se caractérisent par toute variation entre les individus qui ne sont pas des SNPs. On distingue les séquences répétées (mini ou micro-satellites ou VNTR pour "variable number of tandem repeats") et les insertions/délétions (InDel) correspondant à la présence/absence d'une ou plusieurs bases alors qu'elles ne sont pas présentées dans un autre génome et dont la taille est inférieure à 1 kilobase (kb). Les altérations de structure correspondent aux délétions, duplications, insertions, inversions et translocations. Les variations de structures peuvent ainsi modifier la quantité d'ADN comme les CNV (copy number variant), qui intéressent des fragments d'ADN de plus de 1 kb(74).

## Synthèse Bibliographique

---

Les SNPs peuvent être estimés à environ 11 millions répartis au sein du génome et surviennent toutes les 100 à 300 paires de bases. Pour ces SNPs, on peut définir des variants rares qui correspondent à moins de 1% de la population. On peut estimer à 7 millions de SNPs, le nombre de SNPs dont l'allèle mineur a une fréquence supérieure à 5%. Il est important de noter que les différences entre individus se porteront sur des variations reconnues comme fréquentes plutôt que rares. Ainsi pour un individu donné, la majorité des variations seront situées à la même position que pour la majorité de la population. Cela est probablement en rapport avec le fait que des altérations du génome compatible avec la vie seront présentées par une majorité d'individus(74).

L'analyse des SNPs sur des génomes entièrement séquencés (2 européens, 1 asiatique) montre que sur environ 3 à 4 millions de SNPs, 67% sont communs aux 3 génomes, 52% communs à au moins 2 génomes et 30% propres à chaque individu.

Plusieurs SNPs localisés à une distance proche peuvent être corrélés entre eux, présentant un déséquilibre de liaison (LD, du terme anglo-saxon, linkage of disequilibrium). Les projets internationaux comme HapMap visent à établir des groupes de SNPs hautement corrélés qui sont donc transmis ensemble. L'intérêt est donc de définir ces LD qui pourraient permettre de ne rechercher que quelques SNPs "taggés" et connaître ainsi la majorité des SNPs. Cela pourrait permettre de réduire le nombre de SNPs ayant une fréquence allélique supérieure à 5% à 550.000 SNPs en LD (74).

Les SNPs peuvent être « synonymes », ne modifiant pas la séquence protéique. Lorsqu'ils sont situés dans une région codante, ils peuvent altérer la séquence d'acide aminé et potentiellement impacter la structure ou la fonction de la protéine traduite, ils sont alors appelés non-synonymes. Ces derniers pourraient être représentés plus de 50% des mutations connues et pourraient être impliqués dans les maladies héréditaires. De larges études de populations comparant les fréquences de ces polymorphismes au sein de plusieurs populations, notamment porteuses d'un trait phénotypique, permettent d'identifier un SNP en tant que facteur de risque du trait phénotypique considéré (75).

## Synthèse Bibliographique

---

### II.1-2 Analyses d'association génétique

La recherche d'associations, entre des marqueurs génétiques et des maladies, est une des voies possibles pour identifier des gènes de susceptibilité aux maladies. La technique d'étude est relativement simple : on compare la fréquence d'un marqueur génétique chez les sujets atteints et chez les témoins (étude cas-témoins). L'analyse statistique est fondée sur le tableau de contingence où figurent, pour les cas et les témoins, les fréquences de chaque génotype ou de chaque allèle au locus considéré. Le marqueur utilisé peut être un polymorphisme sans relation causale avec la pathologie ou bien un polymorphisme d'un gène candidat.

Un résultat positif (différence de distribution allélique entre les cas et les témoins) suggère que le marqueur est soit directement impliqué, soit en déséquilibre de liaison avec une ou plusieurs variation(s) génétique(s) causale(s) (76).

Ces dernières années nous avons assisté à une véritable explosion des études d'association à grande échelle, permettant une recherche exhaustive des polymorphismes génétiques pouvant être impliqués dans les mécanismes biologiques à l'origine de traits complexes. Ceci s'est fait en parallèle avec les progrès techniques de la biologie moléculaire, qui ont largement contribué à la diminution à la fois du coût et du temps de génotypage. Bien qu'une grande partie des régions chromosomiques identifiées ne contiennent pas de gènes codant des protéines (moins de 5% du génome code des protéines), ces études ont permis de révéler de nouveaux gènes candidats potentiels pour de nombreuses maladies (76).

#### II.1-2-1 Notion de déséquilibre de liaison

Un déséquilibre de liaison entre deux loci est défini par l'existence d'une combinaison d'allèles à ces loci plus fréquente que celle attendue sous l'hypothèse d'indépendance. Deux marqueurs génétiques en déséquilibre de liaison sont en général très proches sur le même chromosome (76), mais nous ne pouvons détailler le déséquilibre de liaison sans parler de l'équilibre de Hardy-Weinberg.

La théorie de l'équilibre de liaison a été développée au début du 20<sup>e</sup> siècle par Godfrey Hardy, un mathématicien anglais, et Wilhelm Weinberg, un médecin allemand. Ils ont montré qu'à partir d'une population idéalisée, c'est-à-dire d'une population d'appariements aléatoires, en

## Synthèse Bibliographique

---

absence des forces de l'évolution, les fréquences d'allèle et les fréquences de génotype demeureront constantes de génération en génération. La loi de Hardy-Weinberg de l'équilibre génétique fournit un modèle mathématique permettant d'analyser des changements de fréquence d'allèle durant l'évolution dans une population, en examinant les relations entre des fréquences relatives de deux ou plusieurs allèles.

À contrario, on appelle déséquilibre de liaison (noté LD), le paramètre qui mesure l'écart à l'association aléatoire de deux allèles situés à des loci différents sur les gamètes. Il mesure le degré de dépendance statistique entre deux caractères, qui sont ici les allèles à deux loci différents au sein d'une même population et dans la même génération.

Toutefois, il est important de souligner que l'existence d'un déséquilibre de liaison entre deux loci n'implique pas une liaison génétique entre les deux loci, et que la mise en évidence d'une association n'est pas synonyme de relation de causalité, ce qui implique en général la démonstration cellulaire et biochimique du mécanisme d'action de la variation étudiée. Si la population témoin est suffisamment importante et représentative, il est possible de calculer le risque relatif de présenter la pathologie en fonction de l'état homozygote ou hétérozygote de l'allèle en question.

Les études d'association sont particulièrement intéressantes lorsqu'il existe plusieurs loci impliqués et que l'effet quantitatif de chaque allèle délétère est trop faible pour être facilement analysé par une étude de liaison familiale. La probabilité de détecter une association dépend de l'intensité du déséquilibre de liaison entre le marqueur et la variation causale, de la fréquence de la variation dans la population, de l'effet observable de la variation (sa pénétrance) sur la pathologie, et enfin de la distance génétique entre les marqueurs et le locus impliqué dans la maladie lorsqu'on ne se réfère pas directement au gène candidat.

Dans ces conditions, un résultat négatif ne permet pas d'exclure le rôle d'un locus. Il se peut en effet qu'il ne soit pas en déséquilibre de liaison avec une variation morbide, même très proche. De même, une mutation à effet biologique fort et plus généralement une variation génétique, mais rarement représentée dans la population, peut aboutir à un test statistique négatif et passer inaperçue.

## Synthèse Bibliographique

---

À partir du moment où, dans une étude, on se base sur des hypothèses, il faut se mettre des barrières à ne pas dépasser pour être vraisemblablement exact dans ses calculs. Ces barrières seront appelées dans le cas présent l'intervalle de confiance.

L'intervalle de confiance (IC) à 95% est un intervalle de valeurs qui a 95% de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé. Avec moins de rigueur, il est possible de dire que l'IC représente la fourchette de valeurs à l'intérieur de laquelle nous sommes certains à 95% de trouver la vraie valeur recherchée. L'intervalle de confiance est donc l'ensemble des valeurs raisonnablement compatibles avec le résultat observé (l'estimation ponctuelle). Il donne une visualisation de l'incertitude de l'estimation.

### II.1-2-2 Études d'association cas-témoins

Parmi les interactions possibles entre phénomènes liés à la santé et processus démographique, il en est une que l'on peut rencontrer en épidémiologie génétique dans le cadre des études d'association entre un gène – ou un marqueur génétique – et une maladie.

Une méthode classique pour aborder ce type d'étude est la méthode cas-témoin qui consiste à comparer un échantillon de malades atteints de la maladie étudiée (pour laquelle on s'interroge et on recherche une éventuelle cause génétique) et un échantillon de personnes non malades comparables, ayant globalement les mêmes caractéristiques (d'âge, d'origine ethnique, etc.).

Si l'on décèle qu'un marqueur génétique spécifique est beaucoup plus représenté (voire systématiquement présent) chez les individus malades et peu représenté (voire absent) chez les individus sains, la mesure statistique peut conclure à une association entre ce marqueur génétique et la maladie. Ce type d'enquête et de méthodologie suppose implicitement que cas et témoins soient issus d'une population homogène.

Cette méthode a soulevé une polémique par rapport au risque de biais qui lui était lié. En effet, si jamais il existait un effet de « structure » non connu de la population (ou effet de « stratification » selon le vocabulaire des épidémiologistes), la population supposée homogène d'où sont tirés les échantillons étant, en fait, un mélange de deux ou plusieurs populations aux caractéristiques très différentes. Les résultats des tests statistiques d'association pourraient être biaisés et

## Synthèse Bibliographique

---

conclure à tort à une association, le facteur ethnique ou « sous-population » jouant dans ce cas comme un facteur de confusion dans l'étude de l'association gène-maladie. Afin de contourner ce problème, on peut avoir recours à des tests statistiques qui tiennent compte de la possible stratification des populations étudiées (76).

Ce problème est important en pratique dans des pays où les populations sont composées de nombreuses communautés différentes, restées relativement fermées, et où les échantillons qui en sont issus sont susceptibles d'être très hétérogènes.

Statistiquement parlant, dans une étude cas-témoins, nous allons remplacer le risque relatif par l'Odds Ratio (OR). L'Odds Ratio (OR) ou « rapport des cotes » est le rapport de l'odds de l'événement (sa cote) dans le groupe traité divisé par l'odds de l'événement dans le groupe contrôle (77). L'Odds est égale à  $c = r / (1 - r)$  où  $r$  est la fréquence de l'événement. Ainsi un Odds est le rapport du nombre de patients  $n$  présentant l'événement,  $r \times n$ , divisé par le nombre de patients ne présentant pas l'événement,  $(1-r) \times n$ . Par exemple, un odds de 0,25 correspond au rapport 2/8 et signifie que pour 2 patients présentant l'événement, 8 ne le présentent pas ( $0,25=2/8=r/(1-r)$ ). Dans la même situation, le risque est 0,20 (2/10). Un Odds peut aussi être interprété de la façon suivante : dans un groupe, pour 100 patients ne présentant pas l'événement étudié,  $100 \times c$  le présentent.

Il faut cependant prendre garde aux faux positifs qui découlent d'un biais de sélection des cas et des témoins, dont la sélection peut être inappropriée parce qu'ils diffèrent par l'âge, la répartition des sexes et des groupes ethniques, ou la présence d'une autre pathologie associée au critère de choix - autant de paramètres susceptibles d'entraîner des différences de fréquences génotypiques non attribuables à la pathologie (76).

### II.1-3 Choix de marqueurs et stratégies d'études

La recherche et la caractérisation des déterminants génétiques impliqués dans les maladies génétiques "complexes" ont été initiées dans la décennie 1990 par des travaux qui ont concerné, entre autres, le diabète de type 2. Compte tenu de la multiplicité des locus potentiellement impliqués, les méthodes employées dans les maladies monogéniques ont dû être adaptées à

## Synthèse Bibliographique

---

l'étude de l'hérédité polygénique. On retiendra de cette époque deux méthodes majeures : la stratégie gène candidat et l'approche génome entier (Genome Wide Scan).

### II.1-3-1 Approche gène candidat

Cette stratégie consiste à rechercher et analyser les variants génétiques dans des gènes dont la fonction pourrait jouer un rôle dans la pathologie en question. Elle repose sur une bonne connaissance de la physiologie et de la fonction du gène mis en examen et de ses interactions avec les autres partenaires impliqués dans la même voie métabolique qui pourrait être incriminée dans la pathologie.

Les gènes impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation ont été candidats dans le cadre de l'asthme. Une fois le ou les variants génétiques identifiés (en général par séquençage direct de l'ADN de sujets atteints et de sujets non atteints) il reste à conclure sur chacun quant à son rôle (ou son absence de rôle) dans la maladie génétique complexe.

Comme dans une maladie complexe chaque variant génétique ne possède qu'un effet minime sur la variation du trait phénotypique et donc sur la survenue ou non de la maladie, cette phase nécessite une approche épidémiogénétique sur des groupes importants de patients atteints et de sujets témoins indemnes de la maladie (études cas-témoins).

La question posée étant : le variant génétique est-il plus fréquent chez les sujets présentant la maladie que chez les témoins ? La réponse à cette question ne peut être objectivée que par un test statistique de comparaison de fréquences au risque 5%, dans cet exemple, un test du  $\chi^2$ . Si la réponse est oui, on est en droit de conclure (au risque de 5%) que le variant en question est l'un des déterminants génétiques de la maladie, ou bien il est en déséquilibre de liaison génétique avec l'un des déterminants génétiques de la maladie.

N'ayant aucune information objective et biologique quant au retentissement du variant génétique sur la fonction du gène et sur la maladie, nous ne pouvons à ce stade que constater qu'il existe une association significative au sens statistique entre la présence du variant génétique et la présence de la maladie. C'est pourquoi ces analyses sont appelées analyses d'association.

## Synthèse Bibliographique

---

Ces approches gène candidat qui ont mis en évidence de nombreux variants génétiques impliqués dans des maladies génétiques complexes, présentent le défaut de ne pouvoir cibler et analyser que les gènes connus dont la fonction est évidemment connue et qui présentent un rapport a priori évident avec la pathologie (76).

### II.1-3-2 Étude de ségrégation : « genome wide approaches »

Il s'agit d'études de ségrégation, utilisant une panoplie de marqueurs sur la totalité du génome : les gènes de susceptibilité sont localisés, mais leur fonction n'est pas connue. Ce type d'études permet de générer de nouvelles hypothèses concernant les gènes, mais nécessite énormément de statistiques pour être significatif. De plus, les liens entre les allèles trouvés et la pathologie ne sont pas toujours faciles à mettre en évidence.

#### Genome wide linkage studies

Un locus supposé responsable de la pathologie est recherché au sein d'une famille dont deux individus sont touchés par la pathologie. Cette technique permet de découvrir des régions nouvelles, mais ces régions sont souvent très étendues et les allèles à risque avec des répercussions modestes sur la pathologie ne sont pas détectés.

#### Genome wide association studies (GWAS)

Il s'agit d'une méthode de plus en plus utilisée, car très précise. Les variations les plus communes du génome sont « taggées » par des marqueurs de manière très précise, mais ces allèles ne sont pas nécessairement les plus impliqués dans la pathologie.

#### Études de re-séquençage

Cette méthode part du principe que des allèles rares (avec un effet plus important sur le risque de pathologie que les variants communs) expliquent une portion significative du risque génétique pour les pathologies communes. Le re-séquençage s'effectue sur un large échantillon d'individus, pour trouver des allèles rares non « taggés » par la méthode GWAS.

Les gènes potentiellement impliqués dans la pathologie doivent être répliqués pour vérifier que leur association pendant l'étude n'est pas uniquement le fruit du hasard.

## Synthèse Bibliographique

---

Toutes ces techniques ne sont évidemment pas exclusives. Selon le type de gène étudié (allèle rare ou commun), l'une ou l'autre des méthodes peut être utilisée (78).

Par exemple (69) :

- GWAS pour connaître la fréquence de chaque gène étudié chez les sujets témoins et les sujets à étudier
- Réplifications, méta-analyses pour connaître l'importance des allèles dans la population
- Etudes fonctionnelles et biologiques.

### **CHAPITRE III : Polymorphismes génétiques et variabilité de l'expression phénotypique des cytokines IL-4 et IL-13 dans l'hypersensibilité aux bêta-lactamines**

Les bêta-lactamines, antibiotiques les plus largement prescrits, sont très fréquemment impliquées dans la survenue des hypersensibilités médicamenteuses, en particulier immédiates. De nombreuses études ont évalué l'existence d'un terrain génétique sous-tendant ces réactions d'hypersensibilité.

La première étude qui a évalué le terrain génétique de patients ayant présenté une hypersensibilité aux bêta-lactamines est celle de Romano et al. Cette étude a évalué les gènes du CMH chez des patients ayant présenté une hypersensibilité retardée aux bêta-lactamines. Bien que menée sur une cohorte de petite taille, 24 patients comparés à un grand nombre de témoins (522 individus), cette étude a mis en évidence une forte prévalence des HLA2 et DRw2 avec des OR respectifs de 6.76 et 9.28 (79).

Qiao et al. ont étudié plusieurs gènes de susceptibilité pour les hypersensibilités aux bêta-lactamines. Leur cohorte est majoritairement constituée de patients avec allergie immédiate aux bêta-lactamines. En premier lieu, ils ont testé un polymorphisme du gène codant pour le récepteur de haute affinité des IgE, FcεRI chez 158 patients chinois ayant présenté majoritairement des hypersensibilités immédiates aux bêta-lactamines. En effet, FcεRI est associé à l'asthme atopique et à la production d'IgE spécifique. De plus, les IgE sont suspectées d'être impliqués dans les mécanismes physiopathologiques des hypersensibilités aux bêta-lactamines. Les auteurs ont

## Synthèse Bibliographique

---

montré une association entre ce polymorphisme et la présence d'IgE spécifiques. Ceci serait la confirmation du rôle des IgE et de leur récepteur dans l'apparition d'une hypersensibilité (80).

Cette même équipe a ensuite étudié des polymorphismes cytokiniques et leur association avec l'hypersensibilité aux bêta-lactamines. Ils ont tout d'abord évalué les polymorphismes de l'IL-4 et de l'IL-4R $\alpha$ . En effet, l'IL-4 joue un rôle clé dans la production d'IgE par les lymphocytes B et son récepteur a un rôle pivot dans la voie de l'IL-4, la production d'IgE et le développement d'une immunité Th2. La population étudiée comprenait 156 patients avec hypersensibilité aux bêta-lactamines, majoritairement de type immédiat et 88 contrôles. Les auteurs ont montré l'association du polymorphisme testé de l'IL4R $\alpha$  étudié (Q576R) avec l'hypersensibilité retardée aux bêta-lactamines mais également avec des taux d'IgE spécifiques augmentés (81).

La même équipe a montré sur une plus large cohorte de 242 patients l'association de 2 polymorphismes du gène codant pour le récepteur de l'IL-4 avec l'hypersensibilité aux bêta-lactamines. Dans cette étude, le génotype AA du polymorphisme Q576R de l'IL-4RA était associé à un risque accru d'hypersensibilité aux BL ( $P=0,005$ ), à la présence de tests positifs et à un taux IgE élevé. Le génotype AA du polymorphisme I75V était quant à lui associé à un risque augmenté d'urticaire ( $P=0,049$ ). Ces données étaient confirmées par l'analyse des haplotypes (82).

L'IL13 étant un cofacteur de l'IL4, Yang et al. ont étudié un polymorphisme de l'IL-13 et 2 polymorphismes de la région intergénique entre les gènes codant pour ces 2 cytokines chez 158 patients et 89 contrôles. Au cours de cette étude, ils ont montré l'association entre les 2 polymorphismes intergéniques et la présence d'IgE spécifiques (83).

Plus tard, cette équipe a testé des polymorphismes du gène STAT6 impliqué dans la voie de signalisation de l'IL-4. Ils ont identifié une association entre le génotype majoritaire et le risque d'hypersensibilité aux bêta-lactamines, en particulier, le risque d'hypersensibilité immédiate. Les auteurs n'ont pas retrouvé d'association entre les polymorphismes testés et la présence d'IgE spécifiques (84).

Cette équipe avait également testé l'association entre 2 polymorphismes du promoteur de l'IL10 (-1082 G/A et -819 C/T) et l'hypersensibilité aux bêta-lactamines chez 102 patients et 86

## Synthèse Bibliographique

---

contrôles. Ils ont montré une fréquence significativement plus faible de l'allèle rare du polymorphisme -1082 C/T chez les patients présentant une hypersensibilité avec IgE spécifiques élevées et une fréquence significativement plus faible de l'allèle rare du second polymorphisme chez les patients avec hypersensibilité et IgG spécifiques (85).

Ils ont également testé 2 polymorphismes du promoteur du gène codant pour l'IL18 chez 606 patients chinois Han et 614 sujets contrôles. La très grande majorité de ces patients avaient présenté une allergie immédiate aux bêta-lactamines. Dans cette étude, le génotype minoritaire pour le polymorphisme -607 A/C était significativement plus fréquent chez les patients que chez les contrôles. Le risque relatif de présenter une hypersensibilité aux bêta-lactamine en présence de l'allèle A pour ce polymorphisme était de 1,51 (IC: 1,28-1,78). Pour le second polymorphisme testé (-137 G/C), l'allèle minoritaire, C, était significativement associé avec le risque d'HS aux BL (OR=1,79, IC : 1,40-2,28). Ces données étaient confirmées par l'analyse des haplotypes (86).

Guglielmi et al. ont testé l'association entre des polymorphismes de gènes codant pour des cytokines ou leurs récepteurs : IL-4, IL-13, IL-10, STAT6, IL-4R $\alpha$ , IL-21R, IFNR1, IFNR2 et Fc $\epsilon$ RI $\beta$ . Au cours de cette étude cas-témoin, 44 patients français ayant présenté une allergie immédiate démontrée aux bêta-lactamine et autant de témoins ont été recrutés. Seuls un variant du récepteur de l'IL-4 et 2 variants localisés dans le promoteur de l'IL10 ont été identifiés comme associés avec l'hypersensibilité immédiate (HSI) aux bêta-lactamine chez des femmes atopiques. Chez ces patientes, la présence de l'allèle rare pour 2 promoteurs de l'IL10 (-819 et -592) augmentait le risque d'HSI (OR=17,5, IC : 1,26-533,07) de même que la présence de l'allèle rare pour le polymorphisme I75V du récepteur de l'IL-4 (OR=5,4, IC : 1,16-27,7). Ce dernier polymorphisme avait en revanche un effet protecteur chez les hommes atopiques. Le polymorphisme étudié du récepteur de l'IL-4 semble influencer l'activation de STAT6, sa prolifération et l'activité transcriptionnelle du promoteur I $\epsilon$  en réponse à une stimulation par l'IL-4. Les 2 polymorphismes de l'IL-10 localisés au niveau de son promoteur sont, à l'inverse, responsables d'une plus faible expression de L'IL-10. Or, IL-10 est une cytokine inhibitrice tandis que L'IL-4 est une cytokine activatrice (87).

## Synthèse Bibliographique

---

Apter et al. ont évalué des polymorphismes de gènes codant pour différentes cytokines impliquées dans l'hypersensibilité immédiate (IL4, IL4R, IL10) et d'un gène codant pour une bêta-lactamase impliquée dans le métabolisme des bêta-lactamines (LACTB), chez des patients blancs américains déclarant avoir présenté une allergie immédiate aux bêta-lactamine. Parmi 23 cas et 39 témoins, ces auteurs ont pu identifier l'influence de 3 SNP de l'IL-4 sur l'allergie immédiate aux bêta-lactamine, dont 2 confirmés par l'analyse multivariée : rs100624446 et rs11740584 avec des OR à 6,21 pour chacun de ces SNP. Dans cette étude, l'influence de l'un des polymorphismes de LACTB (rs2729835) dans un modèle multivarié n'était que marginale (88).

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

Au cours de cette étude, la prévalence de l'atopie était élevée chez les patients avec hypersensibilité aux bêta-lactamines. Pour expliquer l'association entre ces 2 pathologies et la prévalence élevée dans cette cohorte à la fois d'IgE anti-bêta-lactamine et anti-acariens, les auteurs émettaient deux hypothèses : (i) une sensibilisation aux acariens stimulant la production d'IL4 et de façon conséquente d'IgE spécifique des BL ; (ii) une possible homologie de structure entre les protéines allergisantes des acariens et les haptènes sensibilisantes des bêta-lactamines (89).

Dans une cohorte de 210 patients italiens ayant présenté une allergie immédiate aux BL, Guéant-Rodriguez et al. ont également évalué les polymorphismes de l'IL13 ainsi que du récepteur de l'IL4. L'allèle majoritaire pour les polymorphismes de l'IL-4R $\alpha$  I50V et Q551R était significativement associé à l'hypersensibilité aux BL (P=0,027 et P=0,015 respectivement).

Ces mêmes polymorphismes ainsi que le polymorphisme R130Q de l'IL-13 étaient associés à un taux élevé d'IgE (P=0,002, P=0,042 et P=0,020 respectivement). La combinaison de l'allèle le moins fréquent du polymorphisme de l'IL-13 et de l'un des polymorphismes majoritaires de l'IL-4R $\alpha$  était associée au risque d'hypersensibilité (OR=2,9, IC : 1,5-5,4). À l'inverse,

## Synthèse Bibliographique

---

l'association de l'allèle majoritaire de l'IL13 et de l'un des allèles minoritaires de l'IL-4R $\alpha$  avait un effet protecteur (OR=0,5, IC : 0,4-0,8). Ces associations plaident pour un rôle complémentaire de ces 2 gènes dans les mécanismes allergiques IgE médiés. La forte prévalence d'un taux d'IgE augmenté chez les patients présentant une allergie immédiate aux bêta-lactamines faisait également discuter le lien entre ce type d'hypersensibilité et l'atopie (90).

Récemment, une approche GWAS "Genome Wide Association Study" publiée par Gueant et al, menant une étude d'association à l'aide d'une puce SNP Immuchip, cette puce prête à l'emploi contient environ 200000 SNP choisis par un groupe d'experts sur le thème de l'immunologie (91). Cependant, on doit souligner que cette étude n'était pas une étude complète du génome parce que l'Immuchip ne couvre que des gènes candidats liés à l'immunité. Comme le montre le tableau .3, plusieurs études suggèrent que les gènes des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-4R, IL-4, IL-13 sont impliqués dans les réactions bêta-lactamines IgE médiées (92).

Parmi ces études, plusieurs ont recensé les polymorphismes identifiés sur le gène du récepteur à l'IL-4 et sur le gène de l'IL-13 (89,90). Parmi ceux-ci, les gènes candidats sélectionnés pour la présente étude, à partir des données bibliographiques, ont montré une relation avec des variations des taux d'IgE dans différentes populations, à savoir IL-13 *Arg130Gln*, IL4R *Ile50Val*, IL-4R *Ser478Pro*, et IL-4R *Gln551Arg*.

Au total, si des associations ont été montrées, peu ont été confirmées par plusieurs études. La difficulté d'interprétation de ces résultats tient tout d'abord au fait que les populations étudiées sont d'origines ethniques différentes (patients européens ou américains, caucasiens ; patients asiatiques, chinois). De plus, les critères d'inclusion peuvent varier (hypersensibilité rapportée par le patient, tests cutanés positifs, IgE spécifiques positives, hypersensibilité immédiate définie sur le délai de réaction), de même que la présentation clinique ou le mode de confirmation diagnostique (tests cutanés ou in vitro). Enfin, le choix des polymorphismes testés pour un gène donné est rarement le même entre 2 équipes différentes (tableau 3).

## Synthèse Bibliographique

**Tableau 3. Études d'associations génétiques dans l'allergie aux bêta-lactamines (BL) (92).**

Auteur, Année, Journal	Région géographique	Type d'étude et approche	Nombre de cas	définition des cas	Nombre de contrôles	Définition des contrôles
(Huang et al., 2009, Eur J Clin Pharmacol)	Chine	Cas-témoins (gène candidat)	242	Allergie BL	240	Contrôles sains
(Gao et al., 2008, Eur J Clin Pharmacol)	Chine	Cas-témoins (gène candidat)	144	Allergie BL	88	Contrôles sains
(Gueant-Rodriguez et al., 2008, Pharmacogenomics J)	Italie	Cas-témoins (gène candidat)	167	Allergie BL	260	Contrôles sains
(Apter et al., 2008, J Allergy Clin Immunol)	USA	Cas-témoins (gène candidat)	23	Allergie BL	39	Contrôles sains
(Qiao et al., 2007, Eur J Clin Pharmacol)	Chine	Cas-témoins (gène candidat)	102	Allergie BL	86	Contrôles sains
(Guglielmi et al., 2006, Allergy)	France	Cas-témoins (gène candidat)	44	Allergie BL	44	Contrôles sains
(Yang et al., 2006, Chin Med J (Engl))	Chine	Cas-témoins (gène candidat)	113	Allergie BL	87	Contrôles sains
(Gueant-Rodriguez et al., 2006, Pharmacogenet Genomics)	Italie	Cas-témoins (gène candidat)	210	Allergie BL	265	Contrôles sains
(Yang et al., 2005, Eur J Clin Pharmacol)	Chine	Cas-témoins (gène candidat)	158	Allergie BL	89	Contrôles sains
(Qiao et al., 2005, Allergy)	Chine	Cas-témoins (gène candidat)	245	Allergie BL	101	Contrôles sains
(Qiao et al., 2004, Allergy)	Corée	Cas-témoins (gène candidat)	448	Allergie BL	101	Contrôles sains
(Jean-Louis Gueant et al., 2015, Allergy Clin Immunology)	Espagne	Cas-témoins (gène candidat)	436	Allergie BL	1218	Contrôles sains

**ÉTUDE EXPÉRIMENTALE**

## **Etude Expérimentale**

---

### **I. SUJETS, MATÉRIELS & MÉTHODES**

#### **I.1. Patients et témoins**

Cette étude a porté sur une série de 199 patients avec un antécédent d'allergie immédiate (moins de 1 h après la prise médicamenteuse) à au moins une bêta-lactamine. Cette population a été recrutée entre 2012-2015. Les patients avaient présenté une réaction allergique à une pénicilline ou une céphalosporine et présenté une allergie immédiate diagnostiquée sur la base de tests cutanés.

Le groupe témoin était constitué de 99 volontaires appariés en âge et en sexe avec les patients, en l'absence d'antécédent personnel ou familial d'allergie, y compris les allergies médicamenteuses (immédiate ou non), maladies respiratoires ou dermatologiques. De plus, les sujets présentant un taux d'IgE sérique totales supérieur à 100UI/l ont été exclus.

La majorité des individus ont été recrutés au niveau de l'établissement public de santé et de proximité (EPSP) Kais, wilaya de Khenchela.

Tous les cas étudiés dans ce travail (patients et témoins) ont été choisis de la même population. Tous les individus participant à cette étude ont signé un consentement éclairé (annexe 3) conformément aux principes de la déclaration d'Helsinki. Les caractéristiques cliniques et biologiques des groupes de patients et contrôles sont résumées dans le tableau 4.

#### **I.2. Matériels et Méthodes**

##### **I.2.1 Conditions de prélèvement des échantillons sanguins :**

Le sang des patients et témoins a été prélevé, centrifugé, le sérum et le culot cellulaire ont été séparés et congelés à -20°C jusqu'à la réalisation des dosages des immunoglobulines E et l'extraction de l'ADN en vue de la recherche des polymorphismes.

## Etude Expérimentale

**Tableau 4. Caractéristiques cliniques des patients et contrôles.**

Caractéristiques	Patients, n=199, Mean ± SD Et nombre de cas (%, 95% intervalle de confiance)	Contrôles, n=99, Mean ± SD Et nombre de contrôles (%, 95% intervalle de confiance)	valeur- <i>P</i>
Âge	39.48 ± 15.72	35.78 ± 11.78	0.1023
Sexe masculin	65 (32.7, 26.5–39.4)	29 (29.3, 21.2–38.9)	0.5554
Sexe féminin	134 (67.3, 60.5–73.5)	70 (70.7, 61.1–78.7)	
IgE total sérique	187 ± 94.55	41 ± 35.7	< 0.0001
IgE >100	152 (76.3, 70.02–81.75)	11 (11.11, 6.31–18.81)	< 0.0001
Histoire personnelle de l'Allergie	53	None	
Urticaire	19	None	
Shoc Anaphylactique	15	None	
Asthme	19	None	

### I.2.2 Extraction d'ADN génomique et dosage :

L'extraction d'ADN est une étape incontournable pour chaque manipulation en biologie moléculaire.

#### I.2.2-1 Protocole

Le protocole suivi est celui de la technique au NaCl aussi appelée « salting out » qui consiste à traiter uniquement le lysat cellulaire par une solution saline afin d'éliminer les protéines fixées à l'ADN (93). Cette technique se déroule en trois étapes :

#### Lyse des hématies

Au volume de sang (300µl) prélevé sur EDTA, sont ajoutés à 900µl de solution hypotonique TKM 1 [Tris/HCl (10mM) pH 7.6, KCl (10mM), MgCl<sub>2</sub>(10mM), EDTA (2mM)], et 50µl de 1x Triton-X. Les tubes sont placés dans le bain-marie pendant 5 minutes et centrifugés à 8000 tours/minute durant 3 minutes. Cette opération est renouvelée 2-3 fois après élimination du sur-

## **Etude Expérimentale**

---

nageant, et la quantité du 1x Triton-X est diminuée jusqu'à la lyse complète des hématies et l'obtention d'un culot lymphocytaire blanchâtre.

### **Lyse des lymphocytes**

Le culot lymphocytaire obtenu est additionné à 300 $\mu$ l de TKM2 (solution de lyse des globules blancs) [Tris/HCl (10mM) pH 7.6, KCl (10mM), MgCl<sub>2</sub> (10mM), EDTA (2mM), NaCl (0.4M)], ainsi que 40 $\mu$ L de 10% SDS. Le mélange est mis en incubation au bain-marie à 37°C pendant 5 minutes. 100 $\mu$ l d'NaCl 6M sont ajoutés, puis les tubes sont vortexés afin de précipiter les protéines.

### **Précipitation de l'ADN**

Le surnageant obtenu est récupéré dans un autre tube puis additionné de 300 $\mu$ l d'isopropanol afin de précipiter l'ADN, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 8000 tours/minute. Après élimination du surnageant, 300 $\mu$ l d'éthanol à 70% sont ajoutés et mixés soigneusement pour éliminer les excès des sels. À la fin, les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 8000 tours/minute, le surnageant est éliminé pour laisser l'ADN sécher à température ambiante. 50 $\mu$ l de TE [Tris/HCl (10mM) pH 8.0, EDTA (1mM)] sont ajoutés pour resuspendre l'ADN.

#### **I.2.2-2 Dosage de l'ADN (vérification de la qualité et la quantité d'ADN)**

La concentration en ADN génomique était contrôlée au Nanodrop 1000 (Thermo scientific). Les courbes d'absorption étaient analysées. L'absorption doit être mesurée à 260nm afin de quantifier la concentration de l'ADN, ainsi qu'à 280nm dans le but d'évaluer le taux de protéines. Le rapport DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> nous permettra de définir la pureté de l'ADN, qui doit être compris entre 1,5 et 2. L'intégrité et la qualité de l'ADN génomique (200 ng) étaient vérifiées à l'aide du profil de migration électrophorétique sur gel d'agarose 2%. L'ADN extrait était stocké à -20°C avant la réalisation des analyses génétiques.

## **Etude Expérimentale**

---

### **I.2.3 Choix des gènes et des SNPs**

Le choix des quatre SNPs des gènes (IL-4R $\alpha$  Ile50Val rs1805010, IL-4R $\alpha$  Ser478Pro rs1805015, IL-4R $\alpha$  Gln551Arg rs1801275 et IL-13 Arg130Gln rs20541) est basé sur les données publiées antérieurement dans les études d'association avec les allergies aux bêta-lactamines de type « gènes candidats » ou encore des études dites du génome entier « GWAS : Genome Wide Association Study » (83,84).

### **I.2.4 Analyse du polymorphisme des gènes IL-4RA et IL-13 : Génotypage par PCR en-temps réel**

Le génotypage des quatre polymorphismes a été réalisé avec un test de discrimination allélique par sondes fluorescentes en temps réel (TaqMan®, LifeTechnology) (tableau 5).

La réaction de polymérisation en chaîne des échantillons (PCR) est réalisée sur une machine de PCR en temps réel «Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR instrument» (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) selon le protocole du fabricant. Les conditions de PCR sont les mêmes, quel que soit le polymorphisme étudié, seul le mélange des sondes fluorescentes est spécifique de chaque polymorphisme (Assay). Le principe de la chimie TaqMan® est détaillé dans le paragraphe suivant.

## Etude Expérimentale

**Tableau 5. SNPs et gènes sélectionnés pour notre étude**

SNP	NCBI rs No	Base change	Amorces	Sondes
IL-13 Arg130Gln	rs20541	G > A	F: 5'-CTGCAAATA ATGATGCTTTCGA-3' R: 5'- CCAGTTTGTAAG- GACCTGCTCT-3'	A allele: 5'-FAM- GAGGGA- CAGTTCAACTGMGB-3' G allele: 5'-VIC- GAGGGACGGTTCAACT- MGB-3'
IL4RA Ile50Val	rs1805010	A > G	F:5'CTACAGGTGACC AGCTAAC-3' R:5'CCCACAGGTCCA GTGTATAGT-3'	G allele: 5' -FAM- ACGTGTGTCCCTG- MGB-3 A allele: 5' -VIC- ACGTGTATCCCTG-MGB- 3'
IL4RA Ser478Pro	rs1805015	T > C	F: 5'-C GCAGGC AACCTGCT TA-3' R: 5'-GCA TCT CGG GTT CTA CTCTCCTC-3'	C allele: 5'-FAM- CAGCAACCCCTGAG-MBG- 3' T allele:5'-VIC- TTCAG- CAACTCCCTGAG-MGB-3'
IL4RA Gln551Arg	rs1801275	A > G	F:5'CTCCGCCGAAAT GTCCTC-3' R:5'GCCTTGTAACCA GCCTCTCC-3	G allele: 5'-FAM- GGCTATCGGGAGTTT - MGB-3' A allele: 5'-VIC- TGGCTATCAGGAGTTTG- MGB-3'

### I.2.4-1. Principe

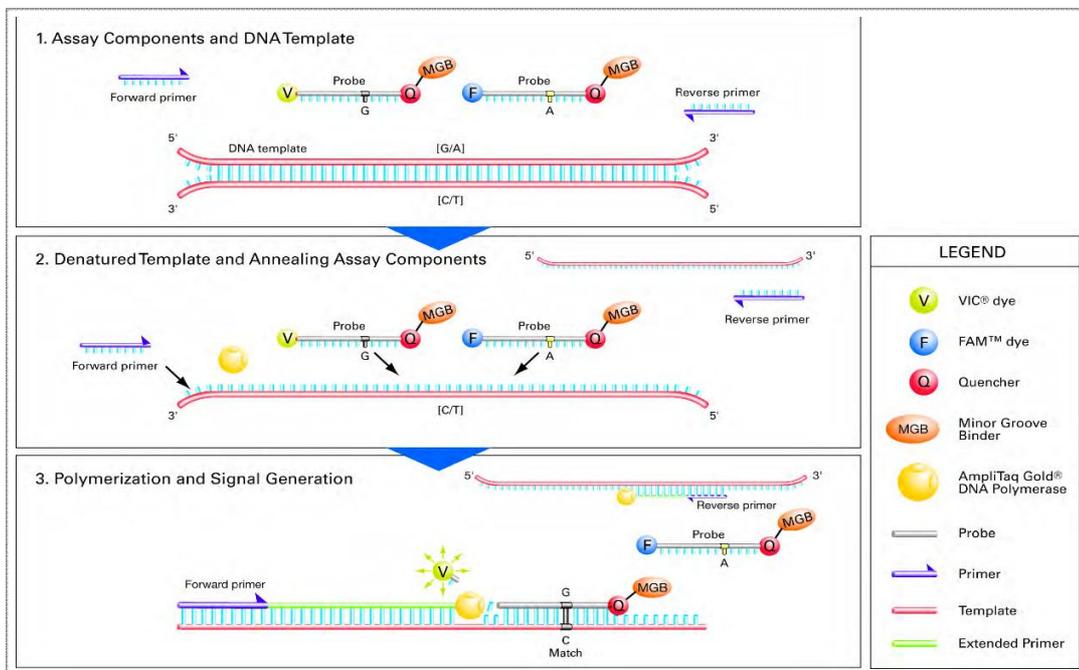
La PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent au cours de la réaction d'amplification. Le signal fluorescent est directement proportionnel à la quantité de produits de PCR générés. En mesurant l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle, il est possible de suivre la formation des produits de PCR pendant la phase exponentielle (phase au cours de laquelle la quantité de produits amplifiés est en corrélation directe avec la quantité initiale de matrice)(94).

Les produits d'amplification peuvent être détectés selon deux grands principes : par marquage non spécifique avec des agents se liant à l'ADN double brin (Syber Green) et par mar-

## Etude Expérimentale

quage spécifique du produit de PCR à l'aide d'une ou deux sonde(s) fluorescente(s) (Sondes TaqMan® ou balises moléculaires) (94).

Nous avons utilisé ici deux sondes discriminantes, VIC et FAM. Dans ce cas de figure, la PCR requiert deux amorces oligonucléotidiques pour amplifier la séquence d'intérêt et deux sondes TaqMan® : l'une s'hybridant à l'allèle sauvage, l'autre à l'allèle variant. Chaque sonde TaqMan renferme un fluorochrome à l'extrémité 5' spécifique de chaque type d'allèle (VIC ou FAM), un quencher non fluorescent (NFQ) à l'extrémité 3' et une molécule MGB (Minor Groove Binder) qui s'insère dans le petit sillon de la double hélice formée par le duplex ADN cible-sonde spécifique et le stabilise (figure 12).



**Figure 12 : Schéma explicatif du principe de la technologie TaqMan® (d'après le protocole TaqMan® SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems).**

Cette stabilisation du complexe ADN cible-sonde va de pair avec la température de fusion du complexe ( $T_m$ ). Ainsi, le  $T_m$  d'une sonde parfaitement hybridée avec le produit de PCR sera plus élevé que celui d'une sonde s'hybridant imparfaitement. Ce phénomène est accentué par l'utilisation du MGB qui va déstabiliser un duplex imparfait et donc faire chuter la  $T_m$ .

## Etude Expérimentale

---

Au début de l'élongation, les sondes spécifiques d'allèle s'hybrident spécifiquement à la matrice, entre les deux amorces nécessaires à l'amplification. La proximité du fluorochrome et du quencher empêche la détection de fluorescence. Au cours de l'étape d'élongation de la PCR, la Taq polymérase dégrade la sonde hybridée, ce qui entraîne une émission de fluorescence.

La discrimination allélique sera ensuite réalisée à l'aide d'un programme qui mesure la fluorescence à chaque cycle de la PCR et qui permet la discrimination entre les deux allèles présents dans les échantillons testés. Par exemple, si la sonde FAM est spécifique de l'allèle muté, une augmentation de la fluorescence FAM exclusivement indiquera une homozygotie pour l'allèle variant, une augmentation de VIC exclusivement rendra compte de la présence d'un homozygote sauvage ; et une augmentation des 2 signaux de fluorescence marquera la présence d'un individu hétérozygote présentant chacun des deux allèles recherchés.

### I.2.4-2. Protocole

Cette technique a été réalisée sur des plaques de 96 puits. Pour chaque SNP, les amorces et les sondes ont été désignés ("Assays-by-Design") et fournis par le service ABI (Applied Biosystems). La réaction est réalisée dans un volume total de 12  $\mu$ l à partir de 10 ng d'ADN, 6  $\mu$ l de Bio-Rad SsoAdvanced Universal Probes Supermix (2X), 0.12  $\mu$ l pour chaque amorce (500 nM), et 0.36  $\mu$ l pour chaque sonde (300 nM). Les plaques sont ensuite fermées par une feuille thermocollante avant d'être placées dans l'instrument CFX Connect Real Time PCR (Bio-rad).

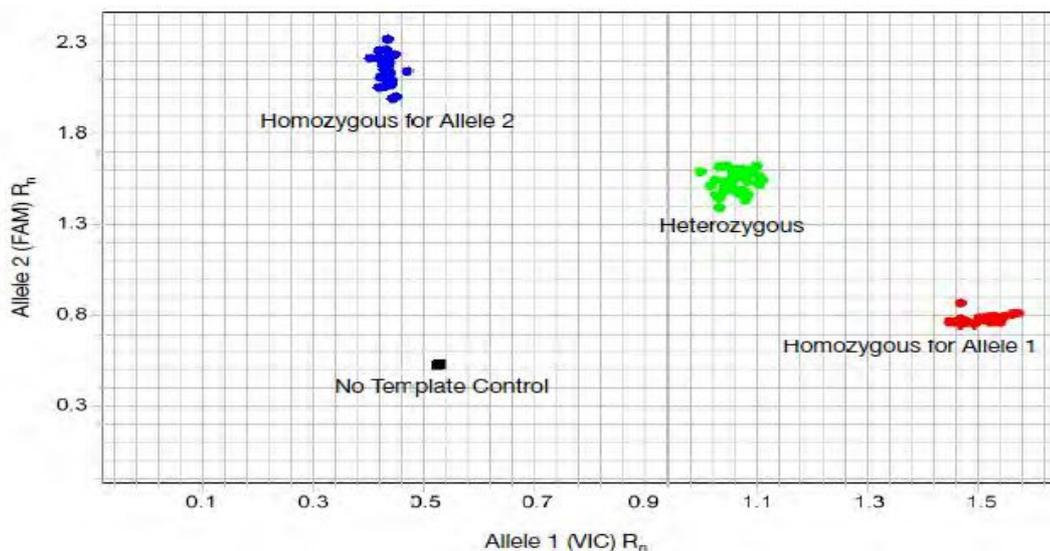
Les conditions pour les réactions d'amplification par QPCR sur le thermocycleur CFX Connecte Real Time PCR System sont les suivantes : 98°C pendant 3 min, puis 98°C 15 s, puis hybridation/élongation à 60°C pendant 30 s, répétées durant 40 cycles.

Les conditions restent spécifiques du SNP étudié et sont choisies en fonction des meilleures conditions obtenues après choix de la température de fusion (en utilisant un gradient de température), et optimisation de la concentration des amorces et des sondes (en utilisant une série de titration allant de 200 à 600 nM). Tous les échantillons ont été traités en triple afin d'assurer une meilleure reproductibilité.

## Etude Expérimentale

### I.2.4-3. Lecture des résultats :

La collecte des signaux de fluorescence suivie du traitement des résultats, obtenus sur le CFX 96, est réalisée par le logiciel Bio-Rad CFX Manager Software (Version 3.1, Bio-Rad). Ce programme permet, à partir des proportions calculées de la fluorescence émise par chaque rapporteur (FAM et VIC) spécifique d'un allèle du marqueur étudié, de représenter les génotypes de l'ensemble des individus sous forme de 3 nuages de points représentant tous les génotypes possibles pour un SNP biallélique : les individus homozygotes pour l'allèle X (X/X) (émission d'un seul fluorophore), les individus hétérozygotes pour l'allèle X et Y (X/Y) (émission des deux fluorophores) et les individus homozygotes pour l'allèle Y (Y/Y). Pour chaque mixe, le fournisseur précise à quel allèle, sauvage ou muté, est associée chacune des sondes VIC et FAM. Figure 13.



**Figure 13 : Résultat graphique de génotypage par TaqMan® obtenu par le logiciel CFX Manager.**

### I.2.5. Dosage du taux sérique d'IgE totales

Le dosage est réalisé par Technique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). C'est une technique utilisée dans la plupart des réactions antigène (Ag) -anticorps (Ig) dans les dosages biologiques. Elle fut mise au point en routine dans les années 1970 (95).

## Etude Expérimentale

L'étape de lecture n'utilise pas de marqueur radioactif comme dans les méthodes RIA, mais une enzyme qui utilisera un substrat chromogénique. Cette technique comporte « classiquement » trois temps :

- 1. Mise en contact du support avec antigène fixé + sérum avec Ig recherchée et création de liaisons spécifiques (Ag-Ig) ;
- 2. Mise en contact du complexe formé (Ag-Ig) avec un réactif comportant une anti Ig marquée avec une enzyme (Anti Ig\*) ;
- 3. Révélation du complexe (Ag-Ig-Anti Ig\*) avec mise en évidence de l'activité enzymatique par ajout du substrat chromogénique + lecture-dosage par rapport à une courbe-étalonnage. De nombreuses variantes ont été développées à partir de cette technique de base entre autres Elisa sandwich (annexe 4) (Figure 14) (96).

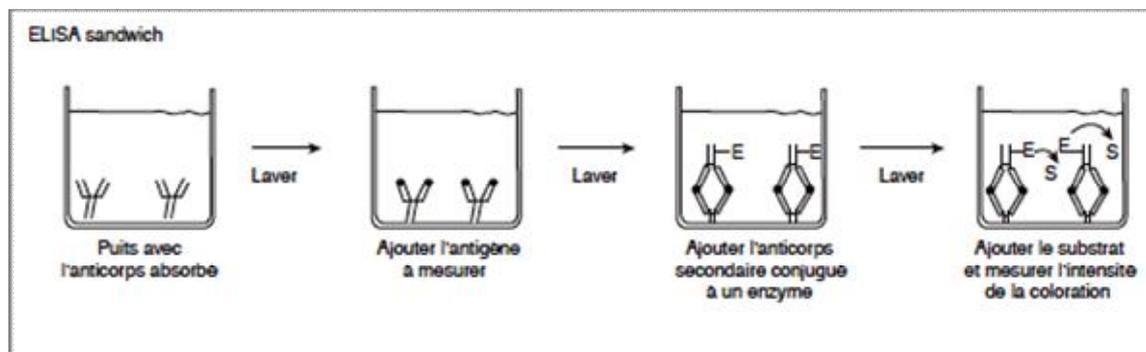


Figure 14: Technique ELISA sandwich (96).

### I.2.6. Analyse statistique

Notre étude a été réalisée dans le cadre d'une étude Cas-Témoins. Les deux populations « patients » et « témoins » doivent être les plus possibles similaires aux niveaux de l'âge et de la région géographique. À la suite du recrutement, les études des variants seront réalisées en comparant la distribution des génotypes dans la population « témoins » et « patients ». Une différence de distribution importante donne une indication sur le rôle possible qu'ils peuvent jouer dans la pathologie étudiée. (Allergie aux bêta-lactamines).

## Etude Expérimentale

---

Nous avons utilisé le logiciel SNP stats (97). Pour tester si les fréquences alléliques étaient en équilibre de Hardy-Weinberg (HW). Ce logiciel a également été utilisé pour estimer la fréquence des haplotypes chez les patients et chez les témoins.

Le test du  $\chi^2$  ou le test exact de Fisher (lorsque le nombre de sujets était inférieur à (5) ont été utilisés pour :

- Étudier la distribution des génotypes donnés par chacun des SNP chez les patients et chez les contrôles par rapport à celle attendue avec l'équilibre de Hardy Weinberg.
- Comparer entre la fréquence de chaque génotype chez les patients et chez les contrôles.
- Étudier l'association du taux d'IgE sérique avec chaque génotype ainsi que l'association entre les deux gènes, IL13 et IL4RA.

En effet, les études d'association sont basées sur l'analyse directe d'un polymorphisme en comparant la fréquence des génotypes des patients atteints de la pathologie à celle des témoins appariés. Pour cela deux calculs sont réalisés.

- Le seuil critique de significativité : Il est calculé par la loi du  $\chi^2$ . Le test de  $\chi^2$  qui ne peut être réalisé que pour les populations en équilibre d'Hardy-Weinberg, c'est-à-dire que les génotypes doivent être distribués de façon aléatoire dans la population. Cette loi du  $\chi^2$  permet de comparer les valeurs obtenues aux valeurs attendues. Le résultat de cette loi, appelé P-value, est compris entre 0 et 1 et correspond à la chance d'obtenir par hasard le même résultat sous l'hypothèse nulle. Un résultat est significatif pour des valeurs inférieures à 5% avec un intervalle de confiance de 95% et un degré de liberté égal à 1.
- L'estimation du risque relatif : Cette estimation du risque relatif est effectuée par le calcul du rapport des cotes d'exposition (*odds ratio*) au facteur étudié chez les cas et les témoins. Cette approche est utilisée pour mesurer l'effet des gènes les uns sur les autres. Cette même analyse est utilisée pour estimer la force d'association entre ces deux gènes et le taux d'IgE total élevé.

## Etude Expérimentale

---

- Le calcul de l'OR sera le suivant : ce calcul du risque relatif est accompagné d'un calcul des bornes de l'intervalle de confiance qui est classiquement fixé à 95%. Les valeurs à signification statiques ont été fixées à  $p < 0,05$ .

Le Test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour évaluer si la distribution d'une variable catégorique est la même entre les différents génotypes.

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software, San Diego, CA) et du logiciel SNP stats.

## **RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

## Résultats

---

### II. Résultats

Les antibiotiques sont parmi les classes de médicaments le plus souvent impliquées dans les réactions allergiques. Les classes d'antibiotiques les plus souvent associées à des réactions allergiques sont les pénicillines, les céphalosporines (98).

Plusieurs études se sont intéressées au terrain génétique sous-jacent à ces réactions allergiques et ont identifié des polymorphismes à risque dans les gènes tels que HLA-DRB1(99), IL4 (88), IL4R (81,87, 89,90), IL10 (85,87), IL13 (89,90). Ainsi, des associations avec des polymorphismes des gènes codant pour les cytokines IL13 et IL4 (83), l'IL13 et IL4RA (90) et l'IL-10 (85, 87) ont été montrées.

Sur la base de ces données, nous avons réalisé une étude incluant 199 cas et 99 témoins tous de même origine, en prenant pour cible des gènes candidats. Nous avons comparé la prévalence de polymorphismes SNPs entre une population souffrant d'allergie immédiate et démontrée aux bêta-lactamines et une population témoin. Les gènes choisis sont connus pour être impliqués dans la pathogénie de l'allergie aux bêta-lactamines ainsi que de l'asthme et de l'atopie, et sont impliqués pour certains dans le contrôle de la régulation de l'expression des IgE. Il s'agit des gènes codant le récepteur de l'IL4 (*Ile50Val*, *Ser478Pro*, et *Gln551Arg*) et du gène de l'IL13 (*Arg130Gln*).

Les gènes qui codent pour ces protéines sont des candidats intéressants et les interactions entre eux devraient être considérés dans les études génétiques, ces interactions reposent sur le rôle biologique de chacun des gènes. Cependant à ce jour, les études qui se concentrent sur les interactions gène-gène sont relativement rare bien qu'elles soient nécessaires dans l'avancement des connaissances dans la génétique des allergies aux bêta-lactamines.

## Résultats

---

### II.1. Fréquences alléliques et génotypiques

La loi d'Hardy-Weinberg était respectée chez les témoins comme chez les patients pour les 4 polymorphismes étudiés. Les fréquences alléliques et génotypiques des SNPs rs1805010, rs1805015, rs1801275 et rs20541 chez les cas et chez les témoins sont présentées dans les Tableaux 6 et 7.

Il n'y avait pas de différences significatives dans la distribution de l'âge ( $P= 0.1023$ ) et du sexe ( $P= 0.5554$ ) entre les cas et les témoins de notre population (tableau 4).

Nous avons mis en évidence une fréquence augmentée de l'allèle (A) du polymorphisme rs1805010 chez les patients hypersensibles aux bêta-lactamines ( $P=0,0031$ ). Chez ces mêmes patients, l'allèle (G) du polymorphisme rs20541 était aussi associé à un risque d'allergie aux bêta-lactamine ( $P=0.0093$ ) (tableau 6). Aucune autre association significative n'était démontrée pour les autres polymorphismes.

Nous avons mis en évidence une association entre le génotype *RQ/QQ* (hétérozygote et homozygote muté) du polymorphisme rs20541 de IL13 *R130Q* à un faible risque d'hypersensibilité immédiate aux bêta-lactamines (OR=0.40, 95% IC [0.20-0.83],  $P=0.0094$ ) (RR vs RQ+QQ) (tableau 7).

Le génotype *Ile/Ile* du polymorphisme rs1805010 de l'IL4RA *Ile50Val* était quant à lui associé à un risque augmenté d'hypersensibilité immédiate aux bêta-lactamines chez les patients de notre population (OR=1.82, 95% IC [1.04-3.18],  $P=0.036$ ) (II vs IV+VV). Par ailleurs, il n'y a pas de différences significatives de fréquences génotypiques entre les cas et témoins concernant les polymorphismes IL4RA *Ser478Pro* et IL4RA *Gln551Arg* (tableau 7).

## Résultats

**Tableau 6. Fréquences alléliques des polymorphismes des gènes de l'IL4RA et l'IL13 chez les patients et chez les contrôles ainsi que leur association avec le risque de l'allergie aux bêta-lactamines.**

SNP	Allèle	Patients n (%)	Contrôles n (%)	Valeur P
IL4RA I50V (rs1805010)	A (I)	174 (43.4)	112 (56.3)	0.0031
	G (V)	224 (56.6)	86 (43.7)	
IL4RA S478P (rs1805015)	T (S)	332 (83.4)	173 (87.9)	0.2059
	C (P)	66 (16.6)	25 (12.1)	
IL4RA Q551R (rs1801275)	À (Q)	315 (79.1)	153 (77.3)	0.6000
	G (R)	83 (20.9)	45 (22.7)	
IL13 R130Q (rs20541)	G (R)	346 (93.9)	186 (86.9)	0.0093
	A (Q)	52 (6.1)	12 (13.1)	

**Tableau 7. Fréquences génotypiques des polymorphismes des gènes de l'IL4RA et l'IL13 chez les cas et les témoins et leur association avec le risque de l'allergie aux bêta-lactamines.**

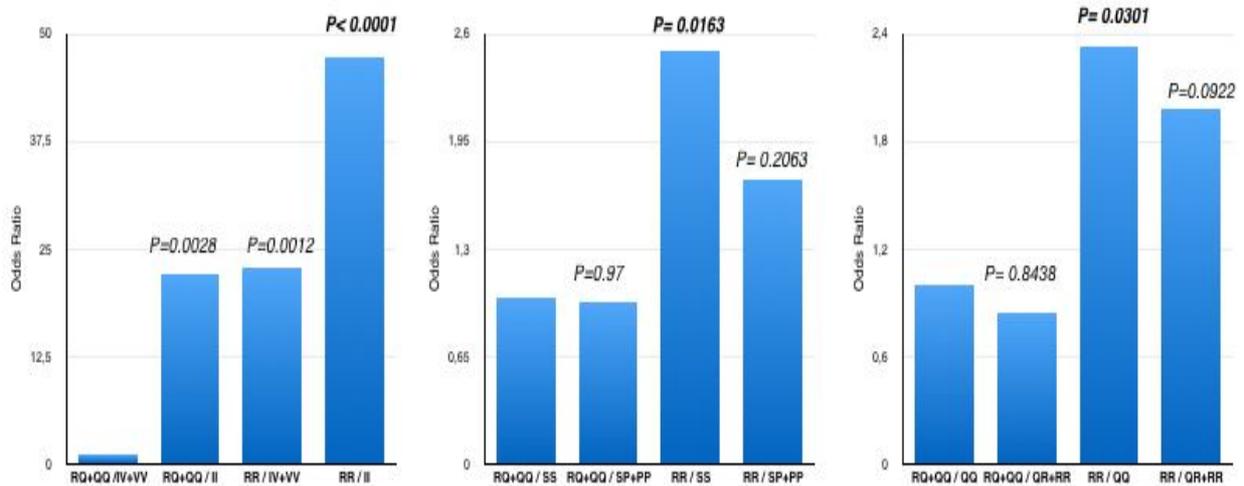
SNP	Patients n(%)	Contrôles n(%)	Valeur de P selon le mode d'héritage					OR (IC 95%)
			Codominant	Dominant	Recessif	Over-dominant	Log-additive	
IL4RA I50V II (AA) IV (AG) VV (GG)	44 (22.1)	32 (32.3)	<b>0,0144</b>	<b>0.036</b>	<b>0.013</b>	0.72	<b>0.0059</b>	<b>1.82 (1.04-3.18)</b>
	86 (43.2)	48 (48.5)						
	69 (34.7)	19 (19.2)						
IL4RA S478P SS (TT) SP (TC) PP (CC)	139 (69.9)	74 (74.7)	0.1925	0.56	0.12	0.79	0.41	0.84 (0.47-1.51)
	54 (27.1)	25 (25.2)						
	06 (3.0)	00 (0)						
IL4RAQ551R QQ (AA) QR (AG) RR (GG)	121(60.8)	61 (61.6)	0.1378	0.95	0.16	0.55	0.57	1.02 (0.60-1.72)
	73 (36.7)	31 (31.3)						
	05 (2.5)	07 (7.0)						
IL13 R130Q RR (GG) RQ (GA) QQ (AA)	152 (76.4)	87 (87.9)	<b>0.0384</b>	<b>0.0094</b>	<b>0,041</b>	<b>0,038</b>	<b>0.0045</b>	<b>0.40 (0.20-0.83)</b>
	42 (21.1)	12 (12.1)						
	05 (2.5)	00 (0)						

## Résultats

### II.2. Analyse d'interaction

En raison de l'interaction biologique de IL4RA et IL13, une analyse a été effectuée pour déterminer si les individus avec les génotypes à risque pour les deux gènes présentaient plus de risque de développer une allergie aux bêta-lactamines lors de leurs associations deux à deux. Les données sont résumées sur la figure 15 et ont montré que l'IL13 130RR combiné à l'un des génotypes homozygotes d'IL4RA (Ile/Ile, Ser/Ser et Arg/Arg) était un facteur de risque d'allergie aux bêta-lactamines.

Nous avons donc constaté que la combinaison de l'allèle prédominant du polymorphisme IL13 R130Q avec l'un des génotypes homozygotes prédominants des trois polymorphismes de IL4RA (I50V, S478P et Q551R) étaient plus significativement associés au risque d'allergie au bêta-lactamines ( $P < 0.0001$ ,  $P = 0.0163$ ,  $0.0301$ , respectivement) que l'effet d'un polymorphisme tout seul ( $P = 0.0093$ ,  $0.0031$ ,  $0.2059$ ,  $0.6000$ , respectivement). De plus, les combinaisons symétriques (IL13 130RQ / QQ + IL4RA 50II) et (IL13 130RR+ IL4RA 50IV/VV) représentent aussi un facteur de risque d'allergie aux bêta-lactamines. Aucune autre association n'est observée avec les autres combinaisons (Figure 15).



Bars indicate the odds ratio between the different combinations of genotypes for IL4RA (I50V, S478P, and Q551R) and IL13 R130Q. The non-risk genotype for each gene was used as the reference odds ratio.

**Figure 15 : Interaction entre les génotypes de l'IL13 et IL4RA**

## Résultats

---

Plusieurs études ont suggéré que la réaction allergique aux bêta-lactamines est influencée par les gènes impliqués dans la production d'IgE y compris IL13 et IL4RA. Donc nous avons étudié l'association entre les polymorphismes des gènes IL13 et IL4RA; ainsi que leur interaction deux à deux; et le risque d'avoir un taux d'IgE totales supérieur à 100 UI/ml.

L'allèle G en position rs20541 était associé à un taux élevé d'IgE totales ( $P=0,0002$ ) dans toute la population d'étude (patients et témoins). Aucune association avec les trois polymorphismes du gène IL4RA n'était identifiée (tableau 9).

Les patients possédant l'allèle Val pour IL4RA 50 et l'allèle Propour IL4RA 478, ont un taux d'IgE totales significativement plus élevé que les patients homozygotes *Ile/Ile*, et *Ser/Ser*. La présence des formes Val/Val et Pro/Pro présentent un facteur de risque d'avoir un taux d'IgE totales supérieur à 100kUI/l chez les patients allergiques (Tableau 8).

Dans les deux groupes de l'étude (cas et témoins), on observe un taux d'IgE sérique élevé lorsque les combinaisons IL13Arg/Arg + IL4RA50Ile/Ile, IL13Arg/Arg + IL4RA 478Ser/Ser, et IL13Arg/Arg + IL4RA 551Gln/Gln sont présentes (IL13 / IL4RA : $P =0,0220, 0,0002, 0,0020$ , respectivement) comparativement aux résultats obtenus si l'on considère chaque variant séparément ( $P = 0,0002, 0,2224, 0,6978, 0,1237$ , respectivement) (Tableau 9).

## Résultats

**Tableau 8. Taux sériques d'IgE en fonction du génotype chez le groupe des patients.**

Polymorphisme	Taux sérique d'IgE totales en kUI/l			Valeur <i>P</i>
	Médiane(25th - 75th centiles)			
	Homozygote sain	Hétérozygote	Homozygote muté	
IL4RA <i>Ile50Val</i>	168.3 (81.03 - 253)	216.5 (82.75 - 259.6)	252.4 (181.6 -269.1)	<b>0.0136</b>
IL4RA <i>Ser478Pro</i>	218.3 (100.5 - 276)	197.4 (97.78 - 258.5)	261.6 (260.7 -264.2)	<b>0.0492</b>
IL4RAGln551Arg	219.2 (110.7-273.1)	213.4 (90.75 - 261.6)	112 (63.3- 180.9)	0.2011
IL13 <i>Arg130Gln</i>	214.4 (92.38-261.1)	213.7 (146.6 - 277.5)	270.2 (240 - 301)	0.0460

**Tableau 9. Association entre les polymorphismes *IL13* et *IL4RA* et le taux sérique d'IgE totales chez les groupes des patients et témoins.**

Polymorphismes <sup>a</sup>	Total IgE (IU/ml)		Valeur <i>P</i>
	IgE < 100	IgE > 100	
	Mean ± SD	Mean ± SD	
IL4RA 50 II (76)	37.5 ± 18.4	202.2 ± 70.5	0.2224
IL4RA 478 SS (213)	40.2 ± 18.9	228.0 ± 62.3	0.6978
IL4RA 551 QQ (182)	40.05 ± 19.6	224.0 ± 63.5	0.1237
IL13 130RR (239)	39.8 ± 20.15	226.1 ± 60.5	<b>0.0002</b>
IL13 130RR/ IL4RA 50II (39)	37.7 ± 17.7	207.4 ± 82.2	<b>0.0220</b>
IL13 130RR/ IL4RA 478 SS(164)	36.1 ± 17.1	229.2 ± 62.2	<b>0.0002</b>
IL13 130RR/ IL4RA 551QQ(134)	41.1 ± 20.6	221.6 ± 64.9	<b>0.0020</b>

<sup>a</sup>Nombre de cas avec le génotype est indiqué entre parenthèses, SD: Standard de Déviation

## Résultats

### II.3. Analyse des haplotypes

Les fréquences des haplotypes chez les cas et les témoins ont été estimées en utilisant le logiciel SNP stats.

Pour cette analyse, il était noté un déséquilibre de liaison entre IL4RA I50V (rs1805010) et IL4RA S478P (rs1805015), ainsi qu'un fort déséquilibre de liaison entre IL4RA S478P (rs1805015) et IL4RA Q551R (rs1801275), alors que IL4RA I50V (rs1805010) et IL4RA (rs1801275) n'étaient pas en déséquilibre de liaison (Tableau 10).

Nous avons démontré l'association entre les haplotypes majeurs pour ces 3 polymorphismes et l'allergie aux bêta-lactamines (Tableau 11).

L'haplotype GTA semble être un facteur de risque de l'allergie aux bêta-lactamines (OR= 1.61, 95% IC [1.11-2.35]), tandis que l'haplotype ATA a un effet protecteur de cette allergie (OR= 0.45, 95% IC [0.3- 0.65])

**Tableau 10. Déséquilibre de liaison des gènes de l'IL4RA (rs1805010, rs1805015 et rs1801275)**

IL4RA SNP	D'	r <sup>2</sup>
rs1805010, rs1805015 (IL4RA I50V, IL4RA S478P)	<b>0.5195</b>	0.04
rs1805010, rs1801275 (IL4RA I50V, IL4RA Q551R)	0.4355	0.05
rs1805015, rs1801275 (IL4RA S478P, IL4RA Q551R)	<b>0.7977</b>	0.42

## Résultats

**Tableau 11. Fréquences des haplotypes des polymorphismes du gène IL4RA chez les cas et témoins.**

Haplotype	Fréquence		Valeur <i>P</i>	OR (IC 95%)
	Cas	Témoins		
ATA	0,378	0,486	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>0.45 (0.31-0.65)</b>
GTA	0,383	0,275	<b>0.0123</b>	<b>1.61 (1.11-2.35)</b>
GCG	0,240	0,230	0.3099	1.23 (0.82-1.83)

OR odds ratio, IC intervalle de confiance.

Dans le tableau 12. Les fréquences des polymorphismes ont été comparées entre la population témoin de notre étude et des populations témoin Caucasienne ou Chinoise de différentes études afin d'évaluer une éventuelle variabilité génique en fonction des populations.

## Résultats

**Tableau 12. Comparaison des fréquences des polymorphismes entre la population d'étude et différentes populations témoins.**

Population	IL13 Arg130Gln					Valeur P*
	Arg/arg	Arg/Gln	Gln/Gln	Allèle Arg	Allèle Gln	
Témoins algériens	87 (87.9%)	12 (12.1%)	0 (0%)	186 (93.9%)	12 (6.1%)	<b>&lt; 0.0001</b>
Témoins chinois (110)	10 (12%)	36 (42%)	39 (46%)	114 (67%)	56 (33%)	
Témoins italiens (90)	179 (67.5%)	73 (27.5%)	13 (5%)	431 (81.3%)	99 (18.7%)	
Témoins espagnoles (89)	244 (71.8%)	85 (25.1%)	11 (3.1%)	573 (84%)	107 (16%)	
	IL4R Ile50Val					
	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	Allèle Ile	Allèle Val	
Témoins algériens	32 (32.3%)	48 (48.5%)	19 (19.2%)	112 (56.6%)	86 (43.4%)	0.5629
Témoins français (87)	16 (36.4%)	21(47.7%)	07 (15.9%)	53 (60%)	35 (40%)	
Témoins italiens (90)	55 (20.7%)	147 (55.5%)	63 (23.8%)	257 (48.5%)	273 (51.5%)	0.0525
Témoins espagnoles (89)	165 (48.5%)	135 (39.8%)	40 (11.7%)	465 (68%)	215 (32%)	<b>0.0020</b>
Témoins américains (88)	11 (29.8%)	17 (45.9%)	9 (24.3%)	39 (53%)	35 (47%)	0.5705
	IL4R Ser478Pro					
	Ser/Ser	Ser/Pro	Pro/Pro	Allèle Ser	Allèle Pro	
Témoins algériens	74 (74.7%)	25 (25.2%)	0	173 (87.9%)	25 (12.1%)	0.7348
Témoins italiens (90)	197 (74.3%)	64 (24.1%)	4 (1.6%)	458 (86.4%)	72 (13.6%)	
Témoins espagnoles (89)	240 (70.6%)	90 (26.5%)	10 (2.9%)	570 (84%)	110 (16%)	0.2229
	IL4R Gln551Arg					
	Gln/Gln	Gln/Arg	Arg/Arg	Allèle Gln	Allèle Arg	
Témoins algériens	61 (61.6%)	31 (31.3%)	07 (7.07%)	153 (77.3%)	45 (22.7%)	0.0518
Témoins italiens (90)	182 (68.9%)	77 (29.2%)	05 (1.9%)	441 (83.5%)	87 (16.5%)	
Témoins espagnoles (89)	171 (50.2%)	22 (36.1%)	47 (15.7%)	464 (68%)	216 (32%)	<b>0.0143</b>
Témoins français (87)	33 (78.6%)	07 (16.6%)	02 (4.85%)	73 (87%)	21 (13%)	0.9411

\* test de  $\chi^2$  entre les fréquences alléliques de notre population témoin et celle de la population témoin de référence.

## Discussion

---

### III. Discussion

Ce travail a fait l'objet d'un article intitulé: "Polymorphisms in the interleukin 4 receptor and interleukin 13 genes in immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics: a case-control study", publié dans la revue *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* (annexe 5).

Nous avons, pour la première fois, évalué l'association des gènes IL13 et IL4RA avec des hypersensibilités immédiates aux bêta-lactamines dans une partie de la population Algérienne.

Il ressort de cette étude que les polymorphismes IL13 Arg130Gln et IL4RA Ile50Val sont liés à l'allergie aux bêta-lactamines ( $P=0.0093$  et  $P=0.0031$  respectivement).

Dans une cohorte de 210 patients italiens ayant présenté une allergie immédiate aux bêta-lactamines, Guéant-Rodriguez et al. ont évalué les polymorphismes de l'IL13 ainsi que du récepteur de l'IL4. L'allèle majoritaire pour les polymorphismes de l'IL-4R $\alpha$  I50V et Q551R était significativement associé à l'hypersensibilité aux bêta-lactamines ( $P=0,027$  et  $P=0,015$  respectivement)(90).

Cependant, Apter et al. ont rapporté que le polymorphisme IL4RA I50V n'est pas lié à un risque d'allergie à la pénicilline, basé sur une série de 23 patients allergiques à la pénicilline en provenance des États-Unis (88).

Qiao et al ont étudié des polymorphismes cytokiniques et leurs associations avec l'hypersensibilité aux bêta-lactamines dans une population qui comprenait 242 patients avec une allergie aux bêta-lactamines. Cette équipe a montré l'association de 2 polymorphismes du gène codant pour le récepteur de l'IL-4 avec l'hypersensibilité aux bêta-lactamines. Dans cette étude, le génotype AA du polymorphisme Q576R de l'IL-4RA était associé à un risque accru d'hypersensibilité aux bêta-lactamines ( $P=0,005$ ), à la présence de tests positifs et à un taux IgE élevé. Le génotype AA du polymorphisme I75V était quant à lui associé à un risque augmenté d'urticaire ( $P=0,049$ ). Ces données étaient confirmées par l'analyse des haplotypes (82).

Ces résultats semblent dépendre des populations étudiées (effectifs pris en compte, origine ethnique et géographique). Cette explication est soutenue par la recherche de Guéant et al.

## Discussion

---

qui ont montré qu'il existe une différence de fréquence du génotype AA pour l'IL4RA I50V entre deux populations européennes (100).

Chez le groupe des patients de notre population, nous avons observé une concentration plus élevée du taux sériques d'IgE totales par rapport à la population contrôle, suggérant l'implication d'un mécanisme génétique lié à la commutation de classe IgE (tableau 4).

Le gène IL4RA est situé sur le chromosome 16p11-16p12 (101). Dans cette étude, les I50Vet S478R sont associés à la production d'IgE chez les patients allergiques aux bêta-lactamines, tandis qu'aucune association est observée pour Q551R (tableau 8). Cependant, Cornejo-Garcia et al. ont trouvé, chez les Caucasiens espagnols, que le taux d'IgE totales est affecté par le polymorphisme Q551R ainsi que la combinaison IL13 130RQ/QQ + IL4RA 551QQ (89).

Guéant-Rodriguez et al ont également évalué les polymorphismes de l'IL4RA I50V et Q551R et le taux sérique d'IgE totales. Ces mêmes polymorphismes ainsi que le polymorphisme R130Q de l'IL13 étaient associés à un taux élevé d'IgE ( $P=0.002$ ,  $P=0.024$  et  $P=0.020$  respectivement) (90).

Dans notre population d'étude, les deux combinaisons symétriques (IL13 130RR + IL4RA 50II, et IL13 130RR +IL4RA 551QQ) sont significativement corrélées avec le taux sérique d'IgE totales, mais l'association la plus significative est avec le génotype IL13 RR130 et la combinaison IL13 130RR + IL4RA 478SS (Tableau 9), confirmant le rôle critique de l'IL13 dans le déclenchement de la production d'IgE (102-105).

Il semble ainsi nécessaire d'étudier non pas l'effet d'un polymorphisme isolé sur la réaction allergique ou le taux des IgE, mais l'association de plusieurs gènes d'entre eux afin d'avoir un impact pronostique plus important.

De notre étude, la combinaison de l'allèle majoritaire du polymorphisme de l'IL13 et l'un des allèles majoritaires de l'IL4RA (I50V, S478P, Q551R) était associé à un risque élevé d'hypersensibilité aux bêta-lactamines (OR= 47.31, IC : [2.68-835.1], OR= 2.49 [1.16-5.35], OR=2.33, [1.07-5.09] respectivement) (figure 15). Ces associations plaident pour un rôle complémentaire de ces 2 gènes dans les mécanismes allergiques IgE médiés.

## Discussion

---

La forte prévalence d'un taux d'IgE augmenté chez les patients présentant une allergie immédiate aux bêta-lactamines faisait également discuter le lien entre ce type d'hypersensibilité et l'atopie (90).

Guéant-Rodriguez et al, conclut dans leurs travaux sur les interactions gène-gène dans l'analyse génétique moléculaire des hypersensibilités immédiates aux bêta-lactamines, qu'une seule mutation n'a qu'un impact mineur, alors qu'une combinaison de plusieurs mutations peut avoir un effet significatif sur un phénotype (90).

La modélisation informatique du variant rs20541 a montré que cette substitution affecte l'interaction de l'interleukine 13 a son récepteur (106). Ce polymorphisme code pour un résidu d'acide aminé situé dans l'hélice D, près de la région C-terminale de l'IL13 (107). IL13 est un ligand de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur de l'IL4 (IL4R) ; il est donc possible que le polymorphisme *R130Q* influence l'interaction entre l'hélice D et la sous-unité  $\alpha$  de IL4R. Les mécanismes moléculaires sous-jacents de cette association doivent être clarifiés, car la modélisation informatique de l'interaction IL13 / IL4RA suggère que l'*Arginine* du variant *130RR* repousse l'*Histidine131* de IL4RA (106). Les variants *S478P* et *Q551R* de l'IL4RA ; en raison de leur position proche d'un domaine de recrutement STAT6 ; peuvent intensifier l'association du récepteur à STAT6 par conséquent, le niveau de la réponse traductionnelle (107). Enfin, certains gènes liés à la voie de signalisation d'IL4RA ; telles que IL4, STAT6 et JAK1 ; pourrait également expliquer un risque supplémentaire d'allergie aux bêta-lactamines IgE dépendante (108).

Dans l'analyse des haplotypes du gène IL4RA, la fréquence de l'haplotype GTA s'est révélée significativement plus élevée chez les sujets allergiques que chez les témoins, suggérant une interaction entre les trois polymorphismes et la survenue d'une allergie aux bêta-lactamines. En d'autres termes, l'haplotype GTA pourrait avoir une susceptibilité à l'allergie immédiate aux bêta-lactamines dans la population algérienne.

L'haplotype combinant G50, T478 et A551 aurait un impact plus important sur la survenue de l'allergie aux bêta-lactamines que l'effet isolé de chaque SNP, ce qui suggère que l'analyse des haplotypes pourrait être utile pour une meilleure compréhension des déterminants génétiques sous-tendant ces accidents médicamenteux. De plus, l'haplotype ATA semble avoir un effet protecteur contre l'allergie aux bêta-lactamines, bien que la raison en soit peu claire (tableau

## Discussion

---

11). Ces résultats devraient être confirmés dans une plus large cohorte de même origine ethnique ou d'autre origine.

Nous avons effectué une comparaison de la fréquence des polymorphismes retrouvée dans notre population témoin avec celle retrouvée dans d'autres études portant sur différentes populations contrôles caucasienne et chinoise (tableau 12). L'analyse statistique par un test de  $\chi^2$  montre des différences significatives de fréquences pour le polymorphisme IL13 Arg130Gln entre les témoins de notre population et les témoins chinois ainsi que les Italiens et les Espagnols. Pour les polymorphismes IL4RA Ile50Val et IL4RA Gln551Arg, il existe une différence significative de fréquences entre les témoins algériens et les témoins espagnols (tableau 12).

Les études réalisées au sein des populations ethniques différentes montrent des différences significatives de fréquences pour les polymorphismes IL4RA Ile50Val et IL4RA Gln551Arg entre les sujets noirs, blancs, asiatiques et hispaniques (109). Une autre étude de Guéant et al. ont montré une différence de fréquence pour le polymorphisme IL4RA Ile50Val entre deux populations témoin Espagnole et Italienne (100). Il est donc difficile de comparer des études portant sur des populations différentes et qui plus est chez des sujets présentant des pathologies de type allergiques différentes. Ces différences génétiques pourraient expliquer des différences phénotypiques concernant la réactivité des sujets suite à la prise des bêta-lactamines.

Le tableau 13 montre une comparaison entre les résultats de notre étude et d'autres études d'association génétique rapportées chez des patients présentant une hypersensibilité aux bêta-lactamines. Ces études ont suggéré que les gènes des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL4RA, l'IL4, et l'IL13 sont impliqués dans des réactions allergiques aux bêta-lactamines IgE dépendante.

## Discussion

**Tableau 13. Synthèse des associations génétiques rapportées dans différentes populations comparées avec notre étude.**

Auteur	Région géographique	Variant du gène	Effect de taille	Validation Fonctionnelle
Guéant-Rodriguez, 2006 <sup>90</sup>	Italie	IL13 R130Q IL4RA I50V IL4RA S478P IL4RA Q551R	130 (RQ+QQ); OR=1.44(0.95–2.18); P=0.0881 50II; OR=1.65 (1.06–2.57); P=0.0272 478SS; OR=1.82 (1.07–3.12); P=0.0271 551QQ; OR=1.67(1.02–2.74); P=0.0426	Taux sérique d'IgE totales
Guglielmi, 2006 <sup>87</sup>	France	IL4RA Ile75Val IL10 -819C>T IL10 -592C>A	OR=5.4(1.16–27.7); P=0.012 OR=17.5(1.26–533.07); P=0.023	Aucun
Apter, 2008 <sup>88</sup>	USA	IL4 IL4R LACTB	rs2070874; OR=3.33(1.09–10.21); P=0.035 rs10062446; OR=3.61(1.21–10.71); P=0.021 rs11740584; OR=4.08(1.35–12.30); P=0.012 rs1805010; OR=1.35(0.40–4.62); P=0.63 rs2729835; OR=2.99 (0.96–9.28); P=0.058	Métabolisme de la pénicilline (LACTB)
Cornejo-Garcia, 2012 <sup>89</sup>	Espagne	IL4RA I50V IL4RA Q551R	NR	IgE spécifiques contre les allergènes dominants; Prévalence de l'atopie
Qiao, 2005 <sup>81</sup>	Chine	IL4R Q576R	NR	IgE spécifiques aux pénicillines (huit types); taux sériques d'IL-4, d'IL-13 et d'IFN-gamma
Huang, 2009 <sup>82</sup>	Chine	IL4R Q576R IL4R I75V	Q576; OR=1.67(1.17–2.38); P=0.003 I75; OR=1.21(0.93–1.57); P=0.19	IgE spécifiques (huit types)
Notre étude	Algérie	IL13 R130Q IL4RA I50V IL4RA S478P IL4RA Q551R	130 RR; OR=3.56(1.78–7.12); P=0.0002 50II; OR=0.65 (0.37–1.13); P=0.2224 478SS; OR=1.07(0.61–1.87); P=0.6978 551QQ; OR=0.65(0.39–1.10); P=0.1237	Taux sérique d'IgE totales

NR : non rapportée

## **Conclusion Et Perspectives**

---

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## Conclusion Et Perspectives

---

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Une analyse d'association avec deux gènes candidats à l'allergie aux bêta-lactamines a été conduite dans une partie de la population Algérienne. Les résultats ont montré une association positive avec les polymorphismes IL13 Arg130Gln et IL4RA Ile50Val pour l'allergie immédiate aux bêta-lactamine. L'allèle Arg130 est lié à des taux sériques d'IgE totales plus élevés chez les patients algériens.

Par la suite, une analyse d'interaction a été conduite, avec le variant IL13 Arg130Gln et les trois polymorphismes du gène de l'IL4RA, afin de voir s'il existe une relation génétique entre eux, ainsi que leur association deux à deux avec les taux d'IgE totales. Les résultats de cette analyse ont permis de montrer des interactions possibles entre les polymorphismes de ces deux gènes, le risque d'allergie aux bêta-lactamines et la concentration élevée d'IgE.

L'analyse des haplotypes pourrait être utile pour une meilleure compréhension des déterminants génétiques sous-tendant les allergies immédiates aux bêta-lactamines dans la population algérienne.

Ces résultats ouvrent néanmoins des pistes très intéressantes et seront amenés à être confirmés lors d'études ultérieures menées sur des populations plus importantes.

Les étapes subséquentes à de tels résultats obtenus, sont : 1) de valider cette association génétique dans la cohorte entière ; 2) d'effectuer des travaux ciblant d'autres gènes candidats, ces gènes seront choisis pour leur implication physiopathologique connue dans les allergies médicamenteuses et pour leur localisation dans des régions chromosomiques liées à ces allergies ou à leurs conditions cliniques.

D'autres avancées possibles reliées à cette étude concernant les prochaines analyses d'interactions. En fait, il faudra sélectionner d'autres gènes candidats potentiellement en interactions avec les présents gènes. L'emploi des analyses haplotypiques sera également priorisé afin d'augmenter les chances de trouver des associations positives.

Enfin, effectuer des études pharmacologiques afin de voir si ces paramètres pourraient être pris en considération et influencer le choix d'une antibiothérapie future.

## Références

---

**RÉFÉRENCES**

## Références

---

### RÉFÉRENCES

1. **Alfirevic A., Pirmohamed M.** Drug-induced hypersensitivity reactions and pharmacogenomics : past, present and future. *Pharmacogenomics*. 2010;11:497-9.
2. **Demoly P., Viola M., Gomes E., Romano A.** Epidemiology and causes of drug hypersensitivity. In: Pichler WJ, editor. *Drug hypersensitivity*. Basel:Karger; 2007. p. 2-17.
3. **Johansson SG., Hourihane JO., Bousquet J et al;** EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) Nomenclature Task Force. A revised nomenclature for allergy: an EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001;56:813-824.
4. **Schnyder B, Pichler WJ.** Mechanisms of drug-induced allergy. *Mayo Clin Proc*. 2009;84:268-272.
5. **Descotes J., Choquet-Kastylevsky G.** Gell and Coombs's classification: is it still valid?. *Toxicology*. 2001a;158: 43-9.
6. **Pichler WJ.** Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med*. 2003;139:683-693.
7. **Gell PGH., Coombs RRA., Lachmann PJ.** *Clinical Aspects of Immunology*. 3rd edition. Oxford: Blackwell; 1975.
8. **Nyfelner B., Pichler WJ.** The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy*. 1997; 27:175-81.
9. **Mirakian R., Leech SC., Krishna MT., et al.** Management of allergy to penicillins and other beta-lactams. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(2):300-27.
10. **Romano A., Demoly P.** Recent advances in the diagnosis of drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7:299-303.
11. **Demoly P., Romano A.** Update on beta-lactam allergy diagnosis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005; 5:9-14.

## Références

---

12. **Solensky R.** Hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2003; 24:201-20.
13. **Ponvert C., Scheinmann P.** Les réactions allergiques et pseudo-allergiques aux bêta-lactamines. *Arch Ped.* 2003; 10 (7):658-665.
14. **Ponvert C., Le Bourgeois M., Scheinmann R., et al.** Les réactions allergiques aux médicaments anti-infectieux courants. *Rev Fr Allergol.* 1999; 39 (6) :455-467.
15. **Ponvert C., Mazeyrat R., Scheinmann R., et al.** Exploration allergologique des réactions aux bêta-lactamines chez l'enfant : résultats d'une étude de 50 cas, comportant des tests cutanés lecture immédiate, des RAST et des tests de réintroduction par voie orale. *Rev Fr Allergol.* 1996; 36 (2):162-175.
16. **Juchet A., Rance F., Bremont F. et al.** Exploration de l'allergie aux bêta-lactamines chez 45 enfants. *Rev Fr Allergol.* 1994; 34 (5):369-375.
17. **Romano A., Quaratino D., Papa G., et al.** Aminopenicillin allergy. *Arch Dis Child.* 1997; 76:513-517.
18. **Park M A., Li JT.** Diagnosis and management of penicillin allergy. *Mayo Clin Proc.* 2005; 80 (3):405-410.
19. **Birnbaum J., Verloet D.,** Allergie aux pénicillines. *Rev Fr Allergol.* 1997; 37 (1):29-35.
20. **Bousquet PJ., Kvedariene V., Co-Minh HB., et al.** Clinical presentation and time course in hypersensitivity reactions to beta-lactams. *Allergy.* 2007;62:872-6.
21. **Gómez E., Torres MJ., Mayorga C., et al.** Immunologic evaluation of drug allergy. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2012;4:251-63.
22. **Carbon C., Régnier B., Saimot AG., et al.** Médicaments anti-infectieux. Ed Flammarion Médecine-sciences. 1995.
23. **Mirakian R., Ewan PW., Durham SR., et al.** BSACI guidelines for the management of drug allergy. *Clin Exp Allergy.* 2009 ;39(1):43-61.

## Références

---

24. **Cavallo JD., Fabre R., Jehl F., et al.** Bêta-lactamines. EMC Mal Infect. 2004;1(3):129-202.
25. **Paradis H., Thirion DJG., Bergeron L.** Les allergies croisées aux antibiotiques :comment s'y retrouver? Pharmactuel. 2009 Vol. 42 N° 1 Janvier - Février.
26. **Comte D., Petitpierre S., Bart PA., et al.** Allergie aux  $\beta$ -lactamines. Rev Med Suisse. 2012; 8:836-42.
27. **Demoly P., Hillaire-Buys D., Raison-Peyron N., et al.** Identifier et comprendre les allergies médicamenteuses , Med Sci (Paris). 2003; 19(3):327-36.
28. **Blanca A., Romano MJ., Torres J.,et al.** Update on the evaluation of hypersensitivity reactions to betalactams. Allergy. 2009; 64:183-193.
29. **Haouichat H., Guénard L., Bourgeois S., et al.** Skin tests in the investigation of penicillin allergy. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique. 2002; 42(8):779-792.
30. **Chaabane A., Aouam K., Boughattas NA., et al.** Allergy to betalactams: Mythe and realities. Medecine et maladies infectieuses .2009;39:278-287.
31. **Bourrain JL.** Methodology for rapid readout tests, Annales de dermatologie et de vénéréologie. 2009;136 :661-667.
32. **Laxenaire MC., Mertes PM.** Accidents anaphylactiques. EMC - Médecine. 2004;1(1):59-69.
33. **Ponvert C., Mazeyrat R., Scheinmann R., et al.** Exploration allergologique des réactions aux bêta-lactamines chez l'enfant : résultats d'une étude de 50 cas, comportant des tests cutanés lecture immédiate, des RAST et des tests de réintroduction par voie orale. Rev Fr Allergol. 1996;36(2):162-75.
34. **Torres MJ., Blanca M., Fernandez J., et al.** Diagnosis of Immediate Allergic Reactions to Beta-Lactam Antibiotics. Allergy 2003;58 (10):961-972.
35. **Beauvillaina C., Drouet M., Renier G.** Le test d'activation des basophiles, Revue francophone des laboratoires. 2008 ;404:67-77.

## Références

---

36. **Aberer W., Bircher A., Romano A., et al. European Network for Drug Allergy (ENDA), EAACI interest group on drug hypersensitivity.** Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy*. 2003;58(9):854-863.
37. **Bousquet PJ., Demoly P., Romano A., et al.** Pharmacovigilance of drug allergy and hypersensitivity using the ENDA-DAHD database and the GA2 LEN platform. The Galenda project, Global Allergy, Asthma European Network (GA2LEN) and DrugAllergy andHypersensitivity Database (DAHD) and the European Network for Drug Allergy (ENDA), *Allergy*. 2009; 64:194-203.
38. **Sanz ML., Gamboa PM., Garcia-Aviles C., et al.** Drug hypersensitivities: which room for biological tests. *Eur Ann Allerg Clin Immunol*. 2005;37(6): 230-235.
39. **Fontaine C., Mayorga C., Bousquet PJ., et al.** Relevance of the Determination of Serum-Specific IgE Antibodies in the Diagnosis of Immediate Beta-Lactam Allergy. *Allergy* 2007, 62 (1):47-52.
40. **Fernández TD., Torres MJ., Blanca-López N., et al.** Negativization Rates of IgE Radioimmunoassay and Basophil Activation Test in Immediate Reactions to Penicillins. *Allergy*. 2009; 64 (2):242-248.
41. **Sanz ML., Gamboa PM., Antépara I., et al.** Flow Cytometric Basophil Activation Test by Detection of CD63 Expression in Patients with Immediate-Type Reactions to Betalactam Antibiotics. *Clin. Exp. All.* 2002; 32 (2):277-286.
42. **Torres MJ., Padial A., Mayorga C., et al.** The Diagnostic Interpretation of Basophil Activation Test in Immediate Allergic Reactions to Betalactams. *Clin. Exp. Allergy* 2004; 34 (11):1768-1775.
43. **De Weck AL., Sanz ML.** Cellular Allergen Stimulation Test (CAST) 2003 , a Review. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol*. 2004; 14 (4):253-273.
44. **Lebel B., Messaad D., Kvedariene V., et al.** Cysteinyl-Leukotriene Release Test (CAST) in the Diagnosis of Immediate Drug Reactions. *Allergy* 2001; 56 (7):688-692.

## Références

---

45. **Vervloet D., Durham S.** ABC of Allergies. Adverse Reactions to Drugs. *Brit. Med. J.* 1998; 316 (7143):1511-1514.
46. **Yusin JS., Klaustermeyer W., Simmons CW., et al.** Desensitization in Patients with Beta-Lactam Drug Allergy. *Allergol. Immunopathol.* 2013; 41 (5):298-303.
47. **Owen JA., Punt J., Stranford SA.** Le cours de Janis Kuby. *Immunologie* 7<sup>ème</sup> édition, 2014. Edition Dunod.
48. **Infuhr D.** Molecular and cellular targets of anti-IgE antibodies. *Allergy* 2005; 60: 977-985.
49. **Pullen NA., Barnstein BO., Falanga YT., et al.** Novel Mechanism for FcRI-mediated Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) Tyrosine Phosphorylation and the Selective Influence of STAT5B over Mast Cell Cytokine Production. *J Biol Chem.* 2012; 287(3):2045-2054.
50. **Vitte J., Bienvenu F.** Allergènes moléculaires. EMC- Biologie médicale. 2012;7(3):1-8 [Article 90-30-0001-A].
51. **Hawrylowicz CM., O'Garra A.** Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma, *Nat Rev Immunol.* 2005;5(4):271-83.
52. **Punnonen J., Yssel H., Vries JE.** The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1997; 100:792-801.
53. **Izuhara K., Shirakawa T.** Signal transduction via the interleukine-4 receptor and its correlation with atopy. *International journal of molecular medicine* 1999; 165-169.
54. **Nossal GJ.** The double helix and immunology. *Nature.* 2003; 421:440-444.
55. **Nelms K., Keegan AD., Zamorano J., et al.** The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:701-38.
56. **Deichmann K., Bardutzky J., Forster J., et al.** Common polymorphisms in the coding part of the IL4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231:696-697.

## Références

---

57. **Hershey GK., Friedrich MF., Esswein LA., et al.** The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* 1997; 337:1720-1725.
58. **Kelly-Welch AE., Hanson EM., Boothby MR., et al.** Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science* Jun 2003; (6)300:1527-1528.
59. **Risma KA., Wang N., Andrews RP., et al.** V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function. *J Immunol* Aug 2002;169(3):1604-10.
60. **Hackstein H., Hecker M., Kruse S., et al.** A novel polymorphism in the 5' promoter region of the human interleukin-4 receptor alpha-chain gene is associated with decreased soluble interleukin-4 receptor protein levels. *Immunogenetics*. May-Jun 2001;53(4):264-269.
61. **Deichmann K., Bardutzky J., Forster J., et al.** Common polymorphisms in the coding part of the IL4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231:696-697.
62. **de Vires JE.** The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *Journal Allergy Clin Immunol* 1998; 102:165-169.
63. **McKenzie AN., Li X., Largaespada DA., et al.** Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. *J Immunol*. 1993; 150 (12):5436-5444.
64. **Minty A., Chalon P., Derocq JM., et al.** Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*. 1993; 362(18):248-250.
65. **Wills-Karp M., Chiaramonte M.** Interleukin-13 in asthma. *Curr Opin Pulm Med* Jan 2003; 9:21-27.
66. **Schnyder B., Lugli S., Feng N., et al.** Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 bind to a shared heterodimeric complex on endothelial cells mediating vascular cell adhesion molecule-1 induction in the absence of the common gamma chain. *Blood* 1996; 87:4286-4295.
67. **Frazer KA., Murray SS., Schork NJ., et al.** Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet*. 2009; 10:241-251.

## Références

---

68. **Dessaint JP.** Génétique de l'asthme et des allergies. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 2005; 45:200-207.
69. **Meyers DA.** Genetics of asthma and allergy: What have we learned? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010;126:439-446.
70. **Prescott SL., Macaubas C., Smallacombe T., et al.** Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999; 353(16):196-200.
71. **Laprise C., Madore AM.** Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. *Journal of Asthma and Allergy*, 2010; 107. doi:10.2147/JAA.S8970.
72. **Ying X., Zhang R., Yu S., et al.** Association of interleukin-13 SNP rs1800925 with allergic rhinitis risk: a meta-analysis based on 1,411 cases and 3169 controls. *Gene*, 2012; 506:179-183.
73. **Liu X., Beaty TH., Deindl P., et al.** Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113(3): 489-495.
74. **Wu J., Jiang R.** Prediction of deleterious nonsynonymous single-nucleotide polymorphism for human diseases. *Scientific World Journal* 2013. doi:10.1155/2013/67851.
75. **Gourraud PA., Barnetche T., Vidan-Jeras B., et al.** Introduction to statistical analysis of population data in immunogenetics. *Transplant immunology.* 2005;14(3-4):245-53.
76. **Cochran WG.** Methodological problems in the study of human populations. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1963;107:476-89.
77. **Szumilas M.** Explaining odds ratios. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry = Journal de l'Académie canadienne de psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent.* 2010;19(3):227-9.
78. **Ober C., Yao TC.** The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunological Reviews.* 2011; 242:10-30.

## Références

---

79. **Romano A., De Santis A., Romito A., et al.** Delayed hypersensitivity to aminopenicillins is related to major histocompatibility complex genes. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998;80(5):433-437.
80. **Qiao HL., Yang J., Zhang YW.** Specific serum IgE levels and FcεRIβ genetic polymorphism in patients with penicillins allergy. *Allergy.* 2004;59:1326-1332.
81. **Qiao HL., Yang J., Zhang YW.** Relationships between specific serum IgE, cytokines and polymorphisms in the IL-4, IL-4Rα in patients with penicillin allergy. *Allergy.* 2005; 60:1053-1059.
82. **Huang CZ., Yang J., Qiao HL., et al.** Polymorphisms and haplotype analysis of IL-4Rα Q576R and I75V in patients with penicillin allergy. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; 65:895-902.
83. **Yang J., Qiao HL., Dong ZM.** Polymorphisms of IL-13 and IL-4-IL13-SNPs in patients with penicillin allergies. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61:803-809.
84. **Huang CZ., Zou D., Yang J., et al.** Polymorphisms of STAT6 and specific serum IgE level in patients with penicillin allergy. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2012;50:461-467.
85. **Qiao HL., Wen Q., Gao N., et al.** Association of IL-10 level and IL-10 promoter SNPs with specific antibodies in penicillin-allergic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2007;63:263-269.
86. **Ming L., Wen Q., Qiao HL., et al.** Interleukin-18 and IL18 -607A/C and -137G/C gene polymorphisms in patient with penicillin allergy. *J Int Med Res* 2011;39:388-398.
87. **Guglielmi L., Fontaine C., Gougat C., et al.** IL-10 promoter and IL4-Rα gene SNPs are associated with immediate β-lactam allergy in atopic women. *Allergy.* 2006;61(8):921-927.
88. **Apter AJ., Schelleman H., Walker A., et al.** Clinical and genetic risk factors of self-reported penicillin allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:152-158.

## Références

---

89. **Cornejo-Garcia JA., Gueant-Rodriguez RM., Torres MJ., et al.** Biological and genetic determinants of atopy are predictors of immediate-type allergy to betalactams, in Spain. *Allergy* 2012;67(9):1181-1185.
90. **Gueant-Rodriguez RM., Romano A., Beri-Derxheimer M., et al.** Gene gene interactions of IL13 and IL4RA variants in immediate allergic reactions to betalactam antibiotics. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16:713-719.
91. **Gueant JL., Romano A., Cornejo-Garcia JA., et al.** HLA-DRA variants predict penicillin allergy in genome wide fine-mapping genotyping. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 135:253-9.
92. **Oussalah A., Mayorga C., Blanca M., et al.** Genetic variants associated with drugs-induced immediate hypersensitivity reactions: a PRISMA compliant systematic review. *Allergy.* 2016; 71:443-62.
93. **Suguna S., Nandal DH., Kamble S., et al.** Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non-enzymatic salting out method. *Inter J Pharmacy and Pharmaceut Sci.* 2014; 6:198-199.
94. **Le Morvan V., Formento JL., Milano G., et al.** Techniques de recherche des polymorphismes génétiques. *Oncologie.* 2005;7(1):7-16.
95. **Ambroise-Thomas P., Desgeorges PT.** Diagnostic immuno-enzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifiée. 1. Modalités techniques. *Bulletin de l'OMS* 1978;56:609- 13.
96. **Gaussorgues R., Kerdranvat H.** Contribution de la biologie dans l'aide au diagnostic en allergologie. Mise au point 2010. *Revue française d'allergologie* 50 (2010) S55 S63.
97. **Sole X., Guino E., Valls J., et al.** SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006; 22(15):1928-192.
98. **Paradis H., Thirion DJ., Bergeron L.** Les allergies croisées aux antibiotiques: comment s'y retrouver ? *Pharmactuel.* 2009;42(1):22-33.

## Références

---

99. **Yang J, Qiao HL., Zhang YW., et al.** HLA-DRB genotype and specific IgE responses in patients with allergies to penicillins. *Chin Med J* 2006;119:458-466.
100. **Gueant JL., Gueant-Rodriguez RM., Cornejo-Garcia JA., et al.** Gene variants of IL13, IL4, and IL4RA are predictors of beta-lactam allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:509; author reply 509-10.
101. **Wu L.C., Scheerens H.** Targeting IgE production in mice and humans. *Curr Opin Immunol.* 2014;31:8-15.
102. **Punnonen J., Yssel H., Vries JE.** The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1997; 100:792-801.
103. **de Waal Malefyt R., Abrams JS., Zurawski SM., et al.** Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells. *Int Immunol.* 1995; 7(9):1405-1416.
104. **de Vries JE.** The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol.* 1998; 102:165-169.
105. **Choi WA., Kang MJ., Kim YJ., et al.** Gene-gene interactions between candidate gene polymorphisms are associated with total IgE levels in Korean children with asthma. *J Asthma.* 2012; 49(3):243-252.
106. **Heinzmann A., Mao XQ., Akaiwa M., et al.** Genetic variants of IL-13 signaling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(4):549-559.
107. **Zurawski SM., Vega FJr., Huyghe B., et al.** Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J.* 1993; 12: 2663-2670.
108. **Howard TD., Koppelman GH., Xu J., et al.** Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet.* 2002; 70(1): 230-236.

## Références

---

109. **Caggana M., Walker K., Reilly AA., et al.** Population-based studies reveal differences in the allelic frequencies of two functionally significant human interleukin-4 receptor polymorphisms in several ethnic groups. *Genet Med* 1999;1:267-271.
110. **Yang J., Qiao HL., Dong ZM.** Polymorphisms of IL-13 and IL-4-IL-13-SNPs in patients with penicillin allergies. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005;61(11):803-9.

## **Annexes**

---

**ANNEXES**

## Annexes

### Annexe 1 : Classification des bêta-lactamines, adaptée de Vidal.fr, consultée en juin 2016

Classification des bêta-lactamines	Principes actifs disponibles en France
Pénicilline du groupe G et V	Benzylpénicilline sodique Phénoxyéthylpénicilline Benzathine-benzylpénicilline
Pénicilline du groupe M	Cloxacilline Oxacilline
Pénicilline du groupe A	Amoxicilline Ampicilline
Carboxypénicilline	Ticarcilline Témocilline
Uréidopénicilline	Pipéracilline
Céphalosporines de 1 <sup>ère</sup> génération	Céfadroxil Céfalexine Céfazoline Céfaclor Céfradine
Céphalosporines de 2 <sup>ème</sup> génération	Céfuroxime Céfoxitine Céfamandole
Céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération	Céfotaxime Ceftriaxone Ceftazidime Céfixime Cefpodoxime Céfotiam
Céphalosporines de 4 <sup>ème</sup> génération	Céfépime Cefpirome
Autres céphalosporines et pénèmes	Ceftaroline Ceftobiprole
Carbapénèmes	Imipénème Méropénème Ertapénèm
Monobactames	Aztréonam
Inhibiteurs des bêta-lactamases	Acide clavulanique Sulbactam Tazobactam

## Annexes

### Annexe 2 : Questionnaire ENDA/EAACI, P. Demoly et al, 1999

#### ALLERGIE MEDICAMENTEUSE

**INVESTIGATEUR :**

Nom : ..... Centre : ..... Date : .....

**PATIENT :**

Nom : ..... Date de naissance : ..... Age : ..... ans Poids : ..... kg  
 Profession : ..... Origine ethnique : ..... Sexe :  M  F Taille : ..... cm

**PLAINTES ACTUELLES :** .....

**REACTION MEDICAMENTEUSE :** 1: par rapport au 1er jour 2: par rapport à dernière prise 1 2

- 1- ..... Date de la réaction: ..... Chronologie: .....
- 2- .....
- 3- .....
- 4- .....
- 5- .....
- 6- .....

**SYMPTOMES CUTANEO-MUQUEUX:**

- Angioedème → localisation : .....
- Conjonctivite
- Eczéma de contact  Cause topique  Cause hématogène
- Exanthème maculeux
- Exanthème maculopapuleux
- Erythème pigmenté fixe
- Prurit isolé
- Purpura → Taux des plaquettes: .....
- palpable  hémorragique/nécrotique
- Atteinte viscérale
- Postulose exanthématique aiguë généralisée
- Syndrome de Stevens Johnson / Lyell
- Urticaire
- Vasculite urticaire
- Autres (préciser morphologie et localisation) :

**DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL:**

.....

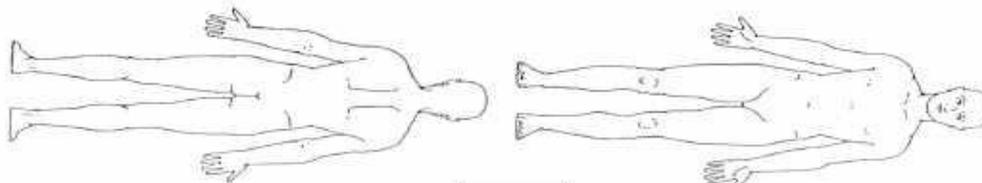
**FACTEURS FAVORISANTS:**

- Infections virales :  grippe  Autres
- Fièvre
- Photosensibilite (insolens photodermatose) ?  Non  Oui  Ne sait pas
- Stress
- Exercice
- Autres (préciser) : .....

**EVOLUTION:** Intense



**LOCALISATION DES LESIONS ET EVOLUTION** (1-6, reporter les chiffres ou couleurs différentes si plusieurs réactions)



généralisé

**SYMPTOMES GASTROINTESTINAUX:**

- Diarrhée
- Douleurs gastro-intestinales
- Nausée, vomissements
- Autres (préciser) : .....

**SYMPTOMES RESPIRATOIRES:**

- Dyspnée → DEP ou VEMS : .....
- Dysphonie
- Rhinite:
  - Rhinorrhée
  - Éternuements
  - Obstruction nasale
- Sifflements / Bronchospasme
- Toux
- Autres (préciser) : .....
- Malaise
- Sneur
- Vertige
- Autre (préciser) : .....

**SYMPTOMES ASSOCIES:**

- Arthralgie/Myalgie → Localisation/s : .....
- Douleur/Brûlure → Localisation/s : .....
- Fièvre : ..... °C
- Lymphadénopathie → Localisation/s : .....

- Oedème: → Localisation/s: .....
- Perte de conscience
- Autres (préciser) : .....

**SYMPTOMES CARDIO-VASCULAIRES:**

- Arythmie
- Collapsus
- Hypotension → Pression artérielle: ..... mmHg
- Tachycardie → Puls: ..... /min
- Autres (préciser) : .....

- .....
- .....
- .....
- .....

## Annexes

**MEDICAMENTS PRIS DEPUIS SANS PROBLEME :**

.....  
 .....

**MEDICAMENTS SUSPECTES:**

Nom générique du médicament ± additifs / Indication:	Dose quotidienne / Voie / Durée du traitement :	Intervalle prise/ réaction	Prise antérieure de ce(s) médicament(s):
1.	..... mg/j ..... j		<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Ne sait pas <input type="checkbox"/> Oui -> Symptômes: .....
2.	..... mg/j ..... j		<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Ne sait pas <input type="checkbox"/> Oui -> Symptômes: .....
3.	..... mg/j ..... j		<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Ne sait pas <input type="checkbox"/> Oui -> Symptômes: .....
4.	..... mg/j ..... j		<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Ne sait pas <input type="checkbox"/> Oui -> Symptômes: .....
5.	..... mg/j ..... j		<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Ne sait pas <input type="checkbox"/> Oui -> Symptômes: .....
6.	..... mg/j ..... j		<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Ne sait pas <input type="checkbox"/> Oui -> Symptômes: .....

Traitement de l'épisode aigu:       Pas de traitement       Consultation urgente       Hospitalisation

- Arrêt des médicaments suspects: N° # .....
- Antihistaminiques:  locaux  oraux  systémiques; -> préciser: .....
- Corticostéroïdes:  locaux  oraux  systémiques; -> préciser: .....
- Bronchodilatateurs:  locaux  systémiques; -> préciser: .....
- Traitement de choc:  adrénaline  remplissage vasculaire  autres: .....
- Réduction simple de dose de: .....
- Changement de médicaments pour: type/nom: ..... tolérance: .....
- Autre (préciser): .....

**MEDICAMENTS EN COURS:**

- Antihistaminiques: .....
- β-Bloquants: .....
- Autres médicaments: .....

**HISTOIRE PERSONNELLE :**

1) Y A T IL EU DES SYMPTOMES SIMILAIRES OBSERVES SANS PRISE DU MEDICAMENT INCRIMINE ?     Oui     Non     Ne sait pas

.....

2) ANTECEDENTS :

- Asthme
- Polyposse naso-sinusienne
- Mucoviscidose
- Diabète
- Autre/Préciser: .....
- Autoimmunité (Goujerot, Lupus, etc)
- Lymphoprolifération (LAL, LLC, Hodgkin...)
- Chirurgie du disque intervertébral
- Foie: .....
- Urticaria pigmentosa / mastocytose
- Urticaire chronique
- HIV positif
- Rein: .....

3) MALADIES ALLERGIQUES: (ex. pollinose, dermatite atopique, allergie alimentaire, allergie aux venins d'hyménoptères, allergie au latex, etc.)

.....

4) REACTIONS MEDICAMENTEUSES LORS DE PRECEDENTES CHIRURGIES (préciser le nombre, avec/sans réaction):

- Dentaires: .....  Pas de réaction
- Anesthésies loco-régionales: .....  Pas de réaction
- Anesthésies générales: .....  Pas de réaction

.....

5) REACTIONS MEDICAMENTEUSES LORS DE VACCINATIONS (oui/non):     Polio     Tetanos

- Rubéole
- Rougeole
- Hépatite B
- Diphtérie
- Autres: .....

**HISTOIRE FAMILIALE :**

Allergies / Allergies médicamenteuses: .....

## Annexes

---

### Annexe 3: Consentement de prélèvement dans un but d'étude génétique chez une personne majeure

Identité du Médecin :
--------------------------

#### Consentement de prélèvement dans un but d'étude génétique chez une personne majeure

Consentement établi en deux exemplaires dont un a été remis à l'intéressé(e).

Je soussigné(e).....

né(e) le : .....

demeurant à.....

accepte que soit effectué chez moi un prélèvement sanguin afin de faire réaliser une étude de génétique moléculaire, qui peut aider au diagnostic ou à la prévention de la maladie :

.....

pour moi-même ou des membres de ma famille, selon la proposition du Docteur

.....

Dans certains cas, la connaissance de mon origine géographique est nécessaire pour orienter les études génétiques.

J'en autorise le recueil. Je n'en autorise pas le recueil.

(Rayer la mention inutile)

## Annexes

---

Cette étude sera faite à partir de l'ADN extrait du sang prélevé, qui sera conservé dans la banque d'ADN du Laboratoire de Biotechnologie des Molécules Bio-actives et Physiopathologie Cellulaire, Université de Batna 2. Dans certains cas, cette étude peut s'étendre sur plusieurs années. À tout moment je peux demander que mon ADN me soit restitué ou détruit.

Je déclare avoir été pleinement informé(e) de la nature des études qui seront effectuées et des conséquences éventuelles des résultats qui peuvent m'être donnés.

Ces résultats seront transmis uniquement au Docteur .....  
.....  
.....

Je souhaite Je ne souhaite pas

en être informé(e) par lui.

(Rayer la mention inutile)

Je consens au recueil, à la saisie et au traitement des données contenues dans mon dossier médical par des personnes tenues au secret professionnel. Les données qui me concernent resteront strictement confidentielles. Je n'en autorise la consultation qu'aux personnes qui collaborent à l'analyse. Je pourrai à tout moment demander que mon dossier soit détruit.

Conformément à la loi Informatique et Libertés, je peux exercer mon droit d'accès aux données qui me concernent par l'intermédiaire d'un médecin de mon choix.

L'utilisation éventuelle de mon ADN à des fins de recherche médicale, pour une étude non directement liée à celle à laquelle je consens ce jour, nécessitera un nouveau consentement de ma part.

Fait à : ..... Le : .....

**Signature du  
Médecin recueillant  
le consentement**

**Signature de l'intéressé(e)**

## Annexes

---

### Annexe 4: Human IgE ELISA Kit

#### REAGENTS PROVIDED

- **96-well antibody coated microtiter strip plate** (removable wells 8x12) containing anti-human IgE antibody, blocked and dried.
- **10X Wash Buffer:** 1 bottle of 50ml
- **Human IgE standard:** 1 vial lyophilized standard
- **Anti-human IgE horseradish peroxidase antibody:** 1 vial lyophilized polyclonal antibody
- **TMB substrate solution:** 1 bottle of 10ml solution

#### STORAGE AND STABILITY

Store all kit components at 4°C upon arrival. Return any unused microplate strips to the plate pouch with desiccant. Reconstituted standards and primary may be stored at -80°C for later use. Do not freeze-thaw the standard and primary antibody more than once. Store all other unused kit components at 4°C. This kit should not be used beyond the expiration date.

#### OTHER REAGENTS AND SUPPLIES REQUIRED

- Microtiter plate shaker capable of 300 rpm uniform horizontally circular movement
- Manifold dispenser/aspirator or automated microplate washer
- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm
- Pipettes and Pipette tips
- Deionized or distilled water
- Polypropylene tubes for dilution of standard
- Paper towels or laboratory wipes
- 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or 1N HCl
- Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)
- Sodium Chloride (NaCl)

#### PRECAUTIONS

- **FOR LABORATORY RESEARCH USE ONLY. NOT FOR DIAGNOSTIC USE.**
- Do not mix any reagents or components of this kit with any reagents or components of any other kit. This kit is designed to work properly as provided.
- Always pour peroxidase substrate out of the bottle into a clean test tube. Do not pipette out of the bottle as contamination could result.
- Keep plate covered except when adding reagents, washing, or reading.
- **DO NOT** pipette reagents by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin.
- **DO NOT** smoke, drink, or eat in areas where specimens or reagents are being handled.

#### PREPARATION OF REAGENTS

- **TBS buffer:** 0.1M Tris, 0.15M NaCl, pH 7.4
- **Blocking buffer (BB):** 3% BSA (w/v) in TBS
- **1X Wash buffer:** Dilute 50ml of 10X wash buffer concentrate with 450ml of deionized water

## Annexes

### SAMPLE COLLECTION

Collect plasma using EDTA or citrate as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at 1000xg within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store at  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ . Avoid repeated freeze-thaw cycles.

### ASSAY PROCEDURE

Perform assay at room temperature. Vigorously shake plate (300rpm) at each step of the assay.

#### Preparation of Standard

Reconstitute standard by adding 1ml of blocking buffer directly to the vial and agitate gently to completely dissolve contents. This will result in a 500ng/ml standard solution.

Dilution table for preparation of human IgE standard:

IgE concentration (ng/ml)	Dilutions
500	From standard vial
200	600 $\mu\text{l}$ (BB) + 400 $\mu\text{l}$ (500ng/ml)
100	500 $\mu\text{l}$ (BB) + 500 $\mu\text{l}$ (200ng/ml)
50	500 $\mu\text{l}$ (BB) + 500 $\mu\text{l}$ (100ng/ml)
20	600 $\mu\text{l}$ (BB) + 400 $\mu\text{l}$ (50ng/ml)
10	500 $\mu\text{l}$ (BB) + 500 $\mu\text{l}$ (20ng/ml)
5	500 $\mu\text{l}$ (BB) + 500 $\mu\text{l}$ (10ng/ml)
2	600 $\mu\text{l}$ (BB) + 400 $\mu\text{l}$ (5ng/ml)
1	500 $\mu\text{l}$ (BB) + 500 $\mu\text{l}$ (2ng/ml)
0.5	500 $\mu\text{l}$ (BB) + 500 $\mu\text{l}$ (1ng/ml)
0	500 $\mu\text{l}$ (BB) Zero point to determine background

#### Peroxidase Antibody Addition

Reconstitute antibody by adding 10ml of blocking buffer directly to the vial and agitate gently to completely dissolve contents. Add 100 $\mu\text{l}$  to all wells. Shake plate at 300rpm for 30 minutes. Wash wells three times with 300 $\mu\text{l}$  wash buffer. Remove excess wash by gently tapping plate on paper towel or kimwipe.

#### Substrate Incubation

Add 100 $\mu\text{l}$  TMB substrate to all wells and shake plate for 5-10 minutes. Substrate will change from colorless to different strengths of blue. Quench reaction by adding 50 $\mu\text{l}$  of 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or HCl stop solution to all wells when samples are visually in the same range as the standards. Add stop solution to wells in the same order as substrate upon which color will change from blue to yellow. Mix thoroughly by gently shaking the plate.

#### Measurement

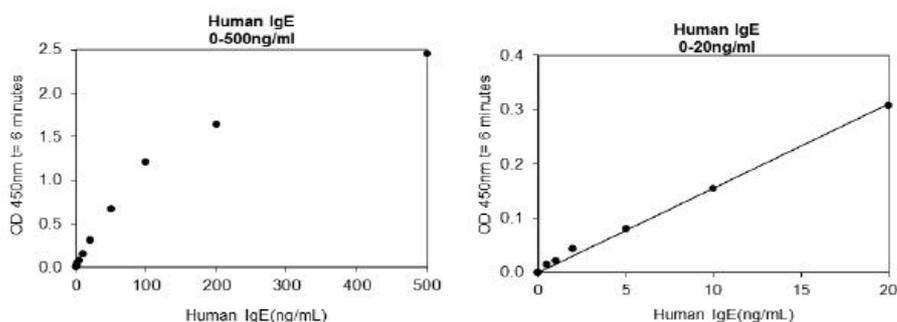
Set the absorbance at 450nm in a microtiter plate spectrophotometer. Measure the absorbance in all wells at 450nm. Subtract zero point from all standards and unknowns to determine corrected absorbance (A<sub>450</sub>).

## Annexes

### Calculation of Results

Plot A450 against the amount of IgE in the standards. Fit a straight line through the linear points of the standard curve using a linear fit procedure if unknowns appear on the linear portion of the standard curve. Alternatively, create a standard curve by analyzing the data using a software program capable of generating a four parameter logistic (4PL) curve fit. The amount of IgE in the unknowns can be determined from this curve. If samples have been diluted, the calculated concentration must be multiplied by the dilution factor.

A typical standard curve (EXAMPLE ONLY):



### Example of ELISA Plate Layout

96 Well Plate: 22 Standard wells, 74 Sample wells

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0.5	1	2	5	10	20	50	100	200	500	
B	0	0.5	1	2	5	10	20	50	100	200	500	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

### Polymorphisms in the interleukin 4 receptor and interleukin 13 genes in immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics: A case-control study

Leila Ksouri,<sup>1,2\*</sup> Yahia Mouloud,<sup>1</sup> Nancy Dumais<sup>2</sup>

#### Abstract

**Background:** Immediate hypersensitivity reactions to beta-lactams are IgE-mediated and constitute the most common adverse reactions to antibiotics mediated by a specific immunologic mechanism.

**Objective:** We investigated the association between four functional polymorphisms of IL13 (R130Q variant) and IL4RA (I50V, S478P and Q551R variants) genes and susceptibility to immediate allergic reactions to beta-lactams in the Algerian population.

**Methods:** We determined these gene variants in 199 patients and 99 healthy controls from Algeria. In a case-control study using the TaqMan method, we genotyped four single nucleotide polymorphisms (SNPs) including Arg130Gln in IL13, and Ile50Val, Ser478Pro as well as Gln551Arg in IL4RA.

**Results:** IL4RA I50V variant was more significantly connected with the risk of beta-lactam allergy ( $P = 0.0144$ ) and the total serum IgE level in patients ( $P = 0.0136$ ). A significant correlation was observed between IL13 R130Q and beta-lactam allergy ( $P = 0.0384$ ). Also, a significant gene-gene interaction was detected between the predominant allele of the IL13 R130Q polymorphism and the three polymorphisms of IL4RA ( $P < 0.0001$ ,  $P = 0.0163$ , and  $0.0301$ , respectively). Haplotype analysis of IL4RA revealed that GTA haplotype had a significant correlation in patients with beta-lactam allergy ( $P = 0.0123$ ).

**Conclusions:** Our results indicate that IL4RA (I50V) and IL13 R130Q are associated with beta-lactam allergy. The combination of IL13 and IL4RA variants markedly increases an individual's susceptibility to beta-lactam allergy in the Algerian population.

**Key words:** Allergy, Beta-lactam, IgE, Interleukin-13, Interleukin-4 receptor, Polymorphism.

#### From:

<sup>1</sup> Laboratoire de Biotechnologie des Molécules Bioactives et de la Physiopathologie Cellulaire, Université de Batna 2, Batna, Algérie.  
<sup>2</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke (QC), Canada.

#### \* Corresponding author:

Leila Ksouri  
Département de Biologie, Faculté des Sciences,  
Université de Sherbrooke, 2500 boul de l'Université, Sherbrooke (QC),  
Canada, J1K 2R1  
E-mail: leila.ksouri.lechehab@gmail.com

#### Introduction

Allergic reactions to beta-lactams are the most common cause of drug reactions mediated by specific immunological mechanisms, where immunoglobulin E (IgE) and T-cells play a role in the onset of allergic reactions.<sup>1</sup> Hypersensitivity reactions are classified as either immune-mediated reactions or non-immune mediated reactions. Immediate hypersensitivity reactions are usually induced by an IgE-mediated mechanism and occur within the first hour following the last drug administration.

These reactions typically appear as urticaria, angioedema, rhinitis, bronchospasm, or anaphylaxis.<sup>2,3</sup> However, the mechanism by which allergic reactions are induced by beta-lactam antibiotics remains unclear.<sup>4</sup>

IgE-mediated reactions also called immediate hypersensitivity reactions (Type-I hypersensitivity reactions) are classified as humoral mediated reactions. When exposed for the first time to an immunogenic drug, T-cells specifically T-helper-2 (Th2)



cells, initiate an allergic reaction by releasing interleukin-4 and interleukin-13 (IL4, IL13), which activate and induce proliferation of B-cells. Then, activated B-lymphocytes produce antigen-specific Ig-E. There is a cross-link between multivalent antigen and basophils or mast cells by Ig-E specific for that antigen which leads to the degranulation of basophils and mast cells and release of inflammatory mediators.<sup>3</sup> Interleukins secreted by Th2 cells, predominantly IL4 and IL13, are critical cytokines in the pathogenesis of allergic disorders. These interleukins share many biological and biochemical characteristics.<sup>6</sup> Both IL4 and IL13 use the IL4 receptor  $\alpha$  chain (IL4RA) as a component of their receptors and transmit their signals through IL4RA.<sup>7</sup> Several studies reported in Europe, United States of America (USA), and China have also shown that immediate-type allergic reactions to beta-lactams are influenced by three genes that affect IgE production, IL13, IL4, and IL4 receptor  $\alpha$  (IL4RA).<sup>8-14</sup> In the present study, we thus aimed to evaluate the correlation between IgE-mediated reactions to beta-lactams and polymorphisms of IL13 (R130Q) and IL4RA (I50V, S478P, and Q551R variants) in the Algerian population.

## Methods

### Patients' samples

Samples were taken from Allergy Unit at the Faculty of Medicine of Batna University in Algeria. The study was performed in 199 Algerian patients with immediate-type reaction to beta-lactams (penicillin or cephalosporins) occurring within 1 hour after drug administration, with positive skin tests and/or serum-specific IgE assays. The 99 healthy controls showed negative skin test to beta-lactam and had no history of allergic, dermatologic, or respiratory diseases, or autoimmune diseases such as asthma, eczema, allergic rhinitis, and urticaria. They have no family relationship with cases. Informed consent was obtained from all subjects and the study was conducted according to the declaration of Helsinki Principles, and the ethics committee of Centre Hospitalo-Universitaire de Batna (CHUB, Algérie) approved the study.

### IgE levels measurements and TaqMan method

Five mL of blood was taken from each participant under complete aseptic conditions and divided into two portions; 1.5 mL of whole blood was collected in sterile EDTA-containing tubes for DNA extraction, and the rest was left for 30 to 60 minutes for spontaneous clotting at room temperature and then

centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. Serum samples were separated into another set of tubes and kept frozen at -20°C for determination of total IgE. Total serum IgE levels were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay ELISA (Innovative research Inc, Novi, Michigan, USA) following the manufacturer's protocol. "Non enzymatic salting out" method was used to isolate genomic DNA from peripheral blood.<sup>15</sup> All the polymorphisms were genotyped by allelic discrimination polymerase chain reaction assays (5' nuclease assay) using predesigned TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, USA). Both PCR primers and MGB TaqMan probes are shown in **Table 1**. Primers and probes annealing temperatures for all allele-discriminating assays were optimized using a standard PCR setup on a Bio-Rad CFX connect real-time PCR instrument (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The program consisted of 3 minutes of polymerase activation at 98°C, followed by 40 cycles of collective annealing and elongation steps at 52-64°C (temperature gradient) for 30 seconds, and denaturation at 98°C for 15 seconds. For the optimization of the primer concentration, a titration series of each pair was prepared from 200 to 600 nM, with 300 nM of each of the two probes added, and using a heterozygotic sample as template DNA. Optimal annealing temperature, concentrations of primers and probes were selected based on the efficiency of the real-time PCR amplification. The main advantages of the direct approach for genotyping are less hands-on time during setup, and that the PCR is performed in a closed system, hereby minimizing the risk of contamination.

Reactions were performed in a 12  $\mu$ L volume, consisting of six  $\mu$ L Bio-Rad SsoAdvanced Universal Probes Supermix, 500 nM of unlabeled PCR primers, 300 nM of TaqMan MGB probes, and 10 ng of template DNA. Thermal cycling was initiated with a denaturation step of 3 min at 98°C, followed by 40 cycles of 15 s at 98°C and 30 s at 60°C. After PCR were completed, allelic discrimination was analyzed using the Bio-Rad CFX Manager Software (Version 3.1, Bio-Rad). Genotype assignment was determined by plotting the endpoint relative fluorescent units (RFU) for one fluorophore (allele one on the x-axis) against the RFU for the other fluorophore (allele two on the y-axis) on the allelic discrimination plot. All samples were set up in triplicate. PCR reactions were performed in a dedicated PCR area with dedicated PCR pipettes and reagents. For quality control purposes, each real time-PCR included negative as well as positive controls for all the genotypes. For validation, about 10% of the

**Table 1. Primers and probes for genotyping screening by TaqMan allelic discrimination.**

SNP	NCBI rs No	Base change	Primers	Probes
IL13 Arg130Gln	rs20541	G > A	F: 5'-CTGAAATAATGATGCTTTCGA-3' R: 5'-CCAGTTTGTAAGGACCTGCTCT-3'	A allele: 5'-FAM-GAGGGACAGTTCAACTG-MGB-3' G allele: 5'-HEX-GAGGGACGGTTCAACT-MGB-3'
IL4RA Ile50Val	rs1805010	A > G	F: 5'-CTACAGGTGACCAGCCTAAC-3' R: 5'-CCCACAGGTCCAGTGTATAGT-3'	G allele: 5'-FAM-ACGTGTGTCCCTG-MGB-3' A allele: 5'-HEX-ACGTGTATCCCTG-MGB-3'
IL4RA Ser478Pro	rs1805015	T > C	F: 5'-CGCAGGCAACCCGTGCTTA-3' R: 5'-GCATCTCGGGTTTCTACTTCCTC-3'	C allele: 5'-FAM-CAGCAACCCCTGAG-MGB-3' T allele: 5'-HEX-TTCAGCAACTCCCTGAG-MGB-3'
IL4RA Gln551Arg	rs1801275	A > G	F: 5'-CTCCGCCGAATGTCCTC-3' R: 5'-GCCTTGTAACCAGCCTCTCC-3'	G allele: 5'-FAM-GGCTATCGGGAGTTT-MGB-3' A allele: 5'-HEX-TGGCTATCAGGAGTTT-MGB-3'

samples were re-genotyped. The results were reproducible with no discrepancies in genotyping.

#### Statistical analysis:

We used SNPstats software to test Hardy-Weinberg (HW) equilibrium of alleles frequencies.<sup>16</sup>

This software was also used to estimate haplotype frequencies in cases and controls. The chi-square test was used to test for significant association between beta-lactam allergies and alleles or genotypes. Odds ratio (OR), used as a measure of association strength, and the corresponding 95% confidence interval (CI) was calculated. Kruskal-Wallis test was used to assess whether the distribution of a categorical variable is the same between genotype groups. A *P*-value of less than 0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software, San Diego, CA).

#### Results

In the present case-control study, we explored the association between the IL13, IL4RA polymorphisms and beta-lactam allergy in a sample of Algerian population. The association

between the immediate allergic reaction to beta-lactams and polymorphisms of IL13 (R130Q), IL4RA (I50V, S478P and Q551R) was evaluated in 199 patient and 99 healthy controls from Algeria. There were no significant differences in the distribution of age (*P* = 0.1023) and sex (*P* = 0.5554) between the cases and controls (Table 2). Patients with immediate allergic reactions had a significantly higher concentration of total serum IgE than controls (Table 2). All genotyped distributions of control subjects were consistent with those expected from the Hardy-Weinberg equilibrium (*P* > 0.05). Besides, the minor allele frequency (MAF) of all the four SNPs was consistent with that reported in the HapMap database (Table 3). No linkage disequilibrium was found between IL13 and IL4RA polymorphisms.

Genotype distributions and allele frequencies of all analyzed polymorphisms for the patients and control group are shown in Table 2. The frequency of the predominant alleles of IL4RA I50V and IL13 R130Q was significantly higher in patients than in controls, whereas no difference was observed for the IL4RA S478P and IL4RA Q551R (Table 2). We observed a significant association between IL13 R130Q and total serum level of IgE

Table 2. Clinical characteristics and genotypes and allele frequencies of IL13 and IL4RA of patients and controls.

Characteristic	Patients, n = 199, Mean $\pm$ SD and number of cases (%; 95% confidence interval)	Controls, n = 99, Mean $\pm$ SD and number of cases (%; 95% confidence interval)	<i>P</i> -value
Age	39.48 $\pm$ 15.72	35.78 $\pm$ 11.78	0.1023
Male gender	65 (32.7, 26.5–39.4)	29 (29.3, 21.2–38.9)	0.5554
Total serum IgE	187 $\pm$ 94.55	41 $\pm$ 35.7	< 0.0001
IgE >100	152 (76.3, 70.02–81.75)	11 (11.11, 6.31–18.81)	< 0.0001
Personal history of allergy	53	None	
Urticaria	19	None	
Anaphylactic shock	15	None	
Asthma	19	None	
IL4RA I50V			
II (AA)	44 (22.1, 16.5–28.5)	32 (32.3, 23.3–42.5)	0.0144
IV (AG)	86 (43.2, 36.2–50.4)	48 (48.5, 38.3–58.7)	
VV (GG)	69 (34.7, 28.0–41.7)	19 (19.2, 11.9–28.3)	
Predominant allele I	174 (43.7, 38.9–48.6)	112 (56.6, 49.6–63.3)	0.0031
Less frequent allele V	224 (56.3, 51.3–61.0)	86 (43.4, 36.7–50.4)	
IL4RA S478P			
SS (TT)	139 (69.9, 63.1–75.8)	74 (74.7, 66.4–83.1)	0.1925
SP (TC)	54 (27.1, 21.4–33.7)	25 (25.2, 17.0–33.5)	
PP (CC)	06 (3.0, 1.4–6.4)	00 (0, 0–3.7)	0.2059
Predominant allele T	332 (83.4, 79.4–86.7)	173 (87.9, 82.6–87.8)	
Less frequent allele C	66 (16.6, 13.2–20.5)	25 (12.1, 8.30–17.4)	
IL4RA Q551R			
QQ (AA)	121 (60.8, 53.9–67.3)	61 (61.6, 51.8–70.6)	0.1378
QR (AG)	73 (36.7, 30.3–43.6)	31 (31.3, 23.0–41.0)	
RR (GG)	05 (2.5, 1.1–5.7)	07 (7.0, 3.5–13.9)	
Predominant allele Q	315 (79.1, 74.9–82.8)	153 (77.3, 70.9–82.5)	0.6000
Less frequent allele R	83 (20.9, 17.15–25.1)	45 (22.7, 17.4–29.0)	
IL13 R130Q			
RR (GG)	152 (76.4, 70.01–81.7)	87 (87.9, 79.9–92.9)	0.0384
RQ (GA)	42 (21.1, 16.0–27.3)	12 (12.1, 7.1–20.0)	
QQ (AA)	05 (2.5, 1.1–5.7)	00 (0, 0–3.7)	
Predominant allele R	346 (86.9, 83.3–89.9)	186 (93.9, 89.7–96.5)	0.0093
Less frequent allele Q	52 (13.1, 10.1–16.7)	12 (6.1, 3.5–10.3)	

**Table 3. Primary information of genotyped SNPs in the IL13 and IL4RA genes.**

SNP	NCBI rs No	Location	Base change	MAF			P for HWE <sup>b</sup>
				HapMap <sup>a</sup>	Case	Control	
IL13 Arg130Gln	rs20541	exon 4	G > A	0,130	0.13	0.07	0,991
IL4RA Ile50Val	rs1805010	exon 5	A > G	0,425	0.51	0.43	0,990
IL4RA Ser478Pro	rs1805015	exon 12	T > C	0,152	0.17	0.13	0,350
IL4RA Gln551Arg	rs1801275	exon 12	A > G	0,207	0.21	0.23	0,260

<sup>a</sup> MAF from the HapMap database

<sup>b</sup> HWE P value in the control group

in patients as well as controls ( $P = 0.0002$ ). The association of IL4RA I50V and S478P with total IgE was more significant when restricting the analysis to patients (Table 4).

Because of the biological relationship of IL4RA and IL13, an analysis was performed to determine if individuals with the risk genotypes for both genes were at higher risk of developing beta-lactam allergy. The data are summarized in Figure 1 and showed that IL13 130RR combined with any of the predominant homozygous genotypes of IL4RA was a risk factor in allergy to beta-lactams. A similar analysis was performed examining total serum IgE levels. Our results showed IL13/IL4RA variant combination:  $P = 0.0220, 0.0002, 0.0020$ , respectively and each variant  $P = 0.0002, 0.2224, 0.6978, 0.1237$ , respectively. A linkage disequilibrium (LD) analysis was performed to study

the relationships between the three SNPs of IL4RA and beta-lactam allergy. The LD showed that rs1805010 and rs1805015 had linkage disequilibrium with  $D' = 0.5195$ , rs1805015 and rs1801275 had a score of  $D' = 0.7977$ . However, rs1805010 and rs1801275 did not show linkage disequilibrium. Three haplotypes were found in the three SNPs of IL4RA gene: ATA, GTA, and GCG (Table 5). These haplotypes were observed in the case and control groups ( $P < 0.0001, P = 0.0123$ , and  $0.3099$ , respectively). The haplotype GTA is correlated with beta-lactam allergy in Algerian population. Indeed, the haplotype GTA was significantly more frequent in patients with immediate allergic reactions to beta-lactams than in control subjects ( $P = 0.0123$ ). Interestingly, the haplotype ATA was significantly more frequent in controls subjects than in patients ( $P < 0.0001$ ).

**Table 4. Serum total IgE levels in patients with beta-lactam allergy.**

Polymorphism	Total IgE (IU/ml)	P-value
	Median (25 <sup>th</sup> - 75 <sup>th</sup> )	
IL4RA I50V		0.0136
II	168.3 (81.03-253)	
IV	216.5 (82.75-259.6)	
VV	252.4 (181.6-269.1)	
IL4RA S478P		0.0492
SS	218.3 (100.5-276)	
SP	197.4 (97.78-258.5)	
PP	261.6 (260.7-264.2)	
IL4RA Q551R		0.2011
QQ	219.2 (110.7-273.1)	
QR	213.4 (90.75-261.6)	
RR	112 (63.3-180.9)	
IL13 R130Q		0.0460
RR	214.4 (92.38-261.1)	
RQ	213.7 (146.6-277.5)	
QQ	270.2 (240-301)	

**Table 5. Major haplotype frequencies of IL4RA in the case and control groups.**

Genotype	Haplotype	Frequency		P-value	OR (95% CI)
		Case	Control		
IL4RA					
rs1805010	ATA	150 (0.378%)	96 (0.486%)	< 0.0001	0.45 (0.31-0.65)
rs1805015	GTA	152 (0.383%)	54 (0.275%)	0.0123	1.61 (1.11-2.35)
rs1801275	GCG	95 (0.240%)	45 (0.230%)	0.3099	1.23 (0.82-1.83)

OR: Odds Ratio, CI: Confidence Interval



## Discussion

Several studies suggested that allergic reaction to beta-lactams are influenced by genes involved in IgE production, including IL13 and IL4 pathways.<sup>8-14,17,18</sup> Besides, recent population studies have reported an association between IL13 and IL4RA with atopy and asthma.<sup>19-21</sup> In this study, we found for the first time in the Algerian population, an association of rs1805010 polymorphism in IL4RA gene and rs20541 in IL13 with an allergic reaction to beta-lactams.

In Algerian patients with allergic reaction to beta-lactams, we observed a higher concentration of total serum IgE than non-allergic patients suggesting the involvement of a genetic mechanism related to IgE class switching. Supporting our data, a relationship was found among IL4RA I50V and IL13 R130Q polymorphisms, the risk of immediate reaction to beta-lactams, and total serum IgE level.<sup>8</sup> However, Apter *et al.* reported that the IL4RA I50V polymorphism had no relationship with penicillin allergy based on a series of 23 self-reported penicillin-allergic patients from USA.<sup>10</sup> One possible explanation for this discrepancy is the difference in the genotype frequency of IL4RA I50V between different populations. This explanation is supported by the research of Gueant *et al.* who showed that the IL4RA I50V of the AA genotype was more significantly associated with the risk of penicillin allergy than with the risk of cephalosporin allergy.<sup>17</sup> This study also demonstrated that a difference in the AA genotype frequency of IL4RA I50V existed between two European populations.<sup>17</sup>

The IL4RA gene is located on chromosome 16p11-16p12. It is a subunit that plays a key role in allergic disease by promoting the IgE production.<sup>22</sup> In our study, the I50V and S478R were correlated with IgE production in patients, whereas the Q551R was not associated with the IgE level (Table 4). However, Cornejo-Garcia *et al.* found that total IgE was affected by Q551R polymorphism as well as IL13 130RQ/QQ and IL4RA 551QQ epistatic genotype in Spanish Caucasians.<sup>12</sup> In our series, the two symmetrical combinations (IL13 130RR and IL4RA 50II, IL13 130RR and IL4RA 551QQ) are significantly correlated with total IgE level, but less than the effect of IL13 R130Q alone ( $P = 0.0002$ ), confirming the critical role of IL13 in the initiation of IgE production.<sup>23-26</sup> These gene-gene interactions were consistent with the complementary role of both molecules in IgE switching.<sup>8</sup> Another interesting finding of our study, is the combination of the predominant allele of IL13 R130Q polymorphism with any of the predominant homozygous genotypes of the three polymorphisms of IL4RA (I50V, S478P, and Q551R) was more significantly associated with the risk of beta-lactam allergy ( $P < 0.0001$ ,  $p = 0.0163$ ,  $0.0301$ , respectively) than any polymorphism considered alone ( $P = 0.0093$ ,  $0.0031$ ,  $0.2059$ ,  $0.6000$ , respectively). Also, the symmetrical combinations (IL13 130RQ/QQ and IL4RA 50II), and (IL13 130RR and IL4RA 50IV/VV) were significantly associated with the risk of beta-lactam allergy, while the other combinations were not significant (Figure 1). Table 6 shows genetic association studies that reported genetic predictors in association with beta-lactam allergy compared with our study. These studies suggested that pro-inflammatory cytokine genes such as IL4R, IL4, IL13 are involved in IgE mediated beta-lactam reactions.

Computer modelling of the rs20541 variant has shown that this substitution affects the signal strength between interleukin 13 and its receptor.<sup>27</sup> This polymorphism encodes an amino acid residue, which is located within the D helix, close to the C-terminal region of IL13.<sup>28</sup> IL13 is a ligand of the IL4RA subunit; it is thus possible that the R130Q polymorphism influences the interaction between D helix and the IL4RA subunit. The underlying molecular mechanisms of this association need to be clarified because the computer modelling of the IL13/IL4RA interaction suggests that the arginine of the 130RR variant repulses the histidine 131 of IL4RA.<sup>27</sup> The S478P and Q551R variants of IL4RA may intensify the downstream signalling, because of their position close to a STAT6-recruiting domain.<sup>28</sup> Therefore, additional genes related to the signalling pathways of IL4RA, such as IL4, STAT6, and JAK1, could also account for an additional risk of IgE mediated allergy to beta-lactams, as previously suggested in probands with asthma susceptibility.<sup>21</sup>

In the haplotype analysis of the IL4RA gene, the GTA haplotype frequency in patients with beta-lactam allergy was found to be significantly higher than the control group suggesting an interaction between the three polymorphisms regarding susceptibility to beta-lactam allergy. In other words, the results indicate that GTA haplotype could be associated with the susceptibility to beta-lactam allergy in the Algerian population. The association of G50, T478 and A551 combination with beta-lactam allergy was higher than each allele alone, suggesting that haplotype analysis can provide more information than the single SNP alone. Moreover, it is interesting to observe that the haplotype ATA seems to have a protective effect against beta-lactam allergy, although the reason is unclear. Thus further studies should be undertaken to analyse the putative relevance of haplotypes of IL4RA Ile50Val, Ser478Pro and Gln551Arg polymorphisms in the development of beta-lactam allergy.

## Conclusion

In summary, our study suggests that IL4RA I50V and IL13 R130Q polymorphisms are related to beta-lactam allergy. Our data demonstrate that IL13 is a more potent predictor of beta-lactam allergy than IL4RA. In the Algerian population, a significant association of IL13/IL4RA polymorphism combinations with beta-lactam allergy and IgE levels is observed. However, additional studies are needed to confirm these results in other populations. Also, our data suggest that the haplotype GTA from rs1805010, rs1805015, and rs1801275 of IL4RA may be related somehow to beta-lactam allergy. This relationship needs to be further studied using a larger sample.

Our results have a certain clinical implication. The identification of genetic risk factors may improve the diagnosis and understanding of the pathophysiology of beta-lactam allergy. Therefore, having a clear view of the genetic factors involved can lead us to develop better preventive methods and strategies as well as effecting better drug design and treatment strategies in the future.

### Conflicts of Interests

The authors have not declared any conflict of interests

### Acknowledgements

This study was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Funding Reference Number RGPIN-2015-06306), and by Biotechnology Laboratory of the Bioactive Molecules and the Cellular Physiopathology, University of Batna 2, Algeria.

### References

- Mahmoud KH, Alzolibani AA, Rasheed Z, Farouk Y, Saif GB, Al Robaee AA. Interleukin-4 and interferon- $\gamma$  are possible allergic markers in pediatric patients with  $\beta$ -lactam hypersensitivity. *Int J Appl Basic Med Res*. 2016;6:276-81.
- Blanca M, Cornejo-Garcia JA, Torres MJ, Mayorga C. Specificities of B cell reactions to drugs. The penicillin model. *Toxicology*. 2005;209:181-4.
- Bousquet PJ, Kvedariene V, Co-Minh HB, Martins P, Rongier M, Arnoux B, et al. Clinical presentation and time course in hypersensitivity reactions to beta-lactams. *Allergy*. 2007;62:872-6.
- Comte D, Petitpierre S, Bart PA, Spertini F. Allergie aux  $\beta$ -lactamines. *Rev Med Suisse*. 2012;8:836-42.
- DiPiro JT, Ownby DR, Schlesselman LS. Allergic and Pseudoallergic Drug Reactions. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM, editors. *Pharmacotherapy, a pathophysiologic approach*. New York: McGraw-Hill, 2002. p. 1585-96.
- Callard RE, Matthews DJ, Hibbert L. IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? *Immunol Today*. 1996;17:108-10.
- Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:677-90.
- Gueant-Rodriguez RM, Romano A, Beri-Dexheimer M, Viola M, Gaeta F, Gueant J. Gene-gene interactions of IL13 and IL4RA variants in immediate allergic reactions to betalactam antibiotics. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16:713-9.
- Guglielmi L, Fontaine C, Gougat C, Avinens O, Eliaou JF, Guglielmi P, et al. IL-10 promoter and IL-4R alpha gene SNPs are associated with immediate beta-lactam allergy in atopic women. *Allergy*. 2006;61:921-7.
- Apter AJ, Schelleman H, Walker A, Addya K, Rebbeck T. Clinical and genetic risk factors of self-reported penicillin allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:152-8.
- Gueant J, Gueant-Rodriguez RM, Aimone Gastin I, Cornejo-Garcia A, Viola M, Barbaud A, et al. Pharmacogenetic determinants of immediate and delayed reactions of drug hypersensitivity. *Curr Pharm Des*. 2008;14:2770-7.
- Cornejo-Garcia JA, Gueant-Rodriguez RM, Torres MJ, Blanca-Lopez N, Tramoy D, Romano A, et al. Biological and genetic determinants of atopy are predictors of immediate-type allergy to betalactams, in Spain. *Allergy*. 2012;67:1181-5.
- Qiao HL, Yang J, Zhang YW. Relationships between specific serum IgE, cytokines and polymorphisms in the IL-4, IL-4R alpha in patients with penicillin allergy. *Allergy*. 2005;60:1053-9.
- Huang CZ, Yang J, Qiao HL, Jia LJ. Polymorphisms and haplotype analysis of IL-4R alpha Q576R and I75V in patients with penicillin allergy. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009;65:895-902.
- Suguna S, Nandal DH, Kamble S, Bharatha A, Kunkulol R. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014;6:198-9.
- Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22:1928-9.
- Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM, Cornejo-Garcia JA, Viola M, Blanca M, Romano A. Gene variants of IL13, IL4, and IL4RA are predictors of beta-lactam allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:509; author reply 509-10.
- Li J, Liu XY, Li LJ, You C, Shi L, Zhang S, et al. Correlation analysis of gene polymorphisms and  $\beta$ -lactam allergy. *J of Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*. 2015;16:632-9.
- Narozna B, Hoffmann A, Sobkowiak P, Schoneich N, Breborowicz A, Szczepankiewicz A. Polymorphisms in the interleukin 4, interleukin 4 receptor and interleukin 13 genes and allergic phenotype: A case control study. *Adv Med Sci*. 2016;61:40-5.
- Li J, Lin LH, Wang J, Peng X, Dai HR, Xiao H, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 pathway genetics affect disease susceptibility, serum immunoglobulin E levels, and gene expression in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;113:173-9.
- Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng SL, Postma DS, Meyers DA et al. Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet*. 2002;70:230-6.
- Wu LC, Scheerens H. Targeting IgE production in mice and humans. *Curr Opin Immunol*. 2014;31:8-15.
- Punnonen J, Yssel H, Vries JE. The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100:792-801.
- de Waal Malefyt R, Abrams JS, Zurawski SM, Lecron JC, Mohan Peterson S, Sanjanwala B, et al. Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells. *Int Immunol*. 1995;7:1405-16.
- de Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102:165-9.
- Choi WA, Kang MJ, Kim YJ, Seo JH, Kim HY, Kwon JW, et al. Gene-gene interactions between candidate gene polymorphisms are associated with total IgE levels in Korean children with asthma. *J Asthma*. 2012;49:243-52.
- Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet*. 2000;9:549-59.
- Zurawski SM, Vega F Jr, Huyghe B, Zurawski G. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J*. 1993;12:2663-70.

**Abstract:**

Immediate hypersensitivity reactions to beta-lactams are IgE-mediated and constitute the most common adverse reactions to antibiotics mediated by a specific immunologic mechanism.

We investigated the association between four functional polymorphisms of IL13 (R130Q variant) and IL4RA (I50V, S478P and Q551R variants) genes and susceptibility to immediate allergic reactions to beta-lactams in the Algerian population.

We determined these gene variants in 199 patients and 99 age-paired and gender-paired control subjects from Algeria. In a case-control study using the TaqMan method, we genotyped four single nucleotide polymorphisms (SNPs) including Arg130Gln in IL13, and Ile50Val, Ser478Pro as well as Gln551Arg in IL4RA.

IL4RA I50V variant was more significantly connected with the risk of beta-lactam allergy ( $P=0.0144$ ). A significant correlation was observed between IL13 R130Q and the total serum IgE level ( $P= 0.0002$ ), and beta-lactam allergy ( $P= 0.0384$ ). Also, a significant gene-gene interaction was detected between the predominant allele of the IL13 R130Q polymorphism and the three polymorphisms of IL4RA ( $P<0.0001$ ,  $P= 0.0163$ , and  $0.0301$ , respectively). The same associations were observed with serum IgE levels ( $P= 0.0220$ ,  $0.0002$ , and  $0.0020$ , respectively). Haplotype analysis of IL4RA revealed that GTA haplotype had a significant correlation in patients with beta-lactam allergy ( $P= 0.0123$ ).

Our results indicate that IL4RA (I50V) and IL13 R130Q are associated with beta-lactam allergy. The combination of IL13 and IL4RA variants markedly increases an individual's susceptibility to beta-lactam allergy in the Algerian population.

**Keywords:** Allergy, Beta-lactam, IgE, Interleukin-13, Interleukin-4 receptor, Polymorphism.

## ملخص:

تفاعلات فرط الحساسية الفورية مع بيتا لاكتام تتم بواسطة IgE وتمثل تفاعلات الحساسية المفرطة للمضادات الحيوية الأكثر شيوعا و ذلك بواسطة آلية مناعية محددة.

فحصنا العلاقة بين أربع طفرات من نوع النيوكليوتيدات المفردة و المتواجدة على مستوى الجين IL13 (المتغير Q130R) والجين IL4RA (V50I ، P478S و R551Q) والقابلية للتفاعلات الفورية لحساسية بيتا لاكتام عند فئة من الشعب الجزائري.

حددنا هذه المتغيرات الجينية عند 199 مريضا و 99 شخص بصحة جيدة اتخذوا كشاهد. تمت دراسة هذه الطفرات باستخدام طريقة TaqMan .

نتائجنا تظهر علاقة وثيقة بين IL4RA I50V و خطر الإصابة بحساسية بيتا لاكتام ( $P=0.0144$ ). وقد لوحظ وجود ارتباط كبير بين IL13 R130Q ومستوى IgE في المصل ( $P=0.0002$ )، والإصابة بحساسية بيتا لاكتام ( $P = 0.0384$ ). بالإضافة إلى ذلك تم الكشف عن علاقة وثيقة بين النمط الجيني السائد IL13Q130R والأنماط الثلاثة المتحيلة لجين مستقبل IL4 ( $P < 0.0001$ ،  $P = 0.0163$  ، و  $0.0301$  ، على التوالي). وقد لوحظت نفس العلاقة مع مستويات IgE المصلية ( $P = 0.0220$  ،  $0.0002$  ، و  $0.0020$  ، على التوالي). وكشف تحليل النمط الفردي ل IL4 RA أن النمط الفردي GTA له علاقة كبيرة عند المرضى الذين يعانون من حساسية بيتا لاكتام ( $P = 0.0123$ ).

نتائجنا تشير إلى أن IL4RA (V50I) و IL13 (Q130R) مرتبطة بخطر الإصابة بحساسية بيتا لاكتام. الارتباط بين متغيرات IL13 و IL4RA يزيد بشكل ملحوظ من حساسية الفرد لبيتا لاكتام لدى السكان الجزائريين.

**الكلمات المفتاحية:** الحساسية ، بيتا لاكتام ، IgE ، انترلوكين 13 ، مستقبل انترلوكين 4 ، تعدد الأشكال.

## Résumé :

Les bêta-lactamines sont la principale classe d'antibiotiques la plus souvent responsable des manifestations allergiques. Le plus souvent, il s'agit d'hypersensibilité immédiate, résultat d'un mécanisme immunologique spécifique mettant en jeu une synthèse exagérée d'IgE.

Nous avons étudié l'association entre les polymorphismes des gènes de l'interleukine 13 (*Arg130Gln*) et du récepteur à l'interleukine 4 (*Ile50Val*, *Ser478Pro* et *Gln551Arg*) et la susceptibilité aux réactions allergiques immédiates aux bêta-lactamines dans une partie de la population Algérienne.

Une mise au point de l'identification de ces polymorphismes mononucléotidiques (SNP) a été réalisée par la méthode TaqMan. Cent quatre-vingt dix-neuf patients allergiques de la même région, appariés selon l'âge et le sexe aux témoins (99 sujets), ont été génotypés pour ces quatre polymorphismes.

Le variant IL4RA *Ile50Val* est associé au risque d'allergie aux bêta-lactamines ( $P=0.0144$ ). Une corrélation significative a été observée entre IL13 *Arg130Gln*, le taux sérique d'IgE totales ( $P=0.0002$ ), et l'allergie aux bêta-lactamines ( $P=0,0384$ ). En outre, une fréquence significativement élevée de ces polymorphismes et leur association deux à deux a été détectée entre l'allèle prédominant du polymorphisme de l'IL13 *Arg130Gln* et les trois polymorphismes de IL4RA ( $P<0.0001$ ,  $P=0.0163$ , et  $0.0301$ , respectivement). Les mêmes associations ont été observées avec le taux sérique d'IgE totales ( $P=0.0220$ ,  $0.0002$  et  $0.0020$ , respectivement). L'analyse des haplotypes du gène de l'IL4RA a révélé que l'haplotype GTA présentait une interaction significative chez les patients présentant une allergie aux bêta-lactamines ( $P=0.0123$ ).

En conclusion, nos résultats indiquent que l'IL4RA *Ile50Val* et IL13 *Arg130Gln* sont associés au risque d'allergie aux bêta-lactamines. De plus, la combinaison de variants d'IL13 et d'IL4RA présente plus de risque de développer une allergie aux bêta-lactamines dans la population algérienne.

**Mots-clés :** Allergie, Bêta-lactamines, IgE, interleukine-13, récepteur à l'interleukine-4, polymorphisme.