



Université de Lille

Année : 2023

Thèse de doctorat d'université
pour l'obtention du titre de docteur de l'université de Lille

**Profil phénotypique du polynucléaire éosinophile au cours des
exanthèmes maculopapuleux médicamenteux et du DRESS syndrome**

Présentée et soutenue publiquement le 19 juin 2023 à 14h

par Frédéric DEZOTEUX

JURY

Présidente du jury :

Madame le Professeur Angèle SORIA

Examineur

Monsieur le Professeur Lars E. FRENCH

Rapporteurs :

Madame le Professeur Audrey NOSBAUM

Monsieur le Professeur Jean-Emmanuel KAHN

Directeur de thèse :

Madame le Professeur Delphine STAUMONT-SALLE

Co-encadrant de thèse : Monsieur le Docteur Guillaume LEFEVRE

**Unité INSERM U1286 – INFINITE – Institute for translational research in
inflammation**

Table des matières

Abréviations.....	1
Remerciements.....	2
Financement	3
Résumé	4
Abstract.....	5
Résumé grand public	6
Liste des publications.....	7
Chapitre 1 : État des connaissances	8
<i>I. Généralités sur les toxidermies et le DRESS syndrome</i>	8
A. Nosologie	8
B. Épidémiologie.....	9
<i>II. Présentation clinico-biologique du DRESS</i>	10
A. Aspect clinique	10
B. Complications viscérales aiguës.....	14
<i>III. Physiopathologie des EMP et du DRESS.....</i>	17
A. Généralités.....	17
B. Mécanismes d'activation lymphocytaire T au cours du DRESS	18
1. La théorie de l'hapténation	19
2. Concept d'interaction pharmacologique (p-i).....	19
3. Modèle du répertoire d'auto-peptides modifiés	19
C. Interaction médicament-HLA.....	20
D. Virus et toxidermies	21
E. Virus et PNE au cours des toxidermies	23
F. PNE et toxidermies.....	24
<i>IV. Démarche diagnostique</i>	30
A. Critères diagnostiques	30
B. Biologie	33
C. Histologie cutanée	34
D. Démarche d'imputabilité	35

V. Traitement du DRESS.....	37
VI. Pronostic et complications à long terme	38
VII. Rationnel et objectif de l'étude.....	39
Chapitre 2 : Étude du profil fonctionnel cutané des PNE à travers la mise au point d'une technique de quantification de la dégranulation éosinophilique. Application au DRESS....	42
I. Introduction.....	43
II. Matériel et méthodes.....	44
A. Étapes de mise au point et validation	44
B. Groupes toxidermies.....	44
1. Groupe 1 (DRESS)	45
2. Groupes 2 et 3 (EMP sans ou avec éosinophilie)	46
C. Technique de marquage immunohistochimique.....	48
D. Technique de quantification automatisée.....	49
E. Statistiques.....	51
III. Résultats.....	51
A. Mise au point de la méthode	51
B. Cohorte de validation	52
C. Application aux toxidermies	56
1. Étude de la dégranulation cutanée des PNE	56
2. Étude de la dégranulation des PNE dans les organes	61
IV. Discussion.....	65
A. Mise au point d'une technique performante pour l'analyse de la dégranulation tissulaire des PNE .	65
B. Confirmation de l'intérêt de la méthode dans l'analyse de la dégranulation tissulaire des PNE dans les maladies éosinophiliques.....	66
C. Faible niveau d'activation des PNE cutanés au cours du DRESS.....	67
D. Présence d'un ratio de dégranulation plus élevé dans les organes par rapport à la peau.....	70
V. Conclusion	73
VI. Publication	74
Chapitre 3 : Étude du profil phénotypique circulant des PNE au cours des toxidermies	

érythémateuses et du DRESS syndrome.	75
I. Introduction	76
A. Objectifs de l'étude.....	78
1. Objectif principal	78
2. Objectifs secondaires	78
II. Matériel et méthodes	78
A. Prélèvements Sanguins	79
B. Numération des PNE.....	79
C. Cytométrie en flux des marqueurs d'activation	79
D. Analyse en clusters et t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding)	81
E. Analyse des ILC2 par CMF	82
F. Analyse de la polarisation lymphocytaire T	83
G. Analyse des cytokines intracellulaires	84
H. Analyse des marqueurs sériques	85
I. Analyse statistique.....	86
III. Résultats	87
A. Caractéristiques démographiques et cliniques	87
B. Taux des PNE	90
C. Étude de l'expression des marqueurs membranaires d'activation des PNE circulants	92
1. Comparaison des ratios d'intensité de fluorescence	92
2. Analyse supervisée et non supervisée des marqueurs d'activation.	102
3. Évolution des marqueurs d'activation dans le temps	105
D. Évaluation de l'activation des PNE circulants via l'expression de l'ECP sérique.....	107
E. Origine de l'éosinophilie.....	108
1. Analyse de la polarisation T.....	108
2. Analyse de l'expression cytokinique intracellulaire lymphocytaire T après stimulation.....	111
3. Analyse des marqueurs inflammatoires sériques	114
4. Analyse de la population d'ILC2 circulantes.....	115
IV. Discussion	118

A. Les PNE circulants présentent un niveau d'activation hétérogène au cours du DRESS	118
B. Diminution de l'expression de marqueurs membranaires impliqués dans la réponse polarisée de type Th2.....	123
C. Évolution des marqueurs d'activation dans le temps.....	130
D. Origine des PNE dans les toxidermies	131
V. Conclusion.....	137
VI. Perspectives	138
Annexes.....	139
<i>I. Annexe 1: Détails des caractéristiques des patients du groupe DRESS dans le cadre de l'analyse de l'activation cutanée des PNE.....</i>	<i>139</i>
<i>II. Annexe 2: Détails des caractéristiques des patients du groupe EMP dans le cadre de l'analyse de l'activation cutanée des PNE.....</i>	<i>140</i>
<i>III. Annexe 3: tableau de synthèse des caractéristiques des patients du groupe EMP+Eo (analyse de l'activation cutanée et circulantes des PNE).</i>	<i>141</i>
<i>IV. Annexe 4: tableau de synthèse des caractéristiques des patients atteints d'EMP dans le cadre de l'analyse de l'activation des PNE circulants.</i>	<i>142</i>
<i>V. Annexe 5: tableau de synthèse des caractéristiques des patients atteints de DRESS dans le cadre de l'analyse de l'activation des PNE circulants.</i>	<i>143</i>
<i>VI. Annexe 6: p values et IC95% concernant la matrice de corrélation des marqueurs d'activation au sein du groupe DRESS.</i>	<i>144</i>
<i>VII. Annexe 7: Article publié dans "Clinical and Experimental Allergy" (IF 5,4) : "Automatic quantification method of eosinophilic degranulation in tissues: application for the study of eosinophilic disorders"</i>	<i>145</i>
<i>VIII. Annexe 8: Article «Duodenal stenosis linked to drug reaction with eosinophilia and systemic symptom » publié dans « Dermatitis ».....</i>	<i>152</i>
Références	155

Abréviations

CCL11	C-C motif chemokine 11
CCR3	C-C Motif Chemokine Receptor 3
CD	Cluster de différenciation
CLA	Cutaneous leucocyte-associated antigen receptor
CLC	Cristaux de Charcot-Leyden
CMF	Cytométrie en flux
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CRTH2	Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells
DRESS	Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms
EBV	Epstein Barr Virus
ECP	Protéine cationique de l'éosinophile
EDN	Neurotoxine dérivée de l'éosinophile
EMP	Exanthème maculopapuleux
Eo	Éosinophilie (>0,5G/L)
EPX	Eosinophil peroxydase
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HHV	Herpes human virus
HLA	Human leukocyte antigen
IFN	Interferon
ILC2	Type 2 innate lymphoid cells
J-SCAR reaction	Japanese Research committee on severe cutaneous adverse reaction
IL-3	Interleukine-3
MBP	Major Basic Protéine
PGD2	Prostaglandin D2
P-i	interaction pharmacologique
PNE	Polynucléaire éosinophile
RegiSCAR	Registry of Severe Cutaneous Adverse Reactions to Drugs
SCAR	Réactions cutanées indésirables graves aux médicaments
SJS/TEN	Syndrome de Steven-Johnson/Nécrolyse épidermique toxique
t-SNE	t-distributed stochastic neighbor embedding
TARC	Thymus and activation regulated chemokine
TCR	T-cell receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin

Remerciements

Je remercie très chaleureusement les membres du jury, Pr Jean-Emmanuel Kahn, Pr Angèle Soria, Pr Lars E. French, Pr Audrey Nosbaum, qui me faites l'honneur d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Veuillez recevoir l'expression de mon profond respect.

Je ne pourrais être plus reconnaissant envers ceux qui m'ont fait confiance et qui m'ont encadré avec une bienveillance équivalente à leur rigueur et leur expertise scientifique. Merci Delphine. Merci Guillaume. J'espère avoir été la hauteur de vos espérances.

J'adresse un immense merci à l'ensemble de l'équipe du laboratoire U1286-INFINITE pour l'aide, les conseils, le soutien qui m'a été apporté tout le long du processus de ce projet. En particulier Arnaud, dont la rigueur, l'organisation, la gentillesse, la compétence ont été très précieuses pour mener à bien ce projet. Je remercie Émilie, Émeline, Antonino, Meryem, Jacques pour leur disponibilité, leurs conseils toujours avisés et pertinents. Merci de m'avoir accompagné tout au long du projet.

J'adresse ma reconnaissance à l'ensemble des centres investigateurs du projet DRESSEo et leurs équipes qui nous ont fait confiance et qui ont rendu possible la constitution de cette cohorte (Dr Sophie Duvert-Lehembre, Dr Sophie Maiezza, Dr Coralie Becquart, Dr Charlotte Fievet, Dr Olivier Carpentier, Pr Saskia Oro, Pr Nicolas Ortonne, Pr Angèle Soria, Dr Philippe Moguelet, Dr Annie Vermersch-Langlin, Dr Sarah Faiz, Pr Philippe Modiano).

Je remercie l'équipe du service d'anatomopathologie du CHU de Lille : Nicolas, Solène, Dr Jean Baptiste Gibier, Dr Morgane Stichelbout, Virginie Deprez, et toute l'équipe de réception pour leur sympathie et leur compétence.

Merci à tous mes collègues et amis du service de dermatologie de m'avoir soutenu pendant ces années à temps partagé avec le laboratoire. Merci de m'avoir permis de mener ce projet pendant ces 5 années. Merci Stéphanie pour le soutien pendant ce long parcours. Merci à tous les internes de dermatologie pour leur aide précieuse pour l'inclusion des patients.

J'adresse ma reconnaissance aux patients qui ont accepté de participer à cette recherche.

Je dédie ce travail à ma famille,

En premier lieu, David, son soutien et sa présence au quotidien m'ont été indispensables, merci d'être là pour moi,

Mes parents, pour leur amour,

Ma grande sœur et mes neveux de choc, Zacharie et Carla-Rose,

Et Rémus qui m'a accompagné tant de soirs à la préparation de ce manuscrit.

Financement

Travail financé et soutenu par la Société Française de Dermatologie



Et la Société de Recherche Dermatologique



Résumé

Introduction : Le syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse ou DRESS pour « Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms » est une toxidermie grave pouvant mettre en jeu le pronostic vital des patients en lien avec des atteintes d'organes graves. Aucune étude n'a porté sur la caractérisation des polynucléaires éosinophiles (PNE) alors que paradoxalement l'éosinophilie fait partie des critères diagnostiques. De même, les données sur l'origine des PNE sont éparses et contradictoires concernant la polarisation T ou l'implication des ILC2 (innate lymphoid cells type 2) dans le recrutement des PNE.

Méthodes : Nous avons réalisé une étude prospective interventionnelle multicentrique dont les objectifs étaient : premièrement, d'évaluer le profil d'activation des PNE au niveau cutané et d'autres organes à travers la mise au point d'une méthode originale et automatisée de détection du marquage immunohistochimique de la dégranulation des protéines cationiques (eosinophil peroxidase, EPX) dans les tissus. Deuxièmement, nous avons évalué le phénotype d'activation des PNE au niveau circulant (marqueurs membranaires d'activation, dosages sériques cytokiniques, chimiokines et protéines cationiques, i.e., eosinophil cationic protein, ECP), en comparaison à des groupes contrôles sains et des groupes de toxidermies contrôles à savoir l'exanthème maculopapuleux médicamenteux associé ou non à une éosinophilie ($>0,5G/L$). **Résultats** : Premièrement, nous avons démontré que si les PNE infiltraient les tissus dans des maladies éosinophiliques, le niveau de dégranulation des PNE semble ne pas être strictement associée à la densité de cet infiltrat et diffère entre les maladies mais également entre les patients atteints d'une même maladie. Au cours des toxidermies, nous montrons la présence (très faible) des PNE dans la peau. Cependant, le PNE infiltre faiblement la peau et apparaît relativement peu activé et donc potentiellement faiblement impliqué dans les lésions cutanées au cours des toxidermies y compris celles où l'éosinophilie est un élément classique du diagnostic (DRESS). Le taux de PNE circulants au cours des toxidermies n'apparaît donc pas discriminant pour confirmer l'implication du PNE dans la survenue de dommages cutanés. L'analyse fonctionnelle des PNE cutanés a montré un état d'activation plus élevé dans les organes atteints en cas de DRESS sévère en comparaison à la peau. L'éosinophilie cutanée apparaît donc comme un mauvais reflet de la sévérité d'une toxidermie et ne permet pas une bonne corrélation au diagnostic et à la sévérité du DRESS. Deuxièmement, nous avons mis en évidence une modification du phénotype des PNE au cours des toxidermies et ce, quel que soit le taux d'éosinophiles circulants. Il existait une diminution de l'expression de CCR3, CRTH2, CD125, CD63 au cours du DRESS suggérant un état de pré-activation avant migration dans les tissus. Il existait une sous-population CD69+ dans le groupe DRESS en analyse t-SNE en faveur de la présence d'une sous-population activée au niveau circulant. Le HLA-DR, le CD137 n'étaient quant à eux pas modifiés. La surexpression du CD44 dans les toxidermies contrôles pourrait être en relation avec la propension des cellules à migrer dans les tissus. Le phénotype observé au cours du DRESS n'était pas expliqué par une polarisation T de type Th2 ni à l'augmentation des marqueurs sériques d'intérêt (IL-5, IL-4, IL-3, GM-CSF, éotaxines, TARC, TSLP), ou du taux d'ILC2 circulantes qui étaient des critères non discriminants entre les groupes. **Conclusion** : Nos résultats témoignent d'une dualité fonctionnelle entre les PNE circulants et les PNE tissulaires mais également entre les PNE présents dans la peau et ceux dans les autres organes au cours du DRESS. Les mécanismes qui sous-tendent cette activation différentielle des PNE selon les compartiments (sang/peau/organes profonds) doivent être mieux compris afin de mieux cibler la prise en charge thérapeutique des patients.

Abstract

Introduction: Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) is a severe, life-threatening drug hypersensitivity associated with severe organ damage. No studies have been conducted on the characterization of eosinophils (Eos), although paradoxically eosinophilia is part of the diagnostic criteria. Similarly, data on the origin of Eos are sparse and contradictory regarding T-polarization or the involvement of ILC2 (innate lymphoid cells type 2) in Eos recruitment. **Methods:** We conducted a prospective, non-interventional, multi-centre study with the following objectives: First, to assess the phenotypic profile of Eos in the skin and other organs through the development of an original and automated method for the detection of immunohistochemical staining of eosinophil peroxidase (EPX) degranulation in tissues. Secondly, we assessed the activation phenotype of Eos in the blood (membrane markers of activation, serum cytokine, chemokine and cationic protein levels, i.e., eosinophil cationic protein, ECP), in comparison with healthy control groups and control drug hypersensitivity groups, namely drug-induced maculopapular exanthema associated or not with an eosinophilia (>0.5G/L) **Results:** Firstly, we demonstrated that while Eos infiltrate tissues in eosinophilic diseases, the level of PNE degranulation seems not to be strictly associated with the density of this infiltrate and differs between diseases but also between patients with the same disease. In drug hypersensitivity, we showed the (very low) presence of Eos in the skin. Eos infiltrates the skin and appears to be relatively unactivated and therefore potentially not involved in skin lesions during drug hypersensitivity, including those where eosinophilia is a classical criterion for the diagnosis (DRESS). The circulating Eos count during drug hypersensitivity did not therefore appear to be discriminating in confirming the involvement of Eos in the occurrence of skin damage. Functional analysis of cutaneous Eos showed a higher activation state in the affected organs in severe DRESS compared to the skin. Skin eosinophilia thus appears to be a poor reflection of the severity of drug hypersensitivity and did not correlate well with the diagnosis and severity of DRESS. Secondly, we found a change in the phenotype of Eos in all groups, regardless of Eos count. CCR3, CRTH2, CD125, CD63 were lower expressed during DRESS suggesting a primed state before migration into the tissues. We observed a CD69+ subpopulation in the DRESS group by t-SNE analysis in favour of activated subpopulation in the blood. HLA-DR and CD137 were not altered. The overexpression of CD44 in control groups may be related to the propensity of the cells to migrate into the tissues. The phenotype observed during DRESS was not directly explained by a Th2-type T polarization nor by the increase of serum markers of interest (IL-5, IL-4, IL-3, GM-CSF, eotaxins, TARC, TSLP), or of the level of circulating ILC2, which were non-discriminating criteria between groups. Further functional analysis must be performed to better correlate phenotypic features and function. **Conclusion:** Our results show a functional duality between circulating and tissue Eos but also between skin and other organs during DRESS. The mechanisms underlying this differential activation of Eos according to compartments (blood/skin/organs) need to be better understood to better target the therapeutic management of patients.

Résumé grand public

Le DRESS syndrome (pour *Drug Reaction and systemic symptoms*) est une réaction allergique grave aux médicaments dont l'origine nécessite d'être exploré pour améliorer la prise en charge des malades. Notre étude a permis de mettre en évidence que les globules blancs appelés polynucléaires éosinophiles (PNE) étaient peu impliqués dans l'apparition des lésions sur la peau mais que ces cellules sont impliquées dans les dommages faits aux organes car ils sont pré-activés dans le sang au préalable. Mieux connaître l'origine de cette activation doit permettre d'améliorer la prise en charge des malades atteints de DRESS.

DRESS syndrome (*Drug Reaction and systemic symptoms*) is a severe allergic reaction to drugs and the origin of this severe disease need to be explored to improve patient management. Our study shown that white blood cells called eosinophils are not involved in the occurrence of the skin lesions compared with other types of drug allergy, but these cells are involved in the organs damages due to their pre-activated state in the blood. A better understanding of the origin of this activation should lead to improved management of patients with DRESS.

Liste des publications

- **Dezoteux F**, Bongiovanni A, Tardivel M, Dendooven A, Gibier JB, Mortuaire G, Audry S, Gevaert MH, Van Poucke N, Anglo E, Lefèvre G, Staumont-Sallé D. « Automatic quantification method of eosinophilic degranulation in tissues: application for the study of eosinophilic disorders », **Clinical and Experimental Allergy Journal**, **IF 5,4**.

Communications affichées à des congrès internationaux

- «Assessment of eosinophils degranulation in skin in Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) » - **Congrès annuel de la SID 2019 (society for investigative dermatology)** – Chicago, USA. **F.Dezoteux**, JB.Gibier, E.Martin De Lassalle, A.Dendooven, B.Lopez, G.Bongiovanni, M.Tardivel, J.Bene, S.Gautier, MC.Copin, G.Lefevre, D.Staumont-Sallé.
- « Activation status of cutaneous and blood eosinophils in Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) » – **Congrès de l'ESDR (European society for Research in Dermatology) 2019** – Bordeaux. **F.Dezoteux**, JB.Gibier, A.Dendooven, B.Lopez, A.Bongiovanni, M.Tardivel, G.Lefèvre, and D.Staumont-Sallé.

Communications orales à des congrès internationaux

- « Activation status of cutaneous and blood eosinophils in Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) » – **Congrès de l'ESDR (European society for Research in Dermatology) 2019** – Bordeaux. **F.Dezoteux**, JB.Gibier, A.Dendooven, B.Lopez, A.Bongiovanni, M.Tardivel, G.Lefèvre, and D.Staumont-Sallé.

Chapitre 1 : État des connaissances

I. Généralités sur les toxidermies et le DRESS syndrome

A. Nosologie

Les réactions d'hypersensibilités médicamenteuses sont des événements indésirables imprévisibles et rares qui surviennent quelle que soit la posologie utilisée. Ils ne sont pas identifiés lors des études précliniques et cliniques qui précèdent la mise sur le marché, et ne le sont qu'une fois une large population exposée. Les toxidermies constituent une potentielle cause de morbi-mortalité dans toutes les spécialités confondues, à la fois en activité ambulatoire et hospitalière (1, 2).

Les réactions d'hypersensibilité aux médicaments représentent un enjeu de sécurité pour les systèmes de santé en raison de leur incidence, qui a augmenté de manière significative au cours des dernières années (3). La littérature est hétérogène quant au spectre nosologique utilisé, en effet les réactions d'hypersensibilité retardées regroupent un spectre large et diversifié de réaction en terme de physiopathologie, de présentation clinique et de sévérité (4) et sont regroupées sous des termes différents ce qui rend leur étude difficile : SCARs pour « severe cutaneous adverse reaction », « drug induced exanthema », « maculopapular exanthema », « drug eruption », « drug allergy ».

Au sein de ce spectre clinique, les toxidermies les plus fréquentes sont représentées par les exanthèmes maculopapuleux (EMP) (5). Ils ne sont pas associés à des défaillances d'organe et évoluent favorablement dans la quasi-totalité des cas. Ils posent le problème du diagnostic différentiel car leur présentation peut être très proche d'une infection virale (6, 7).

Le syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse ou DRESS pour « Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms » est une toxidermie faisant partie des réactions graves pouvant mettre en jeu le pronostic vital des patients mais heureusement rares parmi les 2% de toxidermies graves (8). L'atteinte viscérale qui lui est associée conditionne le pronostic dont le taux de mortalité est proche de 10% (9). Le DRESS est un des nombreux termes utilisés pour décrire une réaction idiosyncrasique grave à un médicament. La particularité du DRESS est la longue période de latence après l'exposition au médicament incriminé pouvant aller jusqu'à 8 semaines même si des délais plus courts ont été décrits notamment dans le cadre des produits de contrastes iodés (10, 11). D'abord décrit dans le cadre des toxidermies secondaires aux anticonvulsivants dans les années 1950, la

nomenclature n'a cessé d'évoluer (12): « syndrome d'hypersensibilité », en anglais : Hypersensitivity Syndrome, « syndrome d'hypersensibilité aux anticonvulsivants », en anglais : Anticonvulsant Hypersensitivity Syndrome, « syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse », en anglais : Drug-Induced Hypersensitivity Syndrome (DIHS), « syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse retardée multiviscérale », en anglais : Drug-Induced Delayed Multiorgan Hypersensitivity Syndrome et « pseudolymphome médicamenteux ».

B. Épidémiologie

Les effets indésirables des médicaments représentent une charge importante pour les systèmes de santé en raison de leur incidence (10 à 20 % des patients hospitalisés et jusqu'à 25 % des patients en consultation externe) et de leur gravité. Les effets indésirables des médicaments comprennent les réactions d'hypersensibilité aux médicaments, qui surviennent dans 15 % des cas et qui constituent la troisième cause d'allergie après la rhinite et l'asthme (13).

Les chiffres relatifs aux réactions d'hypersensibilité aux médicaments sont sans doute surestimés dans la population générale, puisque <40% des cas initialement étiquetés comme allergiques peuvent être confirmés comme tels lorsqu'ils sont évalués dans une unité d'allergologie notamment concernant les bêtalactamines (14).

Deux essais prospectifs sur l'épidémiologie des réactions d'hypersensibilité aux médicaments en milieu hospitalier ont été réalisées. La première étude (française) a permis de calculer une prévalence des toxidermies de 3,6 pour 1 000 patients hospitalisés (15). La deuxième étude était une étude de cohorte prospective menée au Mexique sur une période de 10 mois. Cette étude a démontré une prévalence de 7 pour 1000 patients hospitalisés (16). En Corée du Sud, un système de déclaration électronique obligatoire des effets indésirables liés aux médicaments a permis d'identifier 2652 cas sur un total de 55 432 hospitalisations sur une période de 7 mois. L'étude comprenait des réactions cutanées mais aussi non cutanées. Un allergologue a classé 532 réactions comme étant des "réactions significatives d'hypersensibilité aux médicaments" 100 étaient de nouveaux événements, et 70 % d'entre eux avaient une manifestation cutanée. L'incidence globale a donc été estimée à 1,8 pour 1 000 hospitalisations (17).

Les données sur l'incidence du syndrome DRESS sont rares. L'incidence annuelle rapportée dans la population générale de 0,9/100 000 (18) à 10 cas par million (19). La prévalence varie de 2,18 (20) à 9,63 cas pour 100 000 patients hospitalisés (21). Un taux

d'incidence de 3,89 pour 10 000 patients a été observé en Espagne (22). L'incidence va dépendre notamment du médicament responsable. Le DRESS peut se produire chez les enfants (23), bien que la plupart des cas se produisent chez les adultes chez l'adulte, sans prédilection pour le sexe (24). Les comorbidités associées les plus fréquentes sont l'infection à VIH (28,8 %), l'atopie (21,9 %) et l'épilepsie (20 %) (21, 25, 26).

II. Présentation clinico-biologique du DRESS

A. Aspect clinique

Le diagnostic de DRESS à la phase aiguë peut être difficile car il peut, surtout dans les premiers stades, présenter de nombreuses caractéristiques communes avec les infections notamment virales, les maladies lymphoprolifératives et auto-immunes (27). Le DRESS peut être confondu avec d'autres réactions cutanées indésirables graves aux médicaments (SCAR) en raison de sa longue période de latence. Cependant, une atteinte importante des organes, des caractéristiques hématologiques particulières et une éruption cutanée généralement sans atteinte des muqueuses le différencient du syndrome de Stevens-Johnson/Nécrolyse épidermique toxique (SJS/TEN) et de la pustulose exanthématique aiguë généralisée (PEAG) (28).

Le DRESS se manifeste généralement deux semaines à deux mois après l'initiation d'un médicament. Un délai plus court peut parfois être observé en cas de réintroduction d'un traitement pour lequel le patient est sensibilisé ou selon certaines molécules notamment les produits de contraste iodés (29). Le DRESS se caractérise par de la fièvre, une éruption cutanée généralisée, des adénomégalies, des anomalies hématologiques et l'atteinte d'un ou plusieurs organes internes (10). Cependant, même après la disparition des symptômes et des signes initiaux du DRESS, une réactivation virale aux virus du groupe herpès (EBV pour Epstein-Barr virus, HHV-6, -7 pour herpes human virus et CMV pour cytomegalovirus) peut se produire, et la rechute des symptômes peut survenir 2 à 4 semaines après la phase aiguë ou lors du sevrage des traitements. Une rechute du DRESS ou des complications auto-immunes peuvent également survenir après la disparition de tous les symptômes aigus, après le sevrage des traitements, et peuvent se produire jusqu'à plusieurs années après la présentation initiale. Dans la série de Picard et al., 25% ont présenté au moins une récurrence du DRESS en dehors de toute stimulation antigénique par le médicament initialement imputable. Sept patients ont eu une seule récurrence, alors que huit patients ont eu plusieurs récurrences. Les récurrences étaient le plus souvent incomplètes, correspondant

à une éruption cutanée isolée dans 13 cas et associées à une éosinophilie dans sept cas. Une atteinte des organes internes a été observée dans deux cas (30). A ce jour l'entité de « DRESS chronique » reste débattue et sa prise en charge peu codifiée (31). Une étude récente a notamment proposé un score pouvant prédire un risque de récurrence des symptômes à distance mais n'est pas d'usage courant (32).

Le temps qui s'écoule entre l'apparition du DRESS, l'arrêt du médicament suspecté d'être à l'origine de la maladie et la disparition des symptômes est très variable et dépend de facteurs mal connus liés à l'hôte, au médicament responsable (par exemple, la demi-vie) et au traitement en cours chez les patients. L'œdème facial, bien que ne faisant pas partie des critères diagnostiques du DRESS, est présent chez plus de 75 % des patients et est corrélé à la sévérité de la maladie (33). Des atteintes muqueuses sont possibles et parfois confondues avec une atteinte de nécrolyse épidermique toxique. Les anomalies hématologiques sont très fréquemment observées, la lymphocytose atypique (hyperlymphocytose basophile, syndrome mononucléosique) étant potentiellement la plus fréquente et la plus précoce. L'éosinophilie, définie par un taux d'éosinophiles (PNE) supérieur à 500 éléments/mm³, est présente dans environ 52% des cas rapportés mais ce chiffre est variable selon les séries (34), et peut précéder le rash ou de découverte tardive et persistante (35). Des adénopathies sont observées chez plus de 50 % des patients, et l'hépatite représente l'atteinte la plus fréquente des organes internes, la néphrite (souvent interstitielle) venant en deuxième position.

Les manifestations cutanées ne sont pas détaillées dans les critères de diagnostic du DRESS. En effet, la nature de l'éruption est souvent polymorphe et peut inclure un exanthème maculopapuleux, des manifestations lichénoïdes, urticariennes, purpuriques, eczémateuses et pustuleuses (36). Il arrive de façon rare que l'éruption ne soit pas constatée et que seules l'éosinophilie et les atteintes d'organes permettent le diagnostic (37). L'érythème généralisé peut évoluer en érythrodermie, qui peut persister même si le médicament responsable est arrêté. Des lésions en cocardes ou en cibles de type érythème polymorphe peuvent être présentes dans les cas graves de DRESS, et l'atteinte cutanée s'accompagne d'un œdème et d'une inflammation cutanés importants. Classiquement, l'éruption touche initialement le visage, puis le haut du tronc et les extrémités prenant un aspect infiltré et induré, notamment au visage où il est volontiers associé à un œdème centro-facial prédominant en région périorbitaire (figure 1). Le purpura étant l'une des manifestations cutanées possible, et une étude récente a confirmé une association entre le purpura et la gravité de la maladie chez les patients atteints de DRESS (38). L'atteinte œdémateuse du lobe de l'oreille a été rapporté comme étant un signe assez spécifique de DRESS dans le contexte d'une éruption médicamenteuse et doit être recherché (39). Dans

une étude récente rétrospective multicentrique coréenne, Lee et al., ont recensé 182 cas potentiels de DRESS. Une éruption cutanée étendue à plus de 50 % de la surface corporelle a été observée chez 122 patients (97,6 %) et un œdème facial typique a été constaté chez 67 patients (53,6 %). L'atteinte maculopapuleuse était la morphologie la plus courante de l'éruption (84,8 %). Plus précisément, les formes dites exfoliatives (47,2 %), urticariennes (45,6 %) et purpuriques (31,2 %) étaient fréquentes. Une atteinte des muqueuses a été observée chez 41 patients (32,8 %). Les patients sous antiépileptiques (carbamazépine et oxcarbazépine) ont présenté plus d'œdèmes et d'œdèmes faciaux typiques que ceux sous allopurinol. Le score RegiSCAR (Registry of Severe Cutaneous Adverse Reactions) était plus élevé chez les patients présentant un purpura (40). Dans une étude de Toniato et al., la gravité du DRESS était significativement associée au nombre de médicaments pris quotidiennement ($p=0,0067$) et à un âge d'au moins 68 ans ($p=0,013$). De plus, 75% des cas sévères avaient au moins trois comorbidités dans leurs antécédents, et la plupart des cas sévères étaient des femmes (41).

Les caractéristiques hématologiques et atteintes d'organes associées, ainsi que l'absence d'atteinte des surfaces muqueuses, différencient le DRESS du SJS/TEN selon certains auteurs mais une atteinte muqueuse n'est pas rare (42). Cette atteinte muqueuse se présente sous la forme d'une chéilite, d'érosions, d'une pharyngite touchant environ 30% des patients dans la série de Ang et al. (43). Par ailleurs, les manifestations peuvent aussi dépendre de la molécule incriminée constituant une pathologie hétérogène (44, 45). Dans la série tunisienne de Chaabane et al., le DRESS était principalement induit par les agents anticonvulsivants (27%), suivis par l'allopurinol (26,3%) et les antibiotiques (24%) : Pour les agents anticonvulsivants, l'occurrence des adénopathies était plus élevée, l'atteinte rénale était rare et légère, et les tests cutanés positifs étaient plus fréquents. Le groupe allopurinol était associé à l'âge plus avancé du patient et à une incidence plus faible des adénopathies et d'atteinte rénale. Pour les antibiotiques, le taux de PNE était plus faible, le temps de guérison était plus court et le score RegiSCAR était faible. L'analyse multivariée a montré un lien entre l'allopurinol et l'insuffisance rénale grave, les antibiotiques avec une courte période de latence et un faible score RegiSCAR, et les anticonvulsivants avec une forte proportion de tests cutanés positifs (46). De même, en fonction des molécules impliquées, des différences ont pu être observées comme dans la série rétrospective de Da-Woon Sim et al., où les périodes de latence différaient selon les médicaments responsables : la vancomycine et la céphalosporine ayant une période de latence plus courte. La sévérité de la cytolyse différait entre les sept groupes de médicaments à l'étude ($p<0,05$) : étant plus importante dans le groupe des antituberculeux par rapport au groupe vancomycine ($p<0,05$). L'atteinte rénale différait entre les sept groupes ($p<0,0001$). L'atteinte rénale était

plus fréquente dans les groupes allopurinol, vancomycine et AINS (60%-79%) que dans les quatre autres groupes (9%-32%). En termes de gravité clinique, la durée de l'admission différait entre les sept groupes ($p < 0,01$), étant plus longue dans le groupe vancomycine par rapport au groupe AINS ($p < 0,05$). La durée du traitement différait entre les sept groupes ($p < 0,05$), étant plus longue dans le groupe antituberculeux que dans le groupe carbamazépine ($p < 0,05$). Il n'y avait pas de différence dans l'utilisation des stéroïdes systémiques, de l'immunoglobuline intraveineuse, de la cyclosporine et de l'unité de soins intensifs entre les sept groupes. Le taux de mortalité était le plus élevé dans le groupe vancomycine (11 %), mais il n'était pas différent dans les sept groupes (45).

Concernant les données pédiatriques, il semble que les cas de DRESS adultes et pédiatriques ne sont pas significativement différents concernant les manifestations cliniques. Une série récente de 49 cas pédiatriques en France a également souligné que l'apparition d'un DRESS dans la population pédiatrique (lié aux antibiotiques bêta-lactamines en particulier) peut survenir moins de deux semaines après le début du traitement (médiane de 13 jours pour tous les antibiotiques) (23). Les médicaments antiépileptiques, y compris les anticonvulsivants aromatiques carbamazépine, phénytoïne et phénobarbital sont la principale cause chez les enfants, suivis par les agents anti-infectieux tels que les bêta-lactamines, le triméthoprime-sulfaméthoxazole et la vancomycine.

En synthèse, l'aspect bien qu'évocateur lorsque tous les signes sont présents n'est malheureusement pas uniforme et le clinicien est parfois mis en défaut pour le diagnostic. Il est donc nécessaire d'identifier des marqueurs pouvant aider à identifier précocement ce syndrome dont le diagnostic précoce conditionne le pronostic.



Figure 1: Présentation clinique du DRESS avec atteinte diffuse infiltrée et important œdème du visage et des paupières. (Service de Dermatologie, CHU Lille).

B. Complications viscérales aiguës

Dans la phase aiguë du DRESS, les atteintes systémiques peuvent inclure une hépatite, une pneumonie interstitielle, une néphrite interstitielle et une myocardite. Des manifestations hématologiques sont fréquemment observées, comme des adénopathies, une éosinophilie sanguine et tissulaire, une lymphopénie périphérique et une lymphocytose atypique (10). La particularité du DRESS réside notamment dans les atteintes viscérales parfois multiples pouvant aboutir au décès du patient. Plus rarement, des atteintes neurologiques, gastro-intestinales et endocrinologiques sont aussi possibles et peuvent survenir à distance de l'éruption (47). Certaines molécules prédisposeraient davantage à certaines atteintes viscérales (36) (tableau 1).

Molécule	Atteinte d'organe plus fréquente
Allopurinol	Rein
Ampicilline	Cœur
Carbamazépine	Rein
Dapsone	Foie et rein
Minocycline	Foie, poumon et cœur
Phénytoïne	Foie

Tableau 1: Molécules associées à des atteintes d'organes spécifiques (d'après Husain et al. 2013).

L'atteinte hématologique se traduit souvent par la présence d'adénopathies classiquement présentes dans 75% des cas et souvent supra-centimétriques pouvant mimer une pathologie lymphomateuse, d'autant que cette atteinte est volontiers généralisée comme rapporté par l'équipe de Chen et al., qui ont analysé des biopsies de ganglions lymphatiques chez des patients atteints de DRESS (trois biopsies présentaient un tableau histologique pseudo angio-immunoblastique, deux présentaient une lymphadénite nécrosante voire associée à une vascularite dans un cas) (34).

Le foie est l'organe interne le plus fréquemment touché à divers degrés. La phénytoïne, la minocycline et la dapsone sont régulièrement impliquées (48). Une hépatomégalie peut être observée accompagnée ou non d'une hépatite caractérisée par une ascension marquée des transaminases et notamment les ALAT (Alanine aminotransférase) rencontrée dans 70% à 95% des cas (49, 50). L'atteinte peut persister malgré l'arrêt de la molécule incriminée pouvant prendre plusieurs mois pour se résoudre. Dans des formes fulminantes, l'évolution peut se faire rapidement vers une insuffisance hépatocellulaire terminale et une nécrose hépatique massive à l'origine du décès du patient. Il s'agit de la première cause de mortalité dans le cadre du DRESS.

L'atteinte rénale n'est pas rare, elle survient dans 11 à 38% des patients (50, 51) parfois d'apparition retardée (52). L'allopurinol est la molécule la plus fréquemment associée à l'atteinte rénale suivie par la carbamazépine et la dapsone (48). Cette atteinte est silencieuse et se manifeste précocement par l'apparition d'une hématurie et d'une protéinurie puis par une altération de la fonction rénale avec ascension de la créatinine plasmatique. Une néphrite interstitielle peut aboutir à une défaillance rénale terminale (43, 53).

Bien qu'elle soit moins fréquente dans le syndrome DRESS, l'atteinte pulmonaire est associée à une évolution clinique plus sévère. Les symptômes pulmonaires peuvent précéder le développement des autres symptômes et signes les plus courants, ou se développer plus tard dans l'évolution de la maladie. L'atteinte pulmonaire dans le DRESS se présente sous la forme de nombreuses manifestations allant d'une toux ou d'une

dyspnée légère avec des images interstitielles non spécifiques sur l'imagerie thoracique au syndrome de détresse respiratoire aiguë avec une insuffisance respiratoire hypoxique potentiellement mortelle. L'atteinte pulmonaire du DRESS peut survenir, le plus souvent associée à la prise de minocycline (48, 54). Une éosinophilie tissulaire et dans le LBA ne semble pas systématique (55).

L'atteinte cardiaque est une atteinte rare mais sévère du DRESS. L'allopurinol et la minocycline sont les molécules les plus fréquemment impliquées. Radovanovic et al, ont identifié 42 cas à partir de 36 séries de cas de la littérature. Les femmes étaient deux fois plus touchées que les hommes (56). Deux tiers des patients présentaient des manifestations cardiaques dans la phase initiale de la maladie, tandis que dans un tiers des cas, les manifestations cardiaques se sont développées plus tard (délai moyen de 70 ± 63 jours). Chez 17 % des patients, le cœur était le seul organe interne touché, tandis que la majorité (83 %) avait au moins un autre organe touché, le plus souvent le foie et les reins. La dyspnée (55 %), le choc cardiogénique (43 %), la douleur thoracique (38 %) et la tachycardie (33 %) étaient les signes et symptômes cardiaques les plus fréquemment rapportés. Les patients présentaient fréquemment un ECG anormal (71,4 %), et une diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche était le résultat échographique le plus fréquent mais pas systématique (45 %). Une biopsie endomyocardique ou un examen histologique à l'autopsie ont été réalisés chez 52,4 % des patients. La présentation histologique était une myocardite fulminante à PNE avec nécrose aiguë chez 70 % des patients biopsiés. Une courte latence entre l'exposition au médicament et l'apparition des premiers symptômes du DRESS (<15 jours) et un âge plus avancé (plus de 65 ans) étaient associés au décès. Ces résultats soulignent l'importance potentielle d'un dépistage précoce de cette atteinte et l'implication des PNE dans la pathogénèse des atteintes d'organes (57-59).

L'atteinte neurologique est exceptionnelle mais grave et se présente sous la forme d'un tableau d'encéphalite ou vasculite cérébrale se développant 2 à 4 semaines après les premiers symptômes du DRESS (60-62).

L'appareil digestif peut également être la cible de la réponse cytotoxique incontrôlée et va se manifester par une colite ou iléite (perforative) souvent associée au CMV ou une pancréatite (63, 64). Nous avons décrit récemment le cas d'un patient ayant présenté un tableau de sténose œsophagienne dans un contexte de DRESS sévère aux antibiotiques (65).

III. Physiopathologie des EMP et du DRESS

A. Généralités

Les EMP et le DRESS sont des réactions immunes retardées médiées principalement par une infiltration de lymphocytes T (66) notamment impliqués dans les atteintes d'organe comme rapporté par Spanou et al., au niveau rénal (67). Les arguments en faveur sont nombreux dans la littérature. Les lymphocytes T impliqués dans la physiopathologie des EMP infiltrent la peau et produisent des facteurs cytotoxiques (perforine, granzyme B) pouvant induire la nécrose des kératinocytes via notamment la production d'interféron (IFN γ) ou de TNF α (68). Ces lymphocytes T, principalement CD4+, producteurs d'IFN γ , TNF α , sont spécifiques du médicament comme l'ont montré Yawalkar et al., sur des biopsies de patch test positifs aux antibiotiques (69). D'autres auteurs, ont observé une réaction polyclonale T, composée de lymphocytes CD4+ et CD8+ exprimant un récepteur alpha-beta avec restriction préférentielle à certains TCR et exprimant notamment le récepteur CLA (cutaneous lymphocyte antigen) connu pour son implication dans la domiciliation cutanée (70). Stur et al. ont également montré que les mécanismes de cytotoxicité cellulaires induite par les lymphocytes impliqués dans les toxidermies passaient par la voie Fas/FasL également impliquée dans la pathogénie du DRESS (71). Des auteurs ont montré que l'infiltrat lymphocytaire dermique serait plutôt essentiellement constitué de lymphocytes T CD8+ (72). Ces cellules T CD4+ et CD8+ expriment la perforine et le granzyme B et sont partiellement localisées à la jonction dermoépidermique et dans l'épiderme (73). Le derme des patients atteints de DRESS est le siège d'un infiltrat fait de lymphocytes CD4+ et CD8+, de cellules dendritiques plasmacytoïdes et de monocytes (74). Des lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont également identifiés dans les biopsies des organes internes des patients atteints de DRESS (75-77). Les lymphocytes T CD8+ circulants expriment en effet des marqueurs de domiciliation cutanés comme le CLA ou le C-C chemokine receptor type 4 (CCR4) (78). Le FasL soluble et le granzyme B sont significativement surexprimés dans le sérum des patients atteints de DRESS par rapport aux témoins sains sans en connaître l'origine cellulaire. En outre, les taux de FasL soluble, de perforine et de granzyme B sont significativement corrélés avec le taux sérique d'enzymes hépatiques chez les patients atteints de DRESS. L'examen immunohistochimique confirme une surexpression des protéines cytotoxiques dans les lésions cutanées du DRESS (79). Par ailleurs, la granulysine, une protéine cytotoxique produite notamment par les lymphocytes T, est augmentée au cours du DRESS à l'instar de ce qui peut être observé dans la nécrolyse épidermique toxique (80). Les proportions de cellules T CD4+ circulantes productrices

d'interleukine (IL)-4 et d'IL-13, mais pas de cellules T CD8+, semblent significativement plus élevées chez les patients atteints de DRESS pendant la phase active de la maladie par rapport à des sujets sains, puis diminuent pendant la phase de récupération. Une forte corrélation entre la proportion de cellules T CD4+ productrices d'IL-13 et les niveaux sériques de TARC (thymus and activation-regulated chemokine) a pu être observée. La proportion de cellules T CD4+ productrices d'IL-13 semble plus élevée au sein des cellules T exprimant le CLA (81). Le TARC, est produit par les cellules dendritiques du derme participe au recrutement des lymphocytes T Th2 CCR4+ vers la peau (82, 83). L'IL-5 est produite par les cellules Th2 et les cellules lymphoïdes innées 2 (ILC2), seraient à l'origine de la différenciation, l'activation et la migration des PNE vers le sang et les tissus (84).

Les arguments d'une pathologie principalement T médiée sont nombreux et Gell et Coombs ont proposé une classification en 4 sous-groupes basés sur les populations cellulaires impliquées et les profils cytokiniques qui peuvent varier d'un patient à l'autre et dont les mécanismes précis qui sous-tendent le phénotype d'un patient par rapport à un autre sont complexes (68) :

- Type IVa : médiée en majorité par des lymphocytes T CD4+ Th1
- Type IVb : médiée en majorité par des lymphocytes T CD4+ Th2 et les cytokines IL-4, IL-5, IL-13 et les éotaxines impliquant notamment la toxicité médiée par les PNE
- Type IVc : médiée par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques impliqués dans les nécrolyses épidermiques toxiques
- Type IVd : médiée par les lymphocytes T et les polynucléaires neutrophiles ainsi que la « chemokine ligand 8 » et le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) impliqués dans la pustulose aiguë exanthématique généralisée.

Cette classification est sans doute réductrice des mécanismes impliqués mais a le mérite de proposer différents mécanismes entre fonction des acteurs cellulaires et cytokines impliqués.

B. Mécanismes d'activation lymphocytaire T au cours du DRESS

Bien que trois modèles non mutuellement exclusifs d'activation des lymphocytes T par les médicaments aient été proposés, on ne sait pas si ceux-ci sont pertinents dans l'ensemble des situations de DRESS ou s'ils varient pour les médicaments qui sont associés aux DRESS en fonction de leurs propriétés pharmacologiques spécifiques des traitements imputables ou de leurs métabolites.

1. La théorie de l'hapténation

Un haptène est une petite molécule dépourvue de caractère immunogène pouvant acquérir une immunogénicité en cas de couplage avec une protéine qui lui est complémentaire. Certaines molécules qualifiées de pro-haptène sont capables sous réserve d'une métabolisation enzymatique d'acquérir la forme d'haptène et induire une allergie médicamenteuse. Il a été démontré qu'un polymorphisme des gènes codant pour les enzymes de métabolisation pouvait être à l'origine de la formation d'haptènes (85).

Le médicament constitue un antigène ou allergène en se liant de manière covalente à une auto-protéine.

Dans ce modèle, l'antigène médicamenteux ou dérivé du médicament forme des liaisons covalentes avec des auto-protéines/peptides, pris en charge par les cellules présentatrices d'antigènes pour être présenté par le ou les allèles à risque HLA (human leukocyte antigen) à la surface cellulaire pour être reconnu par les récepteurs des cellules T (TCR) correspondants.

2. Concept d'interaction pharmacologique (p-i)

Le modèle p-i pour « pharmacological interaction of drug with immune receptor » propose que l'antigène médicamenteux forme des interactions non covalentes, labiles et indépendantes de la liaison avec le TCR ou le HLA, induisant directement l'activation des cellules T. La majorité des petites molécules peuvent être reconnues et interagir directement avec le récepteur du lymphocyte T via une liaison directe au complexe HLA (86).

3. Modèle du répertoire d'auto-peptides modifiés

Le modèle du répertoire d'auto-peptides modifiés propose que l'antigène médicamenteux se lie soit au HLA (HLA modifié), soit au TCR (TCR modifié), en changeant la conformation de la liaison de sorte qu'un répertoire différent d'auto-peptides endogènes puisse se lier et être reconnu comme immunogènes (87).

Dans les modèles de peptide modifié et d'interaction pharmacologique, le médicament se lie de manière non covalente aux récepteurs immunitaires. Cette interaction dépend de la dose, ce qui correspond à ce qui est observé cliniquement pour des médicaments tels que l'allopurinol, qui est plus susceptible de provoquer un DRESS ou, en fait, toute réaction cutanée sévère, au cours d'une insuffisance rénale chronique entraînant l'accumulation de son métabolite oxypurinol actif à longue durée d'action (88).

C. Interaction médicament-HLA

Les données de la littérature s'accordent sur l'importance de la prédisposition génétique au cours du DRESS. De nombreuses études rapportent un risque augmenté de DRESS selon la présence de variant HLA particuliers (87, 89) (tableau 2). Ainsi, il a été clairement montré que la présence d'un variant HLA-B*57:01 était associée au risque de DRESS sous abacavir pour le traitement du syndrome d'immunodéficience acquise (90).

Il est important de noter que les mécanismes ne s'excluent pas mutuellement, les modèles d'haptène et d'interaction pharmacologique directe étant tous deux proposés pour les DRESS induits par le sulfaméthoxazole. Enfin, et bien que récemment impliquée dans le DRESS induit par la dapsonne avec restriction HLA-B*13:01,24,25 l'hypothèse d'un répertoire peptidique altéré est illustrée par l'histoire de l'abacavir et l'apparition du syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse avec restriction HLA-B*57:01 (91). Selon ce modèle, l'abacavir occupe une partie du site de liaison à l'antigène du HLA-B*57:01 et modifie le répertoire des peptides présentés pour favoriser les antigènes auxquels l'hôte n'était pas tolérant auparavant et déclenche une réponse d'hypersensibilité. La longue latence du DRESS le différencie également de l'hypersensibilité à l'abacavir, pour laquelle les premiers symptômes d'hypersensibilité ont été décrits dès le premier jour et demi suivant la première exposition (92). De fortes associations HLA de classe I avec de nombreux médicaments responsables de DRESS confirment que ces réactions peuvent être déclenchées par des cellules T CD8+ en présence de lymphocytes T CD4+ (93). De nombreux médicaments associés au DRESS sont également associés au syndrome de nécrolyse épidermique toxique avec, dans certains cas, une association HLA de classe I partagée pour l'allopurinol (HLA-B*58:01), et la dapsonne (HLA-B*13:01) (89). Les facteurs conduisant à l'apparition de la tolérance chez un individu porteur d'un allèle de risque HLA sont actuellement inconnus (94). Bien qu'il y ait eu de nombreuses découvertes de phénotypes HLA associées à des réactions indésirables graves aux médicaments médiés par les lymphocytes T, peu d'entre elles sont utilisées en routine comme test de dépistage avant prescription pour prévenir une réaction spécifique liée à la très faible valeur prédictive de l'allèle de risque HLA pour les réactions indésirables graves aux médicaments comme HLA-B*58:01 et HLA-A*31:01 pour le DRESS à l'allopurinol et à la carbamazépine. L'abacavir, qui est à l'origine d'un syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse dépendant des cellules T CD8+ restreint par le HLA de classe I, est une exception à cette règle, étant l'un des rares médicaments pour lesquels un test de dépistage HLA est utilisé en routine clinique (95) et dont la valeur prédictive négative est de 100 % pour le HLA-B*57:01.

Molécules	Phénotype HLA	Population	Risque (odds ratio)	Référence
Abacavir	HLA-B*57 :01	Européens, africains, nord-américains	NC	(92)
Allopurinol	HLA-B*58:01	Chinois Han, coréens, taiwanais, thaï	5,25	(96)
Bétalactamines	HLA-C*04:06	Thaï	23	(97)
	HLA-DRB1*04:06		55	
Carbamazépine	HLA-B*15:02	Européens, chinois, coréens, japonais	6,63	(96, 98)
	HLA-A*31 :01			
Cotrimoxazole	HLA-DRB1*12:02		16,76	(96)
Dapsone	HLA-B*13:01	Thai, Han	54	(99)
Lamotrigine	HLA-B51 :01 et A*24 :02	Européens	NC	(22)
Phénytoïne	HLA-B*13:01	Thai	13,29	(100)
	HLA-B*56:02/04		56,23	
Pipéracilline tazobactam	HLA-B*62	Européens	NC	(101)
Raltegravir	HLA-B*53 :01	Africains, hispaniques	NC	(102)
Vancomycine	HLA-A*32:01	Caucasiens	NC	(103)

Tableau 2: Principaux phénotypes HLA associés aux réactions d'hypersensibilité retardées aux médicaments d'après (3). NC : non connu.

D. Virus et toxidermies

L'originalité de la physiopathologie du DRESS repose dans la survenue de réactivations virales et plus particulièrement des virus de la famille des HHV incluant principalement : HHV-6, -7, EBV et CMV (7, 104). Contrairement au consensus J-SCAR (Japanese Research Committee on Severe Cutaneous Adverse Reaction), la réactivation du HHV-6 n'a pas été incluse parmi les critères diagnostiques du RegiSCAR (47). Les taux d'incidence de la réactivation du HHV-6 sont très variables selon les études, allant de 36 % dans l'étude RegiSCAR à 62 % dans une étude japonaise (105). Les patients atteints de DRESS sont également à risque de séquelles auto-immunes, qui peuvent apparaître des mois, voire des

années après la résolution de l'éruption cutanée et de l'atteinte systémique initiale (106). Ces phénomènes de réactivation virale et de séquelles auto-immunes ont été considérés comme un facteur essentiel pour comprendre la définition, la classification et la physiopathologie du DRESS. En effet, le DRESS et ses complications semblent se produire à la suite d'interactions complexes entre les réponses immunitaires et les virus, comprenant des réponses immunitaires spécifiques aux antiviraux et aux médicaments (107). Liang et al. ont par ailleurs rapporté la survenue plus fréquente de syndrome d'activation macrophagique chez les patients avec réplication virale EBV et CMV (108)

De nombreux arguments sont venus étayer l'implication des virus dans la pathogénèse du DRESS. Par exemple, Picard et al., ont montré dans une étude portant sur 40 patients atteints de DRESS que 76 % des sujets présentaient une réactivation des virus du groupe herpès avec la présence de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques spécifiquement dirigés contre l'EBV dans le sang et les tissus atteints (foie, poumon et peau) et une corrélation du nombre de lymphocytes T CD8+ à la sévérité de l'atteinte systémique. De plus, la molécule incriminée était capable d'induire une réactivation virale *in vitro* chez ces patients notamment par le triméthoprime-sulfaméthoxazole ou l'allopurinol (72). Les données de ce travail ont pu être synthétisées en figure 2. La réactivation virale entraînerait une réponse antivirale T aboutissant à une inflammation systémique non contrôlée associée à une défaillance multi viscérale (109). Ce phénomène est possiblement lié à l'expansion de lymphocytes T régulateurs chez les patients atteints de DRESS (110). L'atteinte d'organe apparaît parfois associée à la réplication virale comme dans le cas d'un patient avec présence de HHV-6 dans le sang et dans les tissus hépatiques biopsiés (111). Bien que la corrélation entre la réactivation des herpès virus et le DRESS ait été rapportée, les bases cellulaires et moléculaires spécifiques de la contribution des infections virales à la pathogénèse et de l'apparition des séquelles auto-immunes ultérieures ne sont pas connues (112).

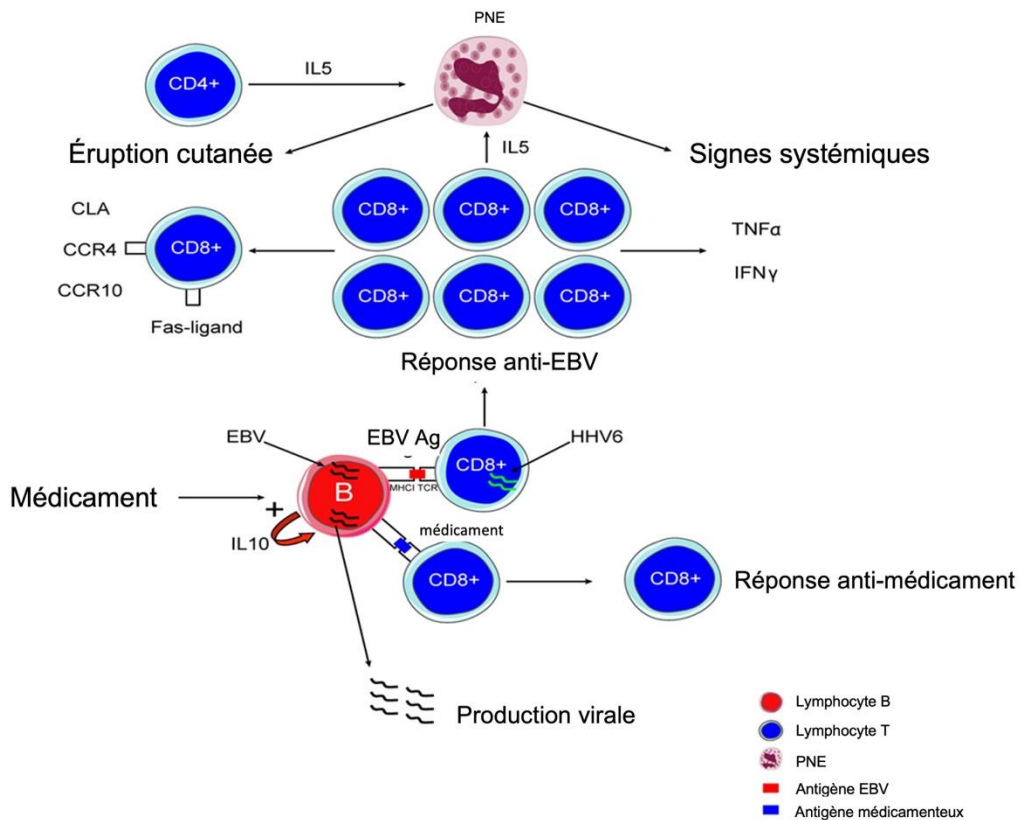


Figure 2: Adapté d'après Picard et al. 2010, les lymphocytes T CD8+ circulants spécifiques de l'EBV se sont développés au sein d'une population de lymphocytes T activés producteurs de grandes quantités de TNFα et d'IFNγ. La réactivation virale déclenche une réponse lymphocytaire T antivirale incontrôlée qui conduit à une inflammation systémique associée à une défaillance des organes.

E. Virus et PNE au cours des toxidermies

Le PNE est par ailleurs décrit par de nombreux travaux comme acteur important de la réponse antivirale et constitue à ce titre une cible d'intérêt. En effet, des auteurs ont montré que les PNE chez la souris infectée par le virus de la grippe A (influenza A virus) avait un profil fonctionnel activé via une dégranulation et une régulation à la hausse des marqueurs de présentation antigénique. Les PNE exposés au virus ou au peptides viraux ont induit la prolifération, l'activation des fonctions effectrices des cellules T CD8+. Ces données suggèrent que les PNE favoriseraient l'immunité cellulaire de l'hôte pour réduire la réplication du virus de la grippe dans les poumons, fournissant ainsi un nouveau mécanisme par lequel les sujets souffrants d'asthme allergique peuvent être protégés de la morbidité de la grippe (113). Des données similaires existent chez l'homme concernant cette fois-ci d'autres virus (SarS-CoV2) où une éosinophilie serait un facteur protecteur de pneumopathie sévère induite par le SarS-CoV2 (114, 115). De même, au cours d'une toxidermie chez les patients infectés par le SarS-CoV2, l'éosinophilie, initialement absente au début de la COVID-19, était enregistrée chez un total de 15/23 (65,2%) patients. Notre équipe a rapporté une réactivation virale a été observée chez 13/23 (56,5 %) des patients,

y compris EBV (n=10), HHV-6 (n=1) et Parvovirus B19 (n=2). Une éosinophilie a été observée chez 11/13 patients (85 %) présentant des réactivations virales (116). Malgré de nombreux projets de recherche sur le sujet, les questions concernant sa pertinence clinique, son rôle en tant que facteur causal par opposition à une complication, et la validité des techniques de dépistage viral, restent pour l'instant sans réponse.

F. PNE et toxidermies

Les toxidermies sont souvent associées à une éosinophilie et l'infiltration des tissus par les PNE joue peut-être un rôle dans la survenue de l'éruption cutanée même si les mécanismes précis sont incomplètement connus. Une éosinophilie peut être présente, selon les séries, dans 1 cas sur 2 et voire jusqu'à 80% des patients atteints de DRESS, il ne s'agit pas d'un critère obligatoire pour le diagnostic (24).

Les PNE ont été classiquement considérés comme des cellules à différenciation terminale qui répondent aux microenvironnements de type Th2 générés par les parasites ou des stimulations allergiques. Toutefois, ce point de vue évolue lentement, car il apparaît que ces cellules subissent des changements phénotypiques en réponse à des signaux micro environnementaux tissulaires et une réactivité accrue aux cytokines (concept de « priming »), une survie prolongée pendant des semaines et divers degrés d'activation cellulaire. Les PNE peuvent infiltrer peau et organes au cours du DRESS alors qu'ils ne sont pas ou peu présents en conditions physiologiques. Le PNE provient, comme les autres granulocytes, de la moelle osseuse. Sa production, maturation et survie est principalement régulée par l'IL-5, produite par des lymphocytes T Th2 ou des ILC2 (84) qui sécrètent des cytokines comme l'IL-4, IL-5 et IL-13 (117, 118). Le taux de PNE circulants varie en fonction de leur production médullaire, de leur migration dans les tissus et du taux d'apoptose. La migration des PNE dans les tissus est favorisée par les molécules d'adhésion, chimiokines (CCL-11 ou éotaxine-1, CCL24 ou éotaxine-2 et CCL26 ou éotaxine-3 selon les tissus et le contexte pathologique) et certaines cytokines de polarisation Th2 (IL-5 surtout, IL-4 et IL-13) (119). Les PNE activés exercent une action toxique via la libération du contenu de leurs granules préformés sous l'influence de cytokine comme l'IL-3 (120). Les PNE sont remplis de granules, primaires et secondaires. Les granules primaires abritent des cristaux de Charcot-Leyden (CLC), des protéines (galectine-10) et l'éosinophile peroxydase des éosinophiles (EPX). Un rôle des CLC a été associé à diverses maladies à PNE, notamment allergiques et parasitaires. Les CLC sont supposés être impliqués dans le transport vésiculaire des RNases cationiques et dans la formation des granules au cours de la différenciation des PNE (121). Il a été démontré que l'EPX exerce des effets antiparasitaires

et antibactériens. Elle est libérée soit dans de grandes vacuoles cytoplasmiques (phagosomes), soit de manière extracellulaire où elle se lie à la surface d'une cible. Les granules secondaires contiennent la major basic protéine (MBP) dans le noyau cristallin, ainsi que la protéine cationique éosinophile (ECP), la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN) et l'EPX dans leur matrice. D'autres médiateurs peuvent également être relargués dans le milieu extracellulaire comme des cytokines et de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (leucotriènes, prostaglandines, platelet-activating factor) (122). Les PNE libèrent leurs contenus granulaires, y compris les protéines cationiques granulaires et d'autres médiateurs, par quatre mécanismes différents (figure 3) (123, 124) :

- Dans l'exocytose classique, le contenu des granules est libéré par fusion de la membrane granulaire avec la bicouche lipidique de la membrane plasmique.
- Dans l'exocytose composée, principalement observée dans la défense contre les parasites, un certain nombre de granules fusionnent dans le cytoplasme puis les protéines cationiques sont ensuite libérées par un seul site de fusion au niveau de la membrane plasmique.
- Dans la dégranulation fragmentaire, principalement observée dans les réponses inflammatoires dans les tissus, les vésicules sécrétoires se forment au sein des granules qui disparaissent progressivement puis se vident dans le milieu extracellulaire de manière analogue à la libération de neurotransmetteurs des neurones. La sécrétion différentielle des protéines cationiques de la matrice (EPX, ECP) ou du noyau (MBP-1, MBP-2) du granule a été démontrée, laissant des granules sans noyau avec une matrice intacte ou des noyaux intacts sans matrice dans la cellule.
- Dans la cytolysse, des granules entiers intacts sont déposés dans les tissus après la rupture de la membrane plasmique due à la nécrose des PNE.

Ces différents modes de dégranulation sont explorés en microscopie électronique (125).

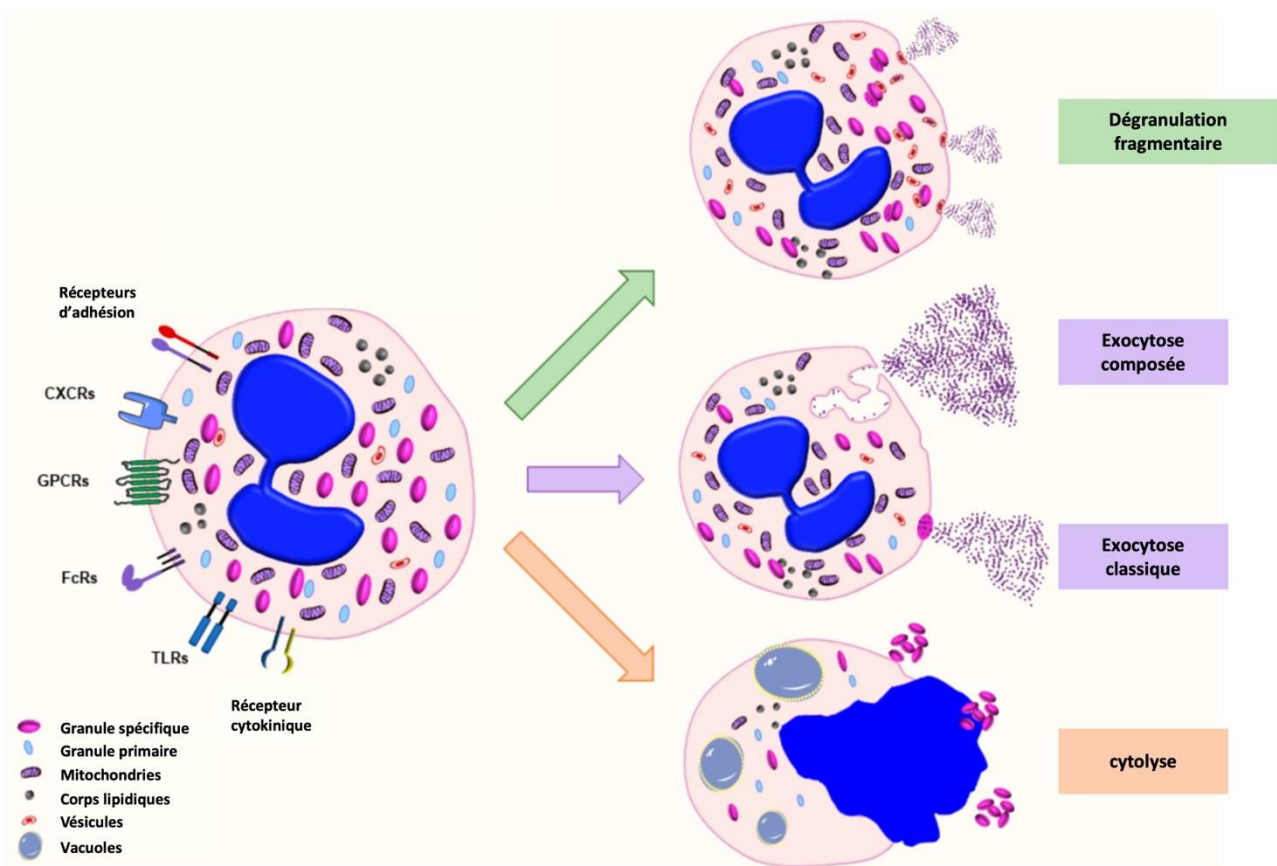


Figure 3: mécanismes à l'origine des différentes modalités de dégranulation du PNE modifié d'après Fettlelet et al. 2021.

Une éosinophilie peut engendrer des dommages tissulaires quelle que soit l'origine de l'éosinophilie et le nombre de PNE circulants. Ainsi, la présence d'une grande éosinophilie sanguine, et même tissulaire, ne préjuge pas nécessairement de son activité cytotoxique, en revanche, la présence de granules extracellulaires, identifiés par le marquage de protéines cationiques du PNE, est considérée comme un signe d'activation tissulaire (126-129) et dont le caractère pathogène dans la peau est démontré (130). Le PNE est une cellule essentiellement tissulaire (129). Un infiltrat cutané éosinophilique peut être présent dans 20% à 71% des biopsies cutanées selon les séries de la littérature et sa présence ne constitue pas un critère histologique diagnostique obligatoire au cours du DRESS (77, 131-134). Son niveau d'activation et d'activité dans la peau n'est pas clairement établi actuellement contrairement à d'autres pathologies impliquant un infiltrat à PNE dans sa physiopathologie comme c'est le cas au cours par exemple de la pemphigoïde bulleuse (BP) où le nombre de PNE dans les tissus et le nombre de PNE dans le sang périphérique étaient corrélés à la gravité de la maladie. Les taux de PNE tissulaires étaient également élevés chez les patients atteints de BP avec comorbidité neurologique. (135-137).

D'après Musette et Janela, au cours du DRESS, l'activation et l'expansion des PNE seraient induites par une réponse immunologique dirigée contre la réactivation virale et la molécule imputable même s'il n'existe pas de preuve moléculaire d'une interaction directe entre PNE

et médicament. Les PNE infiltreraient les organes en réponse aux chimiokines notamment l'éotaxine-1 et le TARC, l'IL-5 (figure 4). Il est intéressant de noter que ces auteurs ont montré une surexpression de l'IL-17, y compris de l'IL-17E (IL-25) dans le DRESS, qui jouerait un rôle clé dans l'augmentation des PNE dans le sang (138).

Néanmoins les mécanismes qui sous-tendent l'infiltration des PNE dans les organes ne sont pas connus et nécessitent d'être explorés ce d'autant qu'en réalité l'infiltration des tissus par les PNE ne serait pas systématique comme dans le cas des myocardites, en effet, 30% des patients biopsiés en phase aiguë de myocardite n'avaient pas d'infiltrat significatif à PNE (56). Toutefois les PNE ne font pas l'objet d'une recherche spécifique en immunohistochimie dans cette série, or, le PNE peut parfois être difficile à identifier sur des coupes tissulaires. Dans ces publications, il n'est par ailleurs pas précisé si les infiltrats observés sont faits de PNE dit « actifs » (i.e., avec présence de cellule avec dégranulation dans le tissu). De fait, leur implication directe dans les dégâts cutanés n'est donc que supposée d'autant que l'infiltrat à PNE est même absent dans certains cas sévères d'hépatites dans le contexte de DRESS (111). L'infiltrat à PNE semble être en revanche plus fréquent en cas d'atteinte rénale (atteinte surtout tubulo-interstitielle), du moins lorsqu'une biopsie a été réalisée (139, 140). La biopsie d'organe in vivo ou post mortem ne représente qu'une minorité de cas, souvent dans un contexte diagnostique douteux nécessitant une confrontation anatomo-clinique. De fait, il est difficile de confirmer l'implication des PNE dans l'ensemble des atteintes d'organes.

Sur la base de cet argumentaire il apparaît donc justifié de mieux préciser le profil fonctionnel et phénotypique des PNE tissulaires afin d'en comprendre son implication réelle dans la survenue des lésions d'organes.

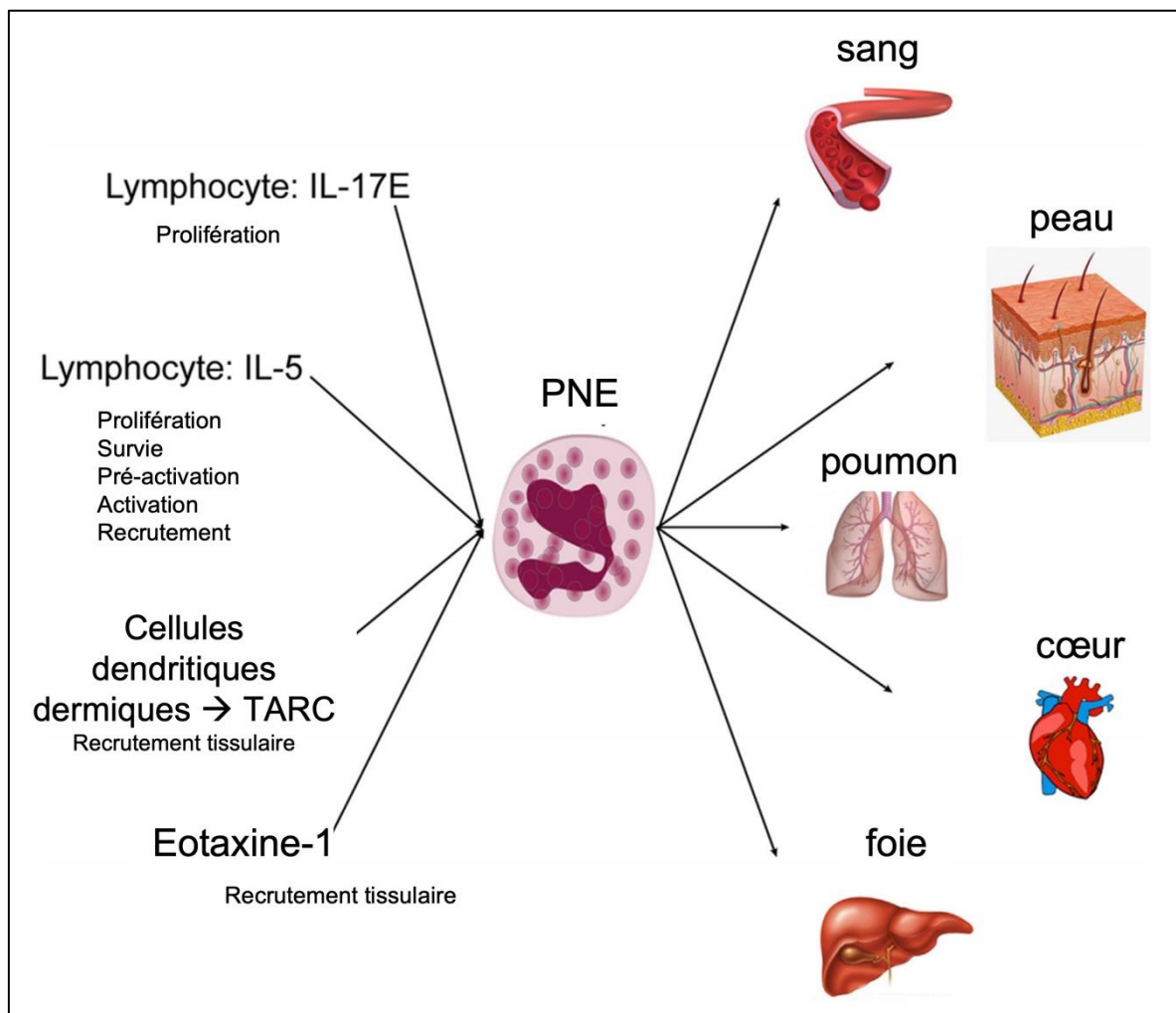


Figure 4: D'après Musette et Janela, 2017. Rôle supposé du PNE au cours du DRESS. Dans ce modèle, le PNE apparaît comme l'acteur central de la physiopathologie de l'ensemble des atteintes d'organes y compris l'atteinte cutanée. Ce modèle émet l'hypothèse que l'IL-5, l'IL-17E sont des éléments centraux de l'implication du PNE dans la physiopathologie du DRESS.

En synthèse, la physiopathologie du DRESS implique donc des mécanismes liés à l'immunité antivirale et l'immunité induite par les médicaments néanmoins la place du PNE reste à conforter (figure 5). Ganeshanandan et al., ont récemment proposé une synthèse de la physiopathologie du DRESS soulignant les zones d'ombres restant à éclaircir concernant (141) : l'origine de l'éosinophilie qui n'est pas toujours présente et la fonction du PNE à la fois au niveau systémique et tissulaire. Leur postulat est que le médicament serait à l'origine d'une stimulation lymphocytaire T CD4+ et T CD8+ à l'origine d'une expansion clonale spécifique au médicament via les mécanismes d'activation précédemment cités d'une part. et d'autre part, le médicament induirait un néo-antigène reconnu par les cellules T mémoire spécifiques des virus du groupe herpès. Ces cellules T préalablement sensibilisées par des virus infectants à vie, qui sortent périodiquement de latence, résident dans des sites anatomiques spécifiques. Ces cellules T mémoires peuvent avoir une réaction croisée avec des peptides endogènes apprêtés et présentés dans le contexte d'un

allèle HLA à risque. Les médicaments peuvent également se lier tels quels au TCR et/ou au CMH de manière non covalente selon le modèle p-i, ou encore avec un répertoire modifié de peptides endogènes à la suite de la liaison du médicament au CMH induisant une réponse antivirale et une réplication massive (7). Cette expansion clonale serait à l'origine d'une réactivation virale au sein des réservoirs où ils sont présents comme le compartiment lymphocytaire B dans l'exemple de l'EBV (72). L'expansion clonale antivirale ainsi induite associée à l'activation tissulaire et circulantes d'autres cellules de l'immunité innée (ILC2) pourrait être à l'origine d'une sécrétion de facteurs à l'origine du recrutement des PNE (IL-5, IL-33, IL-10). Par ailleurs, la sécrétion des médiateurs de danger (TSLP, TARC, IL-33, IFN β) possiblement sécrétés par les kératinocytes (via l'action toxique directe du médicament, ou des lésions induites par les virus ?), ou par les cellules dendritiques dermiques serait également à l'origine du recrutement des PNE au cours du DRESS. La connaissance de ces mécanismes est parcellaire alors que même le niveau d'implication des PNE n'est pas connu. En l'absence de données robustes ou du moins en présence de données contradictoires, il n'est pas précisé si le PNE joue un rôle central systématique ou s'il n'est simplement que réactionnel (« by-stander ») à cet état inflammatoire (141).

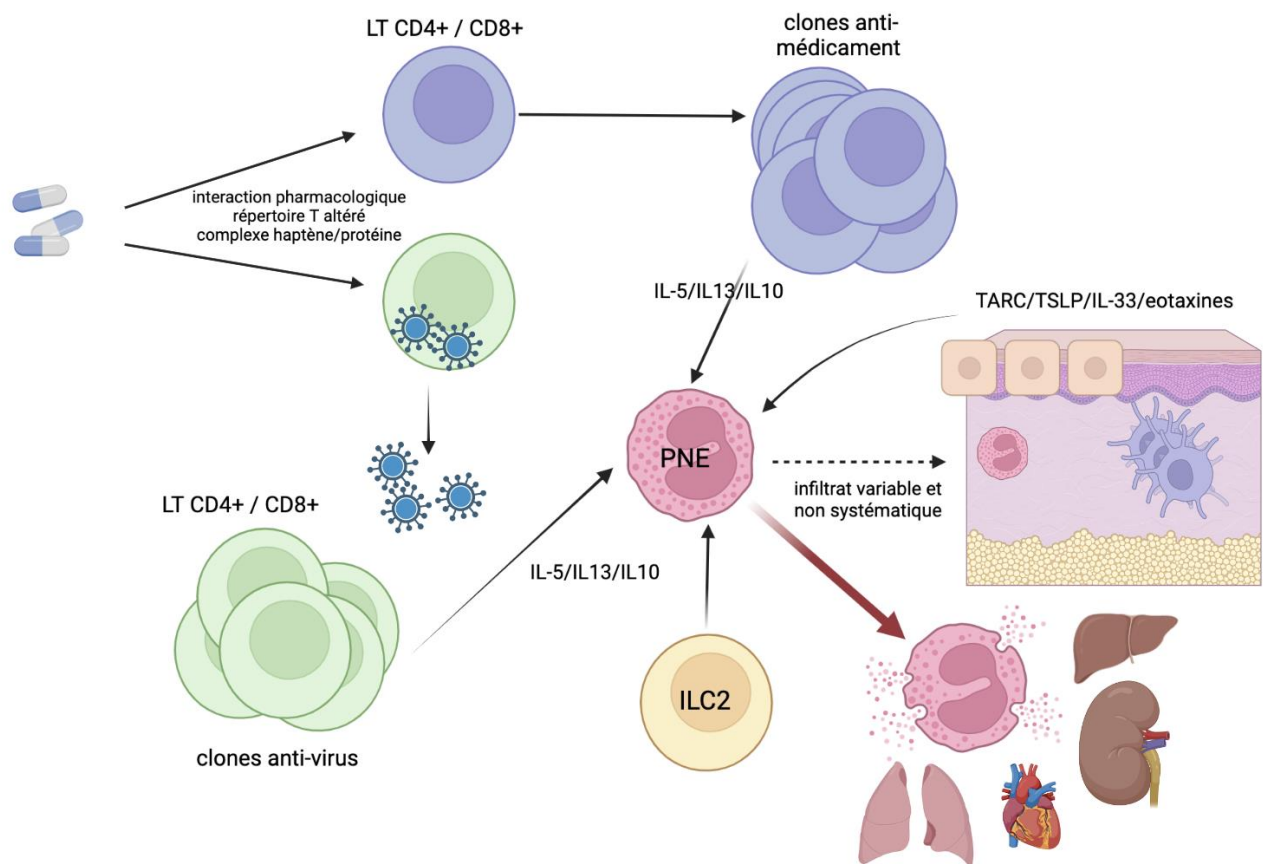


Figure 5: Physiopathologie intégrée du DRESS syndrome impliquant une interaction de la réponse antivirale et spécifique contre le médicament. L'implication précise des PNE n'est pas élucidé. Adapté d'après Ganeshanandan et al., créé avec Biorender.com.

IV. Démarche diagnostique

A. Critères diagnostiques

Les critères diagnostiques japonais (J-SCAR) ont été proposés pour le DRESS en 2007, qui se composaient de sept éléments (tableau 3) (142), tandis que le consortium européen RegiSCAR a établi ses critères pour identifier les cas possibles de DRESS en 2007 (26) (tableau 4). Malgré les différences de nomenclature, les deux maladies appartiennent probablement au même spectre nosologique.

Le diagnostic du DRESS est complexe et constitue un challenge pour le clinicien et pour la recherche car il peut survenir dans un contexte de polymédication complexe parfois sur un terrain d'infection grave non contrôlée ou d'épilepsie sévère. Son diagnostic repose à la fois sur des critères cliniques et biologiques. Le clinicien doit en premier lieu éliminer toute autre cause aux symptômes observés : infection, cancer, maladies auto-immunes ou connectivites. Ainsi, l'approche diagnostique rétrospective du DRESS suit des critères diagnostics ont été proposés et différent selon les groupes de recherche sur le sujet.

J-SCAR (Japanese Research committee on severe cutaneous adverse reaction) selon Shiohara et al. 2007
<ul style="list-style-type: none"> - Rash évoluant depuis >3 semaines (*) ; - Symptômes se prolongeant après arrêt du traitement causal (*) ; - Fièvre >38°C (*) ; - Anomalies hépatiques (ALAT >100U/L) or autre atteinte d'organe (*) - Anomalies hépatiques (ALAT >100U/L) ou autre atteinte viscérale (*) - Anomalies leucocytaires <p>*leucocytose >11000/mm³</p> <p>*lymphocyte atypique (>5%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Adénopathies - Réactivation HHV-6
<p>7 critères : DRESS typique</p> <p>(*) 5 critères seuls : DRESS atypique</p>

Tableau 3: Différents critères diagnostiques utilisés dans le DRESS.

Dans notre étude nous avons choisi d'utiliser les critères et le score développés par le groupe européen d'étude des toxidermies RegiSCAR qui sont résumés dans le tableau 4. Ce score rétrospectif permet d'estimer la probabilité de DRESS pour chaque situation clinique :

- Cas certain : score >5
- Cas probable : score entre 4 et 5
- Cas possible : score entre 2 et 3
- Cas peu probable : score <2.

Score	-1	0	1	2	Min	Max
<i>Fièvre > 38°C</i>	Non/ ?	Oui			-1	0
<i>Adénopathies</i>		Non/ ?	Oui		0	1
<i>Éosinophilie</i>		Non/ ?				
<i>Éosinophiles</i>			700- 1499/mm ³	>1500/mm ³	0	2
<i>Éosinophiles si leucocytes < 4000/mm³</i>			10-19,9%	≥20%	0	2
<i>Lymphocytes atypiques</i>		Non/ ?	Oui		0	1
<i>Rash > 50% de surface corporelle</i>		Non/ ?	>50%		0	1
<i>Rash évocateur</i>	Non	?	Oui		-1	1
<i>Biopsie compatible</i>	Non	Oui/ ?			-1	0
<i>Atteinte viscérale (foie, rein, poumon, cœur, muscle, pancréas, autre)</i>		Non	1 organe	≥2 organes	0	2
<i>Résolution ≥ 15 jours</i>	Non/ ?	Oui			-1	0
<i>Élimination des autres causes possibles :</i> *anticorps antinucléaire *hémocultures positives *sérologies VHA/VHB/VHC positives *chlamydia/mycoplasme <i>Si aucun des items n'est positif et ≥3 critères ci-dessus sont négatifs.</i>			1		0	1
SCORE TOTAL					-4	9

Tableau 4: Critères développés par le groupe d'étude RegiSCAR permettant d'évaluer la probabilité diagnostique de DRESS selon Kardaun et al.

B. Biologie

Sur le plan biologique, il existe souvent une hyperleucocytose marquée souvent précédée par une leucopénie et/ou une lymphopénie. Une thrombopénie est parfois observée, de même qu'une anémie (10). Dans une série de 24 DRESS, tous les patients présentaient des hémogrammes anormaux : 14 avaient une leucocytose, avec $\geq 80\%$ de neutrophiles pour 9 d'entre eux ; 2 patients avaient une pancytopenie ; 1 avait une agranulocytose ; 5 patients avaient une lymphocytose transitoire mais 16 avaient une lymphopénie. Une éosinophilie n'a été observée que chez 12 patients et était transitoire ; 14 avaient des lymphocytes atypiques circulants, seuls 2 étaient thrombopéniques (143). La présence de lymphocytes atypiques peut parfois faire discuter un diagnostic différentiel de lymphome T angio-immunoblastique. Le lymphome angio-immunoblastique à cellules T peut être différencié du véritable syndrome DRESS sur la base d'une faible probabilité de causalité médicamenteuse, d'une moindre atteinte hépatique et d'une atteinte spécifique des ganglions lymphatiques et de la rate sans toutefois être strictement spécifique nécessitant une corrélation anatomoclinique rigoureuse (144-146). Des anomalies de morphologie érythrocytaires ont été noté jusqu'à 55% dans une série de DRESS (147). Lorsqu'elle est présente, une éosinophilie sanguine, dans 30% des cas, peut dépasser les 2000 éléments/mm³ (148, 149). Le DRESS peut rarement se compliquer d'un syndrome d'activation macrophagique qui correspond à une stimulation inappropriée des cellules macrophagiques entraînant une phagocytose des éléments figurés du sang et la libération de cytokines. Le syndrome d'activation macrophagique associe des signes cliniques généraux et non spécifiques (fièvre, altération de l'état général, hépatosplénomégalie, adénopathies) et des éléments biologiques d'orientation comme une pancytopenie, une coagulopathie, une augmentation des LDH, de la ferritine et des triglycérides. Le diagnostic est confirmé par un examen cytologique et/ou histologique identifiant l'hémophagocytose. Le pronostic du syndrome d'activation macrophagique est réservé (150). Par ailleurs, les taux sériques de PCT (procalcitonine) et de CRP (C-Réactive protéine) des patients atteints d'une infection bactérienne étaient significativement plus élevés que ceux des patients atteints de DRESS suggérant que la combinaison de la PCT et de la CRP avait une performance diagnostique beaucoup plus grande avec une sensibilité et une spécificité plus élevées par rapport à la PCT et à la CRP seules pour aider à différencier le DRESS d'une infection bactérienne (151, 152).

C. Histologie cutanée

L'aspect histologique du DRESS peut être variable et, tout comme le tableau clinique de l'éruption, les caractéristiques histopathologiques peuvent être polymorphes.

Une dermatose lichénoïde d'interface serait selon certains auteurs un marqueur d'une atteinte hépatique au cours du DRESS (153). Gonçalo et al., ont rapporté une série de 15 patients atteints de DRESS et rapportaient comme principaux « patterns » : une exocytose lymphocytaire, une spongiose, des nécroses kératinocytaires éparses, une vacuolisation de la couche basale, une infiltration lymphocytaire périvasculaire du derme ou à la jonction dermoépidermique. Il y avait une corrélation positive significative entre l'intensité de l'infiltration lymphocytaire et la gravité de la cytolyse hépatique et de l'éosinophilie. Aucune corrélation n'a été observée entre l'intensité et le type d'inflammation dermique et le degré d'atteinte épidermique ou le médicament responsable. Les patients positifs pour HHV-6 présentaient une réaction pseudo-lymphomateuse ou une localisation périfolliculaire de l'infiltrat (154). Concernant la comparaison entre EMP et DRESS, Skowron et al., ont montré que la prévalence de la spongiose, des lymphocytes dermiques, des PNE et des neutrophiles ne différait pas entre le EMP et les DRESS. La nécrose kératinocytaire, rare dans les EMP était plus fréquente dans le DRESS. Les lymphocytes atypiques étaient absents dans les EMP mais plus fréquemment retrouvés dans les DRESS. L'atteinte dermique profonde et la vascularite leucocytoclasique n'ont été observées que dans le DRESS (132). Pinto-Gouveia et al., ont rapporté 132 patients hospitalisés pour lesquels (dont 37 DRESS, 28 EMP, 34 syndromes de chevauchement). Dans les formes de chevauchement, les auteurs ont observé une vacuolisation des kératinocytes et un infiltrat périvasculaire et interstitiel de lymphocytes, de PNE et de neutrophiles, similaires mais plus légers que dans le DRESS, avec moins de dermatite d'interface, d'exocytose et de spongiose (155). Sur la biopsie cutanée, les lymphocytes peuvent présenter des atypies cyto-nucléaires posant parfois le problème du diagnostic différentiel les lymphomes T angio-immunoblastique (27, 156). Dans l'étude de Chi et al., les principaux changements histologiques observés chez les patients atteints de DRESS sont les suivants : dyskératose (97 %), spongiose épidermique (78 %), vacuolisation de l'interface (91 %), infiltration lymphocytaire périvasculaire (97 %) et infiltration éosinophile (72 %). Cependant, la dyskératose sévère, la spongiose épidermique et la vacuolisation sévère de l'interface étaient significativement plus importantes dans les cas de DRESS ($p < 0,05$). La présence d'une dyskératose sévère était significativement associée à la sévérité clinique de l'insuffisance rénale ($p < 0,01$). Cependant, les auteurs soulignent que ces changements

histopathologiques associés au DRESS ne sont pas entièrement spécifiques (131). Au final, il n'existe pas de critères obligatoires pour un DRESS et les tableaux histologiques sont polymorphes et non spécifiques.

D. Démarche d'imputabilité

Les symptômes du DRESS apparaissent généralement trois semaines ou plus après le début du traitement et avec un nombre limité de médicaments, principalement des anticonvulsivants (142) (tableau 5). En effet, la carbamazépine, la phénytoïne, le phénobarbital, le zonisamide, la lamotrigine, la mexilétine, la dapsonne, la sulfasalazine, la minocycline, l'allopurinol et la vancomycine sont impliqués comme cause dans la plupart des cas de DRESS (157). Néanmoins, n'importe quelle molécule pourrait être à l'origine d'un DRESS comme des cas possiblement en lien avec des vaccins par exemple (158). L'enquête minutieuse doit porter sur tous les traitements reçus par le patient y compris l'automédication jusqu'à 8 semaines avant le début des symptômes. Aux États-Unis, il s'agit de la vancomycine, de l'allopurinol, de la lamotrigine, de la carbamazépine et du triméthoprime-sulfaméthoxazole, qui représentent encore près de 50% des cas (159). Le DRESS et d'autres SCAR ont également été associés à de nombreux médicaments immunomodulateurs ayant de nouvelles cibles, notamment les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire, et le mécanisme de ces réactions n'est pas connu (160). Les patients atteints de DRESS sont exposés une hypersensibilité à de multiples médicaments avec une réactivité croisée inexplicée à de multiples médicaments de structures différentes au moment de l'épisode aigu, y compris ceux utilisés après l'apparition de la maladie (157). Étant donné l'inflammation prolongée et le risque de récurrence les tests allergologiques ne sont pas recommandés avant au moins six mois après l'épisode aigu (161).

Classe médicamenteuse	Molécules
Anticonvulsivants	Carbamazépine, lamotrigine, phénobarbital, phénytoïne, acide valproïque, zonisamide.
Antibiotiques	Ampicilline, céfotaxime, dapsonne, éthambutol, isoniazide, linézolide, métronidazole, minocycline, pyrazinamide, quinine, rifampicine, sulfasalazine, streptomycine, triméthoprim-sulfaméthoxazole et vancomycine.
Antiviraux	Abacavir, nevirapine, zalcitabine.
Antidépresseurs	Bupropion, fluoxétine.
Antihypertenseurs	Amlodipine, captopril.
Biothérapies	Efalizumab, imatinib
AINS	Celecoxib, ibuprofen
Autres	Allopurinol, époétine alfa, mexiletine et ranitidine

Tableau 5: Liste non exhaustive des principales molécules impliquées dans les DRESS d'après Husain et al., 2013.

La méthode de Bégau en matière d'enquête d'imputabilité médicamenteuse est obligatoire dans les centres régionaux de pharmacovigilance en France. Elle a été élaborée en 1978 et actualisée en 1985 et 2016 par Bégau et collaborateurs (162). Elle distingue l'imputabilité intrinsèque et l'imputabilité extrinsèque. L'imputabilité intrinsèque établit la relation de cause à effet entre chaque médicament et la survenue d'un effet indésirable, sur 3 critères chronologiques et 4 critères sémiologiques. Il existe des abaques permettant d'associer ces critères en un score d'imputabilité intrinsèque. En parallèle, l'imputabilité extrinsèque recherche les cas similaires dans la littérature. Elle repose sur des critères bibliographiques et permet d'identifier une molécule potentiellement responsable.

Des techniques récentes basées sur l'expression différentielle en transcriptomique d'un panel de biomarqueurs composé de 6 gènes (STAC, GPR183, CD40, CISH, CD4 et CCL8) ont montré une sensibilité et une spécificité élevées (100% et 85,7%-100%, respectivement) pour l'identification du médicament coupable dans ces cohortes de DRESS associés aux antibiotiques mais sont encore au stade de la recherche (163).

V. Traitement du DRESS

Il existe peu de recommandations pour la gestion du traitement du DRESS et les preuves à l'appui se sont limitées à des données d'observation et à des séries de cas (164-166). Le traitement du DRESS commence toujours par l'identification précoce et l'arrêt définitif de la ou les molécule(s) impliquée(s). Le traitement le plus consensuel du DRESS avec atteintes viscérale est la corticothérapie orale introduite à une dose de 1mg/kg/jour ou par bolus de méthylprednisolone 250-500mg pendant 2 à 4 jours en cas de forme très grave suivi d'un relais à 1mg/kg/j par voie orale pendant plusieurs semaines voire mois. Cependant, les preuves de cette affirmation reposent essentiellement sur des séries de cas. Il n'existe actuellement aucun essai clinique publié pour soutenir le traitement du DRESS. Une résolution rapide des éruptions cutanées, de la fièvre et du dysfonctionnement hépatique survient après l'instauration des corticostéroïdes systémiques, la dose minimale recommandée étant de 1 mg/kg/jour. Cependant, les corticostéroïdes systémiques doivent être diminués progressivement pendant au moins 6 à 8 semaines pour prévenir la réapparition des divers symptômes et sont donc administrés pendant plusieurs mois. Des traitements prolongés jusqu'à un an ou plus sont parfois nécessaires. Le rôle des corticostéroïdes topiques puissants pour les DRESS plus légers doit être précisé. En l'absence de défaillance d'organe et de signes d'éruption cutanée grave, les corticostéroïdes topiques avec surveillance rapprochée de la clinique et du bilan biologique sont possibles (165). Les immunoglobulines G polyvalentes ont été proposées avec des résultats contrastés voire contradictoires suggérant plutôt une balance bénéfique/risque défavorable (167). Quelques cas impliquant les anti-TNF α ont montré un intérêt notamment dans un cas de DRESS induit par les corticoïdes (168). Les traitements antiviraux (valganciclovir ou ganciclovir) représentent une option potentielle de traitement en cas de réactivation virale bien que le bénéfice apparaît faible (169). Dans une étude récente, des auteurs se sont intéressés à l'influence de la corticothérapie sur la réplication virale survenant au cours du DRESS : Six des sept patients traités sans corticostéroïdes ont présenté une virémie HHV-6 associée à des taux sériques élevés de sIL-2R. En revanche, les corticoïdes à forte dose, administrés dans la semaine suivant l'apparition de la maladie, ont eu tendance à inhiber l'apparition de la réactivation du HHV-6, avec une baisse remarquable du taux sérique de sIL-2R. Les corticoïdes à faible dose ou les corticoïdes à forte dose administrés tardivement n'ont pas modifié la virémie HHV-6 et l'augmentation des taux de sIL-2R. Cependant, la prolifération du CMV a été favorisée par les corticoïdes, quel que soit le moment où ils ont été administrés. Cette étude suggère qu'une attention particulière doit être accordée à la

dose et au moment de l'administration des corticoïdes systémiques dans le traitement du DRESS (170). Concernant les patients résistants à la corticothérapie, qui rechutent ou qui présentent des séquelles limitant la dose associée aux corticoïdes, des cas isolés suggèrent des traitements alternatifs tels que la ciclosporine, le mycophénolate mofétil, le rituximab, la plasmaphérèse et le cyclophosphamide (171, 172), mais le niveau de preuve est trop faible pour en tirer quelque recommandation. Il existe actuellement peu de preuves de l'utilisation systématique de l'antagoniste de l'IL-5, le mépolizumab, ou du bloqueur des récepteurs de l'IL-5, le benralizumab (173). Bien que l'IL-5 favorise la maturation et la différenciation des PNE, la défaillance d'organe associée au DRESS est typiquement associée à l'infiltration d'organes par des lymphocytes T dirigés par des antigènes liés au médicament impliqué. Cependant, dans certains cas, la morbidité et les lésions tissulaires pourraient être directement liées aux PNE, comme dans la myocardite (174). Des rapports de cas ont suggéré certains avantages potentiels dans ce contexte (175, 176). Il existe donc un intérêt majeur à mieux comprendre l'implication du PNE dans la physiopathologie du DRESS afin d'envisager pouvoir le considérer comme une cible thérapeutique potentielle.

VI. Pronostic et complications à long terme

La mortalité dans le cadre du DRESS peut atteindre 10% des cas en cas d'atteinte d'organe et notamment hépatique même si les mécanismes à l'origine de cette atteinte ne sont pas élucidés. Comme évoqué précédemment, les patients atteints de DRESS peuvent présenter des séquelles auto-immunes à long terme. Ces séquelles peuvent apparaître après un long intervalle sans symptômes après la résolution complète de la phase aiguë, ou peut-être une continuation de l'atteinte des organes qui est apparue pendant la phase aiguë (177). Diverses séquelles sont observées, telles que la thyroïdite auto-immune, le diabète de type 1 fulminant, l'anémie hémolytique auto-immune et l'alopecie. Le temps de latence entre la résolution de la phase aiguë et le développement des séquelles auto-immunes peut atteindre quatre ans (106).

Dans l'étude de Mizukawa et al, la combinaison d'une hyperlymphocytose, d'une atteinte hépatique sévère initiale, d'une réactivation persistante de l'EBV ou HHV-6 ainsi que de faibles taux d'IL-2 et d'IL-4 lors des phases aiguës, constituait des facteurs de risque significatifs pour le développement futur de maladies auto-immunes. Sur la base de ces facteurs, un système de notation permettant d'identifier les patients à haut risque de développement d'une maladie auto-immune a été établi pour classer les patients en trois groupes (faible/intermédiaire et élevé) (177).

Dans l'étude de Liu et al., rapportant 52 cas de DRESS induits par l'allopurinol, l'âge avancé, une maladie cardiovasculaire sous-jacente, une maladie rénale chronique et une dose élevée d'allopurinol, une infection et une atteinte des organes internes (y compris les reins, le cœur, les poumons et le tractus gastro-intestinal) étaient des facteurs de risque de décès (178).

VII. Rationnel et objectif de l'étude

Le DRESS est une pathologie rare et donc l'hétérogénéité clinique et du médicament causal rend son étude complexe. Classiquement décrite comme une pathologie lymphocytaire T médiée, la place du PNE n'est donc pas clairement établie.

Premièrement, l'aspect histologique du DRESS fait l'objet d'un petit nombre d'études dans la littérature. L'association d'une dermatose lichénoïde intense (vacuolisation basale majeure, dyskératose sévère) et d'une dermatose spongiforme seraient en faveur d'un DRESS. Néanmoins, l'aspect histologique cutané est souvent non spécifique dans le DRESS. En outre, malgré l'acronyme DRESS soulignant l'importance du PNE pour le diagnostic, la présence de PNE dans la peau est inconstante. Les mécanismes de recrutement tissulaire et la pathogénicité des PNE dans ces tissus au cours du DRESS restent non élucidés. Les PNE pourraient jouer un rôle délétère dans les atteintes d'organes et constituer une potentielle cible thérapeutique en particulier chez des patients sévères présentant une contre-indication à la prise en charge classique par corticothérapie. Chez ces patients, le recours à un biomédicament ciblant le PNE pourrait être un traitement de choix, ce que l'expérience clinique tend à confirmer (176, 179, 180). A notre connaissance, aucune étude n'a jusqu'ici porté sur la caractérisation des PNE tissulaires dans le DRESS. La peau représente un organe d'intérêt car : le PNE peut y être retrouvé, il s'agit d'un organe accessible au prélèvement d'échantillon en comparaison aux autres organes et il est possible de comparer les phénotypes cutanés observés dans d'autres toxidermies et chez des patients contrôles ce qui n'est pas possible sur un plan pratique et éthique pour les atteintes des organes profonds. Ces aspects justifient donc l'approche dermatologique dans l'étude du PNE.

Deuxièmement l'éosinophilie n'est pas présente chez tous les patients au cours du DRESS et peut être observée dans des toxidermies érythémateuses n'ayant pas les critères d'un DRESS. Comme évoqué précédemment, la prolifération des PNE est classiquement induite par des cytokines comme l'IL-5, mais les quelques études jusqu'ici menées ont apporté des

résultats contrastés. En effet, certains travaux n'ont pas mis en évidence de polarisation de type Th2 au cours du DRESS et une expression de l'IL-5 non augmentée (72), alors que d'autres auteurs ont pu observer des taux élevés d'IL-5 plasmatique dans la phase précoce du DRESS (181). Ainsi le PNE pourrait jouer un rôle variable selon les cas de DRESS (selon les patients, la sévérité, le moment de prélèvement ? ...) d'autant qu'une éosinophilie peut engendrer des dommages tissulaires quelle que soit l'origine de l'éosinophilie et le nombre de PNE circulants.

Il est donc important de comprendre si les PNE sont impliqués directement au cours du DRESS, ou si leur augmentation dans le sang et/ou leur présence dans les tissus n'est qu'un simple marqueur réactionnel de la réponse immunitaire sans lien direct avec les dégâts tissulaires. Il est également important de comprendre si la peau est une cible privilégiée du PNE au cours du DRESS et pourrait représenter un organe dont l'analyse est primordiale pour le diagnostic, l'évaluation de la sévérité ou du pronostic du DRESS. De même, il n'est pas clairement établi si un EMP médicamenteux avec éosinophilie serait une forme de passage nécessaire ou possible vers un DRESS ou si ces deux entités sont distinctes et ne présentent en réalité pas de *continuum* nosologique. En d'autres termes, l'étude fonctionnelle du PNE permet-elle de prédire l'évolution d'un EMP médicamenteux avec éosinophilie potentielle vers un DRESS ? En outre, le traitement du DRESS n'est pas codifié. Hormis l'arrêt du ou des médicament(s) imputable(s), il n'y a pas de consensus sur l'indication de la corticothérapie, ni dans ses modalités de prescription (topique ou systémique), même s'il convient en pratique courante d'avoir recours à la corticothérapie générale dans les atteintes d'organes les plus sévères. Cependant, en cas de contexte infectieux grave sous-jacent (notamment dans les cas de DRESS induits par les antibiotiques chez les patients en réanimation ou en situation post-opératoire), la mise en route d'un traitement immunosuppresseur avec un aussi large spectre que les corticoïdes peut faire prendre un risque non négligeable sur le plan infectieux. Par conséquent, dans l'hypothèse d'un rôle cytotoxique direct des PNE dans le DRESS, ces cellules pourraient constituer une cible thérapeutique de choix chez certains patients, en justifiant le recours à des biomédicaments bloquant la voie de l'IL-5 ou ciblant le récepteur de l'IL-5. Ces thérapies ciblant l'IL-5 ou son récepteur pourraient ainsi représenter une alternative aux corticoïdes systémiques dans certaines formes de DRESS avec atteinte d'organe, ou une add-on thérapie dans les cas les plus sévères cortico-résistants ou -dépendants, compte-tenu de leur efficacité dans des maladies impliquant le PNE et de leur bon profil de tolérance.

Nous avons donc élaboré dans le cadre de cette thèse une étude pilote multicentrique dont l'objectif était d'évaluer l'état phénotypique d'activation des PNE au niveau cutané mais également au niveau du sang circulant et des autres organes atteints, en comparaison à

des groupes contrôles sains et un autre groupe de toxidermie à savoir l'exanthème maculopapuleux médicamenteux associé ou non à une éosinophilie.

Chapitre 2 : Étude du profil fonctionnel cutané des PNE à travers la mise au point d'une technique de quantification de la dégranulation éosinophilique. Application au DRESS.

I. Introduction

Le diagnostic des maladies éosinophiliques peut être un défi car l'éosinophilie tissulaire doit être confirmée et parfois quantifiée, avec une corrélation entre l'importance de l'infiltrat à PNE et la sévérité de la maladie, par exemple en cas d'œsophagite éosinophilique (EoE) (182). Un dépôt de granules éosinophiles dans les tissus, même en l'absence d'infiltration par des PNE, est en outre considéré comme une confirmation de l'éosinophilie tissulaire lorsque les PNE ne sont pas identifiables en tant que cellules intactes dans les coupes de tissus (125, 128). De plus, la présence de granules est un marqueur d'activation des PNE qui peuvent alors exercer une activité toxique dans les tissus via la libération du contenu de leurs granules préformés comme l'EPX (123). Ainsi, l'identification et la quantification des cellules et des granules sont des éléments importants pour le diagnostic et l'évaluation des maladies à PNE. Comme la quantification des granules extracellulaires PNE n'est pas possible avec les colorations standard comme l'hématoxyline et l'éosine, de nouvelles méthodes de quantification ont été proposées à partir du marquage en immunohistochimie des granules (183, 184). Ces techniques posent néanmoins le problème de l'absence de distinction entre un marquage de granules extracellulaires et granules intracellulaires contenus dans les cellules. De plus, dans certains tissus fortement infiltrés par les PNE, on peut observer de grandes zones de dégranulation dans lesquelles les granules extracellulaires ne peuvent pas être comptés individuellement. Une quantification plus précise de la surface tissulaire incluant les granules, les PNE intacts et altérés - que nous proposons de définir comme "surfaces de dégranulation" – pourrait être un outil précieux pour apprécier en routine le niveau d'activation des PNE dans les tissus selon les maladies, ce qui pourrait être considéré comme un nouveau système de notation histologique de la sévérité d'atteinte d'organe dans les pathologies impliquant les PNE. L'objectif de cette première partie était donc de développer un processus automatique de quantification pour analyser les "surfaces de dégranulation" dans les tissus de patients diagnostiqués avec différentes pathologies éosinophiliques et de procéder à l'analyse du niveau de dégranulation dans les groupes toxidermie d'intérêt.

II. Matériel et méthodes

A. Étapes de mise au point et validation

Nous avons mené une étude rétrospective monocentrique au CHU de Lille. Premièrement, pour l'étape de mise au point, nous avons collecté rétrospectivement des tissus fixés au formol et inclus en paraffine chez des patients atteints de maladies dans lesquelles la présence et le rôle délétère des PNE dans les tissus est bien établi : BP (pemphigoïde bulleuse, peau, n=7), NP (rhino sinusite chronique avec polypose nasale n=7) et EoE (muqueuse digestive, n=8). Les tissus témoins étaient des biopsies de peau de lésions cutanées de psoriasis (n=7), en tant que trouble inflammatoire de la peau, et des biopsies de peau de témoins sains (peau provenant d'une chirurgie plastique du sein, n=7). Dans cette première étape de développement, nous avons sélectionné au hasard un total de 6 zones focalisées (3mm²) dans les infiltrats éosinophiles les plus élevés dans les sections de peau de patients atteints de BP. Nous avons manuellement et automatiquement quantifié et comparé entre ces 2 méthodes : 1) le nombre de PNE intacts (correspondant à la densité en PNE par mm²) et 2) la mesure des surfaces de dégranulation. La quantification manuelle des cellules et des surfaces par délimitation était réalisée par 2 experts en aveugle l'un de l'autre et de la quantification par le programme macro EoJ.

Deuxièmement, une fois, la technique développée, dans une seconde étape de validation, nous avons appliqué la mesure de la densité en PNE et des surfaces de dégranulation par l'algorithme EoJ à l'ensemble de la cohorte de validation (EoE, NP, BP, psoriasis, peau saine) mais cette fois ci, sur la section totale de la biopsie. La collecte des données et des tissus a été approuvée par la Commission nationale française de l'informatique et des libertés (CNIL) sous le numéro DEC18-386.

B. Groupes toxidermies

Dans une troisième étape, nous avons appliqué notre processus de quantification et d'évaluation de la dégranulation aux groupes d'intérêt de notre étude à savoir : EMP, EMP+Eo et DRESS en comparaison à des sujets sains.

Pour mener à bien cette analyse, nous avons d'abord collecté rétrospectivement les blocs de paraffine fixés au formol de patients atteints de DRESS et EMP selon les critères diagnostics précisés plus bas. Les patients étaient recrutés à partir de leur dossier anatomo-pathologique. Les patients étaient sélectionnés de façon consécutive sur un période allant du 1er janvier 2011 au 31 décembre 2017 sur la base de la réalisation d'une biopsie cutanée

au CHRU de Lille. La sélection était réalisée grâce au code technique « OT3900 » codant pour le diagnostic de « toxidermie » renseigné par le pathologiste au moment du diagnostic dans le logiciel Diamic®. Le diagnostic de DRESS ou d'EMP était ensuite confirmé sur le plan clinique après consultation du dossier patient informatisé (logiciel Sillage®) et sur le plan biologique après consultation du logiciel Molis®.

Pour la constitution du groupe EMP+Eo, les patients sont eux secondairement issus de l'étude pilote DRESSEo multicentrique prospective interventionnelle à risque minime impliquant 20 centres partenaires au centre promoteur (CHU de Lille) permettant de recueillir des prélèvements cutanés prélevés au punch biopsique de 4mm sous anesthésie locale à la xylocaïne puis fixés au formol et paraffine pour la réalisation du marquage immunohistochimique. Cet essai a reçu l'approbation du comité de protection des personnes Sud-Est et a été enregistré sous la référence IRB 2018-A02624-51/1.

Les critères de sélection des patients étaient les suivants :

1. Groupe 1 (DRESS)

Tout patient ayant signé un consentement libre et éclairé, âgé de plus de 18 ans ayant un diagnostic de DRESS retenu selon les quatre critères suivants :

- Éruption cutanéomuqueuse survenant au minimum 24h et au maximum 2 mois après une prise médicamenteuse continue.
- Fièvre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ au moment de l'examen ou pic fébrile $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$ dans les 72 dernières heures
- Au moins une atteinte viscérale compatible parmi :
 - Adénopathie sur au moins deux sites différents et mesurant cliniquement au moins 1cm de diamètre ;
 - Transaminases $>2\text{N}$ ou phosphatases alcalines $>3\text{N}$;
 - Atteinte pulmonaire définie par une pneumopathie hypoxémiante (oxymétrie capillaire $\leq 95\%$) et/ou une pneumopathie interstitielle à la radiographie du thorax ou au scanner en l'absence d'autre pathologie pulmonaire ;
 - Atteinte cardiaque : myocardite, péricardite (ECG et confirmation par échographie cardiaque transthoracique) ;
 - Atteinte rénale définie par une élévation de la créatinine au-dessus de la valeur normale du laboratoire associée à une leucocyturie $>$

1000/mm³ ou une protéinurie, un rapport Na/K>1 et un ECBU stérile en l'absence de pathologie rénale préexistante.

- Éosinophilie $\geq 500/\text{mm}^3$
- Un Score RegiSCAR ≥ 4 .

2. Groupes 2 et 3 (EMP sans ou avec éosinophilie)

- Tout patient ayant signé un consentement libre et éclairé, âgé de plus de 18 ans et présentant un exanthème survenant plus de 24 heures après le début d'un traitement médicamenteux.
- Sans critère clinique de sévérité définis par Djien et al. (185) à savoir :
 - Une évolution de plus de 21 jours
 - Une atteinte viscérale telle que décrite dans le groupe 1
- Présentant un taux d'éosinophiles sanguins de :
 - ⇒ **Groupe 2 (EMP sans éosinophilie)** : éosinophiles sanguins $<500/\text{mm}^3$
 - ⇒ **Groupe 3 (EMP avec éosinophilie)** : éosinophiles sanguins $\geq 500/\text{mm}^3$ (inclusions prospectives dans le cadre du projet DRESSEo, IRB 2018-A02624-51/1)

Les critères de non-inclusion étaient :

- Présence d'une autre cause d'éosinophilie concomitante connue dont hémopathies avant l'introduction de la(les) molécule(s) imputable(s).
- Prise d'une corticothérapie orale ou locale, d'un anti-leucotriène (montélukast) dans le mois précédant le prélèvement sanguin pour l'étude ;
- Traitement par un anticorps anti-IgE (omalizumab, ligélizumab), anti-IL-5 (mepolizumab, benralizumab) ou anti-IL4 et/ou anti-IL13 (dupilumab, tralokinumab) dans les 6 mois précédant l'inclusion.

La sévérité des patients dans le groupe DRESS était définie selon les critères suivants (tableau 6) et sont inspirés du programme hospitalier de recherche clinique national « DRESSCODE » (NCT01987076).

DRESS mineur	Atteintes viscérales absentes ou minimales (n'atteignant pas les seuils du DRESS modéré)
DRESS modéré	<p><u>Au moins une atteinte viscérale de gravité intermédiaire :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> -Hépatique : transaminases entre 4 et 15 N, phosphatases alcalines entre 3 et 5 N -Rénale : insuffisance rénale organique avec augmentation de la créatinine de plus de 26,4 µmol/L ou 1,5 fois la normale ou oligurie < 0,5 mL/kg/h -Hématologique : hémoglobine entre 7 et 10 g/dL et/ou polynucléaires neutrophiles entre 500 et 1500/mm³ et/ou plaquettes entre 50000 et 100 000/mm³ <p><u>En l'absence d'atteinte viscérale pouvant menacer le pronostic vital : atteinte cardiaque, pulmonaire, neurologique ou digestive</u></p>
DRESS grave	<p><u>Au moins une atteinte viscérale grave</u></p> <ul style="list-style-type: none"> -Hépatique : cytolysse > 15 N et/ou phosphatases alcalines > 5 N, facteur V < 50% -Rénale : insuffisance rénale organique rapidement progressive ou oligoanurique -Pneumopathie interstitielle avec PaO₂ < 60mmHg -Myocardite -Atteinte neurologique -Atteinte digestive -Pancytopenie -Défaillance multiviscérale -Syndrome d'activation macrophagique secondaire

Tableau 6 : Critères de répartition des DRESS selon leur sévérité. Adapté du protocole national DRESSCODE (NCT01987076, Pr Chosidow, APHP, Hôpital Henri Mondor).

En synthèse, l'ensemble de ces étapes sont rappelées en figure 6.

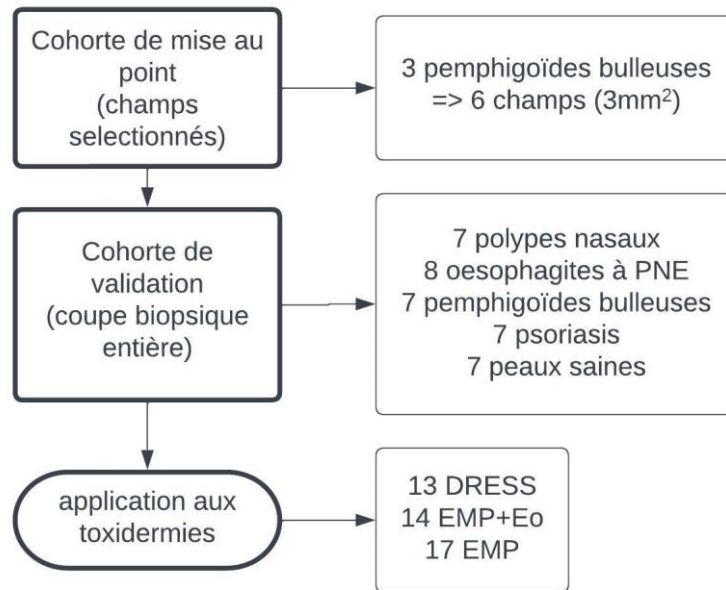


Figure 6 : Diagramme des différentes étapes de mise au point et application de l'algorithme EoJ.

C. Technique de marquage immunohistochimique

La coloration immunohistochimique anti-EPX (avec la collaboration du Dr E. Jacobsen, Mayo Clinic Arizona State University, Scottsdale) (183) a été utilisée pour identifier les granules intracellulaires (c'est-à-dire les PNE intacts isolés et les PNE agrégés), les granules isolés extracellulaires et les granules groupés. Des sections d'une épaisseur de 4µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome, puis étalées sur des lames de silane (DakoFlex). L'automatisation de la technique permet d'assurer la reproductibilité de la technique (automate BenchMark Ultra, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Les échantillons ont été déparaffinés puis réhydratés. Le démasquage de l'antigène a été effectué à l'aide de techniques de démasquage antigénique, soit par digestion enzymatique, soit par chauffage des lames dans des tampons. Ces étapes améliorent l'accessibilité de l'anticorps primaire au site antigénique en brisant les liaisons formées par le formol au sein des tissus. Le prétraitement thermique à 100°C pendant 8-30 min a été effectué à 91°C pendant 24 min dans un tampon citrate à pH 6 (Cell Conditioning solution 2, CC2, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Anticorps primaire (avec l'aimable autorisation du Dr E. Jacobsen, Mayo Clinic Arizona State University, Scottsdale, réf. MM25-82.2.1, dilution 1/750, anticorps anti-mousse humaine) a été incubé pendant 32 min à 37°C. L'incubation avec l'anticorps secondaire était de 8 min à une température stable de 37°C. Le complexe anticorps-antigène est révélé par le kit UltraVIEW Red (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) qui combine un anticorps anti-immunoglobuline avec un multimère marqué à la

phosphatase alcaline. La réaction est visualisée par une couleur rouge après ajout de Fast-Red réagissant avec la phosphatase alcaline. Un tampon de rinçage (tampon de réaction) a été utilisé entre chaque étape. La contre-coloration a été réalisée par immersion dans l'hématoxyline puis dans une solution de bleuissement (solution aqueuse tamponnée de carbonate de lithium) après rinçage. Les coupes de tissus ont enfin été rincées, déshydratées, puis montées entre lame et lamelle. Un contrôle externe positif a été réalisé pour chaque anticorps afin de s'assurer de la qualité de la coloration. Ensuite, les lames ont été acquises à l'aide d'un microscope automatisé Axio Scan.Z1 slide scanner (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Jena, Germany) à l'objectif X20/0.8. Ce système permet de générer une lame virtuelle et d'analyser la totalité de la surface de l'échantillon. Ce procédé permet de limiter l'artefact de la sélection de zone à l'acquisition.

D. Technique de quantification automatisée

La quantification automatique de la coloration anti-EPX a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) dans lequel un programme macro (EoJ) a été créé permettant l'automatisation de multiples commandes après avoir calibré la quantification des éosinophiles. Le programme macro (disponible sur <https://github.com/antoninolillefacility/ImageJ-Macro.git>) est constitué d'une séquence de commandes (figure 7). Dans une première étape, la totalité de la biopsie de la lame est délimitée et convertie en binaire par seuillage où la valeur maximale d'un pixel positif est 255 et la valeur minimale d'un pixel négatif est 0. Pour mesurer la surface de la biopsie, la surface d'un pixel correspondait à $0,88\mu\text{m}^2$. Dans un deuxième temps, les cellules, les granules et les surfaces de dégranulation sont identifiées selon le degré de coloration par analyse de déconvolution des couleurs. Les images à 3 canaux sont obtenues en utilisant un plugin spécifique (Ruifrok, AC & Johnston, DA 2001) permettant de différencier la zone hors biopsie, la biopsie et les granules. Les paramètres de détection sont réglés manuellement sur une lame représentative de la série de lames à quantifier. Dans une troisième étape, les granules et les cellules marquées ont été séparées par leur taille. Les granules extra-cellulaires isolés ont été définis par un intervalle de surface entre $2\mu\text{m}^2$ et $8\mu\text{m}^2$. Les cellules ont été définies entre un intervalle de $8\mu\text{m}^2$ à $100\mu\text{m}^2$ et un paramètre de circularité a été ajouté à la macro de 0,6 à 1, cette dernière valeur correspondant à un cercle parfait. La circularité a permis de différencier les cellules isolées des amas de granules ou de cellules. Les amas de granules n'ont pas été quantifiés comme des granules individuels. Les éléments isolés ainsi identifiés ont ensuite été quantifiés automatiquement

en rapportant leur nombre à la surface de biopsie. Ainsi on obtient une densité en PNE isolés (éléments/mm²), en granules (éléments/mm²). Les "surfaces de dégranulation" représentaient : les granules groupés et les agrégats de PNE. Ces surfaces ont été considérées pour des objets au-delà d'une surface de 100µm². Nous avons exprimé le concept de dégranulation par la formule suivante :

$$\text{ratio de dégranulation} = \frac{\text{surface des granules isolés} + \text{surface de dégranulation}}{\text{surface des cellules isolées} + \text{surface des granules isolés} + \text{surfaces de dégranulation}}$$

Pour la comparaison entre les différentes conditions, le ratio de dégranulation a été calculé comme le ratio de la « dégranulation » rapportées à la surface totale marquée par l'anticorps anti-EPX. La surface totale marquée par l'anticorps anti-EPX a été définie comme la somme totale des surfaces de cellules intactes, des surfaces de granules isolés et des surfaces de dégranulation. Pour la comparaison dans le même tissu, les rapports de dégranulation ont été exprimés sur le total de la biopsie de peau.

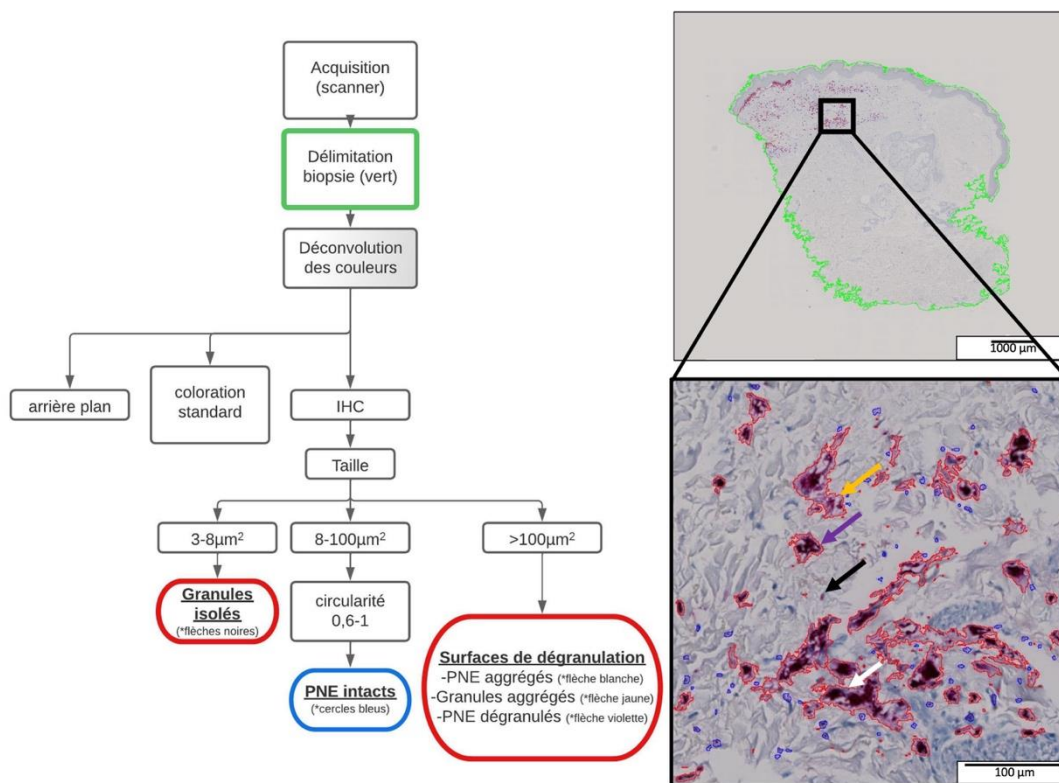


Figure 7 : Organigramme d'EoJ. Après délimitation de la section biopsique entière (encadré vert) (A), EoJ a effectué une détection et un comptage des PNE intacts marqués par l'anti-EPX (encadré bleu) correspondant à la densité de PNE par mm² (B) et des granules isolés (C, flèche noire). En cas de regroupement de granules (C, flèche jaune) ou d'agrégats de PNE (D, flèche blanche), EoJ a effectué une quantification des surfaces correspondant aux "surfaces de dégranulation" exprimées comme le rapport des surfaces de dégranulation quantifiées sur la surface totale de marquage anti-EPX. La surface totale de marquage anti-EPX correspond à la somme des surfaces des cellules, des surfaces des granules isolés et des surfaces de dégranulation.

E. Statistiques

Les paramètres qualitatifs ont été décrits en termes de fréquence et de pourcentages. Les paramètres numériques Gaussiens ont été décrits en termes de moyenne et d'écart-type et les paramètres numériques non gaussiens en termes de médiane et d'intervalle interquartile (IQR). La normalité des paramètres numériques a été vérifiée graphiquement et testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Les comparaisons de groupes ont été effectuées à l'aide du test de Kruskal-Wallis non apparié pour les paramètres continus non Gaussiens et du test de comparaison multiple de Dunn. En cas de répartition Gaussienne, un test ANOVA ordinaire non apparié, avec test de comparaisons multiples de Holm-Sidak ont été utilisés. Le rang moyen de chaque groupe a été comparé au rang moyen du groupe témoin peau saine indemne de toute activation éosinophilique. La comparaison entre les experts et EoJ a été effectuée à l'aide d'un test de Friedman nécessairement apparié et du test de comparaison multiple de Dunn. Les corrélations ont été effectuées à l'aide du test R de Pearson ou du test Rho de Spearman pour les paramètres continus Gaussiens et non Gaussiens, selon le cas. Le niveau de significativité statistique a été fixé à 5%. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism V9.0 (GraphPad Software, La Jolla California, USA).

III. Résultats

A. Mise au point de la méthode

Dans une première étape de développement, nous avons sélectionné un total de 6 zones focalisées (3mm²) dans les infiltrats à PNE les plus denses repérés dans les sections de peau de patients atteints de BP et nous avons quantifié et comparé manuellement et automatiquement le nombre de PNE intacts (densité de PNE par mm²) et la mesure des surfaces de dégranulation en utilisant le logiciel ImageJ avec notre algorithme EoJ et la délimitation manuelle des surfaces de dégranulation par 2 experts indépendants et en aveugle. Nous avons montré que les surfaces de dégranulation étaient mesurées de la même manière par les deux experts par rapport au processus automatique (figure 8 A, B). Le test de corrélation approprié (intervalle de confiance de 95%) était de 0,96 (0,74-0,99) et, 0,78 (0,07-0,97) respectivement pour l'expert 1 et 2 par rapport à EoJ (figure 8 C) confirmant la bonne corrélation entre les méthodes manuelles et automatiques.

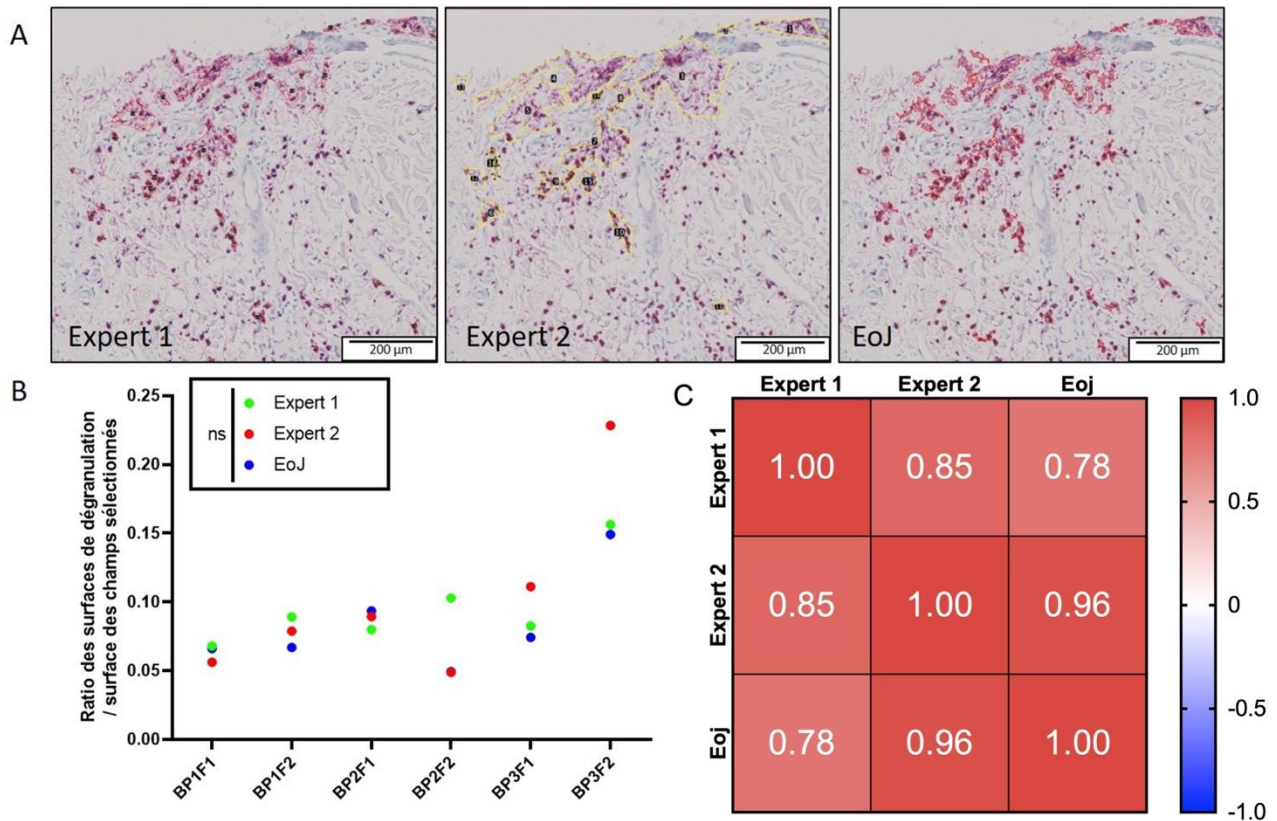
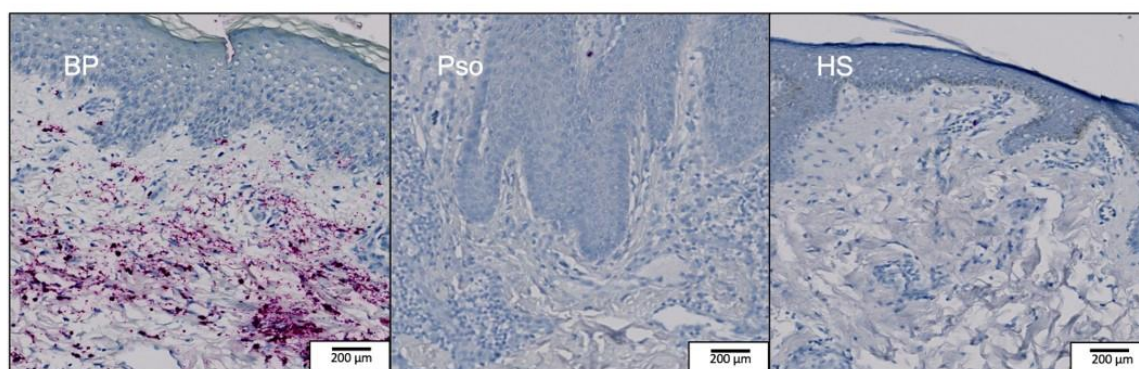


Figure 8 : (A) Présentation histologique des champs sélectionnés et marqués par l'anticorps anti-EPX qui ont été quantifiés manuellement et automatiquement dans 2 champs (F1 et F2) dans 3 sections de biopsies de BP (BP 1 à 3). (B) Comparaison des surfaces de dégranulation entre la quantification manuelle par 2 experts indépendants et la quantification automatique par la méthode EoJ des zones d'étude (n=6). Expert 1 (vert) vs Expert 2 (rouge) vs EoJ (bleu), $p > 0,05$, test de Friedman apparié et test de comparaison multiple de Dunn. NS : non significatif. (C) Matrice de corrélation selon le cas, $p < 0,05$ pour toutes les corrélations.

B. Cohorte de validation

Dans un deuxième temps, nous avons appliqué la mesure de la densité cellulaire et des surfaces de dégranulation de l'algorithme EoJ à tous les échantillons (EoE, NP, BP, psoriasis, peau saine) sur la section totale de la biopsie. Comme prévu, EoJ a confirmé la présence significativement plus élevée de PNE intacts dans la peau des patients atteints de BP par rapport aux patients atteints de psoriasis et aux sujets sains (figure 9).

A



B

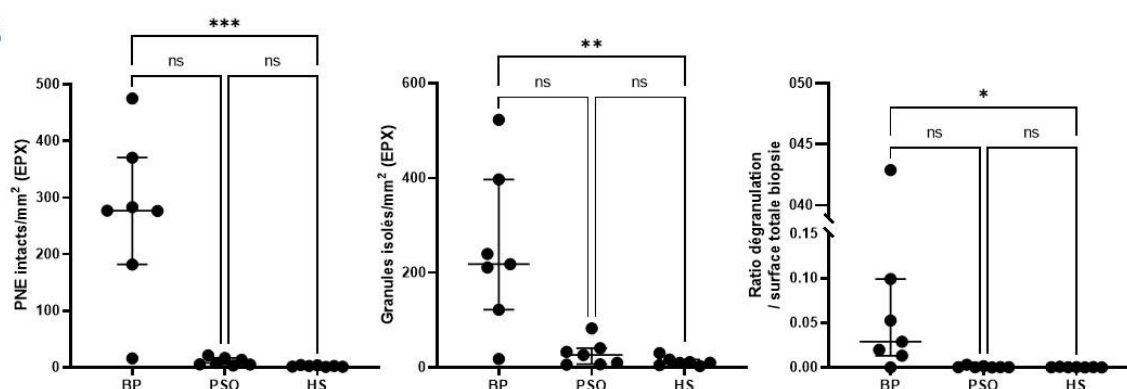


Figure 9 : (A) Biopsies représentatives de BP, psoriasis, peau saine (marquage anti-EPX, HPF x200) (B) Comparaison de la densité de PNE (cellules/mm² à gauche), de la densité des granules isolés (granules/mm², au milieu) et du ratio de dégranulation (à droite) entre les groupes (BP n=7, psoriasis n=7 et peau saine n=8 ; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) selon un test non paramétrique non apparié de Kruskal-Wallis, avec test de comparaisons multiples de Dunn. Les surfaces de dégranulation sont exprimées par le rapport des surfaces de dégranulation mesurées sur la surface totale mesurée de la biopsie.

Nous avons ensuite comparé 3 maladies éosinophiliques endommageant 3 organes différents : EoE, BP et NP (figure 10). La densité médiane de PNE intacts était significativement plus élevée dans le groupe EoE ($653,6 \pm 168,0$ PNE/mm²), comparé au groupe NP ($271,2 \pm 136,1$ PNE/mm², $p<0,01$), et au groupe BP ($268,6 \pm 144,1$ PNE/mm², $p<0,01$) en considérant la coloration des lames entières. La densité en PNE intacts était similaire entre les groupes NP et BP ($p=0,97$). De plus, la densité de granules isolés sur toute la section (granules/mm²) était plus élevée dans le groupe EoE ($481,9 \pm 163,2$ granules/mm²) par rapport au groupe NP ($117,7 \pm 46,0$, $p<0,001$) et au groupe BP ($247 \pm 167,7$, $p<0,05$). Ensuite, nous avons effectué l'analyse des surfaces de dégranulation (c'est-à-dire les surfaces comprenant des granules regroupés et des agrégats de PNE) : le ratio de dégranulation était plus élevé dans les EoE et les PB (respectivement 0,88 IQR 0,80-0,93, $p<0,01$ et 0,78 IQR 0,65-0,92, $p<0,05$) par rapport aux NP (0,19 IQR 0,14-0,24). Il n'y avait pas de différence entre BP et EoE ($p>0,99$) même si la densité de PNE était significativement plus élevée dans l'EoE.

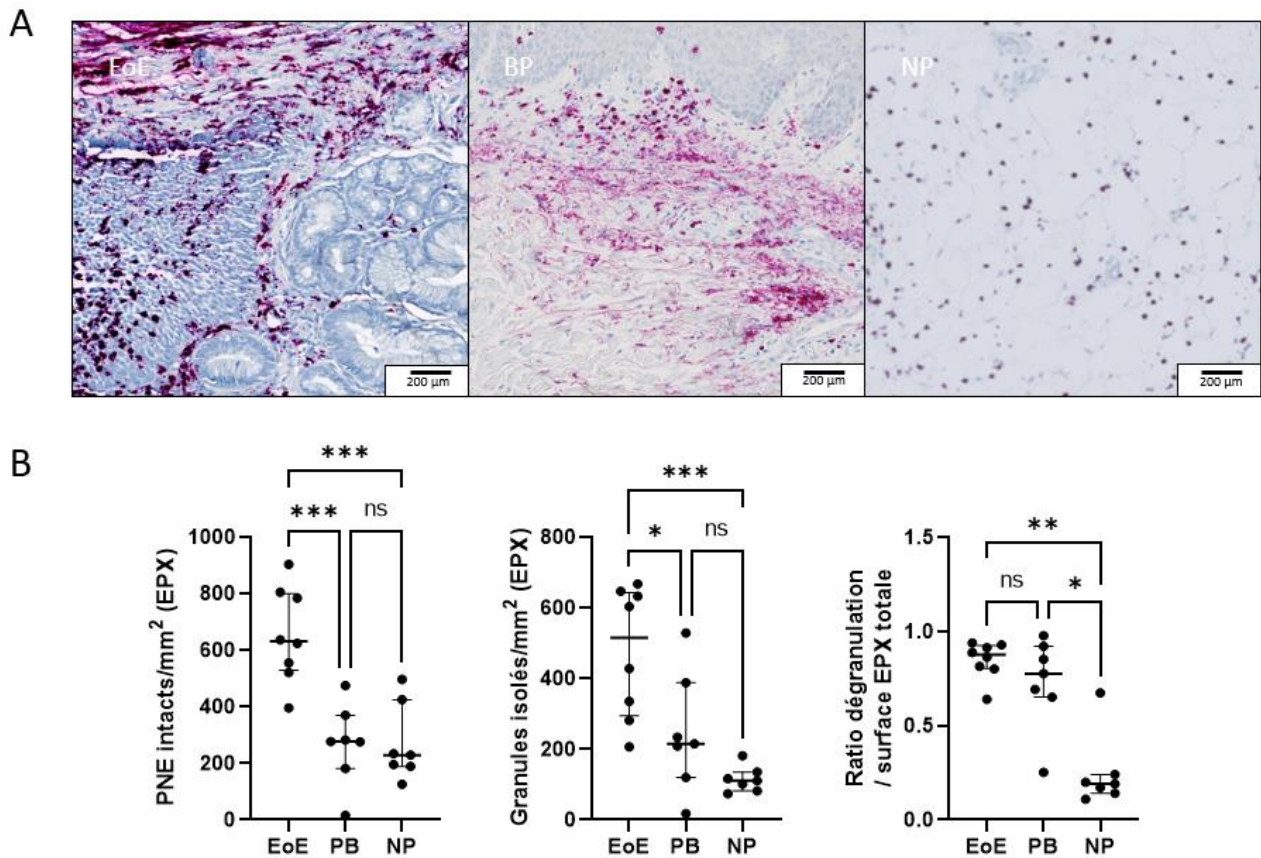


Figure 10: (A) Images représentatives de biopsies d'EoE, de BP et de NP (marquage anti-EPX, HPF x200) (B) Comparaison de la densité de PNE intacts (cellules/mm²) (gauche), de la densité de granules isolés (granules/mm²) (milieu) et des rapports de surface de dégranulation (droite) entre les groupes (EoE n=7, BP n=6, NP n=5 ; *p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001) test ANOVA ordinaire non apparié, avec test de comparaisons multiples de Holm-Sidak. Le rapport de dégranulation est la surface des granules isolés extracellulaires et des zones de dégranulation sur les surfaces totales d'EPX. La surface EPX totale est la somme des surfaces des PNE intacts, des surfaces des granules isolés et des surfaces de dégranulation.

En effet, lorsque nous analysons qualitativement les différents paramètres de l'infiltrat éosinophile, nous avons constaté que la densité des PNE intacts, la densité des granules isolés et le ratio de dégranulation étaient hétérogènes (figure 11 A, B). De plus, la présence d'un infiltrat dense de PNE intacts n'était pas systématiquement associée à un ratio de dégranulation élevé (figure 11 C) puisque pour un patient donné avec une densité élevée en PNE/mm², le ratio de dégranulation pouvait être, à l'inverse, faible.

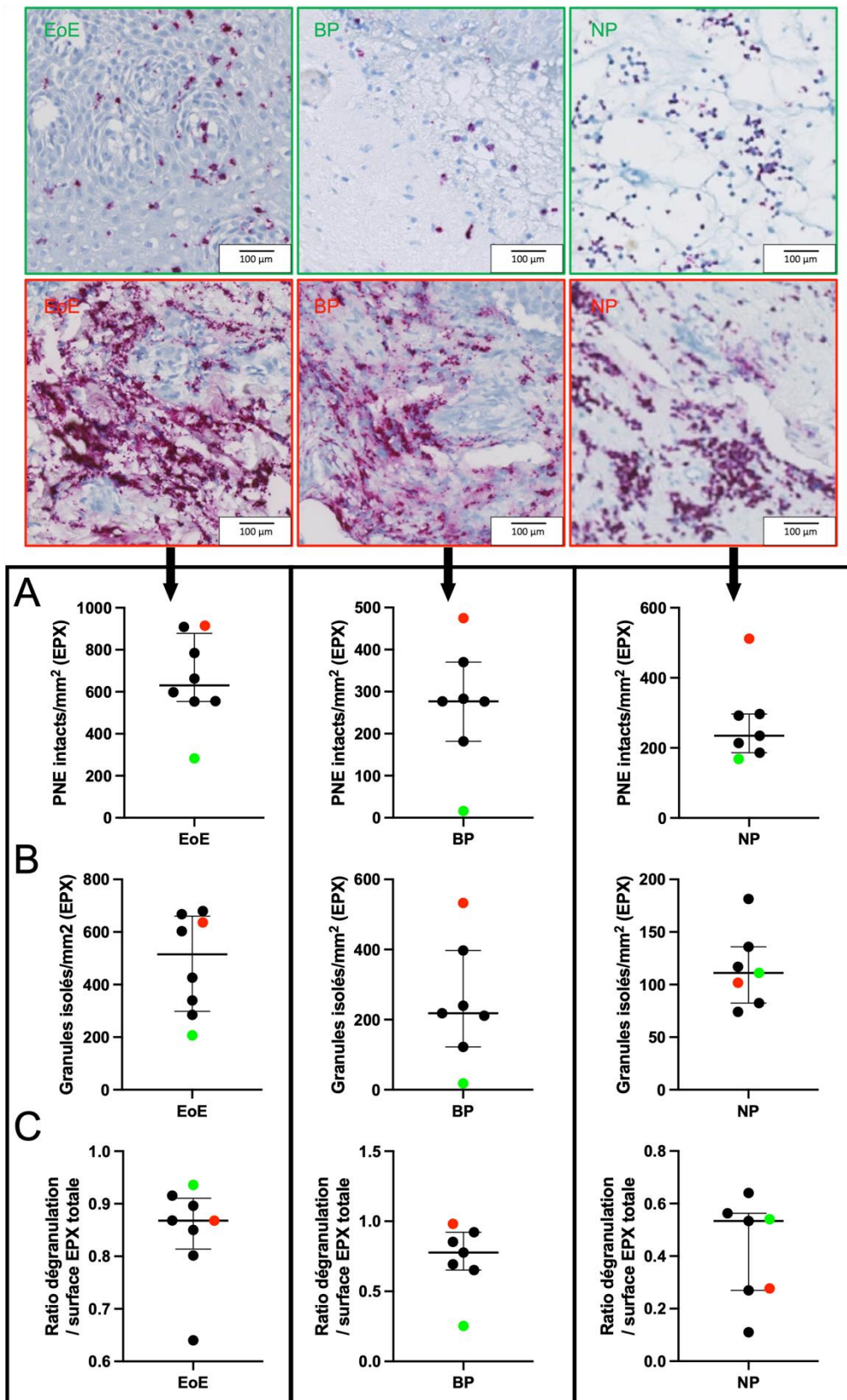


Figure 11: Biopsies représentatives des patients atteints d'EoE, BP et NP avec un infiltrat de faible densité (A, vert) en comparaison avec biopsies présentant un infiltrat de haute densité avec de nombreux agrégats de PNE (B, rouge). Représentation graphique de l'infiltration hétérogène par les PNE tissulaires concernant la densité de cellules intacts, la densité de granules isolés et le rapport des surfaces de dégranulation exprimée par rapport à l'ensemble du marquage anti-EPX (C). La densité en PNE intacts la plus élevée de la série est représentée graphiquement par un point rouge et l'infiltration la plus faible par des points verts.

Points clés :

- Validation d'une technique originale automatique de quantification par rapport à une technique manuelle et forte corrélation entre les deux méthodes,
- Quantification pour la première fois du niveau de dégranulation dans différents tissus issus de patients souffrant de maladies éosinophiliques différentes,
- Présence d'un ratio de dégranulation variable selon les pathologies et entre les patients atteints d'une même maladie,
- Intérêt de ne pas considérer uniquement le nombre de PNE mais également son niveau de dégranulation, ce qui est possible grâce à cette méthode de quantification.

C. Application aux toxidermies

1. Étude de la dégranulation cutanée des PNE

Nous avons donc inclus rétrospectivement 18 patients atteints de DRESS, 17 patients atteints d'EMP et prospectivement 14 patients atteints d'EMP+Eo issus de l'étude DRESSEo. Les données cliniques et anamnestiques sont présentées en annexes 1 à 3. Les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 7.

	EMP (n=17)	EMP+Eo (n=14)	DRESS (n=12)
Femme (%)	10(59)	9(64)	11(61)
Âge médian (années, IQR)	60(32-74)	65,5(63,3-74,8)	52,5(39,25-70)
Éosinophilie médiane (/mm ³ , IQR)	200(100-325)	930(700-1075)	3700(1700-5200)
Délai médian médicament-éruption (jours, IQR)	10(7-15)	10(6-34)	18,5(11,25-30)
Délai médian éruption-biopsie (jours, IQR)	4(3-8)	3(2,25-6)	6,5(4-14,25)
Durée moyenne d'hospitalisation en jours (ET)	NC	8(8,7)	19,21(14,51)

Tableau 7: Principales caractéristiques des groupes toxidermies pour l'analyse de la dégranulation cutanée. NC : non concerné ; IQR, intervalle interquartile ; ET, écart type à la moyenne.

Après marquage par l'anticorps anti-EPX (figure 12 A), l'algorithme EoJ a donc été appliqué à ces groupes et comparé à un groupe témoin sain. La densité en PNE (par mm² de surface tissulaire) était significativement plus importante dans le groupe EMP+Eo (30,49 PNE/mm² IQR 15,53-69,30) en comparaison aux groupes EMP, DRESS (respectivement 0,44 PNE/mm² IQR 0,09-0,86 et 0,62 PNE/mm² IQR 0-2,94) et aux sujets sains (0,67 PNE/mm² IQR 0,43-1,48). Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes EMP et DRESS (figure 12 B). De même, concernant la densité de dégranulation (granules/mm² de surface tissulaire), les résultats étaient similaires avec une augmentation significative de la dégranulation chez les patients EMP+Eo (30,61 granules/mm² IQR 16,36-52,27) en comparaison aux groupes EMP, DRESS (respectivement 1,09 IQR 0,58-1,84 et 0,76 IQR 0-1,99) et aux sujets témoins sains (HS, 0,98 IQR 0,51-10,35). L'analyse des ratios de dégranulation exprimés sur la surface de coupe totale a confirmé une surface de dégranulation plus importante dans le groupe EMP+Eo (0,001 IQR 0,0004-0,01) en comparaison aux groupes EMP et DRESS (figure 12 C). Néanmoins, lorsque le ratio de surface de dégranulation rapporté à la surface totale de marquage anti-EPX (tableau 8), il n'existait pas de différence entre les groupes entre les toxidermies (respectivement un ratio médian de 0,65 IQR 0,4-0,76, 0,69 IQR 0,52-0,85 et 0,53 IQR 0,40-0,96 pour les groupes EMP, EMP+Eo et DRESS) ainsi qu'entre les groupes et le groupe témoin sain (0,64 IQR 0,58-0,67) (figure 12 D).

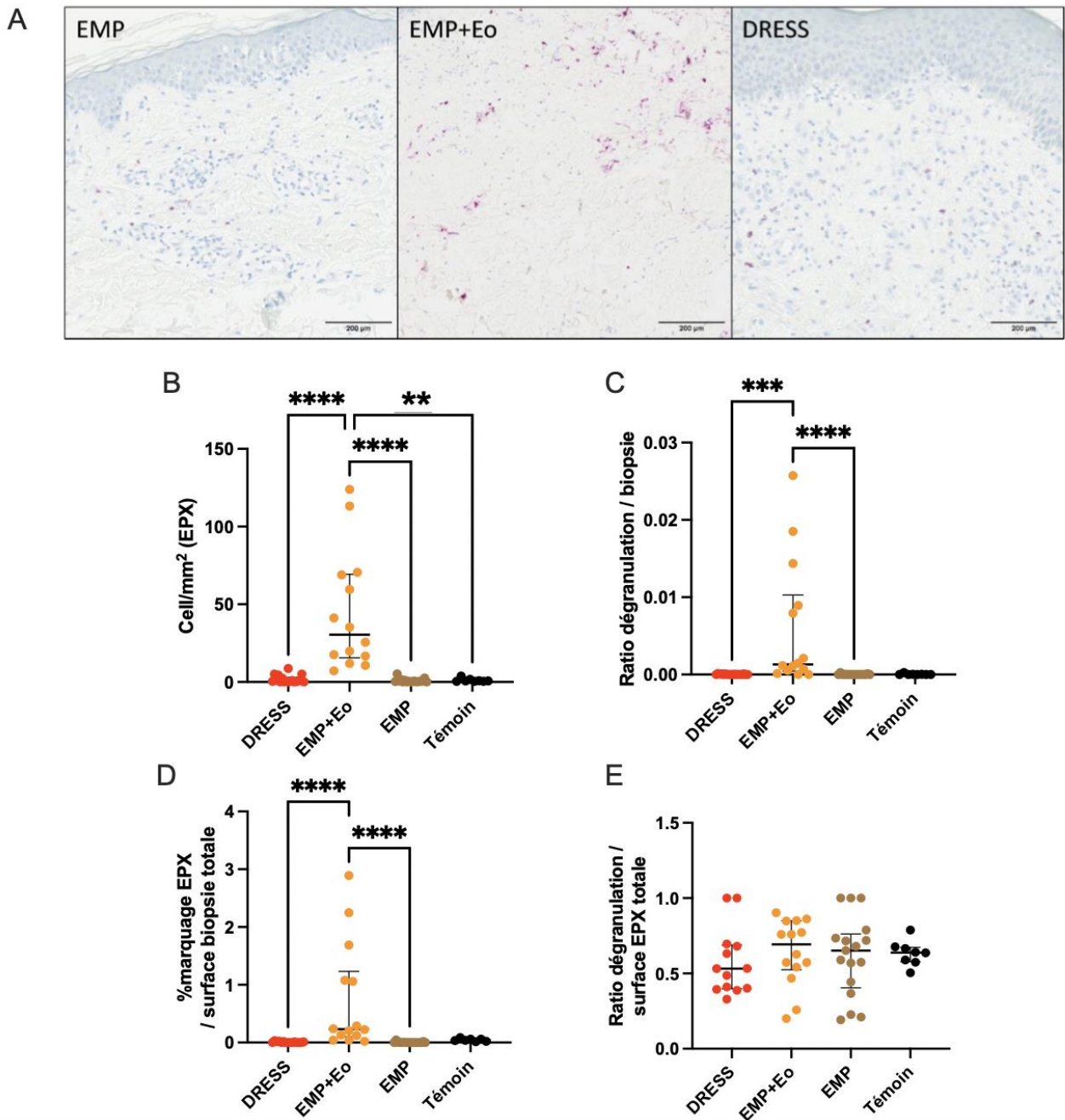


Figure 12: (A) Images représentatives du marquage anti-EPX pour les 3 groupes de l'étude (EMP, EMP+Eo, DRESS). (B) Quantification automatisée du marquage anti-EPX dans les groupes EMP, EMP+Eo et DRESS concernant la densité en PNE, (C) les surfaces de dégranulation rapportées à la surface de la biopsie, (D) le pourcentage de marquage anti-EPX rapporté à la surface de la biopsie et (E) le ratio de dégranulation. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, en l'absence de précisions, les comparaisons ne sont pas significatives.

Comme observé dans notre cohorte de validation en étape 2, à l'échelle individuelle, au sein d'un même groupe toxidermie, on observait une variabilité de dégranulation avec des patients présentant essentiellement un infiltrat fait de PNE intacts (ratio plus proche de 0), des patients présentant essentiellement des granules isolés ou des surfaces de dégranulation (ratio proche ou égal à 1) et un groupe hétérogène majoritaire composé de patient entre les 1^{er} et 3^{ème} percentiles correspondant aux patients ayant à la fois des cellules isolées et de la dégranulation.

Ratio de dégranulation / surface EPX totale	DRESS n=13*	EMP+Eo n=14	EMP n=17	Témoin n=8
Minimum	0,33	0,2	0,19	0,5
25% Percentile	0,4	0,52	0,4	0,58
Médiane	0,53	0,69	0,65	0,64
75% Percentile	0,69	0,85	0,76	0,67
Maximum	1	0,9	1	0,79

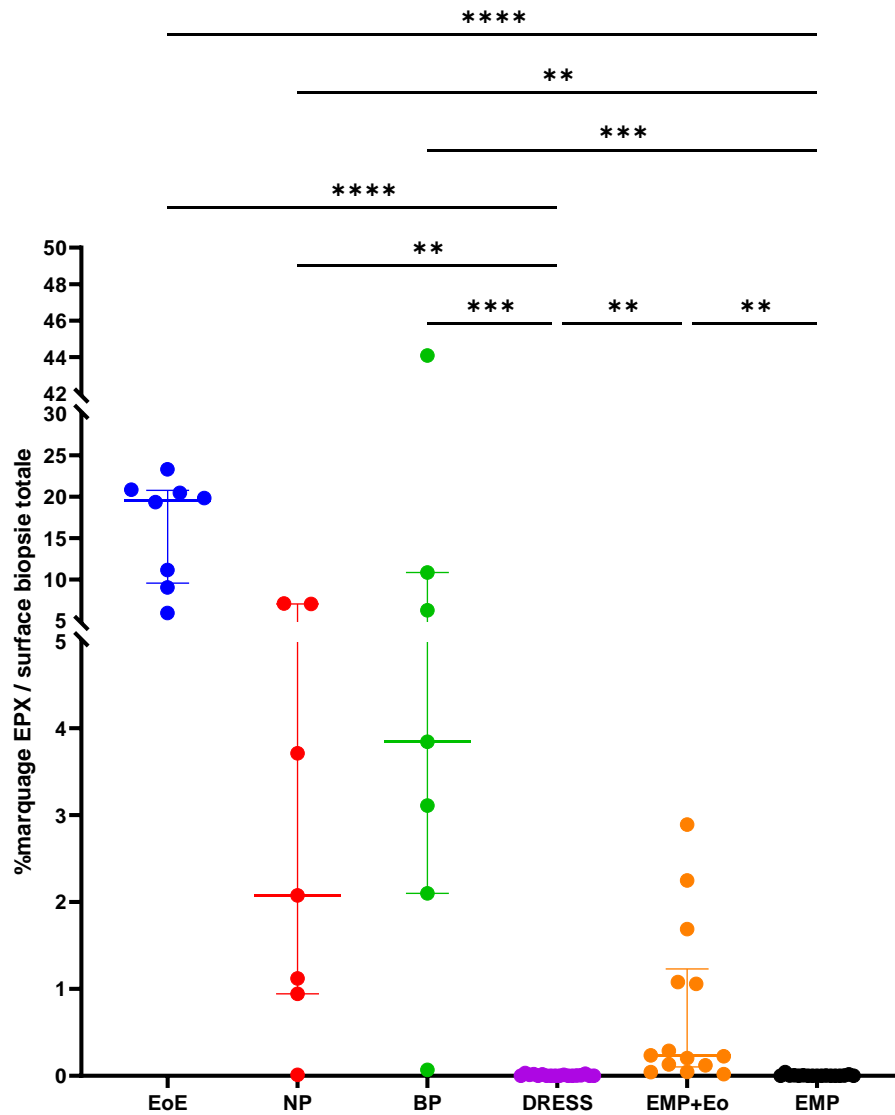
Tableau 8 : Valeurs des ratios de dégranulation exprimés sur la surface EPX marquée totale dans les 4 groupes d'intérêt. *le ratio ne peut être exprimé en l'absence de tout marquage comme observé dans 5 sujets du groupe DRESS où les PNE et granules isolés et non isolés étaient absents.

Il est à noter que le pourcentage de marquage EPX rapporté à la surface totale de la coupe biopsique était faible dans les 4 groupes (avec un maximum à 2,89% dans le groupe EMP+Eo qui avait la plus grande surface de dégranulation détectée versus 0,04%, 0,03 et 0,08% dans les groupes EMP, DRESS et témoin) (tableau 9).

%EPX/biopsie	EMP n=17	EMP+Eo n=14	DRESS n=15	Témoin n=7
Minimum	0,0001807	0,02012	0,0001679	0,01547
25% Percentile	0,0005078	0,1017	0,001326	0,02089
Médiane	0,002411	0,2315	0,002866	0,03679
75% Percentile	0,004768	1,231	0,0161	0,05904
Maximum	0,04396	2,891	0,03268	0,08523

Tableau 9 : Expression du pourcentage de marquage anti-EPX rapporté à la surface du prélèvement biopsique correspondante dans les groupes EMP, EMP+Eo et DRESS

A titre de comparaison, il existait une variabilité importante entre les différentes pathologies en termes d'infiltrat à PNE mais également à l'échelle individuelle comme l'illustre l'expression du pourcentage de surface marquée par l'anti-EPX sur la surface biopsique (figure 13). On observait un pourcentage de surface marquée, rapportée à la surface biopsique, plus important dans le cadre de l'infiltrat de l'EoE (19,6% IQR 9,6-20,8). Dans le cadre d'une pathologie à PNE à tropisme cutané (BP), on notait un pourcentage médian de marquage à 3,8% IQR 2,1-10,9 qui était plus élevé que celui observé dans les toxidermies.



%EPX/biopsie	EoE n=8	NP n=7	BP n=7	DRESS n=18	EMP+Eo n=14	EMP n=17
Minimum	5,9780	0,0105	0,0701	0,0000	0,0201	0,0002
25% Percentile	9,5760	0,9445	2,0990	0,0003	0,1017	0,0005
Médiane	19,6100	2,0770	3,8450	0,0021	0,2315	0,0024
75% Percentile	20,7800	7,0730	10,8600	0,0127	1,2310	0,0048
Maximum	23,3300	7,1080	44,0900	0,0327	2,8910	0,0440

Figure 13: Expression du pourcentage de marquage anti-EPX rapporté à la surface du prélèvement biopsique correspondante. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ selon un test de Kruskal-Wallis et un test de comparaison multiple de Dunn.

Nous proposons la synthèse suivante concernant l'importance de l'infiltrat à PNE, l'infiltrat de granules et le ratio de dégranulation au cours des pathologies de notre étude (tableau 10).

	Densité PNE/mm ³	Densité granules/mm ³	Ratio de dégranulation
DRESS	+/-	=	=
EMP+Eo	+	+	=
EMP	=	=	=
Psoriasis	=	=	=

Tableau 10 : Tableau de synthèse de la densité d'infiltration cutané par les PNE intacts, les granules isolés et le ratio de dégranulation des PNE dans les toxidermies de l'étude par rapport aux témoins sains (peau saine).

Points clés :

- Il existe un niveau faible de dégranulation dans la peau au cours du DRESS et les autres toxidermies érythémateuses,
- Il existe un faible infiltrat à PNE au cours des toxidermies en comparaison à d'autres pathologies éosinophiliques.

2. Étude de la dégranulation des PNE dans les organes

Afin de comparer l'état d'activation des PNE dans la peau par rapport à d'autres organes, dans le cadre d'un appel à cas national, nous avons pu recueillir des cas rétrospectifs de DRESS pour lesquels étaient disponibles des échantillons sous forme de blocs inclus en paraffine permettant à la fois l'étude de la dégranulation dans la peau et l'organe impliqué. Un marquage immunohistochimique anti-EPX et une quantification automatisée ont été réalisés pour permettre la comparaison entre l'atteinte cutanée et l'organe touché. Nous avons pu recueillir les blocs de tissus de 3 patients atteints de DRESS avec respectivement une atteinte colique, une atteinte hépatique et une atteinte rénale. Les principales caractéristiques des patients sont rappelées dans le tableau 11.

	Genre	Âge	Médicament(s) imputable(s)	Délai entre les biopsies (jours)	Description histologique	Taux PNE (biopsie peau)	Taux PNE (biopsie organe)	Taux PNE maximal (G/L)
DRESS n°1 atteinte colique	H	25	Vancomycine, caspofungine, méropénème	15	Colite avec infiltrat à PNE, nombreux corps apoptotiques, chorion oedémateux à infiltrat lympho-plasmocytaire et à PNE. CMV négatif	NC	0,8	5,2
DRESS n°2 atteinte hépatique	H	37	Carbamazépine, colimycine, tigécycline, lansoprazole, héparines, furosémide	2	Cholangite lymphocytaire, éosinophiles dans les espaces portes. Architecture conservée. Pas de nécrose des lobules.	2,4	0,0	2,4
DRESS n°3 atteinte rénale	H		Pénicilline G, imipénème/cilastatine	19	Nécrose tubulaire aiguë et infiltrat inflammatoire interstitiel	0,62	1,0	3,6

Tableau 11 : Principales caractéristiques des patients atteints de DRESS pour la comparaison de l'atteinte cutanée et d'organe. NC, non connu.

L'analyse du marquage immunohistochimique a mis en évidence la présence de PNE dans les peaux et les organes des 3 patients (figure 14). L'infiltrat le plus dense en termes de PNE intacts et granules isolés était celui observé dans l'atteinte colique. A l'inverse, l'infiltrat le moins dense était observé dans le cas de l'atteinte hépatique. En termes de densité de l'infiltrat à PNE intacts, l'infiltrat dans la peau des 3 patients était moins dense en comparaison aux organes touchés (figure 15). L'analyse des ratios de dégranulation rapportés à la surface marquée totale a mis en évidence des niveaux de dégranulation plus élevés dans les organes en comparaison à la peau notamment au niveau rénal où la différence était la plus importante entre la peau et l'organe.

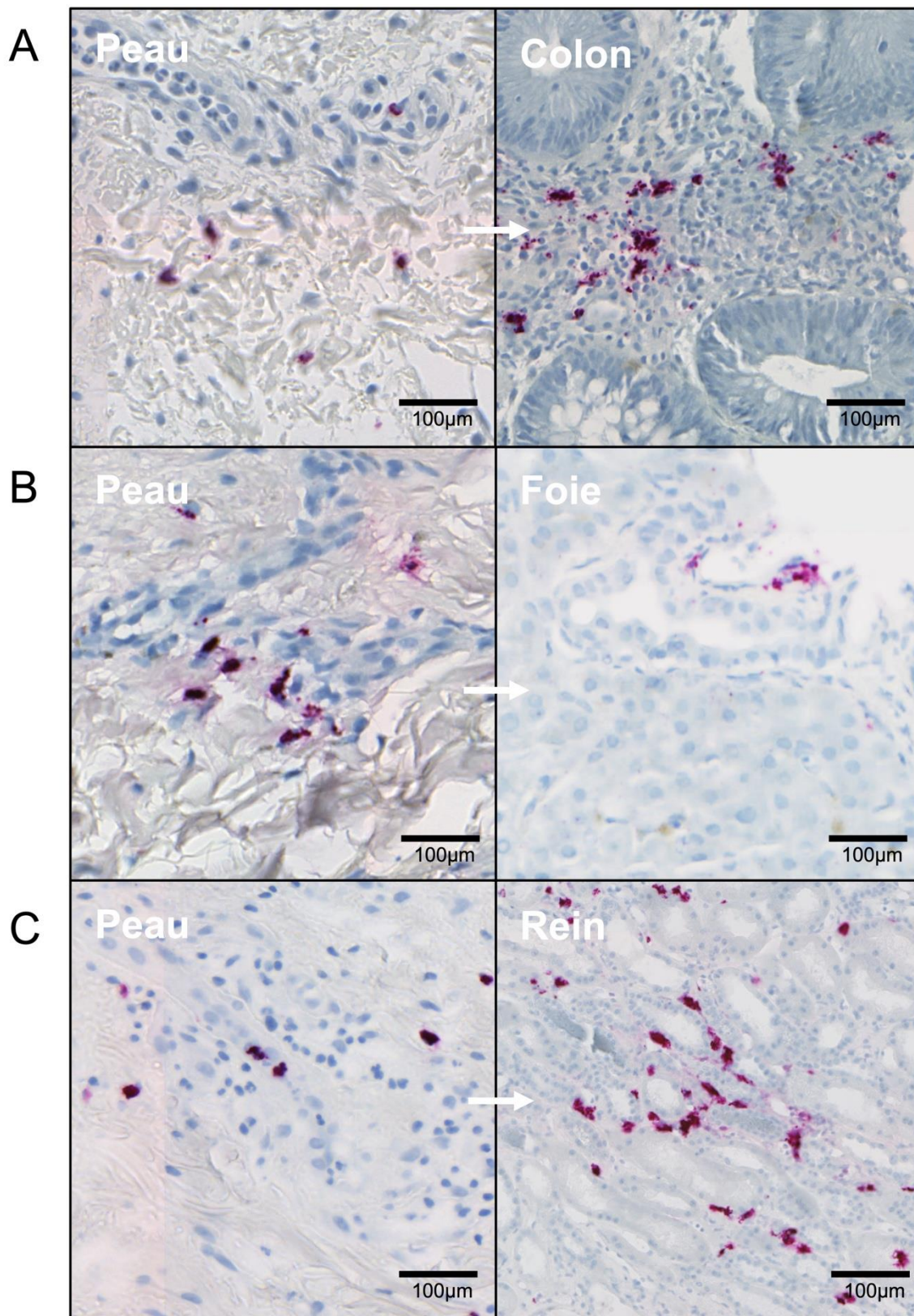
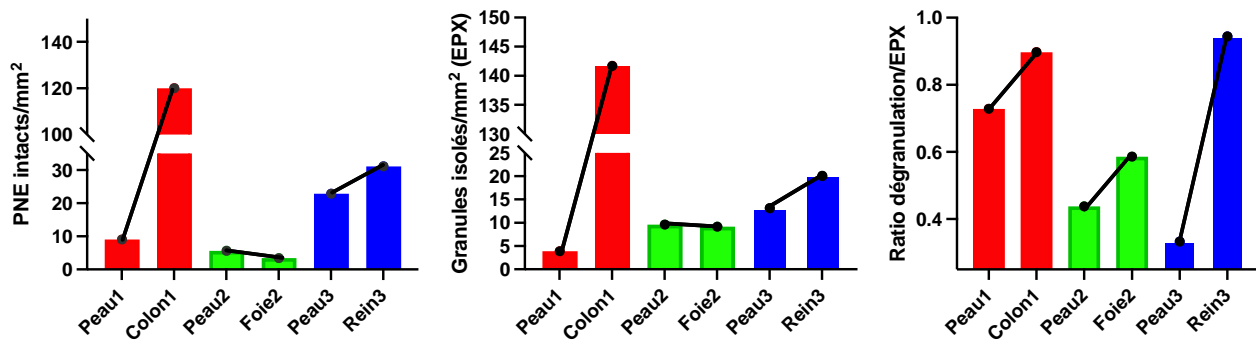


Figure 14 : Images histologiques représentatives des infiltrats à PNE dans le cadre de 3 patients atteints de DRESS avec atteinte cutanée et une atteinte concomitante respectivement (A) colique, (B) hépatique et (C) rénale. Marquage anti-EPX sur bloc inclus en paraffine, HPF x200.



Patient	Organe	PNE intacts/mm ²	Granules isolés/mm ²	Dégranulation/EPX
1	Peau	9,05	3,90	0,73
	Colon	120,03	141,69	0,90
2	Peau	5,65	9,64	0,44
	Foie	3,45	9,16	0,59
3	Peau	22,85	13,12	0,33
	Rein	31,14	20,07	0,94

Figure 15 : Comparaison des paramètres histologiques de l'infiltrat à PNE dans le cadre d'une confrontation peau/organe chez les patients atteints de DRESS. Respectivement en rouge, vert et bleu : patients atteints de DRESS avec atteinte cutanée associée à une atteinte respectivement colique, hépatique et rénale imputables au DRESS.

Points clés

- Le niveau de dégranulation est plus élevé dans les organes internes par rapport à la peau au cours du DRESS dans ces 3 cas,
- Cela souligne l'intérêt de ne pas considérer uniquement le nombre de PNE dans les tissus mais surtout le niveau de dégranulation rapporté au marquage immunohistochimique total, ce que nous appelons le ratio de dégranulation.

IV. Discussion

A. Mise au point d'une technique performante pour l'analyse de la dégranulation tissulaire des PNE

Dans la première étape, nous avons développé un système de quantification automatique capable de détecter de manière simultanée toutes les caractéristiques histopathologiques des infiltrats tissulaires à PNE : PNE intacts, granules extracellulaires isolés et surfaces de dégranulation. Nos résultats ont montré des résultats similaires entre la double analyse manuelle indépendante et la méthode automatique pour les différentes images histologiques informatives de l'infiltration à PNE dans les tissus cutanés (BP), confirmant la validité de notre approche originale de quantification. Premièrement, cette méthode automatique a l'avantage de permettre d'évaluer la densité des PNE de manière précise, objective et reproductible, et de gagner du temps ; et deuxièmement, de permettre la mesure des " surfaces de dégranulation " lorsque la quantification manuelle des granules individuels ou des PNE altérés n'est pas possible en raison de leur regroupement. Contrairement aux outils disponibles dans la littérature, la détection n'est pas exclusivement basée sur la quantification de la surface de coloration sans distinction entre cellules isolées et agrégées, et granules. L'intérêt de notre méthode réside dans la possibilité d'exprimer le niveau de dégranulation (granules isolés, agrégats de PNE, granules agrégés) par rapport à la surface totale de marquage, permettant ainsi de prendre en considération la densité de cellules intactes non dégranulées dans l'infiltrat. Il est possible d'identifier des situations de dégranulation variable dans un tissu mais il est important de prendre en considération la proportion du marquage sur la coupe pour l'interprétation du niveau de dégranulation. En effet, il est possible d'observer des variations du ratio de dégranulation même en présence de quelques granules ; c'est là tout l'intérêt de notre outil qui est capable de détecter et de décrire le niveau de dégranulation à l'échelle de quelques cellules ou quelques granules sur une coupe. De plus, l'avantage de ce procédé est l'exhaustivité du processus qui permet analyse de la lame de biopsie entière, et donc une meilleure interprétation de la densité des cellules et des granules contrairement aux méthodes manuelles conventionnelles qui sont limitées à de petits champs sélectionnés, et qui restent subjectives et chronophages (183, 184, 186). L'utilisation d'une section biopsique entière pourrait être utile pour une meilleure représentation de l'infiltration en PNE dans le tissu qui peut être faite de PNE isolés et dispersés (comme on peut l'observer dans les cas de NP fibrotiques) ou au contraire de

PNE agrégées dont la répartition peut être également diffuse sur tout le tissu ou au contraire sous forme de micro-abcès à PNE. C'est une information importante car, à titre d'illustration, il a été montré que les agrégats de PNE sont associés à une plus grande sévérité et à un plus grand risque de récurrence post-chirurgicale de certaines maladies à PNE comme la polyposse naso-sinusienne (187, 188). De la même manière, dans l'EoE, les pathologistes sont parfois confrontés à la présence de nombreux agrégats de PNE, mais leur quantification représente un temps et un effort considérables. Dans tous les cas d'infiltrats denses, la quantification manuelle des agrégats à PNE n'est pas possible (186). L'utilisation de notre outil dans le contexte des maladies éosinophiliques permet une quantification de tous les différents motifs ou « patterns » possibles d'un infiltrat éosinophilique.

B. Confirmation de l'intérêt de la méthode dans l'analyse de la dégranulation tissulaire des PNE dans les maladies éosinophiliques

Dans le deuxième temps d'analyse de notre cohorte, nous avons observé que la densité en PNE était plus élevée dans l'EoE par rapport à la BP et à la NP, les infiltrats dans ces 2 dernières maladies étant similaires. Mais nous avons observé un niveau différent de dégranulation des PNE qui était plus faible dans les NP par rapport aux EoE et BP. Ces données suggèrent que notre outil peut offrir une information supplémentaire concernant les agrégats à PNE qui est impossible à obtenir avec les approches manuelles et les approches automatisées précédentes. Nous suggérons que la dégranulation des PNE dans les tissus devait avoir une signification physiopathologique particulière en fonction de la maladie (189, 190). De plus, une grande variabilité individuelle a été observée au sein de chaque groupe de troubles éosinophiliques, ce qui pourrait suggérer que le degré d'activation et/ou les fonctions reflétées par cette dégranulation peuvent différer d'un patient à l'autre en fonction des différents endotypes potentiels des PNE dans une maladie donnée ou du stade de la maladie (191). Il est intéressant de noter qu'avec notre méthode, quelques granules isolés ont pu être identifiés en dehors de tout infiltrat à PNE significatif dans une maladie inflammatoire de la peau communément non associée à une éosinophilie sanguine ou tissulaire (psoriasis), ce qui n'est pas surprenant étant donné l'inflammation locale observée (192). La limite de notre étude est le petit nombre d'échantillons et l'absence de corrélation clinique qui limitent les conclusions, mais ces données encouragent à étendre cette cohorte de patients et d'autres maladies pour mieux préciser l'endotype fonctionnel des PNE dans les tissus.

C. Faible niveau d'activation des PNE cutanés au cours du DRESS

Dans le troisième temps de notre étude, une analyse de la dégranulation des PNE a été réalisée au sein de nos groupes d'intérêt toxidermie. Alors que nous avons observé une densité de PNE plus importante de façon inattendue chez les patients du groupe EMP+Eo, l'analyse du niveau de dégranulation des PNE exprimé sur la surface du marquage EPX (i.e., prenant en compte l'ensemble des paramètres de la dégranulation du PNE dans le tissu), n'a pas détecté de différence significative entre les groupes EMP+Eo et DRESS. Comme observé dans notre cohorte de validation en étape 2, à l'échelle individuelle, au sein d'un même groupe toxidermie, on observait une variabilité de dégranulation avec des patients présentant essentiellement un infiltrat fait de PNE intacts (ratio se rapprochant de 0), des patients présentant essentiellement des granules isolés ou des surfaces de dégranulation (le ratio est proche ou égal à 1) et un groupe de patients hétérogène, entre les 1^{er} et 3^{ème} percentiles correspondant aux infiltrats mixtes composés à la fois de cellules isolées et de dégranulation mais en aucun cas il ne s'agissait d'un groupe homogène de patients. Le groupe témoin sain n'était pas indemne de la présence très faible de quelques cellules et granules expliquant un ratio de dégranulation qui n'était pas nul. On pourrait expliquer la présence de ces granules par une dégranulation induite par les techniques de biopsie ou de conservation du matériel biopsique, comme il a déjà été montré dans l'intestin que 2 techniques de prélèvement (en utilisant soit une pince endoscopique soit un scalpel) de la muqueuse intestinale pouvaient induire un niveau de dégranulation différent (193). De plus, des fonctions régulatrices dans les tissus par les PNE et leurs granules ont été suggérées notamment au niveau digestif (194). Cet aspect au niveau cutané n'a jamais été exploré à notre connaissance. En outre, notre technique de quantification ayant la capacité de détecter le marquage à l'échelle de quelques cellules ou de quelques granules épars, il n'est pas surprenant que ces éléments aient été détectés mais leur significativité clinique est discutable. Zimmermann et al., rappellent que les PNE ne sont pas des cellules résidentes de la peau et mais qu'elles peuvent y transiter (195). On dispose de peu d'informations sur ce qui constitue un nombre anormal de PNE dans la peau contrairement à d'autres organes. Néanmoins, les seuils de densité de PNE proposés en situations pathologiques n'ont pas montré leur utilité diagnostique à ce jour. Quoi qu'il en soit, il est important de considérer que le marquage EPX dans les 4 groupes était présent en très faible quantité reflétant un infiltrat à PNE de très faible densité rapportée sur l'ensemble de la coupe. En comparaison avec le pourcentage de marquage sur la coupe dans d'autres organes, l'infiltrat éosinophilique était nettement plus faible dans le cas des toxidermies

suggérant une plus faible implication des PNE dans la physiopathologie de l'éruption cutanée (au moins au stade de la réalisation de la biopsie), tandis que dans d'autres situations comme la polypose naso-sinusienne, l'importance de l'infiltrat est fortement corrélée aux manifestations cliniques (196). Il n'y a pas de données dans la littérature sur la significativité clinique de la présence de quelques granules dans un tissu donné. Le PNE est également connu pour ses propriétés régulatrices (197, 198) et déléter un tissu de ses PNE en contexte pathologique n'est pas systématiquement associé à une amélioration clinique comme en attestent les expériences contradictoires en dermatologie et en gastro-entérologie du benralizumab (anti IL-5 récepteur) n'ayant pas montré son efficacité dans la BP mais ayant permis une déplétion des PNE tissulaires et une amélioration clinique dans la gastro-entérite à éosinophiles (199, 200). Il existe donc, sur la base de ces expériences dans les essais cliniques, une dualité fonctionnelle probable des PNE selon les tissus qui n'est pas connue à ce jour.

Nous avons observé une différence inattendue en termes de dégranulation des PNE entre les groupes EMP+Eo et les autres groupes toxidermies. Pour tenter de l'expliquer, il faut noter que le délai entre la survenue de l'éruption et la biopsie cutanée dans le groupe EMP+Eo était le plus court de tous les groupes toxidermies (délai médian de 3 jours IQR 2,25-6) suggérant une possible infiltration précoce et transitoire. Dans le groupe DRESS, le délai de prélèvement après le début des symptômes était le plus long (6,5 jours IQR 4-14,25). Ainsi il n'est pas exclu que l'infiltrat à PNE aurait pu être présent de façon très précoce. Néanmoins nous n'avons pas observé cette dégranulation dans les cas individuels de DRESS dont le prélèvement a été réalisé dans un délai équivalent au groupe EMP+Eo. De plus, il est établi que les granules déposés dans les tissus peuvent persister dans le tissu bien au-delà de la présence des PNE les ayant relargués (201) comme c'est le cas pour l'EPX qui peut persister 7 jours dans un tissu. Or, nous n'avons pas identifié, de façon significative, la présence d'une infiltration de granules isolés ou en amas sans présence de cellules dans nos groupes qui aurait pu être le reflet de la présence préalable des PNE dans le tissu cutané. De même, dans les cas d'EMP+Eo, aucun patient n'a évolué secondairement vers un DRESS mais le médicament avait arrêté précocement dans la survenue de l'éruption et le traitement adapté mis en place (dermocorticoïde). Donc, sur la base de ces arguments, nos données histologiques et évolutives semblent suggérer qu'un EMP avec éosinophilie ne serait pas une forme de passage vers un DRESS et qu'il s'agit possiblement d'une entité distincte en termes de physiopathologie et de pronostic. Il convient de rappeler que les patients n'avaient pas tous le même traitement imputable, ni les mêmes délais d'exposition aux médicaments, ni la même situation immunologique immédiate sous-jacente (choc septique, goutte, épilepsie etc...). Tous ces facteurs

influencent certainement la survenue d'un tableau par rapport à un autre comme le suggère la littérature où par exemple la présentation clinique ou les atteintes d'organes sont notamment associée à des médicaments en particulier (45). L'hypothèse d'un problème technique a par ailleurs été écartée par l'utilisation d'un contrôle positif dans chaque série et par l'obtention de résultats similaires avec un marquages d'autres granules éosinophiliques notamment l'ECP et la MBP (données non montrées).

Par ailleurs ces données rappellent et confirment que dans les toxidermies, le taux de PNE circulants ne préjuge pas de la présence des PNE dans les tissus comme c'est le cas à l'inverse chez les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive (202). En effet, malgré le taux médian le plus élevé dans le groupe DRESS (3700/mm³ IQR 1700-5200), l'infiltrat cutané à PNE était faible chez ces patients.

De façon intéressante, les patients du groupe EMP sans éosinophilie et ceux du groupe DRESS partageaient un faible niveau d'activité des PNE au niveau du tissu cutané (faible dégranulation, faible infiltrat à PNE). D'une part, on sait que la présence de PNE au niveau cutané n'apparaît pas discriminante comme l'a suggéré l'étude de Jindal et al., où 18 patients atteints de DRESS et 20 atteints d'EMP ont été comparés sur le plan histologique et les éléments en faveur du DRESS par rapport au diagnostic d'EMP étaient l'exocytose lymphocytaire, la vacuolisation de l'interface, la spongiose sévère, l'œdème dermique papillaire sévère et la densité plus élevée de l'infiltrat dermique mais pas l'éosinophilie tissulaire (203). De même, Ortonne et al., ont montré dans leur étude que seuls 20% des 36 patients atteints de DRESS dans leur série avaient un infiltrat à PNE (77). Il faut néanmoins noter que ces études ont porté sur une analyse rétrospective sur bloc de paraffine colorés selon un protocole de coloration standard par hématoxyline éosine qui dans notre expérience sous-estime la détection des PNE notamment lorsqu'ils sont en faible quantité contrairement au marquage immunohistochimique des granules (données non montrées). Nos données, basée sur la détection en immunohistochimie, confirment donc non seulement ces données mais apportent une analyse fonctionnelle sur l'état de dégranulation suggérant en plus un faible niveau de dégranulation et donc d'activation locale au niveau cutané dans le DRESS, ce qui n'aurait pas été possible d'évaluer en coloration standard.

Points clés :

Au total, les arguments pour une faible implication des PNE dans la survenue de l'éruption cutanée au cours de la phase précoce du DRESS sont : la faible densité de cellules, et granules au sein du tissu cutané ; l'absence de granules isolés sans aucune cellule intacte, le faible niveau de dégranulation exprimé en terme de densité de granules et les faibles surfaces de dégranulation rapportées à la surface totale de la biopsie et à l'ensemble du marquage immunohistochimique ; l'absence de différence significative en terme de ratio de dégranulation par rapport aux des toxidermies moins sévères avec et sans éosinophilie et aux sujets sains. Nos données indiquent donc que la peau est un mauvais reflet de l'activité potentielle des PNE dans les tissus et que la peau ne peut pas constituer une cible pour l'évaluation du diagnostic, du pronostic, de l'indication ou du suivi des patients atteints de DRESS syndrome.

D. Présence d'un ratio de dégranulation plus élevé dans les organes par rapport à la peau

Le faible niveau d'activation au niveau cutané des PNE a justifié l'analyse du niveau de dégranulation dans les organes dans le DRESS. Nous avons pu montrer 3 atteintes différentes d'organes où le PNE apparaît impliqué davantage dans les lésions tissulaires dans les organes internes que dans la peau sur la base de l'analyse du ratio de dégranulation. De plus, les PNE ne semblent pas impliqués selon la même intensité entre les différents organes suggérant un chimiotactisme sans doute différent selon les organes. Il est important de noter néanmoins que les prélèvements ont été réalisés de façon séquentielle dans le temps avec un écart de 2 à 19 jours entre le prélèvement cutané et le prélèvement d'organe. Nous ne pouvons exclure l'impact de ce délai sur nos observations. De façon intéressante, notre analyse du cas de DRESS avec atteinte rénale constitue à notre connaissance la première description du profil fonctionnel des PNE dans l'atteinte rénale du DRESS. Classiquement, l'atteinte rénale survient dans environ 11 à 15,8 % des cas, ce qui se traduit par une augmentation de l'urée et de la créatinine, et parfois par une protéinurie hématurique ou une éosinophilurie. L'histologie rénale révèle généralement une néphrite tubulo-interstitielle et une angiite nécrosante granulomateuse (204, 205) mais l'infiltrat à PNE n'est pas classiquement décrit, sans doute parce que le rein est rarement biopsié et que cet infiltrat n'est pas spécifiquement recherché dans les cas de la littérature (206, 207). Esposito et al., ont rapporté le cas d'un homme ayant présenté un DRESS induit

par l'allopurinol et une insuffisance rénale aiguë nécessitant une hémodialyse. La biopsie rénale a révélé une néphrite tubulo-interstitielle avec présence de PNE et une vasculite nécrosante des artères intra-lobulaires sans marqueurs systémiques de vascularite. Il s'agit du premier cas de vasculite nécrosante limitée aux reins, ce qui pose la question de savoir si une biopsie doit être systématiquement effectuée chez les patients atteints de DRESS accompagnés d'une insuffisance rénale sévère (139). Ces données suggèrent que l'infiltrat à PNE dans l'atteinte rénale est sans doute sous-estimé et une analyse fonctionnelle lorsqu'il est présent pourrait aider à évaluer l'implication des PNE dans l'atteinte d'organe et ainsi orienter la prise en charge. De même, l'atteinte hépatique n'apparaîtrait pas systématiquement liée à une infiltration par les PNE comme décrit dans la série de Ichai et al., où l'aspect histologique est plus fréquemment celui d'infiltrats lymphoïdes, d'une nécrose intra-lobulaire, d'une hyperplasie des cellules de Kupffer avec hémophagocytose, avec une présence inconstante (5 sur 7 patients dans cette série) d'un infiltrat d'intensité très variable (50). L'étude de notre cas semble confirmer l'absence d'un infiltrat majeur à PNE mais l'étude fonctionnelle de la dégranulation semble suggérer un niveau de dégranulation plus important dans le foie par rapport à la peau chez un même patient. Il faut néanmoins noter que la biopsie par carottage biopsique ne permet pas d'évaluer un infiltrat sur l'ensemble d'un organe et, dans le cas d'infiltrats focaux, cette technique pourrait mettre à défaut l'évaluation de l'infiltrat à l'échelle d'un organe. C'est le cas également dans la technique de biopsie cardiaque où le niveau et la profondeur de la biopsie doit être pris en considération (208). Cependant il faut prendre en considération le fait que l'infiltrat à PNE était faible dans le foie de notre cas suggérant quand même une probable faible implication des PNE dans la survenue de la défaillance d'organe d'autant qu'il existe une littérature suggérant une régulation par les PNE de l'inflammation au niveau hépatique dans des modèles murins d'hépatites médicamenteuses (209). Cette équipe a montré que des souris déplétées en PNE présentaient une exacerbation des lésions hépatiques induites par le paracétamol. De plus, dans ce même modèle, le transfert adoptif de PNE réduisait de manière significative les lésions hépatiques et le taux de mortalité chez les souris. Des études mécanistiques utilisant des souris knock-out IL-4/IL-13 (cytokines produites par les PNE) ont démontré que ces cytokines, en inhibant l'IFN γ , médiaient la fonction hépatoprotectrice des PNE (210). Il était connu que les lésions hépatiques induisaient un recrutement rapide des PNE, qui sécrétaient alors de l'IL-4 pour favoriser la prolifération des hépatocytes quiescents (211). Ces données ont été confirmées dans le cadre des infections hépatiques d'origine parasitaire (douve du foie) (212). Ces données pourraient expliquer la présence d'un faible infiltrat à PNE et un ratio de dégranulation des PNE plus faible dans le foie du patient atteint de DRESS en comparaison aux autres organes. Quant à l'étude du

cas avec atteinte colique, elle confirme que contrairement à d'autres organes, l'infiltrat à PNE dans le tube digestif n'est pas exceptionnel (213-215), sans doute aussi parce que les PNE y sont déjà présents à l'état physiologique en quantité limitée où ils y exercent une activité régulatrice et de veille immunologique (194, 216). Notre équipe a rapporté récemment le cas d'un patient ayant présenté un exanthème maculopapuleux induit par les antibiotiques d'évolution rapidement favorable mais ayant présenté une sténose œsophagienne subaiguë ayant confirmé en histologie la présence d'une infiltrat éosinophilique intense sur la zone de sténose d'évolution favorable sous corticothérapie. Malheureusement il n'a pas été possible de corrélérer cette atteinte à celle de la peau car la biopsie cutanée n'avait pas pu être réalisée au moment de l'éruption qui avait régressé rapidement. Cette observation illustre la notion d'atteinte séquentielle des atteintes d'organes possiblement sous-tendue par des mécanismes de domiciliation cellulaire différentiels (65). Dans le cas de l'atteinte colique, il est intéressant de constater que quand bien même la densité de l'infiltrat à PNE intacts était forte au niveau cutané, le ratio de dégranulation était encore plus élevé au niveau colique suggérant un niveau de dégranulation plus élevé dans les organes en comparaison à la peau au cours du DRESS. Au total, nos données suggèrent un niveau d'activité des PNE plus élevés dans les organes par rapport à la peau en regard. Cette notion pourrait expliquer le succès des stratégies thérapeutiques anti-IL-5 ou anti-IL-5R à l'origine d'une déplétion circulante et tissulaire en PNE au cours du DRESS (173, 176, 180, 200, 217).

Points clés :

Ce qui est connu :

L'éosinophilie tissulaire n'est pas un critère obligatoire, ni discriminant pour le diagnostic de DRESS par rapport aux autres toxidermies érythémateuses,
Le niveau de dégranulation des PNE dans un tissu est le reflet de son activation.

Ce qui n'était pas connu :

Le niveau de dégranulation des PNE dans la peau et les organes au cours du DRESS et des toxidermies érythémateuses.

Ce que nos résultats apportent :

Mise au point d'une technique de quantification automatique rapide et reproductible du niveau de dégranulation des PNE dans les tissus, applicable à tout tissu et toute pathologie éosinophilique,

Faible niveau de dégranulation cutané des PNE au cours du DRESS,

Niveau de dégranulation plus élevé dans les organes internes en comparaison à la peau au cours du DRESS,

Absence de corrélation entre l'éosinophilie sanguine et tissulaire au cours du DRESS.

V. Conclusion

Dans cette première partie du travail, nous avons montré la capacité d'une méthode originale de détection automatique pour l'évaluation de la dégranulation des PNE dans des maladies dont le rôle pathologique des PNE est connu. Nous avons démontré que si les PNE infiltrent le tissu, le niveau de dégranulation des PNE semble ne pas être strictement associée à la densité de cet infiltrat de PNE et diffère entre les maladies mais également entre les patients atteints d'une même maladie.

Utilisée dans le cadre de l'étude des toxidermies, notre technique de quantification a permis de montrer la présence des PNE dans la peau au cours des toxidermies érythémateuses avec ou sans éosinophilie circulante. Cependant, le PNE infiltre plus faiblement la peau que ce que nous aurions pu attendre. Sur la base de l'étude de la dégranulation tissulaire, le PNE apparaît relativement peu activé et donc potentiellement faiblement impliqué dans les lésions cutanées au cours des toxidermies y compris celles où l'éosinophile est un élément classique du diagnostic (DRESS). Le taux de PNE circulants au cours des toxidermies n'apparaît donc pas discriminant pour confirmer l'implication du PNE dans la survenue de dommages cutanés. L'analyse fonctionnelle des PNE tissulaires a montré un état d'activation plus élevé de ces PNE dans les organes atteints en cas de DRESS sévère en comparaison à la peau. L'éosinophilie cutanée apparaît donc comme un mauvais reflet de la sévérité d'une toxidermie et ne permet pas une bonne corrélation au diagnostic et à la sévérité du DRESS.

Ces résultats ont donc justifié l'analyse du profil d'activation du PNE dans le compartiment circulant, 2^e partie de ce travail de thèse.

VI. Publication

- 1) **Article publié dans « Clinical and Experimental Allergy »** : "Automatic quantification method of eosinophilic degranulation in tissues : application for the study of eosinophilic disorders". Disponible en annexe 7.

Auteurs : **F. Dezoteux**, A. Bongiovanni, M. Tardivel, A. Dendooven, JB. Gibier, G. Mortuaire, S. Audry, MH. Gevaert, N. Van Poucke, E. Anglo, G. Lefèvre, D. Staumont-Sallé.

- 2) **Cas clinique publié dans "Dermatitis"** : "Duodenal Stenosis Linked to Drug Reaction With Eosinophilia and Systemic Symptoms". Disponible en annexe 8.

Auteurs : Douxami M, Faure E, Fievet C, Buche S, Azib-Meftah S, Cuypers-Tilmant A, Béné J, Gautier S, Staumont-Salle D, **Dezoteux F.**

Chapitre 3 : Étude du profil phénotypique circulant des PNE au cours des toxidermies érythémateuses et du DRESS syndrome.

I. Introduction

Le PNE possède de nombreux marqueurs à sa surface (121, 218-220) dont l'expression peut varier en fonction de la nature et de l'intensité du stimulus qui a induit son activation. Ces marqueurs comprennent (de façon non exhaustive) notamment des marqueurs d'activation comme CD63, CD69, ou HLA-DR (figure 16) (221), des molécules d'adhésion impliquées dans la migration des PNE du compartiment sanguin vers les tissus (CD44), des récepteurs de cytokines et chimiokines (CRTH2 pour Chemoattractant Receptor homologous molecule expressed on Th2 cells) dont l'expression est le reflet de leur état fonctionnel au niveau circulant. Ces marqueurs peuvent être impliqués dans la survie et la différenciation des PNE comme la sous unité α du récepteur de l'IL-5 (IL-5R α ou CD125). Ces marqueurs membranaires peuvent également être impliqués dans la réponse de type Th2 car participant au recrutement d'autres cellules inflammatoires comme le CRTH2, récepteur sur lequel vient se lier la prostaglandine D2 (PGD2), mais également le récepteur de TSLP impliqué dans le chimiotactisme et la survie des PNE (222). D'autres marqueurs sont impliqués dans le chimiotactisme des PNE au sein des tissus, par exemple le récepteur aux chimiokines C-C de type 3 (CCR3) sur lequel viennent se lier des C-C chimiokines comme les éotaxine-1 (ou chemokine ligand 11, CCL11), éotaxine-2 (CCL24), éotaxine-3 (CCL26) (223).

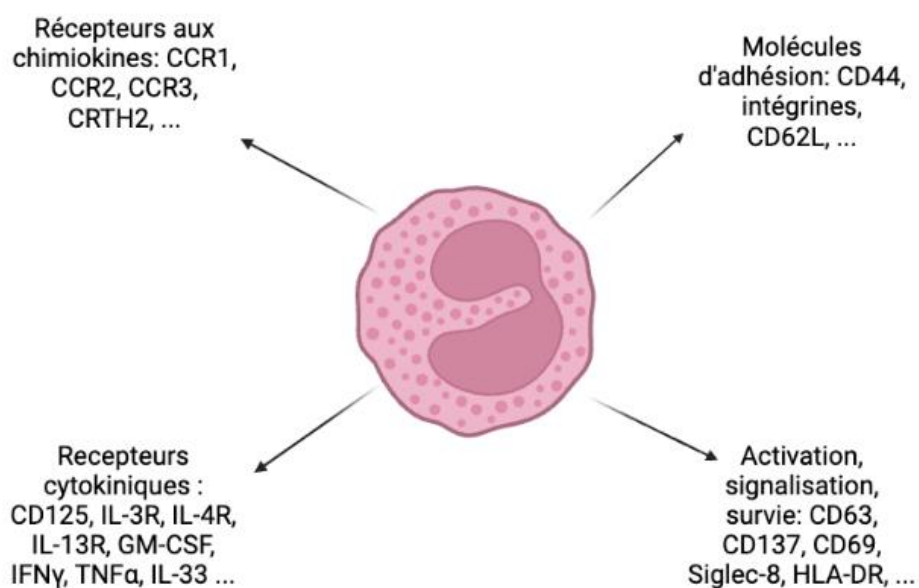


Figure 16 : Principales molécules de surface d'activation exprimées par les PNE adapté d'après Klion et al., 2020 et Carr et al., 2016, crée sur Biorender.com.

Définir le concept de PNE activé repose donc sur un faisceau d'arguments moléculaire (expression de marqueurs d'activation, expression de récepteurs aux chimiokines ou cytokines, molécules d'adhésion, signaux de survie ou anti-apoptotiques, production et sécrétion de protéines cytotoxiques dans le milieu extracellulaire). Nous avons choisi de définir un PNE par l'expression de 8 marqueurs membranaires et de corréler l'expression de ces marqueurs à la sécrétion d'ECP et des cytokines/chimiokines impliquées dans l'homéostasie et l'activité des PNE au niveau circulant (figure 17). Sur la base de la littérature, l'analyse de ces marqueurs était pertinente pour l'exploration du phénotype d'activation des PNE circulants.

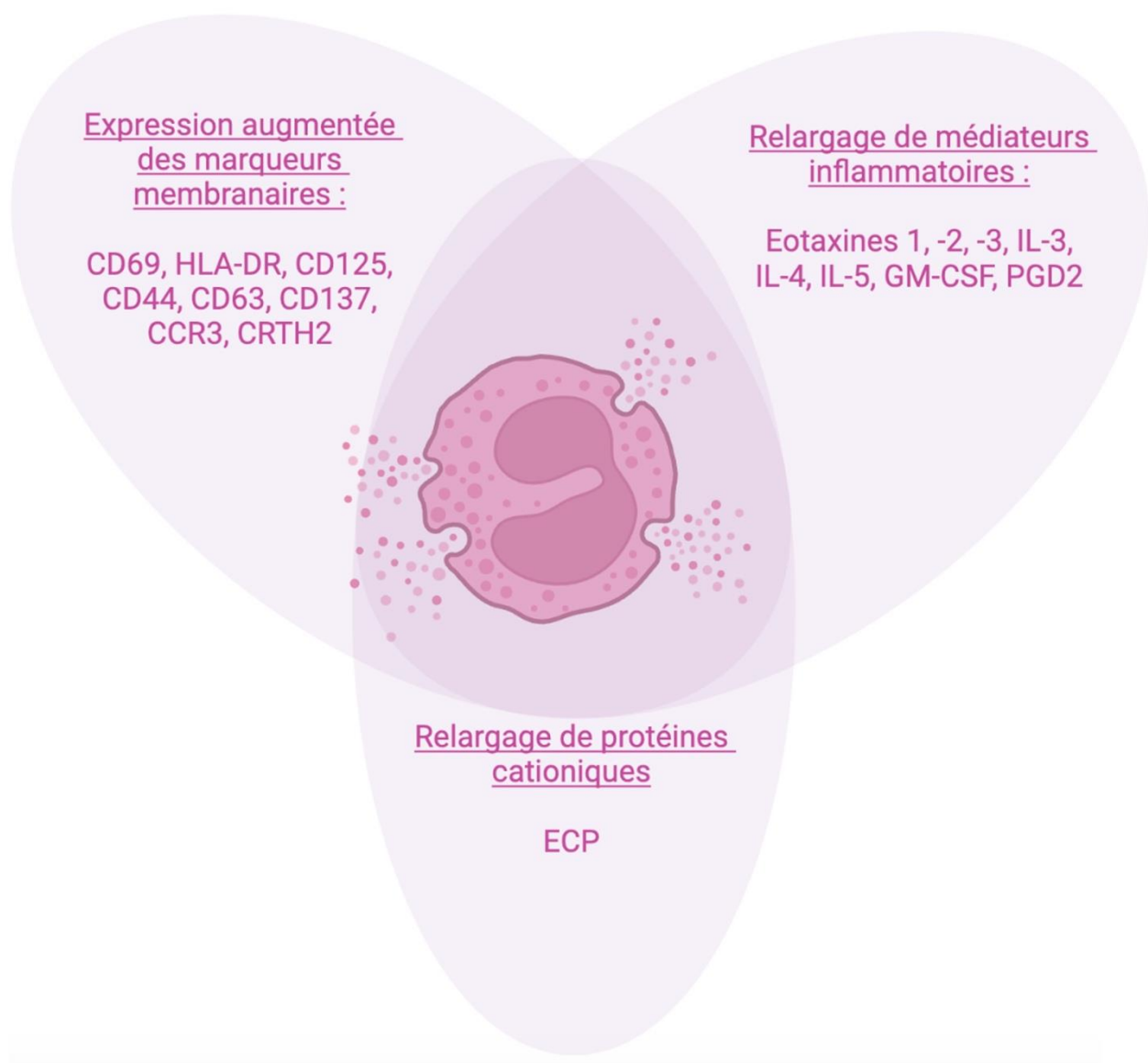


Figure 17: Définition du concept de PNE activé pour notre étude basée sur un faisceau d'arguments moléculaires (créé sur Biorender.com).

Problématique :

L'importance de l'éosinophilie (sanguine) n'est pas associée à la sévérité du DRESS et le niveau d'expression de ces marqueurs sur les PNE n'est pas connu dans le contexte des exanthèmes d'origine médicamenteuse. Par ailleurs, la littérature est hétérogène concernant la polarisation de la réponse immune au cours du DRESS.

Notre objectif était d'explorer le phénotype des PNE circulants et le profil de la réponse immune systémique au cours du DRESS en comparaison à des toxidermies contrôles et des sujets sains. Notre hypothèse est que si la réponse immune systémique est différente dans le DRESS : est-elle principalement Th2 comme le suggère l'efficacité du benralizumab et du mepolizumab ? et dans ce cas, implique-t-elle plutôt les ILC2 ou les lymphocytes T dans la mesure où la littérature n'est pas homogène quant au profil de polarisation lymphocytaire au cours des toxidermies ?

A. Objectifs de l'étude

1. Objectif principal

L'objectif principal était de comparer les profils d'expression membranaire des marqueurs d'activation (CD69, CD125, CCR3, CRTH2, CD44, CD63, HLA-DR et CD137) des PNE circulants entre des patients atteints de DRESS, EMP+Eo et EMP et des sujets sains.

2. Objectifs secondaires

Nos objectifs secondaires étaient de :

- Comparer le niveau de polarisation des cellules T circulantes entre les groupes.
- Comparer l'expression des cytokines intracellulaires Th1, Th2 et Th17 entre les groupes.
- Comparer le nombre d'ILC2 circulantes entre les groupes.
- Comparer les taux sériques de différents médiateurs solubles participant à l'homéostasie et la dégranulation des PNE entre les groupes.

II. Matériel et méthodes

Pour mener à bien ce volet de l'étude nécessitant des prélèvements sanguins à l'état frais pour analyse le jour même en cytométrie, les patients ont été recrutés dans le cadre de l'étude pilote prospective multicentrique nationale DRESSEo dont les critères d'inclusion sont précisés au chapitre 2 (matériel et méthode) pour les 3 groupes de l'étude : EMP,

EMP+Eo et DRESS. Les témoins étaient recrutés dans le cadre de 2 essais actuellement menés dans l'unité et pour lesquels les analyses menées étaient identiques (NCT03816189 et NCT04187976).

A. Prélèvements Sanguins

Une unique ponction de sang veineux périphérique était réalisée dans le cadre du soin. Cinq tubes de 7mL traités à l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) était prélevé dans le cadre de l'étude.

B. Numération des PNE

Une numération des PNE en sang total était effectuée par cytométrie en flux (cytomètre Navios, Beckman Coulter Life Sciences) à partir de 100µL d'un échantillon de sang incubés pendant 10 min avec 2,5µL d'anticorps anti-CD45-KO (B36294 Beckman Coulter) et 2,5µL d'anticorps anti-CD16-PB (B36292 Beckman Coulter). Une lyse des globules rouge était ensuite réalisée à l'aide du TQ-Prep (Beckman Coulter), puis un volume de billes de numération Flow-Count Fluorospheres (7547053, Beckman Coulter Life Sciences, California, US) équivalent au volume de l'échantillon de départ était ajouté. La numération était réalisée sur un cytomètre Navios (Beckman Coulter) en identifiant les PNE selon les critères : SSC^{high}/CD45+/CD16-.

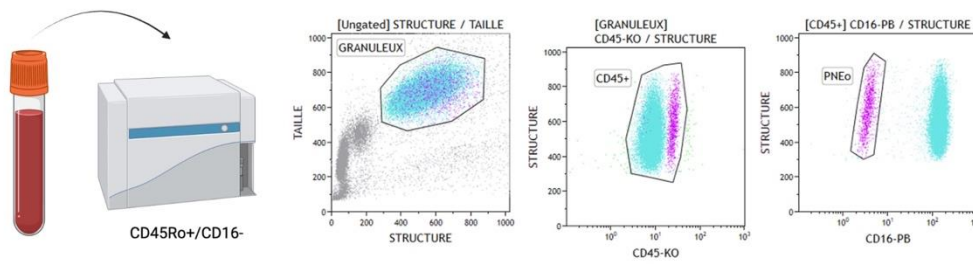
C. Cytométrie en flux des marqueurs d'activation

Cette analyse était faite sur sang total prélevé en tube EDTA. Les marqueurs d'activation d'intérêt étaient répartis entre les deux panels (tableau 12), chacun mis en incubation avec 100 µL de sang pendant 10 min dans l'obscurité à température ambiante. Une lyse des globules rouges était réalisée avec le TQ-Prep (Beckman-Coulter), suivie de 2 lavages successifs à 1800 rotation par minutes (rpm) pendant 5 min avec 3mL de PBS. Le culot cellulaire était repris dans 300 µL de PBS avant analyse par CMF. Nous avons utilisé 3 cytomètres successifs sur la période d'inclusion pour des raisons techniques. Les cytomètres utilisés étaient le NAVIOS cytometer (Beckman Coulter, Brea, California) et 2 CytoFLEX S Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, California). L'identification des PNE était réalisée à partir d'un triple gating en cascade : cellules non altérées sur le diagramme taille/structure, cellules avec structure élevée, CD45 positives (+) et CD16 négatives (-)

(SSC^{high}, CD45+, CD16-) (figure 18). L'analyse des données de cytométrie était réalisée à l'aide du logiciel Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, Brea, California). Afin de garantir la comparaison des médianes de fluorescence entre les différents cytomètres utilisés, nous avons choisi d'exprimer ce paramètre en ratio de fluorescence patient rapporté à la fluorescence d'un pool de sujets sains dont l'analyse de fluorescence a été réalisé pour les mêmes marqueurs et sur les mêmes machines autorisant une comparaison des ratios de fluorescence entre les machines.

	Cible	Dénomination	Clone	Fluorochrome	Quantité (pour 100 µL de sang total)	Société + référence
Panel 1	CD45	Antigène leucocytaire commun	J.33	Krome Orange (KO)	2,5 µL	Beckman Coulter #B36294
	CD16	Récepteur Fc gamma de Type 3	3G8	Pacific Blue (PB)	2,5 µL	Beckman Coulter #B36292
	CD63	Protéine membranaire associée aux lysosomes, n°3	CLBGran/12	Fluorescein IsoThioCyanate (FITC)	8 µL	Beckman Coulter #IM1165U
	CD125	Chaîne alpha du récepteur de l'IL-5	A14	Phycoérythrine (PE)	8 µL	Becton Dickinson #555902
	CD193 (CCR3)	Récepteur 3 des chimiokines C-C	5E8.4	Allophycocyanin (APC)	5 µL	Miltenyi Biotec #130108890
	CD294 (CRTH 2)	Récepteur DP2 des prostaglandines	REA598	Phycoérythrine-Vio 770 (PeVio770)	5 µL	Miltenyi Biotec #130119624
Panel 2	CD45	Antigène leucocytaire commun	J.33	Krome Orange (KO)	2,5 µL	Beckman Coulter #B36294
	CD16	Récepteur Fc gamma de Type 3	3G8	Pacific Blue (PB)	2,5 µL	Beckman Coulter #B36292
	CD69	Lectine de type C	TP1.55.3	Allophycocyanin (APC)	5 µL	Beckman Coulter #A80711
	HLA-DR	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2	G46-6	Phycoérythrine (PE)	8 µL	Beckman Coulter #555812
	CD44	Marqueur d'adhésion et de domiciliation	J.173	Fluorescein IsoThioCyanate (FITC)	8 µL	Beckman Coulter #IM1219U
	CD137	Superfamille des récepteurs du TNF, n°9	4B4-1	Phycoérythrine-Vio 615 (PeVio615)	1 µL	Miltenyi Biotec #130110766

Tableau 12: Panels d'anticorps utilisés pour la cytométrie en flux.



Cible	Fonction
CD44	Adhésion et migration
CD63	Protéine membranaire lysosomale. Passe à la membrane cellulaire après activation.
CD69	Transduction du signal
CD125 (IL-5R)	Récepteur de l'IL-5
CD137	Molécule de costimulation
CCR3	Récepteur de l'éotaxine
CRTH2	Récepteur de PGD2
HLA-DR	Présentation des peptides aux LT CD4

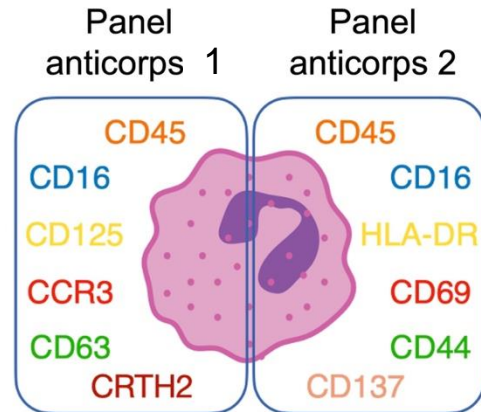


Figure 18: Stratégie de gating des PNE sur sang total et détails des cibles antigéniques au sein des panels 1 et 2.

D. Analyse en clusters et t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding)

Premièrement, une analyse des clusters a été réalisée à l'aide de la fonction FlowSOM du logiciel CytoBANK®. Il s'agit d'un algorithme qui accélère la qualité du regroupement avec des cartes auto-organisées (SOM pour Self-Organizing Maps) qui peuvent révéler la façon dont tous les marqueurs se comportent sur toutes les cellules et qui peuvent détecter des sous-ensembles. Il regroupe donc les cellules en fonction des marqueurs et génère des cartes auto-organisées de clusters, produites sous la forme d'un arbre. Cette méthode présente les résultats sous forme d'arbre MST (Minimum Spanning Tree), où chaque grappe est représentée par un graphique circulaire. Ces graphiques circulaires indiquent les intensités médianes de tous les marqueurs pour toutes les cellules de ce regroupement. La hauteur de chaque segment indique l'intensité : si le segment atteint la limite du cercle, les cellules ont une forte expression pour ce marqueur.

Deuxièmement, en raison du nombre de récepteurs étudiés, nous avons utilisé une méthode d'analyse, non supervisée, permettant une réduction dimensionnelle des données de CMF. L'ensemble de nos données ont été analysées avec l'algorithme t-SNE de la plateforme CytoBANK® (Beckman Coulter). Il permet de regrouper, sur une cartographie bidimensionnelle, les PNE en fonction du niveau d'expression de l'ensemble des marqueurs d'intérêts répartis dans chaque panel, apportant une représentation graphique de leur profil

immunophénotypique.

E. Analyse des ILC2 par CMF

Cette analyse était faite sur sang total prélevé en tube EDTA. L'acquisition en CMF était réalisée sur un cytomètre Navios (Beckman-Coulter).

Une incubation de 4mL de sang avec 4mL de solution de lyse (Lysing solution (10X) IOTest 3 Lysis 10X, réf. A07799, Beckman Coulter, Brea, California) et 36mL d'eau distillée était réalisée pendant 10 min sous agitation. Une centrifugation pendant 10 min à 150g était ensuite réalisée. Le surnageant était éliminé et les anticorps étaient ensuite ajoutés (tableau 13).

Anticorps cible	Dose pour 1 test	Références
CD45-Krome Orange Antigène Leucocytaire Commun	10µL	B36294, Beckman Coulter, Brea, California
CRTH2-FITC Récepteur 2 des prostaglandines D2	10µL	B42020, Beckman Coulter, Brea, California
CD161-PC7 Lectine type C	10µL	B30631, Beckman Coulter, Brea, California
CD127-APC Récepteur IL7	10µL	B42026, Beckman Coulter, Brea, California
(CD3, CD14, CD19, CD20, CD56) Lineage-PE	20µL	B29559, Beckman Coulter, Brea, California

Tableau 13: Panel d'anticorps utilisés pour la détection en cytométrie des ILC2 circulantes.

L'ensemble était mélangé par aspiration/refoulement à la pipette puis incubé 10 min à température ambiante dans l'obscurité. Deux lavages successifs à 1800rpm pendant 5 min avec 3mL de PBS étaient ensuite réalisés. Le culot cellulaire était repris dans 500µL de PBS avant analyse cytométrique qui était réalisée au décours sur un cytomètre NAVIOS (Beckman Coulter, Brea, California). L'identification des ILC2 en CMF était réalisée à partir du gating représenté dans la figure 19.

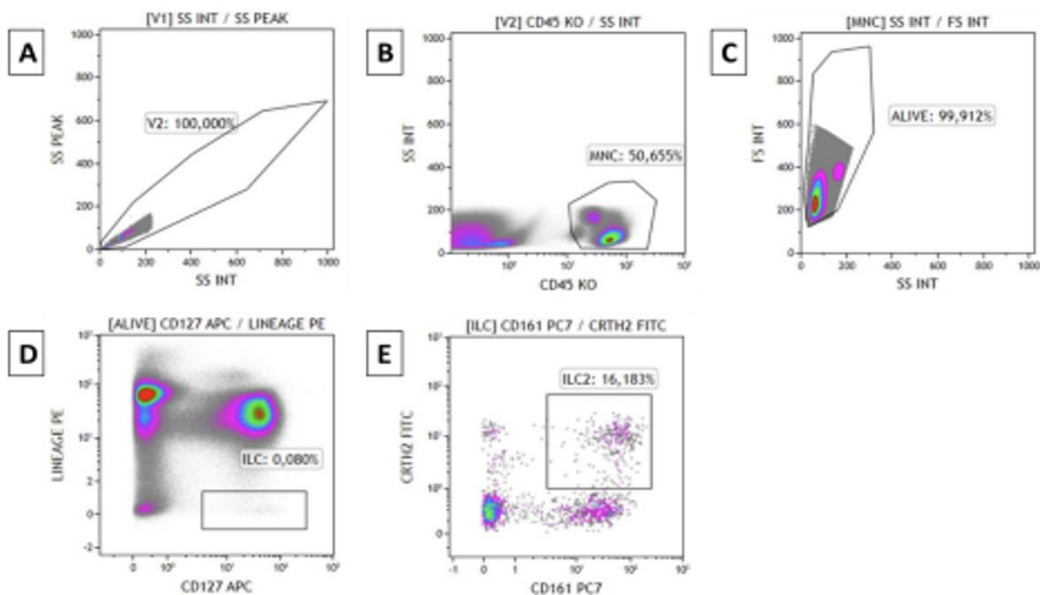


Figure 19: Identification des ILC2 en CMF à partir du gating suivant : Sélection des cellules singulets (A), CD45 positives (+) (B), cellules avec petite taille et petite structure (C), Lineage (CD3, CD14, CD19, CD20, CD56) négatives et CD127 positives (D), CRTH2 positives et CD161 positives (E).

F. Analyse de la polarisation lymphocytaire T

Cette analyse était faite sur sang total prélevé en tube EDTA. Les marqueurs de polarisation sont détaillés dans le tableau 14, chacun mis en incubation avec 100 μ L de sang pendant 10 min dans l'obscurité à température ambiante. Une lyse des globules rouges était réalisée avec le TQ-Prep (Beckman-Coulter), suivie de 2 lavages successifs à 1800rpm pendant 5 min avec 3mL de PBS. Le culot cellulaire était repris dans 300 μ L de PBS avant analyse par CMF. Le cytomètre utilisé était le CytoFLEX S Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, California). L'analyse de l'expression de la polarisation membranaire de la réponse T sur sang total est exprimée en pourcentage des populations CxCR3+CCR6- (Th1), CCR4+CCR6- (Th2) et CxCR3-CCR6+ (Th17) parmi les cellules T non naïves CD45Ro+/CD45RA-/CD3+/CD4+.

Anticorps cible	Dose pour 1 test	Laboratoire
CD45-Krome Orange Antigène Leucocytaire Commun	2,5µL	Beckman Coulter, Brea, California
CD3-APC	2,5µL	Beckman Coulter, Brea, California
CD4-PB	1,5µL	Beckman Coulter, Brea, California
CD45RA-EcD	2,5µL	Beckman Coulter, Brea, California
CCR6-BB515	2,5µL	Beckman Coulter, Brea, California
CxCR3-PeVio770	1µL	Beckman Coulter, Brea, California
CCR4-Pe	5µL	Beckman Coulter, Brea, California

Tableau 14: Détails des anticorps utilisés pour l'analyse de la polarisation T en CMF.

G. Analyse des cytokines intracellulaires

A partir d'un tube hépariné de sang, 50µL était prélevés pour incubation pendant 3h à 37°C dans un tube du kit DURactive 1 (C11101 Beckman Coulter, California), contenant un mélange prêt à l'emploi d'activateurs cellulaires contenant l'ester de phorbol, PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), un ionophore de calcium (ionomycin) et l'inhibiteur de transport de protéines Brefeldin A. Une large activation cellulaire est ainsi obtenue. La sécrétion de biomolécules nouvellement synthétisées après l'activation est empêchée par la présence de Brefeldin A, qui inhibe la sécrétion. On prélève 50µL de sang activé pour être incubés 15 min à température ambiante dans 25µL de PerFix-nc fixative reagent. Le Kit PerFix-nc, utilisé pour préparer des échantillons biologiques en vue de leur analyse par cytométrie de flux. Le kit PerFix-nc lyse les globules rouges et induit une perméabilité de la membrane cytoplasmique des leucocytes simultanément pour la mise en évidence de déterminants antigéniques intracellulaires et membranaires au moyen de sondes fluorescentes. Le culot après lavage au PBS est centrifugé à 200g pendant 5 min est repris dans 25µL de sérum de veau fœtal puis incubé dans 300µL de PerFix-nc permeabilizing reagent pour la perméabilisation des cellules pendant 45 min dans le tube DuraClone IF T Helper Cell (B88649 Beckman Coulter, California) contenant les anticorps couplés au fluorochrome. Après un lavage au PBS, le culot est repris dans 500µL de PerFix-nc wash reagent pour

être analysé au cytomètre Navios (Beckman Coulter, California) selon la stratégie de gating présentée en figure 20.

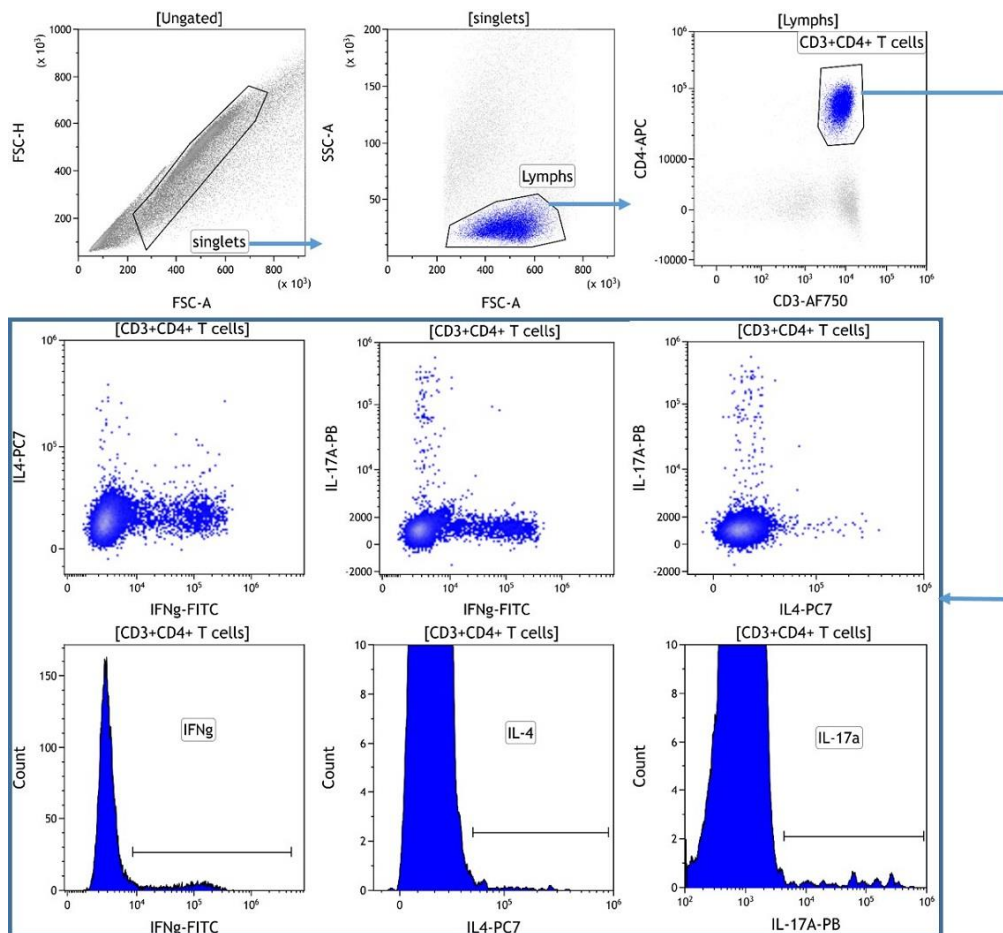


Figure 20 : Stratégie de gating concernant l'étude de l'expression des cytokines intracellulaires après stimulation (Kit DURAClone IF T Helper, reproduit d'après Beckman Coulter, California).

H. Analyse des marqueurs sériques

Après centrifugation du tube sec à 2500g pendant 5 min, le sérum était prélevé et divisé en 3 aliquots de 500µL puis congelé à -80°C jusqu'à analyse des taux sériques de marqueurs d'intérêt par méthode Luminex (Luminex® Discovery Assays, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota) selon les instructions du fabricant. Des microbilles coatées avec des anticorps spécifiques étaient incubées avec les échantillons dilués au demi. Après couplage à des anticorps biotinylés et à un conjugué streptavidine-phycoérythrine, les analytes capturés étaient détectés à l'aide d'un instrument de mesure à deux lasers (Bioplex 200 System, Bio-Rad) permettant une quantification précise et spécifique des marqueurs d'intérêt (éotaxine-1, -2, -3, TARC, TSLP, IL-3, -4, -5, -13, GM-CSF).

I. Analyse statistique

Les analyses statistiques des résultats de CMF étaient réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9 (GraphPad Software® Inc, USA). Les paramètres qualitatifs étaient décrits par les effectifs et pourcentages. Les paramètres quantitatifs étaient exprimés en médiane (intervalle interquartile) ou moyenne \pm écart-type selon la distribution normale observée confirmée par un test de Shapiro-Wilk et validée graphiquement. La comparaison des intensités médianes de fluorescence entre les différents temps de l'étude était réalisée à l'aide d'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis et d'un test de comparaison multiple de Dunn en cas de répartition non-Gaussienne des valeurs. Lorsque des variables appariées devaient être comparées, un test non paramétrique de Friedman et test de comparaison multiple de Holm-Sidak pour les valeurs non-Gaussienne était utilisé. Pour l'ensemble des tests statistiques réalisés, le niveau de significativité était fixé à 5%.

III. Résultats

A. Caractéristiques démographiques et cliniques

Nous avons inclus prospectivement sur la période d'inclusion entre août 2020 et janvier 2023 : 19 patients atteints d'EMP, 15 patients atteints d'EMP+Eo et 12 patients atteints de DRESS ainsi que 16 témoins sains. Les caractéristiques des patients sont présentées dans le tableau 15. Il s'agissait majoritairement de femmes dans les 3 groupes de patients (respectivement 63,1%, 67,1% et 57,6%). Les patients étaient en moyenne âgés de 57,6 à 67,1 ans. L'aspect clinique était similaire avec une atteinte du visage plus fréquente au cours des DRESS (50%) ainsi qu'une surface corporelle plus élevée (90% d'atteinte corporelle au cours du DRESS). Le délai médian de survenue de l'éruption après la prise médicamenteuse était plus long au cours du DRESS (13,5 jours IQR 11,5-25,75). Les délais médians d'inclusion dans le protocole pour le prélèvement étaient courts et similaires entre les groupes : entre 3 et 8 jours permettant une analyse de la phase précoce de la maladie. Aucun DRESS chronique n'a été inclus. Les patients n'avaient reçu aucune corticothérapie préalable conformément aux critères d'inclusion. La durée d'hospitalisation moyenne dans l'ensemble des groupes était de 3,2 à 11,4 jours. L'ensemble des caractéristiques individuelles sont résumées dans les tableaux en annexes 3 à 5.

	EMP (n=19)	EMP+Eo (n=15)	DRESS (n=12)
Femme (%)	12(63,1)	9(60)	7(58,3)
Âge médian (années, IQR)	63(51-74,1)	67,1(12,7)	57,6(22,2)
Présentation clinique			
% surface corporelle atteinte (IQR)	70(60-80)	60(50-72,5)	90(80-90)
Prurit	14(73,7)	12(80,0)	6(50)
Œdème visage	4(21,1)	4(26,7)	6(50)
Érythème	19(100)	15(100)	12(100)
Infiltration	7(36,8)	11(73,3)	8(66,7)
Érythrodermie	0(0)	0(0)	1(8,3)
Ulcération buccale	1(5,3)	0(0)	1(8,3)
Atteinte génitale	0(0)	0(0)	2(16,7)
Nécrose	0(0)	0(0)	0(0)
Purpura	3(15,8)	1(6,7)	2(16,7)
Vésicule	1(5,3)	1(6,7)	1(8,3)
Pustules	2(10,5)	3(20,0)	2(16,7)
Délai médian introduction du médicament-éruption (jours, IQR)	8(5-10)	7(5,5-34)	13,5(11,5-25,75)
Délai médian éruption-prélèvement (jours, IQR)	4(2-6)	3(2,5-6,75)	8(4,5-13)
Durée moyenne d'hospitalisation en jours (SD)	5,6(5,4)	3,2(7,1)	11,4(9,7)
Traitement (n, %)			
Émoullients	16(84,2)	12(80)	10(83,3)
Corticoïdes topiques	15(78,9)	13(86,7)	12(100)
Corticoïdes systémiques	0(0)	0(0)	1(8,3)

Tableau 15: Caractéristiques démographiques et cliniques des patients inclus dans le cadre de l'étude du phénotype circulant des PNE.

Concernant les médicaments principalement imputables, il s'agissait majoritairement d'antibiotiques dans les groupes EMP et EMP+Eo (n=12/19, 63,2% et n=10/15, 66,7% respectivement). Les produits de contraste iodés étaient les principaux suspects dans le cadre des DRESS (n=3/12, 25%) (tableau 16).

	n(%)	EMP n=19	EMP+Eo n=15	DRESS n=12
Produits de contraste iodés		3(15,8)	2(13,3)	3(25)
Antibiotiques		12(63,2)	10(66,7)	1(8,33)
Antiépileptiques		2(10,5)	0(0)	2(16,7)
Anti-inflammatoires		1(5,3)	0(0)	0(0)
Neuroleptiques		0(0)	1(6,7)	0(0)
Antifongiques		1(5,3)	1(6,7)	2(16,7)
Allopurinol		0(0)	1(6,7)	1(8,3)

Tableau 16: Principaux médicaments imputables.

Concernant les principales familles d'antibiotiques responsables, dans le groupe DRESS il s'agissait des pénicillines pour le seul patient concerné (amoxicilline/A. Clavulanique). Dans les groupes EMP et EMP+Eo, les pénicillines étaient également les molécules plus représentées (respectivement dans n=6/12, 50% et n=5/7, 71%). Le détail des antibiotiques est résumé dans la figure 21.

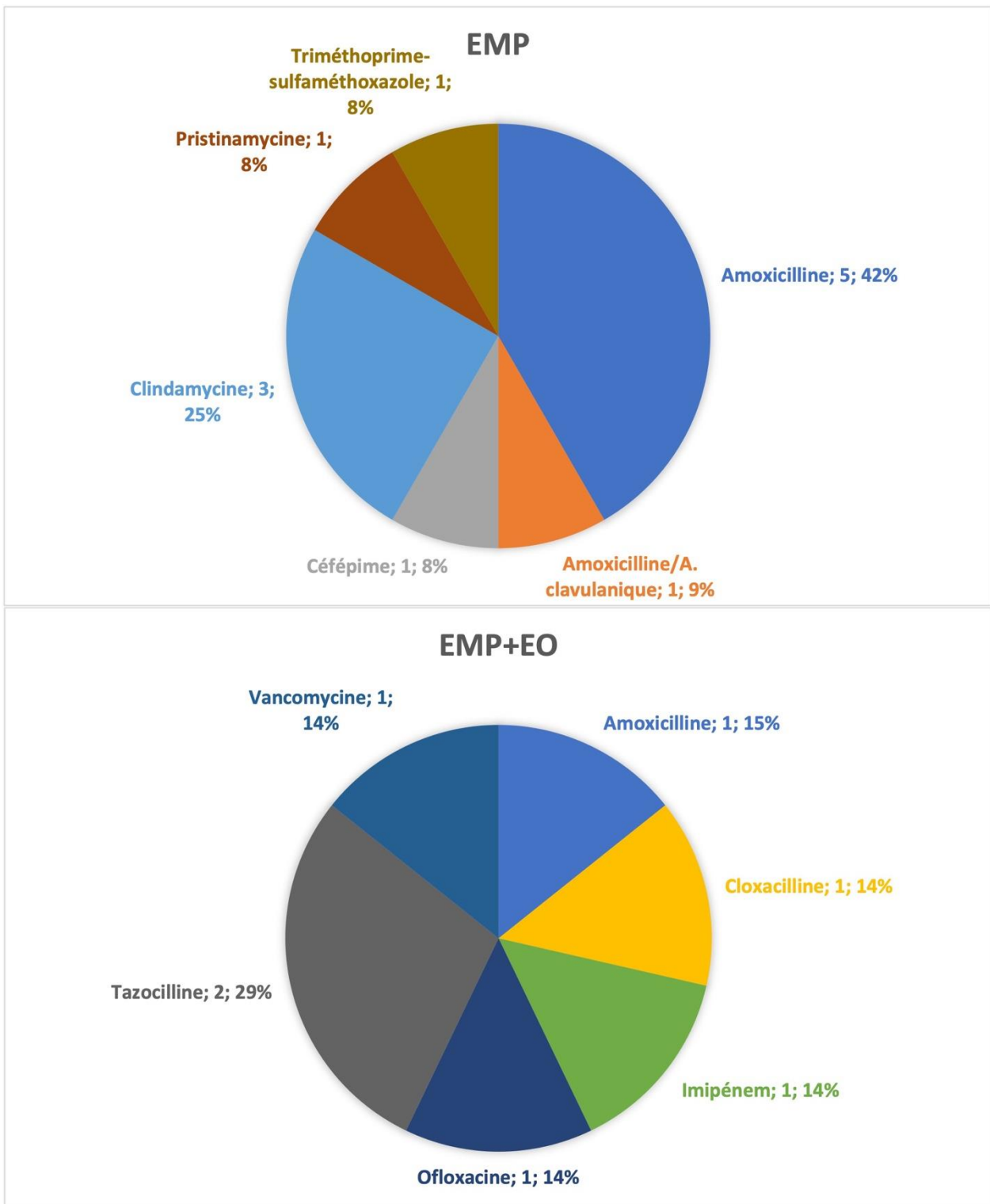


Figure 21: Liste des principaux antibiotiques en effectif et pourcentage de patients dans les groupes EMP et EMP+Eo.

B. Taux des PNE

Les taux des PNE circulants sont présentés dans le tableau 17. Les taux de PNE étaient conformément aux critères d'inclusion supérieurs à $500/\text{mm}^3$ dans les groupes DRESS et EMP+Eo sans différence significative entre ces 2 entités (respectivement $1300/\text{mm}^3$ IQR

673,3-1532 versus 792/mm³ IQR 611-1212) (figure 22A). Conformément aux critères d'inclusion, le taux de PNE était significativement plus élevé dans les groupes DRESS et EMP+Eo en comparaison au groupe EMP (268/mm³ IQR 120-320). Le groupe EMP n'était pas significativement différent du groupe contrôle (109/mm³ IQR 75-171). En analyse regroupant les EMP (avec ou sans éosinophilie) dans un seul groupe nosologique, le taux de PNE circulants étaient plus élevés dans le groupe DRESS (figure 22B). Une éosinophilie étant retrouvée chez 56% des exanthèmes de notre étude, l'éosinophilie ne permet pas de distinguer DRESS et exanthèmes.

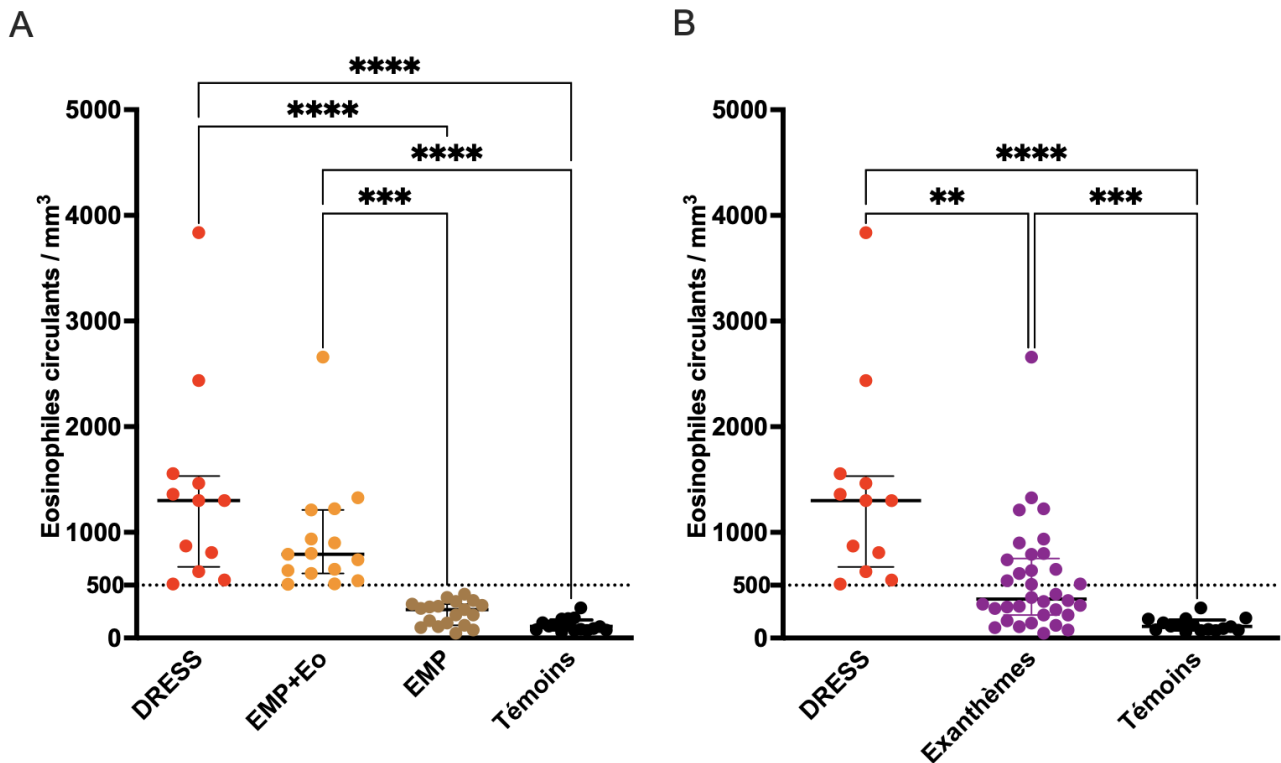


Figure 22: Taux en PNE circulants/mm³ dans les 3 groupes de l'étude comparés aux sujets sains (A) et comparaison entre le groupe DRESS et les exanthèmes ayant été regroupés (B). ***p<0,01, ****p<0,001 selon un test non paramétrique de Kruskal-Wallis et test de comparaisons multiples de Dunn.

	DRESS	EMP+Eo	EMP	Témoins
	n=12	n=15	n=19	n=16
Minimum	511	508	45	55
25% Percentile	673,3	611	120	75
Médiane	1300	792	268	109,5
75% Percentile	1532	1212	320	171
Maximum	3837	2659	414	285

Tableau 17: Taux de PNE circulants dans les différents groupes de l'étude (/mm³)

Point clé :

Le taux de PNE circulants n'est pas discriminant pour différencier un DRESS par rapport aux EMP avec éosinophilie.

C. Étude de l'expression des marqueurs membranaires d'activation des PNE circulants

1. Comparaison des ratios d'intensité de fluorescence

Nous avons réalisé une analyse de l'expression de l'intensité de fluorescence des marqueurs membranaires d'activation et d'homéostasie du PNE par cytométrie de flux (figure 23, tableau 18). Il existait une modification phénotypique des marqueurs membranaires des PNE pour l'ensemble des marqueurs étudiés à l'exception de CD137. Les patients atteints de DRESS avaient une diminution de l'expression de certains marqueurs par rapport aux témoins sains : CCR3, ($p < 0,05$), CRTH2 ($p < 0,0001$), CD125 ($p < 0,001$), et CD63 ($p < 0,05$). Les patients DRESS sous-exprimaient de façon plus marquée et significative le CD125 par rapport aux patients atteints d'EMP. Il existait également une diminution de l'expression, non significative, de CRTH2 et CCR3 chez les patients DRESS par rapport aux patients atteints d'EMP+Eo. En revanche les patients atteints de DRESS ne présentaient pas de différence significative en termes d'intensité de fluorescence concernant l'expression de CD69, HLA-DR, CD44 et CD137 par rapport aux patients EMP, EMP+Eo et aux témoins sains.

Les patients atteints d'EMP+Eo en comparaison à des sujets sains présentaient une expression diminuée de CCR3 ($p < 0,0001$), CRTH2 ($p < 0,0001$) et CD125 ($p < 0,01$), en revanche, on observait une augmentation d'expression de CD44 ($p < 0,001$). L'expression de CD69 était nettement plus élevée dans ce groupe par rapport aux témoins mais pas en comparaison aux autres toxidermies.

Concernant les patients atteints d'EMP, par rapport aux sujets sains, il existait également une diminution d'expression membranaire de CCR3 ($p < 0,001$) et CRTH2 ($p < 0,01$). A l'inverse l'expression de CD44 ($p < 0,05$) et HLA-DR ($p < 0,01$) était augmentée. CD69 était sous-exprimé dans le groupe EMP par rapport au groupe EMP+Eo. De façon globale, les patients atteints de toxidermie ne différaient pas entre eux concernant l'expression des autres marqueurs membranaires (CD63, CCR3, CRTH2, HLA-DR, CD44 et CD137).

Le tableau 19 synthétise les comparaisons entre les groupes pour l'ensemble des marqueurs.

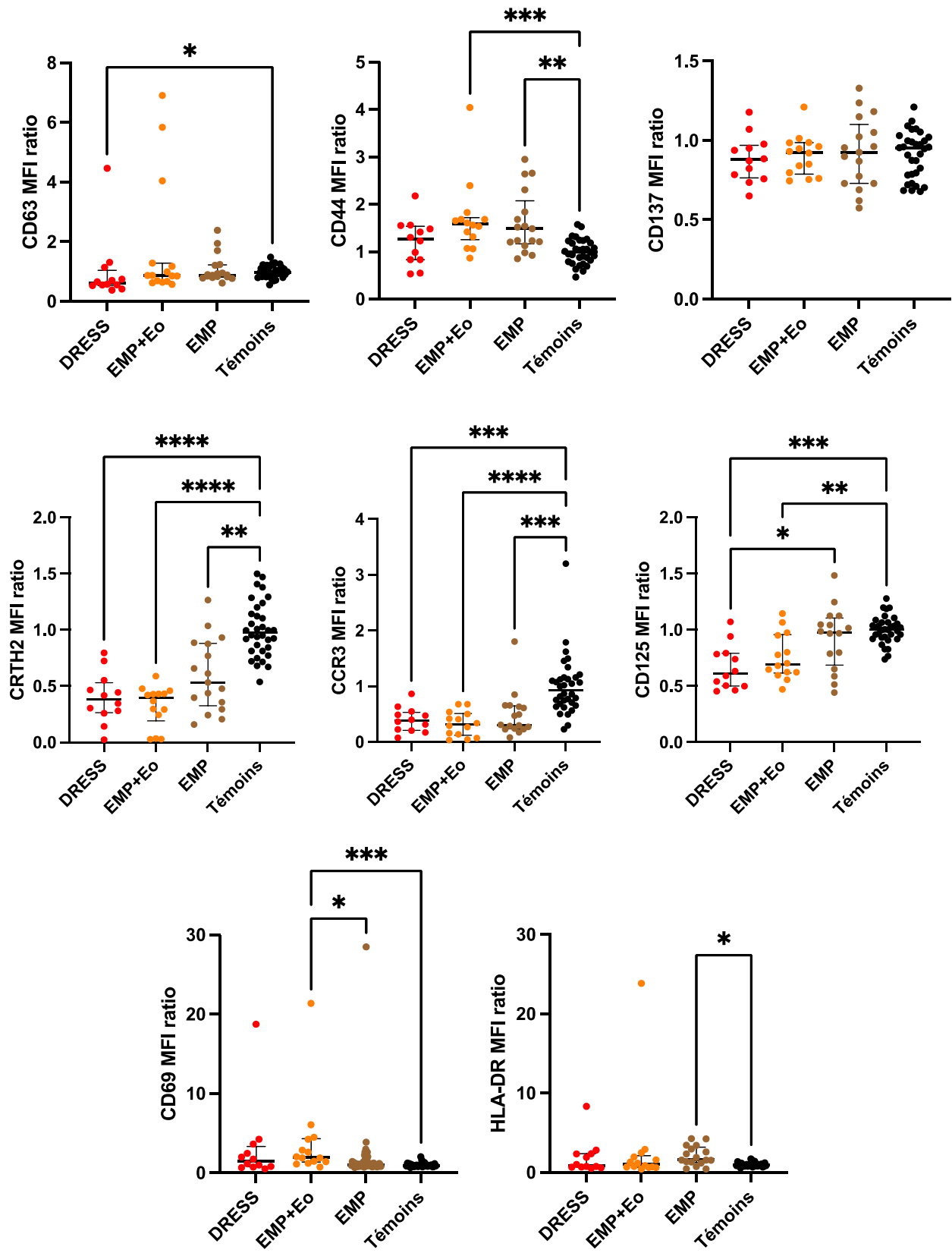


Figure 23: Expression des ratios de fluorescence des marqueurs membranaires d'activation des PNE. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$ selon un test non apparié de Kruskal-Wallis et un test de comparaisons multiples de Dunn.

Ratio (IQR)	DRESS (n=12)	EMP+Eo (n=15)	EMP (n=19)	Témoins (n=16)
CD63	0,62(0,53-1)	0,87(0,67-1,3)	0,88(0,81-1,2)	0,97(0,85-1,2)
CCR3	0,38(0,21-0,53)	0,31(0,12-0,51)	0,31(0,24-0,65)	0,93(0,68-1,2)
CD125	0,61(0,50-0,79)	0,69(0,62-0,96)	0,98(0,69-1,1)	1(0,93-1,1)
CRTH2	0,38(0,28-0,53)	0,39(0,19-0,44)	0,53(0,33-0,88)	0,97(0,81-1,2)
CD69	1,2(0,75-3,6)	2(1,4-4,2)	1(0,87-1,4)	0,94(0,83-1,1)
HLA-DR	0,89(0,67-2,2)	1(0,67-2,1)	1,6(1,3-3,2)	0,93(0,81-1,2)
CD44	1,3(0,83-1,5)	1,6(1,3-1,7)	1,5(1,2-2,1)	1(0,80-1,2)
CD137	0,88(0,78-0,98)	0,92(0,76-0,99)	0,93(0,73-1,1)	0,95(0,78-1)

Tableau 18: Expression des ratios de fluorescence des marqueurs membranaires d'activation des PNE.

	DRESS	EMP+Eo	EMP
CD63	↓	=	=
CCR3	↓↓	↓↓	↓↓
CD125	↓↓↓	↓↓	↓
CRTH2	↓↓	↓↓	↓
CD69	=	↑	=
HLA-DR	=	=	=
CD44	=	↑	↑
CD137	=	=	=

Tableau 19: Synthèse des variations d'expression de ratio de fluorescence entre les groupes de l'étude par rapport aux sujets sains.

L'analyse de corrélations (figure 24, annexe 6) de l'expression des marqueurs membranaires dans le groupe DRESS a confirmé une corrélation positive et significative entre l'expression de CCR3 et CD125 ($\rho^2=0,86$ IC95 0,55-0,96 ; $p=0,001$) ainsi qu'entre l'expression de CCR3 et CRTH2 ($\rho^2=0,88$ IC95 0,61-0,97 ; $p<0,0001$). De même l'expression de CRTH2 et CD125 étaient fortement corrélés de façon significative ($\rho^2=0,93$ IC95 0,76-0,98 ; $p<0,0001$). L'expression de CD69 était corrélé positivement aux variations de CD63 ($\rho^2=0,73$ IC95 0,25-0,92 ; $p<0,001$), de même que l'expression de CD44 était corrélée positivement à l'expression de HLA-DR ($\rho^2=0,59$ IC95 0,001-0,87 ; $p=0,05$). L'intensité de fluorescence des différents marqueurs n'était, par ailleurs, pas corrélée au taux de PNE circulants.

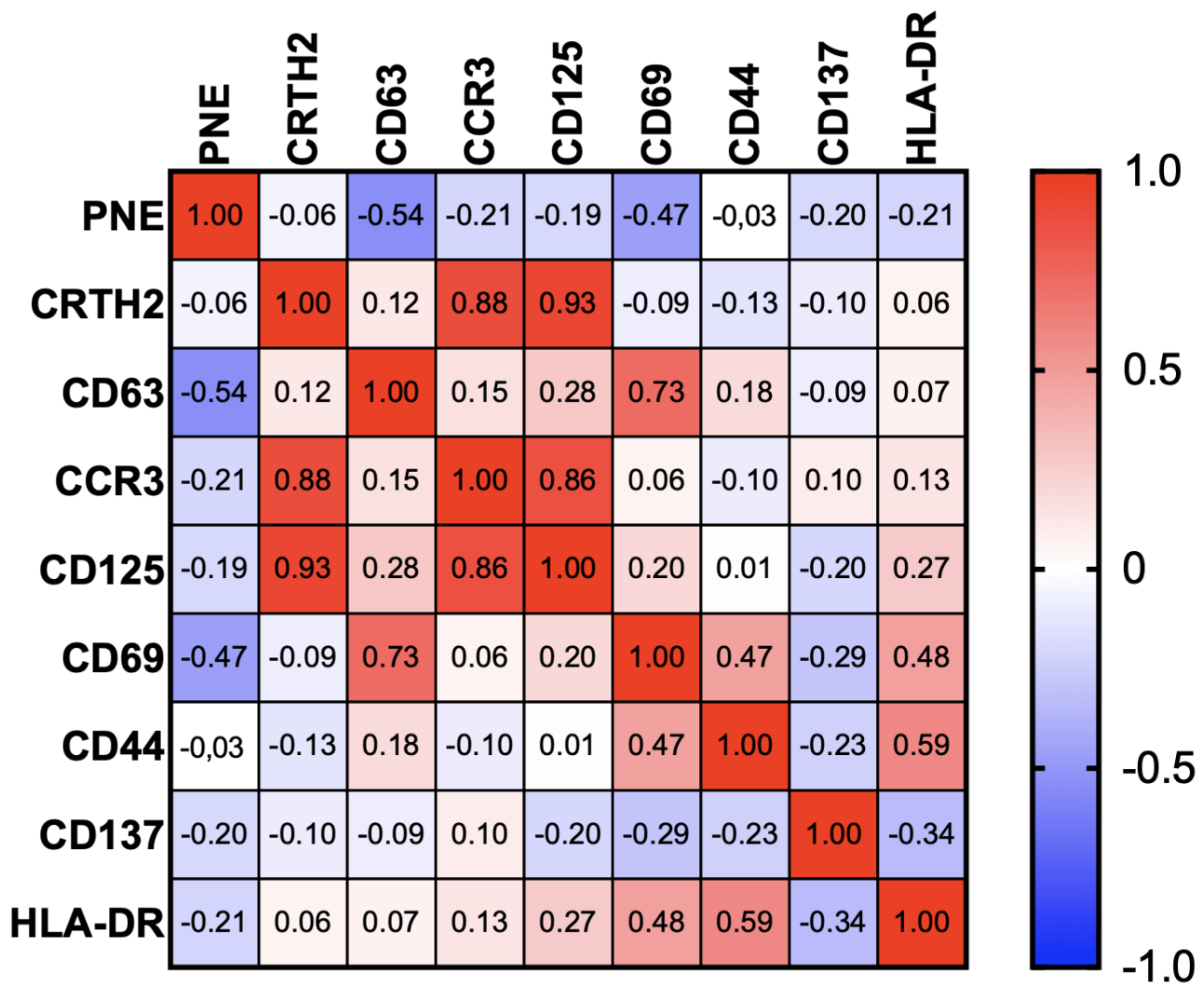


Figure 24: Matrice des coefficients de corrélation selon un test non paramétrique de Spearman au sein du groupe DRESS pour l'ensemble des marqueurs membranaires étudiés. Les intervalles de confiance à 95% et les p-values sont présentées en annexe 6.

La forte corrélation des marqueurs CRTH2, CCR3 et CD125 a justifié une analyse biparamétrique afin d'identifier le comportement des marqueurs entre eux au sein des différents groupes. L'analyse biparamétrique de l'expression de deux marqueurs en cytométrie de flux peut être justifiée pour plusieurs raisons : elle permet d'obtenir une meilleure résolution en faisant apparaître des populations de cellules qui auraient été difficilement repérables en se basant sur un seul critère. Cela améliore également la spécificité de l'analyse en permettant de distinguer les populations de cellules en fonction de leur expression simultanée des deux marqueurs, ce qui peut être particulièrement important lorsqu'on étudie des populations de cellules qui expriment plusieurs marqueurs dont l'expression peut être corrélée. La répartition des cellules par rapport aux contrôles isotypiques nous a permis de faire cette analyse biparamétrique exprimée en populations positives ou négative pour les marqueurs considérés (figure 25).

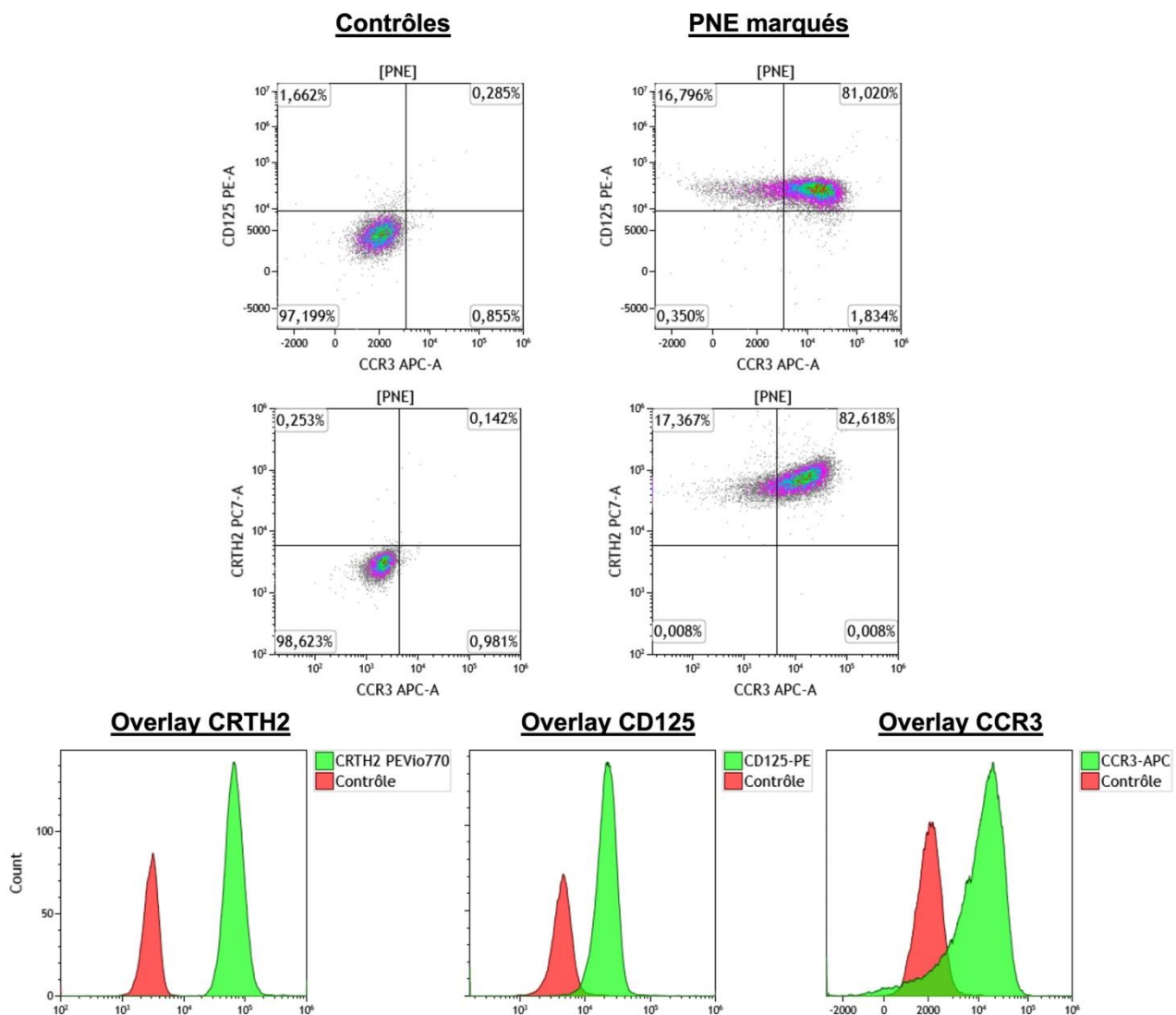


Figure 25 : Méthode de détermination des seuils de positivité pour chaque marqueur. Les histogrammes « overlay » présentent les superpositions des courbes de fluorescence de chaque marqueur versus le contrôle isotypique.

Dans cette optique et dans une première approche, nous avons réalisé une analyse biparamétrique entre CCR3 et CD125 (figure 25). Nous avons observé une diminution significative du pourcentage de PNE double positifs (CCR3+/CD125+) dans le groupe EMP+Eo de plus de 50% pour certains patients. Le pourcentage de PNE CCR3+/CD125- était significativement plus élevé dans le groupe DRESS en comparaison au groupe EMP+Eo et au groupe de témoins sains (respectivement $p < 0,05$ et $p < 0,01$). Le pourcentage de PNE CCR3-/CD125+ était significativement plus élevé dans le groupe EMP+Eo et de manière non significative dans le groupe DRESS. Il n'existait pas de différence significative entre les groupes toxidermie concernant les PNE double négatifs (CCR3-/CD125-).

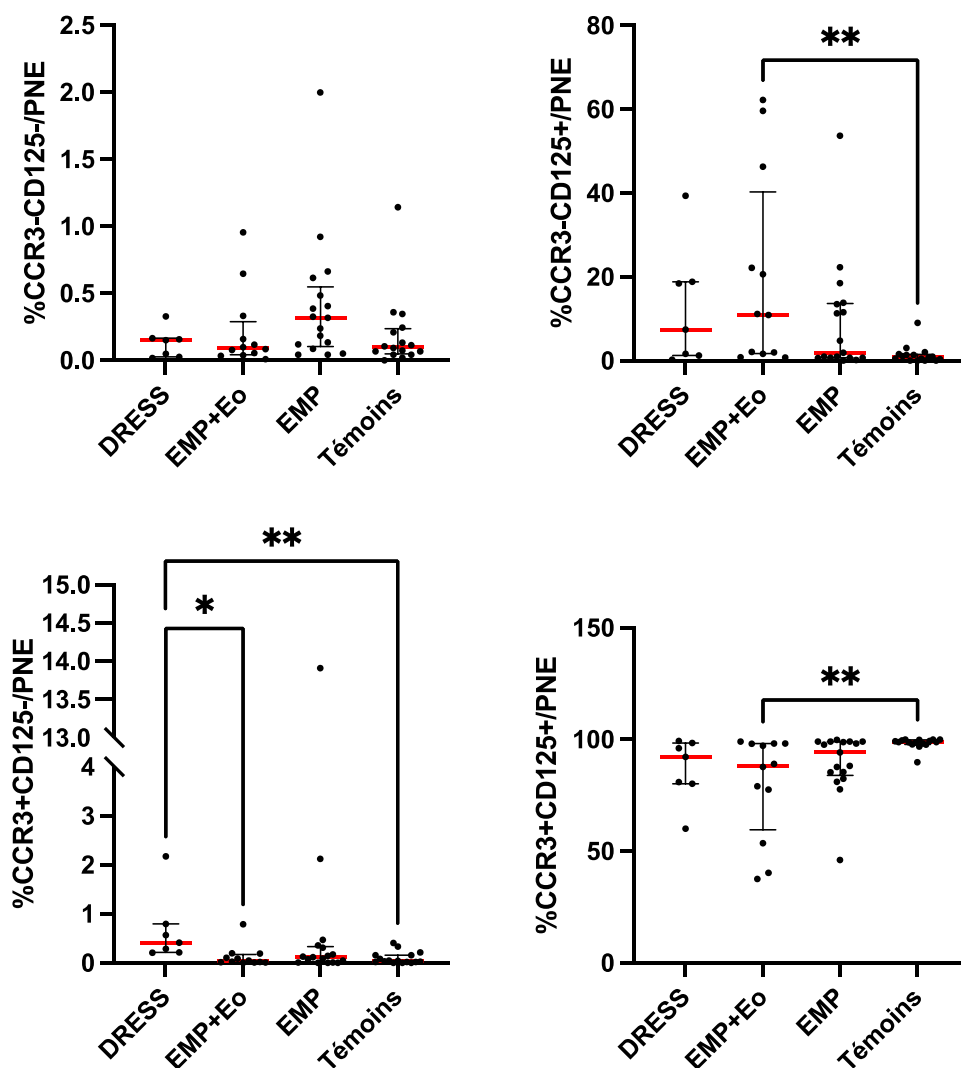


Figure 26 : Analyse biparamétrique des marqueurs membranaires CCR3 et CD125. Données exprimées en pourcentage de PNE (CD45Ro+/CD16-). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ selon un test non paramétrique de Kruskal-Wallis et test de comparaison multiple de Dunn.

Dans une seconde approche, nous avons également réalisé une analyse biparamétrique des marqueurs membranaires CRTH2 et CD125 (figure 26). De façon similaire, il existait une diminution du pourcentage des PNE double positifs (CRTH2+/CD125+) dans le groupe DRESS significative par rapport aux témoins mais non significative en comparaison avec les autres toxidermies. En parallèle il existait une augmentation significative des PNE (CRTH2+/CD125-) dans le groupe DRESS par rapport aux témoins mais sans différence avec les autres groupes toxidermies. Il existait une faible augmentation du pourcentage de PNE CRTH2-/CD125+ et CRTH2-/CD125- dans le groupe EMP.

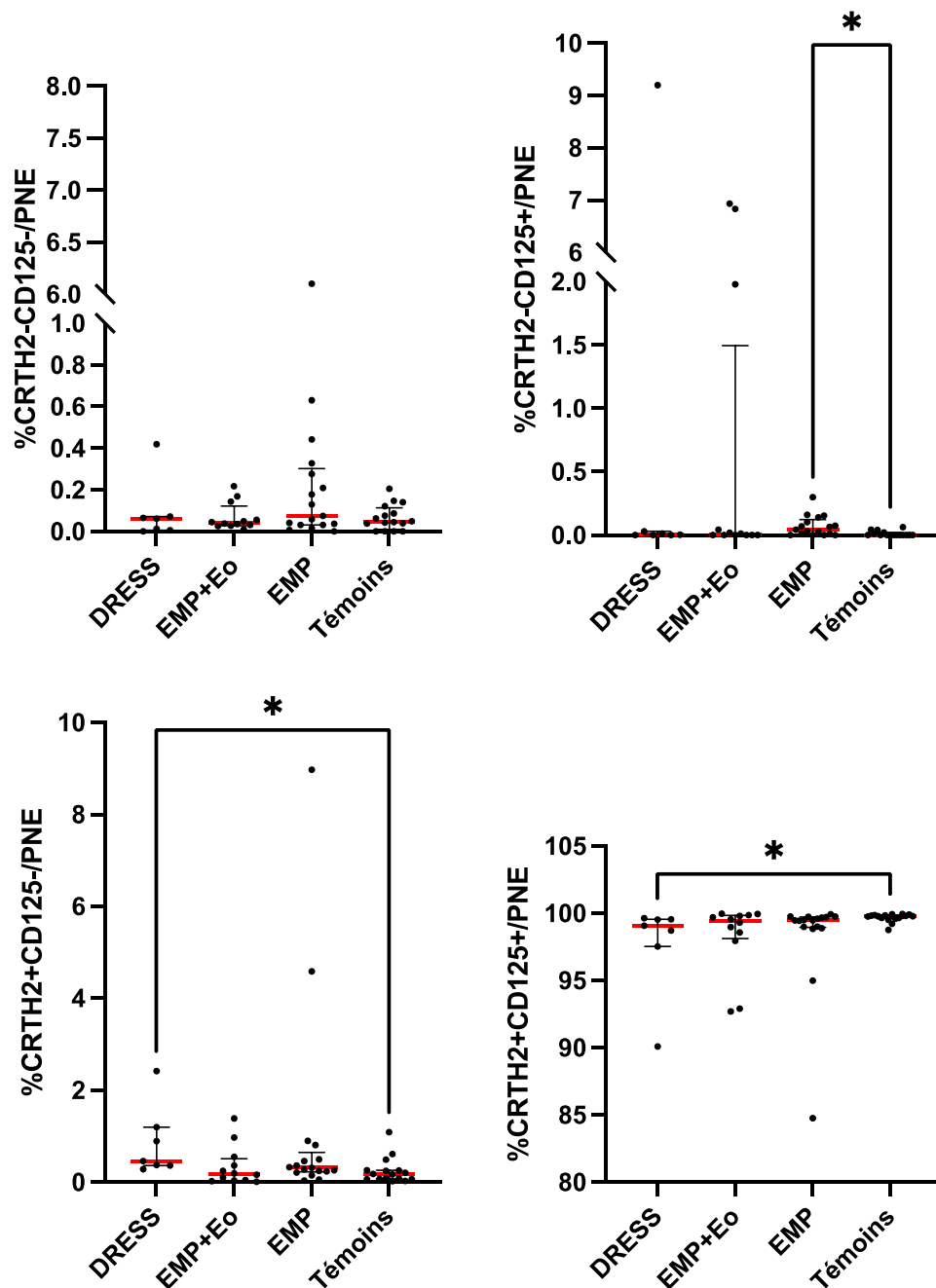


Figure 27 : Analyse biparamétrique des marqueurs membranaires CRTH2 et CD125. Données exprimées en pourcentage de PNE (CD45Ro+/CD16-). * $p < 0,05$, selon un test non paramétrique de Kruskal-Wallis et test de comparaison multiple de Dunn.

Dans une troisième approche, nous avons réalisé une analyse biparamétrique des marqueurs membranaires CRTH2 et CCR3 (figure 27). Il existait une diminution des PNE double positifs au cours des toxidermies, significative par rapport au groupe témoins pour les patients atteints d'EMP ($p < 0,01$) et d'EMP+Eo ($p < 0,001$) mais pas pour les patients atteints de DRESS. On observait une population de PNE exprimant un profil CCR3-/CRTH2 dans les groupes EMP ($p < 0,05$) et EMP+Eo ($p < 0,001$) mais non significative dans le groupe DRESS. Seul le groupe EMP présentait une augmentation significative des PNE double

négatifs (CCR3-/CRTH2-). Il n'existait pas de différence entre les groupes toxidermies

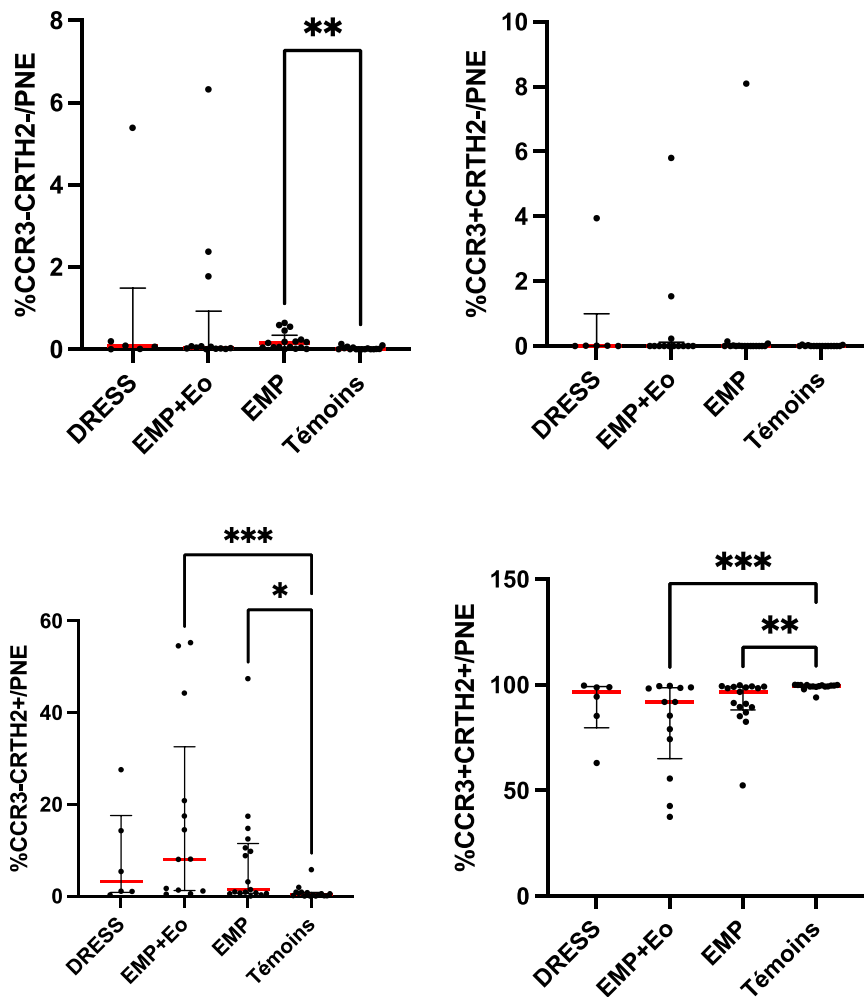


Figure 28 : Analyse biparamétrique des marqueurs membranaires CRTH2 et CCR3. Données exprimées en pourcentage de PNE (CD45Ro+/CD16-). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ selon un test non paramétrique de Kruskal-Wallis et test de comparaison multiple de Dunn.

L'analyse de la répartition des différentes populations en analyse biparamétrique au sein de chaque groupe permettait de révéler l'émergence PNE exprimant un profil CCR3-/CD125+ (respectivement 7,4%, 11%, 1,9% dans les groupes DRESS, EMP+Eo et EMP versus 0,9% des PNE dans le groupe témoin) et CCR3-/CRTH2+ (respectivement 3,2%, 8,1%, 1,4% dans les groupes DRESS, EMP+Eo et EMP versus 0,4 dans le groupe témoin). Cette augmentation était donc observée dans tous les groupes toxidermies mais sans différence significative entre ces groupes ($p > 0,05$) (figure 29).

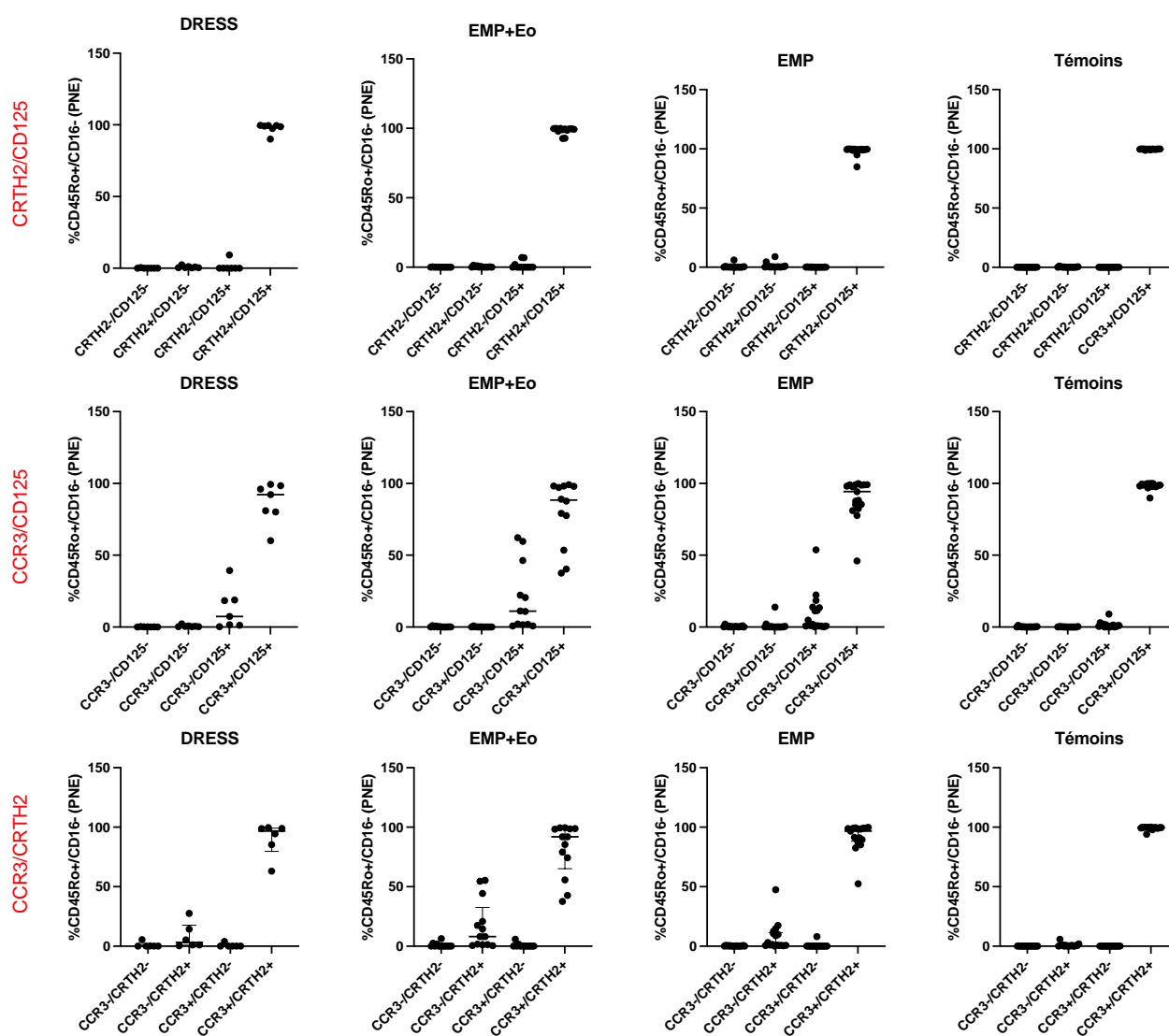


Figure 29 : Synthèse des analyses biparamétriques pour chaque groupe toxidermies et le groupe témoin. Les données sont exprimées en pourcentage de PNE exprimant l'un et/ou l'autre des marqueurs.

Point clé :

L'analyse de la répartition des différentes populations en analyse biparamétrique au sein de chaque groupe permettait de révéler l'émergence PNE exprimant un profil CCR3-/CD125+ et CCR3-/CRTH2+ dans tous les groupes toxidermies mais de façon non discriminante entre les groupes.

L'analyse ciblée sur l'expression du marqueur d'activation cellulaire CD69 en intensité de fluorescence ne semblait pas différencier les groupes de l'étude entre eux et seuls les groupes EMP et EMP+Eo avaient une expression plus élevée de CD69 par rapport aux témoins. Dans le cas général, il existe une vallée très nette entre les deux courbes, ce qui permet de distinguer facilement les deux distributions de signal. Donc l'intensité du marquage des cellules marquées peut également être prise en compte (fluorescence

moyenne, MFI). Parfois la détermination de la positivité peut ne pas être aussi claire car les marqueurs analysés sont exprimés à de faibles niveaux sur les cellules ou bien la qualité de l'anticorps de liaison peut être parfois médiocre. Un signal positif correspond uniquement à un décalage du pic du signal. Dans ce cas, il est peut-être plus objectif de comparer les ratios positifs et négatifs et les pourcentages de cellules. Des contrôles isotypiques ont été utilisés afin de déterminer le signal positif afin de déterminer le pourcentage de cellules positives ou négatives pour un marqueur donné (figure 30).

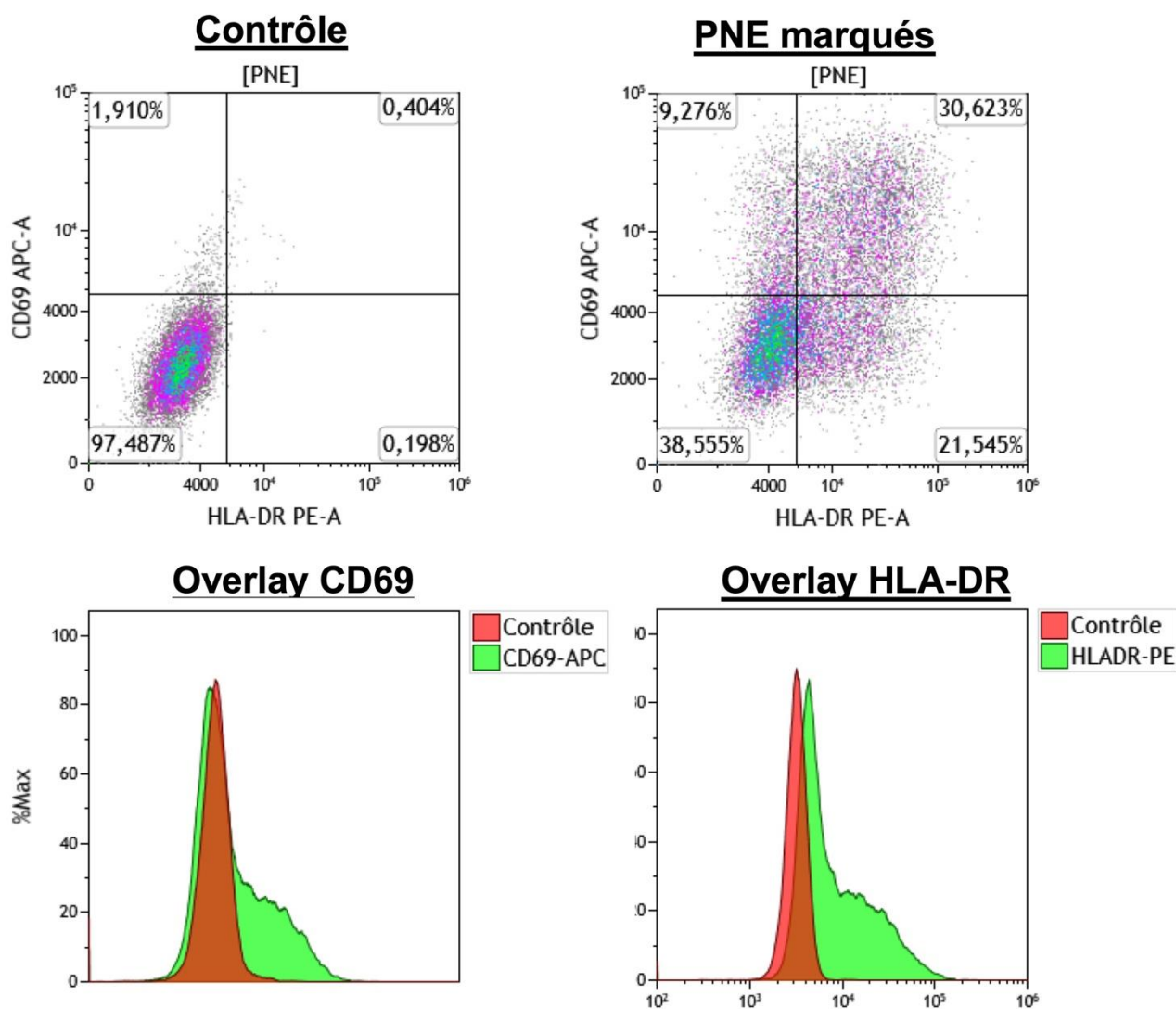


Figure 30: Méthode de détermination des seuils de positivité pour chaque marqueur. Les histogrammes « overlay » présentent les superpositions des courbes de fluorescence de chaque marqueur versus le contrôle isotypique.

Nous avons donc cherché à évaluer le pourcentage de PNE activés dans les différents groupes sur la base du pourcentage de cellules ayant une expression augmentée de CD69 et/ou de HLA-DR (figure 31). Chez les patients atteints de DRESS et d'EMP, il existait une augmentation en pourcentage du nombre de PNE surexprimant CD69 (respectivement $p < 0,01$ et $p < 0,001$) par rapport aux sujets sains. Il existait également une différence

significative entre les patients atteints d'EMP et les sujets sains concernant le pourcentage de PNE surexprimant le HLA-DR et le pourcentage de PNE double positifs ($p < 0,05$). Il n'existait pas de différence significative concernant les patients EMP+Eo en comparaison aux autres groupes. De même, il n'existait pas de différence entre les patients atteints de DRESS et les sujets sains concernant les populations de PNE HLA-DR positifs et les populations de PNE double positives (HLA-DR+/CD69+).

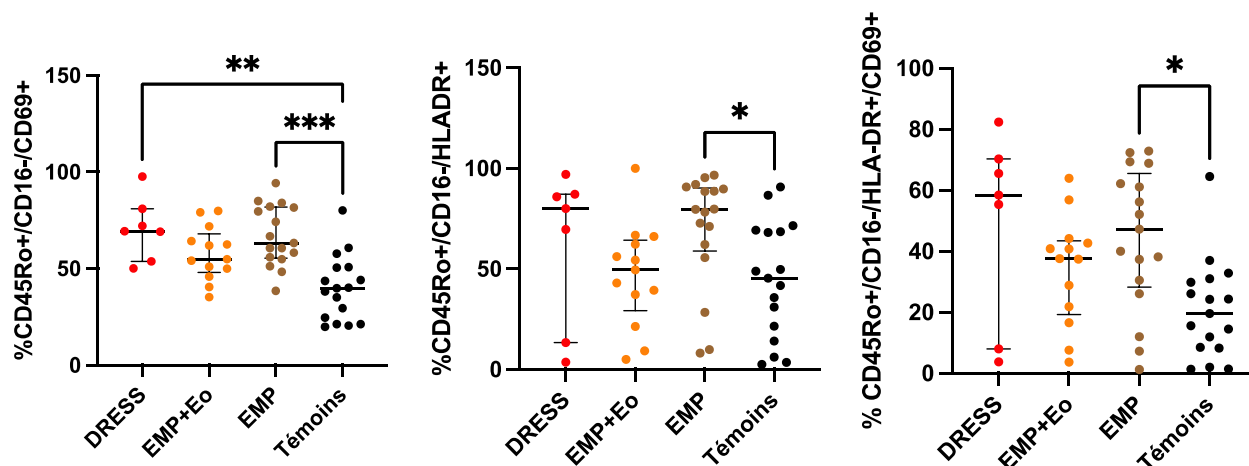


Figure 31: Pourcentage de PNE ayant une augmentation d'expression du CD69 (à gauche), du HLA-DR (au centre) et pourcentage des PNE double positif (CD69+/HLA-DR+). Expression en pourcentage des PNE totaux (CD45Ro+/CD16-).

L'analyse biparamétrique ne permettait donc pas l'identification de profils spécifiques d'un type de toxidermie en particulier. On observait une variabilité individuelle dans tous les groupes et la distinction par le biais de l'analyse biparamétrique ne permettait pas de faire émerger un profil compatible spécifiquement avec l'un des types de toxidermies étudiés.

2. Analyse supervisée et non supervisée des marqueurs d'activation.

Nous avons réalisé une analyse intégrée des marqueurs d'activation à travers une analyse des principaux clusters. L'algorithme permet un regroupement selon des cartes auto-organisées pouvant révéler la façon dont tous les marqueurs se comportent sur toutes les cellules et pouvant permettre de détecter des sous-populations. Cette analyse supervisée a permis la représentation graphique présentée en figure 32 qui n'a pas permis d'identifier de sous-ensemble présentant un phénotype particulier dans aucun des 3 groupes de l'étude.

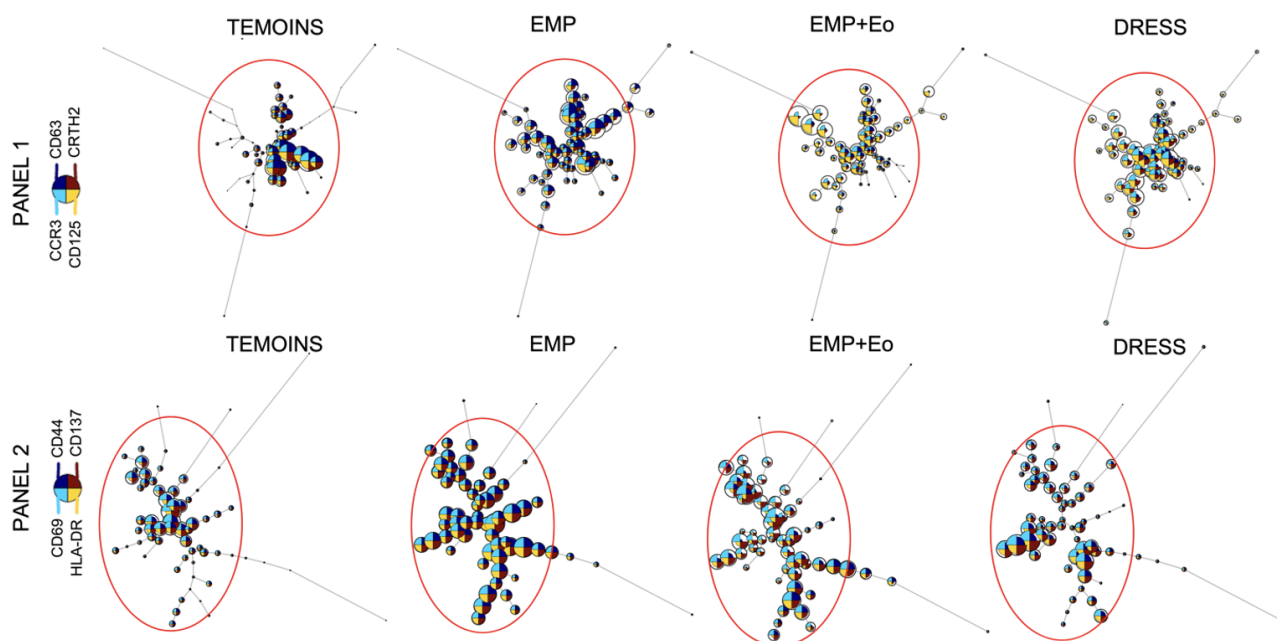


Figure 32 : Regroupement en cluster des PNE en fonction des marqueurs représenté sous forme de cartes auto-organisées produites sous la forme d'un arbre MST (fonction FlowSom, CytoBANK®). Absence de sous-population phénotypique dans les panels 1 et 2. Le cercle rouge représente un même cluster phénotypique de cellules.

En raison du nombre de récepteurs étudiés, nous avons utilisé également une méthode d'analyse, cette fois ci non supervisée, permettant une réduction dimensionnelle de nos données de cytométrie en flux. L'ensemble de nos données ont été analysées avec l'algorithme t-SNE. Il permet de regrouper, sur une cartographie bidimensionnelle, les PNE en fonction du niveau d'expression de l'ensemble des marqueurs d'intérêts, apportant une représentation graphique de leur profil immunophénotypique. Les figures 33 et 34 représentent la cartographie t-SNE obtenue à partir des données de cytométrie en flux des marqueurs des panels d'anticorps. Les analyses en cartographie t-SNE nous ont permis de regrouper les PNE selon l'expression des différents marqueurs membranaires d'un même panel et ainsi dégager des sous-populations de PNE sanguins. Pour chacun des marqueurs, l'intensité de l'expression membranaire est signifiée par une échelle de couleurs. Cette représentation nous a permis de mettre en évidence une hétérogénéité phénotypique des PNE circulants au sein de chaque groupe d'intérêt et notamment une sous-population de PNE exprimant faiblement CCR3 et CRTH2 dans les groupes toxidermies, non présente chez les sujets témoins.

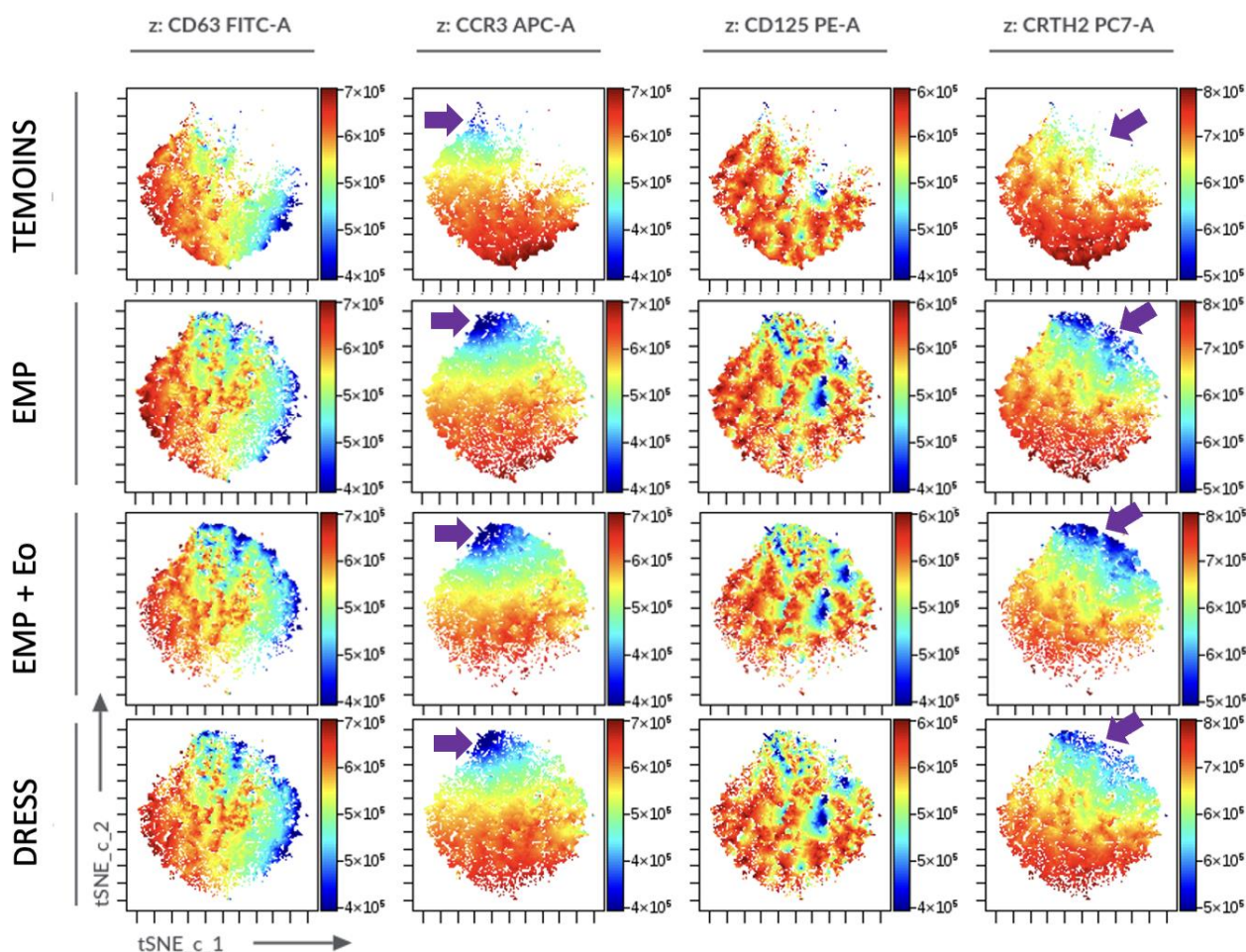


Figure 33: **Distribution graphique des marqueurs de surface dans l'espace réduit de dimension t-SNE (panel 1).** Les cellules ont été visualisées dans un espace dimensionnellement réduit regroupées par leurs similitudes immunophénotypiques. L'expression relative de l'antigène a été visualisée par l'intensité de couleur, allant du bleu foncé (expression la plus faible) au rouge foncé (expression la plus élevée). Hétérogénéité phénotypique des PNE circulants avec présence d'une sous-population de PNE exprimant faiblement le CCR3 et le CRTH2 dans les groupes toxidermies (flèches mauves).

En outre, il existait une hétérogénéité phénotypique des PNE circulants au sein des groupes toxidermies avec notamment une sous-population sur-exprimant CD69 (figure 34), plus marquée dans le groupe DRESS. Nous observons également une hétérogénéité phénotypique des PNE circulants au sein du groupe EMP+Eo avec une sous-population de PNE surexprimant le HLA-DR de façon plus marquée dans ce groupe par rapport aux autres toxidermies et au groupe témoin sain.

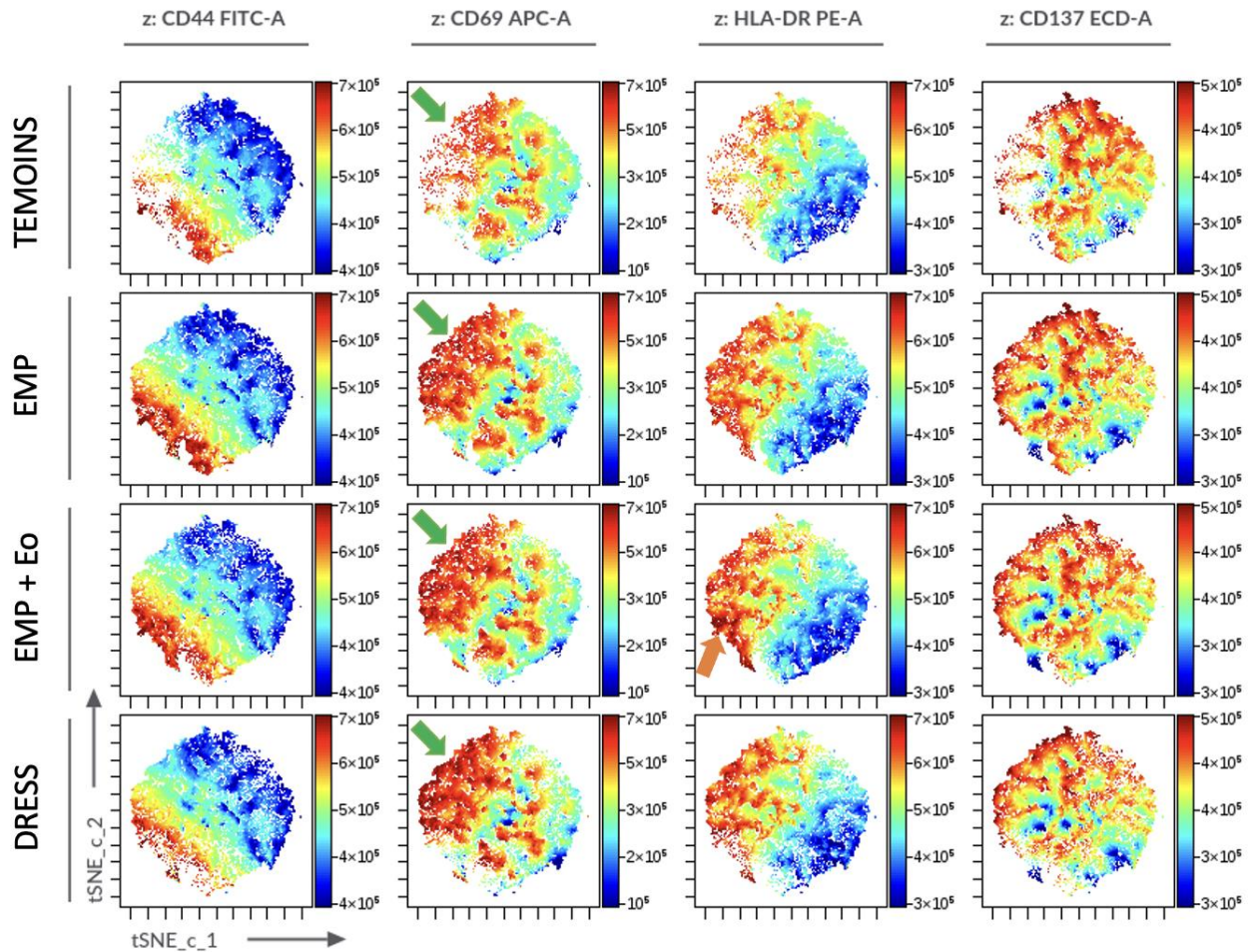


Figure 34: *Distribution graphique des marqueurs de surface dans l'espace réduit de dimension t-SNE (panel 2).* Les cellules ont été visualisées dans un espace dimensionnellement réduit regroupées par leurs similitudes immunophénotypiques. L'expression relative de l'antigène a été visualisée par l'intensité de couleur, allant du bleu foncée (expression la plus faible) au rouge foncé (expression la plus élevée). Hétérogénéité phénotypique des PNE circulants avec présence d'une sous-population surexprimant le CD69 (flèches vertes) ou le HLA-DR (flèche orange).

Point clé

Alors que l'analyse supervisé (FlowSom) ne permettait pas d'identifier une clusterisation différentielle entre les groupes, l'analyse non supervisée en t-SNE permettait de révéler la présence d'une sous-population CD69+ plus marquée au cours du DRESS.

3. Évolution des marqueurs d'activation dans le temps

Afin de mieux comprendre l'implication des marqueurs d'activation dans la physiopathologie du DRESS, nous avons réalisé une analyse évolutive des marqueurs membranaires chez une patiente atteinte de DRESS imputable à la carbamazépine à 5 jours du prélèvement initial après arrêt du traitement et mise en place d'un traitement corticoïde topique (figure 35). Nous avons pu constater à J5 une augmentation de l'expression de CCR3, CRTH2 et

CD125 (i.e., les marqueurs dont nous avons observé une diminution significative dans les groupes toxidermies en comparaison au groupe témoin sain). L'expression de CD137 restait stable en termes d'expression alors que l'expression de CD63, CD69 et HLA-DR diminuait à J5. On notait une diminution en pourcentage des PNE exprimant le CD69+, le HLA-DR+ et les PNE CD69+/HLA-DR+, rapportés à la population totale de PNE à J5 (figure 36). En parallèle, cliniquement à J5, nous avons observé une amélioration concomitante partielle mais significative des lésions cutanées et de la cytolysé hépatique.

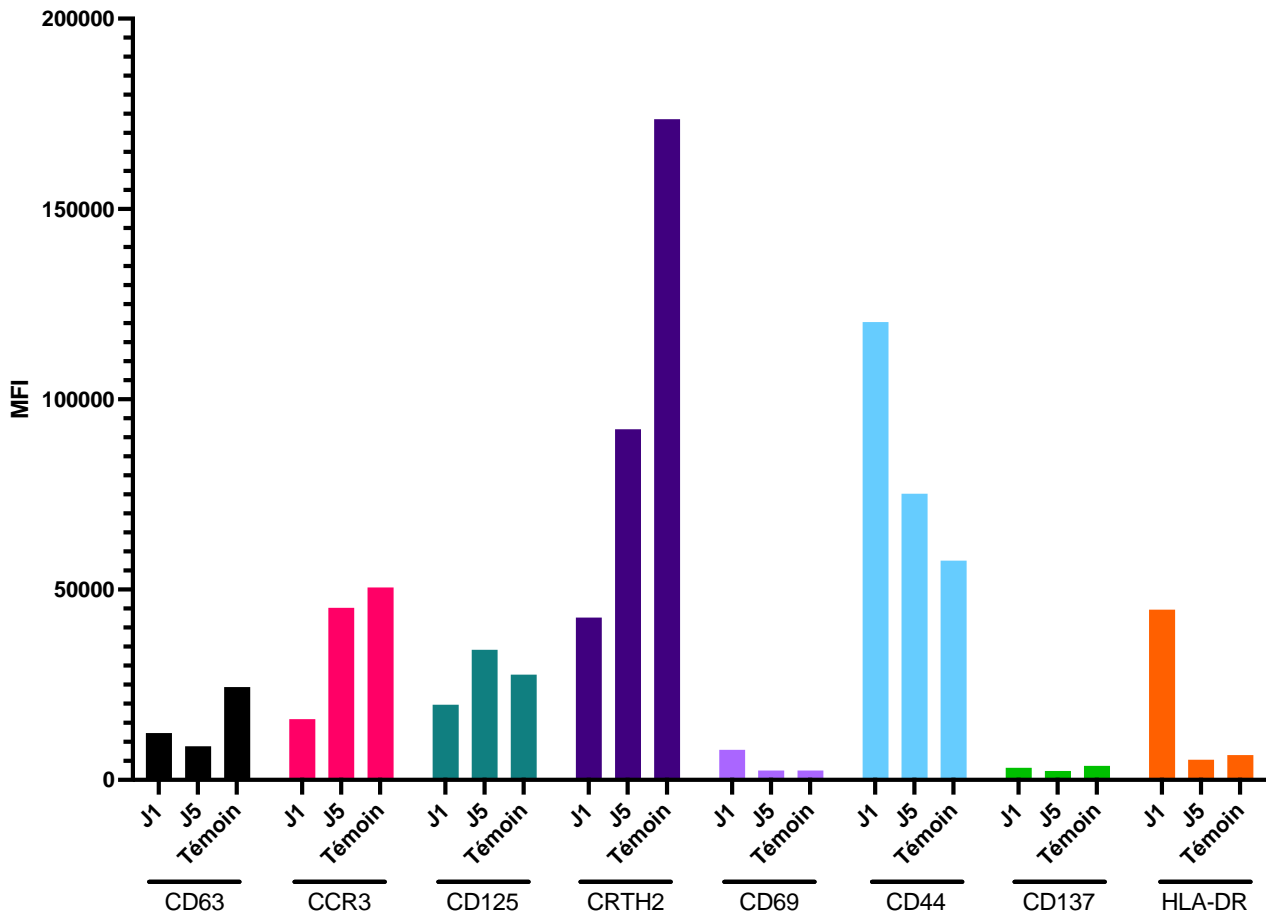


Figure 35: Évolution des marqueurs d'activation chez une patiente atteinte de DRESS à J5 du prélèvement initial. Expression en médiane de fluorescence pour les marqueurs d'activation d'intérêt.

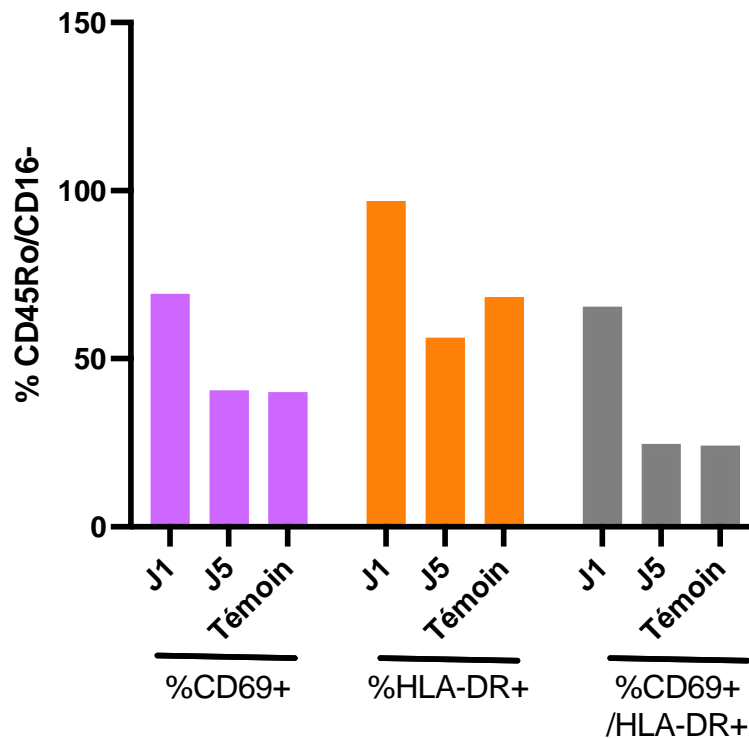


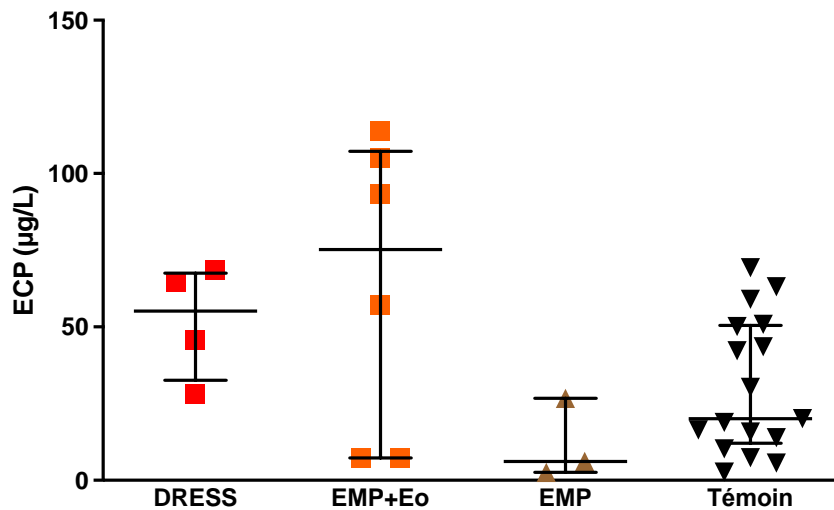
Figure 36: Expression en pourcentage de PNE (CD45Ro+/CD16-) exprimant le CD69 et le HLA-DR à J5 du prélèvement initial comparé à un témoin sain.

Point clé

Le traitement par corticoïdes topiques et/ou l'histoire naturelle du DRESS après arrêt du médicament est associée à une modification rapide du profil phénotypique des PNE à J5 avec restauration de l'expression des marqueurs d'activation observé dans le groupe témoin en parallèle d'une amélioration clinico-biologique.

D. Évaluation de l'activation des PNE circulants via l'expression de l'ECP sérique

Afin de corréliser notre profil d'expression membranaire des marqueurs d'activation et le profil de dégranulation circulante, avons réalisé le dosage sérique en ECP en comparaison avec un groupe témoin sain (figure 37). Le taux sérique en ECP était plus élevé dans les groupes DRESS et EMP+Eo mais de façon non significative par rapport au groupe de témoins sains avec la présence d'une grande hétérogénéité notamment dans le groupe EMP+Eo (75µg/L IQR 7,3-107). Le taux en ECP sérique dans le groupe EMP semblait plus faible (6,1µg/L IQR 2,6-27) que dans le groupe contrôle sain (20µg/L IQR 12-50). Sur la base de cette analyse, nous ne mettons pas en évidence de dégranulation significative des PNE au niveau sanguin.



ECP (µg/L)	DRESS (n=4)	EMP+Eo (n=6)	EMP (n=3)	Témoin (n=17)
25% Percentile	33	7,3	2,6	12
Médiane	55	75	6,1	20
75% Percentile	68	107	27	50

Figure 37: Dosage de l'ECP sérique (µg/L). Comparaison selon un test non paramétrique de Kruskal-Wallis et comparaison multiple de Dunn.

Point clé :

Les taux sériques en ECP sérique étaient hétérogènes et n'était pas significativement augmentés dans les groupes toxidermies. Le taux en ECP sérique n'était pas discriminant entre les groupes.

E. Origine de l'éosinophilie

1. Analyse de la polarisation T

Afin de comprendre l'origine de l'éosinophilie, nous avons procédé à l'analyse de la réponse immune sur sang total afin d'en apprécier le profil fonctionnel dans nos groupes d'intérêt. Pour des raisons techniques, l'ensemble des patients inclus n'ont pas pu être analysés dans le cadre de ce protocole de cytométrie. La stratégie de gating est présentée en figure 38.

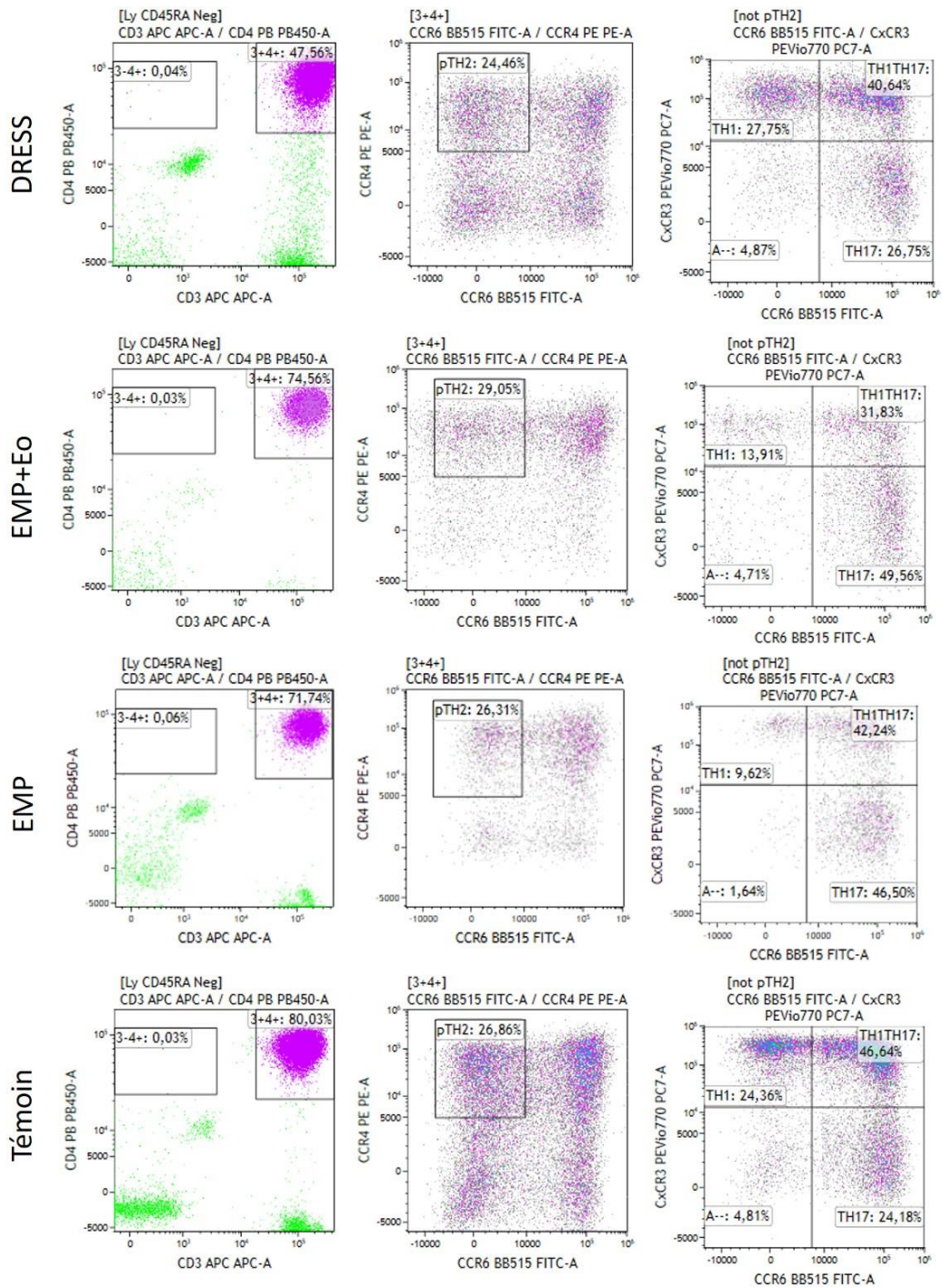


Figure 38: Stratégie de gating et représentation qualitative concernant l'analyse de polarisation immune des cellules T.

Sous réserve d'un effectif faible en raison d'aspects techniques, l'analyse du pourcentage de cellules lymphocytaires non naïves CD45RA-/CD3+/CD4+ polarisées Th1, Th2 et Th17 ne différaient pas entre les groupes de l'étude. On observait une tendance à une polarisation Th1 plus élevée chez les 2 patients atteints de DRESS en comparaison aux autres groupes. Un patient atteint de DRESS avait un pourcentage de cellules polarisées Th2 plus élevé comparé aux autres groupes (figure 39).

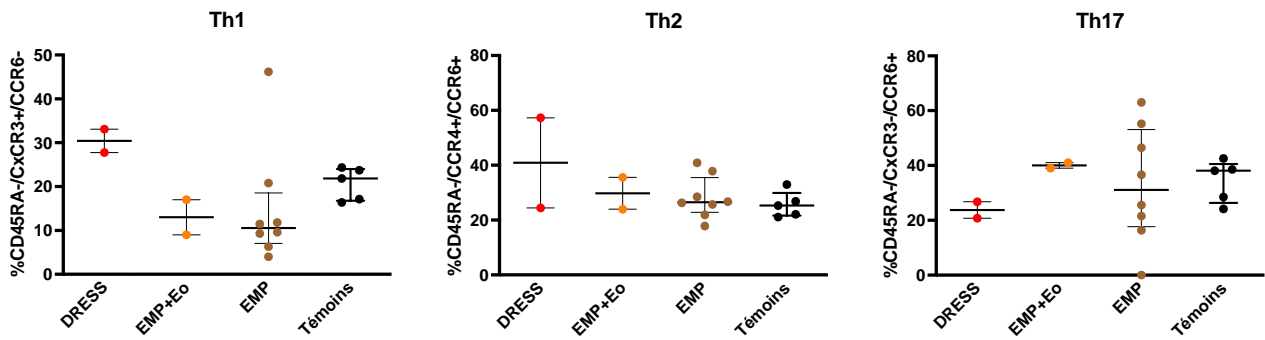


Figure 39: Étude comparative entre les groupes de la polarisation immune en pourcentage de cellules T CD3+/CD4+/CD45RA- exprimant les marqueurs déterminants la réponse Th1 (CxCR3+/CCR6-), Th2 (CCR4+/CCR6+) et Th17 (CxCR3-/CCR6+). DRESS, n=2 ; EMP+Eo n=2, *EMP, n=8 et *témoins n=5. *Test non paramétrique non apparié de Kruskal-Wallis test de comparaison multiple de Dunn.

Au sein de chaque groupe, on observait une polarisation Th2, particulièrement nette dans un cas de DRESS (52,3% c'est un pourcentage de cellules et non un pourcentage de réponse) à la carbamazépine avec atteinte hépatique et éosinophilie à 600/mm³ (figure 40). Dans le groupe EMP+Eo, on notait une polarisation des cellules T vers un profil davantage Th17. Le profil immun dans le groupe EMP était davantage hétérogène avec 4 patients avec une polarisation Th2 prédominante, 1 avec une polarisation Th1 prédominante et 3 avec une polarisation Th17 prédominante (p>0,05). Dans le groupe témoin, hormis 2 sujets ayant une polarisation Th17 prédominante, les populations Th1, Th2 et Th17 apparaissaient équilibrées (p>0,05).

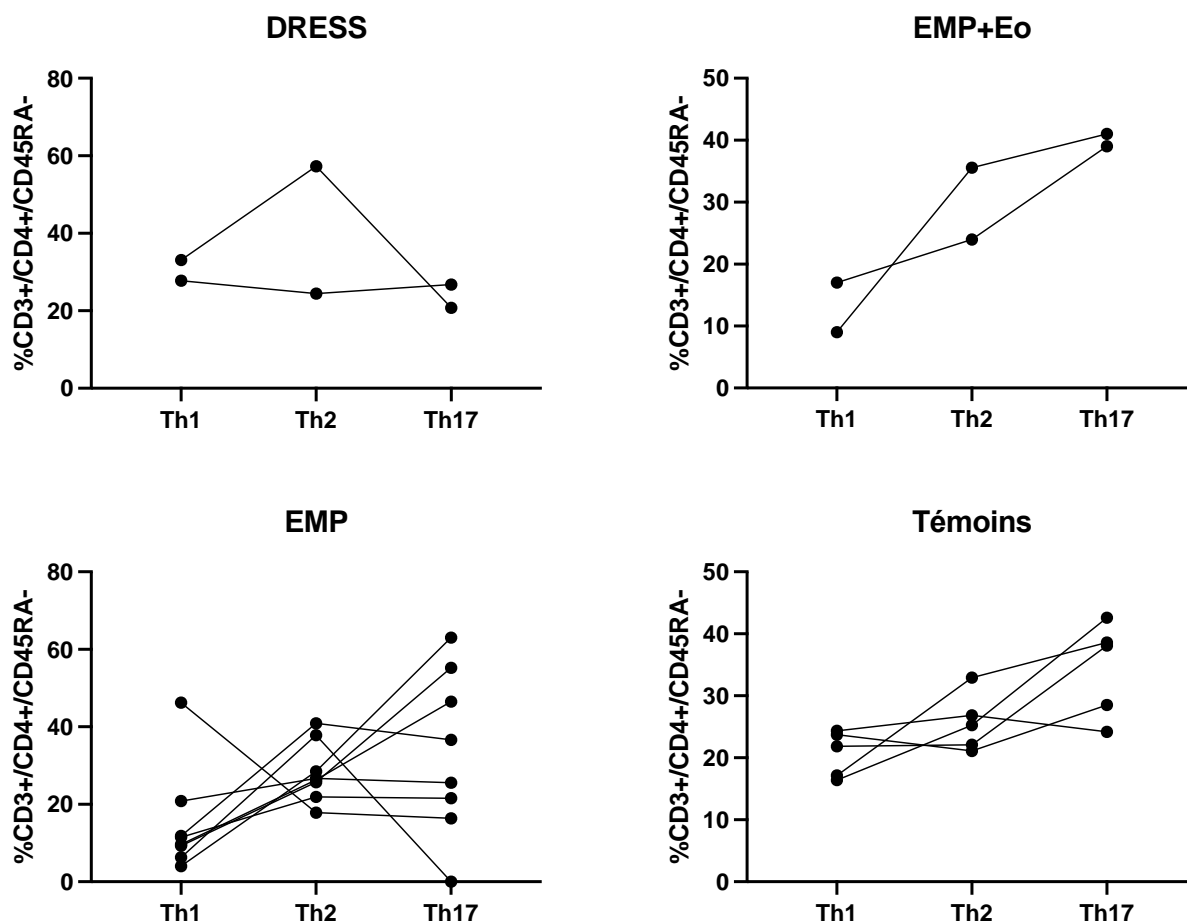


Figure 40: Étude comparative au sein des groupes de la polarisation immune en pourcentage de cellules T CD3+/CD4+/CD45RA- exprimant les marqueurs déterminants la réponse Th1 (C_xCR3+/CCR6-), Th2 (CCR4+/CCR6+) et Th17 (C_xCR3-/CCR6+). DRESS, n=2 ; EMP+Eo n=2, *EMP, n=8 et *témoins n=5. *Test non paramétrique apparié de Friedman et test de comparaisons multiples de Holm-Sidak.

Point clé :

Il n'existait de profil polarisé T prédominant entre les groupes de toxidermies ne permettant pas de les discriminer entre eux.

2. Analyse de l'expression cytokinique intracellulaire lymphocytaire T après stimulation

Afin de confirmer les données observées dans le cadre de l'étude de la polarisation T, nous avons également procédé à l'analyse de l'expression intracellulaire après stimulation des cytokines de la polarisation Th1 (IFN γ), Th2 (IL-4) et Th17 (IL-17). La stratégie de gating est rappelée en figure 41.

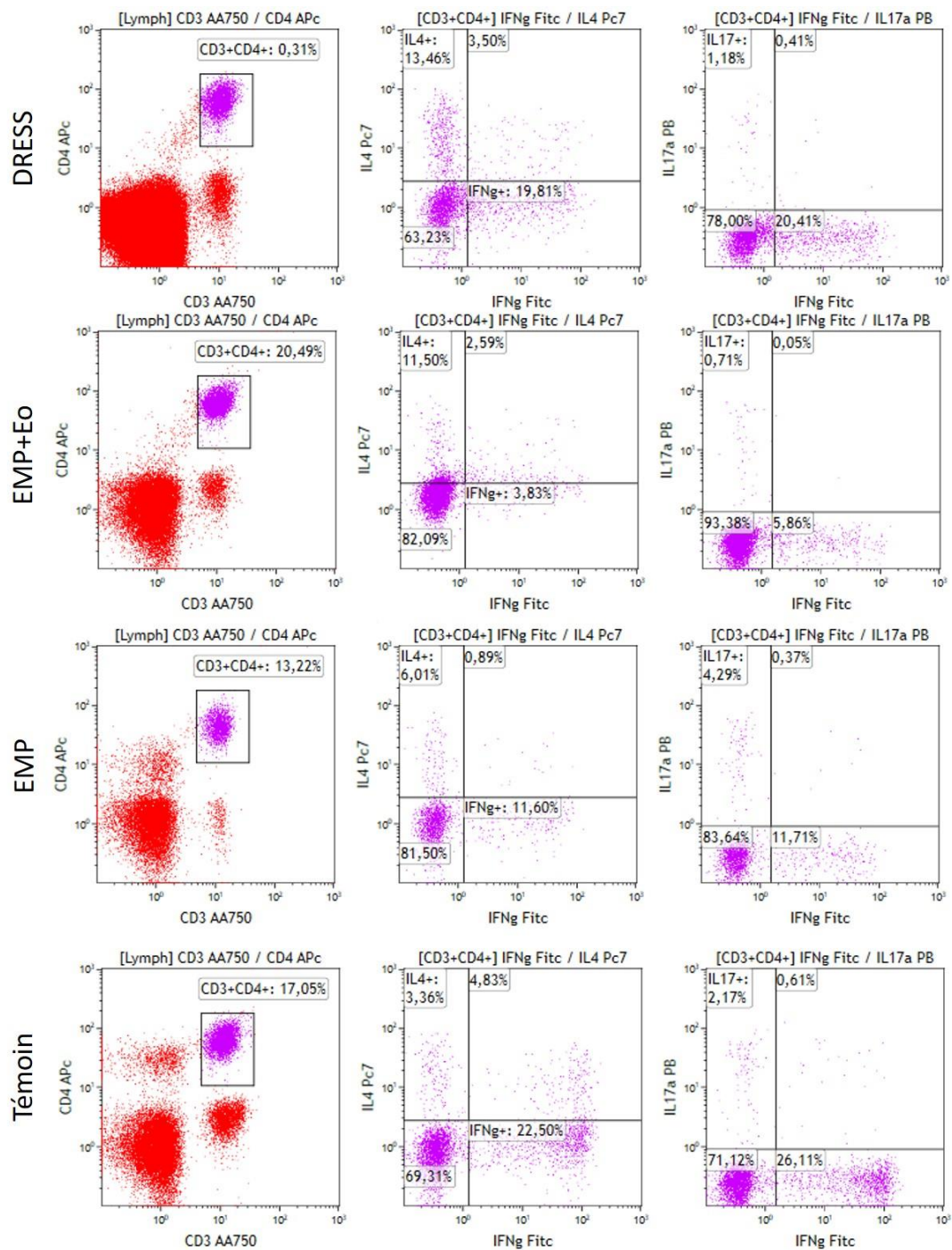


Figure 41: Stratégie de gating et illustration représentative concernant l'expression des cytokines intracellulaires (IFN γ , IL-4 et IL-17) dans les 4 groupes de l'étude.

Après stimulation, les cellules T exprimaient principalement l'IFN γ par rapport à l'IL-17 dans l'ensemble des groupes de façon significative et également par rapport à l'IL-4 dans le groupe EMP. L'IFN γ était la cytokine la plus exprimée par les lymphocytes T stimulés chez les témoins sains (figure 42). L'IL-4 était particulièrement exprimée chez un patient EMP. Concernant la comparaison entre les groupes de l'expression de ces cytokines après stimulation, Il n'existait pas de différence significative entre les groupes toxidermies et les témoins (figure 43). Il n'a pas été possible d'identifier un phénotype de polarisation

particulier chez les patients de notre cohorte en comparaison à des sujets témoins.

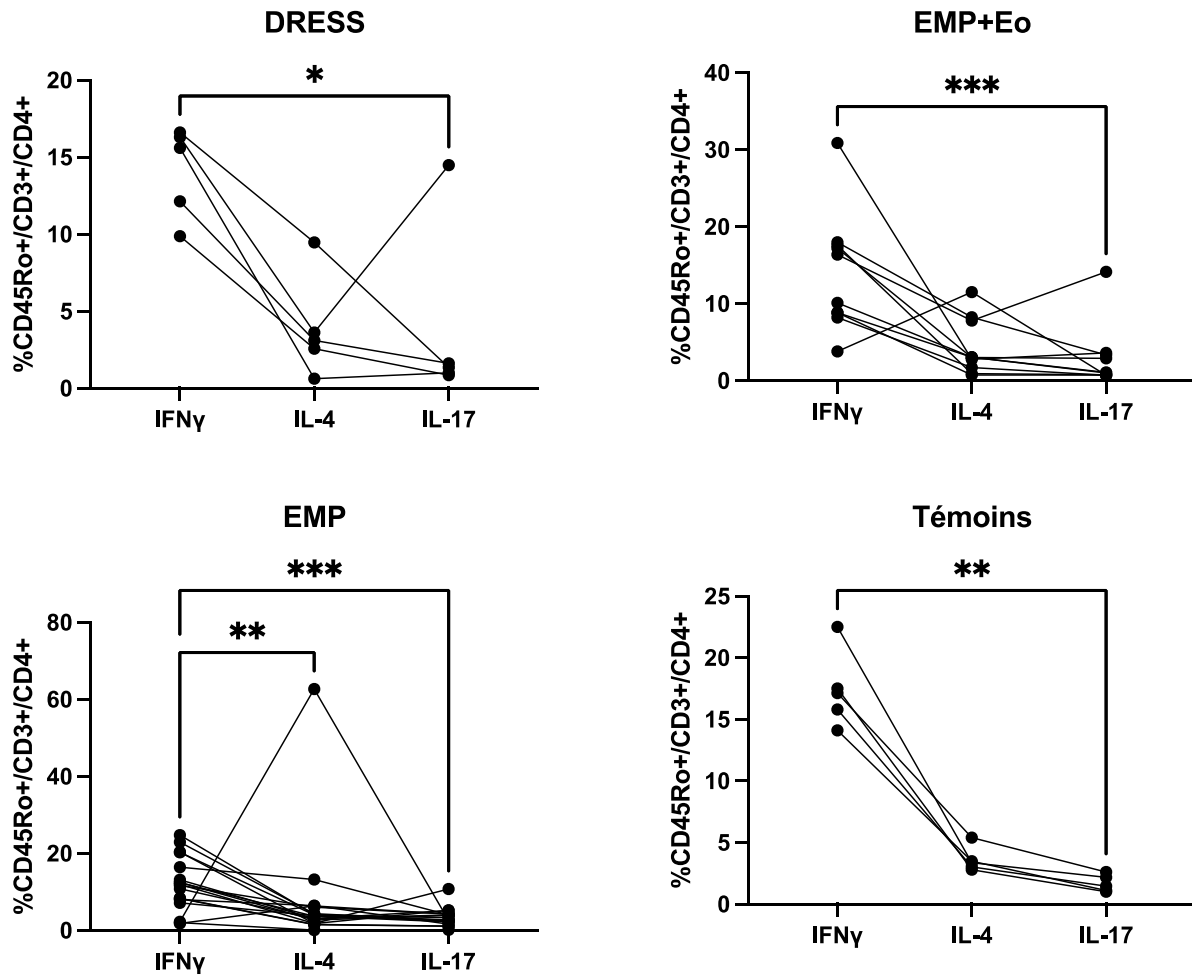


Figure 42: Comparaison au sein de chaque groupe du pourcentage de cellules lymphocytaires CD45Ro+/CD3+/CD4+ exprimant les cytokines intracellulaires (IFN γ , IL-4 et IL-17) dans les 4 groupes de l'étude. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ selon un test non paramétrique de Friedman et test de comparaisons multiples de Holm-Sidak.

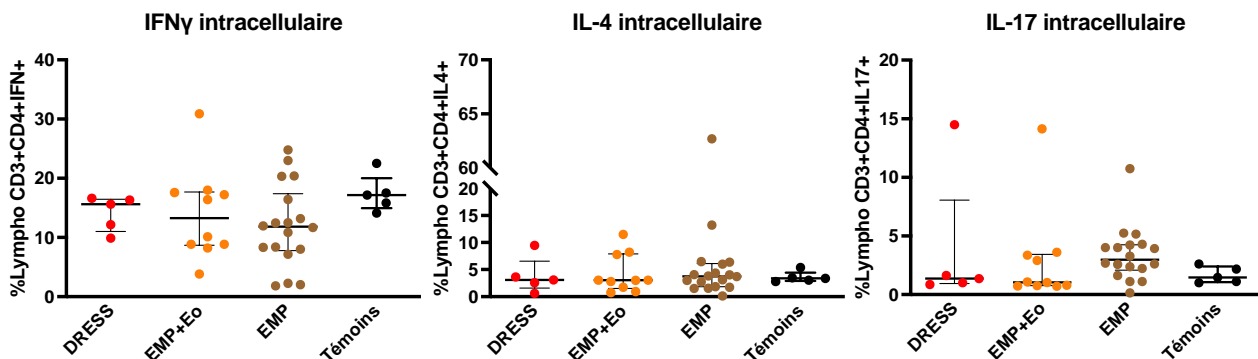


Figure 43 : Comparaison entre les groupes du pourcentage de cellules lymphocytaires CD45Ro+/CD3+/CD4+ exprimant les cytokines intracellulaires (IFN γ , IL-4 et IL-17) dans les 4 groupes de l'étude. $P > 0,05$ selon un test de Kruskal-Wallis non apparié non paramétrique et un test de comparaisons multiples de Holm-Sidak.

Point clé :

Nous n'avons donc pas mis en évidence une expression des cytokines intracellulaires d'une réponse T polarisée en particulier permettant la distinction des différents groupes de toxidermie après stimulation *in vitro*.

3. Analyse des marqueurs inflammatoires sériques

Nous avons réalisé le dosage des marqueurs sériques de l'inflammation Th2 afin de préciser si ce profil pouvait être à l'origine de l'éosinophilie au cours des toxidermies. Le dosage des différentes éotaxines n'a pas mis en évidence de différence entre les groupes et les témoins sains (figure 44).

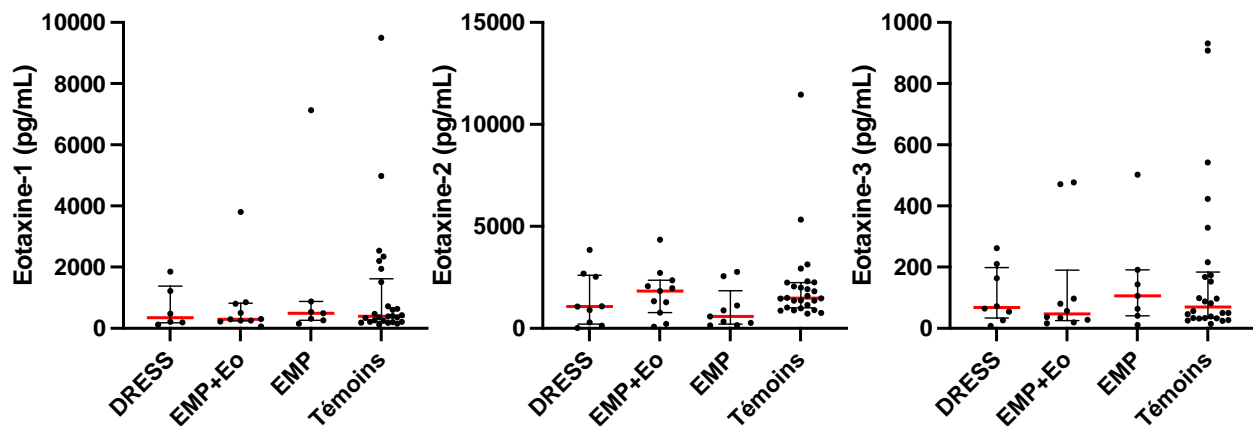


Figure 44 : Dosage sérique des éotaxine-1, -2, -3 au cours des toxidermies par rapport à des sujets sains. DRESS n=6, EMP+Eo n=10, EMP n=7 et témoins sains n=26. Test non paramétrique de Kruskal-Wallis non significatif.

De même le dosage des différentes cytokines d'intérêt n'a pas permis de discriminer les différents groupes de notre étude par rapport à des sujets témoins, ainsi il n'a pas été identifié de différence concernant le taux sérique de l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5 et le l'IL-13. Par ailleurs, les taux sériques de TSLP n'étaient pas différents entre les groupes (figure 45). Nous avons en revanche identifié un taux plus élevé de TARC dans le cadre du groupe EMP+Eo par rapport aux témoins sains. Cette différence n'était pas retrouvée entre les groupes EMP et DRESS. Les taux sériques de PGD2 étaient significativement plus hauts dans le groupe EMP par rapport au groupe DRESS mais n'étaient pas différents par rapport au groupe témoin confirmant l'absence de polarisation Th2 au cours des toxidermies étudiées.

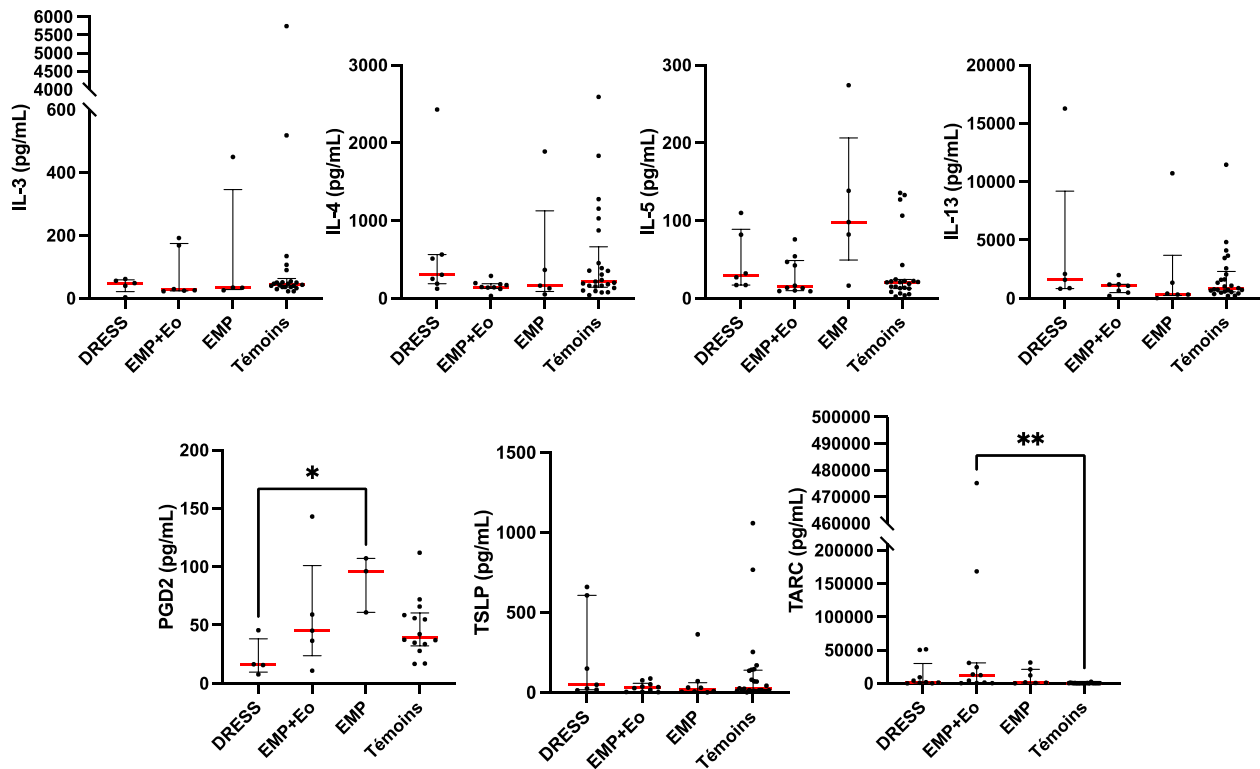


Figure 45 : Dosage sérique des cytokines d'intérêt au cours des toxidermies par rapport aux sujets témoins. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ selon un test non paramétrique de Kruskal-Wallis et test de comparaison multiple de Dunn.

Point clé :

Le dosage sérique des médiateurs cytokiniques d'intérêt (IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF) ou chimiokines (PGD2, TSLP, TARC, éotaxines 1, -2, -3) ne discriminait pas les formes de toxidermies étudiées.

4. Analyse de la population d'ILC2 circulantes

Afin d'explorer les mécanismes impliqués dans la survenue de l'éosinophilie nous avons focalisé notre analyse sur les populations ILC2 afin de savoir si ces cellules étaient impliquées dans la survenue du phénotype clinique et biologique. La stratégie de gating est détaillée dans la figure 46. L'analyse du pourcentage d'ILC2 dans la population lymphocytaire totale n'a pas montré de différence entre les groupes de l'étude. L'analyse du nombre d'ILC2 rapporté au nombre ILC totales a révélé une diminution en comparaison aux témoins sains de la fréquence des ILC2 circulantes dans les groupes EMP+Eo ($p < 0,01$) et EMP ($p < 0,001$) par rapport aux sujets contrôles. Il n'existait pas de différence significative entre les patients DRESS et les témoins sains (figure 47).

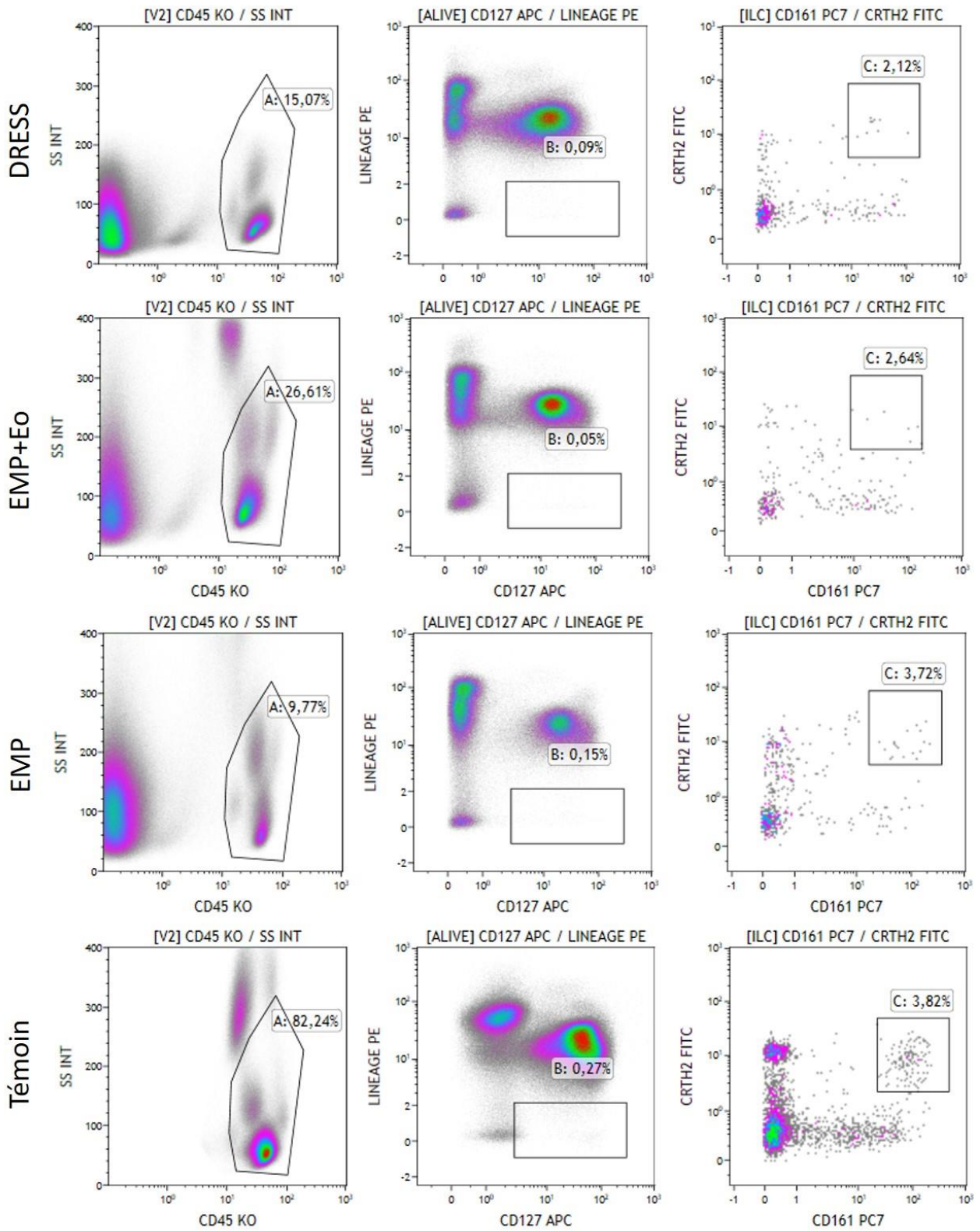
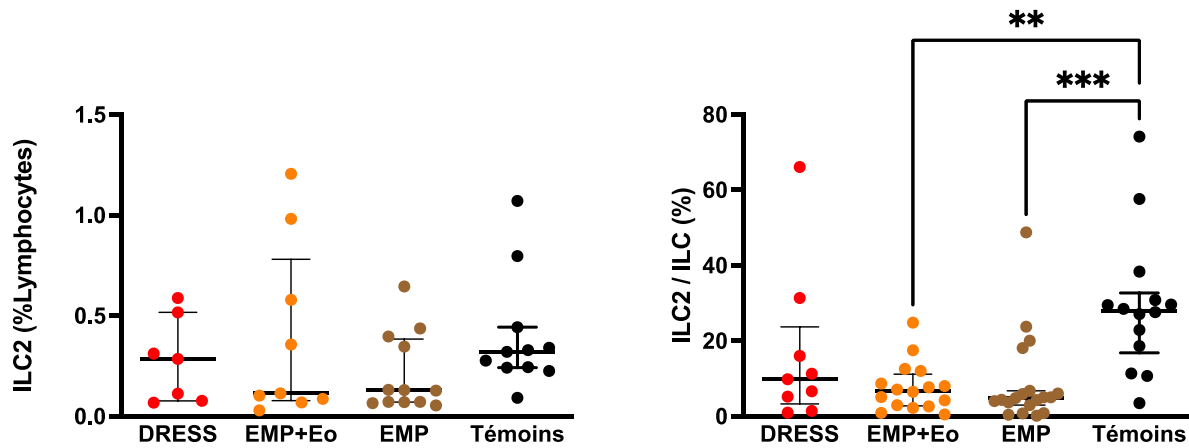


Figure 46: Stratégie de gating et illustration représentative des groupes concernant la numération des ILC2.



ILC2/ILC (%)	DRESS n=9	EMP+Eo n=16	EMP n=19	Témoins n=14
25% Percentile	3,3	2,7	2,9	17
Médiane	9,8	6,8	4,9	28
75% Percentile	24	11	6,8	33

Figure 47: Pourcentage d'ILC2 au sein de la population lymphocytaire (à gauche) et proportion en pourcentage d'ILC2 rapporté à la population ILC totale (à droite).

Points clés

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les groupes de toxidermie concernant le pourcentage d'ILC2 circulantes, ceci était cohérent avec l'absence de polarisation Th2 prédominante dans les différents groupes.

IV. Discussion

Nous avons donc montré que les PNE circulants modifient le profil d'expression de leurs marqueurs membranaires d'activation au cours d'une toxidermie érythémateuse. Ceci peut donc suggérer l'implication des PNE dans la physiopathologie des toxidermies indépendamment du taux de PNE circulant. En effet, même dans le groupe EMP sans éosinophilie significative, il existait une modification du profil d'activation cellulaire des PNE circulants. De plus, la sévérité de l'atteinte d'organe du DRESS n'était pas corrélée au taux de PNE circulants comme cela a pu être suggéré dans la littérature (224, 225), ni à la densité de l'éosinophilie cutanée (33, 77) comme nous le montrons dans notre première partie d'étude.

A. Les PNE circulants présentent un niveau d'activation hétérogène au cours du DRESS

Nous avons montré que l'expression de CD69 était légèrement augmentée dans le groupe EMP+Eo mais pas au cours du DRESS ni dans le groupe EMP par rapport aux témoins. Cependant, alors même que l'intensité de fluorescence globale de CD69 variait peu entre les différents groupes de toxidermie, nous avons identifié une sous-population de PNE chez les patients atteints de DRESS surexprimant CD69. Ces données confortent d'autres observations similaires faites dans d'autres maladies à éosinophiles, d'une hétérogénéité phénotypique des PNE que les analyses en MFI globale ne permettent pas toujours d'appréhender. Elles suggèrent aussi un état activé d'une sous population de PNE dans le compartiment circulant. CD69 et HLA-DR sont tous deux des marqueurs d'activation cellulaire qui peuvent être exprimés sur la surface des PNE. CD69 est une protéine transmembranaire exprimée sur la surface des cellules immunitaires activées, y compris les PNE. L'expression de CD69 est rapide et précoce après l'activation cellulaire et est notamment impliquée dans la régulation de la migration et de l'adhésion des cellules immunitaires. HLA-DR est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II exprimée sur la surface des cellules présentatrices d'antigènes, y compris les PNE activés. L'expression de HLA-DR est induite par l'activation cellulaire et permet aux cellules présentatrices d'antigènes d'interagir avec les cellules T. Des études ont montré que l'expression de CD69 et de HLA-DR sur les PNE était augmentée dans les tissus inflammatoires chez les patients atteints d'asthme ou de dermatite atopique (221, 226). Cela suggère que les PNE activés circulants pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse des toxidermies en produisant des cytokines inflammatoires et en contribuant à l'inflammation

des tissus. Selon Hartnell et al., l'expression de CD69 est détectée après une stimulation par le GM-CSF pendant seulement 1 heure et peut également être induite par l'IL-3, l'IL-5 et l'IFN γ (227). Dans l'étude de Wada et al., l'expression de CD69 à la surface des PNE a été évaluée par cytométrie de flux chez des patients atteints de syndrome d'entérococolite induite par les protéines alimentaires avant et après l'ingestion de l'aliment responsable. Alors qu'aucune activation des PNE n'a été observée avant l'ingestion, une augmentation significative de l'expression de CD69 sur les PNE a été démontrée chez tous les patients sans changement significatif dans le nombre absolu de PNE dans le sang périphérique, de manière intéressante, comme dans notre expérience, sans rapport avec une augmentation du nombre des PNE circulants après stimulation allergénique médicamenteuse. Dans cette étude, les niveaux d'EDN fécaux étaient augmentés le jour suivant l'ingestion de l'aliment responsable confirmant l'activation tissulaire des PNE (228). CD69 est exprimé sur les PNE dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de patients atteints d'asthme et l'exposition allergénique augmente son expression de façon significative confirmant l'intérêt de CD69 également dans l'évaluation des PNE tissulaires (229). Dans notre étude, quand bien même les PNE ne surexpriment pas CD69 en termes d'intensité moyenne de fluorescence, il existe une proportion de PNE CD69+ reflétant leur état activé au niveau circulant ce que toutefois notre analyse supervisée (FlowSom) de clusterisation n'a pas confirmé dès lors que l'ensemble des marqueurs membranaire du panel ont été pris en compte. L'expression de HLA-DR dans notre expérience n'apparaît pas modifiée de façon significative entre les groupes mais ceci ne préjuge pas de l'activation des PNE dans les tissus. En effet, dans une étude de Patel et al., l'expression de HLA-DR par les PNE tissulaires évaluée en immunohistochimie était plus importante chez les sujets atteints d'EoE par rapport à des sujets contrôles (RGO et sains) alors qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans l'expression de HLA-DR par les PNE circulants entre les groupes (230). La notion de compartimentation de l'activation entre le sang et les organes est également soulignée par d'autres auteurs ayant étudié l'expression de HLA-DR dans le poumon à éosinophiles, où les PNE dérivés du lavage broncho-alvéolaire exprimaient davantage HLA-DR (86%) par rapport à ceux du sang périphérique (7%), en faveur d'une activation sélective des PNE dans le poumon et non dans le sang. Les PNE du sang périphérique conservaient néanmoins leur capacité d'expression de HLA-DR après incubation avec des fibroblastes pulmonaires (231). Ces données suggèrent ainsi une possible compartimentation de l'activation des PNE dans les organes au cours du DRESS comme nous l'avons montré dans la première partie de ce travail où la dégranulation tissulaire dans les organes était augmentée. Par ailleurs, nos données illustrent l'intérêt de ne pas seulement considérer l'évaluation de l'intensité de fluorescence des marqueurs mais également considérer la

quantification des populations d'intérêt comme l'illustre notre analyse de l'expression de CD69 et l'analyse en t-SNE.

Points clés

- Nous avons mis en évidence la présence d'une sous population de PNE activés exprimant CD69 dans le compartiment circulant au cours du DRESS.
- Nous soulignons l'importance de ne pas seulement considérer la variation moyenne de l'intensité de fluorescence des marqueurs dans l'analyse de l'activation des PNE.

Nous n'avons pas observé d'augmentation significative de CD63 dans les groupes toxidermies ce qui témoigne d'un niveau de dégranulation faible et hétérogène au cours des toxidermies. CD63 est une molécule transmembranaire de la superfamille des tétraspanines faiblement exprimée de façon basale, mais présente de façon très intense à la membrane des granules cristalloïdes des PNE. Il est donc à ce titre considéré comme un marqueur de dégranulation. Mahmudi-Azer et al., ont observé *in vitro* une augmentation de son expression membranaire après stimulation par l'IFN γ , par les fractions du complément (C5A/CB) mais pas par l'IL-5, l'IL-3 ou le GM-CSF (232). Dans le travail de Carmo et al., les auteurs ont montré que l'éotaxine-1 par le biais d'un mécanisme de dégranulation fragmentaire était capables d'induire *in vitro* l'expression de CD63 sur les PNE (233). Notre analyse a montré que l'éotaxine-1 n'était pas augmentée chez nos patients, ce qui expliquer l'absence d'augmentation de l'expression de CD63. Aucune autre étude ne s'est encore intéressée à l'expression de ce marqueur par les PNE circulants chez les patients atteints de DRESS. Il est possible que CD63 soit davantage exprimé en intracellulaire dans un contexte de stimulation inflammatoire comme le suggèrent l'expression de CD63 sur les granules intracellulaires (232).

A ce stade, nous ne pouvons qu'émettre l'hypothèse que la diminution d'expression de CD63 à la surface des PNE chez les patients au cours des toxidermies et a fortiori du DRESS pourrait être le témoin d'un état pré-activé des PNE, avec possible augmentation de l'expression intra-cellulaire de CD63 au sein des granules mais sans dégranulation des PNE dans le compartiment circulant. En effet, l'ECP, marqueur de dégranulation des PNE, était non significativement augmenté dans le sérum alors que la dégranulation était observée dans les organes comme nous l'avons montré dans notre 1^{ère} partie de ce travail. Cette augmentation, qui est non significative, est peut-être simplement due au nombre de PNE qu'à une véritable dégranulation accrue.

Ces données phénotypiques devront faire l'objet d'une corrélation fonctionnelle plus précise

afin de préciser si ces sous populations de PNE circulants sont fonctionnellement différents des PNE du compartiment tissulaire. Cette hypothèse apparaît possible au regard des travaux de Perez-Lucendo et al., ayant évalué l'activation des PNE circulants de patients atteints d'EoE par l'identification de 5 molécules de surface (CD69, CD125, CD44, ICAM-1, CD63). Le niveau d'expression d'ICAM-1 (une protéine d'adhésion utile à la migration tissulaire) diminuait de manière significative chez les patients atteints d'EoE avec maladie active par rapport aux patients atteints d'EoE non active et aux témoins sains. De façon intéressante, chez les patients atteints d'EoE, une corrélation inverse était observée entre le nombre de PNE dans le tissu œsophagien et le pourcentage d'expression d'ICAM-1 dans les PNE du sang périphérique. Aucune différence n'était observée pour les autres molécules étudiées. Ces données suggèrent que ces PNE pré-activés au niveau sanguin présenteraient un état anergique et ne constitueraient pas le pool de PNE actifs dans les tissus (234). Notre approche méthodologique ne permet pas à ce stade de confirmer cette hypothèse.

Point clé :

A ce stade, nous confirmons une sous-expression du CD63 au cours du DRESS sans pouvoir corréler formellement ce phénotype observé à la fonction du PNE. Néanmoins, l'absence de dégranulation sérique significative pourrait suggérer un faible niveau d'activation global des PNE circulants qu'il sera nécessaire de confirmer.

Nous n'avons pas observé de modification de l'expression de CD137. CD137 est un récepteur faisant partie de la superfamille des récepteurs du TNF. Il s'agit un récepteur de costimulation inductible des cellules T, exprimé sur les cellules T activées, les cellules NK activées, les cellules T régulatrices et plusieurs cellules de l'immunité innée, notamment les cellules dendritiques, les monocytes, les neutrophiles, les mastocytes et les PNE. Son activation aurait un effet pro-apoptotique par inhibition de la survie de la cellule facilitée par l'IL-5 et le GM-CSF (235, 236).

Dans l'étude de Heinisch et al., des PNE ont été isolés à partir de sujets témoins normaux ainsi que de patients souffrant d'asthme, de dermatite atopique et d'éosinophilie idiopathique. Pour déterminer si CD137 régule la mort et l'apoptose des PNE, les cellules ont été stimulées avec un anticorps anti-CD137, en présence ou en l'absence de cytokines liées à la survie de PNE. Les auteurs ont montré que bien que l'expression de CD137 soit associée à une augmentation des taux d'IgE, l'IL-4 et l'IL-13 n'ont pas induit l'expression du gène de CD137 dans les PNE. L'expression de CD137 dans les PNE a été induite *in vitro*

en stimulant les cellules avec des surnageants dérivés de cellules T activées *in vivo* ou *in vitro*. L'activation de CD137 a abrogé l'effet anti-apoptotique médiée par le GM-CSF et l'IL-5 chez les PNE exprimant CD137, mais pas chez les PNE déficients en CD137. Ces données indiquent que l'activation de CD137 pourrait limiter l'effet anti-apoptotique des PNE médié par le GM-CSF et l'IL-5. L'absence de ce mécanisme anti-inflammatoire potentiel pourrait donc induire une augmentation du nombre de PNE aux sites inflammatoires chez les patients souffrant d'asthme intrinsèque et d'éosinophilie idiopathique comme nous l'avons observé dans notre expérience dans le DRESS (i.e., expression neutre de CD137 et augmentation de la dégranulation et de l'infiltration des PNE dans les organes) (235).

Point clé

L'absence de surexpression du CD137 pourrait constituer un facteur favorisant une augmentation des PNE dans les tissus.

Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de CD44 dans les groupes EMP et EMP+Eo mais pas dans le groupe DRESS. CD44 est une molécule d'adhésion cellulaire impliquée dans de nombreux processus biologiques, y compris la migration cellulaire et l'adhésion. L'accumulation accrue de PNE activés dans les voies respiratoires et leur diminution concomitante dans le sang périphérique soutiennent l'hypothèse que le recrutement local des PNE par des molécules d'adhésion endothéliales ou l'activation locale des PNE par des cytokines sécrétées dans les sites inflammatoires peuvent jouer un rôle décisif dans l'induction de la migration tissulaire des PNE. Les interactions entre CD44 et l'hyaluronane sont essentielles pour le recrutement des leucocytes dans les tissus inflammatoires. Une étude récente de Katoh et al., a montré que dans un modèle d'asthme aigu induit par des allergènes d'acariens, l'injection intrapéritonéale d'anticorps monoclonaux anti-CD44 empêchait les lymphocytes T et les PNE de s'accumuler dans les poumons et inhibait à la fois la production des cytokines Th2 induites par la stimulation antigénique dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et l'hyperréactivité des voies respiratoires (237). Xue et al., ont montré que l'IL-13 jouait un rôle important pendant la phase de provocation allergénique, car l'expression de CD44 était régulée à la hausse dans le tissu pulmonaire et les lymphocytes après traitement par IL-13, ce qui entraînait le recrutement des cellules inflammatoires dans les poumons et l'aggravation de l'hyperréactivité bronchique dans un modèle murin d'asthme chez la souris (238). Par ailleurs, le niveau de CD44 sur les PNE sanguins était plus faible chez les patients présentant un asthme mal contrôlé que chez les sujets bien contrôlés, indiquant une

réduction de PNE sanguins activés dans les asthmes exacerbés (239). L'existence d'une relation inverse entre le pourcentage de PNE activés exprimant CD44 dans le sang périphérique et la sévérité de l'asthme implique que CD44 peut être une molécule d'adhésion précoce requise pour la migration tissulaire des PNE. Nous avons montré que les PNE circulants au cours des toxidermies ont tendance à surexprimer CD44 suggérant une prédisposition de ces cellules à migrer dans les tissus. L'absence de surexpression significative de CD44 dans le groupe DRESS pourrait à nouveau être en faveur du caractère anergique des PNE circulants à opposer aux sous-populations actives (que nous avons identifiés par notre approche en t-SNE) ayant migré ou étant en cours de migration dans les tissus. Par ailleurs, l'absence d'augmentation de l'IL-13 sérique dans le groupe DRESS pourrait permettre en partie d'expliquer l'absence d'augmentation de l'expression de CD44. Il faut néanmoins noter qu'à l'inverse, CD44 pouvait aussi jouer un rôle clé dans l'induction des cellules T régulatrices dans un modèle murin d'asthme chronique induit par les acariens suggérant une dualité fonctionnelle du récepteur en réponse à son ligand sous tendant des mécanismes de régulation complexes non élucidés à ce jour (240). Il conviendra de confirmer nos données par le biais par exemple de l'expression des intégrines (ICAM, B2ta2-integrine, Alpha4-intégrine) par les PNE dans les groupes d'intérêt (241) pour étudier les capacités de migration des PNE dans les tissus.

Points clés :

- La tendance à surexprimer CD44 suggèrent une prédisposition phénotypique des PNE à migrer dans les tissus.
- Par extrapolation, l'absence de surexpression dans le groupe DRESS pourrait suggérer le caractère anergique des PNE circulants à opposer aux sous-populations actives (que nous avons identifiées par notre approche en t-SNE) ayant ou étant en cours de migration dans les tissus mais une analyse fonctionnelle plus poussée devra le confirmer.

B. Diminution de l'expression de marqueurs membranaires impliqués dans la réponse polarisée de type Th2

Nous avons mis en évidence une diminution du profil d'expression de marqueurs impliqués dans la réponse polarisée de type Th2 (CCR3, CRTH2, CD125) dans les groupes toxidermies suggérant que, quel que soit le niveau de l'éosinophilie, les PNE circulants modifient leur profil phénotypique dans un contexte de toxidermie, ce qui n'avait jamais été

montré jusqu'à présent. Ceci est un argument fort pour considérer que le taux de PNE circulant ne reflète pas la sévérité d'une toxidermie et qu'il n'est pas un élément suffisant pour porter le diagnostic de DRESS.

Le CRTH2 est un récepteur des prostaglandines D2 (PGD2) exprimé sélectivement par les lymphocytes T polarisés Th2, les PNE et les basophiles (242). Cette voie est notamment impliquée dans les maladies allergiques à médiation Th2 comme dans l'asthme (243), dans la rhinite allergique (244), la dermatite atopique (245), ou la conjonctivite allergique par exemple où les lésions de l'épithélium cornéen pourraient être causées par les PNE, qui sont recrutés par la sécrétion de PGD2 via CRTH2 exprimée sur les PNE (246). La liaison PGD2-CRTH2 est à l'origine d'une activation cellulaire, ainsi qu'un effet chimiotactique responsable de la migration et de l'accumulation de PNE au sein d'un site inflammatoire (247). Aussi, dans l'étude de Yahara et al., l'expression de CRTH2 à la surface des PNE était hétérogène, augmentée chez certains patients et au contraire diminuée chez d'autres patients. La diminution de CRTH2 sur les PNE de certains malades pourrait être témoin d'un état activé des PNE en réponse à l'IL-5, l'IL-5 inhibant l'expression de surface de CRTH2 sur les PNE (248). En effet, Hamada et al., ont montré que la PGD2 ou l'IL-5 pouvaient être responsables d'une diminution de l'expression de CRTH2 par les PNE, par le biais d'une internalisation de ce récepteur (249). Dans notre étude, nous avons observé une diminution de l'expression du CRTH2 sur les PNE suggérant un même mécanisme de rétrocontrôle sur l'expression de ce récepteur chez les patients atteints de toxidermie. Cependant, il n'a pas été possible de mettre en évidence une augmentation en regard du taux de PGD2 sérique. Cependant, un autre mécanisme de rétrocontrôle pourrait être impliqué en cas de toxidermie. En effet, la PGD2 exerce son action via deux récepteurs couplés aux protéines G, le récepteur prostanoïde DP et CRTH2 dont les mécanismes de régulations sont différents (250). Une équipe a montré que le récepteur DP et CRTH2 sont tous deux détectables sur les PNE circulants et que la PGD2 est capable d'induire un changement rapide de la morphologie des PNE et de favoriser leur dégranulation. Ces effets sont induits par l'agoniste sélectif de la CRTH2, mais pas par un agoniste sélectif de la DP (251). Ces données suggèrent une dualité dans la fonction de la PGD2, en fonction du récepteur impliqué. Ce que des auteurs ont montré dans l'allergie de contact induites chez la souris (par l'application de trinitrochlorobenzène ou dinitrofluorobenzène) où la PGD2 était soit capable d'induire la réaction allergique via le récepteur CRTH2 et, inversement, de l'inhiber via le récepteur DP (252). Cette même équipe a également confirmé cette dualité dans la survenue des polypes (plutôt induits via la voie DP) dans la rhino sinusite chronique (253). Dans une étude de Chiba et al., un traitement avec des agonistes de DP inhibait le chimiotactisme des PNE induit par le récepteur CRTH2. En outre, les auteurs ont montré

que les agonistes du récepteur DP augmentaient la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) lors de la stimulation par l'agoniste de CRTH2 sans augmenter l'expression de CRTH2. L'équilibre entre DP et CRTH2 pourrait donc fortement influencer le degré de migration des PNE induit par la PGD2 (254). En somme, cette dualité CRTH2/DP pouvant expliquer en partie nos observations, il serait intéressant d'évaluer l'expression du récepteur DP sur les PNE des patients atteints de toxidermie afin d'évaluer l'équilibre d'expression entre CRTH2 et DP. Par ailleurs, une étude s'étant intéressée aux mécanismes de régulation de CRTH2 indique que l'expression de CRTH2 est régulée par l'action compétitive des facteurs de transcription GATA3 et NFAT1. Bien qu'une activation prolongée par l'IL-2 ait conduit à une diminution d'expression de CRTH2 médiée par NFAT1, CRTH2 a été réexprimé lorsque le stimulus a été supprimé, ce qui suggère qu'il s'agit d'un mécanisme complexe et dynamique qui pourrait jouer un rôle dans l'inflammation allergique médiée par la voie PGD2-CRTH2 (255). Il serait, de fait, intéressant d'évaluer dans le cadre des toxidermies quelles voies sont impliquées dans la régulation de l'expression de CRTH2 dans la mesure où le PGD2 n'était pas augmenté chez nos patients. En outre, il est important de noter qu'une augmentation de CRTH2 est classiquement observée dans les situations où le PNE est impliqué dans la physiopathologie comme la polypose nasosinusienne ou l'asthme. Chen et al., ont notamment montré que les PNE des polypes nasaux avaient une expression accrue d'ARNm de CRTH2 par rapport aux témoins, l'expression la plus élevée étant observée dans les polypes nasaux récidivants. L'expression de CRTH2 sur les PNE était positivement corrélée au nombre de PNE tissulaires. Les courbes ROC (Receiver operating characteristic) ont même révélé que le CRTH2 était un meilleur marqueur prédictif de récurrence des polypes que le taux de PNE circulants et la présence d'un asthme concomitant (256). A l'inverse dans notre étude, l'expression de CRTH2 était diminuée dans les 3 groupes de toxidermies et elle n'était pas corrélée au taux de PNE circulants suggérant plutôt un mécanisme de rétrocontrôle négatif sur les PNE. De plus, il a été montré que des souris déficientes pour CRTH2 (CRTH2^{-/-}) sensibilisées et exposées à l'ovalbumine (OVA) présentaient moins de cellules inflammatoires et en particulier de PNE dans leur liquide de lavage broncho-alvéolaire après exposition chronique à l'OVA, suggérant un rôle important de la voie PGD2/CRTH2 dans la constitution de l'inflammation médiée par les PNE dans les tissus. Cependant, chez l'homme, les essais ayant évalué des stratégies bloquant le CRTH2 n'ont pas confirmé ces données obtenues chez la souris (257). Donc nos données suggèrent que la voie CRTH2/PGD2 ne serait pas prépondérante dans la survenue de l'éosinophilie circulante au cours des toxidermies et du DRESS en particulier, mais il serait intéressant d'explorer l'implication de cette voie dans la survenue des infiltrats à PNE dans les organes. Au total, il est important de considérer que le niveau

de PGD2 peut être normal même si le niveau de CRTH2 est bas. Comme détaillé précédemment, la régulation de l'expression de CRTH2 est complexe et peut donc être influencée par de nombreux facteurs.

Points clés :

Le PNE modifie son profil phénotypique quel que soit le taux de PNE circulants. Quand bien même le CRTH2 est augmenté dans les maladies à composante allergique à médiation Th2, on observait dans le cas des toxidermies, un rétrocontrôle négatif de l'expression de CRTH2 qui n'était pas associé à une augmentation du PGD2 indiquant un mécanisme de régulation complexe de cette voie de signalisation.

Cet état de régulation négative des PNE observé après la liaison sur leurs récepteurs de certains ligands pourrait aussi expliquer la diminution d'expression de CD125 dans les toxidermies, qui a tendance à être plus marquée en cas d'EMP+Eo et de DRESS, et ce, comparativement aux témoins. Cette diminution d'expression de CD125 sur les PNE a également été observée chez des patients asthmatiques sévères (258). Il est connu que l'incubation de PNE *in vitro* avec de l'IL-3, de l'IL-5 ou du GM-CSF est capable d'induire une réduction de l'expression de CD125 (259). Dans une étude menée chez des patients asthmatiques *in vivo*, l'expression de CD125 diminuait de manière significative sur les PNE circulants et sur les PNE présents dans le LBA de patients après stimulation allergénique pulmonaire. En revanche, les concentrations d'IL-5 étaient en parallèle augmentées dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire après stimulation, suggérant un mécanisme de rétrocontrôle de l'IL-5 sur son récepteur (260). Nous n'avons pas observé d'augmentation des taux sériques d'IL-5 chez nos patients atteints de toxidermies, ce qui pourrait vouloir dire que s'il existe un mécanisme de rétrocontrôle complexe dans la mesure où les taux d'IL-5, et d'IL-3 n'étaient pas augmentés. Dans notre laboratoire, nous avons également observé la baisse d'expression de CD125 sur les PNE de patients atteints de dermatite atopique ce qui pourrait être une piste pour expliquer l'échec du mépolizumab et plus récemment du benralizumab dans cette indication. La diminution d'expression du récepteur de l'IL-5 pourrait expliquer que les PNE circulants deviennent moins sensibles ou réfractaires à l'IL-5 et donc aux traitements ciblant l'IL-5 ou son récepteur. Dans l'exemple du mépolizumab, ce traitement a entraîné une déplétion périphérique peu profonde en PNE dans cet essai chez des patients atteints de dermatite atopique dont il faut rappeler qu'ils n'avaient pas été sélectionnés en baseline sur l'expression de CD125 (261). Dans l'étude de Hellman et al., les auteurs avaient pour objectif d'étudier la régulation *in vitro* de CD125

sur les PNE isolés du sang périphérique de sujets sains. L'expression de CD125 était diminuée de manière dose-dépendante, par l'IL-5 et le GM-CSF ou par l'exposition à du liquide péritonéal de patients atteints d'ascite éosinophilique idiopathique (cet effet inhibiteur était largement moindre avec du liquide d'ascite d'origine infectieuse). Ces données indiquent que l'IL-5, contrairement à son action connue sur les progéniteurs des PNE, régule à la baisse le CD125 sur les PNE matures (262). Au laboratoire, nous avons évalué l'impact de la stimulation par l'IL-5, l'IL-3 et le GM-CSF sur des PNE de sujets sains triés et nous avons observé qu'une stimulation des PNE avec des mix de cytokines (GM-CSF/IL-3 ou GM-CSF/IL-3/IL-5 ou IL-5 seule) induisait une diminution significative de l'expression membranaire de CD125. En parallèle, des stimulations de 24 heures étaient associées à une augmentation de l'expression d'HLA-DR et CD44 à l'inverse de CCR3 qui était diminué (données non publiées). Dans le cadre de la polypose naso-sinusienne, des patients présentant également un asthme se caractérisent par une éosinophilie et un taux élevé d'IL-5 dans les sécrétions nasales. Bien que les PNE présentent des profils d'activation après la migration de la muqueuse (augmentation d'expression de CD69), il a été constaté une baisse relative de l'expression de CD125 sur les PNE tissulaires chez les patients asthmatiques. La culture des PNE en présence concomitante (mais pas séparément) d'IL-5 et d'IL-9 a montré un effet anti-apoptotique chez les patients asthmatiques ainsi qu'une augmentation de l'expression de CD125 (263). Cette étude montre bien qu'une expression basse de CD125 n'est pas toujours associée à une diminution de la fonction des PNE lorsqu'ils sont dans les tissus comme nous l'avons montré en première partie. Néanmoins, toutes les études ne sont pas concordantes, comme dans les travaux de Dupuch et al., où les auteurs ont observé un métabolisme oxydatif accru des PNE circulants à l'état basal ou activé, diminuant significativement en présence d'IL-5 au cours de la polypose naso-sinusienne. Les auteurs suggèrent un état de pré-activation (« priming ») des PNE circulants chez les patients atteints de polypose se produisant avant la migration des PNE vers les polypes (264). En somme, nos données au cours des toxidermies peuvent suggérer qu'une expression basse de CD125 sur les PNE circulants ne soit pas la conséquence unique d'une altération de la voie de signalisation de l'IL-5 car d'autres voies de signalisation sont impliquées dans son expression (IL-9 ?). La baisse d'expression de CD125 pourrait ne pas avoir d'impact direct sur la fonction des PNE dans les tissus comme le suggère les nombreuses expériences positives des biothérapies ciblant CD125 au cours du DRESS (173, 176, 265).

Points clés :

- Les PNE circulants dans les toxidermies ont une diminution d'expression de CD125 plus marquée dans les cas de DRESS suggérant un mécanisme de rétrocontrôle négatif qui ne semble pas exclusivement médié par l'IL-5 et l'IL-3.
- La diminution d'expression de CD125 pourrait être en faveur d'un état pré-activé dans le compartiment circulant avant la migration tissulaire.

Le CCR3 est un récepteur membranaire impliqué dans le chimiotactisme et la dégranulation des PNE. Il reconnaît notamment les éotaxines-1, 2 et 3, impliquées dans le chimiotactisme des PNE (266, 267). Ses autres ligands sont les protéines chimiotactiques monocytaires (CCL7, CCL8 et CCL13). Ces molécules sont impliquées dans le recrutement tissulaire des PNE et dans leur dégranulation comme l'ont confirmé Fujisawa et al., qui ont montré que le potentiel de dégranulation des PNE induit par les chimiokines était potentialisé *in vitro* après un priming par l'IL-5 (268). A l'inverse, l'inactivation du gène de CCR3 entraîne l'inhibition de la prolifération, la migration et la dégranulation des PNE en régulant à la baisse la voie PI3K/Akt chez la souris (269). Cependant, le blocage de CCR3 en pathologie humaine n'a pas montré son intérêt (270). Notre étude a montré une diminution d'expression de CCR3 dans les 3 groupes de toxidermie par rapport aux sujets sains. Dans l'EoE, il a été mis en évidence une diminution de l'expression du CCR3 sur les PNE sanguins (271) et un taux sanguin élevé d'éotaxine-3 (272). Zimmerman et al., ont suggéré que la liaison de CCR3 avec ses ligands entraînerait une internalisation prolongée du récepteur, et ce de façon dose-dépendante. Leurs résultats établissent que l'internalisation de CCR3 joue un rôle essentiel dans certaines réponses fonctionnelles des PNE (273, 274). Une partie du récepteur internalisé serait ainsi dégradée, ce qui nécessiterait une nouvelle synthèse pour que le récepteur puisse être à nouveau exprimé à la membrane. Ces données suggèrent donc un état « réfractaire » des PNE après exposition prolongée aux éotaxines mais cette hypothèse n'a pas pu être confirmée dans notre étude car les dosages réalisés dans le sérum de nos patients n'ont pas montré d'augmentation des taux d'éotaxines quel que soit le groupe de toxidermies. Cependant, la diminution d'expression de CCR3 n'est pas exclusivement liée aux éotaxines ; en effet, dans l'étude de Dulkys et al., les auteurs démontrent que l'IL-3 induit une inhibition dose et temps-dépendante de CCR3 à la surface des PNE, comparable à celle qui est observée avec l'éotaxine, ligand spécifique de CCR3, alors que l'IL-5, le GM-CSF, l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, l'IFN γ et le TNF α n'ont eu aucun effet (275). Il est important de noter que la majorité de nos patients atteints de toxidermies était atteinte d'un syndrome infectieux ayant motivé l'introduction du traitement responsable de la toxidermie. Ce point est important à considérer car des auteurs ont observé chez des

patients atteints de choc septique, une expression réduite de CRTH2 sur les lymphocytes polarisés Th2 et les cellules T régulatrices et également les PNE. En outre, l'expression de CCR3 par les PNE était fortement corrélée à l'expression de CRTH2, suggérant ainsi une modulation étendue des molécules liées à la réponse Th2 dans un contexte infectieux (276).

Points clés :

- L'expression de CCR3 est diminuée de façon plus marquée au cours du DRESS par rapport aux autres toxidermies.
- Cette diminution ne semblait pas directement expliquée par une augmentation sérique des éotaxines ni de l'IL-3.

Le niveau bas d'expression de CD125, CRTH2 et CCR3 pourrait être rapproché d'un concept de PNE « usé » ou « épuisé » (« exhausted » en anglais) (129), c'est-à-dire un état dans lequel les PNE, sous l'effet de multiples stimuli deviennent "dysfonctionnels" ou "désensibilisés" après avoir été activés, adressés aux tissus de manière répétée et prolongés dans leur survie par des stimuli inflammatoires. Toutefois, dans notre étude, il s'agissait d'une pathologie aiguë et précoce à opposer au contexte chronique où ce phénomène est plus susceptible de survenir. De plus, les taux sériques d'IL-3, d'IL-5, de GM-CSF mesurés en parallèle de manière précoce dans le sang, ne pouvaient expliquer l'activation excessive à l'origine de la régulation négative observée. De fait, nous suggérons donc plutôt un mécanisme de « pré-activation » ou « priming » des PNE au cours des toxidermies. Dans cette hypothèse, un PNE dit « primé » est un PNE qui aurait été exposé à un stimulus - peut être temporaire- qui aurait induit des modifications des PNE les rendant plus réactifs et plus aptes à migrer vers les tissus. Toutefois, notre analyse ne permet pas d'identifier les mécanismes moléculaires à l'œuvre dans le rétrocontrôle des récepteurs sous-tendant cette hypothèse puisque les marqueurs classiques sériques (dosage des cytokines) et cellulaires (profil de la réponse immune T et nombre d'ILC2) n'étaient pas particulièrement présents chez nos patients.

En synthèse, nous proposons les arguments suivants en faveur du caractère « pré-activé » des PNE du compartiment circulant au cours des EMP avec ou sans éosinophilie et du DRESS: une faible expression en intensité de fluorescence des marqueurs membranaires d'activation cellulaires (CD69, HLA-DR) mais la présence d'un contingent de PNE activés (pourcentage augmenté de PNE CD69+); corrélé à un faible niveau de dégranulation circulante (augmentation non significative des taux sériques d'ECP en parallèle d'un niveau

d'expression faible de CD63) ; une diminution du niveau d'expression de CD125, CRTH2 et CCR3 suggérant un état « pré-activé » avant migration dans les tissus et l'absence de corrélation entre le niveau d'expression des marqueurs d'activation et le taux de PNE. Il faudra confirmer ces données sur la base d'une étude fonctionnelle qui fera l'objet d'analyses ultérieures.

Le « priming » des PNE est un processus par lequel ces cellules sont activées et préparées à une réponse plus rapide et plus forte à des stimuli ultérieurs (277). Les PNE peuvent être « pré-activés » de plusieurs façons, notamment par l'exposition à des cytokines (IL-5), qui est produite par les lymphocytes T et d'autres cellules immunitaires qui est capable d'une réorganisation globale du cytosquelette, des organelles, des récepteurs d'adhésion et des molécules de signalisation facilitant probablement l'extravasation, la migration, la libération des granules et la survie des PNE qui pénètrent dans les tissus à partir de la circulation sanguine (278). Dans le cadre du DRESS, les mécanismes à l'origine cet état de « priming » des PNE sont inconnus. En ce qui concerne par exemple les virus, des études ont montré que certains virus respiratoires, tels que le virus respiratoire syncytial (VRS) et le virus de la grippe, peuvent induire l'activation des PNE (279). Le VRS est particulièrement connu pour induire une forte réponse à PNE (280) chez les nourrissons et les jeunes enfants, qui peut conduire à une inflammation des voies respiratoires inférieures et à une exacerbation de l'asthme chez les personnes atteintes de cette maladie. Le mécanisme par lequel les virus induisent le priming des PNE n'est pas encore entièrement compris, mais il est probable que cela implique la libération de cytokines et d'autres médiateurs inflammatoires par les cellules infectées, la libération de particules virales ou la réaction immunitaire de l'hôte. Le rôle d'HHV-6 ou EBV dans le priming des PNE est totalement inconnu à ce jour et pourrait constituer une voie de recherche importante sur le DRESS syndrome.

C. Évolution des marqueurs d'activation dans le temps

Nous avons constaté une modification rapide des marqueurs membranaires chez une patient atteinte de DRESS à J5 de l'arrêt du traitement et de l'initiation du traitement par dermocorticoïdes. Ceci confirme que les PNE modifient très vite le profil d'expression de leurs marqueurs membranaires. Nous n'avons pas la possibilité de confirmer l'effet spécifique des dermocorticoïdes en l'absence de témoin évaluant l'histoire naturelle sans traitement du DRESS dans le cas présent. L'augmentation de l'expression par le PNE des récepteurs CRTH2/CCR3/CD125, couplée à la diminution de l'expression de CD69 et HLA-DR, était associée à une amélioration des lésions cliniques et des paramètres biologiques, comme

cela a été montré par Venet et al., dans le cas du choc septique (276). Sur la base de cette observation, la ré-ascension précoce de l'expression de ces marqueurs membranaires des PNE circulants pourrait constituer un marqueur de réponse au traitement et à une évolution favorable du DRESS. Les données de la littérature rapportent fréquemment le succès de la stratégie topique comme dans une étude récente, où 25,5% des 171 patients inclus avaient bénéficié d'une corticothérapie locale exclusive (281) ; ou encore dans la série pédiatrique de Bedouelle et al., où 30,6% des 49 enfants avaient bénéficié d'une corticothérapie topique exclusive et était suffisante au moins dans les cas les moins sévères (23).

Points clés :

- Les PNE modifient à J5 leur profil phénotypique après arrêt du médicament inducteur et initiation du traitement topique.
- L'augmentation de l'expression de CD125, CRTH2, CCR3 et la diminution de l'expression de CD69 et HLA-DR sont associés à une évolution clinique et biologique favorable.

D. Origine des PNE dans les toxidermies

Les mécanismes sous-tendant la survenue d'une éosinophilie au cours des toxidermies ne sont aujourd'hui pas complètement compris. Il a été suggéré que l'augmentation des PNE dans le cadre des toxidermies serait lié à la sécrétion d'IL-5 comme l'ont suggéré des études *in vivo* (181) et *in vitro* (282). Dans cette dernière étude, des PBMC de 20 patients ayant développé un EMP à divers antibiotiques ont été incubés pendant cinq jours avec les médicaments suspectés. Une production d'IL-5 et d'IFN γ a été observée en réponse à l'exposition au médicament imputable dans 65% et 73,6% des cas, respectivement. Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de façon significative une augmentation des taux d'IL-5 dans les groupes de toxidermies avec éosinophilie, suggérant d'autres mécanismes à l'origine de l'augmentation de PNE chez nos patients comme sans doute 35% des patients de l'étude de Dharanisankar et al.

Dans notre étude, les ILC2 circulantes ne semblaient pas impliquées dans la survenue de l'éosinophilie si on considère l'absence de différence en termes de nombre d'ILC2 circulantes entre les groupes toxidermies avec et sans éosinophilie. Ces données sont contradictoires par rapport aux données de la littérature. Néanmoins, il n'y a qu'une seule étude à notre connaissance ayant évalué spécifiquement le rôle des ILC2 dans un travail

ayant comparé 54 patients (24 patients atteints de DRESS et 30 témoins sains). Les auteurs ont identifié une augmentation des ILC2 ST2+ dans les lésions cutanées et le sang des patients atteints de DRESS. En outre, les taux sériques de ST2 soluble, d'IL-5 et de TSLP étaient significativement élevés au stade aigu de la maladie suggérant leur implication dans la physiopathologie du DRESS (84). Nos résultats ne montrent pas d'augmentation du contingent d'ILC2 circulantes entre les groupes d'intérêt ce qui était cohérent avec l'absence de polarisation Th2 prédominante dans nos groupes. En effet, les ILC2 sont connues pour leur capacité à induire une réponse Th2 notamment dans l'asthme où elles occupent une position stratégique préférentiellement dans la muqueuse des voies respiratoires et jouent un rôle important dans le recrutement d'autres cellules du système immunitaire et l'activation des cellules résidentes en réponse à des dommages causés par des agents pathogènes (283). Notre étude des ILC2 s'est limitée au compartiment circulant mais la littérature suggère l'intérêt d'explorer le contingent tissulaire des ILC2. En effet, dans une étude récente de modèle murin de dermatite atopique a montré que l'IL-25 produite par les kératinocytes active les ILC2 était à l'origine de l'hyperplasie épidermique, l'infiltration dermique par les cellules T CD4+ et l'expression cutanée de l'IL-13. Les ILC étaient la principale source d'IL-13 dans la peau de souris sensibilisée de façon aiguë (284). En outre, Xue et al., ont montré que la liaison de la PGD2 au CRTH2 était capable d'induire la prolifération et la migration des ILC2 ainsi que la production de cytokines de type 2 (285). De même, d'autres travaux ont montré l'implication des ILC2 dans le maintien de l'inflammation pulmonaire médiée par la voie PGD2/CRTH2 et le rôle de CRTH2 favorisant l'accumulation d'ILC2 induite par l'IL-33 dans le poumon (286, 287). Dans les récents travaux de Tsai et al., les ILC2 exprimant le récepteur de l'IL-33 : la ST2 sérique soluble, étaient présentes dans la peau et le sang au cours de la phase très aiguë du DRESS, et le taux de sST2 semble être corrélé à la sévérité du DRESS (84). Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'augmentation significative de la réponse Th2 et du nombre d'ILC2 circulantes dans nos groupes de patients atteints de toxidermie. Il serait sans doute intéressant de poursuivre l'exploration de l'implication des ILC2 dans les tissus dans le cadre des EMP et du DRESS (notamment dans les organes lésés autres que la peau).

Par ailleurs comme évoqué précédemment, nous n'avons pas identifié de polarisation T prédominante dans nos groupes de toxidermies. Il est intéressant de noter que dans la littérature, les données apparaissent contradictoires quant à la prédominance d'une réponse polarisée dans les toxidermies et en particulier le DRESS comme on peut le voir dans d'autres pathologies impliquant les PNE. Par exemple, il n'a pas montré de différence significative dans la répartition des cellules Th1 et Th2 du sang périphérique entre des

groupes de patients atteints de sinusite chronique atopique, non atopique et des patients témoins quand bien même il existait une éosinophilie significative chez les patients atopiques (288). Des données contradictoires sur la polarisation immunes des EMP d'origine médicamenteuse existent : des équipes ont montré qu'il existait à la fois des taux augmentés de d'IL-5 (Th2) et d'IFN γ (Th1) (282) mais les auteurs n'avaient pas étudié la polarisation des cellules. D'autres équipes ont suggéré la prédominance d'une réponse polarisée Th1 via l'expression augmentée des cytokines et chimiokines correspondantes (TNF α , CXCL9, CXCL10, CXCR3) à la fois dans la peau et le sang de patients atteints d'EMP en comparaison à des sujets sains (289). Le TNF α et l'IFN γ sont connus pour être élevés dans les cas de DRESS et pourraient prédire une réactivation virale HHV6 au cours de l'évolution selon certaines équipes mais n'est pas d'usage courant (79, 290). De même, les lymphocytes Th17 peuvent être augmentés au cours du DRESS mais d'avantage à la phase tardive de la maladie (prélèvement réalisé à J10 dans l'étude de Fujiyama et al.). Les auteurs de cette étude ont démontré que les cellules Th17 sont présentes dans la peau lésionnelle ainsi que dans le sang périphérique. Par rapport aux cellules Th17 circulantes, l'apparition des cellules Th17 infiltrant la peau semble être retardée (291). Tandis que d'autres équipes ont suggéré à l'inverse une expression prédominante de marqueurs de la réponse Th2 (TARC, TSLP, IL-5) (82, 84, 292). En effet, dans l'étude de Tsai et al., les taux de TSLP étaient élevés à la phase aiguë du DRESS dès la 1^{ère} semaine d'évolution. Le TSLP peut être classiquement produit par les kératinocytes en situation de danger. Des études ont montré que le TSLP et l'IL-33 peuvent interagir de manière synergique pour amplifier la réponse immunitaire dans la peau. Par exemple, une production excessive de TSLP peut entraîner une augmentation de la production d'IL-33, qui à son tour peut activer les lymphocytes T pour induire une réponse inflammatoire (293, 294). Dans notre étude, le TSLP n'était pas augmenté de façon globale chez tous les patients mais pouvait être augmenté à l'échelle individuelle au cours du DRESS ; ceci suggère des mécanismes physiopathologiques différents à l'échelle individuelle à la phase aiguë, impliquant davantage l'immunité innée médiée par les alarmines chez certains patients et pas chez d'autres malades. Quant au TARC, il s'agit d'un biomarqueur semblant assez spécifique des DRESS aigus (82). TARC exerce son action via son récepteur aux chimiokines C-C de type 4 (CCR4). Le CCR4 est surtout exprimé par les lymphocytes Th2 (295) mais sa présence à la surface des PNE a déjà été montrée dans le lavage broncho-alvéolaire (296). Dans notre étude, TARC était augmenté dans le groupe EMP+Eo de façon significative par rapport aux sujets contrôles et il existait une tendance à son augmentation dans le groupe DRESS, sans observer des valeurs trois fois plus élevée chez les patients ayant une réactivation HHV-6 à la phase précoce du DRESS comme observé dans l'étude d'Ogawa

et al. Ces auteurs ont également suggéré que les taux sériques de TARC dans les DRESS étaient corrélés à la gravité des lésions cutanées et muqueuses, à la fièvre, à l'atteinte hépatique et rénale, aux taux d'ADN de HHV-6 et de CMV circulants, ainsi qu'aux cytokines sériques dosées telles que l'IL-5, IL-10 et IL-2 (82). Une augmentation de TARC dans le groupe EMP+Eo pourrait constituer un marqueur précoce de l'évolution d'un EMP+Eo vers un DRESS comme suggéré dans la littérature. Toutefois, dans notre étude, le suivi évolutif des patients du groupe EMP+Eo à 10 jours n'a pas identifié de tels patients ayant finalement évolué vers un DRESS mais il faut considérer que le médicament imputable avait été arrêté et le traitement par corticoïdes débutés.

Les données de la littérature reflètent finalement l'hétérogénéité très importante inhérente à cette pathologie qui met en jeu des paramètres très variés : médicaments différents, délais d'exposition, situation immune sous-jacente, prédisposition génétique, profil de réplication virale. Ces données contradictoires expliquent sans doute le succès variable de différentes stratégies thérapeutiques rapporté dans la littérature. En effet, des nombreux cas suggèrent l'efficacité des stratégies ciblant l'IL-5 ou son récepteur (173). Récemment, une analyse en single-cell-RNA-seq réalisée sur la peau et le sang chez un patient atteint de DRESS sévère a montré une régulation positive des gènes des voies de signalisation JAK-STAT. Ceci a conduit les auteurs à introduire un traitement par un inhibiteur de JAK-1/3 (tofacitinib) ce qui a permis de contrôler la maladie et de réduire les traitements immunosuppresseurs. Ainsi, cette approche de "médecine de précision" utilisant des analyses RNA-seq a guidé une intervention thérapeutique réussie chez un patient atteint de DRESS réfractaire (297). Damsky et al., rapporte un succès similaire chez 2 patients atteints de DRESS sévère avec myocardite traités par tofacitinib (298). Les auteurs soulignent l'intérêt d'une stratégie ciblant plus largement les médiateurs par le biais de l'inhibition de la voie JAK-STAT en comparaison à une stratégie trop restreinte sur une voie en particulier (IL-5), néanmoins à ce jour il n'existe pas de données sur la supériorité d'une stratégie par rapport à l'autre. Un cas de DRESS a quant à lui été traité avec par anti-TNF α illustrant cette notion d'hétérogénéité des mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette pathologie (299)

Finalement, il n'existe pas de critère cytométrique ou des marqueurs circulants robuste, fiable et reproductibles permettant de distinguer un DRESS par rapport à un EMP (avec ou sans éosinophilie) sur la base de l'étude des marqueurs d'activation des PNE circulants. En d'autres termes lors de la survenue d'un exanthème d'origine médicamenteuse, la présence d'une éosinophilie ne préjuge pas d'une évolution potentielle vers un DRESS ce d'autant que l'éosinophilie n'est pas un critère obligatoire (seuls 52% des patients dans la série de Chen et al., avaient une éosinophilie) y compris en contexte de DRESS sévère (300, 301).

Il n'existe pas d'argument robuste quant au profil phénotypique précis des PNE qui permettrait de prédire précocement une évolution d'un EMP vers un DRESS ou même simplement de confirmer si un EMP avec éosinophilie constituerait une forme de passage obligatoire vers un DRESS. Il apparaît donc possible que la distinction à l'échelle du PNE soit complexe et repose sur l'identification de sous population de PNE activés d'intérêt ainsi que la confrontation aux données du répertoire T et des paramètres d'activation lymphocytaires.

Points clés :

- Nous ne mettons pas en évidence de différence possible entre DRESS et les autres toxidermies au niveau circulant (marqueurs d'activation des PNE, profils immuns comparables, taux d'ILC2 non discriminant), il n'était notamment pas possible de prédire l'évolution d'un EMP+Eo vers DRESS,
- L'éosinophilie à elle seule n'est pas un critère suffisant pour le diagnostic ou prédire l'évolution d'un patient vers un DRESS,
- Mais nous avons identifié la présence d'une sous population de PNE particulière, activée au cours du DRESS,
- Au cours des exanthèmes médicamenteux comprenant le DRESS nous avons proposé le concept de PNE pré-activés avant migration dans les tissus confirmant leur implication dans les atteintes d'organes (hors peau),
- Finalement l'hétérogénéité des patients au niveau circulant (quel que soit le groupe de toxidermies) sous-entend des mécanismes différents et donc cibles thérapeutiques différentes.

Nous proposons la synthèse suivante concernant le phénotype des PNE au cours des exanthèmes médicamenteux et du DRESS sur la base de notre analyse (figure 48) où le PNE circulant présente un phénotype particulier qui le prédispose à migrer dans les tissus où il exprime un état activé différent entre la peau et les organes internes. Néanmoins ce phénotype circulant ne permet pas de distinguer un DRESS d'un simple EMP avec ou sans éosinophilie autrement que sur le niveau de rétrocontrôle observé.

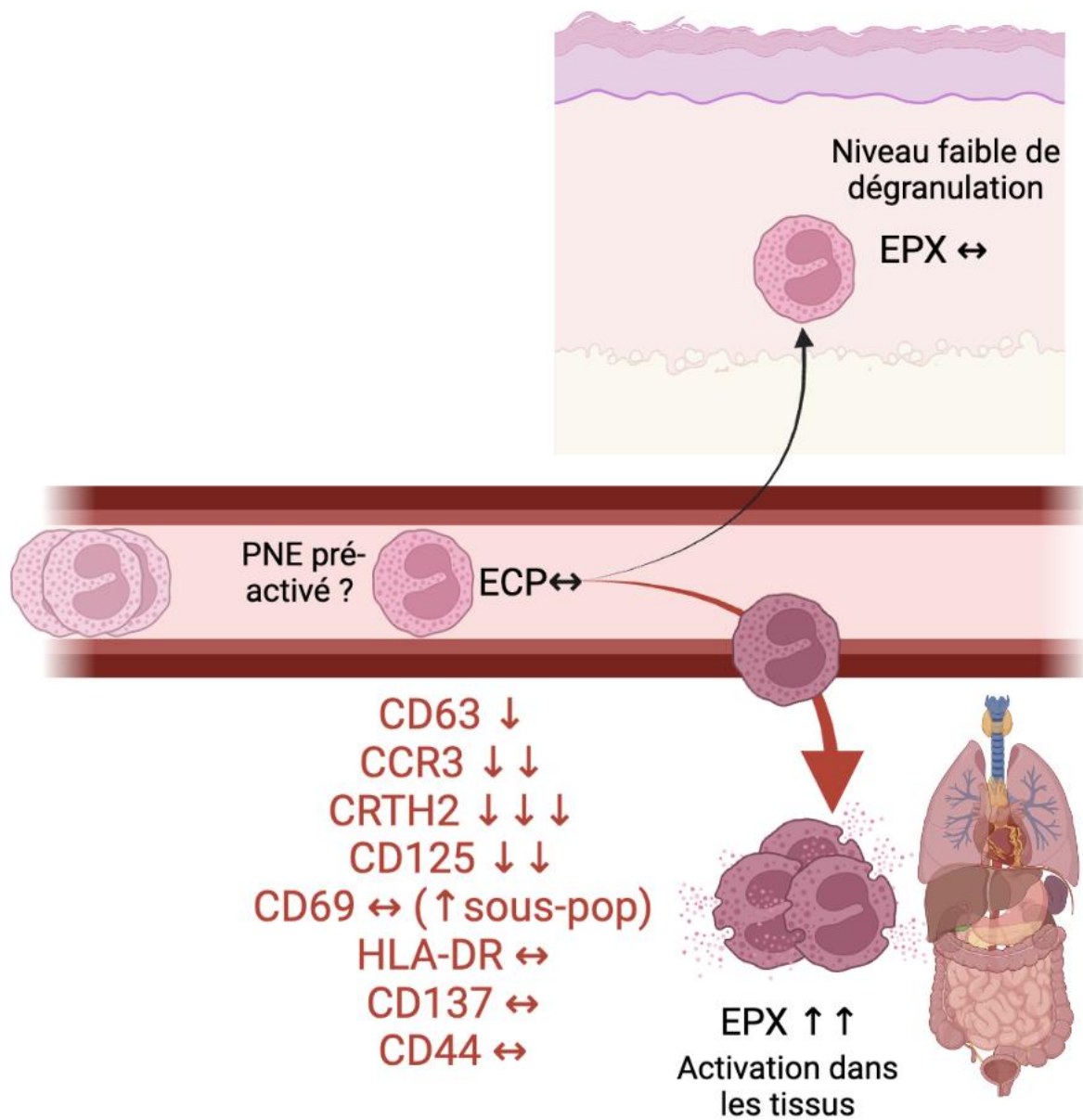


Figure 48 : Synthèse du profil d'activation des PNE et de l'activation différentielle entre la peau et les organes. Profils de PNE pré-activés dans le compartiment sanguin dont l'activité cytotoxique va principalement se localiser aux organes internes. La peau constitue un mauvais reflet de l'activation tissulaire et ne permet pas d'évaluer l'état d'activation tissulaire des PNE (créé avec biorender.com).

V. Conclusion

Au total, notre étude originale a permis pour la première fois une approche phénotypique des PNE au cours du DRESS et des exanthèmes médicamenteux avec ou sans éosinophilie à la fois dans la peau, les organes et le sang. Nous confirmons la modification du profil phénotypique d'expression membranaire des marqueurs impliqués dans l'activation des PNE au cours des toxidermies. Le PNE circulant modifie son profil phénotypique totalement indépendamment du taux de PNE circulant suggérant donc une implication des PNE y compris lors que le taux de PNE apparaît normal même en l'absence de critères de sévérité clinique. Notre analyse en t-SNE confirme l'existence de sous-populations de PNE circulants activés notamment dans le DRESS même si le rétrocontrôle négatif exercé sur les marqueurs membranaires des PNE par certains marqueurs de la réponse Th2 suggère que ce phénotype particulier des PNE pourrait être le résultat d'une pré-activation de ces PNE dans le sang avant leur passage dans les tissus. Nos résultats témoignent d'une dualité fonctionnelle entre les PNE circulants et les PNE tissulaires mais également entre les PNE présents dans la peau et dans les autres organes au cours du DRESS. Les mécanismes qui sous-tendent cette activation différentielle des PNE selon les compartiments (sang/peau/organes profonds) doivent être mieux compris afin de mieux cibler la prise en charge thérapeutique des patients à l'aube de la médecine de précision. Ce travail pose donc les bases d'une meilleure compréhension de l'implication des PNE dans les exanthèmes médicamenteux et le DRESS.

VI. Perspectives

La rédaction d'un article pour publication sur ces analyses phénotypiques est en cours et nous poursuivons les inclusions dans ce travail afin de conforter ces résultats encourageants et explorer les pistes issues de l'analyse de ces résultats, à savoir :

- Poursuivre l'exploration des mécanismes d'activation et de migration dans les tissus : analyse du contingent tissulaire d'ILC2, analyse du profil d'expression des intégrines et molécules d'adhésion d'intérêt (ICAM-1).
- Poursuivre l'exploration fonctionnelle de PNE et des mécanismes d'activation dans le compartiment circulant à travers : l'étude des sous-populations des PNE activées après tri cellulaire ; l'analyse du profil d'expression transcriptomique des médiateurs d'activation des PNE ; l'analyse de la cytotoxicité sur PNE triés (perforine, granulysine, granzyme B, MBP, EPX sériques sur surnageants ; l'augmentation des effectif pour les dosages sériques des médiateurs inflammatoires pour conforter nos résultats obtenus ; l'exploration de l'implication du récepteur DP dans la diminution d'expression du CRTH2, l'exploration de l'implication de l'IL-9 dans la diminution d'expression du CD125 à la membrane des PNE ; l'exploration de l'implication de l'IL-33 et des alarmines dans la constitution du phénotype des PNE.

En parallèle, une étude prospective commencera prochainement dans l'unité dans le cadre d'un essai interventionnel multicentrique (BENRADRESS) évaluant l'efficacité et la tolérance d'une thérapie anti-IL5 récepteur (benralizumab) dans le DRESS, dont la partie ancillaire conduite au laboratoire permettra en parallèle d'évaluer l'impact de cette biothérapie sur le phénotype des PNE sanguins et cutanés.

Annexes

I. Annexe 1: Détails des caractéristiques des patients du groupe DRESS dans le cadre de l'analyse de l'activation cutanée des PNE.

DRESS n°	Sexe	Age	Score RegiSCAR	Molécule responsable	Délai prise médicamenteuse - symptômes	Délai symptômes-biopsie (j)	Séjour en réanimation	Traitement	Durée de traitement (j)	Durée hospitalisation (j)	Atteintes principales d'organe
1	M	70	7	Céftazidime	10	30	Non	CTC	180	60	Foie
2	M	42	6	Vancomycine	11	5	Oui	CTC	70		Foie, rein
3	F	40	7	Amikacine	10	6	Oui	CTC	240		Rein
4	F	62	6	Tazocilline	37	4	Non	CTC	195	15	
5	F	70	5	Vancomycine	30	42	Non	DC	90	25	
6	F	43	8	Vémurafénib	8	2	Non	CTC	60	26	Foie, cœur, rein
7	M	19	7	Carbamazépine	30	4	Non	CTC	270	20	Foie
8	F	84	6	Carbamazépine	49	10	Non	DC	15	7	
9	F	86	5	Allopurinol	30	15	Non	DC	21	21	
10	M	68	5	Tazocilline	42	1	Non	DC	12	11	
11	F	42	7	Dabrafénib, Tramétinib	21	51	Non	CTC	30	15	Foie
12	F	68	5	Vémurafénib, Cobimétinib	16	19	Non	CTC	60	13	Foie, cœur, rein
13	M	25	8	Méronem, Caspofungine, Vancomycine	21	7	Oui	CTC	45	35	Foie, rein
14	F	79	4	Amoxicilline/A. Clavulanique	12	12	Non	DC	30	7	Foie
15	M	23	5	Amoxicilline	1	2	Non	DC	30	6	
16	F	75	4	Fluindione, Méronem, Esoméprazole	13	4	Non	Aucun	0		
17	M	34	4	Tazocilline, Fluconazole, Esoméprazole	30	7	Non	Aucun	0		
18	F	39	4	Pristinamycine, Hélicidine, Métopimazine, Lévétiracétam	12	2	Non	DC		8	Foie

II. Annexe 2: Détails des caractéristiques des patients du groupe EMP dans le cadre de l'analyse de l'activation cutanée des PNE.

EMP n°	Sexe	Age	Molécules imputables	Délais prise médicament - éruption (j)	Délai éruption - biopsie (j)	Traitement
1	H	77	Esoméprazole	21	8	Aucun
2	H	83	Clopidogrel	7	90	Aucun
3	F	61	Célécoxib	7	4	Aucun
4	H	43	Amoxicilline	9	4	Aucun
5	F	60	Tazocilline, vancomycine	16	3	Aucun
6	F	68	Vémurafénib, Cobimétinib	8	8	Aucun
7	F	75	Vémurafénib, Cobimétinib	6	3	Aucun
8	F	30	Acide ursodésoxycholique, ésoméprazole	15	4	Aucun
9	H	74	Dabrafénib, Tramétinib	15	17	Aucun
10	H	32	Vémurafénib	10	10	DC
11	F	40	Vancomycine	13	7	DC
12	F	19	Etifoxine	7	2	Aucun
13	F	26	Adiazine, pyriméthamine	16	5	Aucun
14	H	30	Oracilline, Valaciclovir	10	3	Aucun
15	F	34	Sorafénib	6	4	DC
16	F	66	Fluconazole, amiodarone, colchicine	10	1	DC
17	H	76	Carbamazépine	7	12	DC

Abréviations : H, homme ; F, femme ; DC : dermocorticoïdes.

III. Annexe 3: tableau de synthèse des caractéristiques des patients du groupe EMP+Eo (analyse de l'activation cutanée et circulantes des PNE).

EMP+Eo n°	Âge	Sexe	Médicament imputable principal	Nombre médicaments suspectés	Délai médicaments- éruption (j)	Délai éruption- prélèvement	Traitement
1	79	F	Allopurinol	1	38	57	DC
2	66	H	Produit de contraste iodé	5	5	3	DC
3	76	H	Gabapentine	2	48	2	DC
4	65	H	Imipénem	5	1	6	DC
5	32	H	Tazocilline	3	7	3	DC
6	61	F	Tazocilline	4	25	2	DC
7	74	F	Cloxacilline	2	7	3	DC
8	64	F	Amoxicilline/A. Clavulanique	1	6	6	DC
9	57	H	Ofloxacine	2	13	3	DC
10	72	F	Pristinamycine	1	1	5	DC
11	64	F	Triméthoprime/sulfaméthoxazole	3	16	9	DC
12	89	F	Amoxicilline	1	6	2	DC
13	63	F	Produit de contraste iodé	7	52	1	DC
14	75	F	Vancomycine	1	37	7	DC
15*	69	H	Voriconazole	4	5	7	DC

Abréviations : H, homme ; F, femme ; DC : dermocorticoïdes. *patient n'ayant pas été inclus dans l'analyse de la dégranulation cutanée pour des raisons techniques.

IV. Annexe 4: tableau des synthèse des caractéristiques des patients atteints d'EMP dans le cadre de l'analyse de l'activation des PNE circulants.

EMP n°	Âge	Sexe	Médicament imputable principal	Nombre médicaments suspectés	Délai médicaments-éruption (j)	Délai éruption-prélèvement (j)	Traitement
1	20	H	Carbamazépine	1	11	4	DC
2	66	F	Clindamycine	1	10	7	DC
3	76	F	Produit de contraste iodé	1	3	6	DC
4	82	F	Amoxicilline	2	9	3	DC
5	58	F	Amoxicilline	3	6	1	DC
6	71	F	Amoxicilline	4	7	1	DC
7	62	H	Carbamazépine	1	9	6	DC
8	63	H	Céfépime	2	7	1	DC
9	33	H	Terbinafine	1	10	7	DC
10	44	F	Triméthoprim/sulfaméthoxazole	2	26	5	DC
11	81	F	Clindamycine	1	21	4	DC
12	23	F	Produit de contraste iodé	4	8	7	DC
13	73	H	Produit de contraste iodé	1	1	3	DC
14	83	H	Pristinamycine	2	4	2	DC
15	25	H	Amoxicilline/A. Clavulanique	1	7	5	DC
16	61	H	Produit de contraste iodé	2	3	2	DC
17	59	H	Célécoxib	1	10	6	DC
18	72	F	Clindamycine	4	32	4	DC
19	81	F	Amoxicilline	2	2	1	DC

Abréviations : H, homme ; F, femme ; DC, dermocorticoïdes.

V. Annexe 5: tableau de synthèse des caractéristiques des patients atteints de DRESS dans le cadre de l'analyse de l'activation des PNE circulants.

DRESS n°	Âge	Sexe	Médicament imputable principal	Nombre médicaments suspects	Atteinte organe	Sévérité*	RegiSCAR	Délai médicaments-éruption	Délai éruption-prélèvement	Traitement	Rechute	Évolution
1	71	H	Amoxicilline/acide clavulanique	4	Foie	Modérée	4	13	3	DC	NC	Décès / choc septique
2	74	F	Produit contraste iodé	4	Rein	Modérée	4	25	4	DC	NC	Décès / choc septique
3	81	F	Allopurinol	2	Foie	Modérée	4	13	3	DC	Non	Favorable
4	42	H	Fluconazole	1	Foie	Modérée	5	23	14	DC	1 / inobservance	Favorable
5	19	F	Carbamazépine	6	Foie	Légère	6	38	8	DC	Non	Prurit à M3
6	47	F	Carbamazépine	1	Foie	Modérée	6	12	11	DC	Non	Sd sclérodermique
7	90	F	Allopurinol	1	Pancréas	Sévère	7	14	15	DC	NC	Décès / pancréatite
8	37	H	Lansoprazole	2	Cœur	Sévère		28	40	DC	NC	Décès / choc septique
9	62	H	Allopurinol	1	Cœur	Sévère	5	30		CTC	Oui	Favorable
10	70	H	Caspofungine	1	Rein, cœur	Sévère	4	10	12	DC	NC	Décès / choc septique
11	70	F	Produit contraste iodé	1	Rein	Sévère	6	3	8	DC	Non	Favorable
12	29	H	Produit contraste iodé	3	Rein	Sévère	4	3	5	DC	NC	Décès / choc septique

Abréviations : H, hommes ; F, femmes ; CTC : corticoïdes systémiques, DC : dermocorticoïdes, NC : non concerné. *sévérité selon les critères d'inclusion précisés dans le chapitre 2, rubrique « matériel et méthodes ».

VI. Annexe 6: p values et IC95% concernant la matrice de corrélation des marqueurs d'activation au sein du groupe DRESS.

p value	PNE	CRTH2	CD63	CCR3	CD125	CD69	CD44	CD137	HLA-DR
PNE									
CRTH2	0,86								
CD63	0,07	0,72							
CCR3	0,52	<0,001	0,64						
CD125	0,55	<0,0001	0,38	<0,0001					
CD69	0,13	0,78	0,01	0,85	0,54				
CD44	1,00	0,68	0,57	0,77	0,97	0,13			
CD137	0,54	0,77	0,78	0,77	0,53	0,35	0,47		
HLA-DR	0,51	0,85	0,83	0,68	0,40	0,12	0,05	0,29	

IC95%	PNE	CRTH2	CD63	CCR3	CD125	CD69	CD44	CD137	HLA-DR
PNE									
CRTH2	-0,62 - 0,55								
CD63	-0,86 - 0,069	-0,50 - 0,66							
CCR3	-0,71 - 0,43	0,61 - 0,97	-0,48 - 0,68						
CD125	-0,70 - 0,44	0,76 - 0,98	-0,37 - 0,74	0,55 - 0,96					
CD69	-0,83 - 0,16	-0,64 - 0,52	0,25 - 0,92	-0,54 - 0,63	-0,44 - 0,70				
CD44	-0,59 - 0,58	-0,67 - 0,49	-0,45 - 0,69	-0,65 - 0,52	-0,58 - 0,60	-0,16 - 0,83			
CD137	-0,70 - 0,44	-0,65 - 0,52	-0,64 - 0,52	-0,52 - 0,65	-0,71 - 0,44	-0,75 - 0,35	-0,72 - 0,41		
HLA-DR	-0,71 - 0,43	-0,54 - 0,63	-0,54 - 0,63	-0,49 - 0,67	-0,38 - 0,74	-0,15 - 0,83	0,0011 - 0,87	-0,77 - 0,31	

VII. Annexe 7: Article publié dans “Clinical and Experimental Allergy” (IF 5,4) : “Automatic quantification method of eosinophilic degranulation in tissues: application for the study of eosinophilic disorders”

Automatic quantification method of eosinophilic degranulation in tissues: application for the study of eosinophilic disorders

Frédéric Dezoteux 1*, Antonino Bongiovanni 2, Meryem Tardivel 2, Arnaud Dendooven 3, Jean-Baptiste Gibier 4, Geoffrey Mortuaire 5, Solène Audry 4, Marie-Hélène Gevaert 2, Nicolas Van Poucke 4, Emilie Anglo 3, Guillaume Lefèvre 6†, Delphine Staumont-Sallé 1†
†These authors contributed equally to this work and share last authorship.

1 CHU Lille, Univ. Lille, Service de dermatologie, U1286 Inserm INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation; CEREO, National Reference Center for Hypereosinophilic syndromes, F-59000 Lille

2 Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41 - UAR 2014 - PLBS, F-59000 Lille, France

3 CHU Lille, Univ. Lille, U1286 Inserm INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille

4 CHU Lille, Univ. Lille, Institut de Pathologie, Centre de biopathologie, F-59000 Lille

5 CHU Lille, Univ. Lille, Service d’otorhinolaryngologie, U1286 Inserm INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation; CEREO, National Reference Center for Hypereosinophilic syndromes, F-59000 Lille

6 CHU Lille, Univ. Lille, Institut d’Immunologie, Médecine Interne et Immunologie Clinique, U1286 Inserm INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation; CEREO, National Reference Center for Hypereosinophilic syndromes, F-59000 Lille

WORDS: 1475

TABLES: 0

FIGURES: 2

AUTHOR CONTRIBUTION STATEMENT:

Conceptualization: FD, AB, MT, GL, DSS

Data curation: FD, AB, EA

Formal analysis: FD, AB, MT, GL, DSS

Methodology: FD, AB, NVP, JBG, SA, MT, AD

Software: AB, MT, MHG

Supervision: DSS, GL

Validation: DSS, GL

Visualization: FD, EA

Writing Original Draft Preparation: FD

Writing – Review and Editing: GL, DSS, AD, MT, AB.

KEYWORDS: eosinophils, eosinophil peroxidase, EPX, extracellular granules, degranulation surface, eosinophil aggregates, eosinophil degranulation

*Corresponding author: Dr Frédéric DEZOTEUX, frederic.dezoteux@chu-lille.fr

Key message:

- 1- Precise analysis of eosinophils (Eo) degranulation could identify a differential degree of activation in tissues.
- 2- Eo degranulation intensity is not strictly related to the intact Eo density.
- 3- Eo degranulation differs greatly among patients with a given disease.

IRB STATEMENT: The data and tissue collection were approved by the French National Commission for Information Technology and Civil Liberties (CNIL) under the number DEC18-386.

DATA AVAILABILITY STATEMENT: Data are available from the authors on request.

CONFLICT OF INTEREST: none

ACKNOWLEDGMENTS: Plateau de microscopie photonique et d'Histologie BICeL- campus santé "US 41 - UAR 2014 - PLBS" - UAR 2014 - US 41".

The authors thank E. Jacobsen (Mayo Clinic, Arizona State University, Scottsdale) for the EPX antibody.

ABBREVIATIONS:

BP	bullous pemphigoid
EoE	eosinophilic esophagitis
Eos	eosinophils
EPX	eosinophil peroxidase
HS	healthy skin
NP	chronic rhinosinusitis with nasal polyps
Pso	psoriasis

To the Editor,

The diagnosis of eosinophilic disorders can be a challenge, as tissue eosinophilia must be confirmed and sometimes quantified, and there is a correlation between the level of eosinophil infiltrate and the severity of the disease, such as in the case of eosinophilic oesophagitis (EoE) (Reed et al., 2021). The presence of eosinophilic granules is a marker of activated eosinophils (Eos), which may exert toxic activity in tissues via the release of the contents of their preformed granules, such as eosinophil peroxidase (EPX) (Weller and Spencer, 2017). Moreover, Eos that infiltrate the tissue in more than occasional numbers, and/or group to form aggregates, are always abnormal (Yantiss et al., 2015). For a more precise quantification of tissue areas including Eos aggregates and/or clustered granules, which we propose to define as “degranulation surfaces”, we aimed to develop valuable tool for routine identification of a differential degree of activation in tissues according to the eosinophilic disorder.

We retrospectively collected formalin-fixed paraffin-embedded tissues from patients with

eosinophilic disorders: bullous pemphigoid (BP, skin, n=7), chronic rhinosinusitis with nasal polyps (NP, n=7) and EoE (digestive mucosa, n=8). Control tissues were skin biopsies of psoriatic skin lesions (n=7) as an inflammatory skin disorder control and skin from breast plastic surgery as healthy controls (n=7). The data and tissue collection were approved by the French National Commission for Information Technology and Civil Liberties (CNIL) under the number DEC18-386. Anti-EPX (Protheroe et al., 2009) (Mayo Clinic Arizona State University, Scottsdale, MM25-82.2.1, dilution 1/750, anti-human mouse antibody) was used to identify intracellular granules (i.e., intact, and aggregated Eos), extracellular isolated granules and clustered granules (degranulation surfaces). After staining, the slides were acquired using an automated microscope Axio Scan Z1 slide scanner (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Jena, Germany) with the X20/0.8 objective. This system allows the generation of a virtual slide and analysis of the whole surface of the sample. The automatic quantification of anti-EPX staining was performed using ImageJ software (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), in which a macro program (EoJ) was created allowing the automation of multiple commands after calibrating the eosinophil quantification. The macro program (available at <https://github.com/antoninolillefacility/ImageJ-Macro.git>) was made up of a sequence of commands (Fig. 1). In the first step, the entire slide biopsy was delimited and converted into binary by thresholding, where the maximum value of a positive pixel was 255 and the minimum value of a negative pixel was 0. To measure the area of the biopsy, the area of a pixel corresponded to 0.88 μm^2 . In the second step, the cells, granules and degranulation surfaces were identified according to the degree of staining by colour deconvolution analysis. The 3-channel images were obtained using a specific plugin (Ruifrok, AC & Johnston, DA 2001) allowing us to differentiate the area outside the biopsy, the biopsy, and the granules. The detection parameters were manually set on a slide representative of the series of slides to be quantified. In a third step, the labelled granules and cells were separated by size. The isolated extracellular granules were defined within a range of 2 μm^2 to 8 μm^2 . The cells were defined within a range of 8 μm^2 and 100 μm^2 , and a circularity parameter was added to the macro from 0.6 to 1, the latter value corresponding to a perfect circle. The circularity helped to differentiate isolated cells from clusters of granules or cells. The clusters of granules were not quantified as individual granules. The “degranulation surfaces” represented clustered granules and Eo aggregates. The surfaces were considered beyond a surface of 100 μm^2 . For comparisons between different conditions, the degranulation ratio was used, calculated as the ratio of the surface of extracellular isolated granule surfaces and degranulation surfaces to total EPX-stained surfaces. The total EPX-stained surface was defined as the total sum of intact cell surfaces, isolated granule surfaces and degranulation surfaces. For comparisons in the same tissue, degranulation ratios were expressed over the total skin biopsy area. Additional information about study methods and findings are available in the following repository: <https://doi.org/10.5281/zenodo.7775861>.

In the first development step, we randomly selected a total of 6 focused areas (3 mm²) of the highest eosinophilic infiltrates in BP skin sections, and we quantified and compared intact eosinophil counts (Eo density per mm²) and degranulation surface measurements using EoJ by ImageJ software and using hand-writing delimitation of clustered granules by 2 experts. We showed that degranulation surfaces were measured in the same way by both experts compared to the automatic process (p>0.05). The correlation coefficient (95%

confidence interval) was 0.96 (0.74-0.99) and 0.78 (0.07-0.97) for experts 1 and 2, respectively, compared with EoJ ($p < 0.05$). In the second step, we applied the EoJ algorithm measurement of cell density and degranulation surfaces to the total biopsy area of all samples (EoE, NP, BP, psoriasis, healthy skin). As expected, EoJ confirmed a significantly higher presence of intact Eos in skin from BP patients compared with that of psoriasis patients and healthy subjects. We then compared 3 eosinophilic disorders damaging 3 different organs: EoE, BP and NP (Fig. 2). The median intact Eo density on stained whole slides was significantly higher in the EoE group (653.6 ± 168.0 Eos/mm²) compared with the NP group (271.2 ± 136.1 Eos/mm², $p < 0.01$) and BP group (268.6 ± 144.1 Eos/mm², $p < 0.01$). Intact Eo density was similar between the NP and BP groups ($p = 0.97$). In addition, the isolated granule density within the whole section (granules/mm²) was higher in the EoE group (481.9 ± 163.2 granules/mm²) than in the NP group (117.7 ± 46.0 , $p < 0.001$) and BP group (247 ± 167.7 , $p < 0.05$). Then, we performed an analysis of degranulation surfaces (i.e., clustered granules and Eo aggregate surfaces according to EPX staining); the degranulation ratio was higher in the EoE and BP groups (0.88 IQR 0.80-0.93, $p < 0.01$ and 0.78 IQR 0.65-0.92, $p < 0.05$) compared with the NP group (0.19 IQR 0.14-0.24). There was no difference between the BP and EoE groups ($p > 0.99$), although the Eo density was significantly higher in the EoE group. Indeed, when we qualitatively analyzed the different parameters of the eosinophilic infiltrate, we found that intact Eo density, isolated granule density and degranulation ratio were heterogeneous. Moreover, the presence of a dense infiltrate of intact Eos was not systematically associated with a high degranulation ratio.

We developed an automatic scoring system to detect all histopathological features of Eo tissue infiltrates: intact eosinophils, isolated extracellular eosinophil granules and degranulation area. We observed similar results between independent manual analysis by two experts and the automatic method for the different histological images showing eosinophil infiltrate in BP skin tissues, confirming the validity of our original quantification approach. First, this automatic method has the advantage of allowing us to assess Eos density precisely, objectively, and reproducibly and in a time-saving manner, and second, it allows “degranulation surface” measurement where the manual quantification of individual granules or altered Eos is not possible due to their clustering. Contrary to available tools in the literature, the detection is not exclusively based on quantification of the staining surface. The novelty of our method lies in its ability to express the degranulation level (isolated granules, Eo aggregates, aggregated granules) within the total stained area, and whole biopsy slide, leading to a better interpretation of Eos and granules density (Protheroe et al., 2009; Wright et al., 2021) than conventional manual methods, which are restricted to selected small fields and are subjective and time-consuming (Turner et al., 2022). Using a whole slide could be a better representation of eosinophilic infiltration in the tissue, which can be made up of isolated and dispersed Eos (i.e., in the case of fibrotic NP) or aggregated Eos. Eo aggregates are known to be associated with the severity of NP (Brescia et al., 2020). In the same way, in EoE, physicians are confronted with large Eo aggregates, the quantification of which requires considerable time and effort. In our cohort, we observed that the Eo density was higher in EoE than in BP and NP, which were similar to each other. Conversely, we observed a lower level of Eo degranulation in NP than in EoE and BP. These data suggest that our tool may offer additional information about Eo aggregates that is impossible to obtain with manual approaches and previous automatized approaches. We

assumed that Eo degranulation in tissue has particular pathophysiological significance depending on the disease. Moreover, high individual variability was observed within each group of eosinophilic disorders, which could suggest that the degree of activation and/or functions reflected by degranulation may differ from one patient to another according to potentially different Eo endotypes or the stage of the disease (Hilvering and Koenderman, 2022). In this work, we demonstrated that if Eos infiltrate the tissue, the density of degranulation is not strictly associated with the Eo density and differs among diseases and even among patients with the same disease. These data encourage the extension of this cohort of patients and the inclusion of other diseases to assess whether the degranulation levels would be associated with specific functional endotypes and/or predictive of response to treatment.

REFERENCES

1. Reed CC, Genta RM, Youngblood BA, Wechsler JB, Dellon ES. Mast Cell and Eosinophil Counts in Gastric and Duodenal Biopsy Specimens From Patients With and Without Eosinophilic Gastroenteritis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;19(10):2102-2111.
2. Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(12):746-760.
3. Yantiss RK. Eosinophils in the GI tract: how many is too many and what do they mean? *Mod Pathol.* 2015;28 Suppl 1:S7-21.
4. Protheroe C, Woodruff SA, de Petris G, et al. A novel histologic scoring system to evaluate mucosal biopsies from patients with eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7(7):749-755.e711.
5. Wright BL, Doyle AD, Shim KP, et al. Image Analysis of Eosinophil Peroxidase Immunohistochemistry for Diagnosis of Eosinophilic Esophagitis. *Dig Dis Sci.* 2021;66(3):775-783.
6. Turner KO, Collins MH, Walker MM, Genta RM. Quantification of Mucosal Eosinophils for the Histopathologic Diagnosis of Eosinophilic Gastritis and Duodenitis: A Primer for Practicing Pathologists. *Am J Surg Pathol.* 2022;46(4):557-566.
7. Brescia G, Alessandrini L, Parrino D, Franz L, Barion U, Marioni G. Emerging Contribution of Histopathology to Our Understanding of Chronic Rhinosinusitis Endotypes: Tissue Eosinophil Count and Aggregates. *Am J Rhinol Allergy.* 2020;34(1):122-126.
8. Hilvering B, Koenderman L. Quality over quantity; eosinophil activation status will deepen the insight into eosinophilic diseases. *Respir Med.* 2022;207:107094.

FIGURES AND LEGENDS

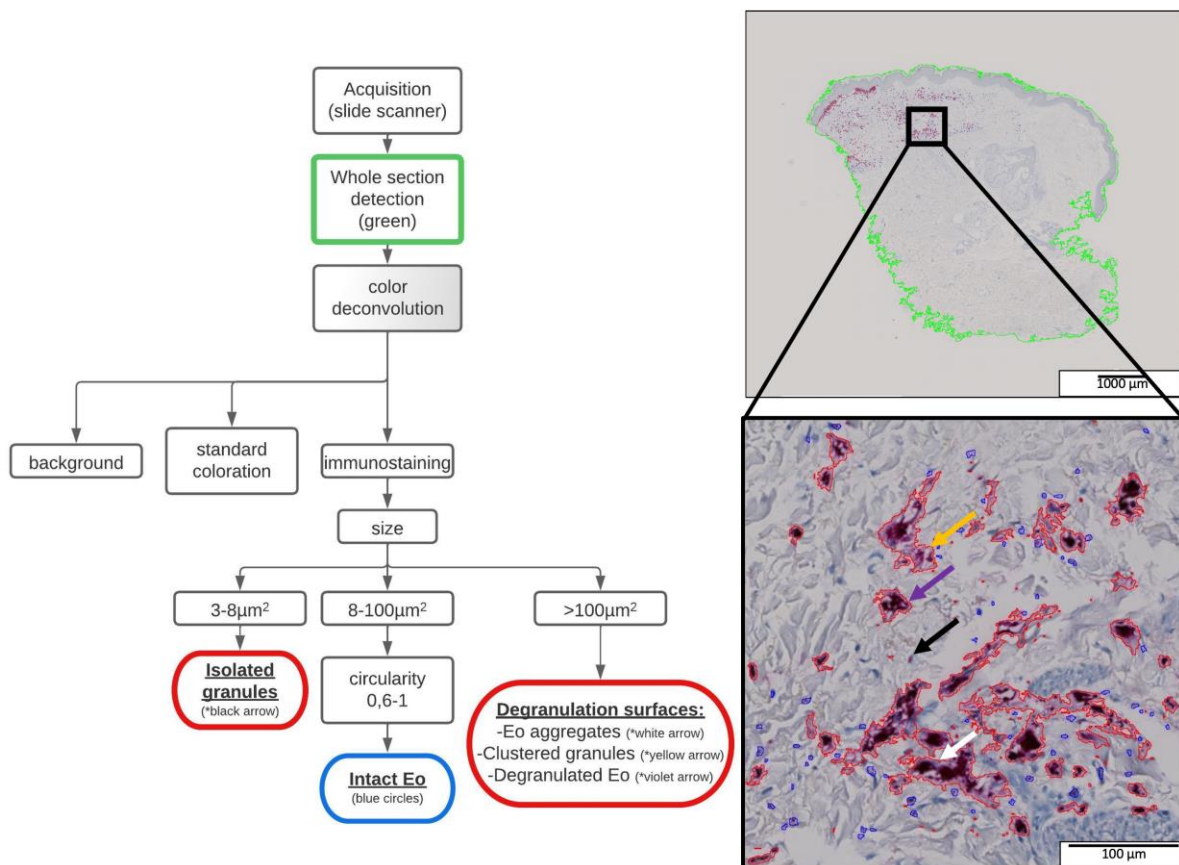


Figure 1: EoJ organigram. After whole section delimitation (green box) (A), EoJ performed a detection and count of anti-EPX-stained intact Eos (blue box) that corresponded to Eo density per mm² (B) and isolated granules (C, black arrow). In the case of clustering of granules (C, yellow arrow) or Eo aggregates (D, white arrow), EoJ performed surface quantification corresponding to “degranulation surfaces” expressed as a ratio of quantified degranulation surfaces to total EPX-stained surface. Total EPX-stained surfaces include cell surfaces, isolated granule surfaces and degranulation surfaces.

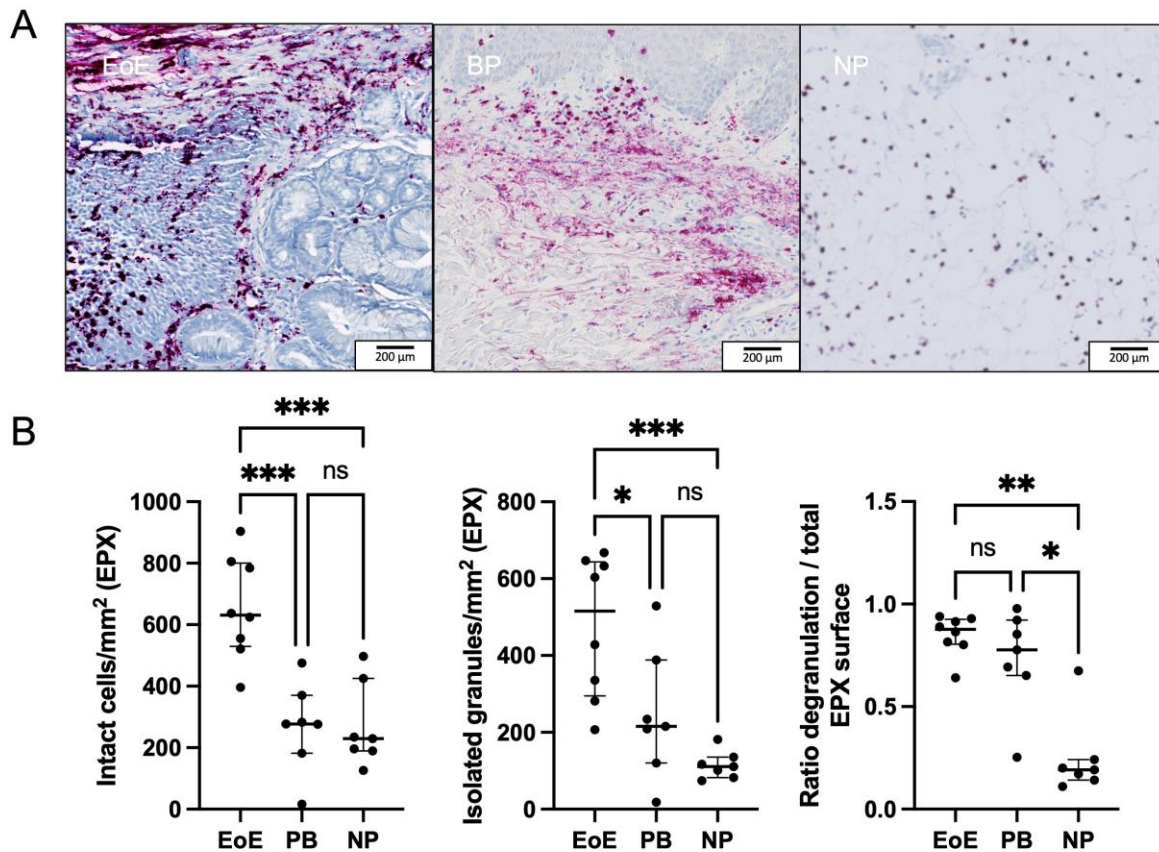


Figure 2: (A) Representative biopsies of EoE, BP and NP (anti-EPX staining, high-power field x200). (B) Comparison of intact Eo density (cell/mm²) (left), isolated granule density (gran/mm²) (middle) and degranulation surface ratios (right) between groups (EoE n=7, BP n=6, NP n=5; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001) with unpaired ordinary ANOVA test with Holm–Sidak multiple comparisons test. The degranulation ratio is the ratio of the surface of extracellular isolated granules and degranulation areas to total EPX surfaces. Total EPX surface is the sum of intact cell surfaces, isolated granule surfaces and degranulation surfaces.

VIII. Annexe 8: Article «Duodenal stenosis linked to drug reaction with eosinophilia and systemic symptom » publié dans « Dermatitis ».

Duodenal stenosis linked to Drug Reaction With Eosinophilia And Systemic Symptoms (DRESS)

Marion Douxami resident¹, Emmanuel Faure M.D², Charlotte Fievet M.D^{1,3}, Sébastien Buche M.D^{1,3}, Selma Azib-Meftah M.D¹, Aurélie Cuyppers-Tilmant M.D⁴, Johana Béné PharmD Ph.D⁵, Sophie Gautier PharmD Ph.D⁵, Delphine Staumont-Salle Ph.D^{1,6}, **Frédéric Dezoteux M.D**^{1,6}.

1. CHU Lille, Service de Dermatologie, F-59000 Lille
2. CHU Lille, Service de Maladies Infectieuses, F-59000 Lille
3. CH Seclin, Service de Dermatologie, F-59560 Seclin
4. CHU Lille, Institut de Pathologie, Centre de Biologie pathologie, F-59000 Lille
5. CHU Lille, Centre Régional de Pharmacovigilance, F-59000 Lille
6. U1286 Inserm, INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille

Keywords

Drug induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS), Drug reaction, Eosinophilia, Digestive stenosis.

Word count: 588

Reference count: 6

Figure/table count: 1

Funding: none

The authors have no conflict of interest to declare.

Abbreviation and acronym list

DIHS: Drug induced hypersensitivity syndrome

DRESS: drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms

CT-scan: computerized tomography scanner

EBV: Epstein-Barr Virus

WFI: Water For Injection purposes

RegiSCAR: European Registry of Severe Cutaneous Adverse Reactions

Drug induced hypersensitivity syndrome (DIHS), or drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) is a drug induced severe systemic reaction¹. A few cases of gastrointestinal involvement have been reported^{2,3}. We report a case of DRESS complicated with a severe duodenal stenosis.

A 73-year-old man treated for *Staphylococcus aureus* bacteremia complicated with sacroiliitis, presented a maculopapular exanthema with pruritus, purpuric and pustular elements located on the trunk and limbs and persistent fever for five days. He did not have mucosal involvement, nor clinical arguments for AGEP. He received multiple antibiotics: cefotaxime for one day, switched to cloxacillin for five days, associated with levofloxacin for 24 hours before onset of exanthema. Blood test revealed fluctuating eosinophilia (peak at

1,7G/L). A CT-scan identified multiple mediastinal lymphadenopathies. The diagnosis of DIHS was suspected, and culprit antibiotics were stopped. Skin lesions improved rapidly with topical corticosteroids. Three days after, the patient developed an occlusive syndrome with severe vomiting. The CT-scan showed gastric dilatation, severe duodenitis with stenosis, and diffuse ileitis (Figure 1A). An endoscopic exploration revealed antral gastritis, with inflammatory stenosis on the duodenum (Figure 1B). Biopsies showed acute duodenitis, with oedema and infiltration of eosinophils, lymphocytes and plasma cells (Figure 1C). There were no arguments for an inflammatory, peptic or infectious stenosis. Autoimmune parameters were negative. Epstein-Barr Virus (EBV) viral load was positive. Evolution was marked by oxygen desaturation consistent with the occurrence of an interstitial lung infiltrate confirmed on the CT-scan, associated with an eosinophil count of 1 G/L. The diagnosis of DRESS/DIHS with cutaneous, intestinal and lung involvement was suspected with a RegiSCAR score of 5 (European Registry of Severe Cutaneous Adverse Reactions). The patient was treated with oral corticosteroids, stopped after 6 months without relapse. The digestive symptoms slowly improved, confirmed by endoscopic and histologic exploration at one month. Skin patch test were performed with IQ Ultra™ chambers, left 48h on the skin, with readings at day 1, 2 and 8 after patch removal. For cloxacillin and cefotaxime, fresh extracts from injectable solution (1g in 10 ml of water for injection (WFI)) were used as is, and for levofloxacin, tablet powder 30% was used in WFI and in Vaseline. Due to the severity of the symptoms, allergic investigations were stopped after skin patch tests, which were negative. Cloxacillin and levofloxacin were considered as culprit drugs based on the timing and duration of drug exposure and contraindicated after collegial discussion.

Diagnosis of DRESS/DIHS can be challenging due to the heterogeneous symptoms and organ involvement variability¹. Few published case reports described gastrointestinal involvement^{2,3}, with antiepileptic drugs², leflunomide² and antibiotics³, and none due to cloxacillin⁴ and levofloxacin. Most of the articles describe cases of colitis, however, stenosis has never been reported.

In our case, the delay between drug intake and first symptoms was short. However, Soria *and al.*⁵ suggested that delay of onset could be short, especially in case of reintroduction. Our patient developed an unusually severe duodenal stenosis, which led us to explore other diagnosis such as cancer or infection. Endoscopic exploration was necessary because it enabled microbiological cultures and histopathologic analysis, which showed eosinophilic and lymphocyte infiltration, as described in other DRESS-related organ damage¹, or DRESS-induced colitis biopsy specimens². There is no consensus regarding treatment of severe DRESS/DIHS but high dose of systemic corticosteroids has been accepted as the gold standard treatment at the acute phase, and has to be prescribed for several months to prevent relapse of various symptoms⁶.

In conclusion, gastrointestinal complication of DRESS/DIHS must be considered when stenosis occurs in context of eosinophilia and drug hypersensitivity.

REFERENCES:

1. Cabañas R, Ramírez E, Sendagorta E, et al. Spanish Guidelines for Diagnosis, Management, Treatment, and Prevention of DRESS Syndrome. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2020;30(4):229-253. doi:10.18176/jiaci.0480

2. Do-Pham G, Charachon A, Duong TA, et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms and severe involvement of digestive tract: description of two cases: Correspondence. *Br J Dermatol.* 2011;165(1):207-209. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10293.x
3. Chung WL, Teo L, Wang YS, Liu TT. Drug hypersensitivity syndrome with significant gastrointestinal involvement. *Singapore Med J.* 2012;53 (11):e231-e232.
4. Ramírez A, Abril JC, Cano J. DRESS syndrome due to antibiotic therapy of osteoarticular infections in children: Two case reports. *Rev Esp Cir Ortopédica Traumatol Engl Ed.* 2015;59(5):360-364. doi:10.1016/j.recote.2014.05.007
5. Soria A, Bernier C, Veyrac G, Barbaud A, Puymirat E, Milpied B. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms may occur within 2 weeks of drug exposure: A retrospective study. *J Am Acad Dermatol.* 2020;82(3):606-611. doi:10.1016/j.jaad.2019.09.036
6. Shiohara T, Mizukawa Y. Drug-induced hypersensitivity syndrome (DiHS)/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): An update in 2019. *Allergol Int.* 2019;68(3):301-308. doi:10.1016/j.alit.2019.03.006

FIGURES AND LEGENDS:

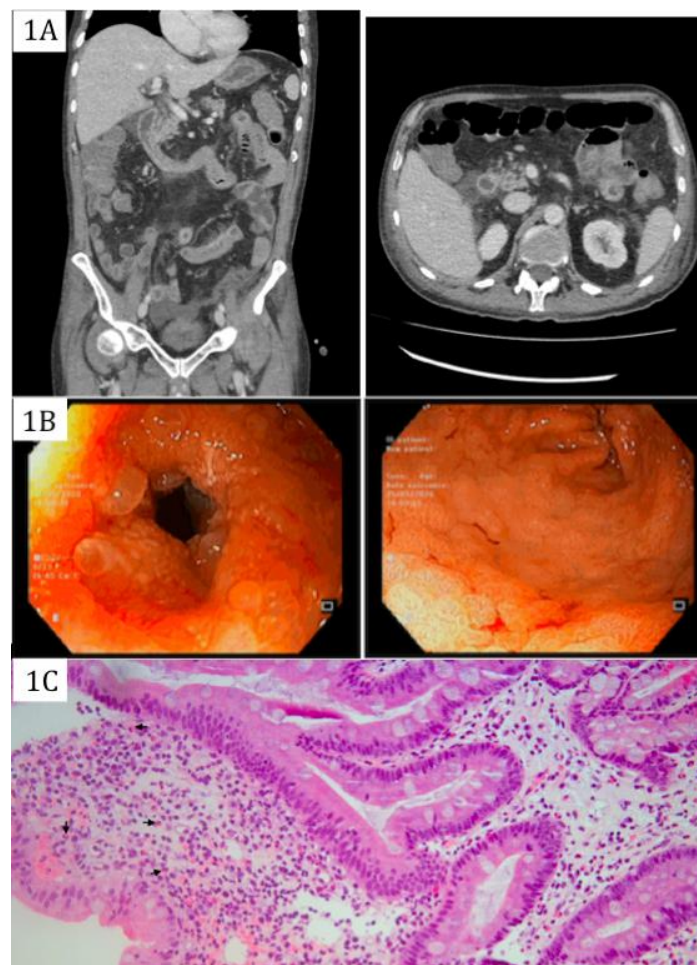


Figure 1: (A) CT scan showing duodenal stenosis. (B) Endoscopic examination showing erosive gastritis and inflammatory duodenal stenosis. (C) Duodenal histologic examination: duodenitis, with infiltration of eosinophils (arrows), lymphocytes and plasma cells (hematoxylin eosin staining, high power field x100).

Références

1. Gomes ER, Demoly P. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5(4):309-16.
2. Ahmed AM, Pritchard S, Reichenberg J. A review of cutaneous drug eruptions. *Clin Geriatr Med*. 2013;29(2):527-45.
3. Mayorga C, Fernandez TD, Montañez MI, Moreno E, Torres MJ. Recent developments and highlights in drug hypersensitivity. *Allergy*. 2019;74(12):2368-81.
4. Mockenhaupt M. Epidemiology of cutaneous adverse drug reactions. *Allergol Select*. 2017;1(1):96-108.
5. Dykewicz MS, Lam JK. Drug Hypersensitivity Reactions. *Med Clin North Am*. 2020;104(1):109-28.
6. Muzumdar S, Rothe MJ, Grant-Kels JM. The rash with maculopapules and fever in adults. *Clin Dermatol*. 2019;37(2):109-18.
7. Anci E, Braun C, Marinosci A, Rodieux F, Midun E, Torres MJ, et al. Viral Infections and Cutaneous Drug-Related Eruptions. *Front Pharmacol*. 2020;11:586407.
8. Hoetzenecker W, Nägeli M, Mehra ET, Jensen AN, Saulite I, Schmid-Grendelmeier P, et al. Adverse cutaneous drug eruptions: current understanding. *Semin Immunopathol*. 2016;38(1):75-86.
9. Descamps V, Ranger-Rogez S. DRESS syndrome. *Joint Bone Spine*. 2014;81(1):15-21.
10. Hama N, Abe R, Gibson A, Phillips EJ. Drug-Induced Hypersensitivity Syndrome (DIHS)/Drug Reaction With Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS): Clinical Features and Pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2022;10(5):1155-67.e5.
11. Soria A, Amsler E, Bernier C, Milpied B, Tétart F, Morice C, et al. DRESS and AGEP Reactions to Iodinated Contrast Media: A French Case Series. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021;9(8):3041-50.
12. Chaiken BH, Goldberg BI, Segal JP. Dilantin sensitivity; report of a case of hepatitis with jaundice, pyrexia and exfoliative dermatitis. *N Engl J Med*. 1950;242(23):897-8.
13. Thong BY, Tan TC. Epidemiology and risk factors for drug allergy. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;71(5):684-700.
14. Romano A, Atanaskovic-Markovic M, Barbaud A, Bircher AJ, Brockow K, Caubet JC, et al. Towards a more precise diagnosis of hypersensitivity to beta-lactams - an EAACI position paper. *Allergy*. 2020;75(6):1300-15.
15. Fiszenson-Albala F, Auzerie V, Mahe E, Farinotti R, Durand-Stocco C, Crickx B, et al. A 6-month prospective survey of cutaneous drug reactions in a hospital setting. *Br J Dermatol*. 2003;149(5):1018-22.
16. Hernández-Salazar A, Rosales SP, Rangel-Frausto S, Criollo E, Archer-Dubon C, Orozco-Topete R. Epidemiology of adverse cutaneous drug reactions. A prospective study in hospitalized patients. *Arch Med Res*. 2006;37(7):899-902.
17. Park CS, Kim TB, Kim SL, Kim JY, Yang KA, Bae YJ, et al. The use of an electronic medical record system for mandatory reporting of drug hypersensitivity reactions has been shown to improve the management of patients in the university hospital in Korea. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2008;17(9):919-25.
18. Muller P, Dubreil P, Mahé A, Lamaury I, Salzer B, Deloumeaux J, et al. Drug Hypersensitivity Syndrome in a West-Indian population. *Eur J Dermatol*. 2003;13(5):478-81.
19. Shiohara T, Kano Y, Takahashi R, Ishida T, Mizukawa Y. Drug-induced hypersensitivity syndrome: recent advances in the diagnosis, pathogenesis and management. *Chem Immunol Allergy*. 2012;97:122-38.
20. Wolfson AR, Zhou L, Li Y, Phadke NA, Chow OA, Blumenthal KG. Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Syndrome Identified in the Electronic Health Record Allergy Module. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019;7(2):633-40.

21. Hiransuthikul A, Rattananupong T, Klaewsongkram J, Rerknimitr P, Pongprutthipan M, Ruxrungtham K. Drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DIHS/DRESS): 11 years retrospective study in Thailand. *Allergol Int.* 2016;65(4):432-8.
22. Ramírez E, Bellón T, Tong HY, Borobia AM, de Abajo FJ, Lerma V, et al. Significant HLA class I type associations with aromatic antiepileptic drug (AED)-induced SJS/TEN are different from those found for the same AED-induced DRESS in the Spanish population. *Pharmacol Res.* 2017;115:168-78.
23. Bedouelle E, Ben Said B, Tetart F, Milpied B, Welfringer-Morin A, Maruani A, et al. Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS): Series of 49 French Pediatric Cases. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2022;10(1):267-74.e5.
24. Cacoub P, Musette P, Descamps V, Meyer O, Speirs C, Finzi L, et al. The DRESS syndrome: a literature review. *Am J Med.* 2011;124(7):588-97.
25. Ramírez E, Medrano-Casique N, Tong HY, Bellón T, Cabañas R, Fiandor A, et al. Eosinophilic drug reactions detected by a prospective pharmacovigilance programme in a tertiary hospital. *Br J Clin Pharmacol.* 2017;83(2):400-15.
26. Kardaun SH, Sidoroff A, Valeyrie-Allanore L, Halevy S, Davidovici BB, Mockenhaupt M, et al. Variability in the clinical pattern of cutaneous side-effects of drugs with systemic symptoms: does a DRESS syndrome really exist? *Br J Dermatol.* 2007;156(3):609-11.
27. Mangana J, Guenova E, Kerl K, Urosevic-Maiwald M, Amann VC, Bayard C, et al. Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma Mimicking Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS Syndrome). *Case Rep Dermatol.* 2017;9(1):74-9.
28. White KD, Abe R, Ardern-Jones M, Beachkofsky T, Bouchard C, Carleton B, et al. SJS/TEN 2017: Building Multidisciplinary Networks to Drive Science and Translation. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(1):38-69.
29. Soria A, Bernier C, Veyrac G, Barbaud A, Puymirat E, Milpied B. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms may occur within 2 weeks of drug exposure: A retrospective study. *J Am Acad Dermatol.* 2020;82(3):606-11.
30. Picard D, Vellar M, Janela B, Roussel A, Joly P, Musette P. Recurrence of drug-induced reactions in DRESS patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(4):801-4.
31. Ingen-Housz-Oro S, Staumont-Sallé D, Palladini A, Ferries L, Chiaverini C, Valois A, et al. Immunosuppressants as steroid-sparing agents for chronic DRESS: four cases. *Eur J Dermatol.* 2021;31(4):576-7.
32. Sharma AN, Shwe S, Ravi V, Miller M, Mesinkovska NA, Rojek NW, et al. Characterizing DRESS syndrome recurrence: a systematic review. *Arch Dermatol Res.* 2022;314(8):721-8.
33. Momen SE, Diaz-Cano S, Walsh S, Creamer D. Discriminating minor and major forms of drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms: Facial edema aligns to the severe phenotype. *J Am Acad Dermatol.* 2021;85(3):645-52.
34. Chen HC, Wang RC, Tsai HP, Medeiros LJ, Chang KC. Morphologic Spectrum of Lymphadenopathy in Drug Reaction With Eosinophilia and Systemic Symptoms Syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* 2022;146(9):1084-93.
35. Pukhalskaya T, El Hussein S. Hematologic findings in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). *Am J Hematol.* 2021;96(11):1548-50.
36. Husain Z, Reddy BY, Schwartz RA. DRESS syndrome: Part I. Clinical perspectives. *J Am Acad Dermatol.* 2013;68(5):693.e1-14; quiz 706-8.
37. Zereshkian A, Wasserman S. Liver enzyme elevation and eosinophilia with atorvastatin: a case of probable DRESS without cutaneous symptoms. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2021;17(1):81.
38. Takei S, Hama N, Mizukawa Y, Takahashi H, Miyagawa F, Asada H, et al. Purpura as an indicator of severity in drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms: evidence from a 49-case series. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2022;36(4):e310-e3.

39. Gilkey TW, Amigo MA, Himed S, Rojek NW, Milani-Nejad N, Korman AM, et al. Oblique earlobe crease as a novel physical examination finding in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms: a retrospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2022;36(9):e739-e40.
40. Lee JW, Lee SR, Kim MJ, Cho S, Youn SW, Yang MS, et al. Skin manifestations and clinical features of drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms: a retrospective multicentre study of 125 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2022;36(9):1584-92.
41. Toniato A, Gamba C, Schroeder JW, Fabbri V, Bernal Ortiz SV, Borgonovo L, et al. Role of Multiple Comorbidities and Therapies in Conditioning the Clinical Severity of DRESS: A Mono-Center Retrospective Study of 25 Cases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13).
42. Avancini J, Maragno L, Santi CG, Criado PR. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms/drug-induced hypersensitivity syndrome: clinical features of 27 patients. *Clin Exp Dermatol*. 2015;40(8):851-9.
43. Ang CC, Wang YS, Yoosuff EL, Tay YK. Retrospective analysis of drug-induced hypersensitivity syndrome: a study of 27 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2010;63(2):219-27.
44. Tashiro Y, Azukizawa H, Asada H, Niihara H, Morita E, Yamauchi T, et al. Drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms due to lamotrigine differs from that due to other drugs. *J Dermatol*. 2019;46(3):226-33.
45. Sim DW, Yu JE, Jeong J, Jung JW, Kang HR, Kang DY, et al. Variation of clinical manifestations according to culprit drugs in DRESS syndrome. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2019;28(6):840-8.
46. Chaabane A, Romdhane HB, Fadhel NB, Fredj NB, Ammar H, Boughattas N, et al. DRESS characteristics according to the causative medication. *Eur J Clin Pharmacol*. 2022;78(9):1503-10.
47. Kardaun SH, Sekula P, Valeyrie-Allanore L, Liss Y, Chu CY, Creamer D, et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): an original multisystem adverse drug reaction. Results from the prospective RegiSCAR study. *Br J Dermatol*. 2013;169(5):1071-80.
48. Kano Y, Shiohara T. The variable clinical picture of drug-induced hypersensitivity syndrome/drug rash with eosinophilia and systemic symptoms in relation to the eliciting drug. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2009;29(3):481-501.
49. Devarbhavi H, Raj S. Drug-induced liver injury with skin reactions: Drugs and host risk factors, clinical phenotypes and prognosis. *Liver Int*. 2019;39(5):802-11.
50. Ichai P, Laurent-Bellue A, Saliba F, Moreau D, Besch C, Francoz C, et al. Acute Liver Failure/Injury Related to Drug Reaction With Eosinophilia and Systemic Symptoms: Outcomes and Prognostic Factors. *Transplantation*. 2017;101(8):1830-7.
51. Funck-Brentano E, Duong TA, Bouvresse S, Bagot M, Wolkenstein P, Roujeau JC, et al. Therapeutic management of DRESS: a retrospective study of 38 cases. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(2):246-52.
52. Higashi Y, Baba N, Yoshimine H, Sakaguchi I, Kanekura T. Late-onset interstitial nephritis in a patient with drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms. *J Dermatol*. 2020;47(2):174-7.
53. Torroba Sanz B, Mendez Martínez E, Cacho Asenjo E, Aquerreta Gonzalez I. Permanent renal sequelae secondary to drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome induced by quetiapine. *Eur J Hosp Pharm*. 2021;28(5):285-8.
54. Taweeseedt PT, Nordstrom CW, Stoeckel J, Domic I. Pulmonary Manifestations of Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Syndrome: A Systematic Review. *Biomed Res Int*. 2019;2019:7863815.
55. Kinehara Y, Kijima T, Inoue K, Hirata H, Takeuchi Y, Fukushima K, et al. Dapsone hypersensitivity syndrome-related lung injury without eosinophilia in the bronchoalveolar lavage fluid. *Intern Med*. 2015;54(7):827-31.

56. Radovanovic M, Jevtic D, Calvin AD, Petrovic M, Paulson M, Rueda Prada L, et al. "Heart in DRESS": Cardiac Manifestations, Treatment and Outcome of Patients with Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms Syndrome: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2022;11(3).
57. Thongsri T, Chularojanamontri L, Pichler WJ. Cardiac involvement in DRESS syndrome. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2017;35(1):3-10.
58. Morikawa D, Hiraoka E, Obunai K, Norisue Y. Myocarditis Associated with Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Syndrome: A Case Report and Review of the Literature. *Am J Case Rep*. 2018;19:978-84.
59. Bourgeois GP, Cafardi JA, Groysman V, Hughey LC. A review of DRESS-associated myocarditis. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(6):e229-36.
60. Gaha M, Landry D, Bélair M, Paquet B, Chapdelaine H, Bard C. DRESS syndrome: cerebral vasculitic-like presentation. *Neuroradiology*. 2015;57(10):1015-21.
61. Sola D, Rossi L, Sainaghi PP, Pirisi M. DRESS syndrome with cerebral vasculitis. *Intern Med*. 2013;52(12):1403-5.
62. Roth M, Gray JT, Peterson PG, Clark PA. Dapsone-induced DRESS after infliximab-induced vasculitis: a case of cerebral infarction in the context of multiple drug reactions. *BMJ Case Rep*. 2020;13(12).
63. Sano S, Ueno H, Yamagami K, Yakushiji Y, Isaka Y, Kawasaki I, et al. Isolated ileal perforation due to cytomegalovirus reactivation during management of terbinafine hypersensitivity. *World J Gastroenterol*. 2010;16(26):3339-42.
64. Fujikawa H, Araki T, Shimura T, Okita Y, Tanaka K, Inoue M, et al. Small intestinal perforation caused by cytomegalovirus reactivation after subtotal colectomy for ulcerative colitis: report of a case. *Clin J Gastroenterol*. 2013;6(2):111-5.
65. Douxami M, Faure E, Fievet C, Buche S, Azib-Meftah S, Cuypers-Tilmant A, et al. Duodenal Stenosis Linked to Drug Reaction With Eosinophilia and Systemic Symptoms. *Dermatitis*. 2023.
66. Yawalkar N, Egli F, Hari Y, Nievergelt H, Braathen LR, Pichler WJ. Infiltration of cytotoxic T cells in drug-induced cutaneous eruptions. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(6):847-55.
67. Spanou Z, Keller M, Britschgi M, Yawalkar N, Fehr T, Neuweiler J, et al. Involvement of drug-specific T cells in acute drug-induced interstitial nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(10):2919-27.
68. Posadas SJ, Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions - new concepts. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(7):989-99.
69. Yawalkar N, Hari Y, Frutig K, Egli F, Wendland T, Braathen LR, et al. T cells isolated from positive epicutaneous test reactions to amoxicillin and ceftriaxone are drug specific and cytotoxic. *J Invest Dermatol*. 2000;115(4):647-52.
70. Naisbitt DJ, Farrell J, Wong G, Depta JP, Dodd CC, Hopkins JE, et al. Characterization of drug-specific T cells in lamotrigine hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(6):1393-403.
71. Stur K, Karlhofer FM, Stingl G. Soluble FAS ligand: a discriminating feature between drug-induced skin eruptions and viral exanthemas. *J Invest Dermatol*. 2007;127(4):802-7.
72. Picard D, Janela B, Descamps V, D'Incan M, Courville P, Jacquot S, et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): a multiorgan antiviral T cell response. *Sci Transl Med*. 2010;2(46):46ra62.
73. Yawalkar N, Pichler WJ. Pathogenesis of drug-induced exanthema. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;124(1-3):336-8.
74. Miyagawa F, Asada H. Current Perspective Regarding the Immunopathogenesis of Drug-Induced Hypersensitivity Syndrome/Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DIHS/DRESS). *Int J Mol Sci*. 2021;22(4).
75. Ortonne N. [Histopathology of cutaneous drug reactions]. *Ann Pathol*. 2018;38(1):7-19.

76. Ortonne N. Is DRESS syndrome a single entity or within a spectrum of adverse reactions to drug? *Br J Dermatol.* 2016;175(6):1142-4.
77. Ortonne N, Valeyrie-Allanore L, Bastuji-Garin S, Wechsler J, de Feraudy S, Duong TA, et al. Histopathology of drug rash with eosinophilia and systemic symptoms syndrome: a morphological and phenotypical study. *Br J Dermatol.* 2015;173(1):50-8.
78. González FJ, Leyva L, Posadas S, Luque I, Blanca M, Santamaría L, et al. Participation of T lymphocytes in cutaneous allergic reactions to drugs. *Clin Exp Allergy.* 1998;28 Suppl 4:3-6.
79. Yang F, Chen SA, Wu X, Zhu Q, Luo X. Overexpression of cytotoxic proteins correlates with liver function impairment in patients with drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). *Eur J Dermatol.* 2018;28(1):13-25.
80. Saito N, Abe R, Yoshioka N, Murata J, Fujita Y, Shimizu H. Prolonged elevation of serum granulysin in drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol.* 2012;167(2):452-3.
81. Teraki Y, Fukuda T. Skin-Homing IL-13-Producing T Cells Expand in the Circulation of Patients with Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms. *Dermatology.* 2017;233(2-3):242-9.
82. Ogawa K, Morito H, Hasegawa A, Daikoku N, Miyagawa F, Okazaki A, et al. Identification of thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) as a potential marker for early indication of disease and prediction of disease activity in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). *J Dermatol Sci.* 2013;69(1):38-43.
83. Watanabe H. Recent Advances in Drug-Induced Hypersensitivity Syndrome/Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms. *J Immunol Res.* 2018;2018:5163129.
84. Tsai YG, Liou JH, Hung SI, Chen CB, Chiu TM, Wang CW, et al. Increased Type 2 Innate Lymphoid Cells in Patients with Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms Syndrome. *J Invest Dermatol.* 2019;139(8):1722-31.
85. Chen CB, Abe R, Pan RY, Wang CW, Hung SI, Tsai YG, et al. An Updated Review of the Molecular Mechanisms in Drug Hypersensitivity. *J Immunol Res.* 2018;2018:6431694.
86. Pichler WJ. Immune pathomechanism and classification of drug hypersensitivity. *Allergy.* 2019;74(8):1457-71.
87. Mullan KA, Anderson A, Illing PT, Kwan P, Purcell AW, Mifsud NA. HLA-associated antiepileptic drug-induced cutaneous adverse reactions. *Hla.* 2019;93(6):417-35.
88. Karnes JH, Miller MA, White KD, Konvinse KC, Pavlos RK, Redwood AJ, et al. Applications of Immunopharmacogenomics: Predicting, Preventing, and Understanding Immune-Mediated Adverse Drug Reactions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2019;59:463-86.
89. Fan WL, Shiao MS, Hui RC, Su SC, Wang CW, Chang YC, et al. HLA Association with Drug-Induced Adverse Reactions. *J Immunol Res.* 2017;2017:3186328.
90. Quiros-Roldan E, Gardini G, Properzi M, Ferraresi A, Carella G, Marchi A, et al. Abacavir adverse reactions related with HLA-B*57: 01 haplotype in a large cohort of patients infected with HIV. *Pharmacogenet Genomics.* 2020;30(8):167-74.
91. Ostrov DA, Grant BJ, Pompeu YA, Sidney J, Harndahl M, Southwood S, et al. Drug hypersensitivity caused by alteration of the MHC-presented self-peptide repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(25):9959-64.
92. Saag M, Balu R, Phillips E, Brachman P, Martorell C, Burman W, et al. High sensitivity of human leukocyte antigen-b*5701 as a marker for immunologically confirmed abacavir hypersensitivity in white and black patients. *Clin Infect Dis.* 2008;46(7):1111-8.
93. Sousa-Pinto B, Correia C, Gomes L, Gil-Mata S, Araújo L, Correia O, et al. HLA and Delayed Drug-Induced Hypersensitivity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;170(3):163-79.
94. Redwood AJ, Pavlos RK, White KD, Phillips EJ. HLAs: Key regulators of T-cell-mediated drug hypersensitivity. *Hla.* 2018;91(1):3-16.
95. Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomazic J, et al. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med.* 2008;358(6):568-79.

96. Nakkam N, Konyoung P, Kanjanawart S, Saksit N, Kongpan T, Khaeso K, et al. HLA Pharmacogenetic Markers of Drug Hypersensitivity in a Thai Population. *Front Genet.* 2018;9:277.
97. Singvijarn P, Manuyakorn W, Mahasirimongkol S, Wattanapokayakit S, Inunchot W, Wichukchinda N, et al. Association of HLA genotypes with Beta-lactam antibiotic hypersensitivity in children. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2021;39(3):197-205.
98. Genin E, Chen DP, Hung SI, Sekula P, Schumacher M, Chang PY, et al. HLA-A*31:01 and different types of carbamazepine-induced severe cutaneous adverse reactions: an international study and meta-analysis. *Pharmacogenomics J.* 2014;14(3):281-8.
99. Zhao Q, Alhilali K, Alzahrani A, Almutairi M, Amjad J, Liu H, et al. Dapsone- and nitroso dapsone-specific activation of T cells from hypersensitive patients expressing the risk allele HLA-B*13:01. *Allergy.* 2019;74(8):1533-48.
100. Yampayon K, Sukasem C, Limwongse C, Chinvarun Y, Tempark T, Rerkpattanapipat T, et al. Influence of genetic and non-genetic factors on phenytoin-induced severe cutaneous adverse drug reactions. *Eur J Clin Pharmacol.* 2017;73(7):855-65.
101. Rutkowski K, Taylor C, Wagner A. HLA B62 as a possible risk factor for drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms to piperacillin/tazobactam. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5(3):829-30.
102. Thomas M, Hopkins C, Duffy E, Lee D, Loulergue P, Ripamonti D, et al. Association of the HLA-B*53:01 Allele With Drug Reaction With Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Syndrome During Treatment of HIV Infection With Raltegravir. *Clin Infect Dis.* 2017;64(9):1198-203.
103. Konvinse KC, Trubiano JA, Pavlos R, James I, Shaffer CM, Bejan CA, et al. HLA-A*32:01 is strongly associated with vancomycin-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(1):183-92.
104. Pichler WJ, Brüggem MC. Viral infections and drug hypersensitivity. *Allergy.* 2022.
105. Tohyama M, Hashimoto K, Yasukawa M, Kimura H, Horikawa T, Nakajima K, et al. Association of human herpesvirus 6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol.* 2007;157(5):934-40.
106. Kano Y, Tohyama M, Aihara M, Matsukura S, Watanabe H, Sueki H, et al. Sequelae in 145 patients with drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms: survey conducted by the Asian Research Committee on Severe Cutaneous Adverse Reactions (ASCAR). *J Dermatol.* 2015;42(3):276-82.
107. Shiohara T, Inaoka M, Kano Y. Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS): a reaction induced by a complex interplay among herpesviruses and antiviral and antidrug immune responses. *Allergol Int.* 2006;55(1):1-8.
108. Liang J, Qu H, Wang X, Wang A, Liu L, Tu P, et al. Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms Associated with Reactivation of Epstein-Barr Virus and/or Cytomegalovirus Leading to Hemophagocytic Syndrome in One of Two Patients. *Ann Dermatol.* 2018;30(1):71-4.
109. Musette P, Janela B. New Insights into Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms Pathophysiology. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:179.
110. Takahashi R, Kano Y, Yamazaki Y, Kimishima M, Mizukawa Y, Shiohara T. Defective regulatory T cells in patients with severe drug eruptions: timing of the dysfunction is associated with the pathological phenotype and outcome. *J Immunol.* 2009;182(12):8071-9.
111. Li JC. Reactivation of Human Herpesvirus (HHV) 6 as Etiology of Acute Liver Injury in Drug Reaction With Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Syndrome: A Case Report. *Cureus.* 2022;14(9):e29697.
112. Pavlos R, White KD, Wanjalla C, Mallal SA, Phillips EJ. Severe Delayed Drug Reactions: Role of Genetics and Viral Infections. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2017;37(4):785-815.

113. Samarasinghe AE, Melo RC, Duan S, LeMessurier KS, Liedmann S, Surman SL, et al. Eosinophils Promote Antiviral Immunity in Mice Infected with Influenza A Virus. *J Immunol.* 2017;198(8):3214-26.
114. Eid R, Borish L. Eosinophils in antiviral immunity and (perhaps) a benefit of having asthma during the SARS-CoV2 pandemic. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2021;127(1):3-4.
115. Ho KS, Howell D, Rogers L, Narasimhan B, Verma H, Steiger D. The relationship between asthma, eosinophilia, and outcomes in coronavirus disease 2019 infection. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2021;127(1):42-8.
116. Mille B, Ingen-Housz-Oro S, De Prost N, Voiriot G, Soria A, Tetart F, et al. High frequency of eosinophilia and viral reactivation in drug hypersensitivity in patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2022;36(4):e256-e7.
117. Wechsler ME, Munitz A, Ackerman SJ, Drake MG, Jackson DJ, Wardlaw AJ, et al. Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. *Mayo Clin Proc.* 2021;96(10):2694-707.
118. Marichal T, Mesnil C, Bureau F. Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:101.
119. O'Sullivan JA, Bochner BS. Eosinophils and eosinophil-associated diseases: An update. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(2):505-17.
120. Esnault S, Shen ZJ, Malter JS. Protein Translation and Signaling in Human Eosinophils. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:150.
121. Klion AD, Ackerman SJ, Bochner BS. Contributions of Eosinophils to Human Health and Disease. *Annu Rev Pathol.* 2020;15:179-209.
122. Fettelet T, Gigon L, Karaulov A, Yousefi S, Simon HU. The Enigma of Eosinophil Degranulation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13).
123. Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(12):746-60.
124. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem.* 2014;289(25):17406-15.
125. Saffari H, Hoffman LH, Peterson KA, Fang JC, Leiferman KM, Pease LF, 3rd, et al. Electron microscopy elucidates eosinophil degranulation patterns in patients with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(6):1728-34.e1.
126. Valent P, Gleich GJ, Reiter A, Roufosse F, Weller PF, Hellmann A, et al. Pathogenesis and classification of eosinophil disorders: a review of recent developments in the field. *Expert Rev Hematol.* 2012;5(2):157-76.
127. Valent P, Klion AD, Horny HP, Roufosse F, Gotlib J, Weller PF, et al. Contemporary consensus proposal on criteria and classification of eosinophilic disorders and related syndromes. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(3):607-12.e9.
128. Valent P, Klion AD, Roufosse F, Simon D, Metzgeroth G, Leiferman KM, et al. Proposed refined diagnostic criteria and classification of eosinophil disorders and related syndromes. *Allergy.* 2022.
129. Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(4):651-63.
130. Plager DA, Davis MD, Andrews AG, Coenen MJ, George TJ, Gleich GJ, et al. Eosinophil ribonucleases and their cutaneous lesion-forming activity. *J Immunol.* 2009;183(6):4013-20.
131. Chi MH, Hui RC, Yang CH, Lin JY, Lin YT, Ho HC, et al. Histopathological analysis and clinical correlation of drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). *Br J Dermatol.* 2014;170(4):866-73.
132. Skowron F, Bensaid B, Balme B, Depaepe L, Kanitakis J, Nosbaum A, et al. Comparative histological analysis of drug-induced maculopapular exanthema and DRESS. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(12):2085-90.

133. Skowron F, Bensaid B, Balme B, Depaepe L, Kanitakis J, Nosbaum A, et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): clinicopathological study of 45 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(11):2199-205.
134. Walsh S, Diaz-Cano S, Higgins E, Morris-Jones R, Bashir S, Bernal W, et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms: is cutaneous phenotype a prognostic marker for outcome? A review of clinicopathological features of 27 cases. *Br J Dermatol*. 2013;168(2):391-401.
135. Baum S, Engler Markowitz M, Lyakhovitsky A, Gershon R, Aviv H, Segal Z, et al. Skin Eosinophil Counts in Bullous Pemphigoid as a Prognostic Factor for Disease Severity and Treatment Response. *Acta Derm Venereol*. 2023;103:adv00850.
136. Gore Karaali M, Koku Aksu AE, Cin M, Leblebici C, Kara Polat A, Gurel MS. Tissue eosinophil levels as a marker of disease severity in bullous pemphigoid. *Australas J Dermatol*. 2021;62(2):e236-e41.
137. Garrido PM, Aguado-Lobo M, Espinosa-Lara P, Soares-Almeida L, Filipe P. Association of Peripheral Blood and Cutaneous Eosinophils With Bullous Pemphigoid Disease Severity and Treatment Outcomes. *Actas Dermosifiliogr*. 2022;113(9):881-7.
138. Kim MR, Manoukian R, Yeh R, Silbiger SM, Danilenko DM, Scully S, et al. Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. *Blood*. 2002;100(7):2330-40.
139. Esposito AJ, Murphy RC, Toukatly MN, Amro OW, Kestenbaum BR, Najafian B. Acute kidney injury in allopurinol-induced DRESS syndrome: a case report of concurrent tubulointerstitial nephritis and kidney-limited necrotizing vasculitis. *Clin Nephrol*. 2017;87(6):316-9.
140. Savard S, Desmeules S, Riopel J, Agharazii M. Linezolid-associated acute interstitial nephritis and drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome. *Am J Kidney Dis*. 2009;54(6):e17-20.
141. Ganeshanandan L, Lucas M. Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms: A Complex Interplay between Drug, T Cells, and Herpesviridae. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3).
142. Shiohara T, Iijima M, Ikezawa Z, Hashimoto K. The diagnosis of a DRESS syndrome has been sufficiently established on the basis of typical clinical features and viral reactivations. *Br J Dermatol*. 2007;156(5):1083-4.
143. Ben M'rad M, Leclerc-Mercier S, Blanche P, Franck N, Rozenberg F, Fulla Y, et al. Drug-induced hypersensitivity syndrome: clinical and biologic disease patterns in 24 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2009;88(3):131-40.
144. Weingertner N, Mitcov M, Chenard MP, Cribier B. Intralymphatic CD30+ T-cell proliferation during DRESS: a mimic of intravascular lymphoma. *J Cutan Pathol*. 2016;43(11):1036-40.
145. Sato R, Itoh M, Suzuki H, Kusuhara Y, Nakayama M, Kikuchi S, et al. Pathological findings of lymphadenopathy in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/drug reaction with eosinophilia and systemic syndrome (DRESS): similarities with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Eur J Dermatol*. 2017;27(2):201-2.
146. Jeong J, Sim DW, Yu JE, Choi YD, Kim SK, Yoon W, et al. Differentiation of angioimmunoblastic T-cell lymphoma from DRESS syndrome. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019;7(5):1684-6.e1.
147. Dorrell DN, Whitaker LF, Anderson KL, Strowd LC. Abnormal erythrocyte morphology in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(4):1159-60.
148. Paulmann M, Mockenhaupt M. Severe drug-induced skin reactions: clinical features, diagnosis, etiology, and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2015;13(7):625-45.
149. Tempark T, John S, Rerknimitr P, Satapornpong P, Sukasem C. Drug-Induced Severe Cutaneous Adverse Reactions: Insights Into Clinical Presentation,

- Immunopathogenesis, Diagnostic Methods, Treatment, and Pharmacogenomics. *Front Pharmacol.* 2022;13:832048.
150. Komatsuda A, Okamoto Y, Hatakeyama T, Wakui H, Sawada K. Sulfasalazine-induced hypersensitivity syndrome and hemophagocytic syndrome associated with reactivation of Epstein-Barr virus. *Clin Rheumatol.* 2008;27(3):395-7.
151. Hübner ST, Bertoli R, Rätz Bravo AE, Schaeublin M, Haschke M, Scherer K, et al. C-Reactive Protein and Procalcitonin in Case Reports of Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Syndrome. *Int Arch Allergy Immunol.* 2018;176(1):44-54.
152. Rhyou HI, Nam YH. Procalcitonin as a diagnostic marker for differentiating DRESS syndrome from bacterial infection. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2019;123(3):307-9.e1.
153. Sasidharanpillai S, Govindan A, Ajithkumar K, Chathoth AT, Khader A, Reena Mariyath OK, et al. Interface dermatitis as an indicator of hepatic involvement in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). *J Cutan Pathol.* 2020;47(9):800-8.
154. Gonçalo MM, Cardoso JC, Gouveia MP, Coutinho I, Gameiro AR, Brites MM, et al. Histopathology of the Exanthema in DRESS Is Not Specific but May Indicate Severity of Systemic Involvement. *Am J Dermatopathol.* 2016;38(6):423-33.
155. Pinto Gouveia M, Gameiro A, Coutinho I, Pereira N, Cardoso JC, Gonçalo M. Overlap between maculopapular exanthema and drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms among cutaneous adverse drug reactions in a dermatology ward. *Br J Dermatol.* 2016;175(6):1274-83.
156. Novice T, Ahn JW, Wilcox R, Tejasvi T, Hristov A, Mancuso J. Distinguishing reactive inflammatory dermatoses from lymphoma: 2 cases of severe drug reactions to phenytoin/phenobarbital and rosuvastatin mimicking lymphoma. *JAAD Case Rep.* 2020;6(4):311-5.
157. Shiohara T, Mizukawa Y. Drug-induced hypersensitivity syndrome (DiHS)/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): An update in 2019. *Allergol Int.* 2019;68(3):301-8.
158. Schroeder JW, Gamba C, Toniato A, Rongioletti F. A definite case of Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) induced by administration of the Pfizer/BioNTech BNT162b2 vaccine for SARS-CoV2. *Clin Dermatol.* 2022;40(5):591-4.
159. Khan DA, Phillips EJ. Pharmacogenomic biomarkers in allergy and immunology practice. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;146(3):509-12.
160. Takimoto R, Honda T, Kataoka TR, Ueshima C, Otsuka A, Kabashima K. DIHS/DRESS-like eruption possibly induced by amoxicillin during treatment with nivolumab. *Eur J Dermatol.* 2019;29(2):228-9.
161. Barbaud A, Collet E, Milpied B, Assier H, Staumont D, Avenel-Audran M, et al. A multicentre study to determine the value and safety of drug patch tests for the three main classes of severe cutaneous adverse drug reactions. *Br J Dermatol.* 2013;168(3):555-62.
162. Miremont-Salamé G, Théophile H, Haramburu F, Bégaud B. Causality assessment in pharmacovigilance: The French method and its successive updates. *Therapie.* 2016;71(2):179-86.
163. Teo YX, Haw WY, Vallejo A, McGuire C, Woo J, Friedmann PS, et al. Potential Biomarker Identification by RNA-Seq Analysis in Antibiotic-Related Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS): A Pilot Study. *Toxicol Sci.* 2022;189(1):20-31.
164. Cabañas R, Ramírez E, Sendagorta E, Alamar R, Barranco R, Blanca-López N, et al. Spanish Guidelines for Diagnosis, Management, Treatment, and Prevention of DRESS Syndrome. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2020;30(4):229-53.
165. Husain Z, Reddy BY, Schwartz RA. DRESS syndrome: Part II. Management and therapeutics. *J Am Acad Dermatol.* 2013;68(5):709.e1-9; quiz 18-20.

166. Shiohara T, Kano Y. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): incidence, pathogenesis and management. *Expert Opin Drug Saf.* 2017;16(2):139-47.
167. Joly P, Janela B, Tetart F, Rogez S, Picard D, D'Incan M, et al. Poor benefit/risk balance of intravenous immunoglobulins in DRESS. *Arch Dermatol.* 2012;148(4):543-4.
168. Kim S, Joo EJ, Kim UJ, Kim JH, Kim B, Lee HJ, et al. Corticosteroid-induced drug reaction with eosinophilia and systematic symptoms successfully treated with a tumor necrosis factor alpha inhibitor. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2020.
169. Moling O, Tappeiner L, Piccin A, Pagani E, Rossi P, Rimenti G, et al. Treatment of DIHS/DRESS syndrome with combined N-acetylcysteine, prednisone and valganciclovir--a hypothesis. *Med Sci Monit.* 2012;18(7):Cs57-62.
170. Tohyama M, Hashimoto K, Oda F, Namba C, Sayama K. Influence of corticosteroid therapy on viral reactivation in drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms. *J Dermatol.* 2020;47(5):476-82.
171. Singer EM, Wanat KA, Rosenbach MA. A case of recalcitrant DRESS syndrome with multiple autoimmune sequelae treated with intravenous immunoglobulins. *JAMA Dermatol.* 2013;149(4):494-5.
172. Nguyen E, Yanes D, Imadojemu S, Kroshinsky D. Evaluation of Cyclosporine for the Treatment of DRESS Syndrome. *JAMA Dermatol.* 2020;156(6):704-6.
173. Gschwend A, Helbling A, Feldmeyer L, Mani-Weber U, Meincke C, Heidemeyer K, et al. Treatment with IL5-/IL-5 receptor antagonists in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). *Allergo J Int.* 2022:1-8.
174. Jain V, Bansal A, Aggarwal D, Chetrit M, Gupta M, Bhatia K, et al. Eosinophilic Myocarditis: When Allergies Attack the Heart! *Cardiol Rev.* 2022;30(2):70-4.
175. Schmid-Grendelmeier P, Steiger P, Naegeli MC, Kolm I, Claudia Cécile Valérie L, Maverakis E, et al. Benralizumab for severe DRESS in two COVID-19 patients. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(1):481-3.e2.
176. Mesli F, Dumont M, Soria A, Groh M, Turpin M, Voiriot G, et al. Benralizumab: A potential tailored treatment for life-threatening DRESS in the COVID-19 era. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(9):3529-31.e1.
177. Mizukawa Y, Aoyama Y, Takahashi H, Takahashi R, Shiohara T. Risk of Progression to Autoimmune Disease in Severe Drug Eruption: Risk Factors and the Factor-Guided Stratification. *J Invest Dermatol.* 2022;142(3 Pt B):960-8.e9.
178. Liu Q, Zhao S, Chen W. Clinical features, treatment outcomes and prognostic factors of allopurinol-induced DRESS in 52 patients. *J Clin Pharm Ther.* 2022;47(9):1368-78.
179. Ange N, Alley S, Fernando SL, Coyle L, Yun J. Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) syndrome successfully treated with mepolizumab. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(3):1059-60.
180. Truong K, Kelly S, Bayly A, Smith A. Successful mepolizumab treatment for DRESS-induced refractory eosinophilic myocarditis and concurrent thyroiditis. *BMJ Case Rep.* 2021;14(7).
181. Choquet-Kastylevsky G, Intrator L, Chenal C, Bocquet H, Revuz J, Roujeau JC. Increased levels of interleukin 5 are associated with the generation of eosinophilia in drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol.* 1998;139(6):1026-32.
182. Reed CC, Genta RM, Youngblood BA, Wechsler JB, Dellon ES. Mast Cell and Eosinophil Counts in Gastric and Duodenal Biopsy Specimens From Patients With and Without Eosinophilic Gastroenteritis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;19(10):2102-11.
183. Protheroe C, Woodruff SA, de Petris G, Mukkada V, Ochkur SI, Janarthanan S, et al. A novel histologic scoring system to evaluate mucosal biopsies from patients with eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7(7):749-55.e11.
184. Wright BL, Doyle AD, Shim KP, Pai RK, Barshow SM, Horsley-Silva JL, et al. Image Analysis of Eosinophil Peroxidase Immunohistochemistry for Diagnosis of Eosinophilic Esophagitis. *Dig Dis Sci.* 2021;66(3):775-83.

185. Djien V, Bocquet H, Dupuy A, Revuz J, Roujeau JC. [Symptomatology and markers of the severity of erythematous drug eruptions]. *Ann Dermatol Venereol*. 1999;126(3):247-50.
186. Turner KO, Collins MH, Walker MM, Genta RM. Quantification of Mucosal Eosinophils for the Histopathologic Diagnosis of Eosinophilic Gastritis and Duodenitis: A Primer for Practicing Pathologists. *Am J Surg Pathol*. 2022;46(4):557-66.
187. Tajudeen BA, Ganti A, Kuhar HN, Mahdavinia M, Heilingoetter A, Gattuso P, et al. The presence of eosinophil aggregates correlates with increased postoperative prednisone requirement. *Laryngoscope*. 2019;129(4):794-9.
188. Brescia G, Alessandrini L, Parrino D, Franz L, Barion U, Marioni G. Emerging Contribution of Histopathology to Our Understanding of Chronic Rhinosinusitis Endotypes: Tissue Eosinophil Count and Aggregates. *Am J Rhinol Allergy*. 2020;34(1):122-6.
189. Ferguson AE, Fulkerson PC. Eosinophilic esophagitis: Time to classify into endotypes? *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(1):71-2.
190. Klingler AI, Stevens WW, Tan BK, Peters AT, Poposki JA, Grammer LC, et al. Mechanisms and biomarkers of inflammatory endotypes in chronic rhinosinusitis without nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(4):1306-17.
191. Hilvering B, Koenderman L. Quality over quantity; eosinophil activation status will deepen the insight into eosinophilic diseases. *Respir Med*. 2022;207:107094.
192. Penn L, Brinster NK. Eosinophils Among the Histological Features of Psoriasis. *Am J Dermatopathol*. 2019;41(5):347-9.
193. Kato M, Kephart GM, Talley NJ, Wagner JM, Sarr MG, Bonno M, et al. Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissue. *Anat Rec*. 1998;252(3):418-25.
194. Wen T, Rothenberg ME. The Regulatory Function of Eosinophils. *Microbiol Spectr*. 2016;4(5).
195. Zimmermann N, Abonia JP, Dreskin SC, Akin C, Bolton S, Happel CS, et al. Developing a standardized approach for assessing mast cells and eosinophils on tissue biopsies: A Work Group Report of the AAAAI Allergic Skin Diseases Committee. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;148(4):964-83.
196. McHugh T, Snidvongs K, Xie M, Banglawala S, Sommer D. High tissue eosinophilia as a marker to predict recurrence for eosinophilic chronic rhinosinusitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2018;8(12):1421-9.
197. Yang BG, Seoh JY, Jang MH. Regulatory Eosinophils in Inflammation and Metabolic Disorders. *Immune Netw*. 2017;17(1):41-7.
198. Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, Xiao X, Birrell MA, Pirottin D, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest*. 2016;126(9):3279-95.
199. Simon D, Yousefi S, Cazzaniga S, Bürgler C, Radonjic S, Houriet C, et al. Mepolizumab failed to affect bullous pemphigoid: A randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 pilot study. *Allergy*. 2020;75(3):669-72.
200. Kuang FL, De Melo MS, Makiya M, Kumar S, Brown T, Wetzler L, et al. Benralizumab Completely Depletes Gastrointestinal Tissue Eosinophils and Improves Symptoms in Eosinophilic Gastrointestinal Disease. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2022;10(6):1598-605.e2.
201. Davis MD, Plager DA, George TJ, Weiss EA, Gleich GJ, Leiferman KM. Interactions of eosinophil granule proteins with skin: limits of detection, persistence, and vasopermeabilization. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(5):988-94.
202. Turato G, Semenzato U, Bazzan E, Biondini D, Tinè M, Torrecilla N, et al. Blood Eosinophilia Neither Reflects Tissue Eosinophils nor Worsens Clinical Outcomes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(9):1216-9.
203. Jindal R, Chugh R, Chauhan P, Shirazi N, Bisht YS. Histopathological Characterization of Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) and

- Comparison with Maculopapular Drug Rash (MPDR). *Indian Dermatol Online J.* 2022;13(1):32-9.
204. Lusica M, Rondon-Berrios H, Feldman L. Urine Eosinophils for Acute Interstitial Nephritis. *J Hosp Med.* 2017;12(5):343-5.
205. de Campos FPF, de Lima PP, Maragno L, Watanabe FT. Hepatic necrosis associated with drug-induced hypersensitivity syndrome. *Autops Case Rep.* 2012;2(4):5-14.
206. Augusto JF, Sayegh J, Simon A, Croue A, Chennebault JM, Cousin M, et al. A case of sulphasalazine-induced DRESS syndrome with delayed acute interstitial nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(9):2940-2.
207. Hagiya H, Iwamuro M, Tanaka T, Hasegawa K, Hanayama Y, Kimura M, et al. Reactivation of Human Herpes Virus-6 in the Renal Tissue of a Patient with Drug-induced Hypersensitivity Syndrome/Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DIHS/DRESS). *Intern Med.* 2016;55(13):1769-74.
208. Ammirati E, Buono A, Moroni F, Gigli L, Power JR, Ciabatti M, et al. State-of-the-Art of Endomyocardial Biopsy on Acute Myocarditis and Chronic Inflammatory Cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep.* 2022;24(5):597-609.
209. Xu L, Yang Y, Wen Y, Jeong JM, Emontzpohl C, Atkins CL, et al. Hepatic recruitment of eosinophils and their protective function during acute liver injury. *J Hepatol.* 2022;77(2):344-52.
210. Xu L, Yang Y, Jiang J, Wen Y, Jeong JM, Emontzpohl C, et al. Eosinophils protect against acetaminophen-induced liver injury through cyclooxygenase-mediated IL-4/IL-13 production. *Hepatology.* 2023;77(2):456-65.
211. Goh YP, Henderson NC, Heredia JE, Red Eagle A, Odegaard JI, Lehwald N, et al. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(24):9914-9.
212. Frigerio S, da Costa V, Costa M, Festari MF, Landeira M, Rodríguez-Zraquia SA, et al. Eosinophils Control Liver Damage by Modulating Immune Responses Against *Fasciola hepatica*. *Front Immunol.* 2020;11:579801.
213. Parsi M, Daniel C. Lamotrigine-induced DRESS Syndrome Manifesting as 'Eosinophilic Colitis': An Uncommon Presentation of a Very Uncommon Condition. *Cureus.* 2020;12(4):e7570.
214. Shah P, Roman J, Meehan S, Femia AN. A case of drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms with colitis as a presenting feature. *JAAD Case Rep.* 2021;12:22-4.
215. Jevtic D, Dumic I, Nordin T, Singh A, Sulovic N, Radovanovic M, et al. Less Known Gastrointestinal Manifestations of Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Syndrome: A Systematic Review of the Literature. *J Clin Med.* 2021;10(18).
216. Ignacio A, Shah K, Bernier-Latmani J, Köller Y, Coakley G, Moyat M, et al. Small intestinal resident eosinophils maintain gut homeostasis following microbial colonization. *Immunity.* 2022;55(7):1250-67.e12.
217. Thein OS, Sutton B, Thickett DR, Parekh D. Mepolizumab rescue therapy for acute pneumonitis secondary to DRESS. *BMJ Case Rep.* 2019;12(10).
218. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(5):709-50.
219. Sriaroon P, Ballow M. Biological Modulators in Eosinophilic Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016;50(2):252-72.
220. Carr TF, Berdnikovs S, Simon HU, Bochner BS, Rosenwasser LJ. Eosinophilic bioactivities in severe asthma. *World Allergy Organ J.* 2016;9:21.
221. Johansson MW. Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(4):482-98.
222. Wong CK, Hu S, Cheung PF, Lam CW. Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43(3):305-15.

223. White JR, Imburgia C, Dul E, Appelbaum E, O'Donnell K, O'Shannessy DJ, et al. Cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine that binds to the CCR3 receptor and activates human eosinophils. *J Leukoc Biol.* 1997;62(5):667-75.
224. Sasidharanpillai S, Chathoth AT, Khader A, Reena Mariyath OK, Riyaz N, Binitha MP, et al. Predictors of disease severity in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2019;85(3):266-75.
225. Manriquez J, Andino-Navarrete R, Cataldo-Cerda K, Downey C, Berroeta D. Progression of drug exanthemas to serious drug eruptions: A retrospective review identifying early determinants. *Australas J Dermatol.* 2016;57(3):e83-7.
226. Toma T, Mizuno K, Okamoto H, Kanegane C, Ohta K, Ikawa Y, et al. Expansion of activated eosinophils in infants with severe atopic dermatitis. *Pediatr Int.* 2005;47(1):32-8.
227. Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology.* 1993;80(2):281-6.
228. Wada T, Matsuda Y, Toma T, Koizumi E, Okamoto H, Yachie A. Increased CD69 Expression on Peripheral Eosinophils from Patients with Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;170(3):201-5.
229. Julius P, Luttmann W, Knoechel B, Kroegel C, Matthys H, Virchow JC, Jr. CD69 surface expression on human lung eosinophils after segmental allergen provocation. *Eur Respir J.* 1999;13(6):1253-9.
230. Patel AJ, Fuentebella J, Gernez Y, Nguyen T, Bass D, Berquist W, et al. Increased HLA-DR expression on tissue eosinophils in eosinophilic esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51(3):290-4.
231. Beninati W, Derdak S, Dixon PF, Grider DJ, Strollo DC, Hensley RE, et al. Pulmonary eosinophils express HLA-DR in chronic eosinophilic pneumonia. *J Allergy Clin Immunol.* 1993;92(3):442-9.
232. Mahmudi-Azer S, Downey GP, Moqbel R. Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release. *Blood.* 2002;99(11):4039-47.
233. Carmo LA, Bonjour K, Ueki S, Neves JS, Liu L, Spencer LA, et al. CD63 is tightly associated with intracellular, secretory events chaperoning piecemeal degranulation and compound exocytosis in human eosinophils. *J Leukoc Biol.* 2016;100(2):391-401.
234. Perez-Lucendo I, Gomez Torrijos E, Donado P, Melero R, Feo-Brito F, Urra JM. Low Expression of ICAM-1 in Blood Eosinophils in Patients With Active Eosinophilic Esophagitis. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2021;31(4):316-21.
235. Heinisch IV, Bizer C, Volgger W, Simon HU. Functional CD137 receptors are expressed by eosinophils from patients with IgE-mediated allergic responses but not by eosinophils from patients with non-IgE-mediated eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(1):21-8.
236. Simon HU. Evidence for a pro-apoptotic function of CD137 in granulocytes. *Swiss Med Wkly.* 2001;131(31-32):455-8.
237. Katoh S. Critical Involvement of CD44 in T Helper Type 2 Cell-Mediated Eosinophilic Airway Inflammation in a Mouse Model of Acute Asthma. *Front Immunol.* 2021;12:811600.
238. Xue L, Liang H, Jiang X. Up-regulation of CD44 expression by interleukin-13 in a murine model of asthma. *Mol Med Rep.* 2011;4(6):1233-7.
239. Sano K, Yamauchi K, Hoshi H, Honma M, Tamura G, Shirato K. CD44 expression on blood eosinophils is a novel marker of bronchial asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;114 Suppl 1:67-71.
240. Katoh S, Uesaka T, Tanaka H, Matsuhara H, Ohashi-Doi K, Oga T. CD44 is critical for the enhancing effect of hyaluronan in allergen-specific sublingual immunotherapy in a murine model of chronic asthma. *Clin Exp Immunol.* 2022;208(2):202-11.
241. Johansson MW, Annis DS, Mosher DF. $\alpha(M)\beta(2)$ integrin-mediated adhesion and motility of IL-5-stimulated eosinophils on periostin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;48(4):503-10.

242. Nagata K, Hirai H, Tanaka K, Ogawa K, Aso T, Sugamura K, et al. CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s). *FEBS Lett.* 1999;459(2):195-9.
243. Arima M, Fukuda T. Prostaglandin D2 receptors DP and CRTH2 in the pathogenesis of asthma. *Curr Mol Med.* 2008;8(5):365-75.
244. Tojima I, Matsumoto K, Kikuoka H, Hara S, Yamamoto S, Shimizu S, et al. Evidence for the induction of Th2 inflammation by group 2 innate lymphoid cells in response to prostaglandin D(2) and cysteinyl leukotrienes in allergic rhinitis. *Allergy.* 2019;74(12):2417-26.
245. Iwasaki M, Nagata K, Takano S, Takahashi K, Ishii N, Ikezawa Z. Association of a new-type prostaglandin D2 receptor CRTH2 with circulating T helper 2 cells in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2002;119(3):609-16.
246. Fujishima H, Fukagawa K, Okada N, Takano Y, Tsubota K, Hirai H, et al. Prostaglandin D2 induces chemotaxis in eosinophils via its receptor CRTH2 and eosinophils may cause severe ocular inflammation in patients with allergic conjunctivitis. *Cornea.* 2005;24(8 Suppl):S66-s70.
247. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, et al. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med.* 2001;193(2):255-61.
248. Yahara H, Satoh T, Miyagishi C, Yokozeki H. Increased expression of CRTH2 on eosinophils in allergic skin diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;24(1):75-6.
249. Hamada K, Yamada Y, Kamada Y, Ueki S, Yamaguchi K, Oyamada H, et al. Prostaglandin D2 and Interleukin-5 Reduce Crth2 Surface Expression on Human Eosinophils. *Allergology International.* 2004;53(2):179-84.
250. Gallant MA, Slipetz D, Hamelin E, Rochdi MD, Talbot S, de Brum-Fernandes AJ, et al. Differential regulation of the signaling and trafficking of the two prostaglandin D2 receptors, prostanoid DP receptor and CRTH2. *Eur J Pharmacol.* 2007;557(2-3):115-23.
251. Gervais FG, Cruz RP, Chateauneuf A, Gale S, Sawyer N, Nantel F, et al. Selective modulation of chemokinesis, degranulation, and apoptosis in eosinophils through the PGD2 receptors CRTH2 and DP. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(6):982-8.
252. Yamamoto Y, Otani S, Hirai H, Nagata K, Aritake K, Urade Y, et al. Dual functions of prostaglandin D2 in murine contact hypersensitivity via DP and CRTH2. *Am J Pathol.* 2011;179(1):302-14.
253. Yamamoto M, Okano M, Fujiwara T, Kariya S, Higaki T, Nagatsuka H, et al. Expression and characterization of PGD2 receptors in chronic rhinosinusitis: modulation of DP and CRTH2 by PGD2. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;148(2):127-36.
254. Chiba T, Ueki S, Ito W, Kato H, Kamada R, Takeda M, et al. The opposing role of two prostaglandin D2 receptors, DP and CRTH2, in human eosinophil migration. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011;106(6):511-7.
255. MacLean Scott E, Solomon LA, Davidson C, Storie J, Palikhe NS, Cameron L. Activation of Th2 cells downregulates CRTh2 through an NFAT1 mediated mechanism. *PLoS One.* 2018;13(7):e0199156.
256. Chen W, He S, Xie X, Yang X, Duan C, Ye P, et al. Over-expression of CRTH2 indicates eosinophilic inflammation and poor prognosis in recurrent nasal polyps. *Front Immunol.* 2022;13:1046426.
257. Bateman ED, O'Brien C, Rugman P, Luke S, Ivanov S, Uddin M. Efficacy and safety of the CRTh2 antagonist AZD1981 as add-on therapy to inhaled corticosteroids and long-acting β (2)-agonists in patients with atopic asthma. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:1093-106.
258. Matucci A, Nencini F, Maggiore G, Chiccoli F, Accinno M, Vivarelli E, et al. High proportion of inflammatory CD62L(low) eosinophils in blood and nasal polyps of severe asthma patients. *Clin Exp Allergy.* 2023;53(1):78-87.

259. Gregory B, Kirchem A, Phipps S, Gevaert P, Pridgeon C, Rankin SM, et al. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. *J Immunol.* 2003;170(11):5359-66.
260. Julius P, Hochheim D, Böser K, Schmidt S, Myrtek D, Bachert C, et al. Interleukin-5 receptors on human lung eosinophils after segmental allergen challenge. *Clin Exp Allergy.* 2004;34(7):1064-70.
261. Kang EG, Narayana PK, Pouliquen IJ, Lopez MC, Ferreira-Cornwell MC, Getsy JA. Efficacy and safety of mepolizumab administered subcutaneously for moderate to severe atopic dermatitis. *Allergy.* 2020;75(4):950-3.
262. Hellman C, Halldén G, Hylander B, Lundahl J. Regulation of the interleukin-5 receptor alpha-subunit on peripheral blood eosinophils from healthy subjects. *Clin Exp Immunol.* 2003;131(1):75-81.
263. Mortuaire G, Gengler I, Vandenhende-Szymanski C, Delbeke M, Gatault S, Chevalier D, et al. Immune profile modulation of blood and mucosal eosinophils in nasal polyposis with concomitant asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2015;114(4):299-307.e2.
264. Dupuch V, Tridon A, Ughetto S, Walrand S, Bonnet B, Dubray C, et al. Activation state of circulating eosinophils in nasal polyposis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2018;8(5):584-91.
265. Maverakis E, Ji-Xu A, Brügger MC. Targeting interleukin-5 with benralizumab: A novel treatment for drug rash with eosinophilia and systemic symptoms. *Allergy.* 2022;77(8):2287-9.
266. Kampen GT, Stafford S, Adachi T, Jinquan T, Quan S, Grant JA, et al. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood.* 2000;95(6):1911-7.
267. Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Fujisawa T, Kawasaki H, Ohta K, et al. Regulation of chemokine receptor expression in eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;125 Suppl 1:29-32.
268. Fujisawa T, Kato Y, Nagase H, Atsuta J, Terada A, Iguchi K, et al. Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(3):507-13.
269. Jiang Y, Pan Q, Zhu X, Liu J, Liu Z, Deng Y, et al. Knockdown of CCR3 gene inhibits Proliferation, migration and degranulation of eosinophils in mice by downregulating the PI3K/Akt pathway. *Int Immunopharmacol.* 2022;113(Pt B):109439.
270. Gauvreau GM, FitzGerald JM, Boulet LP, Watson RM, Hui L, Villeneuve H, et al. The effects of a CCR3 inhibitor, AXP1275, on allergen-induced airway responses in adults with mild-to-moderate atopic asthma. *Clin Exp Allergy.* 2018;48(4):445-51.
271. Johnsson M, Bove M, Bergquist H, Olsson M, Fornwall S, Hassel K, et al. Distinctive blood eosinophilic phenotypes and cytokine patterns in eosinophilic esophagitis, inflammatory bowel disease and airway allergy. *J Innate Immun.* 2011;3(6):594-604.
272. Bhattacharya B, Carlsten J, Sabo E, Kethu S, Meitner P, Tavares R, et al. Increased expression of eotaxin-3 distinguishes between eosinophilic esophagitis and gastroesophageal reflux disease. *Hum Pathol.* 2007;38(12):1744-53.
273. Zimmermann N, Conkright JJ, Rothenberg ME. CC chemokine receptor-3 undergoes prolonged ligand-induced internalization. *J Biol Chem.* 1999;274(18):12611-8.
274. Zimmermann N, Rothenberg ME. Receptor internalization is required for eotaxin-induced responses in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(1):97-105.
275. Dulkys Y, Kluthe C, Buschermöhle T, Barg I, Knöss S, Kapp A, et al. IL-3 induces down-regulation of CCR3 protein and mRNA in human eosinophils. *J Immunol.* 2001;167(6):3443-53.
276. Venet F, Lepape A, Debard AL, Bienvenu J, Bohé J, Monneret G. The Th2 response as monitored by CRTH2 or CCR3 expression is severely decreased during septic shock. *Clin Immunol.* 2004;113(3):278-84.

277. Bochner BS. Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(5 Suppl):S292-302.
278. Han ST, Mosher DF. IL-5 induces suspended eosinophils to undergo unique global reorganization associated with priming. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(3):654-64.
279. Flores-Torres AS, Salinas-Carmona MC, Salinas E, Rosas-Taraco AG. Eosinophils and Respiratory Viruses. *Viral Immunol*. 2019;32(5):198-207.
280. Phipps S, Lam CE, Mahalingam S, Newhouse M, Ramirez R, Rosenberg HF, et al. Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus. *Blood*. 2007;110(5):1578-86.
281. Kridin K, Brügger MC, Walsh S, Bensaïd B, Ranki A, Oppel E, et al. Management and treatment outcome of DRESS patients in Europe: An international multicentre retrospective study of 141 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2022.
282. Dharanisankar S, Chandrashekar L, Selvarajan S, Rajappa M, Ramassamy S. In-vitro detection of suspected drug in maculopapular drug reaction to antibiotics using secreted cytokines from drug-specific activated T cells. *Clin Exp Dermatol*. 2023.
283. Maggi L, Mazzone A, Capone M, Liotta F, Annunziato F, Cosmi L. The dual function of ILC2: From host protection to pathogenic players in type 2 asthma. *Mol Aspects Med*. 2021;80:100981.
284. Leyva-Castillo JM, Galand C, Mashiko S, Bissonnette R, McGurk A, Ziegler SF, et al. ILC2 activation by keratinocyte-derived IL-25 drives IL-13 production at sites of allergic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(6):1606-14.e4.
285. Xue L, Salimi M, Panse I, Mjösberg JM, McKenzie AN, Spits H, et al. Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(4):1184-94.
286. Oyesola OO, Duque C, Huang LC, Larson EM, Früh SP, Webb LM, et al. The Prostaglandin D(2) Receptor CRTH2 Promotes IL-33-Induced ILC2 Accumulation in the Lung. *J Immunol*. 2020;204(4):1001-11.
287. Wojno ED, Monticelli LA, Tran SV, Alenghat T, Osborne LC, Thome JJ, et al. The prostaglandin D₂ receptor CRTH2 regulates accumulation of group 2 innate lymphoid cells in the inflamed lung. *Mucosal Immunol*. 2015;8(6):1313-23.
288. Huang Z, Nayak JV, Sun Y, Huang Q, Zhou B. Peripheral blood T-helper cells and eosinophil populations in patients with atopic and nonatopic chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2017;31(1):8-12.
289. Fernandez TD, Mayorga C, Torres MJ, Cornejo-Garcia JA, López S, Chaves P, et al. Cytokine and chemokine expression in the skin from patients with maculopapular exanthema to drugs. *Allergy*. 2008;63(6):712-9.
290. Uno H, Kabashima K, Tohyama M, Watanabe T, Hashimoto K, Iijima M, et al. TNF- α as a useful predictor of human herpesvirus-6 reactivation and indicator of the disease process in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). *J Dermatol Sci*. 2014;74(2):177-9.
291. Fujiyama T, Kawakami C, Sugita K, Kubo-Kabashima R, Sawada Y, Hino R, et al. Increased frequencies of Th17 cells in drug eruptions. *J Dermatol Sci*. 2014;73(1):85-8.
292. Komatsu-Fujii T, Chinuki Y, Niihara H, Hayashida K, Ohta M, Okazaki R, et al. The thymus and activation-regulated chemokine (TARC) level in serum at an early stage of a drug eruption is a prognostic biomarker of severity of systemic inflammation. *Allergol Int*. 2018;67(1):90-5.
293. Dai X, Muto J, Shiraishi K, Utsunomiya R, Mori H, Murakami M, et al. TSLP Impairs Epidermal Barrier Integrity by Stimulating the Formation of Nuclear IL-33/Phosphorylated STAT3 Complex in Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2022;142(8):2100-8.e5.
294. Hasegawa T, Oka T, Demehri S. Alarmin Cytokines as Central Regulators of Cutaneous Immunity. *Front Immunol*. 2022;13:876515.
295. Catherine J, Roufousse F. What does elevated TARC/CCL17 expression tell us about eosinophilic disorders? *Semin Immunopathol*. 2021;43(3):439-58.

296. Liu LY, Jarjour NN, Busse WW, Kelly EA. Chemokine receptor expression on human eosinophils from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid after segmental antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(3):556-62.
297. Kim D, Kobayashi T, Voisin B, Jo JH, Sakamoto K, Jin SP, et al. Targeted therapy guided by single-cell transcriptomic analysis in drug-induced hypersensitivity syndrome: a case report. *Nat Med.* 2020;26(2):236-43.
298. Damsky WE, Vesely MD, Lee AI, Choi J, Meyer AC, Chen M, et al. Drug-induced hypersensitivity syndrome with myocardial involvement treated with tofacitinib. *JAAD Case Rep.* 2019;5(12):1018-26.
299. Kim S, Joo EJ, Kim UJ, Kim JH, Kim B, Lee HJ, et al. Corticosteroid-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms successfully treated with a tumor necrosis factor alpha inhibitor. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2022;40(4):418-21.
300. Qadri I, Zeng X, Guo R, Koratala A. Acute interstitial nephritis and DRESS syndrome without eosinophilia associated with cefepime. *BMJ Case Rep.* 2017;2017.
301. Chen YC, Chiu HC, Chu CY. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms: a retrospective study of 60 cases. *Arch Dermatol.* 2010;146(12):1373-9.

