

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
UMRS 1255 BIOLOGIE ET PHARMACOLOGIE DES PLAQUETTES SANGUINES :
Hémostase - Thrombose - Transfusion

THÈSE

présentée par

Charles-Ambroise TACQUARD

soutenue le : 17 décembre 2021

pour obtenir le grade de **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Science de la vie et de la santé

Étude du rôle des plaquettes sanguines dans l'anaphylaxie

THÈSE dirigée par :

M. GACHET Christian

M. MERTES Paul Michel

Docteur, UMRS 1255 – EFS Grand Est

Professeur, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme GAUSSEM Pascale

Mme TANNO Luciana

Professeure, Hôpital Européen George Pompidou

Docteure, CHU de Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme KORGANOW Anne-sophie

M. EBO Didier

Professeure, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Professeur, Université d'Anvers

« Connaître son ignorance est la meilleure part de la connaissance. »
Proverbe chinois

REMERCIEMENTS

Au **Dr Christian Gachet**, merci beaucoup de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et d'avoir accepté de diriger ma thèse. Merci pour votre accompagnement tout au long de ces années et de m'avoir appris la rigueur du travail scientifique. Ces leçons m'accompagneront tout au long de ma carrière.

Au **Pr Paul Michel Mertes**, merci pour votre accompagnement depuis le début de mon internat et de m'avoir initié à la recherche, qu'elle soit clinique ou expérimentale. Je vous remercie chaleureusement pour votre accompagnement au quotidien et votre soutien sans faille dans l'accomplissement de ma carrière. Merci aussi pour votre confiance en mes capacités à aller toujours plus loin.

À la **Pr Anne-Sophie Korganov**, la **Pr Pascale Gaussem**, la **Dr Luciana Tanno** et au **Pr Didier Ebo**, merci beaucoup d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. J'espère qu'il sera à la hauteur de vos attentes et qu'il permettra d'initier une discussion riche autour d'un sujet passionnant.

A **Béatrice**, merci pour ton accompagnement au quotidien, dans chaque étape de ce travail de thèse. Tu as largement contribué à façonner mes connaissances sur les plaquettes sanguines. Il y a encore beaucoup de choses à comprendre et à explorer sur le sujet de l'anaphylaxie et nous aurons l'occasion de poursuivre ce travail ensemble.

A **toute l'équipe de l'UMRS 1255**, et en particulier Blandine, Catherine S, Catherine B, Clarisse, Emily, Florian, Julien, Laurie, Léa, Nathalie, Patricia, Pierre, Stéphanie, Véronique, merci pour votre aide et votre soutien au quotidien dans mes différents projets, malgré mon emploi du temps parfois chaotique !

A **Olivier**, merci pour ton soutien depuis de nombreuses années, pour ta disponibilité de chaque instant et pour savoir me rassurer sur l'avenir de notre métier quand il le faut.

A toute l'équipe de **recherche sur le choc anaphylactique**, Charlotte, Cécile, Marie, Xavier et Walid, pour partager avec moi ce sujet de recherche passionnant même s'il faut bien admettre qu'il reste encore beaucoup de chose à découvrir.

A **l'équipe de l'EA3072**, en particulier Anne-Laure, Isabelle et Fabienne pour leur aide et leurs bons conseils.

A **toute l'équipe du service d'anesthésie-réanimation du NHC**, et en particulier mes collègues de réanimation chirurgicale polyvalente, pour leur soutien, leur compréhension et leur aide dans mes différents projets.

A **l'équipe d'allergologie du NHC**, en particulier Carine, Lydie et Rodolphe pour leur aide au quotidien sur le sujet complexe qu'est l'allergologie. Merci aussi à tous les **membres du GERAP**, et en particulier Anca Chiriac, Pascal Demoly et Jean-Marc Malinovsky pour leur aide dans les nombreux projets que nous avons en commun.

A **tous mes amis**, Sophie H et Alexis, Jean-Pierre et Hélène, Lucas et Anne-So, Thibaut et Johanna, Marion, Seb et Sophie F, Honoré et Julia, François, Jean, Alex G, Alex M, Gilles et Aurore, Arnaud et Émeline. Merci d'être là pour moi et de me rappeler qu'il n'y a pas que le boulot dans la vie. J'en ai parfois besoin...

A **Lina**, pour ton écoute, tes conseils et ton soutien dans des moments où j'en avais vraiment besoin.

A **Céline**, pour ton soutien sans faille ces dernières semaines alors que tu t'apprêtes, toi aussi, à vivre une aventure incroyable.

A **Lolo & JB**, parce que, même si vous vivez à l'autre bout de la planète, nous ne sommes jamais très loin les uns des autres et que la distance n'arrête pas une amitié solide.

A **Paul-Henri**, pour ton soutien, ton amitié et parce que c'est précieux d'avoir quelqu'un à qui on peut tout dire.

A **Anne-Julie**, parce que, malgré ces derniers mois, nous avons partagé tant de choses que rien ne pourra jamais effacer nos années ensemble. Tu m'as porté plus loin que je ne l'aurais jamais imaginé et tu m'as poussé à devenir celui que je suis aujourd'hui.

A **Maman, Papa, Rachel et Jean-Marc, Jean-Alphonse et Aurélie**, vous m'avez accompagné, soutenu et réconforté dans chaque étape de ma vie. Je ne serais pas arrivé là sans vous. J'ai hâte de continuer à partager chaque étape de ma vie avec vous.

A **Léa, Raphaël et Thomas** pour votre énergie débordante !

RÉSUMÉS

Le choc anaphylactique est l'expression la plus sévère des réactions d'hypersensibilité immédiate. Les mécanismes conduisant à ces réactions sont encore mal compris et pourraient impliquer les plaquettes, notamment dans les formes les plus sévères.

Nos résultats indiquent que, bien que les plaquettes ne soient pas un effecteur primaire au cours des réactions anaphylactiques médiées par les IgE, elles contribuent de manière significative à moduler la sévérité de la réaction dans différents modèles expérimentaux d'anaphylaxie, avec une réponse différente selon le mécanisme à l'origine de la réaction. Les mécanismes responsables de cet effet ne sont pour l'heure pas identifiés. Le ciblage du récepteur du Platelet Activating Factor semble être intéressant d'un point de vue thérapeutique. Une meilleure caractérisation des modèles utilisés et des mécanismes responsables des réactions chez l'Homme devrait permettre de mieux comprendre la contribution des plaquettes à la sévérité du choc anaphylactique.

Mots clés: Anaphylaxie, Plaquettes, Neutrophiles, FcεRI, Platelet Activating Factor

Anaphylactic shock is the most severe expression of immediate hypersensitivity reactions. The mechanisms leading to these reactions are still poorly understood and may involve platelets, especially in the most severe forms.

Our results indicate that, although platelets are not a primary effector during IgE-mediated anaphylactic reactions, they contribute significantly to modulate the severity of the reaction in different experimental models of anaphylaxis, with a different response depending on the mechanism of the reaction. The mechanisms responsible for this effect are not yet identified. Targeting the Platelet Activating Factor receptor seems to be interesting from a therapeutic point of view. A better characterization of the models used and the mechanisms responsible for the reactions in humans should allow a better understanding of the contribution of platelets to the severity of anaphylactic shock.

Key words: Anaphylaxis, Platelets, Neutrophils, FcεRI, Platelet Activating Factor

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	3
RÉSUMÉS.....	6
TABLE DES MATIÈRES.....	7
LISTE DES TABLEAUX.....	10
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	11
1. Introduction	12
2. Définition de l’anaphylaxie	12
3. Mécanismes à l’origine des réactions anaphylactiques.....	13
3.1. Réactions d’hypersensibilité immédiate médiées par les IgE	13
3.2. Réactions d’hypersensibilité immédiate médiées par les IgG.....	14
3.3. Réactions d’histaminolibération non-spécifique	15
3.4. Activation de la phase contact.....	15
3.5. Activation mastocytaire directe via le récepteur MRGPRX2.....	16
3.6. Médiateurs de l’anaphylaxie.....	16
4. Quelles sont les lacunes dans notre connaissance de l’anaphylaxie en 2021 ?.....	17
4.1. Mécanisme d’initiation de la réaction	17
4.2. Mécanisme à l’origine de la sévérité de la réaction.....	19
4.3. Moyens thérapeutiques en cas d’anaphylaxie réfractaire à l’adrénaline.....	20
5. Arguments pour une implication des plaquettes dans l’anaphylaxie	20
5.1. Plaquettes et modèles d’anaphylaxie active.....	20
5.2. Plaquettes et modèles d’anaphylaxie médiée par les IgG	21
5.3. Rôle potentiel des plaquettes dans l’amplification de la réaction.....	22
5.4. Questionnement autour du rôle des plaquettes dans l’anaphylaxie en 2021	23
6. L’anaphylaxie en pratique clinique	25
6.1. Épidémiologie de l’anaphylaxie	25

6.1.1.	Dans la population générale	25
6.1.2.	Anaphylaxie en contexte particulier : la période périopératoire	26
6.1.3.	Réactions anaphylactiques sévères et mortelles	27
6.2.	Formes cliniques de l'anaphylaxie	28
6.3.	Traitement de la réaction	30
6.3.1.	Arrêt de l'exposition à l'allergène	30
6.3.2.	Administration d'adrénaline	30
6.3.3.	Remplissage vasculaire	31
6.3.4.	Autres thérapeutiques	32
6.4.	Démarche diagnostique	33
7.	Objectifs du travail de thèse	34
PARTIE II : RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX		35
1.	Les plaquettes humaines n'expriment pas de récepteur FcεRI fonctionnel à leur surface	36
1.1.	Introduction	37
1.2.	Human platelets do not express a functional FcεRI receptor	39
1.3.	Conclusion.....	52
2.	Article n°2 : Rôle différentiel des plaquettes et des polynucléaires neutrophiles selon le mécanisme à l'origine de la réaction anaphylactique.....	53
2.1.	Introduction	54
2.2.	A differential role of platelets and neutrophils depending on the initiating mechanism of anaphylaxis.....	56
2.3.	Conclusion.....	80
3.	Article n°3 : Le traitement par un antagoniste du récepteur au Platelet Activating Factor permet une amélioration hémodynamique et diminue les besoins en adrénaline. 82	
3.1.	Introduction	83

3.2. Treatment with a platelet-activating factor receptor antagonist improves hemodynamics and reduces epinephrine requirements, in a lethal rodent model of anaphylactic shock.....	85
3.3. Conclusion.....	93
PARTIE III : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	94
1. Discussion générale	95
2. Perspectives	101
CONCLUSION.....	103
PARTIE IV : RÉFÉRENCES	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Signes cliniques associés à une réaction anaphylactique.....29

Tableau 2 : Récepteurs impliqués dans l’anaphylaxie et présents sur les plaquettes selon l’espèce considérée.....55

PARTIE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Introduction

L'anaphylaxie est un évènement rare mais dont l'incidence est en constante augmentation dans la population générale. L'anaphylaxie peut prendre plusieurs formes, allant d'une simple éruption cutanée à un état de choc anaphylactique, voire à l'apparition inaugurale d'un arrêt cardio-respiratoire. La prise en charge de ces réactions est empirique et repose principalement sur l'utilisation de traitements symptomatiques, dont l'adrénaline. Certaines formes d'anaphylaxie sont réfractaires à ces traitements, avec pour conséquence une morbidité et une mortalité significative, notamment dans des situations à haut risque comme la période périopératoire.

De nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer ces réactions anaphylactiques, souvent sur la base d'études *in vitro* et/ou sur des modèles animaux, avec un recours de plus en plus fréquent à des modèles de souris transgéniques. Le mécanisme allergique, impliquant la production d'IgE spécifiques contre un antigène et l'activation synchrone des mastocytes et des basophiles lors de la réexposition à cet antigène, est le plus largement décrit mais ne permet pas d'expliquer toutes les situations vues en pratique clinique. D'autres mécanismes impliquant une production d'IgG spécifiques ou une activation directe des mastocytes par un antigène ont été évoqués mais la validation de ces mécanismes chez l'Homme fait encore défaut, notamment en raison de l'absence d'outils diagnostics valides permettant de les identifier. La physiopathologie des formes réfractaires à l'adrénaline n'est pour l'heure pas connue mais pourrait comporter des boucles d'amplifications de la réaction, impliquant notamment les plaquettes sanguines.

Ainsi les plaquettes pourraient avoir un rôle pivot en contribuant à l'amplification de ces réactions lorsqu'elles s'activent et libèrent leur contenu granulaire. L'activation des plaquettes pourrait être à l'origine de l'apparition de formes réfractaires aux traitements utilisés actuellement. L'identification et la caractérisation du rôle des plaquettes dans l'anaphylaxie pourrait ouvrir de nouvelles perspectives diagnostiques et thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge des patients.

2. Définition de l'anaphylaxie

L'anaphylaxie est définie par l'académie européenne de l'allergie et de l'immunologie clinique (European Academy of Allergy and Clinical Immunology - EAACI) comme une réaction d'hypersensibilité immédiate systémique et sévère, mettant potentiellement en jeu le

pronostic vital¹. Il s'agit d'une définition clinique ne prenant pas en compte le mécanisme de la réaction, elle englobe donc les réactions d'origine immunologique et celles d'origine non-immunologique.

3. Mécanismes à l'origine des réactions anaphylactiques

Plusieurs mécanismes peuvent être responsables d'une réaction anaphylactique, certains ayant une cause immunologique (réaction médiée par les IgE ou les IgG), d'autres une cause non-immunologique (histaminolibération non-spécifique, activation de la phase contact, activation mastocytaire directe, activation du système kinine-kallicréine)². Ces mécanismes ne sont pas différenciables cliniquement et un bilan allergologique est nécessaire pour tenter d'identifier les causes de la réaction. Malgré un bilan parfois étendu, il n'est pas toujours possible d'identifier le mécanisme en cause, et de fait, la substance impliquée dans la réaction. C'est particulièrement vrai dans l'allergie médicamenteuse, et notamment au cours de la période périopératoire où la substance à l'origine de la réaction n'est pas identifiée dans près de 40% des cas³. L'impact clinique est important car rendant un conseil sûr pour les anesthésies futures, exposant ainsi le patient à un risque de récurrence de la réaction. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ces réactions à bilan négatif. L'hypothèse d'un mécanisme médié par les IgG, expliquant alors l'absence d'IgE spécifiques, ou celle d'une activation des mastocytes par le biais d'une interaction directe entre un médicament et le récepteur MRGPRX2 (Mas-related G-protein-coupled receptor X2) ont été proposées sur la base de données expérimentales mais les données cliniques font cruellement défaut à l'heure actuelle pour valider ces hypothèses⁴.

3.1. Réactions d'hypersensibilité immédiate médiées par les IgE

Ce type de réaction, aussi appelé « réaction allergique », est le plus connu et le plus largement décrit. Il s'agit de la réaction d'hypersensibilité immédiate de type I décrite par Gell & Coombs^{5, 6}. Ces réactions se décomposent en deux phases distinctes :

- Une phase de sensibilisation suite à un contact préparant : l'allergène est capturé et internalisé par des cellules présentatrices d'antigène puis présenté à des lymphocytes T naïfs via le complexe majeur d'histocompatibilité de type II⁷. Les lymphocytes T vont en réponse activer des lymphocytes B qui, une fois devenus plasmocytes, vont produire des anticorps de type IgE, spécifiquement dirigés contre l'allergène. Ces

anticorps vont venir se fixer sur leur récepteur à haute affinité FcεRI, présent à la surface des mastocytes et des basophiles. Cette phase de sensibilisation dure entre 10 et 15 jours et est totalement silencieuse.

- Contact déclenchant : lorsque le patient est à nouveau exposé à l'antigène, celui-ci va venir se fixer sur les IgE présentes à la surface des basophiles et des mastocytes, entraînant une dimérisation des récepteurs FcεRI et une transduction du signal. Il en résulte une libération massive et synchrone de médiateurs préformés, présents dans les granules des mastocytes et des basophiles, ainsi qu'une synthèse et une libération de nouveaux médiateurs.

Bien qu'ayant un rôle bien identifié dans l'asthme, les polynucléaires éosinophiles n'ont pas de rôle clairement identifié dans l'anaphylaxie.⁸

3.2. Réactions d'hypersensibilité immédiate médiées par les IgG

Ce mécanisme a été évoqué il y a de nombreuses années pour expliquer des réactions liées à certains médicaments comme les dextrans et l'aprotinine^{9, 10}, puis de nouveau étudié depuis quelques années afin de tenter d'expliquer certaines réactions pour lesquelles le bilan allergologique classique ne permettait pas d'identifier la substance en cause.

Ce mécanisme implique la production d'immunoglobulines de type G (IgG) dirigées contre l'antigène. Ces IgG solubles vont reconnaître l'antigène, former des complexes immuns et interagir avec le récepteur FcγRIIA/CD32A⁴. Ce récepteur est présent à la surface de nombreuses cellules, notamment les neutrophiles, les basophiles et les plaquettes. Ces éléments cellulaires seraient les principaux effecteurs des réactions médiées par les IgG avec une sécrétion particulièrement importante de myéloperoxydase (MPO) par les neutrophiles ainsi que du Platelet Activating Factor (PAF) et de la sérotonine par les neutrophiles et les plaquettes¹¹⁻¹³. Ces médiateurs sont à leur tour responsables de la symptomatologie observée.

Ce mécanisme a été largement décrit sur la base de modèles expérimentaux de souris transgéniques humanisées pour le récepteur FcγRIIA. Cependant, l'implication de cette voie en clinique humaine reste à démontrer. En effet, de nombreux patients indemnes de toute réaction clinique lors de l'exposition à un antigène ont des IgG dirigées contre cet antigène¹⁴.

De plus, les situations cliniques ayant le plus d'argument pour une activation de la voie IgG étaient celles où la probabilité d'avoir une activation de la voie IgE était également la plus forte¹⁴. Les outils permettant de différencier ces voies font cruellement défaut et il s'agit toujours d'un sujet en cours d'investigation.

3.3. Réactions d'histaminolibération non-spécifique

Ces réactions sont liées à la libération d'histamine par les basophiles sanguins suite à un contact direct avec un produit. Il n'y a pas de phase de sensibilisation et la présence d'anticorps spécifiques n'est pas nécessaire. Ce type de réaction survient en général lors d'une exposition à des médicaments basiques, chargés positivement, qui vont induire une libération d'histamine par interaction directe au niveau de la membrane des basophiles^{15, 16}. Ces réactions ne peuvent pas être distinguées cliniquement des autres types de réactions anaphylactiques même si elles sont volontiers moins sévères.

Parmi les médicaments fréquemment impliqués, on trouve les curares de type benzyloquinolines (atracurium, mivacurium), la morphine ou la vancomycine^{17, 18}. Ce type de réaction est favorisée par un terrain atopique, une vitesse d'injection élevée ou l'utilisation d'une substance hyperosmolaire.

3.4. Activation de la phase contact

Ce mécanisme a été décrit suite à une épidémie de réactions anaphylactiques après exposition à de l'héparine sodique contaminée par de la chondroïtine hypersulfatée^{19, 20}. Il en résultait une activation de la phase contact, mais aussi du complément et du système kinine-kallicréine entraînant une production importante de bradykinine et une augmentation très importante de la perméabilité vasculaire²¹.

L'activation de la phase contact a également été rapportée comme un mécanisme secondaire à l'activation mastocytaire (par voie directe ou via le récepteur FcεRI) à l'origine d'une libération de polyphosphates et d'héparine contenus dans les granules du mastocyte. Ces médiateurs entraînent une auto-activation du facteur XII (FXII) puis, par cascade, une formation de bradykinine^{22, 23}. Ce mécanisme serait, en outre, responsable de l'augmentation de la perméabilité vasculaire observée au cours de l'anaphylaxie.

3.5. Activation mastocytaire directe via le récepteur MRGPRX2

Le Mas-related G-protein coupled receptor X2 (MRGPRX2) est un récepteur présent au niveau de la surface membranaire des mastocytes. Il serait également présent à la surface des basophiles et les éosinophiles²⁴. Ce récepteur, décrit pour la première fois par McNeil et col. en 2015, peut entraîner une libération du contenu granulaire mastocytaire sans implication des anticorps de type IgE²⁵. Ce récepteur est principalement activé par des molécules cationiques, dont certaines sont utilisées en pratique clinique, notamment en anesthésie (atracurium, mivacurium, fluoroquinolones)^{26, 27}.

Il s'agit de travaux expérimentaux et il n'y a pour l'heure pas de preuve de son implication en clinique humaine. Les outils pour diagnostiquer ce type de réaction en routine sont inexistantes. De plus, les mastocytes de personnes saines sont capables de s'activer *in vitro*, via le récepteur MRGPRX2, en réponse à l'exposition à certains médicaments alors même que le patient ne présente pas de symptômes lors de l'exposition à ces médicaments. Cela pose la question de la réalité clinique de ce mécanisme. La dégranulation mastocytaire ne serait d'ailleurs que partielle lorsque le mastocyte est stimulé via le MRGPRX2 et de cinétique beaucoup plus lente²⁸.

3.6. Médiateurs de l'anaphylaxie

De nombreux médiateurs vont être libérés au cours de l'anaphylaxie, que ce soient des médiateurs préformés stockés dans les granules des mastocytes ou des basophiles et des médiateurs néo-synthétisés au moment de la réaction.

L'histamine est un médiateur important au cours de l'anaphylaxie²⁹. Libérée par les mastocytes et les basophiles, elle va interagir avec ses récepteurs (de H₁ à H₄) présents sur de nombreux types cellulaires, expliquant son effet pléiotrope. En agissant sur les cellules musculaires lisses vasculaires, l'histamine induit une vasodilatation et donc une hypotension artérielle. L'histamine exerce un effet inverse sur les cellules musculaires lisses bronchiques en induisant une bronchoconstriction. Elle contribue également à une augmentation de la perméabilité vasculaire en interagissant avec l'endothélium. Enfin, l'histamine a un effet au niveau cardiaque, entraînant des modifications de l'inotropisme, de la conduction cardiaque et du flux sanguin coronaire³⁰.

D'autres médiateurs sont également stockés dans les granules des mastocytes, comme des chymases, en particulier la tryptase, des carboxypeptidases et de l'héparine².

Certains médiateurs sont produits au moment de la réaction, notamment les médiateurs lipidiques :

- Activation de la cyclo-oxygénase^{31, 32}: production de prostaglandines D2 par les mastocytes et de thromboxane A2 par les plaquettes à l'origine d'une modification de la contractilité des muscles lisses vasculaires et utérins, d'une augmentation de l'agrégation plaquettaire et d'une augmentation de la perméabilité vasculaire. Ces médiateurs contribuent également au prurit décrit dans certaines réactions.
- Activation de la 5-lipo-oxygénase³³ : production de leucotriènes LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄ responsables d'une bronchoconstriction, d'une vasoconstriction coronaire et d'un effet inotrope négatif.
- Production de PAF : la distribution des récepteurs au PAF est large et implique de nombreux éléments cellulaires³⁴. Le PAF est responsable d'une vasodilatation, d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, d'une agrégation plaquettaire mais est aussi capable d'activer les mastocytes, notamment au niveau pulmonaire^{35, 36}. La concentration circulante en PAF est d'autant plus élevée que la réaction est sévère ce qui en fait une cible thérapeutique particulièrement intéressante^{37, 38}.

Comme vu précédemment, la réaction anaphylactique s'accompagne d'une génération importante de bradykinine par activation de la phase contact via une auto-activation du facteur XII. D'autres médiateurs sont encore impliqués comme le monoxyde d'azote (NO) produit en grande quantité, notamment par la NO-synthase endothéliale^{39, 40}. Le NO est un puissant vasodilatateur et contribue à l'hypotension artérielle observée au cours du choc anaphylactique. La sérotonine pourrait également jouer un rôle dans ces réactions (cf ci-dessous).

4. Quelles sont les lacunes dans notre connaissance de l'anaphylaxie en 2021 ?

4.1. Mécanisme d'initiation de la réaction

De nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer les réactions anaphylactiques, souvent sur la base d'études *in vitro* et/ou sur des modèles animaux, avec un recours de plus en plus fréquent à des modèles de souris transgéniques. Si ces études permettent d'ouvrir le champ des possibilités en clinique humaine, la validation de ces mécanismes chez l'Homme fait encore défaut, notamment en raison de l'absence d'outils diagnostics valides permettant de les identifier.

Le mécanisme IgE-médié est bien étayé par des données expérimentales et cliniques et peut être clairement identifié chez de nombreux patients, notamment dans les situations d'allergie à une protéine, comme les allergies alimentaires ou les allergies aux venins d'hyménoptères. La situation est beaucoup moins claire concernant les allergies médicamenteuses. En effet, dans 40 à 50% des réactions d'hypersensibilité immédiate à un médicament, le mécanisme et la substance responsable ne peuvent être formellement identifiés en raison de données négatives ou discordantes. Certaines réactions, parfois sévères, ne sont pas associées à une hausse de la concentration circulante en marqueurs d'activation mastocytaire (tryptase, histamine), soulevant la question d'une activation d'autres éléments cellulaires par des voies différentes⁴¹.

Le mécanisme même de sensibilisation et de déclenchement de la réaction en cas d'allergie médicamenteuse est remis en cause, notamment en raison de la taille de ces molécules, trop petites pour induire à elles seules une sensibilisation. La formation de complexe médicament-protéine plasmatique (haptène) a été proposée mais la formation de ce complexe prend du temps et ne concorde pas avec la cinétique de déclenchement de la réaction. D'autres hypothèses comme la formation de liaisons non-covalentes avec ces protéines (par les forces de van der Waals notamment) pour expliquer la cinétique de déclenchement de la réaction ou l'interaction directe avec certains récepteurs (P-I concept - pharmacological interaction with immune receptor) pour expliquer la sensibilisation aux médicaments ont également été proposées⁴². Les données permettant de valider ces hypothèses sont pour l'instant insuffisantes.

Les outils diagnostiques pour explorer les réactions d'hypersensibilité immédiate médicamenteuses ne permettent pas actuellement d'apporter une réponse fiable. Le dosage des IgE spécifiques constitue une aide en cas de tests cutanés non contributifs mais il manque de sensibilité et de spécificité, notamment pour les antibiotiques et les curares. Une des difficultés vient du fait que les IgE « actives » sont celles fixées sur leur récepteur à haute affinité FcεRI et non pas les IgE circulantes, qui pourraient au contraire, neutraliser l'antigène en formant des complexes immuns captés par le récepteur FcεRII/CD23^{43, 44}.

Il en est de même pour le test d'activation des basophiles qui, bien que sa performance diagnostique semble meilleure, manque encore de fiabilité et de reproductibilité entre les laboratoires. Le test d'activation mastocytaire, décrit récemment, semble plus prometteur mais est compliqué par la nécessité de récolter des progéniteurs mastocytaires CD34+ dans le

sang, d'induire leur différenciation *in vitro* et de les garder en culture⁴⁵. Cette procédure est longue et coûteuse et risque de limiter sa diffusion en pratique clinique. De plus, ces techniques d'activation cellulaire ne prennent pas en compte la complexité des interactions cellulaires *in vivo* et occultent la possible coopération de différents éléments cellulaires, nécessaire au déclenchement de la réaction. Ces techniques ne considèrent pas non plus les différences phénotypiques des mastocytes dans l'organisme, les mastocytes cutanés semblant se comporter différemment des mastocytes pulmonaires³⁶, ce qui pourrait expliquer l'absence de réaction cutanée lors du bilan de réaction authentiquement liée à une activation mastocytaire.

4.2. Mécanisme à l'origine de la sévérité de la réaction

Les mécanismes conduisant, pour une même dose d'antigène, à des réactions de sévérité différente ne sont pas clairement identifiés.

La variation de la densité en IgE spécifiques fixés à leur récepteur FcεRI à la surface des mastocytes et des basophiles pourrait contribuer à faire varier la sévérité de la réaction mais cela est difficile à évaluer car ce n'est pas forcément corrélé à la concentration en IgE spécifiques circulantes.

La variation de la concentration relative en IgE et IgG spécifiques d'un antigène pourrait également jouer un rôle : une concentration élevée en IgE et faible en IgG orienterait la réaction vers une voie IgE, une concentration élevée en IgG avec une forte concentration d'antigène orienterait vers une voie IgG et un équilibre entre les deux conduirait à une neutralisation mutuelle de la réaction⁴⁶. Ce concept est pour l'heure encore mal validé.

La coexistence d'autres conditions (comme une infection latente par exemple) pourrait également être nécessaire à la réaction, ou venir l'aggraver, et contribuer ainsi à la variation phénotypique de l'anaphylaxie (hypothèse du « double hit »)⁴⁷.

L'évolution vers un état de choc réfractaire au traitement par adrénaline est encore mal comprise et pourrait être liée à l'activation secondaire d'autres éléments cellulaires comme les neutrophiles et les plaquettes. Ces cellules pourraient s'activer de manière directe ou indirecte dans les formes les plus sévères d'anaphylaxie et contribuer à la gravité des symptômes observés en libérant leur contenu granulaire, riche en MPO (neutrophiles) et sérotonine (plaquettes), produire du PAF (neutrophiles et plaquettes) et entrer en NETose (neutrophils extracellular traps).

4.3. Moyens thérapeutiques en cas d'anaphylaxie réfractaire à l'adrénaline

Les moyens thérapeutiques utilisés classiquement au cours du choc anaphylactique sont développés plus loin (paragraphe 6.3). Il n'existe pas pour l'heure de traitement « étiologique » permettant de stopper la réaction une fois celle-ci déclenchée. Une nouvelle classe de molécule, de la classe pharmacologique des DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteins), interagissant avec la partie distale du récepteur $Fc\epsilon RI\alpha$, a été récemment décrite. Ces DARPins ont une affinité très forte pour le complexe IgE- $Fc\epsilon RI$, permettant ainsi de dissocier les IgE de leur récepteur $Fc\epsilon RI$ dans un laps de temps très court. Elles ont également la propriété de neutraliser les IgE circulantes en neutralisant le site de reconnaissance pour le $Fc\epsilon RI$. Ces molécules semblent prometteuses mais ne sont pour l'heure pas disponibles en clinique et leur capacité à stopper une réaction en cours reste discutée⁴⁸. Les anticorps monoclonaux anti-IgE, comme l'omalizumab, sont régulièrement utilisés, notamment en traitement des asthmes allergiques, mais leur mode d'action rend leur utilisation inutile une fois la réaction anaphylactique déclenchée. Ils pourraient néanmoins garder une place dans la prévention des réactions anaphylactiques⁴⁹.

L'association d'autres traitements à l'adrénaline, ciblant des voies de signalisations différentes, activées au cours de l'anaphylaxie, pourrait être intéressante. Ainsi, l'usage du bleu de méthylène, interagissant avec la voie du NO permet d'accélérer la récupération d'une pression artérielle correcte en limitant la quantité d'adrénaline nécessaire, diminuant ainsi le risque d'effets indésirables liés à l'adrénaline⁵⁰.

5. Arguments pour une implication des plaquettes dans l'anaphylaxie

5.1. Plaquettes et modèles d'anaphylaxie active

Dès les années 70, plusieurs travaux ont évoqué le potentiel rôle des plaquettes dans l'anaphylaxie en utilisant des modèles d'anaphylaxie active (immunisation de l'animal par une exposition répétée à un antigène associé avec des adjuvants pour stimuler la réponse immunitaire) chez des animaux préalablement sensibilisés. En 1977, Pinckard et col. ont décrit l'apparition brutale et transitoire d'une thrombopénie, associée à une neutropénie dans un

modèle de choc anaphylactique actif chez le lapin⁵¹. L'utilisation de plaquettes marquées révélait une séquestration des plaquettes dans le foie et les poumons. L'induction d'une thrombopénie avant le choc en atténuait la sévérité. En 1986, Pretolani et col. ont confirmé l'existence d'une thrombopénie associée à une séquestration pulmonaire des plaquettes dans un modèle d'anaphylaxie active chez le cochon d'Inde⁵². L'utilisation d'un inhibiteur du récepteur aux leucotriènes (FPL 55712) associé à de la PGI2 empêchait l'apparition d'une thrombopénie, l'utilisation de PGI2 seule ne permettant que de limiter la séquestration pulmonaire de plaquettes. En 2002, Yoshida et col. ont observé des résultats similaires dans un modèle d'anaphylaxie active induite par l'ovalbumine chez la souris avec une séquestration plaquettaire au niveau hépatique et pulmonaire associée à une sécrétion de sérotonine⁵³. Là aussi, l'induction d'une thrombopénie avant la réaction à l'aide d'un anticorps monoclonal atténuait l'intensité du choc anaphylactique. En 2012, Krishnamurthy et col. ont également observé une thrombopénie dans un modèle de choc actif induit par la caséine chez la souris, et rapportaient, en plus, une neutropénie associée à une séquestration pulmonaire des neutrophiles⁵⁴.

5.2. Plaquettes et modèles d'anaphylaxie médiée par les IgG

Le rôle des plaquettes dans l'anaphylaxie médiée par les IgG a récemment été décrit sur la base de travaux s'appuyant sur des modèles de souris transgéniques humanisées pour le récepteur FcγRIIA⁴. Ce récepteur est naturellement absent chez les souris sauvages mais il est présent sur les plaquettes des souris transgéniques. Dans ces modèles, l'injection d'immunoglobulines humaines agrégées à la chaleur (HAIG) entraîne une baisse franche de la température, paramètre de substitution utilisé pour évaluer l'intensité du choc anaphylactique, et une augmentation de la perméabilité vasculaire^{11, 55}. Une thrombopénie apparaît précocement, dès les 5 premières minutes suivant l'induction du choc et uniquement lorsque le FcγRIIA humain est présent à la surface des plaquettes. En présence de ce récepteur, les plaquettes sont essentielles à la survenue d'une réaction anaphylactique médiée par les HAIG. La réalisation d'une déplétion plaquettaire (à l'aide d'un anticorps monoclonal) avant l'injection d'HAIG abolit complètement la réaction. A l'inverse, la réaction est aggravée par une thrombocytose (par injection de romiplostim)¹¹. La réaction est associée à une sécrétion importante du contenu granulaire plaquettaire en sérotonine et en PF-4. La déplétion du contenu plaquettaire en sérotonine par de la fluoxétine ou l'utilisation d'un antagoniste des

récepteurs à la sérotonine (kétansérine) diminue de manière significative la sévérité de la réaction dans ce modèle⁵⁵.

L'applicabilité de ces résultats chez l'humain reste pour le moment limitée. En effet, les données humaines relatives à l'activation plaquettaire au cours du choc anaphylactique sont fragiles et souffrent de nombreux biais. De plus, l'existence même d'une voie IgG dans l'anaphylaxie humaine reste débattue par manque d'outils permettant de différencier ces réactions des réactions médiées par les IgE. Dans l'étude NASA (Neutrophil Activation in Systemic Anaphylaxis), s'intéressant aux réactions anaphylactiques périopératoires, les réactions avec le plus d'arguments pour une réaction médiée par les IgG étaient également celles avec le plus d'arguments pour une réaction médiée par les IgE ce qui oriente plus vers une coexistence des deux voies, notamment dans les formes les plus sévères¹⁴.

5.3. Rôle potentiel des plaquettes dans l'amplification de la réaction

Les plaquettes pourraient jouer un rôle dans l'amplification de la réaction mais aussi dans l'aggravation des symptômes et dans l'apparition d'états de choc réfractaires à l'adrénaline.

Les plaquettes sont riches en PAF et en sérotonine, deux médiateurs ayant des effets cardiovasculaires et respiratoires similaires à ceux observés au cours de l'anaphylaxie.

Le PAF est un médiateur lipidique qui a des effets pléiotropes en raison de la présence de son récepteur à la surface de nombreuses cellules⁵⁶.

Le PAF a un effet vasodilatateur et inotrope négatif au niveau cardiovasculaire, bronchoconstricteur au niveau respiratoire, il augmente la perméabilité vasculaire et induit une agrégation et une sécrétion plaquettaire⁵⁶. Il est libéré en grande quantité au cours du choc anaphylactique, avec une concentration d'autant plus importante que la réaction est sévère³⁸.

Ce médiateur semble jouer un rôle essentiel dans les modèles expérimentaux d'anaphylaxie médiée par les IgG mais pourrait également contribuer à la symptomatologie des réactions médiées par les IgE. De manière intéressante, le PAF semble être un médiateur clé de l'interaction entre les plaquettes et les mastocytes, ces derniers pouvant être activés par les plaquettes via une sécrétion de PAF dans des contextes inflammatoires (circulation extracorporelle, anaphylaxie passive)⁵⁷. Tous les mastocytes n'ont pas la même sensibilité au PAF, avec une sensibilité plus importante des mastocytes pulmonaires³⁶. Ainsi, la libération du PAF contenu dans les plaquettes pourrait aggraver la symptomatologie clinique, à la fois

par l'action directe du PAF sur les organes cibles mais aussi en amplifiant l'activation mastocytaire.

La sérotonine est principalement contenue dans les granules plaquettaires bien qu'il y en ait aussi dans les granules mastocytaires⁵⁸. L'activation plaquettaire entraîne une libération d'une grande quantité de sérotonine. L'effet de la sérotonine diffère en fonction de la distribution de ses différents récepteurs⁵⁹. Elle peut avoir un effet vasodilatateur ou vasoconstricteur selon le lit vasculaire étudié. La sérotonine a également un rôle au niveau cardiaque, que ce soit dans la fibrillation atriale (via le 5-HT₄), dans les valvulopathies (5-HT₃) ou l'angor (5-HT_{2A}). Peu d'études se sont intéressées au rôle de la sérotonine au cours de l'anaphylaxie. En dehors des modèles décrits ci-dessus, seule une étude a mis en évidence une libération *in vitro* de sérotonine en réponse à l'exposition du sang à un curare chez des patients ayant présenté une réaction anaphylactique périopératoire⁶⁰. Comme pour le PAF, la sérotonine libérée au cours d'une activation plaquettaire pourrait contribuer à l'aggravation de la symptomatologie.

Le facteur plaquettaire 4 (PF-4) libéré en quantité importante lors de l'activation plaquettaire, a également la possibilité d'activer les basophiles ce qui pourrait, là aussi, contribuer à l'amplification de la réaction⁶¹.

Un facteur important à prendre en compte est l'utilisation systématique d'adrénaline pour le traitement des réactions anaphylactiques sévères. L'adrénaline est connue pour potentialiser l'effet des autres agonistes plaquettaires. Ainsi, l'utilisation d'adrénaline pourrait potentialiser l'activation plaquettaire liée à la réaction anaphylactique elle-même, responsable à son tour d'une aggravation de la symptomatologie ce qui pourrait expliquer les états réfractaires observés en clinique humaine.

5.4. Questionnement autour du rôle des plaquettes dans l'anaphylaxie en 2021

Plusieurs points concernant le rôle des plaquettes dans l'anaphylaxie humaine nécessitent de poursuivre les investigations :

- Anaphylaxie médiée par les IgE : il n'existe pas de données à l'heure actuelle sur l'existence d'une activation plaquettaire dans des modèles d'anaphylaxie passive IgE-médiée. En effet, les nombreux modèles dans lesquels une thrombopénie a été observée sont des modèles de sensibilisation active. S'ils ont pendant longtemps été décrits comme des modèles d'anaphylaxie médiée par les IgE, les données récentes

rappellent la production d'IgG spécifiques au cours de la sensibilisation. L'activation plaquettaire dans ces modèles pourrait donc résulter d'une interaction avec les IgG et non les IgE. Une étude plus approfondie est donc nécessaire pour identifier l'implication respective des plaquettes selon le mécanisme initiateur de la réaction.

- Présence du récepteur FcεRI à la surface des plaquettes : le récepteur FcεRI est fréquemment décrit comme présent à la surface des plaquettes. Cependant, peu de données robustes permettant de l'affirmer sont disponibles. En 1997, Joseph et col. rapportent l'existence de ce récepteur sur les plaquettes humaines⁶². A l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne α extracellulaire du récepteur, les auteurs montrent que ce récepteur serait présent à la surface de 22% des plaquettes, avec une hétérogénéité très importante en fonction des sujets. Ces données sont corroborées par une analyse en RT-PCR qui confirme l'existence d'ARN messagers résiduels des chaînes β et γ du FcεRI dans les plaquettes. L'exposition des plaquettes à un antigène après les avoir incubées avec l'IgE spécifique de cet antigène était responsable d'une activation plaquettaire. Cette activation était inhibée par des concentrations croissantes d'anticorps bloquants contre le FcεRI. Des données similaires ont été rapportées par Hasegawa et col. en 1999 qui montraient la présence des chaînes α, β et γ du FcεRI dans les plaquettes en RT-PCR ainsi qu'un marquage de la chaîne α du FcεRI à la surface des plaquettes⁶³. De manière intéressante, ce marquage n'intéressait que 19% des plaquettes environ et n'était visible qu'avec les clones reconnaissant le domaine de liaison à l'IgE (CRA-2 et CRA-3). L'exposition de plaquettes lavées à différents activateurs du FcεRI induisait une libération de sérotonine et de RANTES, indiquant que ce récepteur est fonctionnel. La présence de ce récepteur fonctionnel à la surface des plaquettes devrait conduire à leur activation au cours de l'anaphylaxie médiée par les IgE. Ces études souffrent de certains biais, notamment sur la sélection et l'identification des plaquettes en cytométrie en flux ainsi que sur la purification des plaquettes pour l'analyse des ARN messagers (absence de contrôle de l'absence de contamination avec d'autres cellules pouvant potentiellement contenir le FcεRI) ou pour les tests fonctionnels. Compte tenu des biais, une nouvelle étude sur la présence du récepteur FcεRI sur les plaquettes humaines paraît nécessaire.

- Mécanisme d'activation des plaquettes : en dehors d'une activation plaquettaire directe via un récepteur aux immunoglobulines, plusieurs autres voies d'activation plaquettaire sont possibles au cours de l'anaphylaxie et n'ont pas été explorées : activation directe par la thrombine générée suite à l'activation de la phase contact, activation par le PAF produit par les leucocytes ou activation par les polyphosphates sécrétés par les mastocytes.
- Effet amplificateur de l'activation plaquettaire au cours de l'anaphylaxie : le rôle des plaquettes dans l'amplification de la réaction, notamment en potentialisant l'activation des mastocytes n'a pas été étudié dans des modèles d'anaphylaxie active. Cette voie d'amplification pourrait être une cible thérapeutique dans les réactions les plus sévères.
- Effet potentialisateur de l'adrénaline : il n'existe pas à l'heure actuelle d'étude sur l'effet de l'adrénaline sur l'activation plaquettaire au cours de l'anaphylaxie. Une meilleure compréhension de ce mécanisme pourrait inciter à favoriser des traitements alternatifs dans les réactions les plus sévères pour éviter la mise en place d'un cercle vicieux.

6. L'anaphylaxie en pratique clinique

6.1. Épidémiologie de l'anaphylaxie

6.1.1. Dans la population générale

L'anaphylaxie est un évènement rare dans la population générale avec une incidence estimée entre 1,5 à 32 réactions par 100 000 personne-année⁶⁴. Toutes les tranches d'âge peuvent être touchées mais la répartition des substances responsables de la réaction change selon que les patients soient des enfants ou des adultes. Les réactions anaphylactiques chez l'enfant sont principalement liées aux allergènes alimentaires alors que celles de l'adulte sont en premier lieu liées aux médicaments ou aux venins d'hyménoptère⁶⁴.

Les principaux allergènes alimentaires responsables de réactions anaphylactiques sont les fruits à coque, le lait de vache, les œufs et les crustacés⁶⁵. Parmi les médicaments, les antibiotiques et les anti-inflammatoires sont particulièrement représentés. L'allergie aux venins d'hyménoptère est plus fréquente chez les apiculteurs, avec une fréquence plus élevée chez les hommes⁶⁴.

L'incidence de l'anaphylaxie est en augmentation régulière dans la population générale avec une augmentation du nombre de consultations aux urgences et d'hospitalisations liées à l'anaphylaxie. Cette augmentation a récemment été estimée à 615% au Royaume-Uni entre 1992 et 2012⁶⁶. A Taiwan, l'incidence des réactions anaphylactiques a augmenté de 4,79 à 8,20 réactions pour 100 000 personnes-années entre 2001 et 2013⁶⁷. L'incidence des réactions anaphylactique a été multiplié par 1,7 entre 2010 et 2014 en Corée du Sud et par 2,8 entre 2006 et 2015 en Nouvelle-Zélande⁶⁸.

L'augmentation de l'incidence de l'anaphylaxie est accompagnée d'une augmentation similaire de la prévalence de l'allergie en France et dans le monde et représente un défi pour la santé publique.

6.1.2. Anaphylaxie en contexte particulier : la période périopératoire

L'incidence de l'anaphylaxie dans la période périopératoire est nettement plus élevée que dans la population générale. Elle varie de 1/353 à 1/18600 anesthésies, selon le type de réaction considéré et les méthodes utilisées pour les identifier⁶⁹. En France, l'incidence de ce type de réaction a été estimée à 100,6 [76,2-125,3] réactions par million d'anesthésie, avec une incidence plus importante pour les curares (184,0 [139,3-229,7] réactions aux curares par million d'anesthésie) et une nette prédominance féminine (250,9 [189,8-312,9] réactions aux curares par million d'anesthésie)⁷⁰.

Si toutes les substances utilisées au bloc opératoire peuvent être responsables d'une réaction anaphylactique, leur fréquence varie en fonction du pays concerné, de l'environnement et des pratiques cliniques. En France, les principales substances responsables de réactions d'hypersensibilité immédiate IgE-médiées sont les curares (60,6% des réactions IgE-médiées), les antibiotiques (18,2%) et les colorants (5,4%)³.

Parmi les curares, le risque de réaction IgE-médiée n'est pas le même pour tous les agents avec un risque supérieur pour le rocuronium (13,8 [9,0–18,6] réactions pour 100 000 ampoules vendues) et la succinylcholine (13,3 [11,5–15,1] réactions pour 100 000 ampoules vendues) par rapport au cisatracurium (0,4 [0,2–0,6] réactions pour 100 000 ampoules vendues) sans que la raison de cette différence ne soit identifiée. Les antibiotiques occupent une part croissante parmi les réactions IgE-médiées, représentant 2% des réactions en 1989 contre 18,2% en 2011-2012³. Les β -lactamines sont principalement en cause, avec une fréquence élevée des réactions aux céphalosporines, et notamment à la céfazoline. Les colorants sont utilisés en chirurgie, notamment pour le repérage du ganglion sentinelle dans

la chirurgie carcinologique mammaire. Le bleu patenté (triarylméthane), fréquemment utilisé dans cette indication, est particulièrement pourvoyeur de réaction IgE-médiée^{3, 71}.

Les réactions au latex étaient particulièrement fréquentes au cours des années 1990-2000⁷². L'épidémie de Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) avait entraîné à l'époque une forte demande en latex ce qui avait conduit les fabricants à utiliser un latex de moins bonne qualité, plus riche en protéine. Associé à l'utilisation large de gants poudrés, cela a conduit à une sensibilisation importante des patients mais aussi du personnel de santé. La mise en place de mesures de prévention primaire (évacuation du latex en chirurgie pédiatrique, utilisation de gants non poudrés et d'un latex de meilleure qualité) et secondaire (identification des sujets allergiques au latex, programmation en première position au bloc opératoire) a permis une franche réduction de l'incidence de ces réactions puisque celle-ci ne représentaient plus que 5,2% des réactions en 2011-2012³.

Cette épidémiologie est très différente dans d'autres pays avec, par exemple, une fréquence élevée des réactions liées à la chlorhexidine au Royaume-Uni et au Danemark alors que celles-ci sont rares en France⁶⁹. Les réactions aux antibiotiques sont plus fréquentes aux États-Unis mais les réactions aux céphalosporines y sont beaucoup plus rares. Au Royaume-Uni, les réactions à la teicoplanine, un glycopeptide, sont particulièrement fréquentes alors qu'elles sont exceptionnelles en France⁷³.

Ainsi il est important de prendre en compte ces disparités spatiales lorsque l'on étudie l'épidémiologie de ces réactions, ces disparités étant liées à la fois à des facteurs environnementaux mais aussi probablement à des facteurs génétiques encore mal évalués.

6.1.3. Réactions anaphylactiques sévères et mortelles

L'étude des patients admis en réanimation en France suite à une réaction anaphylactique montre que les médicaments sont les premiers pourvoyeurs de réactions sévères. Ainsi, la majeure partie des patients admis en réanimation sont issus du bloc opératoire et des services de radiologie. Concernant les admissions issues du pré-hospitalier, les médicaments sont également les premiers responsables, suivis par les aliments et les venins d'hyménoptères⁷⁴.

Le taux de mortalité lié à l'anaphylaxie dans la population générale est faible, allant de 0,002 à 2,51 décès par million de personnes-années selon les études et les pays. Les décès sont plus fréquents en cas de réaction aux médicaments (0,004-0,56 décès/million de

personnes-années) ou aux venins d'hyménoptères (0,02- 0,61 décès/million de personnes-années)⁷⁵. En France, le taux de mortalité d'une réaction anaphylactique est estimé à 0,60 [0,52-0,68] % avec un taux plus élevé chez les hommes et chez les personnes de plus de 70 ans⁷⁶.

Parmi les patients admis en réanimation, 5% décèdent suite à la réaction anaphylactique⁷⁴. Un taux similaire est observé au bloc opératoire avec 4,1% de décès en France en cas de réaction à un curare, 2% des réactions périopératoires aux États-Unis et 4,74% au Japon^{77, 78}. Il est intéressant de noter que ces décès surviennent dans un milieu très contrôlé, en présence de personnels entraînés, malgré une détection rapide de la réaction et une administration précoce d'adrénaline. Cela dénote donc l'existence de formes réfractaires au traitement par adrénaline^{74, 78}.

Plusieurs facteurs de risque de développer une forme sévère de réaction anaphylactique ont été identifiés, notamment le sexe masculin, l'âge avancé, les antécédents cardio-vasculaires ou la prise d'un traitement par β -bloquant ou inhibiteur du système rénine-angiotensine. Le retard à l'administration de l'adrénaline a également été identifié comme facteur de risque de développer une forme réfractaire à l'adrénaline^{75, 76, 78-80}.

6.2. Formes cliniques de l'anaphylaxie

Le diagnostic de réaction anaphylactique est un diagnostic uniquement clinique qui va se baser sur l'association temporelle entre l'exposition à un allergène et la survenue de symptômes concordants avec une réaction anaphylactique⁸¹. Les signes cliniques évocateurs d'une réaction anaphylactique sont détaillés dans le **Tableau 1**.

Type d'atteinte	Signes cliniques	Observations
Cutanée	Érythème diffus Urticaire généralisée Œdème	Très évocateur du diagnostic mais manquant dans 40% des réactions. Œdème potentiellement menaçant s'il intéresse les voies aériennes supérieures (œdème de Quincke) ¹ .
Cardiovasculaire	Hypotension artérielle voir état de choc Tachycardie/ Bradycardie Troubles du rythme Dysfonction myocardique Syndrome coronarien aigu Arrêt cardio-respiratoire	Principale source de morbidité au cours de l'anaphylaxie. La forme la plus courante associe une vasodilatation intense et une hypovolémie profonde par augmentation de la perméabilité capillaire ^{3,82} .
Respiratoire	Bronchospasme Hypoxémie Ventilation impossible	Bronchospasme parfois sévère pouvant évoluer vers une forme asphyxiante ⁸³ .
Digestive	Nausées, vomissements Crampes abdominales Diarrhées	Plus fréquemment rencontrés en cas d'anaphylaxie dans un contexte pré-hospitalier.
Neurologique	Confusion Obnubilation Coma	

Tableau 1 : Signes cliniques associés à une réaction anaphylactique.

L'anaphylaxie a été classée en 4 grades de sévérité croissante selon la classification de Ring & Messmer modifiée⁸⁴ :

- Grade I : signes cutanés isolés
- Grade II : apparition de signes cardiovasculaires (tachycardie ou hypotension artérielle modérée) ou respiratoires (bronchospasme modéré) significatifs mais ne mettant pas en jeu le pronostic vital
- Grade III : apparition de signes cardiovasculaires (collapsus cardiovasculaire, tachycardie sévère, bradycardie extrême, troubles du rythme ventriculaire) ou respiratoires (bronchospasme, hypoxémie) sévères mettant en jeu le pronostic vital

- Grave IV : arrêt cardio-respiratoire

Si cette classification ne permet pas de différencier les mécanismes impliqués dans la réaction, elle permet une adaptation du traitement à la sévérité de la réaction.

6.3. Traitement de la réaction

Plusieurs sociétés savantes ont émis des recommandations pour la prise en charge de l'anaphylaxie, que ce soit en pré-hospitalier, aux urgences ou au cours de la période périopératoire^{1, 85-88}. Ces recommandations diffèrent selon les sociétés savantes et les pays concernés et reposent principalement sur des avis d'experts.

En effet, il n'existe que peu de données robustes sur la prise en charge de l'anaphylaxie, la plupart d'entre elles étant issues d'études expérimentales, les études cliniques étant rendues très compliquées par le caractère rare, brutal et imprévisible de ce type de réaction.

La prise en charge repose sur plusieurs piliers fondamentaux : l'arrêt de l'exposition à l'allergène, l'administration précoce d'adrénaline et le remplissage vasculaire.

6.3.1. Arrêt de l'exposition à l'allergène

Il s'agit d'une mesure essentielle de la prise en charge du patient. Elle consiste à soustraire le patient à l'exposition à l'allergène, que ce soit en arrêtant une perfusion en cours ou en éloignant le patient de son environnement lorsque l'exposition est environnementale. Cette mesure peut être rendue difficile lorsque par exemple il s'agit d'un allergène alimentaire car celui-ci va persister longtemps dans le tractus digestif. Cette mesure est également rendue compliquée lorsque le patient a été exposé à de nombreuses substances en même temps, comme c'est le cas en anesthésie. Il convient alors de contre-indiquer temporairement l'ensemble des médicaments impliqués dans le protocole utilisé, et ce, jusqu'à la réalisation du bilan allergologique^{85, 86}.

6.3.2. Administration d'adrénaline

L'adrénaline est le traitement de référence pour toute réaction anaphylactique supérieure au grade I. Par ses mécanismes alpha (vasoconstricteur) et bêta-adrénergique

(inotrope positif, chronotrope positif, bronchodilatateur), l'adrénaline vient s'opposer aux effets des médiateurs libérés par les mastocytes et les basophiles⁸⁵. L'adrénaline aurait également un effet sur la libération des médiateurs eux-mêmes en bloquant la sécrétion mastocytaire mais cette affirmation repose sur des données anciennes, discordantes et de faible niveau de preuve⁸⁹.

Il est impératif d'adapter la dose d'adrénaline à la sévérité de la réaction car l'index thérapeutique est étroit et les effets secondaires d'une trop forte dose d'adrénaline peuvent venir contrebalancer le bénéfice de son utilisation⁹⁰⁻⁹².

En l'absence de voie veineuse périphérique immédiatement accessible, il est recommandé d'administrer l'adrénaline en intramusculaire (IM), idéalement à l'aide d'un stylo auto-injecteur, à la dose de 300 µg pour les adultes et 150 µg pour les enfants. Cette dose peut être répétée en l'absence d'efficacité 5 minutes après l'injection⁹³.

Dès la voie intraveineuse disponible, celle-ci doit être privilégiée et la dose adaptée à la sévérité de la réaction comme suit :

- Grade II : bolus de 10 à 20 µg d'adrénaline, à répéter toutes les 2 à 4 minutes
- Grade III : bolus de 100 à 200 µg d'adrénaline, à répéter toutes les 2 à 4 minutes
- Grade IV : bolus de 1 mg d'adrénaline, à répéter toutes les 2 à 4 minutes.

En cas de nécessité de répéter les bolus d'adrénaline, la mise en route d'une perfusion continue peut s'avérer utile. Si le patient est traité par β-bloquant, il peut être nécessaire de majorer les doses pour obtenir le même effet⁸⁵.

6.3.3. Remplissage vasculaire

L'hypovolémie au cours du choc anaphylactique est profonde du fait d'une augmentation brutale de la perméabilité vasculaire. Le remplissage vasculaire est souvent insuffisant, notamment dans les formes les plus sévères⁷⁴. Ainsi, il est recommandé pour toutes les réactions de grade II ou plus de réaliser un remplissage vasculaire d'au moins 30 mL/kg de soluté, le plus rapidement possible, en utilisant une voie veineuse de bon calibre⁸⁵. Des données expérimentales montrent que l'hypovolémie persiste malgré un remplissage vasculaire agressif, ce qui confirme la nécessité d'identifier d'autres voies thérapeutiques pour limiter l'augmentation de la perméabilité vasculaire⁸².

6.3.4. Autres thérapeutiques

En cas de troubles circulatoires ou respiratoires, la fraction inspirée en oxygène doit être augmentée en utilisant soit des lunettes, soit un masque à haute concentration. Dans les cas les plus graves, le patient doit être intubé et placé sous ventilation mécanique.

Les traitements antihistaminiques n'ont pas fait preuve d'efficacité en cas d'atteinte respiratoire ou hémodynamique et ne doivent donc pas être utilisés en première intention. Ils peuvent néanmoins garder un intérêt en cas de prurit intense, dans les réactions de grade I notamment⁹⁴.

Les corticoïdes sont recommandés afin de limiter la durée de l'inflammation et d'éviter le risque de récurrence de la réaction. Ils doivent donc être administrés à la dose de 1 à 2 mg/kg de méthylprednisolone⁹⁵.

En cas de situation réfractaire, d'autres traitements ont été proposés :

- Le bleu de méthylène : proposé sur la base de données expérimentales et de quelques cas cliniques, il semble avoir un effet intéressant notamment par son action vasoconstrictrice liée à son effet sur la voie du NO. Il s'agit d'un traitement de 2^{ème} intention potentiellement bénéfique^{50, 96}.
- Les β 2-mimétiques (salbutamol) peuvent être intéressants en cas de bronchospasme isolé mais ne doivent pas se substituer à l'adrénaline dans les autres situations.
- La noradrénaline peut être un complément intéressant à l'adrénaline en cas de tachycardie très importante et de vasoplégie intense même si son efficacité n'a jamais été évaluée.
- La vasopressine est parfois proposée, notamment dans des pays anglo-saxons mais les seules données expérimentales disponibles font état d'une surmortalité lors de son utilisation⁹⁷.
- La mise en place d'une ECMO (extracorporeal membrane oxygenation) est parfois proposée même si son efficacité reste discutée, notamment en raison des anomalies importantes de la perfusion sanguine régionale⁷⁴.

Certaines formes de choc anaphylactique sont réfractaires à l'ensemble de ces traitements malgré une détection précoce et une réanimation adaptée. Il est donc capital d'identifier de nouvelles voies thérapeutiques pour améliorer la prise en charge de ces patients^{74, 78}.

6.4. Démarche diagnostique

La démarche diagnostique en cas de réaction anaphylactique se décompose en deux étapes distinctes :

- **Confirmer l'activation des mastocytes et des basophiles** au cours de la réaction en étudiant la concentration plasmatique en marqueurs d'activation spécifiques de ces cellules (histamine et tryptase)^{98, 99}. Cette étape nécessite la réalisation de prélèvements sanguins au moment de la réaction.
- **Identifier la substance en cause et le mécanisme à l'origine de la réaction** en étudiant la chronologie entre l'exposition à un allergène et la réaction, en étudiant la concentration en IgE spécifiques de l'antigène suspecté et en étudiant la réponse du patient à des tests fonctionnels, soit *in vivo* (tests cutanés, test de provocation avec l'allergène), soit *in vitro* (tests d'activation des basophiles)^{85, 88, 100,101, 102}. Cette étape doit être réalisée au plus tôt 6 à 8 semaine après la réaction afin de limiter le risque de faux négatif.

Un résultat concordant entre ces tests (délai compatible entre exposition et réaction, augmentation de la concentration en histamine et/ou tryptase plasmatique, présence d'IgE spécifiques, tests cutanés voire test de provocation positifs) orientera vers une réaction IgE-médiée. L'existence de résultats discordants ou négatifs (absence d'augmentation de la tryptase plasmatique au moment de la réaction, absence d'IgE spécifique, tests cutanés négatifs, test d'activation des basophiles négatifs) est fréquente et complique beaucoup le diagnostic. Il est alors difficile voire impossible d'identifier formellement la substance en cause ce qui expose le patient a un risque de récurrence de la réaction lors d'une nouvelle exposition. C'est l'existence de ces réactions à bilan négatif ou discordant qui incite à poursuivre l'exploration des mécanismes responsables de l'anaphylaxie afin de voir si d'autres voies peuvent être responsables de ces réactions. Cependant, les outils utilisables en clinique humaine font actuellement cruellement défaut.

7. Objectifs du travail de thèse

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier le rôle joué par les plaquettes dans l'anaphylaxie. Plusieurs axes de travail ont été définis :

- Étudier la distribution du récepteur FcεRI à la surface des plaquettes humaines.
- Caractériser l'état d'activation plaquettaire dans un modèle d'anaphylaxie passive médiée par les IgE.
- Évaluer la contribution des plaquettes à l'intensité et la sévérité de la réaction dans un modèle d'anaphylaxie passive médiée par les IgE.
- Caractériser l'état d'activation plaquettaire dans un modèle d'anaphylaxie active létal chez le rat Brown Norway.
- Évaluer la contribution des plaquettes à l'intensité et à la sévérité de la réaction dans un modèle d'anaphylaxie active létal.
- Évaluer l'intérêt thérapeutique d'un blocage du récepteur au Platelet Activating Factor dans un modèle d'anaphylaxie active létal.

PARTIE II

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Article n°1

Les plaquettes humaines n'expriment pas de récepteur FcεRI fonctionnel à leur surface

Manuscrit en préparation

Human platelets do not express a functional FcεRI receptor

C. Tacquard^{1,2} et al.

¹ URMS 1255 EFS-INSERM : Biologie et pharmacologie des plaquettes sanguines, EFS Grand Est

² Service d'anesthésie-réanimation, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

1.1. Introduction

Le récepteur FcεRI est le récepteur à haute affinité aux immunoglobulines de type IgE¹⁰³. Il s'agit d'un récepteur tétramérique avec une structure αβγ₂. Les IgE circulantes, produites après une phase de sensibilisation, vont venir se fixer sur la portion extracellulaire du récepteur, au niveau de la chaîne α. En cas de nouvelle exposition à un antigène, la fixation de celui-ci sur des IgE liées au récepteur FcεRI entraîne une dimérisation de ce récepteur et la transduction d'un puissant signal activateur responsable de la libération du contenu granulaire (notamment de l'histamine, et des protéases, comme la tryptase) et de la synthèse de certains médiateurs (prostaglandines, thromboxane A₂, Platelet Activating Factor - PAF)².

Le récepteur FcεRI est présent de manière constitutionnelle à la surface des mastocytes et des basophiles, faisant de ces cellules les principaux effecteurs dans les réactions IgE-médiées, aussi appelées allergiques. Il est également présent de manière plus anecdotique à la surface des éosinophiles et des monocytes sous certaines conditions (atopie). Certains auteurs ont décrit une implication des plaquettes dans la physiopathologie des réactions IgE-médiées, notamment sur la base de travaux expérimentaux anciens, sans que le mécanisme ne soit identifié à ce jour^{51, 52, 61}.

Deux études ont rapporté la présence du récepteur FcεRI à la surface des plaquettes humaines et ont décrit une activation plaquettaire en réponse à la stimulation de ce récepteur^{62, 104}. Ces études s'appuyaient sur une analyse par cytométrie en flux, par RT-PCR et sur des tests fonctionnels. Ces études sont anciennes et souffrent de nombreux biais, que ce soit dans la technique de préparation des plaquettes ne permettant pas d'exclure une pré-activation ou une contamination par des leucocytes, ou par les techniques d'analyses qui ont évolué avec le temps.

Nous avons donc entrepris de réaliser une nouvelle étude de manière à évaluer si le récepteur FcεRI est présent à la surface des plaquettes humaines, et si celles-ci ont la capacité de s'activer en réponse à une stimulation de la voie IgE.

Pour ce faire, nous avons mené tout d'abord une étude par cytométrie en flux à l'aide de deux anticorps monoclonaux (CRA-1 et 2) reconnaissant la chaîne α du récepteur FcεRI. Nous avons également réalisé une étude par Western Blot avec un anticorps monoclonal (9E1) reconnaissant le même site. Nous avons ensuite réalisé plusieurs tests fonctionnels (en agrégométrie et par cytométrie en flux à l'aide d'une technique dérivée du test d'activation

des basophiles) visant à évaluer si la stimulation de la voie IgE conduit à l'activation des plaquettes.

Human platelets do not express a functional FcεRI receptor

Introduction

Anaphylaxis is a severe condition following exposure to an antigen¹. Most of these reactions are due to an allergic mechanism, where specific IgE produced after a period of sensitization interacts with its high-affinity receptor, the FcεRI. FcεRI is a tetrameric receptor with an $\alpha\beta\gamma_2$ structure². The IgE-binding site is located on the extracellular domain of the α -chain while the β and γ -chains contribute to the signal transduction and to the stabilization of the α -chain on the cell surface³. When antigens bind to the fab fragment of bound IgE, the FcεRI dimerizes, resulting in a strong activation signal and release of the vesicles content. The main effector cells of this mechanism are basophils and mast cells².

Some data in the literature suggest that platelets may contribute to IgE-mediated anaphylaxis, particularly in the most severe reactions⁴. However, the mechanism by which platelets may be activated during anaphylaxis is not clear. Platelet activating factor (PAF) is secreted during anaphylaxis and its receptor (PAF-R) is present on human platelets⁵. The FcεRII/CD23 receptor has also been described on human platelets although its role in anaphylaxis remains unclear and may instead act as a regulator of the IgE-mediated response⁶.

A direct activation of platelets by FcεRI signaling has been proposed by some authors. Indeed, several studies have reported the presence of a functional FcεRI on the surface of human platelets. In 1997, Joseph & al. were the first to describe that FcεRI was present on the surface of platelets and megakaryocytes using flow cytometry, RT-PCR and a functional assay, showing platelet activation in aggregometry using specific antigens on washed platelets⁷. These results were corroborated by Hasegawa & al. in 1999 who found similar results using RT-PCR, flow cytometry, immunoelectromicroscopy and the serotonin/RANTES release assay after exposure to a FcεRI activating antibody⁸. Interestingly, these two studies reported that only 22 and 19% of platelets were positive for FcεRI in flow cytometry and that the signal was only slightly different from that obtained with the nonimmune control antibody. Furthermore, these studies suffered from the same limitations. None of them formally eliminated leukocyte contamination in their preparations, and platelets can easily form platelet-leukocyte aggregates upon activation. Since leukocytes, and in particular basophils, have a high density

of FcεRI on their surface, this can be a confounding factor, especially for western blot and RT-PCR analyses.

As current techniques for platelet isolation and flow cytometry analysis have improved since the earlier studies, we decided to reassess the actual presence of the FcεRI receptor on the surface of platelets and to evaluate whether this receptor is functional in response to stimulation of the IgE-FcεRI pathway.

Methods

Blood sampling

Blood samples from healthy donors were obtained from the French national blood donor service (Etablissement Français du Sang) after obtaining informed consent from the donors. Blood samples from allergic patients were obtained in collaboration with the allergology service of the University Hospitals of Strasbourg after obtaining informed consent from the patients. Blood was taken using a 3.8% (v/v) sodium citrate (1:9) or acid-citrate-dextrose (ACD) as the anticoagulant.

Platelet rich plasma

Platelet-rich-plasma (PRP) was prepared by centrifugation of citrated whole blood drawn from allergic patients at 150 g, 10 min at room temperature.

Platelet washing procedure

Washed platelets were prepared from healthy donors as previously described⁹. Briefly, platelets were isolated by differential centrifugation and washed twice at 37°C in Tyrode's buffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose, 5 mM HEPES, pH7.3, 295 mOsmol), containing 0.35% purified human serum albumin and 0.5 μM prostaglandin I₂ (PGI₂). Platelets were finally suspended in Tyrode's-Hepes buffer containing 0.35% human serum albumin and 0.02 U/mL of the adenine nucleotides scavenger apyrase, a concentration sufficient to prevent desensitization of platelet responses to ADP 25, but no PGI₂ and adjusted to 3 x 10⁵ platelets/μL. Platelets were kept at 37°C throughout all experiments.

Aggregation assays

Aggregation was measured at 37°C by a turbidometric method in a Carat TX4 aggregometer (Entec GmbH, Ilmenau, Germany). A 450 μL aliquot of platelet suspension was stirred at 1100 rpm and activated by addition of 50 μL of the appropriate agonist: thrombin (1 U/mL), ADP (5 μM), TNP (2,4,6-trinitrophenol, 1 μg/mL), FcεRI activating αIgE antibody (G7-19; 50 μg/mL) or specific antigen (VES-V1 10 ng/mL, amoxicillin 100 μg/mL, rocuronium 1 mg/mL, suxamethonium 5 mg/mL). For the passive sensitization assay, platelets were incubated with αTNP specific IgE (50 μg/mL) for 1 hour during the second washing step, washed in Tyrode's

buffer containing 0.35% human serum albumin, before exposition to TNP. The extent of aggregation was estimated quantitatively by measuring the maximum curve height above baseline.

Western blot analysis

Washed platelets from healthy donors and transgenic hFcεRI mice (kindly provided by P. Bruhns, Institut Pasteur, Paris) were used for the western blot analysis. Platelets from hFcεRI mice were used as positive control as they express hFcεRI on their platelets. Fifty micrograms of human platelets proteins and 10 μg of mouse platelets proteins were separated on 4%–15% acrylamide gels (Biorad) then blotted onto nitrocellulose membranes, and processed for Western blotting.

Nitrocellulose membranes were then incubated with a specific primary monoclonal against the human FcεRI α-chain (9E1, Aviva systems biology, 2.5 μg/mL). The molecular weight of FcεRI α-chain is approximately 54 kDa. Membranes were finally incubated with 100 ng/mL peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson Immuno Research, PA, USA) resolved by Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Flow cytometry analysis

Expression of FcεRI on the surface of human platelets. A double-labeling technic was used to properly discriminate between specific and nonspecific staining. The protocol was conducted as described in the **Figure 1A and B**. Washed platelets (10 μL, 3.10^5 platelets/μL) from the same donor were incubated with either 1 μg/mL rat anti-mouse anti-GPIbα-PE (clone RAM.1-PE) alone or with 1 μg/mL rat anti-mouse anti-GPIbα-APC (clone RAM.1-APC) associated with anti-FcεRI α-chain mouse anti-human monoclonal antibodies CRA-1 (AER-37, Biolegend) or CRA-2 (MAB 7946, Abnova) at different concentration (0, 1, 2 and 5 μg/mL). After a 20 minutes incubation period at room temperature and a washing step, 20 μL of both platelet suspensions were mixed and incubated together 20 minutes at room temperature after addition of FITC-conjugated goat anti-mouse antibody (A11029, Invitrogen) 5 μg/mL. Samples were finally diluted in 500 μL Tyrode's buffer for flow cytometry analysis. Samples were analyzed using a Fortessa X-20 flow cytometer (BD Biosciences) and Diva Software (BD Biosciences). As shown

in **Figure 1C**, this technic allows to clearly discriminate between specific and nonspecific staining with GPIX (ALMA16) used as a positive control.

Basophil and platelet activation test. Citrated whole blood from allergic patients was incubated 10 minutes at 37°C with IL-3 10 ng/mL (A2919 Preproteck) than 30 minutes at 37°C with either buffer alone, FcεRI activating αIgE antibody (G7-19; 50 µg/mL), with platelet specific FcγRIIA activating αCD9 mAb or 3 different concentrations of the specific antigen. Blood for basophil analysis was then incubated 20 min at 4°C with αIgE-488 antibody 25 µg/mL, αCD203c-647 antibody 25 µg/mL and αCD63-PE 25 µg/mL then 10 minutes at 4°C with a lysing solution. Phosphate buffered saline (PBS) 1 mL was added to the solution. The sample was centrifuged 5 minutes at 300g then resuspended in 300 µL PBS for flow cytometry analysis. Basophils were defined as IgE+/CD203c+ cells and 500 events were required. For platelets analysis, blood was incubated 20 minutes at room temperature with rat anti-mouse anti-GPIIb/IIIa antibody 1 µg/mL and either FITC-conjugated PAC-1 (5 µg/mL, BD Bioscience) or FITC-conjugated αP-selectin mAb (1/21st Beckman Coulter) and their respective immune control. After the incubation period, samples were diluted in Tyrode's buffer 500 µL for flow cytometry analysis using a Gallios flow cytometer and Kalusa Software (Beckmann Coulter, Villepinte, France).

Results

Study of the presence of FcεRI on human platelets

Flow cytometry analysis using two different monoclonal antibodies against the FcεRI α-chain (αFcεRIA - CRA-1; n=3 and CRA-2; n=2) on washed platelet preparations from healthy donors showed no evidence of presence of the FcεRI receptor on the platelet surface (**Figure 1D**). The results of the titration of αFcεRIA antibodies CRA-1 and CRA-2 are available in supplementary material (**Figure S1 A and B**). Western blot analysis on washed platelets using an αFcεRIA antibody (9E1; n=2) showed that FcεRI was not present in human platelets from healthy donors whereas it was present in platelets from hFcεRI transgenic mice (**Figure 1 E**).

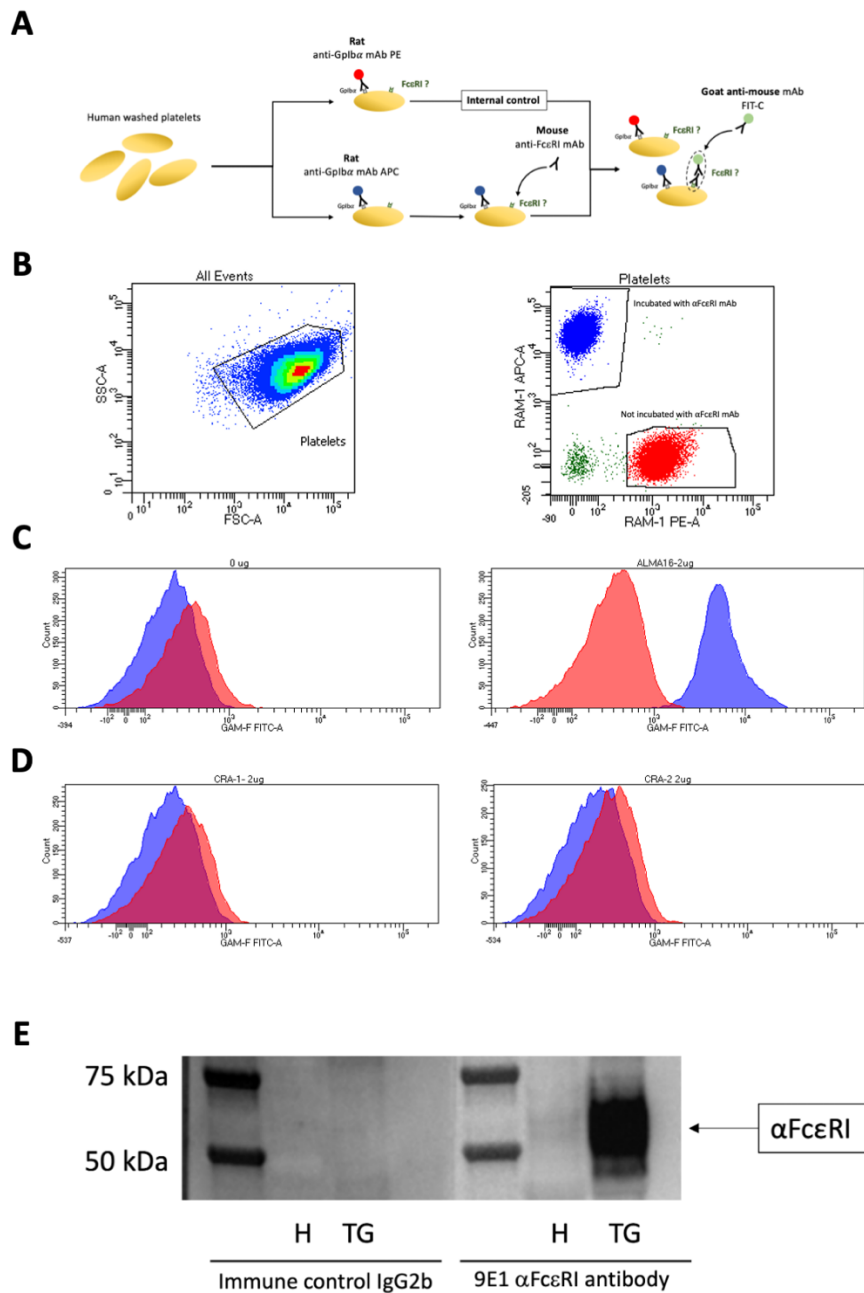


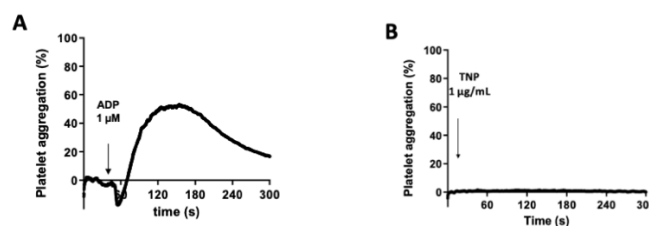
Figure 1: The FcεRI receptor is absent in human platelets from healthy donors. (A-D) Flow cytometry analysis on washed human platelets from healthy donors using a double-labeling method to distinguish between specific and nonspecific staining. **(A)** Experimental protocol **(B)** Gating for labeled and unlabeled platelets **(C)** Staining with αGPIX mAb (ALMA16) as positive control. **(D)** Staining with two αFcεRIA mAb, CRA-1 and CRA-2. **(E)** Western blot analysis of washed platelets from human (H - 50 μg proteins) and transgenic mice expressing human FcεRI on their platelets (TG – 10 μg proteins) with an αFcεRIA antibodies 9E1 and its immune control IgG2b.

Study of the platelet functional response to IgE-FcεRI stimulation

To evaluate whether platelets were able to respond to stimulation of the IgE pathway, we performed several functional assays with human platelets from healthy donors and allergic patients stimulated with IgE.

Using a standard turbidimetric aggregation assay on washed platelets (300,000/μL) from healthy donors, ADP (5 μM) stimulation resulted in a reversible aggregation (**Figure 2A**), whereas incubation of washed platelets with αTNP specific IgE (50 μg/mL) for 1 hour, followed by stimulation with TNP (1 μg/mL) did not induce platelet aggregation (**Figure 2B**). Stimulation of platelet rich plasma from allergic patients with ADP (5 μM) resulted in 84 [69-94] % of the maximal aggregation response, whereas stimulation with a FcεRI activator αIgE antibody (G7-19; 50 μg/mL) or stimulation with specific allergens on platelets from allergic patients did not result in platelet aggregation (2.8 [2.4-4.9] and 7.3 [6.2-9.0] % of maximal aggregation response, respectively) (**Figure 2 C-D-E-F**).

Washed platelets – Healthy donors



Platelet-rich-plasma – allergic patients

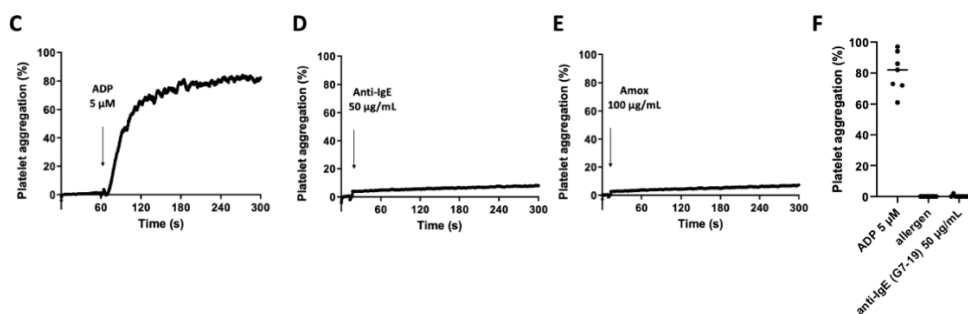


Figure 2: Human platelets from healthy donors and allergic patients do not aggregate in response to an IgE-FcεRI pathway stimulation. (A and B) Aggregation assay by turbidimetry on human washed platelets (300,000/μL) from healthy donors after stimulation with ADP (5 μM) (A) and after 1-hour incubation with αTNP specific IgE (50 μg/mL) followed by a washing step, and stimulation with TNP (1 μg/mL) (B). (C, D, E and F) Aggregation assay by turbidimetry on platelet rich plasma from allergic patients after stimulation with ADP (5 μM), FcεRI activating αIgE antibody (G7-19; 50 μg/mL) and specific allergen (hymenoptera venom n=2; amoxicillin n=2; rocuronium n=2; suxamethonium n=2).

In vitro exposure of citrated whole blood from allergic patients (hymenoptera venom n=3; peanut n=2; amoxicillin n=1) to FcεRI activating αIgE antibody (G7-19) or their specific allergen led to significant activation of basophils as shown by the significant increase in CD63 expression on the surface of basophils (**Figure 3A, B and C**) while no increase in P-selectin or activation of αIIbβ3 glycoprotein (PAC-1) was observed on platelets (**Figure 3D**). Conversely, stimulation with a platelet specific αFcyRIIA activating antibody (αCD9 mAb) as a positive control resulted in a significant increase in P-selectin expression and significant activation of αIIbβ3 glycoprotein (**Figure 3D**).

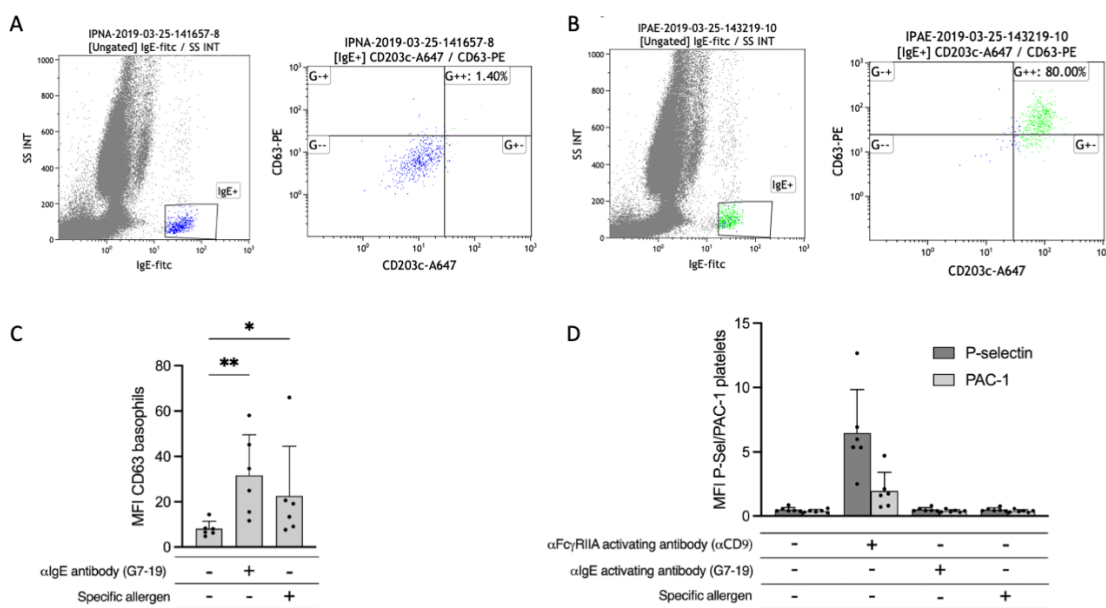


Figure 3: Human platelets from allergic patients do not respond to a stimulation of the IgE-FcεRI pathway. Flow cytometry analysis of whole blood from allergic patients (hymenoptera venom n=3; peanut n=2; amoxicillin n=1). (**A, B and C**) Expression of basophil activation marker CD63 on IgE⁺/CD203c⁺ cells at resting state, after stimulation with FcεRI activating αIgE antibody (G7-19) or with the specific antigen. (**D**) Expression of P-selectin and the activated form of αIIbβ3 (PAC-1) on human platelets at resting state, after stimulation with platelet specific FcyRIIA activating antibody (αCD9 mAb), with FcεRI activating αIgE antibody (G7-19) or with the specific antigen.

Discussion

Contrary to what has been published previously, our results clearly indicate that platelets do not possess a functional FcεRI receptor on their surface. Furthermore, our results also indicate that platelets are not able to directly respond to stimulation of the IgE pathway.

As discussed above, previous studies published by Joseph & al. and Hasegawa & al. suffered from several limitations^{7,8}. Flow cytometry is a very sensitive detection method, but it requires careful sampling and analysis methods to avoid introducing bias and drawing false conclusions. In these studies, the FcεRI receptor was detected in only 22 and 19% of platelets respectively and with only a moderate increase in mean fluorescence compared with the nonimmune control. Besides mast cells and basophils, eosinophils and monocytes (under certain conditions, especially in atopic patients) also express the FcεRI receptor³. Slight variations in sample preparation or sample preactivation leading to platelet-leukocyte aggregate formation could have led to false positive detection of the receptor on the platelet surface. For example, Hasegawa et al. incubated platelets on ice for 1 hour, a condition that is known to activate platelets, and thus, may have altered the pre-analytical conditions⁸. Some previous work has also demonstrated human FcεRI receptor mRNA by RT-PCR on human platelets^{7,8}. However, it should be noted that only traces of mRNA are present in platelets as they are anucleate cells. Furthermore, it is almost impossible to isolate blood platelets without leukocyte contamination. Thus, in the absence of a negative RT-PCR control of leukocyte specific mRNA, the possibility of leukocyte contamination cannot be excluded, weakening the robustness of these results. Platelet isolation techniques have evolved over time and require a very careful process to avoid activation or contamination by other cells. The present study was carried out according to a very rigorous method using a technique of preparation of washed platelets validated and mastered for a long time by our team, thus allowing to isolate platelets in their resting state⁹. Flow cytometry analyses were performed according to the state-of-the-art and using a method allowing to control non-specific staining. We performed several functional assays to evaluate whether platelets could respond to IgE antigen stimulation in an FcεRI-dependent manner, but also possibly in a non-FcεRI-dependent manner. Neither direct stimulation of the FcεRI receptor with an activating αFcεRI mAb (G7-19) nor stimulation with a specific αTNP IgE and its antigen (TNP) was able to induce platelet activation of healthy donors.

Thus, although we do not completely rule out the possibility that trace amounts of mRNA could be found in residual platelet nucleic acid, we can reasonably conclude that the FcεRI receptor is not present on the surface of human platelets from healthy donors.

As the presence of IgE is known to stabilize the FcεRI receptor on the surface of mast cells and basophils¹⁰, we thus hypothesized that allergic patients could have a higher probability of expressing the FcεRI receptor on their platelet surface. Therefore, we evaluated whether platelets from these allergic patients might respond differently than those from healthy donors. Platelets from allergic patients did not aggregate in response to an activating mAb αFcεRI (G7-19) or to the antigen responsible for the patient's allergy. Using a technique derived from the basophil activation test and flow cytometry analysis, we did not detect platelet activation after incubation of whole blood with an activating mAb αFcεRI (G7-19) or the specific antigen, whereas platelets were able to activate upon stimulation of the FcγRIIA receptor. Overall, these results indicate that neither platelets from healthy donors nor those from allergic patients respond directly to IgE stimulation.

In conclusion, our results indicate that the FcεRI receptor is not present on the surface of human platelets. Our results also indicate that platelets are not activated by stimulation of the IgE pathway. These results do not rule out a contribution of platelets to IgE-mediated anaphylaxis, but this contribution can only be indirect, potentially involving other players.

References

- 1 Muraro A, Roberts G, Worm M, et al. Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 2014; **69**: 1026-45
- 2 Ebo DG, Clarke RC, Mertes PM, Platt PR, Sabato V, Sadleir PHM. Molecular mechanisms and pathophysiology of perioperative hypersensitivity and anaphylaxis: a narrative review. *British journal of anaesthesia* 2019; **123**: e38-e49
- 3 Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**: 931-72
- 4 Gill P, Jindal NL, Jagdis A, Vadas P. Platelets in the immune response: Revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2015; **135**: 1424-32
- 5 Vadas P, Perelman B, Liss G. Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013; **131**: 144-9
- 6 Engeroff P, Vogel M. The role of CD23 in the regulation of allergic responses. *Allergy* 2020
- 7 Joseph M, Gounni AS, Kusnierz JP, et al. Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. *European journal of immunology* 1997; **27**: 2212-8
- 8 Hasegawa S, Pawankar R, Suzuki K, et al. Functional expression of the high affinity receptor for IgE (FcepsilonRI) in human platelets and its' intracellular expression in human megakaryocytes. *Blood* 1999; **93**: 2543-51
- 9 Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol* 2004; **272**: 13-28
- 10 Rios EJ, Kalesnikoff J. FcepsilonRI expression and dynamics on mast cells. *Methods Mol Biol* 2015; **1220**: 239-55

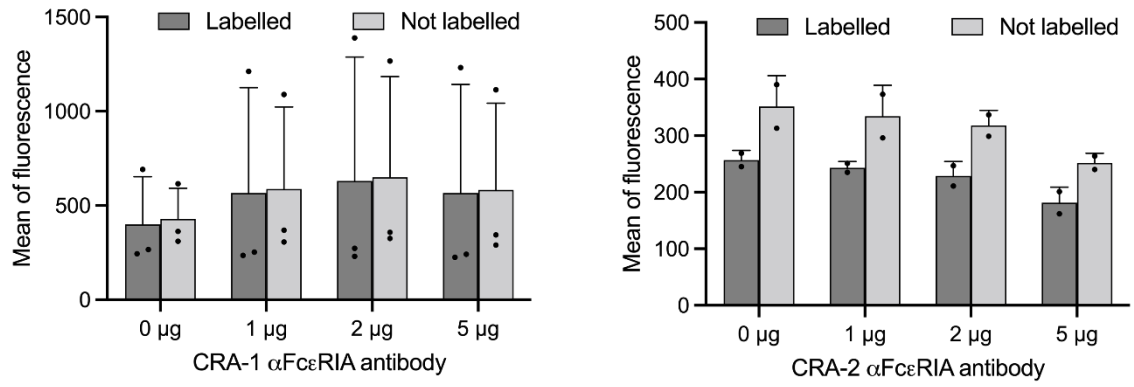


Figure S1: Flow cytometry analysis of the presence of the Fc ϵ RI receptor on the surface of human platelets. Titration of α Fc ϵ RIA mAb CRA-1 (A – n=3) and CRA-2 (B – n=2)

1.3. Conclusion

Grâce à une analyse fine par cytométrie en flux sur plaquettes humaines lavées, nous observons que le récepteur FcεRI n'est pas présent à leur surface. Ces données sont corroborées par l'analyse par Western Blot, qui ne met pas en évidence la présence de la chaîne α du récepteur FcεRI dans les plaquettes humaines lavées. Cependant, en l'absence de contrôle par RT-PCR et en raison d'une sensibilité limitée des analyses par Western Blot, il ne peut être totalement exclu que le récepteur FcεRI ou son ARN messager soit présent en très petite quantité en intracellulaire.

Les tests fonctionnels confirment que les plaquettes n'ont pas la capacité de s'activer directement en réponse à une stimulation IgE, que ce soit sur plaquettes lavées en agrégométrie ou en sang total par cytométrie en flux. Aucun signe d'activation plaquettaire n'a été observé en présence d'un anticorps activateur αFcεRI ou d'un couple IgE αTNP et TNP (sensibilisation passive) ou encore suite à l'exposition des plaquettes issues de patients allergiques à leur allergène respectif. Les plaquettes humaines n'ont donc pas la capacité de s'activer en réponse à une stimulation médiée par les IgE, que ce soit via le récepteur FcεRI ou via d'autres voies potentielles.

Ces travaux permettent donc de conclure que les plaquettes ne sont pas des acteurs de première ligne en cas de réaction médiée par les IgE. Cela n'exclut pas l'activation des plaquettes de manière secondaire, suite à l'activation initiale des mastocytes et des basophiles et donc, par ce biais, une contribution des plaquettes à la symptomatologie et à la sévérité de la réaction. D'autres études sont nécessaires pour évaluer le rôle des plaquettes dans les réactions médiées par les IgE.

Article N°2

Rôle différentiel des plaquettes et des polynucléaires neutrophiles selon le mécanisme à l'origine de la réaction anaphylactique

Manuscrit en préparation

A differential role of platelets and neutrophils depending on the initiating mechanism of anaphylaxis

C. Tacquard^{1,2} et al.

¹ URMS 1255 EFS-INSERM : Biologie et pharmacologie des plaquettes sanguines, EFS Grand Est

² Service d'anesthésie-réanimation, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

2.1. Introduction

Le choc anaphylactique est la forme la plus sévère des réactions d'hypersensibilité immédiate⁸¹. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de ce type de réaction². Le principal mécanisme identifié est le mécanisme IgE-médié, qui implique une production d'IgE spécifiques dirigées contre un antigène et le récepteur FcεRI présent à la surface des mastocytes et des basophiles. Un second mécanisme immunologique, impliquant une production d'IgG spécifiques et le récepteur FcγRIIA, a récemment été décrit sur la base d'études expérimentales murines impliquant des souris transgéniques exprimant le récepteur humain FcγRIIA/CD32A mais la réalité en clinique humaine de cette voie d'activation reste à démontrer^{11, 14}.

Plusieurs auteurs ont décrit une modification de la numération plaquettaire au cours du choc anaphylactique dans des modèles expérimentaux d'anaphylaxie active, avec une séquestration pulmonaire de plaquettes^{51, 52, 61}. Dans ces modèles, une déplétion plaquettaire diminuait l'intensité de la réaction. Le mécanisme par lequel les plaquettes pourraient contribuer à la sévérité de la réaction n'est pas connu mais pourrait impliquer certains médiateurs comme la sérotonine ou le Platelet Activating Factor (PAF)^{56, 60}. Bien que ces modèles soient étiquetés comme étant IgE-médiés, le mécanisme immunologique réel conduisant à la réaction est inconnu. Il n'existe actuellement pas de travaux expérimentaux ayant étudié la fonction plaquettaire spécifiquement au cours des réactions médiées par les IgE.

En parallèle, les plaquettes semblent être des actrices majeures des réactions médiées par les IgG. Dans un modèle de choc induit par l'injection d'immunoglobulines humaines agrégées par la chaleur (HAIGG) chez des souris hFcγRIIA, la déplétion plaquettaire abolit complètement la réaction^{11, 55}. Un des médiateurs clés de ces réactions serait le PAF⁴.

Il n'existe actuellement aucune étude ayant comparé le rôle des plaquettes au cours du choc anaphylactique, selon le mécanisme initiateur de la réaction. La présence des différents récepteurs impliqués dans les réactions anaphylactiques sur les plaquettes diffère selon l'espèce concernée (Tableau 2).

Récepteurs	Souris	Rat	Lapin	Homme
FcεRI	-	?	+	+/-
FcγRIIA/CD32A	-	?	-	+
Récepteur au PAF	-	-	+	+

Tableau 2 : Récepteurs impliqués dans l’anaphylaxie et présents sur les plaquettes selon l’espèce considérée.

Nous avons donc conduit une étude sur l’état d’activation plaquettaire dans différents modèles expérimentaux de choc anaphylactique :

- Un modèle murin d’anaphylaxie passive médiée par les IgE
- Un modèle murin d’anaphylaxie passive induite par les HAIgG chez des souris hFcγRIIA
- Un modèle d’anaphylaxie active à l’ovalbumine chez le rat Brown Norway. Ce modèle de choc léthal est particulièrement utile car proche de ce qui est observé chez l’Homme et permet de tester des protocoles thérapeutiques dans des conditions proches de la clinique humaine.

L’objectif est d’étudier les modifications de la numération et de la formule sanguine induites par le choc anaphylactique dans différents modèles et de comparer l’effet d’une déplétion plaquettaire par un anticorps monoclonal dirigé contre la GPIbα (R300 chez la souris, RPM-14 chez le rat) sur l’intensité du choc.

A differential role of platelets and neutrophils depending on the initiating mechanism of anaphylaxis

Introduction

Anaphylaxis (AS) is an immediate, systemic, and severe hypersensitivity reaction following exposure to an antigen¹. The incidence of anaphylaxis is low in the general population, 1.5 to 7.9 reactions per 100,000 person-years², but is steadily increasing, which may represent public health concerns. In addition, some situations are associated with a relatively high risk of severe anaphylaxis, such as the perioperative period. Despite rapid recognition of the reaction and early administration of epinephrine, the reference treatment, the mortality rate reaches 4.1% of reactions related to neuromuscular blocking agents in the perioperative period and 5% of patients hospitalized in intensive care unit for anaphylaxis^{3, 4}. These data indicate that some forms of anaphylaxis are refractory to epinephrine and should prompt us to seek new therapeutic strategies.

The classical pathway of AS involves activation of mast cells and basophils by FcεRI signaling, resulting in a massive release of preformed and newly formed mediators, which are ultimately responsible for the reaction⁵. Some data in the literature suggest that other cell types may be involved in anaphylaxis, in particular platelets and neutrophils. Platelets are known to contribute to various inflammatory processes. Hasegawa et al. reported that FcεRI was present on the cell membrane of human platelets⁶, suggesting that platelets may be activated in the same way as basophils and mast cells. Pinkard et al. showed as early as 1977 that platelet counts decreased during experimental active anaphylaxis in rabbits and that platelets were trapped in the lungs⁷. Platelets contain several mediators that may contribute to clinical signs such as platelet activating factor (PAF) and serotonin. Vadas et al. reported that human anaphylaxis is associated with a significant release of PAF, with plasma levels correlated with the severity of the reaction⁸. In addition, PAF has the *in vitro* ability to activate pulmonary mast cells and may contribute to increase the severity of the reaction⁹. In 1993, Bermejo et al. showed that serotonin was released from human platelets *in vitro* in response to neuromuscular blocking agents exposure in patients with perioperative anaphylaxis¹⁰. More recently, serotonin has been shown to contribute to the bronchospasm observed in an

experimental model of active anaphylaxis¹¹. Altogether, these data suggest that platelets may play a role during anaphylaxis. However, the detailed mechanisms leading to this activation are still poorly understood.

Few data are available on the involvement of neutrophils in anaphylaxis. Francis et al. showed in 2016 that plasma myeloperoxidase (MPO) levels were increased in patients with anaphylaxis in the emergency department, along with an increase in soluble CD62L, in a severity-dependent manner, suggesting that neutrophils are activated during anaphylaxis¹².

Platelets and neutrophils have been shown to play a key role in experimental IgG-mediated anaphylaxis, but data are lacking in humans due to the absence of a validated diagnostic method to identify these reactions.

Several authors suggest using platelet and neutrophil activation markers as a diagnostic tool to identify an IgG-mediated reaction^{13, 14}. However, the contribution of platelets and neutrophils to IgE-mediated anaphylaxis has never been properly investigated, making it impossible to ensure that these markers are discriminating between IgE- and IgG-mediated anaphylaxis.

Therefore, we decided to conduct the present study to evaluate the respective contribution of platelets and neutrophils in passive models of IgE- and IgG-mediated reactions in mice and in an active model of anaphylaxis in rats. We hypothesized that platelets and neutrophils may react differently depending on the mechanism of initiation of the reaction and could contribute differently to the severity of the reaction.

Methods

Mouse models of passive systemic anaphylaxis

All mice were housed in the animal facilities of the EFS-Grand Est (agreement number F67 482-10). Ethical approval for the animal experiments was received from the French Ministry of Research in accordance with the guidelines of the European Union and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Mice were all maintained under standard conditions (temperature $21\pm 1^\circ\text{C}$, light 6 am to 6 pm) and fed a standard diet and water ad libitum.

IgE-mediated passive systemic anaphylaxis. IgE-mediated passive systemic anaphylaxis (PSA-E) experiments were performed in 8- to 10-week-old female C57BL6/J mice (Charles River, L'Arbresle, France). Mice were passively sensitized by intravenous injection of anti-TNP (trinitrophenyl) IgE (C48-2, BD Biosciences) $100\ \mu\text{g}$ in $200\ \mu\text{L}$ of 0.9% NaCl. Five days later, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine ($100\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and xylazine ($20\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Body temperature was maintained at $38.0\pm 0.5^\circ\text{C}$ using a heating pad. Mice were tracheostomized and mechanically ventilated (Ventelite®, Harvard Apparatus, Holliston, U.S.A.) to maintain PaCO_2 between 4.7 and 5.3 kPa. Blood pressure was continuously monitored with a Millar's SPR-1000 Mikro-Tip® pressure probe (ADInstrument, Paris, France) inserted into the left carotid artery under binocular microscopy. Arterial pressure was recorded and analyzed using the IOX2 software (Emka technologies, Paris, France). After a 5 minutes stabilization period, anaphylaxis was induced by an intravenous injection of TNP ($100\ \mu\text{g}$ diluted in $100\ \mu\text{L}$ of 0.9% NaCl) (Cosmo Bio) into the right jugular vein. Fifteen minutes later, mice were sampled and then euthanized.

IgG-mediated passive systemic anaphylaxis. Transgenic mice expressing human $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}/\text{CD}32\text{A}$ (C57BL6/J background) (McKenzie 1999) were kindly provided by P. Bruhns (Institut Pasteur, France) and bred in our animal facilities. These animals were crossed with C57BL6/J mice (JAX™, Charles River) and thus possess all endogenous $\text{Fc}\gamma$ receptors in addition to the $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$. The presence of the hCD32A transgene was assessed by PCR analysis of genomic DNA using the primers 5'-CAATTTTGCTGCTATGGGC-3' and 5'-CTGGTCAAGGTCACATTCTTC-3'. The day of the procedure, mice were mechanically ventilated and monitored as described above. Passive IgG-mediated systemic anaphylaxis (PSA-G) was induced by i.v. injection of human intravenous IgGs (Gramunex) heat-aggregated (HA IgG) by

incubation at 20 mg/mL in borate-buffered saline [0.17 M H₃BO₃ and 0.12 M NaCl (pH 8)] for 1 hour at 63°C and then diluted to 10 mg/mL in 100 µL 0.9% NaCl, resulting in a dose of 50 mg.kg⁻¹ of body weight. Fifteen minutes after shock induction, mice were sampled and then euthanized.

Rat model of active systemic anaphylaxis

Rats were housed in the animal facilities of the medical faculty of Strasbourg. Ethical approval for the animal experiments was received from the French Ministry of Research in accordance with the guidelines of the European Union and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (ref 2018100500047648).

Active systemic anaphylaxis experiments were performed on 10-week-old Brown Norway rats (Charles River, L'Arbresle, France) previously sensitized by subcutaneous injection of 1 mg of chicken egg albumin (ovalbumin, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and 4 mg of aluminum hydroxide (Al(OH)₃ - Sigma-Aldrich) diluted in 1 mL of 0.9% NaCl on days 0, 7, and 14 as described elsewhere¹⁵. Animals were maintained under standard conditions (temperature 21±1°C, light 6 am to 6 pm) and fed a standard diet (A04; UAR) and water ad libitum. On day 21, anesthesia was induced with 4% isoflurane and maintained with 1% isoflurane combined with an intraperitoneal injection of buprenorphine to provide analgesia. Rats were tracheostomized and mechanically ventilated with a rodent ventilator (Alpha Lab, Minerve) to ensure a PaCO₂ between 4.7 and 5.3 kPa. Body temperature was maintained at 38.0±0.5°C using a heating pad. A fluid-filled polyurethane catheter was inserted into the right jugular vein for injection of ovalbumin and continuous infusion of 0.9% NaCl at 10 ml.kg⁻¹.h⁻¹. A fluid-filled polyurethane catheter was inserted in the left carotid artery and connected to a strain gauge pressure transducer for continuous pressure monitoring (Labchart® software, ADInstrument, Paris, France). After a 15 minutes stabilization period, active systemic anaphylaxis was induced with either 0.1 mg ovalbumin (attenuated anaphylactic shock – AAS) or 1 mg ovalbumin (lethal anaphylactic shock – LAS) diluted in 1 mL 0.9% NaCl. Rats in the LAS group generally die within 20 minutes of shock induction, whereas AAS is strictly nonlethal. A control group received vehicle only (SHAM). Fifteen minutes later, rats were sampled and euthanized. In 6 rats in the AAS group and the thrombocytopenic AAS group, the experiment was continued until 30 minutes after the induction of shock.

Specific cell depletion

Mouse platelets were depleted by i.v. injection of the anti-GPIb α mAb cocktail R300 (R300, 0.5 mg/kg in saline) (Emfret) 24 hours before induction of anaphylaxis.

Rat platelets were depleted by i.v. injection of a homemade mouse anti-rat GPIb α mAb (clone RPM-14, 2 mg/kg in saline) 4 hours before induction of anaphylaxis.

Blood analysis

Platelet and leukocyte counts were determined on whole blood anticoagulated with EDTA (6 mmol.L⁻¹) using an Element HT5 automatic cell counter (HESKA®, Les Ulis, France) set to murine parameters. Blood was obtained by direct cardiac puncture at the end of the experiment. The thorax was surgically opened, and blood samples were taken successively from the left ventricle (LV) and then from the right ventricle (RV). Mechanical ventilation allowed the survival of the animals throughout the procedure. In mice and rats, once anesthetized, the tails were severed and blood (10 μ L) was collected into EDTA (6 mM) before induction of shock. In order to prepare platelet poor plasma (PPP), blood was centrifuged at 3,500 g for 5 min at 4°C. The supernatant was centrifuged again at 12,000 g for 5 min to obtain PPP, which was stored at -80°C until use.

ELISA assays

Plasma concentrations of PF4, serotonin, MPO and mouse MCP-1 were determined using commercial kits (Quantikine® ELISA Mouse CXCL4/PF4 from R&D SYSTEMS™, Serotonin ELISA Fast Track from LDN®, MPO mouse ELISA Kit from Hycult Biotech and mouse MCP-1 uncoated ELISA from Invitrogen).

Statistical analysis

Statistical analysis were performed using Prism 9 software (Graphpad, San Diego, CA). Results were expressed as number and percentage or median and interquartile range. Statistic comparisons were calculated using non-parametric Mann-Whitney or Kruskal Wallis tests followed by a Bonferroni post-hoc test. A P-value < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Anaphylactic shock in a mouse model of IgE-mediated passive systemic anaphylaxis (PSA-E)

Injection of TNP into sensitized mice resulted in a transient increase followed by a progressive decrease in mean arterial pressure (MAP) compared with the SHAM group (vehicle injection only) (**Figure 1A**). Heart rate (HR) increased significantly after TNP injection to reach its maximum level (470 [458-513] bpm, $p < 0.01$ vs. SHAM) after 2.5 minutes in the PSA-E group followed by a slow decline to 349 [289-383] bpm at 15 minutes, while it remained unchanged in the SHAM group (**Figure 1B**). PSA-E resulted in a significant increase in blood hemoglobin (PSA-E 19.4 [17.6-20.5] vs. SHAM 15.0 [14.5-16.8] g.dL^{-1} , $p < 0.01$) (**Figure 1C**) and blood lactate level (PSA-E 3.7 [3.2-3.8] vs. SHAM 1.6 [1.2-1.6] mmol.L^{-1} , $p < 0.01$) (**Figure 1D**). Absolute platelet count was not statistically different between groups (PSA-E 1005 [841-1169] vs. 1132 [820-1200] G.L^{-1} , $p = \text{ns}$). However, corrected platelet count, normalized to hematocrit to account for hemoconcentration, was significantly reduced in the PSA-E group compared with the SHAM group (PSA-E 1692 [1466-1789] vs. 2178 [1981-2482] G.L^{-1} respectively, $p < 0.01$) while corrected neutrophil count remained similar between groups (1.4 [1.0-1.6] vs. 0.8 [0.8-1.5] G.L^{-1} , $p = \text{ns}$) (**Figure 1E-F**). No difference was observed between the number of neutrophils in the right and left ventricles (data not shown). A slight lymphopenia was observed in the PSA-E group (PSA-E 4.2 [2.6-5.8] vs. SHAM 7.1 [6.4-10.0] G.L^{-1} , $p = 0.02$). The corrected monocyte count was similar between groups (data not shown).

PSA-E was characterized by a significant secretion of MMCP-1, a mast cell activation marker (45364 [35334-75864] pg.mL^{-1} , $p < 0.01$ vs. SHAM) whereas MMCP-1 level remained below the detection threshold in the SHAM group (detection threshold 117 pg.mL^{-1}) (**Figure 1G**). PF4 and serotonin tend to slightly increase in the PSA-E group although the difference with the SHAM group was not statistically significant (79 [38-107] vs. 16 [13-31] ng.mL^{-1} , $p = 0.13$ and 55 [33-83] vs. 31 [24-49] ng.mL^{-1} , $p = 0.11$, respectively). PSA-E was not associated with significant secretion of MPO.

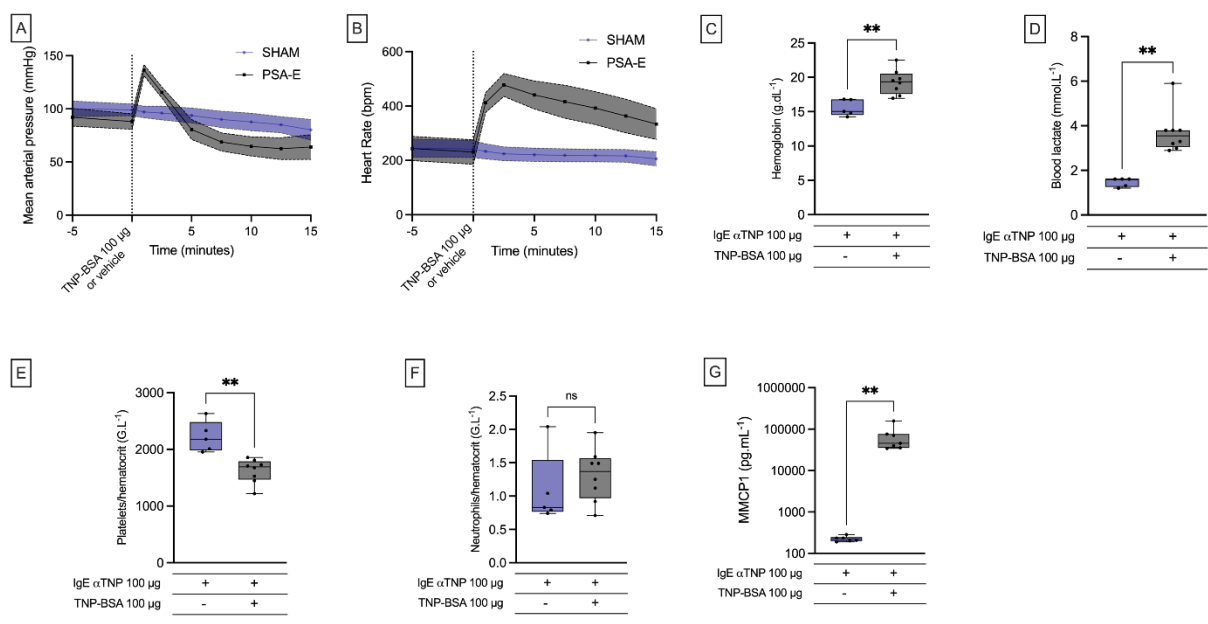


Figure 1: Characteristics of IgE-mediated passive systemic anaphylaxis (PSA-E – intravenous injection of anti-TNP IgE 100 µg followed by i.v. injection of TNP 100 µg/100 µL 5 days later – n=8) compared with SHAM (i.v. injection of anti-TNP IgE 100 µg followed by injection of NaCl 0.9% 100 µL 5 days later – n=6) evaluated during 15 min following injection of TNP. (A-B) Evolution of mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) following injection of TNP (PSA-E) or vehicle (SHAM) in sensitized mice. (C) blood hemoglobin level, (D) blood lactate level, (E) corrected platelet count (platelet/hematocrit) (F) corrected neutrophil count (neutrophil/hematocrit). (G) Mouse Mast Cell Protease 1 (MMCP-1) plasmatic level.

Effect of platelet depletion in PSA-E

Injection of anti-GPIIb/IIIa mAb (R300 0.5 mg.kg⁻¹) 24 hours before surgery resulted in a large and significant decrease in platelet count on the day of surgery (22 [16-33] vs. 1072 [929-1177] G.L⁻¹, p<0.01) (**Figure 2A**). TNP injection resulted in a significantly more severe reaction in the thrombocytopenic group (TPSA-E) than in the group with normal platelet count (PSA-E) with a stronger decrease in MAP (**Figure 2B**) and a significant increase in blood lactate (TPSA-E 10.7 [8.1-17.2] vs. PSA-E 3.7 [3.3-4.4] mmol.L⁻¹, p<0.01) (**Figure 2C**). TNP injection also resulted in the death of 3/4 of the mice before T15 minutes in the thrombocytopenic group (**Figure 2D**). Hemoglobin was not different between groups.

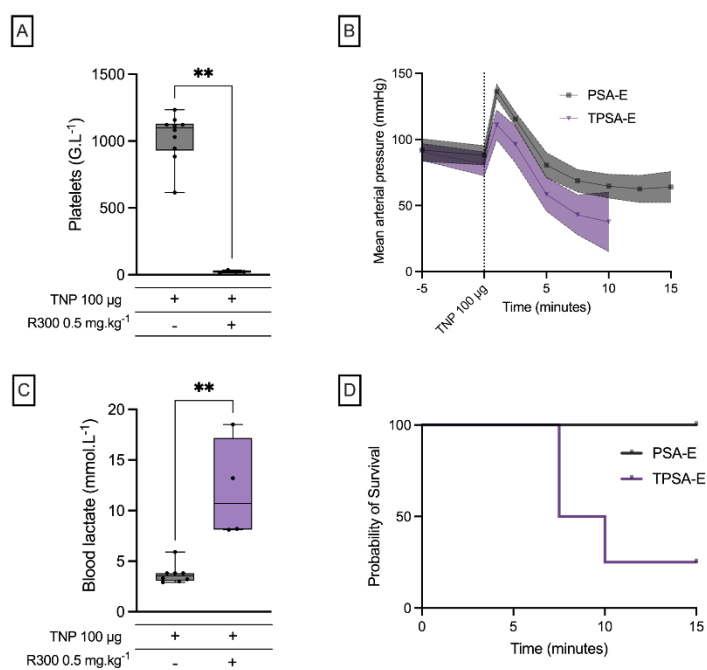


Figure 2: Effect of platelet depletion in IgE-mediated passive systemic anaphylaxis (PSA-E – intravenous injection of anti-TNP IgE 100 µg followed by i.v. injection of TNP 100 µg/100 µL 5 days later – n=8). Thrombocytopenia (TPSA-E – n=4) induced by intravenous injection of R300 0.5 mg.kg⁻¹ 24 hours before the procedure). (A) Platelet count before induction of the anaphylactic shock, (B) evolution of the mean arterial pressure during 15 minutes after TNP injection, (C) blood lactate level 15 minutes after TNP injection, (D) survival analysis.

Anaphylactic shock in a mouse model of IgG-mediated passive systemic anaphylaxis (PSA-G) and the effect of platelet depletion

Intravenous injection of heat-aggregated IgG (HAIGG) in hCD32A+ mice resulted in a significant decrease in MAP, which reached 51 [46-66] mmHg at T15 minutes, whereas it remained constant in the SHAM group (**Figure 3A**). Heart rate significantly increased after HAIGG injection to reach its maximum level (427 [427-449] bpm, p<0.05 vs. SHAM) at 2.5 minutes followed by a slow decline to 332 [313-353] bpm at 15 min, while it remained unchanged in the SHAM group (**Figure 3B**). HAIGG injection resulted in a significant increase in hemoglobin (PSA-G 19.4 [17.2-22.8] vs. SHAM 15.6 [14.7-16.1] g.dL⁻¹, p<0.01) and in blood lactate (PSA-G 6.3 [3.7-9.0] vs. SHAM 1.2 [1.1-1.3] mmol.L⁻¹, p<0.01) (**Figure 3C and D**). Absolute platelet count was significantly lower in the PSA-G group compared with the SHAM group (58 [40-75] vs. 1254 [1192-1318] G.L⁻¹, p=0.02). Corrected platelet and neutrophil count were significantly reduced in the PSA-G group compared with the SHAM group (PSA-G 105 [58-142] vs. 2687

[2650-2822] G.L⁻¹, p<0.01 and 0.06 [0-0.08] vs. 3.1 [2.5-5.8] G.L⁻¹, p<0.01, respectively) (**Figure 3E and F**). A strong right to left ventricle gradient of neutrophils was observed in the PSA-G group compared with the SHAM group with a right to left ventricle ratio (RV/LV ratio) at 24 [19-78] (p<0.05 vs. SHAM) (**Figure 3G**). A lymphopenia was observed in the PSA-G group (PSA-G 1.7 [1.4-2.7] vs. SHAM 5.9 [4.9-6.5] G.L⁻¹, p=0.02). The monocyte count was not statistically different between groups (PSA-G 0.0 [0.0-0.1] vs. SHAM 0.2 [0.1-0.5] G.L⁻¹, p=ns) even if a right to left ventricle gradient of monocyte was observed in the PSA-G group (RV/LV ratio: PSA-G 18 [5-22] vs. SHAM 0.8 [0.5-1], p=0.02).

PSA-G was characterized by a significant secretion of MPO (PSA-G 9279 [8604-16554] vs. SHAM 285 [172-310] ng.mL⁻¹, p<0.01), serotonin (PSA-G 165 [145-223] vs. SHAM 36 [24-45] ng.mL⁻¹, p<0.01) and PF4 (481 [427-728] vs. 22 [16-26] ng.mL⁻¹, p<0.01) (**Figure 3H, I and J**) whereas MMCP-1 level remained similar between groups (data not shown).

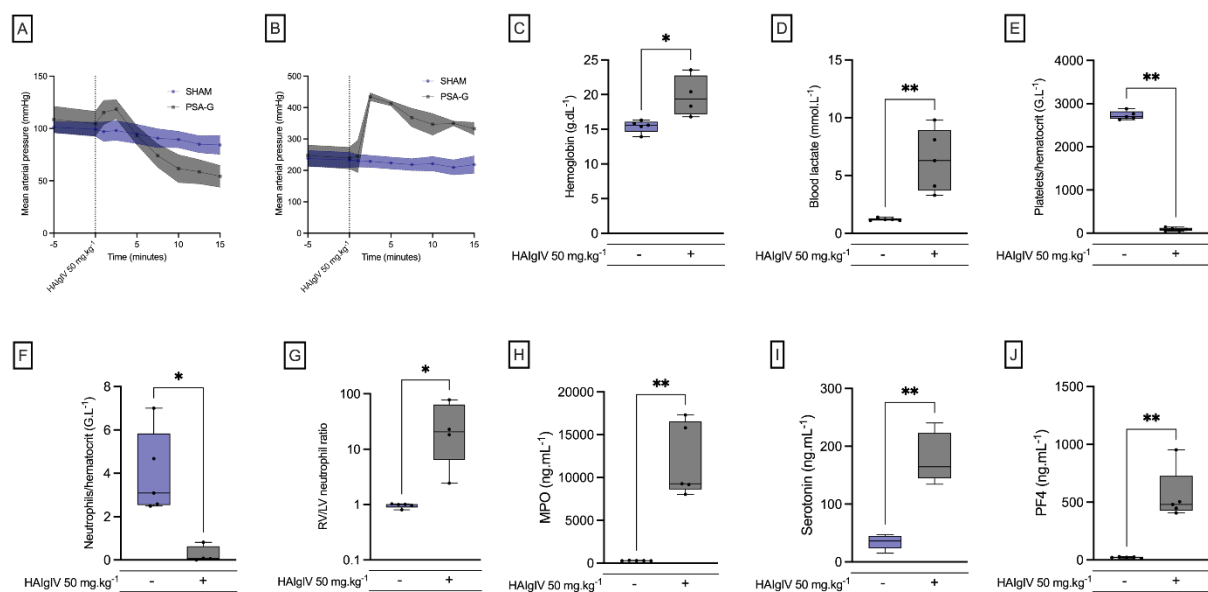


Figure 3: Characteristics of IgG-mediated passive systemic anaphylaxis (PSA-G – intravenous injection of HAIgG 50 mg.kg⁻¹ in transgenic hCD32A+ mice – n=5) compared with SHAM (i.v. injection of vehicle – n=5) evaluated during 15 min following injection. (**A-B**) Evolution of mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) following injection of HAIgG (PSA-G) or vehicle (SHAM) in hCD32A+ mice. (**C**) hemoglobin level, (**D**) blood lactate level, (**E**) corrected platelet count (platelet/hematocrit), (**F**) corrected neutrophil count (neutrophil/hematocrit), (**G**) right cardiac ventricle to left cardiac ventricle ratio (RV/LV ratio) of neutrophils. (**H**) Myeloperoxidase (MPO) plasma level, (**I**) Serotonin plasma level, (**J**) PF4 plasma level.

Injection of anti-GPIIb/IIIa mAb resulted in a large and significant decrease in platelet count on the day of surgery (32 [22-32] vs. 1100 [796-1270] G.L⁻¹, p<0.01) (**Figure 4A**). HAlgG injection in the thrombocytopenic group (TPSA-G) resulted in a less severe response than in the group with normal platelet count (PSA-G) with MAP at T15 at 78 [74-88] mmHg in the TPSA-G group (**Figure 4B**). The increase in heart rate observed in the PSA-G group was completely abolished in the TPSA-G group (**Figure 4C**). Blood lactate concentration was lower in the TPSA-G group compared with the PSA-G group (2.6 [2.3-3.3] vs. 6.8 [3.7-8.5] mmol.L⁻¹, p=0.02) (**Figure 4D**). Hemoglobin level was also lower in the TPSA-G group compared with the PSA-G group (16.3 [15.8-17.2] vs. 19.4 [17.2-22.8] G.L⁻¹, p=0.03). Neutrophil count and RV/LV ratio were unchanged in the thrombocytopenic group (data not shown).

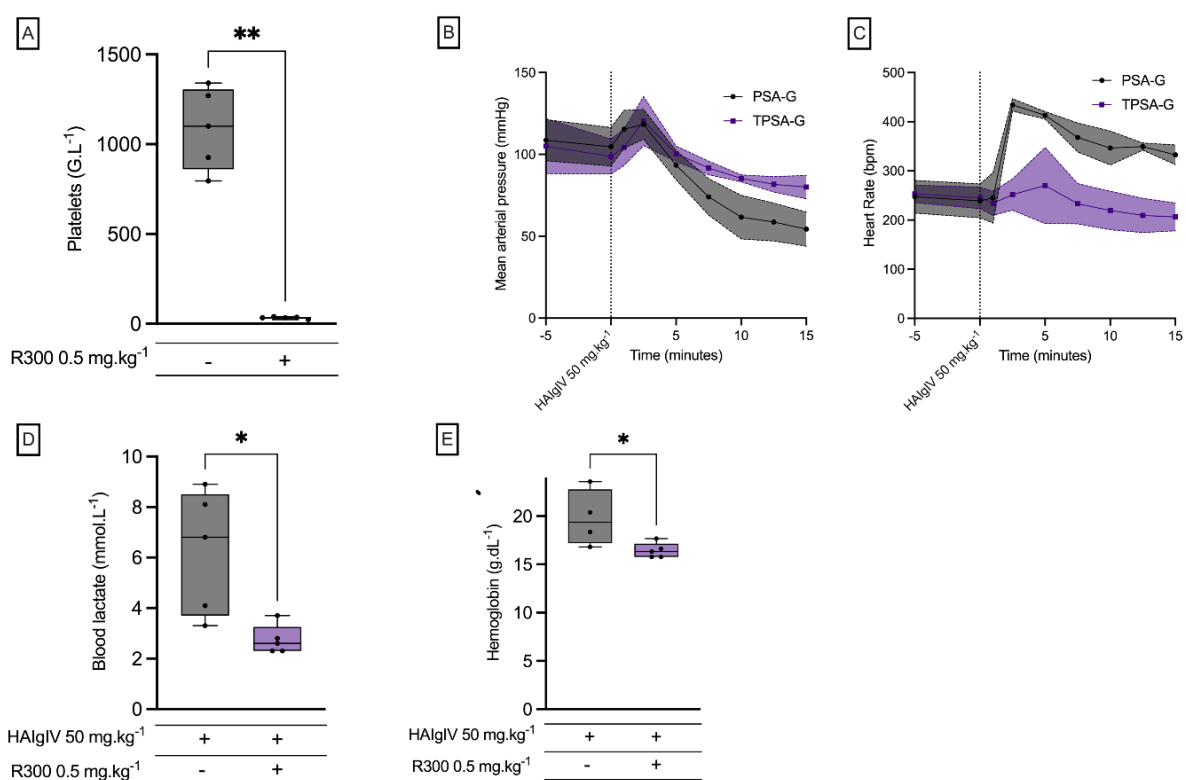


Figure 4: Effect of platelet depletion in IgG-mediated passive systemic anaphylaxis (PSA-G – intravenous injection of HAlgG 50 mg.kg⁻¹ in transgenic hCD32A+ mice – n=5). Thrombocytopenia (TPSA-G – n=5) was induced by intravenous injection of R300 0.5 mg.kg⁻¹ 24 hours before the procedure. (A) Platelet count before shock induction, (B) Time course of mean arterial pressure, (C) Time course of heart rate, (D) Blood lactate level, (E) Hemoglobin level.

Anaphylactic shock (AS) in Brown Norway rats

Ovalbumin caused a rapid and significant decrease in mean arterial pressure (MAP) in the attenuated AS (AAS) and lethal AS (LAS) groups, with a minimum MAP value of 36 [33-55] mmHg and 22 [19-26] mmHg, respectively (**Figure 5A**). AS also resulted in a significant increase in hematocrit in the AAS and LAS groups compared with the SHAM group (respectively 51 [48-55] %, 60 [55-62] % and 40 [39-41] %; SHAM vs. AAS $p=0.02$ and SHAM vs. LAS $p<0.001$) (**Figure 5B**).

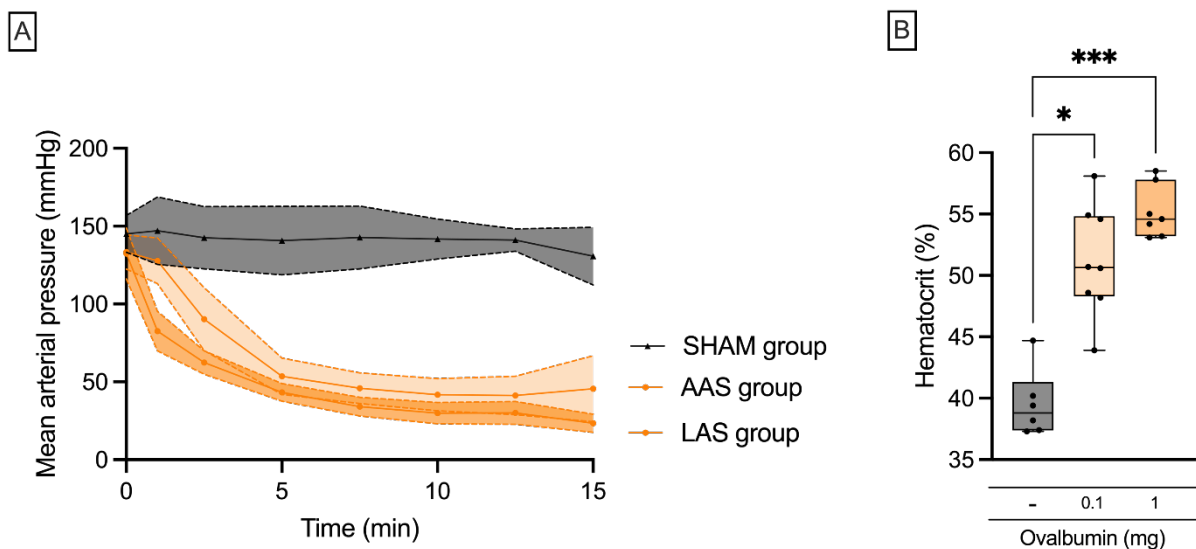


Figure 5: Description of anaphylactic shock in the lethal anaphylactic shock group (LAS - ovalbumin injection 1 mg/1 mL – n=5) and the attenuated anaphylactic shock group (AAS - ovalbumin injection 0.1 mg/1 mL – n=7) compared with the SHAM group (0.9% NaCl injection 1 mL – n=5). **(A)** Evolution of mean arterial pressure (MAP); **(B)** Hematocrit 15 minutes after ovalbumin (or vehicle) injection.

Hematological characteristics of AS in Brown Norway rats

AS was characterized by a significant decrease in circulating platelet counts in the AAS and LAS groups compared with the SHAM group (374 [341-443] G.L⁻¹, 323 [299-377] G.L⁻¹, and 670 [549-726] G.L⁻¹, respectively; SHAM vs. LAS $p < 0.001$ and SHAM vs. AAS $p < 0.05$) (**Figure 6A**). This decrease was even larger when correcting for hemoconcentration (539 [480-683], 734 [629-875] and 1586 [1281-1885] G.L⁻¹ respectively, for a hematocrit at 1). A profound and significant decrease in the corrected circulating neutrophil count was observed in the LAS groups (0.00 [0.00-0.04] G.L⁻¹ vs. SHAM 2.08 [1.41-2.34] G.L⁻¹; SHAM vs. LAS $p < 0.0001$). This decrease was also important in the AAS group although not statistically significant in comparison with the SHAM group (**Figure 6B**). A significant decrease in the number of blood monocytes and lymphocytes was also observed, but only in the LAS group (**Figure 6C and 6D**). Lymphocyte counts tended to decrease in the AAS group compared to the SHAM group, although this difference did not reach statistical significance.

Comparison of right ventricular (RV) and left ventricular (LV) blood samples showed significant differences in the number of neutrophils, monocytes and lymphocytes, but only in the LAS group and particularly marked for neutrophils. The right to left ventricle ratio (RV/LV ratio) for platelets, neutrophils, monocytes, and lymphocytes is shown in **Figure 6E, F, G, H**.

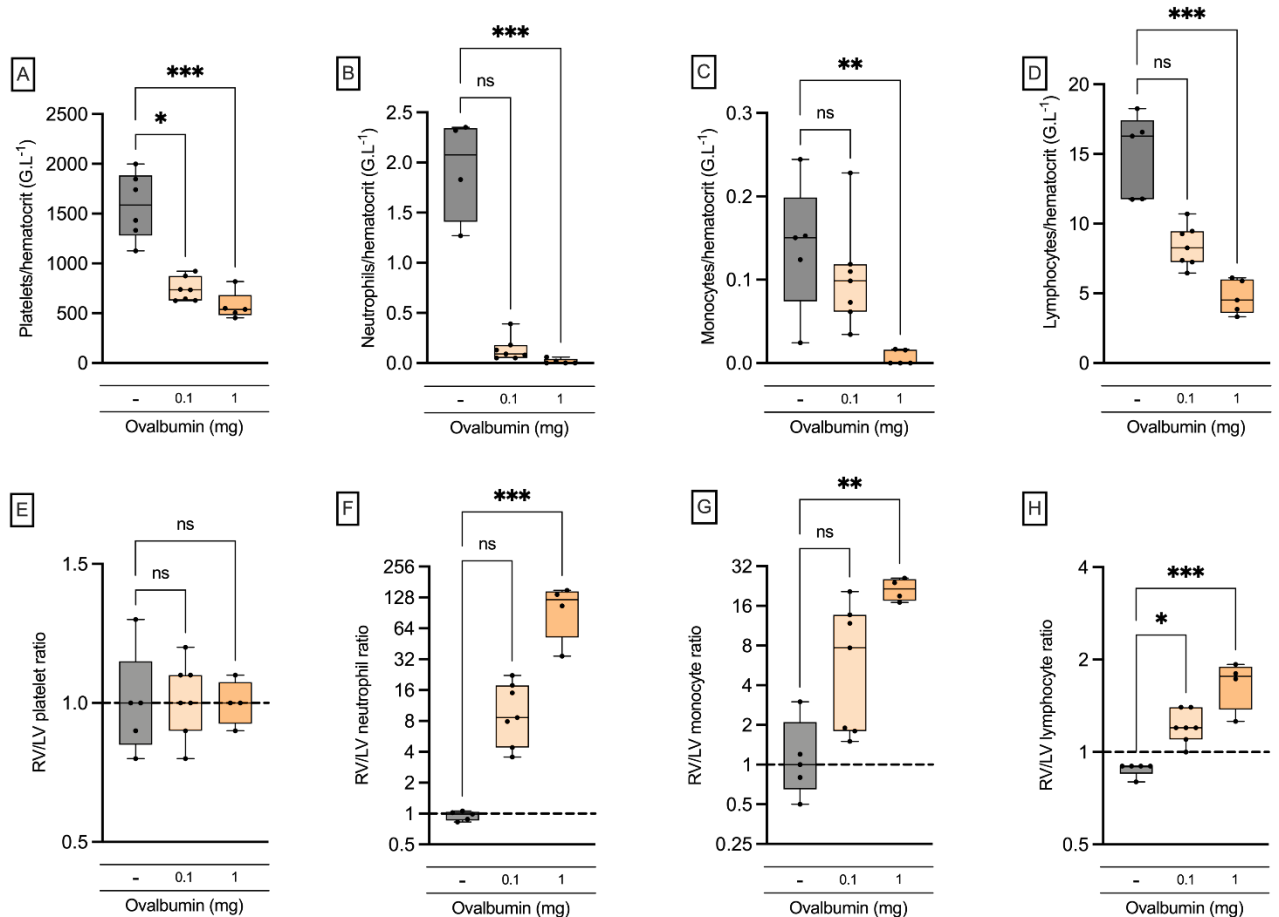


Figure 6: Hematological characteristics of attenuated anaphylactic shock (AAS - 0.1 mg ovalbumin – n=5) and lethal anaphylactic shock (LAS - 1 mg ovalbumin – n=5) compared with the SHAM group (vehicle only – n=7): absolute count of platelets (A), neutrophils (B), monocytes (C) and lymphocytes (D), and right ventricle (RV)/left ventricle (LV) ratio for platelets (E), neutrophils (F), monocytes (G), and lymphocytes (H). * p<0.05; ** p<0.01; * p<0.001.**

LAS was also associated with a significant increase in plasma concentrations of serotonin (**Figure 7A**) and myeloperoxidase (MPO) (**Figure 7B**). The peak of plasmatic serotonin was observed 5 minutes after ovalbumin injection (LAS 40 [29-41] vs. SHAM 19 [18-27] ng.mL⁻¹, p=0.02) while the peak of MPO was observed 15 minutes after ovalbumin injection (T15) (LAS 12632 [8648-13944] vs. SHAM 2497 [2245-2556] ng.mL⁻¹, p<0.0001). MPO tended to increase in the AAS group at T15 although it was not significant (**Figure 7C**).

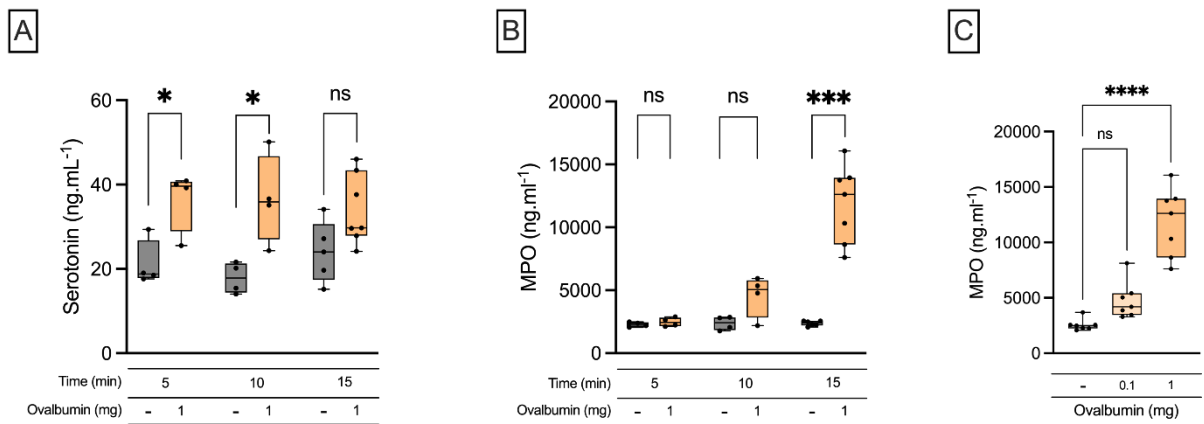


Figure 7: Plasmatic concentrations of serotonin (A) and myeloperoxidase (MPO) (B) 5, 10 and 15 minutes after induction of a lethal anaphylactic shock (LAS – 1 mg ovalbumin) compared with the SHAM group (injection of vehicle only). (C) Comparison of plasmatic concentration of MPO between the SHAM group, the attenuated anaphylactic shock group (AAS - 0.1 mg ovalbumin) and the LAS group. * p<0.05; * p<0.001; **** p<0.0001.**

Impact of thrombocytopenia on anaphylactic shock in Brown Norway rats

Injection of mouse anti-rat GPIIb/IIIa mAb (RPM-14, 2 mg.kg⁻¹) resulted in a significant decrease in platelet count before induction of AS compared with no injection (37 [21-50] vs. 694 [658-766] G.L⁻¹, p<0.001) (**Figure 8A**). There was no difference in mean arterial pressure at T15 between the LAS group and the thrombocytopenic lethal AS (TLAS) group (data not shown). Induction of thrombocytopenia before attenuated anaphylactic shock (TAAS) resulted in a less severe reaction (**Figure 8B**) with a significantly higher mean arterial pressure 15 minutes after ovalbumin injection (T15) compared with the AAS group (60 [55-77] vs 36 [33-55] mmHg, p<0.01). Hematocrit at T15 was not different between the TAAS and AAS groups (data not shown). Absolute neutrophil count in the left ventricle was significantly increased and the right to left ventricle ratio (RV/LV ratio) of neutrophils was significantly decreased in the TAAS group compared with the AAS group (**Figure 8C, E**). MPO was not different between the AAS and TAAS groups (4610 [3563-6085] vs. 4711 [4356-7044] ng.mL⁻¹, p=ns). The monocyte count and the RV/LV ratio tended to be modified by thrombocytopenia although it was not statistically significant (**Figure 8D, F**).

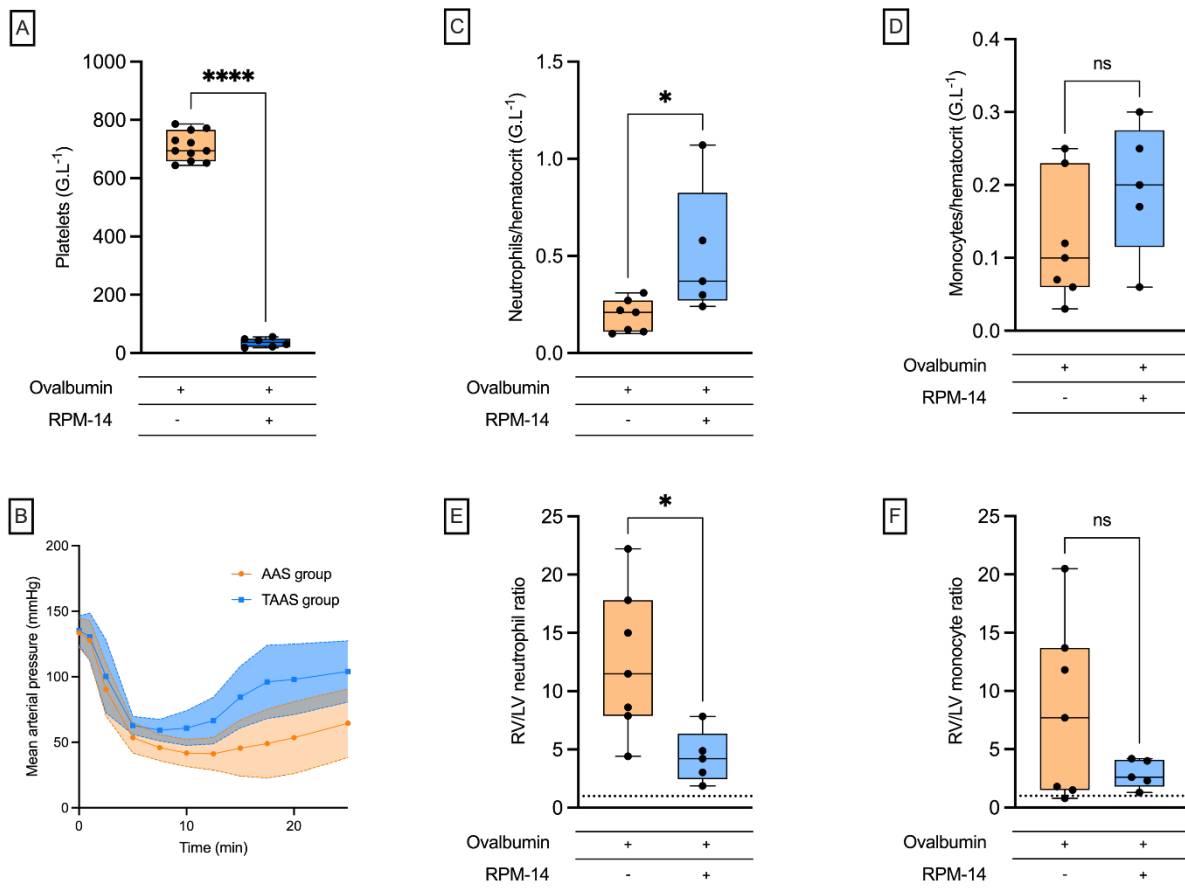


Figure 8: Effect of thrombocytopenia on attenuated anaphylactic shock (AAS): (A) platelet count before AS induction; (B) evolution of mean arterial pressure within the first 30 minutes after induction of AS in an attenuated anaphylactic shock group (AAS – injection of 0.1 mg ovalbumin – n=7) and thrombocytopenia in an attenuated anaphylactic shock (TAAS – intravenous injection of RPM-14 2 mg.kg⁻¹ followed by an injection of 0.1 mg ovalbumin 4 hours later – n=5); (C) left ventricle platelet count; (D) left ventricle monocyte count; (E) neutrophil right to left ventricle ratio; (F) monocyte right to left ventricle ratio.

Discussion

The main findings of this study are (i) both IgE- and IgG-mediated reactions can induce anaphylactic shock in mice, as evidenced by arterial hypotension in both groups, associated with tachycardia, hemoconcentration and hyperlactatemia; (ii) both mechanisms are associated with a decrease in platelet count, but only IgG-mediated reactions are associated with a severe decrease in platelet count and a concomitant increase in plasma PF4 and serotonin levels; (iii) only IgG-mediated reactions are associated with a decrease in neutrophil count, together with an increase in MPO plasma level and a gradient from the right to the left ventricle of the heart, indicating possible pulmonary trapping of neutrophils during IgG-mediated reactions; (iv) platelets appear to play an opposite role in IgE- and IgG-mediated anaphylaxis, with platelets being an aggravating factor in IgG-mediated reaction whereas platelets appear to limit the severity of the IgE-mediated reaction; (v) active lethal anaphylactic shock induced by ovalbumin in Brown Norway rats, classically described as IgE-mediated, is associated with several specific features of IgG-mediated reactions (thrombocytopenia, neutropenia, right to left ventricular neutrophil gradient) and the intensity of shock is correlated with these markers; (vi) thrombocytopenia in the rat model is associated with a decrease in the severity of the reaction, suggesting that platelets may represent a therapeutic target in these reactions.

Most studies using experimental models of anaphylaxis in mice rely on body temperature to assess the occurrence and severity of anaphylaxis^{13, 14, 16-18}. Only few studies assessed arterial pressure in these models^{19, 20}. Although used for a long time, the use of body temperature as a marker of anaphylaxis is still debated because it does not reflect the clinical signs observed in humans and no study has ever evaluated the correlation between a decrease in body temperature and the decrease in MAP²¹. Thus, it is not clear yet whether a drop in body temperature really reflects anaphylactic shock in the absence of measurement of any other sign. Anaphylactic shock is classically described as arterial hypotension, frequently associated with tachycardia²². Cellular hypoxia due to decreased arterial O₂ transportation leads to a shift to anaerobic metabolism and lactate production. Increased vascular permeability leads to capillary leakage and hemoconcentration. We show here that both experimental IgE- and IgG-mediated reactions in mice meet all the criteria for anaphylactic shock equivalent to a grade II or III reaction in humans, according to the modified Ring & Messmer classification.

Platelets have previously been described as a key player in IgG-mediated reactions through Fc γ RIIA signaling. In mouse models of IgG-mediated anaphylaxis, thrombocytopenia, Fc γ RIIA receptor blockade, depletion of platelet serotonin content, or serotonin receptor antagonism led to a significant reduction in the severity of the reaction (assessed by body temperature associated to capillary leakage)^{13, 14, 23}. We confirm here the key role of platelets in the severity of these reactions as shown by the effect of thrombocytopenia on blood pressure and blood lactate level.

The role of platelets during IgE-mediated reactions is less known. Several studies in experimental models of active anaphylaxis have shown that the platelet count decreased during anaphylaxis due to pulmonary trapping and that platelet depletion may reduce the intensity of the reaction^{7, 24-28}. However, since all these studies were based on a process of active sensitization of the animals, the production of specific IgE could have been associated with the production of specific IgG against the antigen and thus both pathways could have been activated at the same time, preventing any definite conclusion on the role of platelets following activation of the IgE-Fc ϵ RI pathway. Our results indicate that platelets are activated during IgE-mediated anaphylaxis but to a lesser extent than in IgG-mediated anaphylaxis. Since mouse platelets do not express the Fc ϵ RI receptor on their surface, the mechanism leading to platelet activation during IgE-mediated reaction is still unknown and further investigations are needed. Interestingly, platelet depletion led to an opposite effect to the IgG-mediated reaction, with increased severity in the thrombocytopenic group of mice, resulting in the death of several mice. These results are difficult to interpret but indicate that platelets may have an influence on the severity of IgE-mediated anaphylactic shock. The underlying mechanism is still unknown, but similar effects have been described in experimental models of septic shock²⁹. One of the main hypotheses is that platelets may help maintain vascular integrity by counteracting increased vascular permeability during anaphylactic shock or by preventing spontaneous bleeding in a highly pro-inflammatory environment. The mechanisms and receptors involved in this process remain to be identified with mice lacking receptors described to be key for the role of platelets in hemostasis and in preventing spontaneous bleeding in the context of a strong pro-inflammatory environment^{31, 32}. Another hypothesis is that the Fc ϵ RII/CD23 receptor, described as present on the surface of platelets in humans, may play a role in limiting the severity of the reaction. Indeed, the function of the Fc ϵ RII/CD23 receptor albeit not well understood is thought to have a

regulatory effect on the FcεRI-induced response³⁰. Further research is needed to assess whether the FcεRII/CD23 receptor is present on rodent platelets. Regarding the difference between IgE- and IgG-mediated reactions, the prominent role of platelets in the initiation and amplification of the IgG-mediated reaction via FcγRIIA signaling may completely mask a similar protective effect of platelets in this inflammatory shock model.

Neutrophils do not appear to have a direct role in IgE-mediated anaphylaxis but appear to be directly involved in IgG-mediated anaphylaxis. Several studies have shown that neutrophils play a key role, along with platelets, in IgG-mediated reactions^{14, 33}. IgG-mediated reactions are associated with neutrophil activation and secretion. Interestingly, we observed that IgG-mediated reactions are associated with a significant neutrophil gradient between the right and left heart ventricles, indicating possible pulmonary neutrophil trapping. The contribution of neutrophil activation and pulmonary sequestration to the severity of the reaction remains to be studied, but similar pulmonary neutrophil sequestration has been described in other pathological conditions, particularly related with lung inflammation such as severe acute respiratory distress syndrome^{34, 35}.

Plasma markers of platelet (serotonin and PF4) and neutrophil (MPO) secretion were increased only in IgG-mediated reactions, whereas MMCP-1, a marker of mast cell secretion, was increased only in IgE-mediated reactions. Thus, comparative study of the concentration of these markers in plasma may be of interest to distinguish these mechanisms.

Ovalbumin-induced anaphylactic shock in the Brown Norway rat is a well-described and widely used active systemic anaphylaxis model³⁶⁻³⁸. The advantage of this model is that it allows for resuscitation measures similar to those in humans, which allows for testing of new therapeutic strategies. Moreover, this model is fatal in less than 20 minutes without treatment, making it possible to study the most severe forms of anaphylactic shock.

This model has been described as mainly IgE-mediated, although ovalbumin-specific IgGs have also been detected after the sensitization period³⁹⁻⁴¹. Our results indicate that platelets and neutrophils are activated in this model with characteristics similar to those observed in the passive IgG-mediated anaphylaxis model. Interestingly, the increase in plasma MPO concentration appears later than the increase in plasma serotonin, which may indicate sequential platelet and neutrophil activation.

Two hypotheses can be drawn from all these observations: either the IgG pathway contributes to, or is responsible for, the reaction, or the passive IgE-mediated anaphylactic

shock was not severe enough to demonstrate the involvement of neutrophils in this pathway and to induce a more significant thrombocytopenia. Given the attenuation of the severity of the reaction in thrombocytopenic rats, the contribution of an IgG pathway to the severity of the reaction seems likely, although the involvement of the IgG pathway alone is unlikely, because thrombocytopenia did not alter the course of the shock in the LAS group. Interestingly, neither the IgE- nor the IgG-mediated passive reaction alone was severe enough to be lethal. The development of very severe or lethal anaphylactic shock may require the simultaneous contribution of these two different pathways, exceeding the organism's ability to compensate. This is particularly interesting to study because these situations are those that occur in humans with epinephrine-refractory anaphylactic shock, making the testing of new therapeutic strategies in this rat model particularly appropriate. Regardless the mechanism involved, our results indicate that platelets may represent a therapeutic target in this active systemic anaphylactic shock model. Further research is needed to assess the effect of antiplatelet therapies such as aspirin or P2Y₁₂ receptor inhibitors in this model.

A major limitation of this study is the difficulty of relating observations on passive models of anaphylaxis to observations on active models of anaphylaxis. Passive models are useful for understanding the underlying mechanisms of anaphylaxis but do not represent the full complexity of active anaphylaxis. On the other hand, models of active sensitization are closer to what is observed in humans, but these models may suffer from some biases related to the sensitization process. The adjuvant used to simulate the immune response (aluminum hydroxide, Freund's adjuvant) could artificially orient the immunization process towards the pathway mediated by either IgE or IgG, which would make extrapolation to humans questionable. A major effort must be made to better understand the underlying mechanism of sensitization in both active animal models and patients with anaphylaxis to ensure that our models accurately reflect this pathology. Another limitation is the use of HAIgG to mimic IgG-mediated reactions. Although HAIgGs are able to activate FcγRs, they do not reflect the complexity of the interaction between antigens and specific IgGs, and the formation of immune complexes, which is required to initiate a reaction. The development of new models of passive IgG-mediated reactions, based on passive sensitization with specific IgG, appears essential.

In conclusion, our results show that the role played by platelets in anaphylaxis is complex and differs according to the model used and the mechanism tested. Platelets are

essential for the initiation and amplification of IgG-mediated reactions whereas they appear to prevent severe hemodynamic impairment in IgE-mediated reactions. Neutrophils are mainly involved in IgG-mediated reactions with rapid and intense right to left ventricle gradient. Further research is warranted to determine whether this gradient is related to pulmonary sequestration and whether this sequestration contributes to the severity of the reaction. The anaphylactic shock induced by ovalbumin in Brown Norway rats seems to involve, at least partially, an activation of the IgG pathway. Targeting platelets to develop new therapeutic strategies in this model seems to be of interest for further research.

References

- 1 Simons FE, Arduzzo LR, Bilo MB, et al. International consensus on (ICON) anaphylaxis. *World Allergy Organ J* 2014; **7**: 9
- 2 Panesar SS, Javad S, de Silva D, et al. The epidemiology of anaphylaxis in Europe: a systematic review. *Allergy* 2013; **68**: 1353-61
- 3 Reitter M, Petitpain N, Lata arche C, et al. Fatal anaphylaxis with neuromuscular blocking agents: a risk factor and management analysis. *Allergy* 2014; **69**: 954-9
- 4 Guerci P, Tacquard C, Chenard L, et al. Epidemiology and outcome of patients admitted to intensive care after anaphylaxis in France: a retrospective multicentre study. *British journal of anaesthesia* 2020
- 5 Ebo DG, Clarke RC, Mertes PM, Platt PR, Sabato V, Sadleir PHM. Molecular mechanisms and pathophysiology of perioperative hypersensitivity and anaphylaxis: a narrative review. *British journal of anaesthesia* 2019; **123**: e38-e49
- 6 Hasegawa S, Pawankar R, Suzuki K, et al. Functional Expression of the High Affinity Receptor for IgE (FcεRI) in Human Platelets and Its' Intracellular Expression in Human Megakaryocytes. *Blood* 1999; **93**: 2543-51
- 7 Pinckard RN, Halonen M, Palmer JD, Butler C, Shaw JO, Henson PM. Intravascular aggregation and pulmonary sequestration of platelets during IgE-induced systemic anaphylaxis in the rabbit: abrogation of lethal anaphylactic shock by platelet depletion. *J Immunol* 1977; **119**: 2185-93
- 8 Vadas P, Perelman B, Liss G. Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013; **131**: 144-9
- 9 Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, et al. Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010; **125**: 1137-45 e6
- 10 Bermejo N, GuÉAnt JL, Mata E, GguÉRard P, Moneret-Vautrin DA, Laxenaire MC. Platelet Serotonin Is a Mediator Potentially Involved in Anaphylactic Reaction to Neuromuscular Blocking Drugs. *British journal of anaesthesia* 1993; **70**: 322-5
- 11 Cyphert JM, Kovarova M, Allen IC, et al. Cooperation between mast cells and neurons is essential for antigen-mediated bronchoconstriction. *J Immunol* 2009; **182**: 7430-9
- 12 Francis A, Bosio E, Stone SF, et al. Neutrophil activation during acute human anaphylaxis: analysis of MPO and sCD62L. *Clinical & Experimental Allergy* 2017; **47**: 361-70

- 13 Beutier H, Hechler B, Godon O, et al. Platelets expressing IgG receptor FcγRIIA/CD32A determine the severity of experimental anaphylaxis. *Sci Immunol* 2018; **3**
- 14 Jonsson F, de Chaisemartin L, Granger V, et al. An IgG-induced neutrophil activation pathway contributes to human drug-induced anaphylaxis. *Sci Transl Med* 2019; **11**
- 15 Tacquard C, Oulehri W, Collange O, et al. Treatment with a Platelet Activating Factor receptor antagonist improves hemodynamics and reduces epinephrine requirements, in a lethal rodent model of anaphylactic shock. *Clin Exp Allergy* 2019
- 16 Hox V, Desai A, Bandara G, Gilfillan AM, Metcalfe DD, Olivera A. Estrogen increases the severity of anaphylaxis in female mice through enhanced endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2015; **135**: 729-36 e5
- 17 Rathod S, Ramsey M, Relling MV, Finkelman FD, Fernandez CA. Hypersensitivity reactions to asparaginase in mice are mediated by anti-asparaginase IgE and IgG and the immunoglobulin receptors FcεRI and FcγRIII. *Haematologica* 2019; **104**: 319-29
- 18 Wu T, Ma L, Jin X, et al. S100A4 Is Critical for a Mouse Model of Allergic Asthma by Impacting Mast Cell Activation. *Front Immunol* 2021; **12**: 692733
- 19 Wang M, Shibamoto T, Tanida M, Kuda Y, Kurata Y. Mouse anaphylactic shock is caused by reduced cardiac output, but not by systemic vasodilatation or pulmonary vasoconstriction, via PAF and histamine. *Life sciences* 2014; **116**: 98-105
- 20 Sala-Cunill A, Bjorkqvist J, Senter R, et al. Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2015; **135**: 1031-43 e6
- 21 Platts-Mills TA, Eid RC, Keshavarz B. Of Mice and Men, MMXXI: Anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2021
- 22 Mertes PM, Collange O, Degirmenci SE, Tacquard C, Petitpain N, Malinovsky J-M. Le choc anaphylactique. *Anesthésie & Réanimation* 2015; **1**: 33-42
- 23 Cloutier N, Allaey I, Marcoux G, et al. Platelets release pathogenic serotonin and return to circulation after immune complex-mediated sequestration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2018

- 24 Henson PM. Activation of rabbit platelets by platelet-activating factor derived from IgE-sensitized basophils. Characteristics of the aggregation and its dissociation from secretion. *The Journal of clinical investigation* 1977; **60**: 481-90
- 25 Pretolani M, Page CP, Lefort J, Lagente V, Vargaftig BB. Pharmacological modulation of the respiratory and haematological changes accompanying active anaphylaxis in the guinea-pig. *European journal of pharmacology* 1986; **125**: 403-9
- 26 Leir SH, Chen SH, Lei HY. Horse gammaglobulin-induced thrombocytopenia in anaphylaxis involving sequestration and activation of platelets. *Clin Exp Allergy* 1995; **25**: 273-80
- 27 Withers GD, Kubes P, Ibbotson G, Scott RB. Anaphylaxis-induced mesenteric vascular permeability, granulocyte adhesion, and platelet aggregates in rat. *The American journal of physiology* 1998; **275**: H274-84
- 28 Yoshida A, Ohba M, Wu X, Sasano T, Nakamura M, Endo Y. Accumulation of platelets in the lung and liver and their degranulation following antigen-challenge in sensitized mice. *British journal of pharmacology* 2002; **137**: 146-52
- 29 Xiang B, Zhang G, Guo L, et al. Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway. *Nat Commun* 2013; **4**: 2657
- 30 Engeroff P, Vogel M. The role of CD23 in the regulation of allergic responses. *Allergy* 2021; **76**: 1981-9
- 31 Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, et al. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *The Journal of clinical investigation* 2013; **123**: 908-16
- 32 Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 1456-67
- 33 Jonsson F, Mancardi DA, Albanesi M, Bruhns P. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *Journal of leukocyte biology* 2013; **94**: 643-56
- 34 Brown GM, Brown DM, Donaldson K, Drost E, MacNee W. Neutrophil sequestration in rat lungs. *Thorax* 1995; **50**: 661-7
- 35 Park I, Kim M, Choe K, et al. Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury. *The European respiratory journal* 2019; **53**
- 36 Tajima K, Zheng F, Collange O, et al. Time to achieve target mean arterial pressure during resuscitation from experimental anaphylactic shock in an animal model. A comparison of

adrenaline alone or in combination with different volume expanders. *Anaesthesia and intensive care* 2013; **41**: 765-73

37 Zheng F, Barthel G, Collange O, et al. Methylene blue and epinephrine: a synergetic association for anaphylactic shock treatment. *Critical care medicine* 2013; **41**: 195-204

38 Zheng F, Collange O, Davidson J, et al. Epinephrine, compared with arginine vasopressin, is associated with similar haemodynamic effects but significantly improved brain oxygenation in the early phase of anaphylactic shock in rats: An experimental study. *European journal of anaesthesiology* 2015; **32**: 563-70

39 Bellou A, Saint-Laudy J, Knippels L, et al. Brown Norway rat ovalbumin-specific immunoglobulin E antibodies increase the human basophil expression of CD63 marker. *Scandinavian journal of immunology* 2003; **57**: 271-8

40 Sun N, Zhou C, Pu Q, Wang J, Huang K, Che H. Allergic reactions compared between BN and Wistar rats after oral exposure to ovalbumin. *J Immunotoxicol* 2013; **10**: 67-74

41 Abril-Gil M, Garcia-Just A, Perez-Cano FJ, Franch A, Castell M. Development and characterization of an effective food allergy model in Brown Norway rats. *PloS one* 2015; **10**: e0125314

2.3. Conclusion

Les 3 modèles utilisés dans ce travail remplissent les conditions d'un état de choc anaphylactique avec la survenue rapide d'une hypotension artérielle, d'une hyperlactatémie et d'une hémococoncentration dans les suites de l'exposition à un antigène ou à des HAIgG.

De manière intéressante, les profils cellulaires et les concentrations en marqueurs spécifiques de l'activation mastocytaire, plaquettaire et des neutrophiles, sont différents entre les réactions médiées par les IgE et les réactions médiées par les IgG. Les réactions médiées par les IgE sont marquées par une thrombopénie modérée, sans anomalie franche de la formule leucocytaire, et par une augmentation franche de la concentration en MMCP-1 (mouse mast cell protease 1), un marqueur d'activation mastocytaire, sans sécrétion de MPO. Le niveau de sérotonine et de PF4 tendait à augmenter en cas de réaction IgE, sans pour autant être statistiquement différent des animaux contrôles. À l'inverse, les réactions médiées par les IgG sont caractérisées par la survenue précoce d'une thrombopénie importante associée à une neutropénie profonde, une monocytopénie et une lymphopénie. La MPO est sécrétée en quantité abondante, tout comme la sérotonine et le PF4. Il existe un gradient important de polynucléaires neutrophiles entre le ventricule droit et le ventricule gauche, évocateur d'une séquestration pulmonaire. Ces éléments sont également retrouvés dans le modèle d'anaphylaxie active induite par l'ovalbumine chez le rat Brown Norway avec, là aussi, une thrombopénie importante, une neutropénie associée à un gradient pulmonaire de neutrophiles et une sécrétion de marqueurs plaquettaires et des neutrophiles.

L'effet de la déplétion plaquettaire s'est avéré différent selon le mécanisme considéré avec une aggravation de la symptomatologie et le décès de la plupart des animaux dans le modèle IgE qui s'oppose à une diminution de l'intensité de l'état du choc anaphylactique dans le modèle d'anaphylaxie IgG. De manière intéressante, la déplétion plaquettaire était aussi associée à une réduction de la sévérité de la réaction chez le rat Brown Norway, mais uniquement en cas de réaction atténuée, non létale.

Ces données indiquent que la contribution des plaquettes à la sévérité de la réaction dépend du mécanisme initiateur. L'effet observé dans le modèle IgE n'est pour l'heure pas expliqué. Il pourrait impliquer le récepteur à faible affinité aux IgE, FcεRII/CD23, qui pourrait jouer un rôle de régulateur en cas de réaction allergique⁴³. Ce récepteur a été décrit comme étant présent à la surface des plaquettes sanguines mais la vérification de cette information

est nécessaire. L'effet observé pourrait également être lié à un rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire, en contribuant à limiter l'augmentation de la perméabilité vasculaire ou les saignements spontanés en contexte inflammatoire.

Nos données confirment que les plaquettes sont un effecteur clé dans les réactions IgG-médiées. Les données issues du modèle d'anaphylaxie active chez le rat Brown Norway sont plus difficiles à interpréter mais pourraient indiquer soit une composante IgG dans ce modèle décrit de longue date comme IgE, soit mettre en évidence une conséquence d'une activation très intense de la voie IgE.

De manière intéressante, aucun modèle passif n'était spontanément létal et l'apparition d'un état de choc réfractaire pourrait nécessiter la mise en jeu concomitante des voies IgE et IgG.

L'extrapolation de ces données vers d'autres modèles et vers l'Homme reste difficile en raison des méconnaissances actuelles sur les mécanismes impliqués dans les réactions anaphylactiques chez l'Homme.

Article N°3

Le traitement par un antagoniste du récepteur au Platelet Activating Factor permet une amélioration hémodynamique et diminue les besoins en adrénaline dans un modèle de choc anaphylactique léthal chez le rat.

Manuscrit publié

Treatment with a platelet-activating factor receptor antagonist improves hemodynamics and reduces epinephrine requirements, in a lethal rodent model of anaphylactic shock

Charles Tacquard, Walid Oulehri, Olivier Collange, Lene H. Garvey, Susan Nicoll, Nicolas Tuzin, Bernard Geny, Paul M. Mertes

Clinical and Experimental Allergy 2020 Mar;50(3):383-390

3.1. Introduction

Le choc anaphylactique est l'expression la plus sévère des réactions d'hypersensibilité immédiate⁸¹. La période périopératoire est associée à un risque particulièrement élevé de choc anaphylactique, notamment en raison de l'utilisation concomitante de nombreux traitements, injectés en intraveineux, et dont certains sont associés à une fréquence élevée de réactions allergiques³. La mortalité des réactions périopératoires est élevée, estimée à 4,1% en France en cas de réaction impliquant un curare, et ce, malgré une reconnaissance rapide de la réaction et l'administration très précoce d'adrénaline, le traitement de référence⁷⁸. L'existence de ces formes mortelles de choc anaphylactique en dépit d'un traitement bien conduit nous indique que certains chocs anaphylactiques sont réfractaires au traitement par adrénaline et qu'il est nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour prendre en charge ces patients.

Plusieurs études ont rapporté une augmentation de la concentration circulante de Platelet Activating Factor (PAF) au cours du choc anaphylactique, avec une concentration d'autant plus élevée que la réaction est sévère³⁸. Le PAF a des effets cardiovasculaires (vasodilatation, diminution de la contractilité myocardique) et respiratoires (bronchoconstriction) qui pourraient contribuer à la symptomatologie observée au cours du choc anaphylactique. Le PAF est produit par de nombreuses cellules mais principalement par les plaquettes et les polynucléaires neutrophiles. Le PAF est dégradé par une enzyme, la PAF-acetylhydrolase^{37, 56}.

L'ABT-491 est un antagoniste spécifique du récepteur au PAF, bien décrit dans la littérature et déjà testé dans des modèles d'allergie à l'arachide et de rhinite allergique¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Il n'a cependant jamais été testé en traitement dans un modèle de choc anaphylactique.

L'objectif de ce travail était, d'une part, de confirmer la sécrétion de PAF au cours du choc anaphylactique dans un modèle létal de choc anaphylactique actif induit par l'ovalbumine chez le rat Brown Norway et, d'autre part, sur la base d'une caractérisation fine des atteintes hémodynamiques dans ce modèle, d'évaluer l'effet d'un traitement par ABT-491 seul ou en association avec l'adrénaline.

Pour ce faire, des rats préalablement sensibilisés à l'ovalbumine étaient anesthésiés, trachéotomisés et ventilés de manière mécanique. Un cathéter était inséré dans la carotide interne gauche pour mesurer la pression artérielle en continu. Une sonde de Millar était

insérée dans le ventricule gauche via la carotide droite afin de mesurer les pressions ventriculaires et d'en déduire des indices de contractilité, notamment de dP/dt maximal. La fonction ventriculaire gauche était également évaluée par échographie trans-thoracique. Un cathéter veineux central était inséré au niveau de la veine jugulaire droite pour l'administration des traitements. Le choc anaphylactique était induit par l'administration intraveineuse d'ovalbumine. Plusieurs groupes étaient comparés : groupe témoin (pas de choc), groupe CHOC sans traitement, traitement par ABT-491 (1 mg/kg), adrénaline (10 µg/kg/min en perfusion continue) et association ABT-491 et adrénaline.

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Experimental Models of Allergic Disease

Treatment with a platelet-activating factor receptor antagonist improves hemodynamics and reduces epinephrine requirements, in a lethal rodent model of anaphylactic shock

Charles Tacquard^{1,2}  | Walid Oulehri^{1,3} | Olivier Collange^{1,3} | Lene H. Garvey^{4,5} | Susan Nicoll⁶ | Nicolas Tuzin² | Bernard Geny³ | Paul M. Mertes^{1,3}

¹Department of anesthesia and intensive care, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France

²Groupe Méthode en Recherche Clinique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France

³EA 3072, Fédération de Médecine Translationnelle, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

⁴Danish Anaesthesia Allergy Centre, Allergy Clinic, Department of Dermatology and Allergy, Copenhagen University Hospital, Gentofte, Denmark

⁵Department of Clinical Medicine, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

⁶Department of Anaesthesia, Christchurch Hospital, Christchurch, New Zealand

Correspondence

Paul M. Mertes, Service d'anesthésie-réanimation chirurgicale, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, 1 Place de l'Hôpital - BP 426 67091 STRASBOURG CEDEX, Strasbourg, France. Email: paul-michel.mertes@chru-strasbourg.fr

Funding information

Institutional funding from Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

Abstract

Background: In some cases, anaphylactic shock (AS) is still lethal, despite rapid use of epinephrine. High doses of epinephrine are associated with severe complications. Platelet-activating factor (PAF) is secreted in massive amounts during AS, and a high plasma level is correlated with increased AS severity.

Objective: To assess the effect of ABT-491, a PAF-receptor antagonist and possible adjunct treatment, alone or in combination with epinephrine during AS.

Methods: AS was induced by intravenous injection of 1 mg ovalbumin into ovalbumin-sensitized rats. Rats were then randomly assigned to 5 groups (n = 10 per group): SHAM (vehicle only), SHOCK (no treatment), ABT (ABT-491 1 mg/kg), EPI (epinephrine 5 µg as a bolus then 10 µg kg⁻¹ min⁻¹ by continuous infusion, followed by a reducing protocol) and EPI-ABT (both treatments).

Results: Ovalbumin injection resulted in a severe decrease in mean arterial pressure, left ventricular inotropy (max dP/dt) and left ventricular shortening fraction (LVSF). All rats from the ABT group survived until the end of the experiment. ABT-491 prevented the LVSF decrease observed in the SHOCK group (at T15: ABT 50% ± 11% vs SHOCK 36% ± 9%, *P* = .01), significantly reduced the dose of epinephrine needed to treat anaphylactic shock (EPI-ABT 314 ± 67 µg/kg vs EPI 475 ± 69 µg/kg, *P* < .001) and reduced the time to restore basal MAP (ABT 23 ± 7 minutes vs EPI-ABT 13 ± 5 minutes, *P* < .01).

Conclusions and Clinical Relevance: AS was characterized by early cardiac dysfunction in our model. Treatment with ABT-491 allowed survival until the end of the experiment and reduced cardiac dysfunction. Use of the PAF-R antagonist had a synergistic effect with epinephrine and allowed a significant reduction in epinephrine consumption. Use of PAF-R antagonists during AS could reduce epinephrine-related complications and improve the treatment of epinephrine refractory cases.

KEYWORDS

anaphylaxis, epinephrine, ovalbumin, platelet-activating factor, shock

1 | INTRODUCTION

Anaphylactic shock (AS) is a severe systemic hypersensitivity reaction following exposure to an antigen. In Europe, the incidence of anaphylaxis is estimated at 1.5–32 for 100 000 person-years.¹ During anaesthesia, the incidence of perioperative anaphylaxis ranges from 1/1250 to 1/18 600 procedures.² Mortality rate of perioperative anaphylaxis ranges from 0% to 1.4% in Western Australia (2000–2009),³ to 4% in USA and Japan.^{4,5} In the US, 500 to 1000 deaths are attributed to anaphylaxis every year.⁶ Interestingly, Reitter et al reported a 4.1% mortality rate after neuromuscular blocking agent (NMBA) related anaphylaxis, despite fully monitored patients and rapid injection of epinephrine.⁷ Epinephrine is the recommended first-line treatment in cases of anaphylaxis. The level of evidence for its use is low, based mainly on expert opinion and experimental studies.⁸ Its use was extrapolated from other clinical situations where high doses are currently questioned.^{9,10} During AS, the injection of high doses of epinephrine; especially intravenously, is associated with severe complications such as arrhythmia, myocardial infarction and stress cardiomyopathy.^{11,12} Epinephrine should therefore be carefully titrated according to dosing recommendations for AS, to restore adequate circulation and by IM or IV administration as clinically appropriate.

The relatively high mortality rates indicate that some AS is refractory to epinephrine and new therapeutic strategies are needed. Combined therapy with an agent which has a synergistic effect with epinephrine appears to be a good way to reduce epinephrine dose and thereby unwanted side-effects.

Platelet-activating factor (PAF) is a potent phospholipid that plays a central role in immune and inflammatory responses. PAF is massively released during anaphylaxis by numerous cells including platelets, basophils and mast cells and contributes to hypotension due to its vasodilator and negative inotropic effects.¹³ In human anaphylaxis, serum PAF levels are correlated with the severity of the reaction whereas PAF-acetylhydrolase levels (PAF-AH), which partially controls circulating PAF activity by hydrolysing PAF into a biologically inactive form, are inversely correlated to severity.¹⁴ Blockade of the PAF-receptor (PAF-R) has not previously been tested during AS resuscitation.

The goal of our study was to assess the hemodynamic effects of ABT-491, an antagonist of PAF-R, alone or in combination with epinephrine, in a rodent model of lethal ovalbumin-induced anaphylactic shock.

2 | METHODS

All animal procedures and care were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 2013 (Directive 2010/63/EU), the official recommendation of the French Ministry of Agriculture (Paris, France) and the recommendations of the Helsinki Declaration. This study was ethically reviewed and approved by the ethical committee of Strasbourg (File AL/105/112/02/13). Ten-week-old Brown Norway rats weighing 250–350 g (Charles River Laboratories France)

were used for this experiment. Animals were kept under standard conditions (temperature $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; lights from 6:00 AM to 6:00 PM) and given a standard diet (A04; UAR) and water ad libitum. Rats were sensitized by subcutaneous administration of 1 mg intravenous (IV) chicken egg albumin, ovalbumin, (OVA; Sigma-Aldrich) and 4 mg aluminium hydroxide ($\text{Al}(\text{OH})_3$; Sigma) diluted in 1 mL 0.9% saline solution on days 0, 7 and 14, as described previously.¹⁵

The surgical procedure was performed on day 21 following the initial sensitization. Anaesthesia was induced with 4% isoflurane and maintained with 1% isoflurane. Rats were tracheostomized and mechanically ventilated with 100% oxygen using a rodent respirator (Alpha Lab, Equipement Vétérinaire Minerve). Tidal volume and respiratory rate was adjusted to maintain PaCO_2 between 5.1 and 5.6 kPa at the beginning of the experiment. Rectal temperature was maintained at $38.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ by a heating pad during the whole experiment. A fluid-filled polyurethane catheter was inserted into the right jugular vein for ovalbumin injection and drug administration. A continuous infusion of 0.9% saline was started at T0 at $30 \text{ mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in all shocked groups.

A fluid-filled polyurethane catheter was inserted into the left carotid artery for pressure monitoring. Systolic (SAP), diastolic (DAP) and mean arterial pressure (MAP) were recorded continuously using a strain gauge pressure transducer linked to Powerlab (ADInstrument). A polyimide Mikro-Tip pressure catheter (SPR-320NR, Millar Inc) was inserted into the right carotid artery and moved into the left ventricle for continuous pressure monitoring. Max dP/dt , which reflects left ventricle inotropy, was calculated with the LabChart 7 software (ADInstrument).

Left ventricular function was assessed at T0 (just before ovalbumin injection), then at T2.5 (2.5 minutes after ovalbumin injection), T5, T10, T15, T20 and then every 10 minutes after ovalbumin injection with cardiac echography (Vivid 7, GE healthcare France) using a 12S probe. Left ventricular end-diastolic diameters (LVEDD) were assessed in the short-axis view. The image was considered valid if the left ventricle appeared circular with a visualization of papillary muscle. Left ventricular shortening fraction (LVSF) was calculated as follows: $(\text{LVEDD} - \text{LVESD}) / \text{LVEDD} \times 100$.

A flexible Clark-type polarographic oxygen (pO_2 Microprobe 200 mm, Integra LifeScience) connected to a Licox system (Integra LifeScience) was inserted into the left gastrocnemius muscle for PtiO_2 measurement.

After a fifteen-minute stabilization period following the end of the surgical procedure, anaphylactic shock was induced by intravenous injection of 1 mg ovalbumin. Animals were randomly assigned to five different groups:

- SHAM (non-shocked group): vehicle only.
- SHOCK: no treatment, saline infusion only.
- ABT: injection of 1 mg/kg ABT-491 (Sigma-Aldrich) diluted in 1 mL 0.9% saline at T3.
- EPI: injection of 2 boluses of epinephrine (Adrenaline Aguettant) $2.5 \mu\text{g}$ diluted in 0.5 mL 0.9% saline at T3 and T5 followed by a continuous infusion of epinephrine started at $10 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ as described previously.¹⁶ Epinephrine continuous infusion was then

reduced by $0.5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ each five minutes if MAP was above 100 mm Hg for at least 5 minutes.

- EPI-ABT: combined treatment group, ABT-491 was injected with the first bolus of epinephrine. Epinephrine treatment protocol was the same as in the EPI group.

The dose of 1 mg/kg of ABT-491 was based on previously published pharmacological studies.¹⁷

MAP, dP/dt and $PtiO_2$ were recorded at the following time-points: T0 (before ovalbumin injection), T1, T2.5, T5, T7.5, T10, T15, T20 and then every 5 minutes until T60.

Arterial blood samples were taken from each animal before shock induction and at the end of the experiment for measurement of arterial blood gas and haematocrit.

At the end of the experiment, after the last blood sampling, rats were killed by an anaesthetic overdose. As described previously, without treatment, AS is lethal within 20 minutes after shock induction.¹⁸ In the SHOCK group, rats were all killed at T15. Rats in the remaining groups were killed at T60.

The PAF-acetylhydrolase (PAF-AH) hydrolyzes and inactivates PAF. The PAF-AH activity is inversely correlated with plasma PAF levels in humans.¹⁴ In order to confirm the secretion of PAF in our model, we measured extracellular PAF-AH activity in SHAM and SHOCK groups using a commercial chromogenic kinetic kit (Abcam). Briefly, hydrolysis of a modified substrate (2-thio-PAF) by the plasma PAF-AH released a coloured product after conjugation with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). Optical absorbance was measured at 414 nm once every 30 seconds to get 10 time-points. Results were calculated using the following formula: $[\text{PAF-AH} (\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}) = \Delta A_{414} \text{min}^{-1} \times 0.225 \text{mL} / 10.66 \text{nM} / 0.01 \text{mL} \times \text{sample dilution}]$. Results were expressed in $\text{nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

3 | STATISTICAL ANALYSIS

Variables were expressed as mean \pm standard deviation then compared between all groups using ANOVA. Gaussian distributions were assessed graphically and by using Shapiro-Wilk's test.

Post hoc analyses were performed for the significant variables in ANOVA to determine which groups differed from each other, using Tukey's Honest Significant Difference test.

Linear mixed models enabled us to evaluate the evolution of variables over time for each group, by fitting a polynomial of degree 2 for the time.

The significance level was set at 5%.

Statistical analyses were performed using the R software version 3.4.0.

4 | RESULTS

Fifty 10-week-old brown Norway rats were randomly allocated into the five groups ($n = 10$ per group).

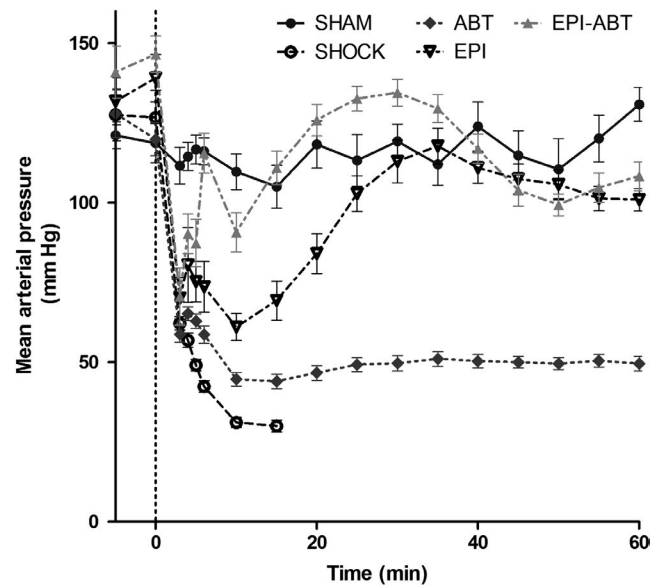


FIGURE 1 Time course of mean arterial pressure in SHAM (vehicle only, no shock), SHOCK (shock, no treatment), ABT (treatment with ABT-491), EPI (treatment with epinephrine) and EPI-ABT (treatment with both epinephrine and ABT-491) groups ($n = 10$ per groups). Ovalbumin was injected at T0. A sharp decrease was observed in all shocked groups while MAP remained stable during the whole experiment in the SHAM group. All rats treated with ABT-491 (ABT) survived until the end of the experiment. Treatment with epinephrine and ABT-491 (EPI-ABT) resulted in a significant improvement in MAP when compared with treatment with epinephrine only (EPI) ($P = .01$ at T15 and T30). Results are represented as mean \pm SEM

4.1 | PAF-AH activity

The level of PAF-AH activity was significantly lower in the SHOCK group when compared with the SHAM group (respectively 8.7 ± 2.6 vs $10.3 \pm 1.5 \text{ nmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$; $P = .001$) indicating that PAF is secreted during ovalbumin-induced anaphylaxis in our model.

4.2 | Hemodynamic parameters

All parameters remained constant during the whole experimentation period in the SHAM group. In the SHOCK, ABT, EPI and EPI-ABT groups, ovalbumin injection resulted in a similar severe decrease in MAP and dP/dt^{-1} at T3 before treatment injection ($p = \text{ns}$) (Figures 1 and 2).

After ovalbumin injection, MAP reached a minimal value of $30 \pm 6 \text{ mm Hg}$ in the SHOCK group at T15 and stabilized around $44 \pm 15 \text{ mm Hg}$ in the ABT group. In this group, all rats survived until the end of the experiment. In the EPI and EPI-ABT groups, after a transient increase in MAP due to epinephrine boluses, MAP progressively increased to reach a maximum value of $118 \pm 18 \text{ mm Hg}$ in the EPI group and $136 \pm 14 \text{ mm Hg}$ in the EPI-ABT group ($P < .05$). At the end of the experiment, MAP remained low in the ABT group, with a

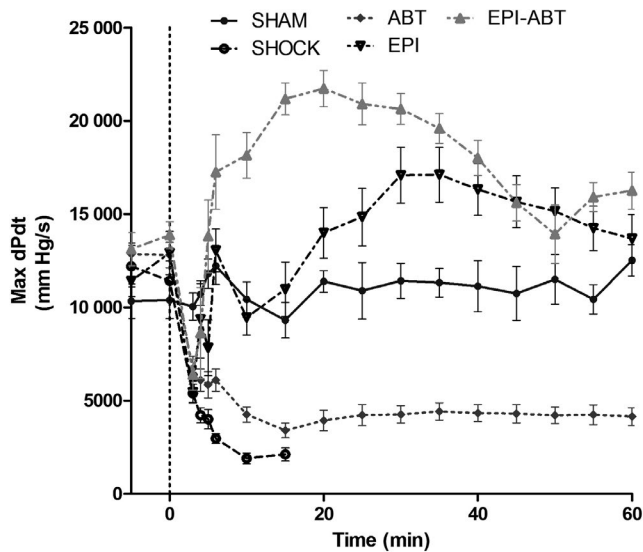


FIGURE 2 Time course of max dP/dt in SHAM (vehicle only, no shock), SHOCK (shock, no treatment), ABT (treatment with ABT-491), EPI (treatment with epinephrine) and EPI-ABT (treatment with both epinephrine and ABT-491) groups ($n = 10$ per groups). Ovalbumin was injected at T0. A sharp decrease was observed in all shocked groups while max dP/dt remained stable during the whole experiment in the SHAM group. At T15, max dP/dt was not statistically different between SHOCK and ABT groups ($P = .8$). The combination of epinephrine and ABT-491 (EPI-ABT) resulted in a significantly higher max dP/dt at T15 when compared with epinephrine alone (EPI) ($P < .01$). Results are represented as mean \pm SEM

value of 50 ± 17 mm Hg. Time to reach 100 mm Hg was significantly shorter with EPI-ABT vs EPI alone (13 ± 5 minutes vs 23 ± 7 minutes, $P < .001$). Total epinephrine consumption was significantly lower with the EPI-ABT group than with EPI alone (314 ± 67 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs 475 ± 69 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $P < .001$).

Baseline max dP/dt was similar between groups before ovalbumin injection (Figure 2). Max dP/dt remained stable during experimentation in the SHAM group with a value of $12\,527 \pm 5\,684$ mm Hg/s at the end of the experimentation. Max dP/dt reached $2\,120 \pm 1\,260$ mm Hg/s at T15 ($P < .001$ vs SHAM) in the SHOCK group. In the ABT group, max dP/dt reached its minimum at T15 and then stabilized at $4\,150 \pm 1\,520$ mm Hg/s until the end of the experiment. In the EPI and EPI-ABT groups, max dP/dt reached their minimum before treatment injection at T3 (respectively $5\,460 \pm 2\,380$ and $6\,400 \pm 3\,560$ mm Hg/s; $p = \text{ns}$). In the EPI group, after a transient effect of epinephrine boluses, max dP/dt progressively increased to reach a maximum at T30 ($17\,270 \pm 6\,760$ mm Hg/s). In the EPI-ABT group, the maximum value of dP/dt was reached at T20 ($21\,730 \pm 10\,710$ mm Hg/s). Time to reach 10 000 mm Hg/s was significantly shorter in the EPI-ABT group than in the EPI group (5 ± 1 minute vs 14 ± 6 minutes; $P < .01$). At T60 minutes, no significant differences were observed between the SHAM, EPI and EPI-ABT groups. In the ABT group, max dP/dt remained significantly lower in comparison with the SHAM group ($P < .001$).

4.3 | Echocardiography parameters

In all shocked groups, left ventricular end-diastolic diameters (LVEDD) severely decreased just after shock induction to reach a minimum value of 3.9 ± 0.7 mm in the SHOCK group, 4.2 ± 0.8 mm in the ABT group, 4.0 ± 0.7 mm in the EPI group and 4.3 ± 0.5 mm in the EPI-ABT group (Figure 3A). In all treated groups, LVEDD was not statistically different at any time during the experiment. In the SHOCK group, left ventricular shortening fractions (LVSF) showed a marked decrease at T10 and was at $36\% \pm 9\%$ at T15 (vs SHAM $48\% \pm 5\%$; $P < .05$) (Figure 3B). In the ABT group, LVSF remained similar to the SHAM group during the whole experiment. In epinephrine treated groups (EPI and EPI-ABT), LVSF increased after epinephrine injection and remained significantly higher than for the SHAM group throughout the whole experiment ($P < .01$ for both groups). There were no significant differences between the EPI and EPI-ABT groups.

4.4 | Metabolic parameters

Muscular PtiO_2 remained stable during the whole experiment in the SHAM group (Figure 4). In the SHOCK, ABT, EPI and EPI-ABT groups a marked decrease in PtiO_2 was observed after shock induction. The minimal level of PtiO_2 was 12 ± 12 mm Hg in the SHOCK group, 14 ± 12 mm Hg in the ABT group, 11 ± 10 mm Hg in the EPI group and 19 ± 14 mm Hg in the EPI-ABT group. In treated groups, PtiO_2 progressively increased to reach 27 ± 18 mm Hg in the ABT group, 14 ± 14 mm Hg in the EPI group and 27 ± 14 mm Hg in the EPI-ABT group at T60 without significant difference. Interestingly, muscular PtiO_2 showed a tendency to improve in groups treated with ABT-491 (ABT and EPI-ABT) at the end of the experiment.

No significant differences were observed before shock induction in blood gases parameters (Table 1). In the absence of treatment, shock was characterized by a sharp increase in blood lactate level (7.5 ± 1.4 mmol/L) at T15. Compared with the SHOCK group at T15, the lactate increase at T60 was lower in the ABT, EPI and EPI-ABT groups, with respectively 4.4 ± 1.2 , 5.0 ± 1.9 and 3.7 ± 0.9 mmol/L ($P < .001$). Lactate was not statistically different between treated groups at T60.

5 | DISCUSSION

AS is classically described as a distributive shock, with a sharp decrease in peripheral vascular resistance and severe microvascular leakage, leading to profound hypovolaemia. These elements are responsible for a severe decrease in MAP and cardiac output (CO). Exploring beyond this description of AS, our study brings new insights into the pathophysiology of AS and revealed that early cardiac dysfunction is present during AS, shown by the severe drop in max dP/dt and LVSF in the SHOCK group.

Low end-tidal CO_2 (EtCO_2) has recently been proposed as a severity marker to identify severe AS during anaesthesia.¹⁹ Our study

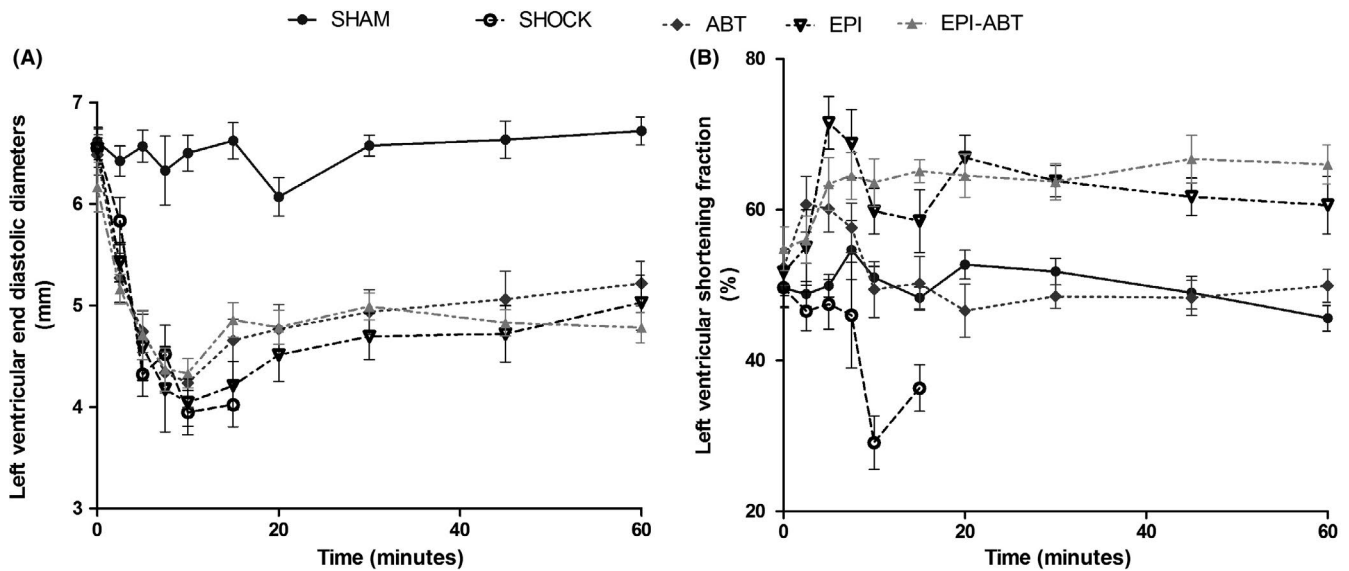


FIGURE 3 Time course of echocardiography parameters in SHAM (vehicle only, no shock), SHOCK (shock, no treatment), ABT (treatment with ABT-491), EPI (treatment with epinephrine) and EPI-ABT (treatment with both epinephrine and ABT-491) groups ($n = 10$ per groups). A, left ventricular end-diastolic diameters (LVEDD). While LVEDD remained stable during the whole experiment in the SHAM group, ovalbumin injection (T0) resulted in a significant decrease in LVEDD in all shocked groups (SHOCK, ABT, EPI, EPI-ABT) ($P < .01$ in comparison with the SHAM group). Despite subsequent vascular filling, LVEDD remained lower in all treated groups when compared with the SHAM group ($P < .01$ at T60). Results are represented as mean \pm SEM. B, left ventricular shortening fraction (LVSF). Ovalbumin injection resulted in a decrease in the LVSF after 10 minutes in the untreated group (SHOCK) ($P < .05$ in comparison with SHAM). Treatment with ABT-491 alone (ABT) prevented the alteration of the LVSF ($P = .01$ at T15 in comparison with SHOCK). Treatment with epinephrine (EPI and EPI-ABT) resulted in a significant higher LVSF during the whole experiment ($P < .01$ at T60 in comparison with SHAM). The combination of epinephrine and ABT-491 was not statistically different than with epinephrine alone. Results are represented as mean \pm SEM

suggests that the low EtCO_2 observed during AS is not only due to a low cardiac output, but also due to a lack of exchange between the adaptive compartments, especially the muscles and the vascular compartment. PaCO_2 was reduced in the SHOCK group while ventilation parameters remained constant. This low PaCO_2 could result from a reduction in extraction of CO_2 from the muscular compartment. While PaO_2 remained high, we observed a severe decrease in muscular PtIO_2 indicating that (a) exchange between the two compartments was impaired and (b) energy consumption was aberrantly persistent in non-working muscle. In a previous study using microdialysis, our group has shown that this persistent energy consumption led to a complete failure of cellular energy production, with an increased lactate/pyruvate ratio which could contribute to rapid organ dysfunction.¹⁵ Our results confirm the need to monitor EtCO_2 during AS in intubated patients, which reflects simultaneously the alteration of cardiac output and the perfusion of adaptive compartments.

Epinephrine is currently the recommended treatment for AS. As expected, treatment with epinephrine improved MAP, max dP/dt and LVSF indicating that epinephrine remains the first-line treatment for anaphylaxis (Figures 1, 2 and 3B). However, high doses of epinephrine were necessary to reach our hemodynamic goals in the EPI group, exposing animals to epinephrine-related complications. Moreover, epinephrine was unable to improve the perfusion of the muscular compartment (Figure 4).

Many mediators have been implicated in anaphylaxis. Histamine was one of the first identified mediators in anaphylaxis, but the

treatment of anaphylaxis with histamine receptor antagonists was disappointing and did not result in improved survival.²⁰ Conflicting results have also been observed with blockers of the NO pathway, which is involved in anaphylaxis pathophysiology.^{20,21} While PAF has long been recognized as a mediator of anaphylaxis, interest in this molecule as a therapeutic target has increased with the publication of studies showing a correlation between the plasma level of PAF and the severity of the reaction.²² Several studies have successfully tried PAF-R antagonist as pretreatment in experimental models of anaphylaxis.^{23,24} For the first time, we have tested experimentally ABT-491, a selective PAF-R antagonist,²⁵ as a treatment of AS, alone or in combination with epinephrine. The effect of ABT-491 on the PAF-R has been well studied, and ABT-491 has a good specificity for the PAF-R.¹⁷ A recent structural study showed that ABT-491 stabilizes the PAF-receptor in an inactive state by locking helices II and IV in an inward conformation, thus decreasing the receptor's ability to signal via G protein.²⁶ PAF is an unstable lipid mediator, which is therefore difficult to measure. However, the decrease in PAF-AH activity in the SHOCK group confirmed that, in our model, PAF is secreted during anaphylaxis. Although our study was not designed to assess mortality, all shocked rats in the ABT group survived until 60 minutes, whereas rats classically die within 20 minutes after shock induction if left untreated.¹⁶

Only a few data are available on cardiac dysfunction during AS and most of them are case reports of coronary spasm²⁷ or stress

cardiomyopathy.²⁸ Among other mediators released by myocardial mast cells during AS, PAF is known to have a direct negative inotropic effect and could play an important role in this cardiac dysfunction.^{29,30} Ovalbumin injection resulted in a decrease in the LVSF after 10 minutes in the untreated group (SHOCK) ($P < .05$ in comparison with SHAM). Treatment with ABT-491 alone (ABT) prevented the initial alteration of the LVSF ($P = .01$ at T15 in comparison with SHOCK). This may have been due to a specific action on cardiomyocytes by preventing cardiac dysfunction. Throughout the experiment, LVSF values in the ABT group were not statistically different from those in the SHAM

group which may seem to contradict values of max dP/dt . However, LVSF is strongly influenced by cardiac after-load, which is greatly reduced during anaphylaxis. In the SHOCK group, LVSF only decreased 10 minutes after shock induction, while the maximum dP/dt decreased very rapidly after shock induction. This could be due to the after-load decrease that will prevent the earlier reduction in the LVSF. LVSF was only decreased in the SHOCK group at an advanced stage of cardiac dysfunction when the negative inotropic effect observed in anaphylaxis exceeds the decrease in after-load. By its action on PAF-receptor, ABT-491 could prevent this last step, thus avoiding a decrease in LVSF.

The haemodynamic effects of ABT-491, especially on MAP, were insufficient to consider its use without epinephrine. Treatment with epinephrine (EPI and EPI-ABT) resulted in a significantly higher LVSF during the whole experiment ($P < .01$ at T60 in comparison with SHAM). The combination of epinephrine and ABT-491 allowed a marked decrease in epinephrine requirements and a significant reduction in the time to reach baseline MAP. ABT-491 also enhanced the effect of epinephrine on cardiac function with a significant and early improvement in maximal dP/dt . The use of combined therapy led to a reduction in the duration of hypotension, which in turn could reduce neurological morbidity during AS, where the cerebral autoregulation is impaired. Davidson et al showed that cerebral blood flow decreased linearly with a decrease in MAP, making the time to restore an adequate MAP critical to avoid cerebral lesions.¹⁸

The use of lower doses of epinephrine during AS, could also reduce the risk of epinephrine-related adverse effects that might lead to significant morbidity, especially when the injected dose is high. During cardiac arrest, high doses of epinephrine, as currently recommended, may actually be harmful and ineffective.^{31,32} During anaphylaxis, high doses of intravenously injected epinephrine have been reported to cause cardiovascular complications including arrhythmia, myocardial infarction and stress cardiomyopathy.^{11,12} Several authors are reporting cases of stress cardiomyopathy following anaphylaxis, which could be attributed to the anaphylaxis itself, or to inappropriately high doses of epinephrine.^{28,33} Epinephrine remains the first-line treatment of

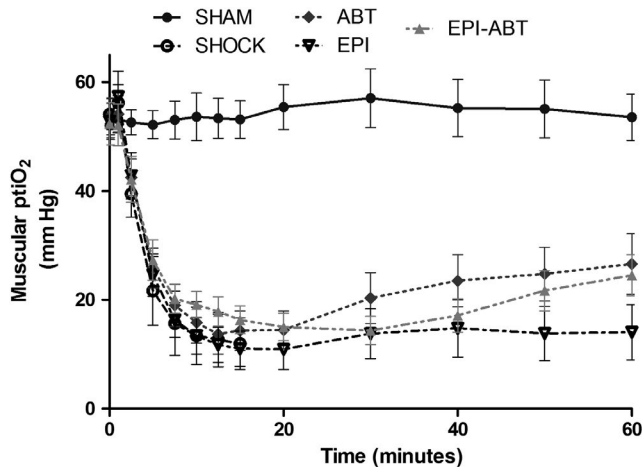


FIGURE 4 Time course of the right gastrocnemius muscular $PtIO_2$ in SHAM (vehicle only, no shock), SHOCK (shock, no treatment), ABT (treatment with ABT-491), EPI (treatment with epinephrine) and EPI-ABT (treatment with both epinephrine and ABT-491) groups ($n = 10$ per groups). Ovalbumin injection (T0) resulted in a sharp decrease in muscular $PtIO_2$ in all shocked groups (SHOCK, ABT, EPI, EPI-ABT). Neither ABT-491, epinephrine or a combination of the two treatments was successful in restoring muscular $PtIO_2$. Muscular $PtIO_2$ in groups treated with ABT-491 (ABT and EPI-ABT) showed a tendency towards improvement at the end of the experimentation period. Results are represented as mean \pm SEM

Groups	Time	pH	PaO ₂ kPa	PaCO ₂ kPa	HT %	Lactate mmol/L
SHAM	T0	7.37 \pm 0.04	28.8 \pm 8.8	5.3 \pm 1.8	39 \pm 4	2.1 \pm 1.0
	T60	7.37 \pm 0.06	35.7 \pm 13.1	5.5 \pm 1.8	40 \pm 3	1.5 \pm 0.7
SHOCK	T0	7.39 \pm 0.03	27.1 \pm 10.4	5.1 \pm 0.7	39 \pm 3	1.9 \pm 0.8
	T15	7.27 \pm 0.03	34.8 \pm 17.7	3.0 \pm 1.5*	54 \pm 6	7.5 \pm 1.4
ABT	T0	7.37 \pm 0.02	19.7 \pm 6.9	5.4 \pm 2.9	40 \pm 2	1.7 \pm 0.6
	T60	7.28 \pm 0.04	15.3 \pm 2.8	5.3 \pm 2.8	42 \pm 3	4.4 \pm 1.2
EPI	T0	7.33 \pm 0.03	23.1 \pm 8.0	5.7 \pm 3.2	38 \pm 3	2.0 \pm 0.9
	T60	7.12 \pm 0.10	20.8 \pm 9.2	7.3 \pm 1.7*	46 \pm 6	5.0 \pm 1.9
EPI-ABT	T0	7.36 \pm 0.02	17.2 \pm 2.9	5.2 \pm 2.7	37 \pm 3	2.0 \pm 0.8
	T60	7.16 \pm 0.06	15.2 \pm 4.4	7.6 \pm 4.0*	43 \pm 2	3.7 \pm 0.9

Note: Results are expressed as mean \pm SD. T0 corresponds to ovalbumin injection. HT, haematocrit.

* $P < .05$ vs SHAM at T60.

TABLE 1 Blood gas parameters of SHAM (vehicle only, no shock), SHOCK (shock, no treatment), ABT (treatment with ABT-491), EPI (treatment with epinephrine) and EPI-ABT (treatment with both epinephrine and ABT-491) groups ($n = 10$ per group)

anaphylactic shock, but the dose should be strictly adjusted according to severity and titrated to clinical response.

Our results show that, neither ABT-491, epinephrine, nor a combination of the two, were able to restore basal muscular PtiO₂. This incomplete reperfusion of the muscular compartment could be due to persistent and profound hypovolaemia, as shown by the persistently low LVEDD on echocardiography, despite vascular filling with 30 mL/kg of crystalloids, over 1 hour, in all treatment groups. PAF is known to increase vascular permeability,¹³ so we hypothesized that microvascular leakage could be reduced by PAF-R antagonists thus improving cardiac preload and muscle perfusion. The moderate effect observed of PAF-R blockade on PtiO₂ and LVEDD could be due to the delay between shock occurrence and ABT-491 administration or due to the impact of mediators other than PAF on vascular permeability.

As with any animal studies, any extrapolation to humans should be made carefully. However, clinical studies on human anaphylaxis are particularly difficult to design due to the rare and unpredictable occurrence of this complication, combined with the ethical issues of introducing a new treatment. Animal models therefore still have an important place, when testing new therapies for AS. PAF-R antagonists have already been tested in humans for indications other than anaphylaxis and showed a good safety profile, apart from in one study, which showed an increased risk of intra-cranial bleeding after subarachnoid haemorrhage.³⁴ Our study was not designed to assess the safety profile of ABT-491 but we did not observe significant bleeding during experimentation.

In conclusion, our study further explores new aspects of the pathophysiology of anaphylaxis. The existence of early cardiac dysfunction was confirmed. The perfusion of muscular compartments was severely impaired and resulted in a reduction in CO₂ extraction that may be contributing to the low EtCO₂ observed in human anaphylaxis.

Blockade of PAF, using a PAF-R antagonist appeared to be beneficial during AS. The effect of PAF-R antagonism was synergistic with epinephrine, reducing the duration of hypotension and the epinephrine dose needed to treat anaphylaxis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors generously thank Anne-Laure Charles, Stéphanie Paradis, Fabienne Goupilleau and Isabelle Georg for their help and their contribution to this work.

CONFLICT OF INTEREST

PMM is a scientific advisor for the ALPHO study (NCT02250729) funded by a consortium of pharmaceutical companies: Zambon, Urgo, Pierre Fabre, Boots, Hepatoum, Biocodex, Sanof, LBR, GSK, APL, Bells, Healthcare, Pinewood, T&R, Ernest Jackson.

AUTHOR CONTRIBUTION

CT and WO made substantial contributions to the design of the work, the acquisition and the interpretation of data for the work. They drafted the work and gave their final approval of the version

submitted for publication. They were accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were appropriately investigated and resolved. OC, LHG, SN, BG and PMM made substantial contributions to the conception of the work and the interpretation of data for the work. They revisited it critically for important intellectual content and gave their final approval of the version submitted for publication. They were accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were appropriately investigated and resolved. NT made substantial contributions to the design of the work and the analysis of data for the work. He drafted the work and gave his final approval of the version submitted for publication. He was accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were appropriately investigated and resolved.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Charles Tacquard  <https://orcid.org/0000-0002-7274-6018>

REFERENCES

1. Panesar SS, Javad S, de Silva D, et al. The epidemiology of anaphylaxis in Europe: a systematic review. *Allergy*. 2013;68:1353-1361.
2. Mertes PM, Volcheck GW, Garvey LH, et al. Epidemiology of perioperative anaphylaxis. *Presse Med*. 2016;45:758-767.
3. Gibbs NM, Sadleir PH, Clarke RC, Platt PR. Survival from perioperative anaphylaxis in Western Australia 2000-2009. *Br J Anaesth*. 2013;111:589-593.
4. Hepner DL, Castells MC. Anaphylaxis during the perioperative period. *Anesth Analg*. 2003;97:1381-1395.
5. Mitsuhashi H, Matsumoto S, Hasegawa J. The epidemiology and clinical features of anaphylactic and anaphylactoid reactions in the perioperative period in Japan. *Masui*. 1992;41:1664-1669.
6. Neugut AI, Ghatak AT, Miller RL. Anaphylaxis in the United States: an investigation into its epidemiology. *Arch Intern Med*. 2001;161:15-21.
7. Reitter M, Petitpain N, Latache C, et al. Fatal anaphylaxis with neuromuscular blocking agents: a risk factor and management analysis. *Allergy*. 2014;69:954-959.
8. Sheikh A, Shehata YA, Brown SG, Simons FE. Adrenaline for the treatment of anaphylaxis: cochrane systematic review. *Allergy*. 2009;64:204-212.
9. Ristagno G, Tang W, Huang L, et al. Epinephrine reduces cerebral perfusion during cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med*. 2009;37:1408-1415.
10. Lin S, Callaway CW, Shah PS, et al. Adrenaline for out-of-hospital cardiac arrest resuscitation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Resuscitation*. 2014;85:732-740.
11. Kawano T, Scheuermeyer FX, Stenstrom R, Rowe BH, Grafstein E, Grunau B. Epinephrine use in older patients with anaphylaxis: clinical outcomes and cardiovascular complications. *Resuscitation*. 2017;112:53-58.
12. Campbell RL, Bellolio MF, Knutson BD, et al. Epinephrine in anaphylaxis: higher risk of cardiovascular complications and overdose after administration of intravenous bolus epinephrine compared

- with intramuscular epinephrine. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2015;3:76-80.
13. Gill P, Jindal NL, Jagdis A, Vadas P. Platelets in the immune response: revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135:1424-1432.
 14. Vadas P, Perelman B, Liss G. Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:144-149.
 15. Dewachter P, Jouan-Hureau V, Franck P, et al. Anaphylactic shock: a form of distributive shock without inhibition of oxygen consumption. *Anesthesiology.* 2005;103:40-49.
 16. Zheng F, Barthel G, Collange O, et al. Methylene blue and epinephrine: a synergetic association for anaphylactic shock treatment. *Crit Care Med.* 2013;41:195-204.
 17. Albert DH, Malo PE, Tapang P, et al. The role of platelet-activating factor (PAF) and the efficacy of ABT-491, a highly potent and selective PAF antagonist, in experimental allergic rhinitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284:83-88.
 18. Davidson J, Zheng F, Tajima K, et al. Anaphylactic shock decreases cerebral blood flow more than what would be expected from severe arterial hypotension. *Shock.* 2012;38:429-435.
 19. Gouel-Chéron A, de Chaisemartin L, Jönsson F, et al. Low end-tidal CO₂ as a real-time severity marker of intra-anaesthetic acute hypersensitivity reactions. *Br J Anaesth.* 2017;119:908-917.
 20. Bellou A, Lambert H, Gillois P, et al. Constitutive nitric oxide synthase inhibition combined with histamine and serotonin receptor blockade improves the initial ovalbumin-induced arterial hypotension but decreases the survival time in brown norway rats anaphylactic shock. *Shock.* 2003;19:71-78.
 21. Cauwels A, Janssen B, Buys E, Sips P, Brouckaert P. Anaphylactic shock depends on PI3K and eNOS-derived NO. *J Clin Invest.* 2006;116:2244-2251.
 22. Vadas P, Gold M, Perelman B, et al. Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med.* 2008;358:28-35.
 23. Herbert JM, Bernat A, Tibirica E. Effect of SR 27417, a novel PAF antagonist on antigen-induced hypotension in the rat. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1997;15:115-123.
 24. Mathison R, Davison JS, Befus AD. Platelet activating factor and systemic anaphylaxis in *Nippostrongylus brasiliensis*-sensitized rats: differential effects of PAF antagonists. *Br J Pharmacol.* 1992;106:263-266.
 25. Albert DH, Magoc TJ, Tapang P, et al. Pharmacology of ABT-491, a highly potent platelet-activating factor receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1997;325:69-80.
 26. Cao C, Tan Q, Xu C, et al. Structural basis for signal recognition and transduction by platelet-activating-factor receptor. *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25:488-495.
 27. Abdelghany M, Subedi R, Shah S, Kozman H. Kounis syndrome: a review article on epidemiology, diagnostic findings, management and complications of allergic acute coronary syndrome. *Int J Cardiol.* 2017;232:1-4.
 28. Y-Hassan S. Clinical features and outcome of epinephrine-induced takotsubo syndrome: analysis of 33 published cases. *Cardiovasc Revasc Med.* 2016;17:450-455.
 29. Triggiani M, Patella V, Staiano RI, Granata F, Marone G. Allergy and the cardiovascular system. *Clin Exp Immunol.* 2008;153(Suppl 1):7-11.
 30. Marone G, Genovese A, Varricchi G, Granata F. Human heart as a shock organ in anaphylaxis. *Allergo J Int.* 2014;23:60-66.
 31. Gueugniaud P-Y, Mols P, Goldstein P, et al. A comparison of repeated high doses and repeated standard doses of epinephrine for cardiac arrest outside the hospital. European Epinephrine Study Group. *N Engl J Med.* 1998;339:1595-1601.
 32. Shao H, Li CS. Epinephrine in out-of-hospital cardiac arrest: helpful or harmful? *Chin Med J (Engl).* 2017;130:2112-2116.
 33. Khoueiry G, Abi Rafeh N, Azab B, et al. Reverse Takotsubo cardiomyopathy in the setting of anaphylaxis treated with high-dose intravenous epinephrine. *J Emerg Med.* 2013;44:96-99.
 34. Hirashima Y, Endo S, Nukui H, Kobayashi N, Takaku A. Effect of a platelet-activating factor receptor antagonist, E5880, on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage—open clinical trial to investigate efficacy and safety. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2001;41:165-176; discussion 175-166.

How to cite this article: Tacquard C, Oulehri W, Collange O, et al. Treatment with a platelet-activating factor receptor antagonist improves hemodynamics and reduces epinephrine requirements, in a lethal rodent model of anaphylactic shock. *Clin Exp Allergy.* 2020;50:383-390. <https://doi.org/10.1111/cea.13540>

3.3. Conclusion

Dans ce modèle de choc anaphylactique létal induit par l'ovalbumine chez le rat Brown Norway, l'injection d'ovalbumine entraînait une baisse rapide et importante de la pression artérielle associée à une diminution franche de la contractilité myocardique (baisse de la fraction d'éjection ventriculaire gauche et du dp/dt maximal). La baisse de l'activité de la PAF-acétylhydrolase dans le plasma indique la sécrétion de PAF au cours de la réaction.

L'utilisation de l'ABT-491 seule ne permettait pas d'améliorer de manière significative la pression artérielle mais réduisait la dysfonction cardiaque observée au cours du choc anaphylactique. De plus, le traitement par ABT-491 permettait la survie des animaux jusqu'à la fin de l'expérimentation (60 minutes), alors que ce modèle est classiquement létal en 15 à 20 minutes.

L'association du traitement par ABT-491 et par adrénaline permettait une restauration plus rapide de la pression artérielle et de la fonction ventriculaire gauche, en réduisant de manière importante les besoins en adrénaline pour atteindre cet objectif, ce qui indique au minimum un effet additif entre ces deux traitements. L'effet de l'ABT-491 pourrait être sous-estimé car les plaquettes de rats sont dépourvues de récepteur au PAF. A l'inverse de ce qui est observé chez l'Homme, les plaquettes de rat ne peuvent pas s'activer en réponse à une stimulation par le PAF. Or cette voie pourrait être impliquée dans l'amplification de la réponse plaquettaire au cours du choc anaphylactique chez l'Homme. La comparaison de l'effet de l'ABT-491 dans des modèles actifs de choc anaphylactique dans d'autres espèces pourrait être intéressante.

Ces résultats nous indiquent néanmoins que le PAF est un médiateur important du choc anaphylactique dans le modèle actif de choc anaphylactique induit par l'ovalbumine, ce qui est un argument supplémentaire en faveur d'un rôle des plaquettes et des neutrophiles dans ce modèle. Le PAF semble être une cible thérapeutique intéressante, notamment en cas de forme sévère, nécessitant des doses importantes d'adrénaline.

La transposition de ces résultats à l'Homme est encore difficile et nécessite de mieux identifier les mécanismes impliqués dans le choc anaphylactique dans ce modèle mais aussi chez l'Homme, afin de s'assurer que ceux-ci sont comparables.

PARTIE III

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. Discussion générale

Nos résultats apportent les premiers éléments de réponse sur une implication des plaquettes au cours du choc anaphylactique et sur leur contribution à la sévérité de la réaction. Ces données ouvrent la porte à l'utilisation de nouveaux outils diagnostiques pour caractériser les mécanismes à l'origine de la réaction, mais aussi à l'utilisation de nouveaux agents thérapeutiques pour prendre en charge les patients les plus graves, ayant un état de choc anaphylactique réfractaire au traitement de référence, l'adrénaline.

La première étape de ce travail a consisté à évaluer si les plaquettes pouvaient être un effecteur primaire en cas de choc anaphylactique médié par les IgE. Ce mécanisme est actuellement le seul mécanisme immunologique à l'origine de la réaction anaphylactique ayant une base scientifique solide pour justifier de sa réalité en clinique humaine¹⁰⁸. Le récepteur FcεRI, récepteur clé des réactions IgE-médiées, présent à la surface des mastocytes et des basophiles, a été décrit il y a de nombreuses années comme étant présent et fonctionnel à la surface des plaquettes humaines et des mégacaryocytes^{62, 63, 103}. Une nouvelle analyse réalisée dans des conditions rigoureuses montre que ce récepteur n'est pas présent à la surface des plaquettes sanguines et que les plaquettes n'ont pas la capacité de répondre à une stimulation de la voie IgE. Nos résultats indiquent donc clairement que les plaquettes ne sont pas un effecteur primaire de la réaction IgE-médiée. Cela ne permet pas cependant d'éliminer une activation secondaire des plaquettes dans ces réactions. Ces résultats doivent également nous inciter à la plus grande prudence vis-à-vis de la présence d'un récepteur FcεRII/CD23 à la surface et il apparaît nécessaire de mener une étude plus approfondie de ce récepteur sur les plaquettes sanguines humaines.

Les précédentes études ayant également rapporté la présence du récepteur FcεRI à la surface des mégacaryocytes, il serait intéressant de conduire une étude sur ces cellules, que ce soit des mégacaryocytes de culture, plus facilement accessibles, mais aussi des mégacaryocytes issus de moelle humaine afin d'éliminer un artéfact de culture qui pourrait nous faire conclure à tort à la présence de ce récepteur. En effet, les mégacaryocytes ont des précurseurs communs avec les mastocytes et les basophiles (cellules CD34+)¹⁰⁹ et la présence d'ARNm du récepteur FcεRI, voire de la protéine, ne pourrait être que résiduelle, sans modifier de manière substantielle la fonction cellulaire.

La deuxième étape de ce travail a consisté en l'étude du rôle des plaquettes dans différents modèles de choc anaphylactique. Trois modèles ont été sélectionnés : un modèle d'anaphylaxie passive induite par les IgE, un modèle d'anaphylaxie passive testant la voie IgG (injection d'HAIGG) et un modèle d'anaphylaxie active induite par l'ovalbumine chez le rat Brown Norway^{11, 50}. L'objectif était de comparer le rôle des plaquettes en fonction du mécanisme initiateur de la réaction.

Le modèle IgG, dont la réaction est médiée par l'activation du récepteur Fc γ RIIA/CD32A humain, est le seul dans lequel le rôle des plaquettes a déjà été clairement établi^{11, 55}. Le rôle des plaquettes sanguines a déjà été évoqué dans des modèles actifs de choc anaphylactique, qui ont l'avantage d'être plus proches de ce qui est observé en clinique humaine, mais pas dans le modèle de choc anaphylactique induit par l'ovalbumine chez le rat Brown Norway. Ce modèle a, de surcroît, l'avantage d'être un modèle de réaction très sévère, proche des états réfractaires observés chez l'Homme.

Nos travaux ont permis de montrer que le rôle des plaquettes différait selon le modèle considéré, les plaquettes sanguines ayant un rôle franc dans l'aggravation des réactions médiées par les IgG et, à l'inverse, un potentiel effet régulateur de la sévérité de la réaction dans les réactions médiées par les IgE. Les plaquettes semblaient avoir un effet aggravant dans le modèle de choc actif, mais uniquement lorsque la réaction était atténuée.

Ces données sont complexes à interpréter. L'aggravation de la réaction en cas de thrombopénie lors d'une réaction IgE-médiée pourrait indiquer que les plaquettes sont impliquées dans les voies de compensation activées au cours du choc anaphylactique. Le mécanisme pouvant expliquer ce phénomène n'est pour l'heure pas connu mais pourrait être lié à un rôle des plaquettes dans la régulation de la perméabilité vasculaire ou dans la prévention des hémorragies spontanées. L'étude de la contribution de différents récepteurs plaquettaires habituellement impliqués dans l'hémostase, notamment en contexte inflammatoire, aux effets observés dans les différents modèles de choc anaphylactique devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués. L'effet régulateur des plaquettes sanguines pourrait aussi impliquer le récepteur de faible affinité aux IgE, Fc ϵ RII/CD23, décrit comme étant présent à la surface des plaquettes, et qui aurait un rôle de régulateur dans la réaction médiée par les IgE⁴³. La validation de cette hypothèse nécessite en premier lieu de vérifier la présence de ce récepteur à la surface des plaquettes sanguines,

murines mais aussi humaines, puis d'évaluer la réponse plaquettaire à la stimulation de ce récepteur. Cette réponse n'est pour l'heure pas connue.

L'effet de la thrombopénie dans le modèle passif IgG est en accord avec ce qui avait déjà été publié sur le même modèle sur la base de mesures de la température corporelle des souris. Le récepteur FcγRIIA/CD32A plaquettaire semble être crucial dans l'initiation de ces réactions, ce qui explique qu'en l'absence de plaquettes, la réaction soit très atténuée⁵⁵. Cet effet pourrait être tellement marqué qu'il pourrait masquer un effet régulateur des plaquettes en cas de choc inflammatoire, similaire à ce qui est observé dans le modèle passif IgE.

La thrombopénie diminuait également l'intensité de la réaction dans le modèle de choc actif chez le rat Brown Norway. L'association de cet effet et des anomalies biologiques décrites précédemment indique que ce choc pourrait, en partie, impliquer une voie médiée par les IgG. En effet, bien que ce modèle soit décrit de longue date comme étant médié par des IgE (sur la base d'un titre élevé d'IgE anti-ovalbumine et d'une augmentation franche de l'histamine plasmatique au cours de la réaction), une production d'IgG anti-ovalbumine a été rapportée dans des modèles similaires de sensibilisation à l'ovalbumine¹¹⁰. Ce modèle pourrait donc associer une activation concomitante des voies IgE et IgG. Il semble néanmoins peu probable que seule la voie IgG soit impliquée en raison de l'absence d'effet de la thrombopénie en cas de réaction très sévère. Les observations faites chez le rat Brown Norway pourraient également être expliquées par un état de choc médié par les IgE beaucoup plus sévère que ce qui a été observé dans le modèle d'anaphylaxie passive IgE-médiée et démasquer ainsi d'autres mécanismes mis en jeu.

Il est très intéressant de noter que ni le modèle passif IgE, ni le modèle passif IgG n'était létal individuellement et qu'une association des deux mécanismes mis en jeu de manière concomitante pourrait être nécessaire pour dépasser les capacités de compensation de l'organisme.

Le Platelet Activating Factor (PAF) est un des médiateurs produits au cours du choc anaphylactique chez l'Homme, notamment dans les réactions les plus sévères et il pourrait contribuer de manière substantielle à la symptomatologie de la réaction^{38 56}. Ce médiateur a, en outre, été décrit comme un des médiateurs clés des réactions anaphylactiques médiées par les IgG⁴.

Partant du principe que le choc anaphylactique lié à l'ovalbumine dans le modèle de rat Brown Norway était en partie lié à une activation de la voie IgG, et de manière plus

pragmatique, du principe que du PAF était produit au cours du choc anaphylactique, nous avons testé l'effet d'un antagoniste spécifique du récepteur au PAF, l'ABT-491, seul ou en association avec le traitement de référence, l'adrénaline¹¹¹. Le traitement par ABT-491 seul avait un effet bénéfique sur la survie des animaux et sur la dysfonction ventriculaire gauche. L'association du traitement par ABT-491 et par adrénaline permettait de raccourcir significativement le temps nécessaire à la restauration d'un état hémodynamique satisfaisant et ce, avec une dose significativement plus faible d'adrénaline. Il existe donc, au minimum, un effet additif entre ces deux traitements suggérant que le récepteur du PAF pourrait être une cible thérapeutique d'intérêt dans les états de choc anaphylactique les plus sévères, réfractaires à l'adrénaline, décrits chez l'Homme. De manière intéressante, l'effet de l'ABT-491 pourrait être sous-estimé, les plaquettes de rats étant dépourvues de récepteur au PAF contrairement à ce qui est observé chez l'Homme. L'inhibition de la voie du PAF pourrait donc également avoir un effet supplémentaire chez l'Homme, en réduisant l'activation plaquettaire. Cette hypothèse nécessite néanmoins d'être validée par des études humaines.

Il existe encore beaucoup d'incertitude concernant les mécanismes conduisant à la sécrétion de PAF au cours du choc anaphylactique et surtout sur les cellules responsables de sa sécrétion. Le PAF a été décrit comme étant un des principaux médiateurs des réactions médiées par les IgG mais sa production dans les réactions médiées par les IgE n'a pas été vraiment étudiée⁴. Le lien entre les modèles passifs et l'effet observé dans le modèle d'anaphylaxie active est encore insuffisamment établi. La production de PAF doit être évaluée dans des modèles strictement IgE-médiés et l'effet de l'ABT-491 doit être déterminé dans les différents modèles passifs afin d'identifier le profil de réponse en fonction du mécanisme impliqué. Les plaquettes sanguines murines étant dépourvues de récepteur au PAF, son rôle dans ces réactions est probablement largement sous-estimé dans nos modèles et l'utilisation de souris transgéniques humanisées pour le récepteur au PAF pourrait apporter des éléments de réponse.

L'extrapolation de ces résultats à l'Homme est rendue très compliquée par la difficulté à identifier le mécanisme responsable de la réaction en clinique humaine. Si l'implication de la voie médiée par les IgE est plutôt bien documentée dans les états de choc anaphylactiques liés à une protéine (arachide, venin d'hyménoptère, etc.), les mécanismes responsables des réactions liées aux médicaments, trop petits pour induire à eux seuls une réponse immunitaire, sont beaucoup plus difficiles à comprendre⁴². Outre le mécanisme IgE, d'autres

mécanismes ont été évoqués, que ce soit le mécanisme IgG mais aussi l'activation mastocytaire directe via le récepteur MRGPRX-2, l'activation de la phase contact ou du système kinine-kallicréine². Les outils diagnostiques manquent à l'heure actuelle pour pouvoir discriminer ces mécanismes, ce qui rend très difficile l'exploration de ces réactions.

Les mécanismes impliqués dans les modèles d'anaphylaxie active sont eux aussi mal connus. Initialement décrits comme impliquant la production d'IgE spécifiques, il apparaît que la sensibilisation des animaux entraîne également la production d'IgG spécifiques, qui pourraient, au moins en partie, contribuer aux effets observés^{110, 112}. Le processus de sensibilisation, impliquant des adjuvants comme l'hydroxyde d'aluminium ou l'adjuvant de Freund (lipopolysaccharides), pourrait orienter de manière artificielle la réponse immunitaire vers une voie IgE ou IgG sans que cela n'ait jamais été vraiment évalué. Le risque d'observer un artéfact expérimental est donc réel et cette question doit absolument être abordée dans les futures études afin de s'assurer que ces modèles reproduisent bien un phénomène observé en clinique humaine. Dans la même ligne, l'utilisation d'HAIGG pour reproduire une réaction anaphylactique médiée par les IgG est discutable. En effet, bien que les HAIGG soient un puissant activateur du récepteur FcγRIIA/CD32A, cette approche ne reproduit pas du tout une interaction *in vivo* entre des IgG spécifiques et leur antigène, n'explorant ainsi pas la complexité de la formation des complexes immuns et celle de leur interaction avec leurs différents récepteurs. Les futurs travaux devront donc s'attacher à créer un modèle d'immunisation passive aux IgG, similaire à ce qui est fait dans l'exploration de la voie IgE, afin de s'assurer que ce qui est observé ne soit pas un artéfact de laboratoire.

Ces travaux suggèrent un rôle des plaquettes au cours du choc anaphylactique, avec un rôle différent selon le mécanisme impliqué dans la réaction. Ces résultats nécessitent néanmoins d'être renforcés par des études complémentaires.

Premièrement, les modèles expérimentaux doivent être étudiés de manière plus précise afin de s'assurer qu'ils reproduisent effectivement une situation observée en clinique humaine. Le modèle d'anaphylaxie passif IgE ne reproduit qu'un état de choc anaphylactique modéré et il serait intéressant de faire varier le protocole de sensibilisation afin d'obtenir un état de choc plus sévère afin de voir si cela permet de démasquer d'autres mécanismes mis en œuvre au cours de la réaction. Un nouveau modèle d'anaphylaxie passive médiée par les IgG doit être mis au point, basé sur l'injection d'IgG spécifique puis de l'antigène, afin d'être

plus proche de la réalité. Les modèles d'anaphylaxie active doivent être explorés, que ce soit chez la souris ou le rat, en étudiant la production respective d'IgE et d'IgG en fonction du protocole de sensibilisation puis le phénotype de la réaction en fonction de la balance IgE/IgG. La reproduction de cet équilibre en combinant les deux modèles passifs (IgE + IgG) pourrait également être d'un grand intérêt, permettant de faire varier l'équilibre, et donc potentiellement le phénotype, de manière contrôlée.

La meilleure compréhension du rôle des plaquettes dans ces différents modèles passe par différentes approches :

- Exploration des marqueurs d'activation plaquettaire dans les réactions IgE et IgG médiées, que ce soit par le dosage de marqueurs solubles ou par des analyses par cytométrie en flux.
- Étude de l'effet des variations de la numération plaquettaire dans ces différents modèles, notamment en explorant l'effet de la thrombocytose (romiplostim) et de la transfusion plaquettaire.
- Étude de l'inhibition pharmacologique des différentes voies d'activation plaquettaire (thromboxane A₂, ADP, thrombine) afin d'identifier les voies contribuant de manière significative aux effets observés.
- Utilisation de différents modèles de souris KO pour les récepteurs plaquettaires (GPIb, GPVI, P2Y₁₂, GPIIb/IIIa) et ceux contribuant à la relation plaquettes/endothélium afin d'étudier les voies préférentielles mises en jeu dans ce phénomène.
- Exploration de la présence du récepteur FcεRII/CD23 sur les plaquettes sanguines murines et humaines et étude de sa fonction.

L'étude de l'interaction entre les plaquettes et les mastocytes d'un côté, et les plaquettes et les neutrophiles de l'autre, semble être prometteuse. En effet, des travaux récents font état d'une interaction importante entre les plaquettes et les mastocytes/neutrophiles notamment *via* la sécrétion de PAF^{57, 113}. L'utilisation des techniques de microscopie intravitale bi-photonique pour visualiser les interactions cellulaires au niveau pulmonaire dans les différents modèles d'anaphylaxie sera essentielle. Le rôle du PAF dans les interactions entre plaquettes, neutrophiles et les mastocytes rend d'autant plus intéressante l'utilisation d'antagonistes spécifiques du récepteur au PAF, comme l'ABT-491, renforçant ainsi les arguments justifiant de son utilisation chez l'Homme.

L'identification de certains phénotypes (cellulaires ou biochimiques) spécifiques à certains mécanismes pourrait permettre de mieux discriminer les différents mécanismes impliqués chez l'Homme et aider ainsi à l'identification des substances à l'origine de la réaction, ce qui est essentiel pour prévenir toute récurrence lors d'une exposition ultérieure.

La validation de ces observations expérimentales chez l'Homme apparaît indispensable. Une étude humaine, menée conjointement par l'UMR-1255 et le service d'anesthésie-réanimation du Nouvel Hôpital Civil des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (étude HEMOCANOPE, NCT04825158) a été débutée en mai 2021 pour une durée de 4 ans, afin d'explorer l'état d'activation plaquettaire au cours des réactions anaphylactiques périopératoires, mais aussi les mécanismes impliqués dans ces réactions. Ces résultats devraient permettre de valider, ou de nuancer, ces résultats expérimentaux.

2. Perspectives

Ces travaux pourraient permettre de mieux caractériser les réactions observées chez l'Homme. La définition de profils biologiques spécifiques aux réactions médiées par les IgE ou par les IgG, sur la base d'un profil cellulaire et du dosage de plusieurs biomarqueurs, pourrait permettre une meilleure identification du mécanisme à l'origine de la réaction et améliorer ainsi le conseil diagnostique. Ces travaux devraient notamment nous permettre de savoir si ces réactions peuvent survenir de manière distincte chez l'Homme ou si elles surviennent systématiquement de manière concomitante. Le dosage simultané d'un marqueur d'activation mastocytaire (tryptase) et d'un marqueur d'activation des neutrophiles (myéloperoxydase) en cas de réaction humaine pourrait permettre de répondre à cette question. L'objectif à terme est d'améliorer le rendement diagnostique pour identifier les substances à l'origine de la réaction et limiter le risque de récurrence de la réaction. La confirmation d'une voie IgG chez l'Homme serait la première étape du développement de nouveaux outils diagnostiques.

Que ces réactions surviennent de manière distincte ou simultanée, la mise en évidence d'autres acteurs cellulaires et la description du rôle de certains médiateurs, comme le PAF ou la sérotonine, offre également la possibilité de cibler d'autres voies thérapeutiques dans les formes les plus sévères de choc anaphylactique, réfractaires à l'adrénaline. Il n'existe pas à l'heure actuelle d'antagoniste spécifique du récepteur au PAF disponible en clinique humaine.

Cependant, la rupatadine, un traitement antihistaminique disponible chez l'Homme, possède également une activité antagoniste pour le récepteur au PAF¹⁴. L'utilisation de ce traitement pourrait alors s'avérer très intéressante en complément du traitement par adrénaline, à condition de pouvoir disposer d'une forme injectable.

CONCLUSION

Nous avons donc montré que, bien que les plaquettes ne soient pas un effecteur primaire au cours des réactions anaphylactiques médiées par les IgE car étant dépourvues de récepteur Fc ϵ RI à leur surface, elles contribuent de manière significative à la sévérité de la réaction dans différents modèles d'anaphylaxie passive ou active, avec une réponse différente selon le mécanisme à l'origine de la réaction. Les mécanismes responsables de cet effet, notamment dans les réactions médiées par les IgE, ne sont pour l'heure pas identifiés. Le ciblage du récepteur du PAF, un médiateur produit au cours du choc anaphylactique, semble être intéressant d'un point de vue thérapeutique. Une meilleure caractérisation des modèles utilisés et une meilleure compréhension des mécanismes responsables des réactions chez l'Homme devraient permettre de mieux comprendre la contribution des plaquettes à la sévérité du choc anaphylactique.

PARTIE IV
RÉFÉRENCES

Références

- 1 Simons FE, Arduzzo LR, Bilo MB, et al. International consensus on (ICON) anaphylaxis. *World Allergy Organ J* 2014; **7**: 9
- 2 Ebo DG, Clarke RC, Mertes PM, Platt PR, Sabato V, Sadleir PHM. Molecular mechanisms and pathophysiology of perioperative hypersensitivity and anaphylaxis: a narrative review. *British journal of anaesthesia* 2019; **123**: e38-e49
- 3 Tacquard C, Collange O, Gomis P, et al. Anaesthetic hypersensitivity reactions in France between 2011 and 2012: the 10th GERAP epidemiologic survey. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 2017; **61**: 290-9
- 4 Bruhns P, Chollet-Martin S. Mechanisms of human drug-induced anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2021; **147**: 1133-42
- 5 Khan BQ, Kemp SF. Pathophysiology of anaphylaxis. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2011; **11**: 319-25
- 6 Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ. The pathophysiology of anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2017; **140**: 335-48
- 7 Aubert N, Mertes PM, Janaszak M, et al. Dendritic cells present neuromuscular blocking agent-related epitopes to T cells from allergic patients. *Allergy* 2004; **59**: 1022-3
- 8 O'Sullivan JA, Bochner BS. Eosinophils and eosinophil-associated diseases: An update. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2018; **141**: 505-17
- 9 Dieterich HJ, Kraft D, Sirtl C, et al. Hydroxyethyl starch antibodies in humans: incidence and clinical relevance. *Anesthesia and analgesia* 1998; **86**: 1123-6
- 10 Dietrich W, Spath P, Zuhlsdorf M, et al. Anaphylactic reactions to aprotinin reexposure in cardiac surgery: relation to antiaprotinin immunoglobulin G and E antibodies. *Anesthesiology* 2001; **95**: 64-71; discussion 5A-6A
- 11 Beutier H, Hechler B, Godon O, et al. Platelets expressing IgG receptor FcγRIIA/CD32A determine the severity of experimental anaphylaxis. *Sci Immunol* 2018; **3**
- 12 Jonsson F, Mancardi DA, Zhao W, et al. Human FcγRIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood* 2012; **119**: 2533-44
- 13 Jonsson F, Mancardi DA, Albanesi M, Bruhns P. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *Journal of leukocyte biology* 2013; **94**: 643-56

- 14 Jonsson F, de Chaisemartin L, Granger V, et al. An IgG-induced neutrophil activation pathway contributes to human drug-induced anaphylaxis. *Sci Transl Med* 2019; **11**
- 15 Findlay SR, Dvorak AM, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Hyperosmolar triggering of histamine release from human basophils. *The Journal of clinical investigation* 1981; **67**: 1604-13
- 16 Genovese A, Stellato C, Marsella CV, Adt M, Marone G. Role of mast cells, basophils and their mediators in adverse reactions to general anesthetics and radiocontrast media. *International archives of allergy and immunology* 1996; **110**: 13-22
- 17 Renz C, Lynch J, Thurn J, Moss J. Histamine release during rapid vancomycin administration. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 1998; **47 Suppl 1**: S69-70
- 18 Harle DG, Baldo BA, Fisher MM. Inhibition of histamine-N-methyltransferase activity by neuromuscular blocking drugs. *Agents Actions* 1985; **17**: 27-31
- 19 Blossom DB, Kallen AJ, Patel PR, et al. Outbreak of adverse reactions associated with contaminated heparin. *The New England journal of medicine* 2008; **359**: 2674-84
- 20 Warkentin TE, Greinacher A. Heparin-induced anaphylactic and anaphylactoid reactions: two distinct but overlapping syndromes. *Expert Opin Drug Saf* 2009; **8**: 129-44
- 21 Adam A, Montpas N, Keire D, et al. Bradykinin forming capacity of oversulfated chondroitin sulfate contaminated heparin in vitro. *Biomaterials* 2010; **31**: 5741-8
- 22 Sala-Cunill A, Bjorkqvist J, Senter R, et al. Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2015; **135**: 1031-43 e6
- 23 Bender L, Weidmann H, Rose-John S, Renne T, Long AT. Factor XII-Driven Inflammatory Reactions with Implications for Anaphylaxis. *Front Immunol* 2017; **8**: 1115
- 24 Wedi B, Gehring M, Kapp A. The pseudoallergen receptor MRGPRX2 on peripheral blood basophils and eosinophils: Expression and function. *Allergy* 2020; **75**: 2229-42
- 25 McNeil BD, Pundir P, Meeker S, et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature* 2015; **519**: 237-41
- 26 Grimes J, Desai S, Charter NW, et al. MrgX2 is a promiscuous receptor for basic peptides causing mast cell pseudo-allergic and anaphylactoid reactions. *Pharmacol Res Perspect* 2019; **7**: e00547

- 27 Elst J, Maurer M, Sabato V, et al. Novel Insights on MRGPRX2-Mediated Hypersensitivity to Neuromuscular Blocking Agents And Fluoroquinolones. *Frontiers in Immunology* 2021; **12**
- 28 Elst J, Sabato V, Faber MA, et al. MRGPRX2 and Immediate Drug Hypersensitivity: Insights from Cultured Human Mast Cells. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2020: 0
- 29 Laroche D, Vergnaud MC, Sillard B, Soufarapis H, Bricard H. Biochemical markers of anaphylactoid reactions to drugs. Comparison of plasma histamine and tryptase. *Anesthesiology* 1991; **75**: 945-9
- 30 Marone G, Genovese A, Varricchi G, Granata F. Human heart as a shock organ in anaphylaxis. *Allergo journal international* 2014; **23**: 60-6
- 31 Kayasuga R, Sugimoto Y, Watanabe T, Kamei C. Participation of chemical mediators other than histamine in nasal allergy signs: a study using mice lacking histamine H(1) receptors. *European journal of pharmacology* 2002; **449**: 287-91
- 32 Mink S, Becker A, Sharma S, Unruh H, Duke K, Kepron W. Role of autacoids in cardiovascular collapse in anaphylactic shock in anaesthetized dogs. *Cardiovascular research* 1999; **43**: 173-82
- 33 Magnan A, Pipet A, Berard F, Malinovsky JM, Mertes PM. [Mechanisms of allergic reactions occurring during anaesthesia]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation* 2011; **30**: 240-5
- 34 Yost CC, Weyrich AS, Zimmerman GA. The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. *Biochimie* 2010; **92**: 692-7
- 35 Stafforini DM. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2). *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 2009; **23**: 73-83
- 36 Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, et al. Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010; **125**: 1137-45 e6
- 37 Vadas P, Perelman B. Effect of epinephrine on platelet-activating factor-stimulated human vascular smooth muscle cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2012; **129**: 1329-33
- 38 Vadas P, Perelman B, Liss G. Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013; **131**: 144-9

- 39 Shinomiya S, Shibamoto T, Kurata Y, et al. Nitric oxide and beta(2)-adrenoceptor activation attenuate pulmonary vasoconstriction during anaphylactic hypotension in anesthetized BALB/c mice. *Experimental lung research* 2013; **39**: 119-29
- 40 Hox V, Desai A, Bandara G, Gilfillan AM, Metcalfe DD, Olivera A. Estrogen increases the severity of anaphylaxis in female mice through enhanced endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2015; **135**: 729-36 e5
- 41 Misbah SA, Krishna MT. Peri-Operative Anaphylaxis-An Investigational Challenge. *Front Immunol* 2019; **10**: 1117
- 42 Pichler WJ. Immune pathomechanism and classification of drug hypersensitivity. *Allergy* 2019; **74**: 1457-71
- 43 Engeroff P, Vogel M. The role of CD23 in the regulation of allergic responses. *Allergy* 2020
- 44 Guttormsen AB, Johansson SG, Oman H, Wilhelmsen V, Nopp A. No consumption of IgE antibody in serum during allergic drug anaphylaxis. *Allergy* 2007; **62**: 1326-30
- 45 Ebo DG, De Puyseleir LP, Van Gasse AL, et al. Mast Cell Activation During Suspected Perioperative Hypersensitivity: A Need for Paired Samples Analysis. *The journal of allergy and clinical immunology In practice* 2021
- 46 Strait RT, Morris SC, Finkelman FD. IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIB cross-linking. *The Journal of clinical investigation* 2006; **116**: 833-41
- 47 Wang N, McKell M, Dang A, et al. Lipopolysaccharide suppresses IgE-mast cell-mediated reactions. *Clin Exp Allergy* 2017; **47**: 1574-85
- 48 Pennington LF, Gasser P, Brigger D, Guntern P, Eggel A, Jardetzky TS. Structure-guided design of ultrapotent disruptive IgE inhibitors to rapidly terminate acute allergic reactions. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2021
- 49 Tanno LK, Alvarez-Perea A, Pouessel G. Therapeutic approach of anaphylaxis. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2019; **19**: 393-401
- 50 Zheng F, Barthel G, Collange O, et al. Methylene blue and epinephrine: a synergetic association for anaphylactic shock treatment. *Critical care medicine* 2013; **41**: 195-204
- 51 Pinckard RN, Halonen M, Palmer JD, Butler C, Shaw JO, Henson PM. Intravascular aggregation and pulmonary sequestration of platelets during IgE-induced systemic

- anaphylaxis in the rabbit: abrogation of lethal anaphylactic shock by platelet depletion. *J Immunol* 1977; **119**: 2185-93
- 52 Pretolani M, Page CP, Lefort J, Lagente V, Vargaftig BB. Pharmacological modulation of the respiratory and haematological changes accompanying active anaphylaxis in the guinea-pig. *European journal of pharmacology* 1986; **125**: 403-9
- 53 Yoshida A, Ohba M, Wu X, Sasano T, Nakamura M, Endo Y. Accumulation of platelets in the lung and liver and their degranulation following antigen-challenge in sensitized mice. *British journal of pharmacology* 2002; **137**: 146-52
- 54 Krishnamurthy D, Starkl P, Szalai K, et al. Monitoring neutrophils and platelets during casein-induced anaphylaxis in an experimental BALB/c mouse model. *Clin Exp Allergy* 2012; **42**: 1119-28
- 55 Cloutier N, Allaeyes I, Marcoux G, et al. Platelets release pathogenic serotonin and return to circulation after immune complex-mediated sequestration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2018
- 56 Gill P, Jindal NL, Jagdis A, Vadas P. Platelets in the immune response: Revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2015; **135**: 1424-32
- 57 Karhausen J, Choi HW, Maddipati KR, et al. Platelets trigger perivascular mast cell degranulation to cause inflammatory responses and tissue injury. *Sci Adv* 2020; **6**: eaay6314
- 58 Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol* 2014; **14**: 478-94
- 59 Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 2009; **60**: 355-66
- 60 Bermejo N, GuÉAnt JL, Mata E, GguÉRard P, Moneret-Vautrin DA, Laxenaire MC. Platelet Serotonin Is a Mediator Potentially Involved in Anaphylactic Reaction to Neuromuscular Blocking Drugs. *British journal of anaesthesia* 1993; **70**: 322-5
- 61 Brindley LL, Sweet JM, Goetzl EJ. Stimulation of histamine release from human basophils by human platelet factor 4. *The Journal of clinical investigation* 1983; **72**: 1218-23
- 62 Joseph M, Gounni AS, Kusnierz JP, et al. Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. *European journal of immunology* 1997; **27**: 2212-8

- 63 Hasegawa S, Pawankar R, Suzuki K, et al. Functional Expression of the High Affinity Receptor for IgE (FcεRI) in Human Platelets and Its' Intracellular Expression in Human Megakaryocytes. *Blood* 1999; **93**: 2543-51
- 64 Panesar SS, Javad S, de Silva D, et al. The epidemiology of anaphylaxis in Europe: a systematic review. *Allergy* 2013; **68**: 1353-61
- 65 Baseggio Conrado A, Patel N, Turner PJ. Global patterns in anaphylaxis due to specific foods: A systematic review. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2021
- 66 Turner PJ, Gowland MH, Sharma V, et al. Increase in anaphylaxis-related hospitalizations but no increase in fatalities: an analysis of United Kingdom national anaphylaxis data, 1992-2012. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2015; **135**: 956-63 e1
- 67 Yao TC, Wu AC, Huang YW, Wang JY, Tsai HJ. Increasing trends of anaphylaxis-related events: an analysis of anaphylaxis using nationwide data in Taiwan, 2001-2013. *World Allergy Organ J* 2018; **11**: 23
- 68 Turner PJ, Campbell DE, Motosue MS, Campbell RL. Global Trends in Anaphylaxis Epidemiology and Clinical Implications. *The journal of allergy and clinical immunology In practice* 2019
- 69 Mertes PM, Ebo DG, Garcez T, et al. Comparative epidemiology of suspected perioperative hypersensitivity reactions. *British journal of anaesthesia* 2019; **123**: e16-e28
- 70 Mertes PM, Alla F, Trechot P, Auroy Y, Jouglu E. Anaphylaxis during anesthesia in France: an 8-year national survey. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011; **128**: 366-73
- 71 Mertes PM, Malinovsky JM, Mouton-Faivre C, et al. Anaphylaxis to dyes during the perioperative period: reports of 14 clinical cases. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008; **122**: 348-52
- 72 Raulf M. The latex story. *Chem Immunol Allergy* 2014; **100**: 248-55
- 73 Harper NJN, Cook TM, Garcez T, et al. Anaesthesia, surgery, and life-threatening allergic reactions: management and outcomes in the 6th National Audit Project (NAP6). *British journal of anaesthesia* 2018; **121**: 172-88
- 74 Guerzi P, Tacquard C, Chenard L, et al. Epidemiology and outcome of patients admitted to intensive care after anaphylaxis in France: a retrospective multicentre study. *British journal of anaesthesia* 2020

- 75 Perez-Codesido S, Rosado-Ingelmo A, Privitera-Torres M, et al. Incidence of Fatal Anaphylaxis: A Systematic Review of Observational Studies. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2021; 0
- 76 Pouessel G, Claverie C, Labreuche J, et al. Fatal anaphylaxis in France: Analysis of national anaphylaxis data, 1979-2011. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2017; **140**: 610-2 e2
- 77 Mitsuhashi H, Matsumoto S, Hasegawa J. [The epidemiology and clinical features of anaphylactic and anaphylactoid reactions in the perioperative period in Japan]. *Masui* 1992; **41**: 1664-9
- 78 Reitter M, Petitpain N, Latache C, et al. Fatal anaphylaxis with neuromuscular blocking agents: a risk factor and management analysis. *Allergy* 2014; **69**: 954-9
- 79 Turner PJ, Jerschow E, Umasunthar T, Lin R, Campbell DE, Boyle RJ. Fatal Anaphylaxis: Mortality Rate and Risk Factors. *The journal of allergy and clinical immunology In practice* 2017; **5**: 1169-78
- 80 Francuzik W, Dolle-Bierke S, Knop M, et al. Refractory Anaphylaxis: Data From the European Anaphylaxis Registry. *Front Immunol* 2019; **10**: 2482
- 81 Mertes PM, Collange O, Degirmenci SE, Tacquard C, Petitpain N, Malinovsky J-M. Le choc anaphylactique. *Anesthésie & Réanimation* 2015; **1**: 33-42
- 82 Tajima K, Zheng F, Collange O, et al. Time to achieve target mean arterial pressure during resuscitation from experimental anaphylactic shock in an animal model. A comparison of adrenaline alone or in combination with different volume expanders. *Anaesthesia and intensive care* 2013; **41**: 765-73
- 83 Barthel G, Zheng F, Demoulin B, et al. Biphasic airway-lung response to anaphylactic shock in Brown Norway rats. *Respiratory physiology & neurobiology* 2013; **189**: 47-51
- 84 Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001; **56**: 813-24
- 85 Mertes PM, Malinovsky JM, Jouffroy L, et al. Reducing the risk of anaphylaxis during anesthesia: 2011 updated guidelines for clinical practice. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011; **21**: 442-53
- 86 Muraro A, Roberts G, Worm M, et al. Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 2014; **69**: 1026-45

- 87 Rosado Ingelmo A, Dona Diaz I, Cabanas Moreno R, et al. Clinical Practice Guidelines for Diagnosis and Management of Hypersensitivity Reactions to Contrast Media. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2016; **26**: 144-55
- 88 Garvey LH, Dewachter P, Hepner DL, et al. Management of suspected immediate perioperative allergic reactions: an international overview and consensus recommendations. *British journal of anaesthesia* 2019; **123**: e50-e64
- 89 Ishizaka T, Ishizaka K, Orange RP, Frank Austen K. Pharmacologic Inhibition of the Antigen-Induced Release of Histamine and Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRS-A) from Monkey Lung Tissues Mediated by Human IgE. *The Journal of Immunology* 1971; **106**: 1267-73
- 90 Campbell RL, Bellolio MF, Knutson BD, et al. Epinephrine in anaphylaxis: higher risk of cardiovascular complications and overdose after administration of intravenous bolus epinephrine compared with intramuscular epinephrine. *The journal of allergy and clinical immunology In practice* 2015; **3**: 76-80
- 91 S YH. Clinical features and outcome of epinephrine-induced takotsubo syndrome: Analysis of 33 published cases. *Cardiovasc Revasc Med* 2016; **17**: 450-5
- 92 Kawano T, Scheuermeyer FX, Stenstrom R, Rowe BH, Grafstein E, Grunau B. Epinephrine use in older patients with anaphylaxis: Clinical outcomes and cardiovascular complications. *Resuscitation* 2017; **112**: 53-8
- 93 Gloaguen A, Cesareo E, Vaux J, et al. Prise en charge de l'anaphylaxie en médecine d'urgence. Recommandations de la Société française de médecine d'urgence (SFMU) en partenariat avec la Société française d'allergologie (SFA) et le Groupe francophone de réanimation et d'urgences pédiatriques (GFRUP), et le soutien de la Société pédiatrique de pneumologie et d'allergologie (SP2A). *Annales françaises de médecine d'urgence* 2016; **6**: 342-64
- 94 Sheikh A, Ten Broek V, Brown SG, Simons FE. H1-antihistamines for the treatment of anaphylaxis: Cochrane systematic review. *Allergy* 2007; **62**: 830-7
- 95 Choo KJ, Simons E, Sheikh A. Glucocorticoids for the treatment of anaphylaxis: Cochrane systematic review. *Allergy* 2010; **65**: 1205-11
- 96 Jang DH, Nelson LS, Hoffman RS. Methylene blue for distributive shock: a potential new use of an old antidote. *Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology* 2013; **9**: 242-9

- 97 Zheng F, Collange O, Davidson J, et al. Epinephrine, compared with arginine vasopressin, is associated with similar haemodynamic effects but significantly improved brain oxygenation in the early phase of anaphylactic shock in rats: An experimental study. *European journal of anaesthesiology* 2015; **32**: 563-70
- 98 Tomasiak-Łozowska MM, Klimek M, Lis A, Moniuszko M, Bodzenta-Łukaszyk A. Markers of anaphylaxis – a systematic review. *Advances in Medical Sciences* 2018; **63**: 265-77
- 99 Tacquard C, Laroche D, Stenger R, et al. Diagnostic procedure after an immediate hypersensitivity reaction in the operating room. *Presse Med* 2016
- 100 Garvey LH, Ebo DG, Mertes PM, et al. An EAACI position paper on the investigation of perioperative immediate hypersensitivity reactions. *Allergy* 2019; **74**: 1872-84
- 101 Ebo DG, Faber M, Elst J, et al. In Vitro Diagnosis of Immediate Drug Hypersensitivity During Anesthesia: A Review of the Literature. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 2018; **6**: 1176-84
- 102 Marraccini P, Pignatti P, apos, Alcamo A, Salimbeni R, Consonni D. Basophil Activation Test Application in Drug Hypersensitivity Diagnosis: An Empirical Approach. *International archives of allergy and immunology* 2018; **177**: 160-6
- 103 Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**: 931-72
- 104 Hasegawa A. Functional Expression of the High Affinity Receptor for IgE (Fc ϵ RI) in Human Platelets and Its' Intracellular Expression in Human Megakaryocytes.
- 105 Albert DH, Magoc TJ, Tapang P, et al. Pharmacology of ABT-491, a highly potent platelet-activating factor receptor antagonist. *European journal of pharmacology* 1997; **325**: 69-80
- 106 Albert DH, Malo PE, Tapang P, et al. The role of platelet-activating factor (PAF) and the efficacy of ABT-491, a highly potent and selective PAF antagonist, in experimental allergic rhinitis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1998; **284**: 83-8
- 107 Arias K, Baig M, Colangelo M, et al. Concurrent blockade of platelet-activating factor and histamine prevents life-threatening peanut-induced anaphylactic reactions. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2009; **124**: 307-14, 14 e1-2
- 108 Shamji MH, Valenta R, Jardetzky T, et al. The role of allergen-specific IgE, IgG and IgA in allergic disease. *Allergy* 2021
- 109 Davenport P, Liu ZJ, Sola-Visner M. Changes in megakaryopoiesis over ontogeny and their implications in health and disease. *Platelets* 2020; **31**: 692-9

- 110 Abril-Gil M, Garcia-Just A, Perez-Cano FJ, Franch A, Castell M. Development and characterization of an effective food allergy model in Brown Norway rats. *PloS one* 2015; **10**: e0125314
- 111 Tacquard C, Oulehri W, Collange O, et al. Treatment with a Platelet Activating Factor receptor antagonist improves hemodynamics and reduces epinephrine requirements, in a lethal rodent model of anaphylactic shock. *Clin Exp Allergy* 2019
- 112 Bellou A, Saint-Laudy J, Knippels L, et al. Brown Norway rat ovalbumin-specific immunoglobulin E antibodies increase the human basophil expression of CD63 marker. *Scandinavian journal of immunology* 2003; **57**: 271-8
- 113 Dudeck J, Kotrba J, Immler R, et al. Directional mast cell degranulation of tumor necrosis factor into blood vessels primes neutrophil extravasation. *Immunity* 2021; **54**: 468-83 e5
- 114 Munoz-Cano R, Ainsua-Enrich E, Torres-Atencio I, et al. Effects of Rupatadine on Platelet-Activating Factor-Induced Human Mast Cell Degranulation Compared With Desloratadine and Levocetirizine (The MASPAF Study). *J Investig Allergol Clin Immunol* 2017; **27**: 161-8

RÉSUMÉS

Le choc anaphylactique est l'expression la plus sévère des réactions d'hypersensibilité immédiate. Les mécanismes conduisant à ces réactions sont encore mal compris et pourraient impliquer les plaquettes, notamment dans les formes les plus sévères.

Nos résultats indiquent que, bien que les plaquettes ne soient pas un effecteur primaire au cours des réactions anaphylactiques médiées par les IgE, elles contribuent de manière significative à moduler la sévérité de la réaction dans différents modèles expérimentaux d'anaphylaxie, avec une réponse différente selon le mécanisme à l'origine de la réaction. Les mécanismes responsables de cet effet ne sont pour l'heure pas identifiés. Le ciblage du récepteur du Platelet Activating Factor semble être intéressant d'un point de vue thérapeutique. Une meilleure caractérisation des modèles utilisés et des mécanismes responsables des réactions chez l'Homme devrait permettre de mieux comprendre la contribution des plaquettes à la sévérité du choc anaphylactique.

Mots clés: Anaphylaxie, Plaquettes, Neutrophiles, FcεRI, Platelet Activating Factor

Anaphylactic shock is the most severe expression of immediate hypersensitivity reactions. The mechanisms leading to these reactions are still poorly understood and may involve platelets, especially in the most severe forms.

Our results indicate that, although platelets are not a primary effector during IgE-mediated anaphylactic reactions, they contribute significantly to modulate the severity of the reaction in different experimental models of anaphylaxis, with a different response depending on the mechanism of the reaction. The mechanisms responsible for this effect are not yet identified. Targeting the Platelet Activating Factor receptor seems to be interesting from a therapeutic point of view. A better characterization of the models used and the mechanisms responsible for the reactions in humans should allow a better understanding of the contribution of platelets to the severity of anaphylactic shock.

Key words: Anaphylaxis, Platelets, Neutrophils, FcεRI, Platelet Activating Factor