



Nouvelles approches diagnostiques du choc anaphylactique aux curares

Aurélie Gouel-Chéron

► To cite this version:

Aurélie Gouel-Chéron. Nouvelles approches diagnostiques du choc anaphylactique aux curares. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066289 . tel-01452781

HAL Id: tel-01452781

<https://theses.hal.science/tel-01452781>

Submitted on 2 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale ED394 Physiologie et Physiopathologie
Spécialité : Immunologie

Aurélie GOUEL-CHERON

Nouvelles approches diagnostiques
du choc anaphylactique aux curares

Soutenue publiquement le 05/12/2016 devant le jury composé de :

Pr. Guy GOROCHOV	Président
Pr. Pascal DEMOLY	Rapporteur
Dr. Jean-Luc TEILLAUD	Rapporteur
Pr. Pierre AUCOUTURIER	Examineur
Pr. Jean-Marc MALIVOSKY	Examineur
Dr. Pierre BRUHNS	Directeur de Thèse
Pr. Dan LONGROIS	Directeur de Thèse

Ce travail a été effectué au sein de :
Anticorps en Thérapie et Pathologie, Unité INSERM U1222, Institut Pasteur
Département d'anesthésie-réanimation, Hôpital Bichat-Claude Bernard

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord profondément remercier mes deux directeurs de thèse, Pierre Bruhns et Dan Longrois. Vous m'avez apporté de la rigueur ainsi qu'un esprit critique. Vous m'avez donné le goût de la curiosité scientifique et de l'approfondissement des connaissances. Vous m'avez soutenue et supportée lorsque certains obstacles se présentaient. Vous avez patiemment écouté mes interrogations et prodigué de précieux conseils de sagesse. Merci également pour m'avoir soutenue dans l'écriture des articles et du manuscrit. Ces quelques années ont été extrêmement riches et je vous en suis très reconnaissante.

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des membres du jury, Pierre Aucouturier, Pascal Demoly, Guy Gorochoff, Jean-Marc Malinosky, Jean-Luc Teillaud qui ont accepté de juger ce travail. Je remercie particulièrement Pascal Demoly et Jean-Luc Teillaud qui ont consacré du temps à l'établissement d'un rapport. Je remercie également Paul-Michel Mertes pour notre collaboration dans deux manuscrits ainsi que pour ses précieux conseils lors de mon comité de mi-thèse et du congrès de la SFAR.

Je ne sais pas comment se serait déroulée cette thèse sans le soutien de Philippe Montravers. Je vous remercie pour avoir cru en moi et m'avoir soutenue dès le début. Sans votre soutien, ce travail n'aurait pas pu commencer. Merci de m'avoir accompagnée dans cette aventure scientifique. Rien n'aurait été bien sur possible sans le soutien de tous mes collègues de l'hôpital Bichat qui ont accepté mes absences pendant que j'étais à l'Institut Pasteur. Je remercie particulièrement l'équipe de chirurgie cardiaque, avec une affection particulière pour Marie-Pierre, Jean-Pol et Daniel, et de la réanimation chirurgicale à l'heure où n'étions que quelques vaillants : Brice, Elise, Paola et Pascal, et notre relève : Aurélie, Claire, Jean-Baptiste et Mouna. Merci à tous pour cette ambiance chaleureuse de travail et ces agréables moments passés ensemble.

Je voudrais remercier tous les membres de l'unité ATP. Cette année parmi vous m'a permis de découvrir une autre forme de vie d'équipe qu'à l'hôpital. Chacun d'entre vous apporte sa part d'édifice à cette petite famille et participe à une atmosphère enjouée dans laquelle il fait bon travailler. Freddie, je voudrais te remercier sincèrement pour ces quatre années intenses d'interactions, particulièrement sur l'étude NASA (même si je suis sûre que tu as du parfois en avoir marre d'attendre les tubes des témoins). Merci d'avoir été toujours aussi disponible pour m'aider et pour discuter. Caitlin, ton sourire et ta bonne humeur sont contagieux. Merci pour ton aide sur tous les ELISA et pour toute l'aide que tu m'as apportée sur l'avancée de mes manip. Ophélie, bien sûr, je te remercie de m'avoir fourni tous les contrôles positifs de mes ELISA. Mais c'est surtout tes délicates attentions dans des moments plus ou moins faciles, enrobées d'une énergie débordante, qui m'ont aidée au cours de cette année. Odile, je te suis vraiment reconnaissante de m'avoir accompagnée dans la découverte du FACS et d'avoir toujours

été libre pour une manip même à la dernière minute. Je te remercie également pour ta présence et ton soutien délicat juste derrière moi toute cette année. Bianca, j'ai rarement rencontré quelqu'un d'aussi enthousiaste et joyeux que toi. Cela booste de t'avoir comme voisine ! Je te remercie pour tes attentions, tes messages, nos longues discussions, scientifiques ou pas. Biliana, je te remercie pour ta gentillesse constante et tes gâteaux réguliers (heureusement que tu avais trop commandé !). Bruno, je te remercie pour nos conversations de sport, de santé (même si tu ne m'écoutes pas), dans le labo et dans le P2. Et oui, je sais comment fonctionne un robinet trois voies !!! Carlos, merci pour le Pisco. Corentin, tu étais un super co-bureau ! Merci d'avoir accepté nos débordements réguliers avec Bianca sans râler. Nous avons encore tes bières sous les pieds ! Danièle, je te remercie pour ton aide logistique efficace, particulièrement dans mes commandes un peu bizarres à facturer. Guillaume, merci de n'avoir pas trop râlé lorsque j'ai perdu ton échantillon et de tous les conseils de boissons. Héloïse, quel plaisir de t'avoir eu comme voisine de carrel pendant la période de rédaction de thèse ! Je te remercie pour ton calme, ta douceur et ta sérénité. Julien, merci pour la leçon de dégustation de vin, je m'en souviendrais longtemps !!!! Laurent, merci pour toutes les pauses cafés du matin ! Les téméraires du matin ne sont pas nombreux. Heureusement que nous étions quelques-uns pour pouvoir bien démarrer la journée et discuter ! Pauline, merci pour ta présence délicate. Merci à Pablo et Yu de venir assurer la relève des thésards du labo, ils auraient été en minorité sans vous !

Je tiens à remercier très sincèrement Sylvie Chollet-Martin pour son soutien constant et sa confiance notamment dans l'étude NASA. J'ai été ravie de collaborer avec vous sur tous les projets, aussi bien NASA que ceux soumis à la SFAR et j'espère que cela pourra continuer. Luc, je te remercie également énormément pour notre collaboration intense et nos nombreux échanges. Tu as été particulièrement disponible, malgré ta charge de travail clinique, notamment ces derniers mois dans les réévaluations des patients. Ta force tranquille est un vrai bonheur dans des situations de crise ! Je tiens à remercier également Pascale Nicaise et Vanessa Granger pour nos collaborations directes ou interposées dans l'étude NASA. Élément central de l'étude NASA, je tiens à remercier Catherine Neukirch. Faire des consultations d'allergologie avec toi a été extrêmement enrichissant. Tu as été très prévenante lorsque je me suis retrouvée de l'autre côté et je te remercie également pour cela. Je remercie l'ensemble des collaborateurs de l'étude NASA, aussi bien dans les centres investigateurs d'anesthésie-réanimation qu'au département d'allergologie de l'hôpital Foch ou à l'URC, notamment Nessima Younes qui a toujours répondu à mes questions.

Au sein de l'Institut Pasteur, je remercie tous les collaborateurs qui m'ont aidé à développer ce projet notamment Sylvie Bay et Christelle Ganneau. Sans votre soutien (et votre réconfort dans un grand moment de crise), les couplages n'auraient pu aboutir et le projet se serait arrêté avant même d'avoir commencé ! Merci à Sébastien Prier d'avoir réalisé des analyses sur ces couplages au milieu de l'été lorsque cela n'était pas prévu. Un grand merci à toute l'équipe de la plateforme de biophysique,

notamment Bertrand Raynal, Sébastien Brule et Bruno Baron pour avoir analysé mes anticorps aux concentrations trop faibles pour être étudiées et pour avoir longuement discuté des conditions d'optimisation de ces anticorps, dans une ambiance toujours très joyeuse. Merci de m'avoir aidée pour tout cela. Je tiens à remercier sincèrement Jean-Marc Cavaillon, mon tuteur de l'Institut Pasteur, qui m'a soutenue, encouragée et joué un rôle important sur mon approche du projet.

Travailler à l'Institut Pasteur permet d'avoir accès à énormément de services, ce qui est très précieux, ce que l'on réalise d'autant plus facilement lorsque l'on vient de l'hôpital (où tout est très compliqué). Je voudrais donc remercier tous ceux qui font que la vie y est plus facile, et ont en plus le sourire, notamment le personnel de l'accueil, du service d'expédition, de réception des produits biologiques, de la reprographie ainsi que les gardes de sécurité.

Ce qui permet de s'épanouir dans sa vie professionnelle, de trouver sa voie, c'est le socle que constituent la famille et les amis, qui sont là dans les bons comme dans les mauvais moments. Ma famille, Maman, Nicolas, Grégoire et Gaëlle, je vous remercie pour votre affection et votre soutien, votre compréhension et votre pardon quand je suis trop speed ou que je n'ai pas le temps. Vous faites partie de ce que j'ai de plus précieux ! Je voudrais remercier également tous mes amis pour m'apporter beaucoup de joie et d'affection, notamment Aymeric et Charline, Mathilde, Raphaële, Anne et JP, Clélia et JC, Charlie, Marie et Damien, Sophie et Gab.

Bien sûr, mes enfants, Elise et Clément, vous n'avez pas directement contribué à ce manuscrit. Mais, en dépit de vos nombreuses maladies infantiles et quelques colères, vos babillages, vos sourires, vos câlins, vos progrès merveilleux font de moi une Maman heureuse. Enfin, je voudrais remercier Christophe sans qui incontestablement rien n'aurait été possible. Tes contributions logistique et statistique à cette thèse sont incontestables. Merci surtout pour ta présence, ton amour, ton soutien indéfectible et cette façon si particulière que tu as de me faire tout relativiser.

TABLE DES MATIERES

Résumé	1
Abstract	2
Préambule.....	2
Liste des abréviations	4
Introduction	5
1 Manifestations et prises en charge des réactions d'hypersensibilité peropératoires.....	5
1.1 Définitions	5
1.2 Epidémiologie, incidence, terrain, étiologie	5
1.3 Manifestations cliniques.....	6
1.4 Prise en charge thérapeutique des réactions d'hypersensibilité peropératoires	7
1.5 Bilan allergologique après suspicion de réaction d'hypersensibilité peropératoire	7
2 Curares.....	8
2.1 Définition, classification, mode d'action et propriétés des curares	8
2.2 Identification des anticorps anti-curares.....	9
2.2.1 Différents antigènes utilisés dans la détection des anticorps anti-curares	9
2.2.2 Relation structure du curare et potentiel allergique	11
2.3 Mécanismes physiopathologiques des réactions d'hypersensibilité aux curares.....	12
2.4 Difficultés diagnostiques de l'anaphylaxie aux curares	12
3 Voies alternatives des réactions d'hypersensibilité aiguë.....	13
4 IgG : structures et récepteurs	16
4.1 Structure des IgG et particularités au sein des sous-classes	16
4.2 Expressions cellulaires des récepteurs humains aux IgG et fixation des sous-classes	19
Objectifs	23
Article 1	25
Article 2.....	26
Synthèse des conjugués protéine-curare pour l'analyse des igg anti-aq par elisa.....	27
1 Synthèse des intermédiaires des curares.....	28
1.1 Synthèse du dérivé du rocuronium	28
1.2 Synthèse du dérivé de la succinylcholine	29
2 Couplage protéique.....	30
2.1 Généralités.....	30
2.2 Couplage protéique du rocuronium-COOH	30
2.3 Couplage protéique de la succinylmonocholine	35
3 Conclusion.....	35

Article 3.....	37
Discussion	38
1 Endotype et phénotype des réactions aiguës d'hypersensibilité.....	38
1.1 Présence d'anticorps et manifestation clinique d'hypersensibilité.....	38
1.2 Influences de l'environnement dans l'allergie.....	39
1.2.1 Hypothèse hygiéniste dans le développement de l'allergie	39
1.2.2 Epigénétique et allergie	40
1.3 Affinité des anticorps et déclenchement d'une réaction d'hypersensibilité	41
2 Sensibilisation aux ammoniums quaternaires : l'hypothèse de l'environnement.....	45
2.1 La présence des groupements ammonium quaternaires dans l'environnement.....	45
2.2 L'identification d'anticorps anti-ammonium quaternaires et des réactions croisées	47
3 Participation des IgG et des polynucléaires neutrophiles dans les réactions d'hypersensibilité aiguë peropératoires.....	51
3.1 Apport des modèles animaux	51
3.2 Relation IgG spécifiques et sévérité de la réaction d'hypersensibilité aiguë	53
3.3 Neutrophil Extracellular Traps	54
3.4 Interactions plaquettes et IgG	57
3.5 Patients de l'étude NASA sans marqueurs d'activation de la voie IgE	57
Conclusions et perspectives.....	60
Références	61
Annexes.....	74
1 Revue de littérature : Contribution of human FcγRs to disease with evidence from human polymorphisms and transgenic animal studies	74
2 Revue de littérature : Management of anaphylactic shock in the operating room	74
3 Chapitre de livre : Anaphylaxis (Immediate hypersensitivity): from old to new mechanisms..	74

RESUME

Etablir le diagnostic d'une réaction d'hypersensibilité aiguë (RHA) peropératoire est difficile du fait de l'incidence supérieure des diagnostics différentiels. Les facteurs de risques en sont mal établis. Il n'existe pas de signe clinique fiable aidant à un diagnostic rapide. Alors que 25% des explorations immunologiques classiques ne mettent pas en évidence un mécanisme IgE-médié, des études animales et humaines suggèrent un rôle des IgG dans ces RHA non caractérisées. Ce travail s'est basé sur deux cohortes de patients : la première pour étudier des phénotypes en lien avec l'apparition d'un bronchospasme, la seconde pour analyser des marqueurs diagnostiques au bloc opératoire et explorer un mécanisme alternatif impliquant les IgG. La survenue d'un bronchospasme au cours d'une RHA peropératoire n'est pas associée à un antécédent d'asthme mais au curare comme agent étiologique. La mise en évidence de la valeur diagnostique d'une hypocapnie inférieure à 20 mmHg dans le caractère sévère de la RHA devrait aider les cliniciens à l'établissement rapide du diagnostic. La présence d'IgG spécifiques anti-curares était associée à la survenue d'une RHA sévère suggérant une participation des IgG à la gravité de la RHA en association avec les IgE. En fonction du curare administré, le mécanisme de la RHA semble différent : implication d'anticorps (IgE et/ou IgG) dans 90% pour succinylcholine et rocuronium mais uniquement 50% pour atracurium suggérant une importante contribution de l'histamino-libération dans ces réactions. L'ensemble de ces travaux devraient permettre d'améliorer les performances diagnostiques en temps réel et à distance lors de la survenue d'une RHA peropératoire.

ABSTRACT

Diagnosis of intra-anesthetic acute hypersensitivity reactions (AHR) is challenging because of elevated incidences of differential diagnoses. Risk factors remain mostly unknown and there is no reliable clinical sign to help physicians in establishing a rapid diagnosis. In 25% of cases, immunologic exploration cannot identify the culprit agent through the exploration of the IgE-mediated pathway. Several animal and human studies suggest a role of IgG in the physiopathology of anaphylaxis, which could explain these uncharacterized AHR. This PhD has focused on two cohorts of patients: the first cohort allowed the exploration of phenotypic links in relation to bronchospasm occurrence; the second cohort analyzed clinical markers of severe AHR and the alternative pathway involving IgG against neuromuscular blocking agents (NMBA). Analysis of risk factors identified a NMBA as the culprit agent of the intra-anesthetic AHR to be the only factor statistically associated with bronchospasm. We propose that a hypocapnia below 20 mmHg may be a novel and useful tool for physicians for the rapid diagnosis of severe intra-anesthetic AHR. Among the second cohort of patients, NMBA-specific IgG were identified and associated with clinical severity, suggesting that they may participate in the severity of NMBA-AHR in association with IgE. The chemical structure of a given NMBA may dictate the mechanism of anaphylaxis to this particular NMBA: an IgE/IgG-pathway for succinylcholine and rocuronium, whereas atracurium may be rather linked to spontaneous histamine release mechanisms. Altogether, our results might improve diagnosis efficacy at the time of the AHR and during immunologic explorations.

PREAMBULE

Le choc anaphylactique peropératoire, qui représente la manifestation la plus sévère d'une réaction d'hypersensibilité aiguë (RHA), est l'un des cauchemars des anesthésistes-réanimateurs. Son incidence étant relativement faible, son diagnostic n'en est que plus difficile. Cette crainte est tellement répandue que, lors de mon internat de spécialité, nombre de seniors m'ont expliqué administrer l'antibioprophylaxie peropératoire uniquement après intubation du patient (malgré les recommandations), non seulement pour des raisons pratiques organisationnelles mais aussi car le patient étant intubé, un éventuel choc anaphylactique serait plus aisé à traiter. Un tel enseignement en début de formation laisse des traces sur une pratique professionnelle !

Une difficulté majeure dans la prise en charge des RHA peropératoires est leur absence totale de prévisibilité. Même si quelques facteurs de risques de mortalité ont été décrits, il n'y a pas de « patient caractéristique » ni même de signe clinique du choc pouvant être relié à tel ou tel antécédent ou caractéristique démographique. Pourquoi certains vont présenter une évolution favorable à un traitement par adrénaline alors que d'autres patients évoluent jusqu'à l'arrêt cardiaque ? Parmi les patients en arrêt cardio-circulatoire, pourquoi certains vont décéder et d'autres récupérer une activité circulatoire efficace malgré une prise en charge considérée comme optimale (selon les recommandations en vigueur) dans les deux situations ?

L'ensemble des explorations allergologiques recommandées conduisent à un diagnostic étiologique dans 85% des cas. Que faire alors des 15% restants ? Cette absence d'agent responsable identifié pourrait être liée à une erreur de diagnostic de l'anesthésiste, à une performance diagnostique insuffisante des tests allergologiques (sensibilité, spécificité, réalisation) ou à un autre mécanisme non exploré, qui pourrait à son tour expliquer certaines manifestations cliniques.

Ce sont ces questions et difficultés concrètes rencontrées dans ma pratique clinique qui ont motivé la réalisation de cette thèse. Pour y répondre, j'ai utilisé deux approches. La première est fondée sur des analyses cliniques de deux cohortes de patients afin d'étudier d'éventuels liens phénotypiques du choc ainsi que des potentiels marqueurs diagnostiques au bloc opératoire. La seconde, visant à analyser les limites de diagnostic étiologique, a été possible grâce à mon intégration dans une unité de recherche. L'objectif était d'explorer l'existence d'un mécanisme alternatif à la voie classique « IgE-dépendante » chez l'homme impliquant les IgG et leur éventuelle pathogénicité, sur une cohorte de 86 patients ayant présenté une suspicion de RHA peropératoire aux curares. Ces travaux, qui correspondent aux trois chapitres de cette thèse, permettent tout d'abord de proposer aux cliniciens un outil diagnostique en temps réel face à une suspicion de RHA peropératoire. Ils confirment également l'existence d'un mécanisme associé à la voie classique « IgE-dépendante », qui pourrait contribuer à la gravité de la réaction et devrait donc être associé aux explorations actuellement recommandées.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
AQ : Ammonium Quaternaire
ASA : Active Systemic Anaphylaxis
AT : Ammonium Tertiaire
BSA : Bovine Serum Albumin
CA : Choc Anaphylactique
CI : Complexes Immuns
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HAS : Human Serum Albumin
Ig : Immunoglobulin
KLH : Keyhole Limpet Hemocyanin
MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MNR : Magnetic Nuclear Resonance
MPO : Myéloperoxydase
NET : Neutrophil Extracellular Traps
NMBA : Neuro-Muscular Blocking Agent
PAF : Platelet Activating Factor
PAF-AH : Platelet Activating Factor Acetyl-Hydrolase
PAPPC : p-aminophenylphosphoryl-choline
PBS : Phosphate Buffered Saline
PN : Polynucléaires neutrophiles
PSA : Passive Systemic Anaphylaxis
QAM : Quaternary Ammonium Morphine
RHA : Réaction d' Hypersensitivity Aiguë
SFAR : Société Française d'Anesthésie et de Réanimation
SMC : Succinylmonocholine
TAB : Test d'Activation des Basophiles
TC : Tests cutanés
VPN : Valeur Prédictive Négative
VPP : Valeur Prédictive Positive
wt : wild type

INTRODUCTION

1 Manifestations et prises en charge des réactions d'hypersensibilité peropératoires

1.1 Définitions

Selon la définition et la classification des réactions d'hypersensibilité historiquement effectuées par Gell et Coombs, récemment revues par l'Académie Européenne d'Allergie et d'Immunologie Clinique (EAACI) [3], l'allergie correspond à une réaction d'hypersensibilité immédiate initiée par des mécanismes immunologiques, médiée par des anticorps (Immunoglobulines E [IgE], IgG, IgM, IgA) ou par des cellules. Il est ainsi admis que le choc anaphylactique (ou CA) implique deux types de mécanismes : une voie classique IgE-dépendante et une voie alternative IgE-indépendante. D'après l'EAACI, l'anaphylaxie est définie comme une réaction d'hypersensibilité généralisée, sévère, menaçant le pronostic vital [3].

1.2 Epidémiologie, incidence, terrain, étiologie

La prévalence de l'allergie représente actuellement une problématique de santé publique mondiale. La World Allergy Organization estime à 1.6% la probabilité d'un individu de présenter une réaction allergique au cours de sa vie [4]. Les données épidémiologiques des réactions d'hypersensibilité aiguës (RHA) peropératoires proviennent majoritairement d'Australie, de France, de Grande Bretagne et de Nouvelle-Zélande, illustrant une politique d'identification et de prévention dans ces pays. A partir des données du réseau du GERAP (Groupe d'Etude des Réactions Anaphylactiques Per anesthésiques) et de la pharmacovigilance nationale française, l'incidence des RHA peropératoires en France a été estimée entre 1/10 000 et 1/20 000 procédures anesthésiques [5, 6]. Avec une moyenne de 1 500 anesthésies effectuées par an, un anesthésiste a donc la probabilité d'être confronté à une RHA tous les 5-10 ans. La mortalité d'un CA est d'autant plus élevée qu'il survient en peropératoire, estimée à 4.1% [7], par rapport à 0.7/million pour une population admise aux urgences [4].

Parmi les allergènes responsables des RHA per-anesthésiques, les curares sont les plus fréquemment incriminés (40-60%), suivis du latex (20%), des antibiotiques (18%), des opioïdes et des colloïdes (2-3%) et enfin des hypnotiques (1%) [8-11]. D'autres substances peuvent induire une anaphylaxie en cours d'anesthésie : aprotinine, chlorhexidine [12], protamine, papaïne, héparine, bleu patenté, bleu de méthylène... Ces incidences ont évolué au cours du temps, avec une diminution de l'incidence du latex, probablement liée à son éviction de certains blocs opératoires. Parmi les curares, la succinylcholine est l'agent le plus souvent en cause (61%), suivi de l'atracurium (20%), du cis-atracurium (6%), du vecuronium (5%) puis du rocuronium (4%) [8]. Chez les patients ayant présenté

une RHA peropératoire, un antécédent d'atopie est observé dans 25.4% des cas (avec une incidence supérieure dans les allergies au latex [10]) et d'asthme dans 8.6%. Une prédominance féminine est observée (environ 2/3 des cas), quel que soit l'agent incriminé. Un lien entre allergie médicamenteuse et risque de test cutané (TC) et de test d'activation des basophiles (TAB) aux curares positif a été rapporté par une équipe [13]. La littérature ne rapporte ainsi pas de terrain clinique caractéristique établi du patient qui va présenter une RHA peropératoire. Et même si certains liens peuvent être retrouvés comme cité précédemment pour l'atopie, ils sont hétérogènes en fonction des séries et en fonction des allergènes étudiés.

1.3 Manifestations cliniques

Selon la classification de Ring et Messmer, les RHA ont des manifestations cliniques de gravités croissantes (Tableau 1). Un CA correspond à une RHA de grade III ou IV.

Tableau 1 : Grades de sévérité des RHA peropératoires

Grades de sévérité	Signes cliniques
I	Manifestations cutanées généralisées avec ou sans œdème angioneurotique
II	Atteinte cutanée, cardiovasculaire, respiratoire, sans menace vitale
III	Atteinte multiviscérale avec menace vitale
IV	Arrêt respiratoire et/ou circulatoire

Les critères diagnostiques d'un CA ont été modifiés en 2006 (Tableau 2) [14]. Cependant, ces critères diagnostiques ne sont pas parfaitement adaptés à la situation peropératoire. En effet, le diagnostic d'une RHA peropératoire est difficile compte-tenu de la pauvreté des signes cliniques, de l'impossibilité de diagnostiquer certains signes (comme l'érythème à cause des champs opératoires ou de son apparition secondaire lors de la restauration d'une activité circulatoire efficace, les signes gastro-intestinaux ou la sensation de malaise) ou de l'importance des diagnostics différentiels dont l'incidence est très élevée (*i.e.* hypotension artérielle secondaire aux agents anesthésiques). Ces difficultés peuvent expliquer la mortalité élevée du CA peropératoire.

Tableau 2 : Nouveaux critères diagnostiques d'anaphylaxie, d'après [14], avec autorisation.

Anaphylaxis is highly likely when any one of the following 3 criteria are fulfilled:	
1. Acute onset of an illness (minutes to several hours) with involvement of the skin, mucosal tissue, or both (eg, generalized hives, pruritus or flushing, swollen lips-tongue-uvula)	
AND AT LEAST ONE OF THE FOLLOWING	
a. Respiratory compromise (eg, dyspnea, wheeze-bronchospasm, stridor, reduced PEF, hypoxemia)	
b. Reduced BP or associated symptoms of end-organ dysfunction (eg, hypotonia [collapse], syncope, incontinence)	
2. Two or more of the following that occur rapidly after exposure to a <u>likely</u> allergen for that patient (minutes to several hours):	
a. Involvement of the skin-mucosal tissue (eg, generalized hives, itch-flush, swollen lips-tongue-uvula)	
b. Respiratory compromise (eg, dyspnea, wheeze-bronchospasm, stridor, reduced PEF, hypoxemia)	
c. Reduced BP or associated symptoms (eg, hypotonia [collapse], syncope, incontinence)	
d. Persistent gastrointestinal symptoms (eg, crampy abdominal pain, vomiting)	
3. Reduced BP after exposure to <u>known</u> allergen for that patient (minutes to several hours):	
a. Infants and children: low systolic BP (age specific) or greater than 30% decrease in systolic BP*	
b. Adults: systolic BP of less than 90 mm Hg or greater than 30% decrease from that person's baseline	

PEF, Peak expiratory flow; BP, blood pressure.

*Low systolic blood pressure for children is defined as less than 70 mm Hg from 1 month to 1 year, less than (70 mm Hg + [2 × age]) from 1 to 10 years, and less than 90 mm Hg from 11 to 17 years.

Les manifestations cliniques des RHA peropératoires ont été décrites dans l'Annexe 2. [15]. Parmi les formes cliniques des RHA peropératoires, les atteintes respiratoires *via* l'œdème des voies aériennes supérieures, l'œdème lésionnel pulmonaire et le bronchospasme, défini par une élévation de la pression des voies aériennes secondaire à une contraction des muscles lisses des bronches distales, sont particulièrement craintes car l'arsenal thérapeutique est assez mince et le pronostic vital est directement mis en cause en cas d'insuffisance prolongée d'apport d'oxygène.

1.4 Prise en charge thérapeutique des réactions d'hypersensibilité peropératoires

Le traitement repose sur une prise en charge en urgence avec un monitoring régulier pendant 24 heures (pour plus de détails voir la revue en Annexe 2) [15-19]. Les pivots du traitement sont l'interruption de l'administration de l'allergène suspecté, le remplissage vasculaire [16, 17, 20] et l'adrénaline par voie intraveineuse (posologie basée sur la gravité de la réaction), l'objectif étant la restauration d'une hémodynamique efficace. Certaines études animales et humaines ont mis en évidence une association entre le retard d'administration d'adrénaline (et donc d'établissement du diagnostic) et un pronostic défavorable au cours des RHA peropératoires [21, 22] mais aussi avec un risque augmenté d'admission à l'hôpital et de décès au cours des allergies alimentaires [23-26]; L'étude *in vitro* de Vadas et al suggère une fenêtre thérapeutique étroite de 10-15 minutes d'efficacité de l'adrénaline, probablement par un effet d'amplification de la réaction anaphylactique (que l'adrénaline pourrait arrêter/atténuer) et/ou une mauvaise tolérance d'un débit cardiaque très bas (vasodilatation hyper-aiguë suivie d'hypovolémie sévère et d'altération de la fonction cardiaque) [27].

Pour les atteintes respiratoires, seuls les bêta2-agonistes (par voie inhalée ou intraveineuse), les inhibiteurs de phosphodiesterase comme l'aminophylline ou l'adrénaline peuvent être proposés (en parallèle d'une intubation oro-trachéale pour sécuriser la perméabilité des voies aériennes supérieures et d'une ventilation en F_iO_2 100%) [28]. Les autres mesures comprennent la suspension ou non du geste chirurgical, une éventuelle antagonisation (comme l'héparine par la protamine ou le rocuronium par le suggamadex même si ce dernier reste controversé [29]), et le glucagon pour les patients traités par bêtabloquants. En dernière ligne, les corticoïdes peuvent être utilisés pour diminuer l'incidence des manifestations tardives [18], l'utilisation d'antihistaminiques n'étant plus recommandée. En cas de choc réfractaire, divers autres mesures d'exception ont été proposées (voir l'Annexe 2).

1.5 Bilan allergologique après suspicion de réaction d'hypersensibilité peropératoire

Tout patient présentant une RHA peropératoire doit bénéficier d'une investigation immédiate et à distance dans un centre spécialisé [30] pour déterminer le type de réaction (IgE-dépendante ou non), l'agent causal et, le cas échéant, une sensibilisation croisée [31]. Le diagnostic est fondé sur une triade associant une symptomatologie clinique évocatrice, les résultats de la mesure des concentrations plasmatiques de médiateurs au moment de la réaction, et du bilan allergologique spécialisé. Même si

certaines sociétés savantes suggèrent une possibilité de réaliser ce bilan dans les suites immédiates de la RHA [32, 33], le délai recommandé par les Sociétés Françaises d'Anesthésie-Réanimation (SFAR) et d'Allergologie (SFA) est de 6 à 8 semaines, les faux négatifs étant importants lors d'une réalisation précoce. L'accident doit être référencé dans le dossier du patient et déclaré au Centre Régional de Pharmacovigilance.

Le bilan allergologique recommandé analyse la voie IgE dépendante. Il porte sur la recherche de médiateurs libérés par les mastocytes et les basophiles activés par les IgE et sur le dosage des IgE spécifiques [34]. Parmi les deux médiateurs explorés, la cinétique de concentration d'histamine plasmatique présente un pic très précoce, dès la première minute suivant le choc (demi-vie d'élimination de 15-20 minutes). Son élévation peut être liée à un mécanisme d'hypersensibilité immédiate IgE-médié ou non. Cependant, plus la réaction est grave, plus le pic va être élevé. Compte-tenu d'une grande variation interindividuelle, la tryptase sérique est mesurée au moment du choc, à 2 heures et à 24 heures post-choc. Son élévation franche (supérieure à 3 fois la valeur normale) est en faveur d'un mécanisme IgE-dépendant. Récemment, certains auteurs ont recommandé d'évaluer la concentration de tryptase au moment du choc par rapport à la tryptase de base du patient ; ainsi celle-ci sera considérée positive si elle est supérieure à $(2 \mu\text{g/L} + 1.2 \times \text{tryptase de base})$ [35]. Les concentrations de tryptase présentent également de grandes variations interindividuelles. Evaluer la positivité de la tryptase par rapport à la valeur de base du patient permet de prendre en compte ces variations mais aussi de s'affranchir des faux positifs en cas de mastocytose par exemple. Bien que peu sensibles, la recherche d'IgE spécifiques dans le sérum du patient qui a présenté une RHA peropératoire concerne principalement l'ammonium quaternaire (AQ, qui est théoriquement l'épitope commun des curares), le thiopental, le latex, les bêta-lactamines et la chlorhexidine. Elle est réalisée au moment du choc et lors de la consultation d'allergo-anesthésie. En effet, les concentrations des IgE anti-AQ au moment du choc et lors de cette consultation ne présentent pas de différences statistiquement significatives [36, 37]. Les tests cutanés sont l'un des pivots de l'établissement du diagnostic de la voie IgE [30, 38-40]. Lors de la consultation d'allergo-anesthésie, toutes les substances administrées aux patients sont testées, les dilutions et conditions de réalisation ayant été publiées dans de nombreuses revues afin de permettre une homogénéisation des techniques et des diagnostics. Ces tests cutanés ne peuvent être interprétés qu'en fonction des renseignements cliniques chronologiques et détaillés fournis par l'anesthésiste ainsi que des résultats des bilans sanguins au décours de la réaction.

2 Curares

2.1 Définition, classification, mode d'action et propriétés des curares

Le mot « curare » est issu d'un mot d'une langue indigène « ourari » qui signifie « la mort qui tue tout

bas ». Les curares sont des médicaments dont l'usage est presque exclusivement réservé aux anesthésies. Ils inhibent la jonction neuromusculaire au niveau du récepteur nicotinique à l'acétylcholine post-synaptique, entraînant un relâchement musculaire complet.

Sur le plan fonctionnel, il existe deux catégories de curares :

- Les curares non-dépolarisants parmi lesquels se trouvent les curares stéroïdiens, issus du pancuronium, et les benzyloquinolines, dérivées de la d-tubocurarine. En fonction de leur durée d'action clinique, on distingue des curares : de courte durée d'action (8 à 20 minutes) comme le mivacurium, de durée d'action intermédiaire (20 à 50 minutes), comme l'atracurium, le cisatracurium, le vécuronium, ou le rocuronium et des curares de longue durée d'action (plus de 50 minutes) comme le pancuronium qui n'est plus commercialisé en France depuis 2012. Ce sont des molécules hydrosolubles diffusant mal en dehors du secteur hydrique extracellulaire en raison de leur ionisation à pH physiologique.
- Les curares dépolarisants sont des agonistes de l'acétylcholine se fixant sur les sous-unités α du récepteur à l'acétylcholine sur la plaque motrice. Le seul curare de cette classe est la Célocurine® (ou succinylcholine ou suxaméthonium). Alors que l'acétylcholine est rapidement détruite par l'acétylcholinestérase, la succinylcholine va rester plusieurs minutes au niveau de la fente synaptique, réagissant de façon répétée avec les récepteurs cholinergiques en les maintenant ouverts.

Cela permet de mettre en évidence trois types de structures de curares très distinctes : la succinylcholine, les benzylquinolones et les curares stéroïdiens (Figure 1). Des réactivités croisées entre les différents curares existent dans 50-75% des cas, principalement au sein des curares stéroïdiens. Le métabolisme est hépatique pour les curares stéroïdiens, par la voie d'Hofmann (métabolisme enzymatique plasmatique) pour l'atracurium et le cis-atracurium et par des pseudocholinestérases plasmatiques pour le mivacron. Leur élimination est rénale.

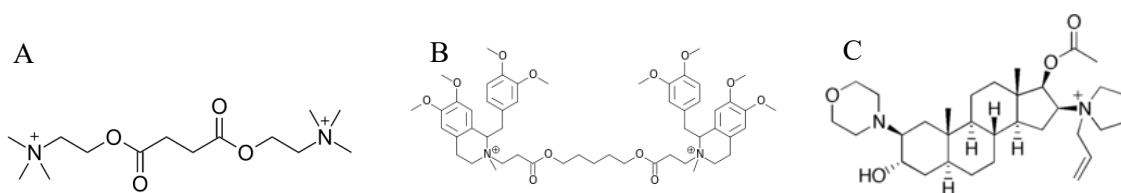


Figure 1 : Structures des trois curares utilisés chez les patients de l'étude NASA/IPAAQ : A/Succinylcholine (290 g/mol), B/Atracurium (929 g/mol), et C/Rocuronium (530 g/mol). A pH physiologique, l'amine tertiaire du rocuronium est protonée.

2.2 Identification des anticorps anti-curares

2.2.1 Différents antigènes utilisés dans la détection des anticorps anti-curares

Sur le plan chimique, les curares comportent tous à pH physiologique deux groupements AQ par lesquels ils se fixent aux récepteurs à l'acétylcholine. Des analyses basées sur la structure des

antigènes responsables des réactions d'hypersensibilité aux curares ont établi ces groupements AQ comme les épitopes communs des curares impliqués dans les CA [41]. Afin d'identifier les IgE spécifiques anti-AQ, différentes structures porteuses de groupement ammonium tertiaire (AT) ou AQ, ont été testées depuis 30 ans chez des patients ayant présentés des RHA à différents curares (alcuronium, d-tubocurarine, pancuronium, succinylcholine, decaméthonium et gallamine) (Figure 2) [41-45]. Avant les années 1980, la détection d'IgE anti-AQ était effectuée via la liaison des curares eux-mêmes (le plus souvent la succinylcholine ou l'alcuronium) à des billes de sépharose activées ou à des disques pour les tests radioallergosorbants (méthode RAST) [46]. Dans la suite, divers composés, porteurs de groupements AT ou AQ, ont été testés afin d'évaluer leur performance globale par rapport à celle de chaque curare individuellement. La triéthylamine est un composé chimique fréquemment utilisé en synthèse organique comme agent solubilisant, catalyseur ou solvant extractif car il constitue l'amine tertiaire symétrique la plus simple à température ambiante (Figure 2A). Son utilisation permettait d'augmenter à 100% la sensibilité du test après RHA à la succinylcholine et à la gallamine (curare non dépolarisant mis au point en 1946, aux effets anticholinergiques et au potentiel allergique majeurs) [47].

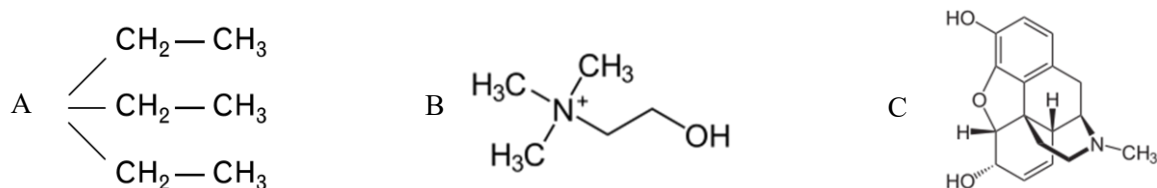


Figure 2 : Structure biochimique A/ de la triéthylamine $N(CH_2CH_3)_3$, B/ de la choline $C_5H_{14}NO$ et C/ de la morphine $C_{17}H_{19}NO_3$.

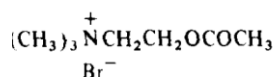
La choline, alcool aminé présent dans l'alimentation (Figure 2B), a été proposée en 1984 pour identifier les IgE anti-succinylcholine, avec une positivité pour 90% des patients aux tests cutanés positifs [42]. Différents modes de couplage et dérivés de la choline ont été étudiés. Tout d'abord la fixation de choline et de triéthylcholine à des billes de sépharose activées via un groupement éther permettant une sensibilité diagnostique supérieure aux tests RAST spécifiques (contre succinylcholine, alcuronium, décaméthonium ou gallamine) [45, 46, 48]. Mais aussi la p-aminophenylphosphorylcholine (PAPPC) à des billes d'agarose, permettant la création d'un test avec une sensibilité de 97%, une spécificité de 97% et une valeur prédictive positive (VPP) de 94% [49, 50]. Alors que la morphine (Figure 2C), avait déjà été utilisée dans des tests d'inhibition [43, 45], les premières utilisations comme allergène sur des surfaces solides pour détecter des IgE anti-curares datent de 1990 [47]. Les tests de radio-immunoassay avec la morphine comme antigène représentaient un meilleur test diagnostique pour la présence d'IgE anti-curares que les tests spécifiques de chaque molécule avec une meilleure concordance avec les tests cutanés [51-53]. La mise au point d'un test par immunofluorescence (morphine couplée à de la poly-L-lysine secondairement couplée à des billes de

cellulose activées) pour utilisation sur ImmunoCAP® avec l'antigène c260 (Phadia AB, Uppsala, Sweden) [54] a permis d'obtenir pour la détection d'IgE anti-QAM (Quaternary Ammonium – Morphine) un test d'une sensibilité de 84% pour les patients avec un test cutané positif aux curares, avec un intérêt diagnostique particulier chez les patients présentant un test cutané négatif (24.6% de patients positifs) [55]. Les études ultérieures ont montré une excellente sensibilité de ce test [56]. En 2002 et en 2005, la SFAR recommandait l'utilisation des tests de RIA avec un analogue de la choline (SAQ-RIA) et de la PAPPC pour la détection d'IgE anti-curares [57]. Dans l'actualisation de 2011, les recommandations n'ont pas changé, suggérant tout de même l'utilisation possible du test ImmunoCAP C260 dont les résultats « donneraient une approximation » des deux précédents [19].

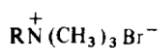
2.2.2 Relation structure du curare et potentiel allergique

Quel que soit le curare considéré, les deux groupements AQ sont séparés par une structure lipophile de taille variable. La distance entre les deux atomes d'azote est comprise entre 10-11 atomes pour les curares stéroïdiens et 18-21 atomes pour les benzylisoquinolines [58]. Des études réalisées chez des patients allergiques à la succinylcholine ont montré que la libération *in vitro* d'histamine pouvait être obtenue par des sels de diammonium, et ce de façon dépendante de la longueur de la chaîne entre les deux groupements : pour une chaîne inférieure ou égale à 4 atomes, aucune libération d'histamine ne pouvait être observée, avec une longueur optimale (pour la libération d'histamine) supérieure ou égale à 6 atomes [59]. De plus, un groupement rigide entre les 2 AQ (comme pour le pancuronium) entraînait moins de libération de médiateurs que des molécules plus souples comme la succinylcholine.

Les études d'inhibition des RAST-alcuronium utilisant des sels d'alkylammonium ont montré que le dérivé tétra était trois fois plus efficace que les dérivés ethyl ou dodecyl et cinq fois plus que le dérivé hexadecyl, suggérant une longueur optimale de la chaîne entre les deux AQ de huit carbones (les dérivés à 3-7-11 carbones n'ayant pas été testés) [43] (Figure 3). La longueur des chaînes carbonées adjacentes à l'AQ est également déterminante puisque le sel de tétraméthylammonium était 27 et 58 fois plus efficace en inhibition que les dérivés tétrapropyl et tétrapentyl.



Acetylcholine bromide



Alkyltrimethylammonium bromides

R = methyl (CH_3)

R = octyl (C_8H_{17})

R = decyl ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}$)

R = dodecyl ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}$)

R = hexadecyl ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}$)

Figure 3 : Dérivés de sels d'alkylammonium testés, d'après [43]

2.3 Mécanismes physiopathologiques des réactions d'hypersensibilité aux curares

Il existe deux types de réactions « adverses » générées par les curares : 1/ un mécanisme immunologique, classiquement décrit via les IgE résultant d'une interaction antigène-anticorps [60], 2/ une histamino-libération non spécifique par action pharmacologique directe sur la membrane des mastocytes et les basophiles, déclenchée majoritairement par deux benzyloquinolones, l'atracurium et le mivacurium, et absente pour les curares stéroïdiens [61]. Le cisatracurium est le premier curare parmi les benzyloquinolones quasiment dénué d'effets histamino-libérateurs aux posologies usuelles. Cette histamino-libération non-anticorps dépendante survient même sans exposition antérieure au produit. Elle est favorisée par la vitesse d'injection du curare, la dose, ainsi que l'existence d'un terrain atopique. La traduction clinique d'une histamino-libération non spécifique est habituellement moins sévère que lors d'une réaction immunologique car la libération d'histamine est moins massive. Il a cependant été démontré *in vitro* que tous les curares sont des inhibiteurs de l'histamine-N-méthyltransférase, pouvant ainsi expliquer certaines manifestations cliniques prolongées [62, 63].

2.4 Difficultés diagnostiques de l'anaphylaxie aux curares

Comme évoqué précédemment, le diagnostic positif d'allergie aux curares est actuellement fondé sur l'association de signes cliniques évocateurs et d'un mécanisme IgE-dépendant [64].

Les tests cutanés sont considérés comme le gold standard du diagnostic de l'allergie aux curares avec une sensibilité supérieure à 95% [65-67], avec une bonne reproductibilité même à plusieurs années d'intervalle. Le risque de réaction systémique est à peu près nul lorsque les tests cutanés sont faits selon les recommandations. Ils peuvent être délicats à interpréter dans le cas d'histamino-libération non spécifique notamment par l'atracurium ou d'utilisation de concentrations trop élevées de curares pouvant entraîner des faux positifs [68, 69]. Alors que certaines équipes leur attribuent une excellente valeur prédictive négative [39, 67, 70], quelques cas de chocs anaphylactiques suite à l'injection d'un curare sur les données d'un test cutané négatif font débat dans la littérature [71, 72]. De par leur place centrale dans l'algorithme diagnostique du mécanisme IgE, les performances des autres tests (dosage des IgE spécifiques ou TAB) sont calculées en fonction des résultats des tests cutanés.

Quel que soit l'allergène considéré, les limites majeures du dosage des IgE spécifiques dans le diagnostic de l'allergie médicamenteuse sont leurs faibles sensibilité et valeur prédictive négative [73]. Ainsi, dans la population générale, la prévalence de patients avec des IgE anti-QAM va de 5% [54] à 9.7% [55], alors qu'elle est de 66.7% chez les patients ayant fait un choc anaphylactique avec TC positif aux curares. Les TAB, réalisés à partir de sang total, analysant par cytométrie en flux des marqueurs de surface des basophiles en présence de curare, ont une spécificité excellente, mais dont la sensibilité varie de 36 à 60% selon les études [74, 75].

L'un des problèmes est l'absence de consensus quant aux critères diagnostiques d'une voie IgE

dépendante dans l'allergie aux curares. La triade « TC, TAB et IgE spécifique » est le plus souvent analysée. Mais alors que certaines équipes valident une voie IgE sur un seul critère positif [8, 76], d'autres ne la retiennent que lorsque deux ou trois critères le sont [77]. Il serait souhaitable que ces critères diagnostiques soient affinés car, si on considère par exemple l'étude de Leysen *et al* sur les RHA au rocuronium, que l'on considère un seul ou plus de deux critères nécessaires, l'incidence des mécanismes IgE varie considérablement, respectivement de 82% à 57% [76]. De plus, de nombreuses études soulignent les difficultés diagnostiques, notamment en terme de sensibilité, des IgE anti-QAM particulièrement envers le diagnostic d'allergie à l'atracurium [39, 56]. Ce sont pour ces raisons que les recommandations d'experts soulignent l'intérêt des IgE spécifiques et du TAB dans les situations de patients avec des tests cutanés négatifs malgré une histoire clinique très évocatrice d'une RHA peropératoire [19]. Ces limites illustrent la difficulté d'établir l'agent responsable dans les RHA aux curares si l'on se restreint à l'analyse de la voie IgE dépendante. D'autres voies pourraient être en cause, non explorées par les tests classiques, expliquant cette absence de diagnostic.

3 Voies alternatives des réactions d'hypersensibilité aiguë

Comme précédemment évoqué, la physiopathologie de l'anaphylaxie est complexe et non parfaitement élucidée, impliquant deux types de mécanismes : une voie classique IgE-dépendante dans 72% des cas et une voie alternative IgE-indépendante dans 28% des cas, la première nécessitant moins d'antigènes et d'anticorps que la seconde [78, 79]. La voie « classique » a été bien explorée dans différents modèles animaux et chez l'homme. Les IgE se fixent sur leurs récepteurs de forte affinité hFcεRI, présents chez l'homme de façon constitutive sur les mastocytes et les basophiles, sur lesquels ils sont fixés, même en absence d'antigène. Lors de l'introduction d'un allergène, celui-ci peut être capturé par les IgE spécifiques de cet allergène fixées à la surface de mastocytes, dans les tissus, et de basophiles, dans le sang. La reconnaissance par au moins deux IgE spécifiques d'un même allergène (du même épitope ou non) entraîne l'agrégation des hFcεRI, la phosphorylation de leurs sous-unités intracytoplasmiques et l'activation des cellules conduisant à la libération de médiateurs pré ou néoformés, parmi lesquels l'histamine et la tryptase participant aux manifestations cliniques. Les voies alternatives sont décrites depuis de nombreuses années, sans que leur physiopathologie ne soit élucidée. Plusieurs arguments soutiennent l'hypothèse d'un rôle des IgG anti-allergène chez l'homme dans ces manifestations dites atypiques de RHA.

Le premier argument se base sur des modèles de souris, dont certains expriment des FcR humains (récepteurs aux immunoglobulines). Chez la souris, le modèle le plus représentatif de l'homme est l'anaphylaxie systémique active (ASA) où, après plusieurs semaines d'immunisation, le même allergène est injecté à l'animal (voir revue en Annexe 3) [80]. Ces dernières années, un rôle central des polynucléaires neutrophiles (PN), des monocytes/macrophages et des IgG a été suggéré chez la souris

(ainsi qu'une contribution plus modeste des basophiles). En effet, l'anaphylaxie était absente chez des souris déficientes en récepteurs activateurs aux IgG ou en PN murins, mais restaurée après transfert de PN humains [81]. Des modèles de souris, déficientes en récepteurs murins activateurs mais transgéniques pour un seul récepteur humain aux IgG (dont la distribution d'expression cellulaire est très proche de celle observée chez l'homme [82, 83]), ont permis de souligner le rôle central de deux des récepteurs activateurs aux IgG : le hFcγRI [84] et le hFcγRIIA (Jönsson, Mancardi et al. 2012)[85] (voir détails à la section 4.2), avec un rôle des neutrophiles dans les deux modèles et des monocytes/macrophages en addition dans le second. De même, chez des souris transgéniques déficientes en récepteurs murins aux IgG et exprimant la majorité des récepteurs humains (hFcγRI, hFcγRIIA, hFcγRIIB, hFcγRIIIA et hFcγRIIIB), l'injection d'IgG intraveineuses humaines (IVIg) agrégées à la chaleur – mimant des complexes immuns - induisait une anaphylaxie [83]. Il est intéressant de noter que ces agrégats d'IgG sont potentiellement fixés par tous les hFcγRs. Même si ces études se confinent à des modèles précliniques particuliers, et nécessiteraient d'être reproduites dans d'autres modèles, les IgG semblent participer dans des modèles de souris humanisées quant à leurs FcRs à l'anaphylaxie notamment via l'activation des PN.

Le second argument soutenant l'existence d'une voie IgG médiée chez l'homme est basé sur les résultats des études sur le PAF (« Platelet Activating Factor »). Le PAF est sécrété principalement par les PN [86, 87], mais aussi par les mastocytes [88], les monocytes, les macrophages alvéolaires, les basophiles, et les plaquettes [89]. Les modèles animaux soulignent le rôle pivot du PAF dans l'anaphylaxie, particulièrement lorsqu'elle est IgG-médiée : altération de l'induction du CA chez des souris déficientes en récepteurs du PAF (PAF-R) [90], protection contre le CA avec réduction de la mortalité par administration de recombinants de la PAF acétylhydrolase (PAF-AH, enzyme responsable de l'hydrolyse d'un résidu du PAF, entraînant son inactivation), d'antagonistes du PAF ou du PAF-R [81, 91]. Chez l'homme, la concentration de PAF est corrélée à la sévérité du CA, avec une corrélation inverse à l'activité de la PAF-AH [92]. L'échec de la PAF-AH à inactiver le PAF pourrait ainsi contribuer à la sévérité du choc [92]. La corrélation sévérité clinique / concentration du PAF n'est pas retrouvée pour l'histamine et la tryptase [93]. Sur le plan clinique, le PAF entraîne : bronchoconstriction, vasoconstriction coronarienne (responsable d'une altération de l'inotropisme), agrégation plaquettaire, migration/activation/lyse leucocytaire, induction de production de NO (entraînant vasodilatation et hypotension artérielle) [27]. Le PAF étant impliqué dans l'amplification de l'activation des mastocytes [94] mais aussi des PN, des cellules endothéliales, des plaquettes, des monocytes/macrophages, participerait à la sévérité de la manifestation clinique. Le PAF étant également libéré lors de l'activation mastocytaire après stimulation de la voie IgE-FcεRI, les deux voies seraient impliquées dans la production de PAF, avec cependant une contribution prédominante des IgG.

Enfin, le dernier argument quant à l'existence d'une voie IgG dans les RHA chez l'homme est apporté

par l'analyse des réactions observées après administration d'anticorps thérapeutiques [95]. Leur utilisation dans les pathologies néoplasiques, inflammatoires ou auto-immunes est croissante depuis une dizaine d'années [96]. Bien qu'elle soit variable, l'incidence élevée de réactions d'hypersensibilité à ces traitements représente un problème majeur dans leur utilisation [96]. Ainsi l'infliximab (anticorps monoclonal chimérique humain/souris anti-IgG1 dirigé contre le TNF- α) entraîne des réactions d'hypersensibilité dans 10% des cas et qui sont sévères dans 1%. Le mécanisme de ces réactions fait débat dans la littérature. Certaines équipes soutiennent l'hypothèse de dérégulation immunitaire, leur raisonnement reposant notamment sur la possibilité d'une réaction dès la première injection (même si cette survenue est rare) et sur la fréquente présence d'anticorps chez des patients ne présentant pas de réactions d'hypersensibilité. La présence d'anticorps anti-infliximab de faible affinité pourrait cependant expliquer leur présence sans manifestations cliniques. D'autres équipes évoquent une origine allergique à ces réactions d'hypersensibilité. Bien que relativement peu explorées dans ce contexte, peu d'équipes relève l'existence d'IgE spécifiques [97] ou de concentration de tryptase élevée [98]. Deux études suggèrent, parmi des patients ayant présenté une réaction d'hypersensibilité à l'infliximab, une positivité des tests cutanés à l'infliximab dans 30% des cas (associés dans 86% et 100% des cas à la présence d'IgE spécifiques), ceux-ci étant négatifs si réalisés au bout de 8 mois suggérant une disparition de ces IgE spécifiques au cours du temps. Ces équipes suggèrent un rôle dominant des IgE dans ce contexte, soulignant notamment que la survenue de nouvelles réactions d'hypersensibilité serait plus fréquente chez les patients dont les tests cutanés contre l'infliximab étaient positifs que chez les autres (71% versus 12%) [99]. Ces auteurs ont cependant également identifié (en sus d'IgM spécifiques) respectivement 77% et 73% d'anticorps dont l'isotype n'était pas identifié, suggérant qu'il puisse s'agir (en partie ou totalement) d'IgG anti-infliximab [99, 100]. En effet, les IgG anti-infliximab ont été mis en évidence par de très nombreuses études [101-105]. Un suivi de 106 patients montre une incidence croissante du développement d'IgG dirigés contre l'infliximab : 13% après la 2ème injection, 30% à 3 mois et 44% à 6 mois [106]. Leur présence est associée à une diminution de l'efficacité du traitement [106], une augmentation de la clairance de l'infliximab et de l'incidence des RHA [102, 107]. Des mesures variées ont été proposées face à la présence des IgG et l'incidence des réactions d'hypersensibilité : une désensibilisation à l'infliximab, sans que la présence d'IgE ou d'IgG spécifiques n'ait été évaluée dans ces études [108-110], une diminution des posologies, entraînant une diminution des concentrations d'IgG spécifiques sans déclencher de nouvelle réaction, un traitement immunosuppresseur associé par méthotrexate (diminuant la quantité d'anticorps ou prévenant leur formation selon les séries) [111] ou un changement de classe de biothérapie. Après administration d'autres biothérapies comme l'adalimumab (IgG1 monoclonale humaine anti-TNF α), la présence d'IgG spécifiques a également été retrouvée chez 15 à 25% des patients, avec une corrélation entre la présence de ces anticorps et une moindre efficacité du traitement [107, 112, 113]. Ce modèle de réactions d'hypersensibilité est un modèle avec une forte concentration d'antigène qui favorise la présence d'une réaction IgG médiée, présentant des

La conclusion raisonnable à apporter à toutes ces études est que l'existence d'une voie IgG médiée chez l'homme est probable, aussi bien pour les allergènes peptidiques que non peptidiques. Tout comme dans les réactions d'hypersensibilité aux anticorps thérapeutiques où les IgE spécifiques sont peu étudiées, les IgG spécifiques ne sont pas explorées dans la plupart des études sur l'allergie. Et il est donc difficile d'affirmer que ce mécanisme n'existe pas si on ne le recherche pas. Il est envisageable que ces deux voies puissent coexister chez l'homme, l'une prenant probablement le dessus par rapport à l'autre dans des circonstances qui restent à déterminer. Des études cliniques sont nécessaires afin de valider leur existence et surtout leur implication dans la physiopathologie des manifestations cliniques observées.

l'envergure du fragment Fab sont sous la dépendance du domaine CH1 et du nombre de ponts disulfures inter chaînes [115]. Les IgG humaines présentent quatre sous-classes découvertes dans les années 1960, numérotées en fonction de leur abondance dans le sérum de sujets sains (IgG1, 2, 3 et 4), représentant respectivement 60-70%, 20-30%, 5-8%, 1-4% des IgG totales. Leur demi-vie est de 21 jours, hormis pour IgG3 qui est de 9 jours. Les IgG peuvent de plus présenter des allotypes au sein d'une même sous-classe (cinq pour IgG1, un pour IgG2 et 13 pour IgG3). Ces quatre sous-classes présentent plus de 90% d'homogénéité de séquence d'acides aminés [118]. La majorité des 10% de différence se trouve dans la région charnière et la région CH2. Les différentes propriétés structurales expliquent les différences de propriétés fonctionnelles d'une sous-classe à une autre [119], entre autre à cause des différences de fixations aux hFcγRs, au récepteur Fc néonatal (hFcRn ; responsable de la longue demi-vie des IgG et de l'albumine) mais aussi au complément (Tableau 3). Ainsi, à l'interface des régions CH2 et CH3, les modifications du site de glycosylation de la position 297 entraînent des expositions plus ou moins fortes du site de fixation aux hFcγRs, et donc des modulations de la réponse immunitaire chez l'homme. Une particularité des IgG4 en position 235 de la région charnière explique également qu'elle soit la seule sous-classe à ne pas fixer le complément. L'ordre décroissant de flexibilité des bras Fab des sous-classes d'IgG est : IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2 [120, 121]. La flexibilité du bras Fab permet une meilleure fixation aux hFcγRs, au complément, aux antigènes et module la capacité à former des complexes immuns (complexes formés par l'antigène et l'anticorps). Les IgG3 se caractérisent par une région charnière particulièrement longue, ceci étant dû à la duplication d'un exon, qui, alors qu'il n'est exprimé qu'une fois dans les autres sous-classes, l'est jusqu'à quatre fois chez les IgG3 (Figure 5). C'est ce qui explique la particularité des IgG3 en termes de déclenchement des fonctions effectrices et de fixation du complément. Les IgG2 présentent une région charnière courte de 12 acides aminés, quatre pont disulfures et l'absence d'un résidu glycine, ces caractéristiques participant à l'absence de flexibilité de leur segment Fab [120].

Tableau 3 : Différence entre les différents allotypes d'IgG (* en fonction de l'allotype)

Sous-Classe	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Abondance dans le sérum	67% IgG	22% IgG	7% IgG	4% IgG
Poids (kDa)	146	146	170	146
Demi-vie (jours)	21	21	7-21 *	21
Nombre d'allotypes	5	1	13	0
Nombre d'AA de la région charnière	15	12	62*	12
Nombre de ponts disulfures inter-chaînes	2	4	11*	2
Fixation du complément	Oui	Oui	Oui (forte)	Non

Schématiquement, les IgG1 sont particulièrement impliquées dans la réponse anti-bactérienne, l'activation du complément et des cellules phagocytaires, expliquant leur place de choix comme

anticorps thérapeutique [122]. Elles sont, avec les IgG3, particulièrement impliquées dans l'induction de la cytotoxicité cellulaire. La réponse IgG2 est majoritairement tournée vers les antigènes carbohydrates présents à la surface des bactéries, comme *Streptococcus pneumoniae* [123], *Haemophilus influenzae* type b, ou *Neisseria meningitidis*, une faible concentration en IgG2 étant associée à des formes plus graves dans les pathologies impliquant ces bactéries [124]. Les IgG2 possèdent la capacité de former des dimères covalents *in vivo*, participant ainsi à augmenter la protection de l'organisme (Figure 5). Les IgG3 représentent la sous-classe la plus efficace en terme d'activation du complément et de médiation de certaines fonctions des hFcγRs comme la phagocytose [125, 126]. Elles ont également un rôle notable dans la neutralisation des virus, supérieur aux IgG1, probablement grâce à une flexibilité accrue, améliorant l'accès des anticorps aux virus et aux interactions avec le complément, qui sont nécessaires dans la lutte contre les pathogènes [127, 128].

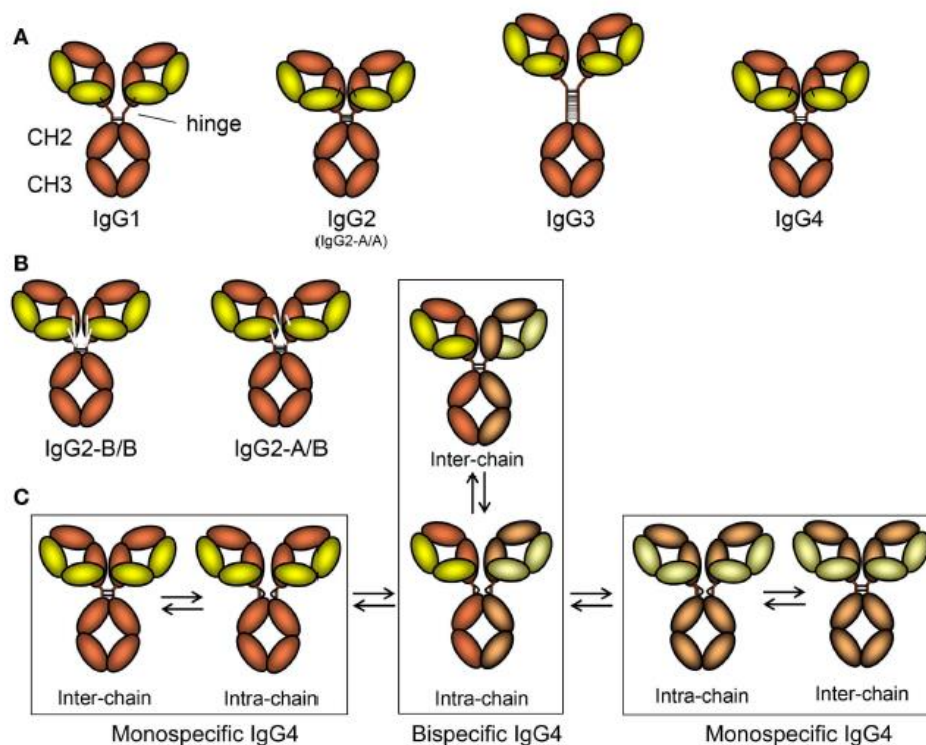


Figure 5 : Représentation schématique des sous-classes d'IgG et de leurs isomères [118], avec autorisation.

Les IgG4 présentent de nombreuses singularités, en faisant une catégorie à part [126]. Elles sont notamment capables *in vivo* de fixer deux antigènes différents grâce à un phénomène d'« échange de bras Fab », entraînant la présence dans le sérum de patients sains de 20 à 30% d'IgG4 contenant deux chaînes légères différentes, aboutissant à des anticorps bispécifiques (Figure 5) [129-132]. Des spécificités conformationnelles sont à l'origine de son absence de fixation au complément mais également de la faculté à former des agrégats via leur segment Fc qui sont impliqués dans de nombreuses pathologies auto-immunes, notamment les IgG4-RD (IgG4-related systemic disease ou pathologies associées aux IgG4), se caractérisant notamment par un envahissement des tissus par des plasmocytes producteurs d'IgG4) [133, 134]. Il est également proposé qu'une exposition répétée à un

antigène entraîne un switch vers la production d'IgG4 spécifiques. C'est le cas durant les protocoles de désensibilisation allergique (ou immunothérapie orale spécifique) [135-137], pour lesquels le taux d'IgG4 spécifiques de l'allergène cible corrèle avec l'efficacité de la désensibilisation. L'hypothèse majeure est la compétition entre les IgE et les IgG4 pour la fixation de l'allergène. En effet les épitopes reconnus par ces IgG4 seraient sensiblement les mêmes que ceux reconnus par les IgE, mais différents de ceux reconnus par les IgG1 par exemple qui sont présents chez de nombreux sujets allergiques et atopiques.

Les conséquences cliniques des modifications quantitatives d'une ou plusieurs sous-classes ne sont pas parfaitement élucidées. Ces déficits sont difficiles à définir, puisque les valeurs d'IgG varient notamment en fonction du sexe, de l'âge ou de la présence d'une pathologie chronique. On estime à 20% la fréquence de patients présentant un déficit d'une ou plusieurs sous-classes. Le déficit en IgG2 est la principale cause d'infections récurrentes chez l'enfant [138], avec une résolution spontanée à l'âge adulte dans la majorité des cas. Certains patients présentent un déficit complet en plusieurs sous-classes sans conséquences cliniques notables [139, 140] alors même que, chez d'autres patients, la diminution de la concentration d'une sous-classe d'IgG peut être associée à une augmentation de la fréquence et de la sévérité des infections, particulièrement des voies respiratoires. Cette baisse de concentration n'est donc considérée comme pathologique que lorsqu'elle s'accompagne par une altération des fonctions anticorps dépendantes, c'est à dire d'infections récurrentes ou d'inefficacité vaccinale.

4.2 Expressions cellulaires des récepteurs humains aux IgG et fixation des sous-classes

Il y a dix récepteurs aux IgG chez l'homme : cinq activateurs : hFcγRI (CD64), hFcγRIIA (CD32a), hFcγRIIC (CD32c), hFcγRIIIA (CD16a) et hFcγRIIIB (CD16b), un inhibiteur hFcγRIIB (CD32b), deux récepteurs apparentés (hFcRL4 (CD307d) et hFcRL5 (CD307e)), le hTRIM21 (récepteur intracytoplasmique) et le hFcRn (Figure 6) (voir revue en Annexe 3) [80, 141, 142]. Après fixation des IgG sur leurs récepteurs via leur fragment Fc, ceux-ci ne seront activés que lors de leur dimérisation [143]. Hormis le hFcRL4, ces récepteurs ne fixent que les IgG. Leur capacité à fixer les anticorps, leurs niveaux d'expression cellulaire et leurs implications dans les pathologies sont modulés par l'existence de polymorphismes (voir revue en Annexe 1) [144]. Certains d'entre eux (hFcγRI et hFcγRIIIA) nécessitent pour être fonctionnels d'être associés avec la sous-unité FcRγ qui possède un motif intracellulaire activateur nommé ITAM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif »). Ces récepteurs ont des profils d'expression cellulaires différents, des affinités distinctes pour les différentes sous-classes et donc des propriétés différentes (Figure 6). Parmi certaines des fonctions effectrices des récepteurs activateurs, se trouvent l'internalisation des complexes immuns liés aux récepteurs, l'amplification de la présentation antigénique, de la cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps (ADCC) et de l'activation cellulaire [118].

Name	FcγRI	FcγRIIA		FcγRIIB		FcγRIIC		FcγRIIIA		FcγRIIIB	FcRn	TRIM21	FcRL5
CD	CD64	CD32A		CD32B		CD32C		CD16A		CD16B	-	-	CD307e
Gene	FCGR1A	FCGR2A		FCGR2B		FCGR2C		FCGR3A		FCGR3B	FCGRT	TRIM21	FCRL5
Alleles	/	H ₁₃₁	R ₁₃₁	I ₂₃₂	T ₂₃₂	Q ₁₃	stop ₃	V ₁₅₈	F ₁₅₈	NA1, NA2, SH	/	/	/
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IgG1	6x10 ⁷	5x10 ⁶	3x10 ⁶	1x10 ⁵	ND	1x10 ⁵	-	2x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ⁵	8x10 ⁷	5x10 ⁶	1x10 ⁶
IgG2	-	4x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ⁴	ND	2x10 ⁴	-	7x10 ⁴	3x10 ⁴	-	5x10 ⁷	5x10 ⁶	var.
IgG3	6x10 ⁷	9x10 ⁵	9x10 ⁵	2x10 ⁵	ND	2x10 ⁵	-	1x10 ⁷	8x10 ⁶	1x10 ⁶	3x10 ⁷	2x10 ⁶	1x10 ⁵
IgG4	3x10 ⁷	2x10 ⁵	2x10 ⁵	2x10 ⁵	ND	2x10 ⁵	-	2x10 ⁵	2x10 ⁵	-	2x10 ⁷	5x10 ⁶	1x10 ⁶
IgE	-	-		-		-		-		-	-	-	-
IgA	-	-		-		-		-		-	-	-	-
Major role	Activation	Activation; ITAMI-inhibition		Inhibition		Activation		Activation; ITAMI-inhibition		Decoy; Activation	IgG recycling; transport. Ag pres.	Activation; proteasom e; viral degradatio n	Inhibition/ Activation ?
B cell	-	-		+		-	-	-		-	low	+	+
T cell	-	-		-		-	-	-		-	-	+	-
NK cell	-	-		- ¹		+	-	+		-	-	+	-
Mono/MΦ	+	+		+/-		+	-	+		-	+	+	-
Neutrophil	[+]	+		+/-		+	-	-		+	+	+	-
DC	+	+		+		-	-	-		-	+	+	-
Basophil	-	+		+		-	-	-		+/-	-	+	-
Mast cell	[+]	+		-		-	-	-		-	?	+	-
Eosinophil	-	+		-		-	-	-		-	-	+	-
Platelet	-	+		-		-	-	-		-	?	?	?
Endothelium	-	-		- / LSEC+		-	-	-		-	+	+/-	-
Epithelium	-	-		-		-	-	-		-	+	?	-
Syncytiotrophoblast	?	?		?		?	?	?		?	+	?	-

Figure 6 : Représentation schématique des récepteurs humains aux IgG à la surface cellulaire, en association avec leurs sous-unités intra-cellulaires, en fonction de leur variant allélique. La partie supérieure du tableau présente les affinités des récepteurs pour les différentes sous-classes d'IgG (en gras : haute affinité ; ND : non disponible). La partie inférieure représente leur expression cellulaire (+ : expression ; +/- : expression sur une sous-population ; [+] : expression inducible ; ? : inconnu ; 1 : détectable dans une sous population exprimant le codon stop *Fcgr2c* et dans une rare sous-population de lymphocytes NK. ITAM : « immunoreceptor tyrosine-based activation motif » ; ITIM : « immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif » ; Ag pres : présentation de l'antigène. Adapté de [142], avec autorisation.

Le hFcγRI est le récepteur présentant les plus hautes affinités pour certaines des sous-classes d'IgG, et peut fixer des monomères d'IgG1, d'IgG3 et d'IgG4. Il peut également fixer des complexes immuns

de ces trois sous-classes mais ne fixe pas les IgG2 (Figure 6). Les autres récepteurs aux IgG ont une affinité 100-1000 fois moindre, ne pouvant donc fixer que des complexes immuns. Le FcRn est une exception, puisqu'il ne fixe pas les IgG à pH physiologique mais uniquement à pH acide, comme dans les endosomes ; dans ce cas son affinité augmente drastiquement et il fixe les IgG monomériques [142]. Le hFcγRIIA est le récepteur le plus largement exprimé sur les cellules myéloïdes, hormis sur les lymphocytes et fixe l'ensemble des sous-classes (Figure 6), et de façon significative les IgG2 (fixation plus efficace pour le variant 131H que pour le variant 131R). Le hFcγRIIB est le seul récepteur inhibiteur aux IgG. En effet, grâce à son motif intracellulaire nommé ITIM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif »), la co-aggrégation du hFcγRIIB avec un récepteur activateur entraîne une inhibition des fonctions effectrices de ce dernier [145]. La fixation des IgG au hFcγRIIB est systématiquement la plus faible pour chaque sous-classe parmi les interactions IgG-hFcγR, sauf pour l'IgG4. Du coup, le hFcγRIIB fixe de manière similaire les IgG1, IgG3, IgG4 et de manière très faible les IgG2. En particulier tous les hFcγR de faible affinité ont la même affinité pour les IgG4, mettant ainsi sur un pied d'égalité le hFcγRIIB avec les hFcγR activateurs, ce qui pourrait être une des causes des propriétés modulatrices anti-inflammatoires de cette sous-classe d'IgG. Le hFcγRIIC n'est exprimé que dans 20% de la population à cause d'un polymorphisme allélique entraînant un codon stop (Figure 6). Le hFcγRIIIA possède deux allotypes, le F158 et le V158, ce dernier ayant une affinité supérieure au F158 pour toutes les sous-classes d'IgG. La fixation au hFcγRIIIA est particulièrement dépendante de la fucosylation du site N297 (fixation 50 fois supérieure en l'absence de fucosylation). Il est le principal récepteur impliqué *in vitro* dans l'ADCC. Le hFcγRIIB possède trois variants - NA1, NA2, SH - dont le premier, NA1 présente une meilleure capacité d'opsonisation des complexes immuns [IgG1/IgG3+antigène]. Le hFcRn permet le transport des IgG dans l'organisme, la transmission materno-fœtale et joue un rôle majeur dans le recyclage des IgG (il y a quatre fois plus d'IgG recyclés par le hFcRn que d'IgG nouvellement synthétisées). Il est le seul à se fixer aux anticorps à la jonction des domaines CH2 et CH3 dans une région riche en histidine [146], ce qui explique la courte demi-vie des IgG3 à cause d'un remplacement de l'histidine par de l'arginine en position 435 [147]. Le récepteur TRIM21 (récepteur intracellulaire) fixe des IgG opsonisées sur des virus et particules une fois internalisées, et représente un système de défense intra-cytosolique contre des pathogènes, notamment viraux, activant leur neutralisation via le protéasome mais également l'induction des voies de l'inflammation [148]. Enfin, les récepteurs FcRL4 et FcRL5 sont deux récepteurs appartenant à la superfamille des immunoglobulines et possèdent également des motifs intracellulaires ITIM, avec un rôle supposé dans la régulation de l'activation des lymphocytes B [149].

Chaque récepteur aux IgG présente donc des profils d'expression cellulaire différents et des capacités de fixation de sous-classes d'IgG distinctes. Analyser le rôle d'IgG spécifiques au cours d'une pathologie peut donc être proposée par l'étude de la distribution en sous-classes, permettant par

déduction d'appréhender les hFcγRs et les types cellulaires impliqués.

OBJECTIFS

Les RHA peropératoires représentent une incertitude pour les cliniciens, tant dans la difficulté diagnostique que dans l'appréhension de son évolution ou dans la recherche de l'agent responsable. Il n'existe pas de facteurs de risque établis de survenue de RHA per-anesthésique, hormis peut-être un antécédent d'allergie médicamenteuse [13]. De plus, les signes diagnostiques des RHA peropératoires peuvent être masqués ou différés, rendant l'établissement du diagnostic difficile. Hors, la rapidité d'instauration du traitement par adrénaline (et donc du diagnostic) conditionne le pronostic de la réaction, tant dans les modèles animaux que dans les études cliniques [21-26][27]. Dans 20 à 33% des cas, les explorations ne permettent pas de confirmer une voie IgE responsable et de confirmer le diagnostic, en dépit de la suspicion clinique [55]³⁰⁻³². L'objectif de ce travail de thèse était d'appréhender quelques-unes des particularités de l'endotype et du phénotype des RHA, permettant d'explorer l'établissement du diagnostic et la confirmation du mécanisme et de l'étiologie.

- **Article 1** : L'hypothèse de travail à la base de cette analyse rétrospective de 106 patients issus du GERAP ayant présenté une RHA peropératoire était que la survenue du bronchospasme au cours des RHA était associée à un antécédent d'asthme, celui-ci ayant été associé à un sur-risque de mortalité. De façon surprenante, après analyse multivariée, parmi les réactions IgE médiées, seul un curare comme agent étiologique de la RHA (quelle que soit la molécule) était associé à la survenue du bronchospasme, suggérant un mécanisme physiopathologique différent entre le bronchospasme induit par une RHA et par une pathologie asthmatique.

Cet article a été publié dans « Allergy » en 2015, sous forme de « *Brief communication* ».

- **Article 2** : L'objectif était de confirmer le rôle du CO₂ télé-expiratoire dans l'établissement rapide du caractère sévère d'une RHA peropératoire, cette donnée ayant été suggérée en 2011 mais non validée [28]. Pour cela, nous avons analysé les caractéristiques cliniques des RHA des 86 patients inclus dans l'étude multicentrique NASA. Cela nous a permis 1/de valider une hypocapnie inférieure à 20 mmHg comme outil diagnostique fiable et accessible de RHA sévère dans cette cohorte de patients avec une suspicion de RHA aux curares, 2/de souligner l'écart de prise en charge par rapport aux recommandations notamment en ce qui concerne le remplissage vasculaire ou l'utilisation d'adrénaline comme premier agent vasoconstricteur.

Le manuscrit correspondant est en cours de soumission à « Anesthesiology ».

- **Article 3** : L'objectif de cette étude est d'analyser le rôle d'IgG spécifiques (en plus d'IgE spécifiques) anti-curares chez les patients de l'étude NASA. Nous souhaitons examiner la possibilité d'une corrélation entre présence d'IgG anti-curare et gravité de la réaction clinique observée, voire même d'expliquer des réactions non-IgE dépendantes par la présence d'IgG spécifiques et ainsi d'un axe IgG-FcγR dans l'anaphylaxie médicamenteuse. Par méthodes ImmunoCAP et ELISA, nous avons mis en évidence la présence d'IgG spécifiques anti-

curares, dont la présence est associée à la survenue d'une RHA sévère. De même qu'il existe des réactions IgE médiées pures, il existe également des réactions IgG sans présence de marqueurs de la voie IgE. Alors que les patients ayant présenté une RHA à la succinylcholine semblent présenter dans la grande majorité des cas une réaction médiée par les anticorps, ceux présentant une réaction à l'atracurium ne présenteraient cette voie que dans la moitié des cas, l'autre moitié serait donc associée à d'autres mécanismes.

Le manuscrit a été rédigé dans une forme préliminaire pour ce manuscrit de thèse. Des expériences supplémentaires doivent être réalisées d'ici la fin 2016 afin de permettre sa soumission. Cible : « Journal of Allergy and Clinical Immunology ».

ARTICLE 1

BRIEF COMMUNICATION

Anaphylactic bronchospasm during general anesthesia is not related to asthma

A. Gouel-Chéron¹, C. Neukirch², B. Aubier¹, P. Montravers¹, P. Nicaise³, S. Chollet-Martin³, P.-M. Mertes⁴, M. Aubier² & D. Longrois¹

¹Département d'Anesthésie-Réanimation, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France; ²Service de Pneumologie, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France; ³Laboratoire d'Immunologie "Auto-Immunité et Hypersensibilités", Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France; ⁴Service d'Anesthésie-Réanimation, Nouvel Hôpital Civil, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France

To cite this article: Gouel-Chéron A, Neukirch C, Aubier B, Montravers P, Nicaise P, Chollet-Martin S, Mertes P-M, Aubier M, Longrois D. Anaphylactic bronchospasm during general anesthesia is not related to asthma. *Allergy* 2015; **70**: 453–456.

Keywords

anaphylaxis; asthma; atopy; bronchospasm; general anesthesia.

Correspondence

Aurélie Gouel-Chéron, Département d'Anesthésie-Réanimation, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France.

Tel.: 01 40 25 83 55

Fax: 01 40 25 63 09

E-mail: aurelie.gouel@bch.aphp.fr

Accepted for publication 20 December 2014

DOI:10.1111/all.12565

Edited by: Douglas Robinson

Abstract

In the general population, a history of asthma (HA) is associated with a higher risk of mortality of anaphylactic shock (AS), but it is unknown whether this association remains valid for intra-operative AS. The goal of this retrospective study was to investigate whether a HA was associated with a higher risk of bronchospasm during intra-operative AS. We analyzed 106 patients (January 2009–December 2012) with intra-operative AS: 57% of them had a confirmed IgE-mediated reaction and 27% had a HA. On logistic regression, the only factor statistically associated with bronchospasm was a neuromuscular blocking drug, with both IgE- or non-IgE-mediated reactions. These results suggest that the mechanisms of bronchospasm in AS may be different from those of asthma and that, in the presence of bronchospasm during anesthesia, AS should be considered to be the most likely cause.

As defined by the EAACI, 'anaphylaxis is a severe, life-threatening, generalized or systemic hypersensitivity reaction' (1). The estimated incidence of anaphylactic shock (AS) during anesthesia is 1/10 000 anesthetic procedures (2). AS can lead to rapid death even in previously healthy individuals (3). According to postmortem studies, death after AS was caused by asphyxia in 50% of cases (pharyngolaryngeal edema, bronchoconstriction) (4). In the general population, asthmatic patients who develop AS are considered to be at higher risk for more severe clinical manifestations and mortality (5). To our knowledge, the relationship between a history of asthma (HA) and clinical manifestations of intra-operative anaphylaxis has not been described. The purpose of this study was to test the hypothesis that a HA modifies the incidence of bronchospasm in patients who develop AS during general anesthesia.

Material and methods

The patients of this cohort are included in the epidemiological studies of the GERAP approved by the Strasbourg Hospitals ethics committee. We retrospectively analyzed

adults with AS during general anesthesia admitted to one single anesthetic allergy reference center for testing from January 2009 to December 2012 [using a standardized diagnostic protocol (6)]. Patients without a detailed report of the reaction were excluded ($n = 32$). Demographic data, HA [according to (7)], atopy [defined as in (1)], allergy [to food, drugs, venom, mites, dust (1)], characteristics of AS severity (8), bronchospasm defined as elevated airway pressures or ventilation difficulties marked in the anesthesia/medical records, treatment and mortality were recorded. IgE-mediated anaphylaxis was diagnosed on the basis of skin tests (9–11) and/or circulating specific IgE (12), otherwise a diagnosis of non-IgE-mediated reaction was adopted. Skin tests were performed for hypnotics, NMBD (suxamethonium, (cis)atracurium, rocuronium), antibiotics, and latex (6).

Comparisons were performed using a t-test and chi-squared test, as appropriate. Logistic regression analyses (bronchospasm as the dependent variable) were performed. A P -value < 0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed with R version 3.0.2 software (R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Table 1 Patient characteristics and features of anaphylactic shock

	All patients (<i>n</i> = 106)	HA (<i>n</i> = 29)		No HA (<i>n</i> = 77)	
		IgE-mediated reactions	Non-IgE-mediated reactions	IgE-mediated reactions	Non-IgE-mediated reactions
Age, years	48 ± 15	52 ± 13	45 ± 10	51 ± 15	45 ± 16
Female gender, %	69	93	50	69	66
Atopy, %	36	80*	50	27	22
Time to onset of shock after induction (min)	5 (3; 10)	3 (3; 5)	5 (3; 9)	3 (3; 10)	10 (3; 90)
Bronchospasm, %	33	47	36	42	12
Arterial hypotension, %	58	53	43	73	47
Hypoxemia, %	10	27	7	8	0
Skin symptoms, %	70	67	57	69	78
Causal agent: NMBD, %	43	60	NA	75	NA

NMBD, neuromuscular blocking drugs; HA, History of asthma.

Results are expressed as mean ± SD, median (with interquartile range), or proportions according to the distribution.

**P* < 0.05 asthma vs no asthma in IgE-mediated reactions.

†*P* < 0.05 asthma vs no asthma in non-IgE-mediated reactions (no observations).

Results

Of the 106 patients included, 57% had a confirmed IgE-mediated reaction and 27% had a HA. Bronchospasm occurred as the single manifestation in 3% of AS cases and associated with other signs in 30% of cases. The severity of AS was grade 2 in 50% of cases, grade 1 or 3 in 24% of cases, and grade 4 in 5% of cases. No differences in terms of the grade severity of AS and clinical signs were observed between patients with or without a HA, regardless of the mechanisms considered. Patient characteristics and features of AS are presented in Table 1. A statistically significant association was observed between atopy and a HA on univariate but not on multivariate analysis. The only parameter associated with bronchospasm during AS was NMBD as causal agent (Table 2).

Discussion

In the general population, asthmatic patients experiencing AS are considered to be at higher risk for respiratory mani-

festations (5). However, few data are available concerning the relationship between asthma, bronchospasm, and intra-operative AS (3). The incidences of bronchospasm (2, 11, 13), IgE-, and non-IgE-mediated reactions (14) in this study were similar to those reported in other studies. After logistic regression, NMBD as the causal agent was the only factor statistically associated with bronchospasm. Asthma incidence in our population is higher than in the general French population, which has been reported of 10.2% in 2006 (15). However, our study investigated patients consulting in an allergeo-anesthetic center which may not be representative of the general population.

Autopsy studies of cases of fatal asthma revealed a significantly decreased distribution of lymphatics (16) and increased expression of FcεRI and mast cells in the lungs (17), which at least theoretically suggest an increased risk to mount IgE-mediated and histamine reactions. In the present study, one possible explanation for the lack of association between a HA and bronchospasm during AS could be that in previous study (5) the differences between asthmatic and nonasthmatic patients on the incidence of anaphylaxis and clinical manifestations concerned respiratory signs globally (both the upper and the lower airways), whereas in the present study, the patients being tracheally intubated, we only analyzed the incidence of bronchospasm between patients with vs without a HA. The incidence of respiratory signs was similar in the study of Gonzalez-Perez et al. (5) and in our study (approximately 40%), but they could not differentiate between upper and lower respiratory signs, whereas we only focused on lower respiratory signs.

To our knowledge, the association between bronchospasm and NMBD has been poorly described in previous studies. One explanation for the association observed in this study would be that some NMBD injection leads to mast cell degranulation and release of bronchoconstricting mediators such as histamine and leukotrienes (18). Indeed, injection of antihistamines can abolish some of the bronchoconstrictor

Table 2 Univariate analysis and logistic regression according to the presence of bronchospasm in patients with AS

	Univariate analysis (<i>n</i> = 106)			Logistic regression (<i>n</i> = 106)		
	OR	95% CI	<i>P</i>	OR	95% CI	<i>P</i>
HA	1.7	0.7; 4	0.26	2.2	0.8; 6	0.1
Causal agent: NMBD	4	1.7; 9.7	0.001	4	1.1; 16.7	0.04
IgE mechanisms	3.1	1.3; 8	0.01	1.2	0.3; 4.6	0.7
Atopy	0.7	0.3; 1.7	0.5			
Causal agent: ATB	0.2	0.01; 1.1	0.1			

CI, confidence interval; NMBD, Neuromuscular Blocking Drug; ATB, antibiotic; HA, History of asthma.

effects of NMBD in rabbits (19). Secondly, NMBD-induced bronchospasm may be related to blockade of M2 muscarinic receptors on prejunctional parasympathetic nerves, leading to vagus nerve-induced bronchospasm (via increased release of acetylcholine, activation of M3 muscarinic receptors and airway smooth muscle constriction) (20). This last pathophysiologic link has been proven for rapacuronium [which has been retrieved from the American market for the major incidence of bronchospasm (21, 22)] and may not be a clinical observable effect of the other NMBD.

One limitation of this study is that it only considered a HA, without providing any more detailed information on severity, as performed by Gonzalez-Perez et al. (5). It was difficult during allergic consultation to have more accurate details of previous asthma episodes. We may hypothesize that bronchial hyper-reactivity may be different in population with active asthma under treatment than with former episodes of asthma. Nevertheless, anesthesiologists consider a HA to be a risk factor for respiratory complications and do not consider all the details of previous asthma to classify the patient's risk. Only considering a previous HA is by consequence of clinical relevance. Although based on only a small sample size, the fact that data were collected by the same physician in a single-center study supports the reliability of these data. Another limitation is that the standardized diagnostic protocol to identify the allergen did not include IgG assays and neutrophil counts, which could be relevant in asthma (6).

Conclusion

These results suggest that a HA may not be related to the development of bronchospasm or the severity of intra-operative AS. We can speculate that asthma and AS are due to different mechanisms of increased airway resistance. This also suggest that bronchospasm occurring during anesthesia should be considered to be due to AS rather than to a HA.

Author contributions

AGC helped to design the study, collected the clinical information, analyzed the raw data, performed statistical analysis, drafted the manuscript, and contributed to the writing of the manuscript. CN conducted all the allergic consultations and helped to design the study. BA helped to design the study and collected the clinical information. PN and SCM performed the biological measurement. PMM, PM, and MA helped to design the study and contributed to the writing of the manuscript. DL helped to design the study, participated with AGC in the interpretation of all data, and contributed to the writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Johansson SGO, Hourihane JOB, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haah-tela T et al. A revised nomenclature for allergy: an EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001;**56**:813–824.
- Mertes PM, Alla F, Tréchet P, Auroy Y, Jouglu E. Anaphylaxis during anesthesia in France: an 8-year national survey. *J Allergy Clin Immunol* 2011;**128**:366–373.
- Reitter M, Petitpain N, Latarche C, Cottin J, Massy N, Demoly P et al. Fatal anaphylaxis with neuromuscular blocking agents: a risk factor and management analysis. *Allergy* 2014;**69**:954–959.
- Greenberger PA, Rotskoff BD, Lifschultz B. Fatal anaphylaxis: postmortem findings and associated comorbid diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;**98**:252–257.
- González-Pérez A, Aponte Z, Vidaurre CF, Rodríguez LAG. Anaphylaxis epidemiology in patients with and patients without asthma: a United Kingdom database review. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**125**:1098–1104.
- Mertes PM, Laxenaire MC, Lienhart A, Aberer W, Ring J, Pichler WJ et al. Reducing the risk of anaphylaxis during anaesthesia: guidelines for clinical practice. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2005;**15**:91–101.
- National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 3 (EPR-3): guidelines for the diagnosis and management of asthma—summary report 2007. *J Allergy Clin Immunol* 2007;**120**:S94–S138.
- Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet* 1977;**309**:466–469.
- Lafuente A, Javaloyes G, Berroa F, Goikoetxea MJ, Moncada R, Núñez-Córdoba JM et al. Early skin testing is effective for diagnosis of hypersensitivity reactions occurring during anesthesia. *Allergy* 2013;**68**:820–822.
- Ramirez LF, Pereira A, Chiriac AM, Bonnet-Boyer MC, Demoly P. Negative predictive value of skin tests to neuromuscular blocking agents. *Allergy* 2012;**67**:439–441.
- Renaudin JM, Beaudouin E, Ponvert C, Demoly P, Moneret-Vautrin DA. Severe drug-induced anaphylaxis: analysis of 333 cases recorded by the Allergy Vigilance Network from 2002 to 2010. *Allergy* 2013;**68**:929–937.
- Laroche D, Chollet-Martin S, Leturgie P, Malzac L, Vergnaud MC, Neukirch C et al. Evaluation of a new routine diagnostic test for immunoglobulin e sensitization to neuro-muscular blocking agents. *Anesthesiology* 2011;**114**:91–97.
- Hepner DL, Castells MC. Anaphylaxis during the perioperative period. *Anest Analg* 2003;**97**:1381–1395.
- Dong SW, Mertes PM, Petitpain N, Hasden-teufel F, Malinovsky JM, GERAP. Hypersensitivity reactions during anesthesia. Results from the ninth French survey (2005–2007). *Minerva Anesthesiol* 2012;**78**:868–878.
- Afrite A, Allonier C, Com-Ruelle L, Le Guen N. L'asthme en France en 2006: prévalence, contrôle et déterminants. IDRES editor. Rapport 549, 2011.
- Ebina M. Remodeling of airway walls in fatal asthmatics decreases lymphatic distribution; beyond thickening of airway smooth muscle layers. *Allergol Int* 2008;**57**:165–174.
- Den Otter I, Silva LFF, Carvalho ALN, Pires-Neto RC, Annoni R, Ferreira DS et al. High-affinity immunoglobulin E receptor expression is increased in large and small airways in fatal asthma. *Clin Exp Allergy* 2010;**40**:1473–1481.
- Burkhalter A, Katzung B, Julius D. Histamine, serotonin, and the ergot alkaloid. In: Katzung BG editor. *Basic and Clinical Pharmacology*, 8th edn. Tulane, USA: McGraw-Hill, 2001: 265–292.

19. Habre W, Babik B, Chaler M, Peták F. Role of endogenous histamine in altered lung mechanics in rabbits. *Anesthesiology* 2002;**96**:409–415.
20. Jooste E, Klafter F, Hirshman CA, Emala CW. A mechanism for rapacuronium-induced bronchospasm: M2 muscarinic receptor antagonism. *Anesthesiology* 2003;**98**:906–911.
21. Naguib M. How serious is the bronchospasm induced by rapacuronium? *Anesthesiology* 2001;**94**:924–925.
22. Goudsouzian NG. Rapacuronium and bronchospasm. *Anesthesiology* 2001;**94**:727–728.

ARTICLE 2

A low value of end-tidal CO₂ is a severity marker of intra-anesthetic acute hypersensitivity reaction

Abbreviated Title: *Low etCO₂ for early diagnosis of severe perioperative anaphylaxis*

Authors

A. Gouel-Chéron^{1,2,3}, et al

Affiliations

¹ Institut Pasteur, Department of Immunology, Unit of Antibodies in Therapy and Pathology, Paris, France; ²INSERM, U1222, Paris, France;

³ Département d'Anesthésie-Réanimation, Hôpital Bichat, APHP, Paris, France;

Correspondence to: Pr Dan Longrois, Département d'anesthésie-réanimation, Hôpital Bichat-Claude Bernard, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. Phone: +33-1-40-25-74-27. Email: dan.longrois@aphp.fr

Disclosure of funding

The NASA study was financed by AP-HP through a « Contrat de Recherche Clinique 2011 » and by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) and DGOS (Direction Générale de l'Offre de Soins, Paris, France) through a « Recherche Clinique translationnelle 2012 » grant. AGC benefited from a stipend provided by AP-HP, Paris, France and by the Institut Pasteur, Paris, France. FJ is an employee of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Clinical trial number and registry URL

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01637220

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01637220?term=NASA&rank=2>

Acknowledgment

We are thankful to Nessima Yelles and all the team of the *Unité de Recherche Clinique* at the Bichat hospital for their help for the NASA study logistics.

Number of words

Abstract: 254 words. Introduction: 495 words. Discussion: 1518 words.

Conflicts of interest: All authors declare that they have no conflict of interest.

Abstract

Background. The prompt diagnosis of intra-anesthetic acute hypersensitivity reaction (AHR) is challenging because of the possible absence of usual signs of AHR and the much higher prevalence of alternative diagnoses. Their under- and delayed-diagnosis may be responsible for delayed epinephrine infusion, which is related with poor prognosis. The clinical utility of the information “low end-tidal CO₂ (etCO₂)” (known to be linked to cardiac output) to confirm intra-anesthetic AHR is not known.

Methods. Clinical data from the 86 patients of the NASA multicentric study (“*Neutrophil Activation in Systemic Anaphylaxis*”) were analyzed. Any patient with clinical signs consistent with intra-anesthetic AHR to neuromuscular blocking agent, that signed consent, was included. Anesthesia/surgery/AHR characteristics were recorded. A severe AHR was defined as a grade 3-4 according to Ring and Messmer classification. Etiologic explorations were performed as recommended.

Results. Among the 86 patients included, half presented a severe AHR and 76% had an IgE-mediated pathway confirmed. Three patients died. Occurrence of arterial hypotension, hypocapnia and hypoxemia and their minimum values were significantly different among the four severity grades groups. However, only a low etCO₂ was able to distinguish a mild (median value 26; IQR [24;29]) from a severe AHR (median value 18 IQR [12;23]), without overlap in IQR values. Among the 41% of patients that received epinephrine, only half received it as the first line therapy despite international guidelines.

Conclusions An etCO₂ lower than 20 mmHg could be useful for fast diagnosis of severe intra-anesthetic AHR and be a strong argument for early injection of titrated doses of epinephrine.

Introduction

The second symposium on the definition and management of anaphylaxis defined anaphylaxis as “a serious allergic reaction that is rapid in onset and may cause death” and updated its clinical criteria.¹⁻³ Although applying to the majority of clinical situations of anaphylaxis, they have limitations for intra-anesthetic anaphylaxis, which is often severe and life-threatening⁴ (grade 3 or 4 according to the Ring and Messmer classification⁵).

Indeed, acute hypersensitivity reactions (AHR) during general anesthesia (GA) may be difficult to diagnose because of the impossibility to detect classic signs such as erythema (because of surgical dressing) and/or the absence of other clinical signs (such as anxiety, dyspnea, and abdominal pain). Finally, major signs of AHR (e.g. arterial hypotension, tachycardia) can have many other causes induced by anesthesia and surgery, which occur with much higher prevalence.⁶ Under- and delayed-diagnosis of intra-anesthetic severe AHR may be responsible for inadequate epinephrine infusion: absent, as a second line treatment or delayed.^{4,7,8} Epinephrine infusion may also be delayed because of its perceived/real risk if AHR is not the accurate diagnosis. Although these difficulties are known for many decades, no simple attempt to improve the diagnosis process of intra-anesthetic AHR has been proposed.

Early diagnosis of AHR and rapid epinephrine infusion are key elements to improve prognosis. In patients with food allergy, delayed epinephrine injection is associated with an increased risk of death and hospital admission⁹⁻¹²; in perioperative anaphylaxis, delayed epinephrine is also associated with poor prognosis in some experimental¹³ and clinical studies.^{4,14} Despite regularly updated guidelines on the management of anaphylaxis, only one third of the junior physicians in United Kingdom know the correct dose and route of epinephrine infusion.¹⁵ In a large study involving three countries in Europe, only 13% of the patients that presented a severe anaphylactic reaction received epinephrine (less than half of

the grade 4 patients received epinephrine), whereas half of them received histamine receptors antagonists and glucocorticoids.¹⁶ All these elements underline the recognized difficulties to diagnose and then correctly manage intra-anesthetic AHR.

From clinical experience, we have hypothesized that end-tidal CO₂ (etCO₂), a nearly universally available clinical parameter in the operating room (OR), could improve clinical reasoning when AHR is a possible diagnosis in patients under GA. Although there are no specific prospective data on this topic, values below 20 mmHg (with a plateau, proof of bronchial permeability¹⁷) after insertion of the intratracheal tube, have been proposed as a tool to diagnose a severe AHR reaction.¹⁸

The main objective of this study was to evaluate the potential role of etCO₂ value in the early diagnosis of severe intra-anesthetic AHR in a prospective cohort of patients with a suspected AHR to neuromuscular blocking agent (NMBA). We subsequently wanted to analyze the implementation of international guidelines on the management of intra-anesthetic AHR, with a focus on the hemodynamic treatment in order to estimate whether the use of the information “low etCO₂” could be used to facilitate both early diagnosis and early epinephrine prescription upon occurrence of a severe grade AHR.

Methods

Study design

The multicentric NASA (“*Neutrophil Activation in Systemic Anaphylaxis*”) study involved 11 anesthesia departments in the Ile-de-France region in France (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01637220>). The purpose of the NASA study was to evaluate the role of neutrophils during AHR to NMBA in humans through a case / control design, with 6-8 weeks follow-up in cases. We took advantage of this cohort to analyze in depth the clinical data associated with NMBA-induced anaphylactic shocks. We included from October 2012 to June 2014 any patient aged over 17 years with clinical signs consistent with intra-anesthetic AHR to NMBA whatever the grade of the reaction. The only patient aged under 18 had a consent signed by his parents. As case patients were not in a medical and psychological state to provide consent to participate in the study during occurrence of the AHR, their consent was obtained as soon as they were judged able to understand, allowing further investigations. If the patients did not recover the day after the AHR, consent was obtained from a next of kin. Non-inclusion criteria were the absence of consent. As recommended¹⁹, case patients benefited from an allergology-anesthesia visit 6-8 weeks following occurrence of the AHR, in order to identify the culprit agent.

Clinical and biological data were collected. Data collection comprised demographic (age and gender) and anesthesia/surgery characteristics (type, NMBA used, status of infection, scheduled or urgent surgery), medical information (history of atopic events, asthma, allergy to food, drugs or other compounds, comorbidity factors and surgeries, previous chronic drug treatments with focus on beta-blockers, ACE inhibitors and calcium-channel blockers, drugs known to alter the response to AHR). All clinical signs of AHR, their chronology and outcome after the shock were recorded. Interventions/drugs initiated in the OR before occurrence of the first clinical sign of AHR were collected (nature of antiseptic, volume

expansion, anesthetic and other drugs used, in order to identify the culprit agent), as well as the specific treatment of the AHR. Patients were retrospectively classified in severity grades according to the Ring and Messmer classification by two independent evaluations of clinician experts. A severe AHR was defined as a grade 3 or 4 (i.e. a severe organ failure or a cardiac/respiratory arrest).

The protocol was approved by local ethics committees (committee for the protection of Individuals "Ile-de-France X"). It was prospectively registered at ClinicalTrials.gov (Identifier: NCT0163722). The biological collection was approved and labeled by the National Health Authority. These collections had also been registered within the French Ministry of Research and ARH ("Agences Régionales de l'Hospitalisation").

Biological exploration of the anaphylactic reaction

As recommended by International/National Guidelines¹⁹⁻²¹ on management of perioperative AHR, a venous blood sample was collected 30 minutes following the onset of the AHR when the patient's condition had been stabilized, two hours after the AHR and during the allergology-anesthesia visit 6-8 weeks post-AHR.

During the allergology-anesthesia visit, immediate reading intra-dermal tests were performed on the forearms and arms of the patients. These skin tests explore a possible involvement of the "classical" IgE-mediated, mast cell-dependent pathway of AHR. Results were interpreted after 20 minutes using as internal controls histamine (positive control) and saline (negative control). Skin tests included drugs used during GA, in particular of the NMBA family, with different dilutions as recommended by the practice guidelines²², but also, depending on the cases, other perioperative compounds/substances (antibiotics, volume expansion solutions, antiseptics...). A latex prick test was systematically performed in all the patients.

The following circulating parameters were assessed as previously described²³, immediately following the AHR and during the allergology-anesthesia visit: histamine (EIA, Immunotech,

Beckman Coulter), tryptase (FEIA, ImmunoCAP 250 Phadia, Thermofisher) and anti-quaternary ammonium-specific IgE ($N < 0.35$ kU/L) (FEIA, ImmunoCAP 250 Phadia, Thermofisher). Tryptase levels were considered increased when greater than $(1.2 \times [\text{baseline tryptase level}] + 2 \mu\text{g/L})$ as recently suggested.^{24,25} A histamine concentration above 20 nmol/L was considered significantly increased.

Clinical signs and management during the hypersensitivity allergic reaction

All clinical signs occurring during the AHR were prospectively recorded. Arterial hypotension, tachycardia and bradycardia were defined as a systolic arterial pressure (SAP) and a heart rate (HR) under/above 20% of baseline. Hypocapnia and hypoxemia were defined respectively as an etCO_2 under 34 mmHg and a SpO_2 under 94%. Bronchospasm was defined as increased airway pressures or ventilation difficulties as reported by the clinicians on the anaesthesia flow chart. When a sign appeared first, the minimum or maximum numeric value was obtained, i.e. minimum etCO_2 for hypocapnia, minimum/maximum HR for bradycardia/tachycardia, lowest BP for arterial hypotension, minimum SpO_2 for hypoxemia. Additional values were retrospectively obtained from patients included in two of the centers (corresponding to 12 patients). All patients that suffered an AHR were treated following the French and international practice guidelines.^{18-20,26}

Statistical analyses

The number of patients to include in the NASA study had been calculated based on the primary endpoint. In order to observe a difference of 50% in the mean percentage of activated neutrophils between cases and controls patients, with a type II error of 10 % and a type I error of 5%, the minimum number of patients per group was 79. We finally included 86 cases patients.

Variables were described according to their distribution as appropriate (median and interquartile range for variables with non-Gaussian distributions; frequency and percentage for category criteria). Comparisons were respectively performed with a Mann & Whitney *U* test or an exact Fisher test. To perform an analysis in sub-groups of patients, defined by the severity of the AHR, we used for continuous data, a Kruskal-Wallis test, followed by a *post-hoc* analysis by a Dunn test, whereas an exact Fisher test was performed for categorical data. Statistical tests were bilateral and the risk of first degree was fixed at 5%. Statistical analyses were performed with R version 3.0.2 software (R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

Patient's inclusion and clinical presentation of the AHR

We included 86 case patients. The characteristics of the patients are presented in Table 1. Among the AHR cases, 7 (8%) were classified grade 1, 36 (42%) grade 2, 33 (38%) grade 3 and 10 (12%) grade 4. The clinical features of the AHR are depicted in Table 2. The AHR occurred in a median delay of 5 minutes following onset of anesthesia induction (defined as the injection of the first anesthetic drug), independently of the grade of the reaction.

Immunologic exploration

Out of the 86 cases, 74 benefited from the Allergology-Anesthesiology visit (9 patients were lost to follow-up and 3 died). Among these 74 patients, 43 (58%) had a positive skin test: 38 (88%) to one or several NMBA, 3 (7%) to beta-lactams, one (2.5%) to plasmion and one (2.5%) to hypnovel. Among the NMBA-positive-ST patients, 15 (39%) displayed a positive QAM-specific IgE. The overall median histamine and tryptase concentration were 54 [10;100] nmol/L and 16.2 [5;38] µg/L, respectively. According to the criteria mentioned above, 55 (64%) patients had a positive tryptase and 49 (57%) a positive histamine (notably, histamine could not be measured in 5 (6%) patients because of a hemolysed blood sample), with only 3 (3%) patients positive for histamine only. Among all case patients with a skin test results, only 18 had neither a positive skin test nor a positive tryptase or histamine or specific IgE.

Values of hemodynamic variables during hypersensitivity allergic reaction

Although occurrence of clinical signs was available for all patients, only two third of the numerical values of the hemodynamic variables of the AHR were recorded. The occurrence of clinical signs was significantly different among the 4 severity grades groups, mainly with hypotension, hypocapnia and hypoxemia being significantly more frequent in severe AHR as

compared to lower severity grades (Table 2). When analyzing the numerical values, the minimum value of SAP and etCO₂ were significantly different between mild and severe AHR, with the major difference concerning etCO₂ (Figure 1). When analyzing these values with a Dunn post-hoc test, only a low etCO₂ was able to distinguish a grade 2 from a grade 3 (p=0.04) and a grade 4 (p=0.005).

Three patients died between day 1 and day 5 after anesthesia (the patients that died on day 5 had been scheduled for cardiac surgery and benefited from an extracorporeal life support as soon as the severe AHR was considered refractory to conventional therapy) (Table 3).

Therapeutic management

Only one patient with a grade 1 AHR benefited from IV histamine receptors antagonist injection. Thirteen patients, that all presented bronchospasm, received beta-2 adrenergic-agonists mainly by inhalation (only one had an IV injection). None of the other 15 patients with bronchospasm benefited from any specific treatment. Twenty (23%) patients received an IV injection of glucocorticoids, 40% of which presented a grade 2 and 45% a grade 3 AHR (Table 2).

Hemodynamic management was heterogeneous: 23 (27%) patients did not receive any vasoconstrictors during the reaction; seven of them suffered from a grade 1 and 16 a grade 2 reaction. The 19 (22%) patients that received only ephedrine and/or phenylephrine suffered from a grade 2 AHR. (Table 2)

Epinephrine was administrated in 35 (41%) patients; all but one presented a severe AHR. When considering epinephrine, the injection was preceded for 19 (54%) patients by ephedrine and/or phenylephrine injection. For only 13 (37%) patients, epinephrine was administrated as the first line treatment, and it was associated with norepinephrine for 3 (9%) patients. The sequences of injection of vasoconstrictors were significantly different among the severity grades groups (p<0.0001). Although there was a tendency for a grade 4 reaction to receive

epinephrine as the first line treatment and for a grade 3 as the second line, vasoconstrictors therapy administration was not statistically different between grade 3 and 4 groups (data not shown).

Fluid resuscitation, whatever volume expansion solution considered, was more frequent with severe reactions (Table 2). Although the use of crystalloids and colloids was significantly different among all the severity grades groups, the median volume transfused did not differ.

Discussion

The incidence of intra-anesthetic AHR is estimated between 1/6,000-1/20,000 procedures.²⁷ Translated to individual practice, when performing 1,500 anesthetic procedures a year, an anesthesiologist has a probability of seeing a case of AHR in his/her practice every 4-15 years. Acquisition and preservation of clinical skills for such rare events are challenging. The major differences in incidence between differential diagnoses (e.g. severe arterial hypotension from other causes) and AHR may explain the delayed diagnosis/treatment of AHR during anesthesia. The pathogenesis of AHR may rely on two distinct (although possibly interacting) mechanisms: IgE-dependent and IgE-independent. To explore a potential IgE-independent mechanism in humans (one has been described in mice involving IgG and neutrophils^{28,29}), a multicenter cohort study was performed. The NASA study focused on AHR presumably caused by NMBA (which is the culprit agent in 60% of the intra-anesthetic AHR cases^{30,31}). Among the cases included, 62% were female patients with a median age of 57, which is in accordance with previous epidemiologic studies.³¹ The clinical results of the NASA study demonstrate that patients with severe AHR have a much lower etCO₂ value immediately following the insertion of the intra-tracheal tube than patients with mild AHR. It is difficult to estimate in real time the severity of the AHR. A low etCO₂ value could allow earlier diagnosis of both the AHR and its severity and thus contribute to earlier injection of epinephrine titrated doses as recommended.

In this study, 86% of the patients presented hemodynamic signs during the AHR. The severity of AHR determined the frequency of arterial hypotension, hypoxemia and hypocapnia. When considering a mild to a severe AHR, only the minimum value of SAP and etCO₂ were significantly different (Figure 1). SAP is most of the time only available discontinuously in the OR and SpO₂ may be lacking in the acute phase of shock when peripheral vasoconstriction leads to a non-interpretable or absent photoplethysmographic signal. Moreover, there is a

large overlap of the IQR values for minimum SAP and SpO₂ values, making these parameters less pertinent for decision-making for individual patients (Figure 1). In contrast, etCO₂ was indeed decreased in severe (18[12;23]) versus mild AHR (26[24;29]), without major overlap. It is important to note that for the patients presenting with bradycardia (only 14/86 patients), differences in values between mild and severe AHR could be observed. However, these did not reach statistical significance probably due to the low occurrence of this sign. Nevertheless one may consider that HR values lower than 50 could be an additional sign of severe AHR.

A sudden drop of etCO₂, without any changes in ventilation parameters or cell metabolism, is related to a drop of cardiac output (CO), as shown in animal models as well as in human studies with a linear correlation between the two parameters during acute hemodynamic changes.^{32,33} The drop of etCO₂ may even precede arterial hypotension.³⁴ In a pig model, etCO₂ was a reliable marker of CO in circulatory shock, i.e. hemorrhagic, septic and cardiogenic shock. When CO was under 80% of the value baseline, the relation between etCO₂ and cardiac index was linear.³⁵ Although arterial hypotension secondary to AHR was associated with a proportional decrease in CO^{36,37}, nicardipine-induced arterial hypotension of similar amplitude and chronology was associated with preserved CO.³⁸ In ovalbumin sensitized rats, anaphylaxis was characterized by rapid metabolic modifications leading to anaerobic glycolysis, participating to the low amount of CO₂ released in the circulation and to complete failure of cellular energy.³⁸ In the majority of arterial hypotension episodes occurring during anesthesia, there is anesthetic drug overdose³⁹⁻⁴¹, preserved/moderately decreased CO and therefore normal etCO₂.

Our results could be considered as trivial as both low CO and low etCO₂ are expected in a shock state that develops within minutes. However, we believe they are of major importance. Indeed, the severity of AHR is often assessed *a posteriori* mainly by the occurrence of severe hemodynamic changes and requirement for epinephrine. This is probably the main reason why here and in many publications, there is delayed injection of epinephrine. In the OR, a

sudden and massive drop of etCO_2 , with a value below 20mmHg, could be the sign that would allow clinicians to estimate in real time the severity of AHR and thus facilitate the use of titrated epinephrine doses.⁴²

The importance of early diagnosis of severe grade of AHR is related to issues of therapeutic interventions. There is weak evidence for all therapeutic measures recommended to treat AHR (epinephrine^{43,44}, histamine receptors antagonists, glucocorticoids) (see for a review⁴³). Epinephrine acts through the activation of both α and β adrenergic receptors, leading to vasoconstriction and positive inotropic and chronotropic effects, allowing restoration of cardiovascular homeostasis. The beneficial effects of very early (minutes following the onset of clinical signs) epinephrine injection could be explained by the results of an *in vitro* study in a human vascular smooth muscle cell model: epinephrine given before (15 and 7.5 minutes) allergen exposure but not later was associated with inhibition of platelet activating factor-induced prostaglandin E2 release, which are major mediators of anaphylaxis.⁴⁵ Among fatal cases of anaphylaxis in the United Kingdom, although epinephrine was administered in 62% of the fatal cases, only 14%⁴⁶ or 19%⁴⁷ received it before cardiac arrest. In several series of severe anaphylactic shock in young patients, 60%¹⁰ or 87%^{48,49} of the fatal cases received no or delayed epinephrine. The authors concluded that “the failure to recognize the severity of these reactions and to administer epinephrine promptly increases the risk of a fatal outcome”.¹⁰ Thus, epinephrine should be promptly administered IV, with a dose adapted to the grade of the reaction, by bolus or continuous infusion.^{4,19,20,43,50-52} There are possible contraindications of epinephrine infusion to patients with heart disease but even in these patients, and even more so in patients without cardiovascular diseases, the benefits of epinephrine infusion are much higher than associated risks (although they clearly exist) during severe AHR, as long as the principle of titrated doses is respected.^{53,54}

In our study, the first signs of AHR appeared in a median delay of five minutes following onset of anesthesia induction, with no delay in the onset of treatment. However, despite all the

recommendations, epinephrine was administrated as the first line therapy in only 50% of cases. This underlines the major uncertainty of clinicians and the ability to evaluate the severity. Thus, monitoring of etCO_2 could be a major tool to guide clinician in their practice.

Aggressive volume expansion is a key-point in the management of severe AHR. In an ovalbumin-sensitized rat model, capillary leakage started within two minutes after the onset of anaphylaxis with increasing severity over time.⁵⁵ In a case-report of an anaphylactic shock during cardiac surgery, allowing close hemodynamic evaluation, volume loss induced by capillary leakage represented 73% of the total blood volume within 15 minutes.⁵⁶ During shock, the choice of fluid for fluid resuscitation is debated.⁵⁷ In an ovalbumin-sensitized rat model, although crystalloids and colloids were as effective in terms of hemodynamic restoration, colloids were the only fluid tested able to restore peripheral tissue oxygen saturation.⁵⁸ The authors speculated that rapid hemoconcentration (in the absence of acute diuresis) during the early phase of an AHR, is highly suggestive of the occurrence of vascular leak. Human studies on fluid resuscitation do not focus on perioperative AHR. Thus, national guidelines might differ on the recommendation of the fluid to choose.^{19,59,60} In France, aggressive fluid resuscitation with crystalloids is first recommended until hemodynamic stability, and then followed if necessary by colloids.^{50,51} Here, only 63% of the patients benefited from fluid resuscitation (whatever fluid considered) with a significant difference among groups. Even if severe AHR benefited more often than mild AHR from a volume expansion therapy, the rate of fluid resuscitation is surprisingly low, especially when considering that there was no difference among groups in regard to the volume administrated. Moreover, the volume of colloids was globally half the volume of crystalloids administrated, which is not in accordance with the French guidelines.

Although we cannot draw any firm conclusions from a total of three deceased patients (Table 3), some points deserve to be highlighted. First, they were older than the average cohort. Furthermore, male gender, emergency surgery and beta-blocker treatment have been

described as risk factors for fatal anaphylaxis.^{61,62} All three presented at least one of these factors. Before cardiac arrest, they presented hypocapnia, with a highly decreased etCO₂ and arterial hypotension. Concerning the instituted therapy, two received epinephrine as the second line therapy whereas only one benefited from a volume expansion, although only moderate.

Histamine-receptor antagonists were not provided to any of the 86 NASA patients (except for one), which is in accordance with the absence of evidence-based medicine of such treatment during anaphylactic reactions.⁶³ As it is the case for histamine receptors antagonists, there has been no randomized controlled trials underlying the use of glucocorticoids during anaphylaxis.⁶⁴ These are usually administrated for the prevention of a biphasic response and should not be considered a first-line treatment, in particular when considering that dosing and infusion route are extrapolated from asthma treatment recommendations.⁶⁵ Here, 23% of the 86 patients received glucocorticoids, without significant variation when comparing severity grade groups, in accordance with the guidelines.

Conclusion

The diagnosis and treatment of severe intra-anesthetic AHR represent a challenge because of its low incidence and the perceived (although not well documented) risk of adverse reactions to epinephrine if the AHR is not the true cause of the hemodynamic/ventilator abnormalities. Out of all standard measured parameters during anesthesia, etCO_2 may be solely able to efficiently categorize patients between mild (class 1-2 severity) and severe (class 3-4 severity) AHR. Indeed, when comparing severity groups, HR values proved non-significantly different, MAP and SpO_2 were significantly different but with large overlaps between severity groups that may render them less useful to differentiate mild versus severe shock in real time. A low value of etCO_2 , below 20 mmHg, could be a useful tool to diagnose severe perioperative AHR. It should be part of the clinical reasoning to diagnose severe intra-anesthetic AHR and be a strong argument for early injection of titrated doses of epinephrine, as stipulated by French guidelines, with foreseeable improved outcomes and reduced mortality. This study also underlines the difficulty of maintaining clinical skills for the management of rare events such as severe AHR.

Bibliography

1. Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF, Bock SA, Branum A, Brown SGA, Camargo CA, Cydulka R, Galli SJ, Gidudu J, Gruchalla RS, Harlor AD, Hepner DL, Lewis LM, Lieberman PL, Metcalfe DD, O'Connor R, Muraro A, Rudman A, Schmitt C, Scherrer D, Simons FER, Thomas S, Wood JP, Decker WW: Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: Summary report—Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 391-397
2. Manivannan V, Decker WW, Stead LG, Li JTC, Campbell RL: Visual representation of National Institute of Allergy and Infectious Disease and Food Allergy and Anaphylaxis Network criteria for anaphylaxis. *Int J Emerg Med* 2009; 2: 3-5
3. Simons FER, Arduoso LRF, Bilò MB, Dimov V, Ebisawa M, El-Gamal YM, Ledford DK, Lockey RF, Ring J, Sanchez-Borges M, Senna GE, Sheikh A, Thong BY, Worm M, Organization ftWA: 2012 Update: World Allergy Organization Guidelines for the assessment and management of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12: 389-399
4. Garvey LH, Belhage B, Kroigaard M, Husum B, Malling HJ, Mosbech H: Treatment with epinephrine (adrenaline) in suspected anaphylaxis during anesthesia in Denmark. *Anesthesiology* 2011; 115: 111-6
5. Ring J, Messmer K: Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *The Lancet* 1977; 309: 466-469
6. Bijker MDJilles B, van Klei MDPDWilton A, Kappen MDTeus H, van Wolfswinkel MDPDL, Moons PDKarel GM, Kalkman MDPDCor J: Incidence of Intraoperative Hypotension as a Function of the Chosen DefinitionLiterature Definitions Applied to a Retrospective Cohort Using Automated Data Collection. *Anesthesiology* 2007; 107: 213-220
7. Soetens FM: Anaphylaxis during anaesthesia: diagnosis and treatment. *Acta Anaesthesiol Belg* 2004; 55: 229-37
8. Currie M, Kerridge RK, Bacon AK, Williamson JA: Crisis management during anaesthesia: anaphylaxis and allergy. *Quality and Safety in Health Care* 2005; 14: e19
9. Xu YS, Kastner M, Harada L, Xu A, Salter J, Wasserman S: Anaphylaxis-related deaths in Ontario: a retrospective review of cases from 1986 to 2011. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2014; 10: 1-8
10. Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP: Fatal and Near-Fatal Anaphylactic Reactions to Food in Children and Adolescents. *N Engl J Med* 1992; 327: 380-384
11. Settiple GA: Anaphylactic Deaths in Asthmatic Patients. *Allergy Asthma Proc* 1989; 10: 271-274
12. Fleming JT, Clark S, Camargo Jr CA, Rudders SA: Early Treatment of Food-Induced Anaphylaxis with Epinephrine Is Associated with a Lower Risk of Hospitalization. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015; 3: 57-62
13. Dewachter P, Raëth-Fries I, Jouan-Hureau V, Menu P, Vigneron C, Longrois D, Mertes PM: A Comparison of Epinephrine Only, Arginine Vasopressin Only, and Epinephrine Followed by Arginine Vasopressin on the Survival Rate in a Rat Model of Anaphylactic Shock. *Anesthesiology* 2007; 106: 977-983
14. Currie M, Kerridge R, Bacon A, Williamson J: Crisis management during anaesthesia: anaphylaxis and allergy. *Qual Saf Health Care* 2005; 14: e19-e19
15. Plumb B, Bright P, Gompels MM, Unsworth DJ: Correct recognition and management of anaphylaxis: not much change over a decade. *Postgrad Med J* 2015; 91: 3-7

16. Grabenhenrich L, Hompes S, Gough H, Ruëff F, Scherer K, Pföhler C, Treudler R, Mahler V, Hawranek T, Nemat K, Koehli A, Keil T, Worm M: Implementation of Anaphylaxis Management Guidelines: A Register-Based Study. *PLoS One* 2012; 7: e35778
17. Nassar BS, Schmidt GA: Capnography During Critical Illness. *Chest* 2016; 149: 576-585
18. Longrois D, Lejus C, Constant I, Bruyère M, Mertes PM: Traitement des réactions anaphylactiques survenant en cours d'anesthésie et en particulier du choc anaphylactique. *Ann Fr Anesth Reanim* 2011; 30: 312-322
19. Mertes PM, Malinovsky JM, Jouffroy L, Working Group of the S, Sfa, Aberer W, Terreehorst I, Brockow K, Demoly P, Enda, Allergy EIGoD: Reducing the risk of anaphylaxis during anesthesia: 2011 updated guidelines for clinical practice. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011; 21: 442-53
20. Gouel-Chéron A, Harpan A, Mertes P-M, Longrois D: Management of anaphylactic shock in the operating room. *Presse Med* 2016; 45: 774-783
21. Simons FER, Arduoso LRF, Dimov V, Ebisawa M, El-Gamal YM, Lockey RF, Sanchez-Borges M, Senna GE, Sheikh A, Thong BY, Worm M: World Allergy Organization Anaphylaxis Guidelines: 2013 Update of the Evidence Base. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 162: 193-204
22. Mertes PM, Lambert M, Guéant-Rodriguez RM, Aimone-Gastin I, Mouton-Faivre C, Moneret-Vautrin DA, Guéant JL, Malinovsky JM, Demoly P: Perioperative Anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009; 29: 429-451
23. Laroche D, Chollet-Martin S, Leturgie P, Malzac L, Vergnaud MC, Neukirch C, Venemalm L, Gueant JL, Roland PN: Evaluation of a new routine diagnostic test for immunoglobulin e sensitization to neuromuscular blocking agents. *Anesthesiology* 2011; 114: 91-7
24. Sprung J, Weingarten TN, Schwartz LB: Presence or Absence of Elevated Acute Total Serum Tryptase by Itself Is Not a Definitive Marker for an Allergic Reaction. *Anesthesiology* 2015; 122: 713-714
25. Valent P, Akin C, Arock M, Brockow K, Butterfield JH, Carter MC, Castells M, Escibano L, Hartmann K, Lieberman P, Nedoszytko B, Orfao A, Schwartz LB, Sotlar K, Sperr WR, Triggiani M, Valenta R, Horny HP, Metcalfe DD: Definitions, Criteria and Global Classification of Mast Cell Disorders with Special Reference to Mast Cell Activation Syndromes: A Consensus Proposal. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 157: 215-225
26. Simons FER, Ebisawa M, Sanchez-Borges M, Thong BY, Worm M, Tanno LK, Lockey RF, El-Gamal YM, Brown SGA, Park H-S, Sheikh A: 2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines. *World Allergy Organ J* 2015; 8: 32
27. Mertes PM, Alla F, Tréchet P, Auroy Y, Jouglé E: Anaphylaxis during anesthesia in France: An 8-year national survey. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 366-373
28. Jonsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, Van Rooijen N, Shimizu T, Daeron M, Bruhns P: Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest* 2011; 121: 1484-96
29. Jönsson F, Mancardi DA, Zhao W, Kita Y, Iannascoli B, Khun H, van Rooijen N, Shimizu T, Schwartz LB, Daëron M, Bruhns P: Human FcγRIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood* 2012; 119: 2533-2544
30. Dong SW, Mertes PM, Petitpain N, Hasdenteufel F, Malinovsky JM, Gerap: Hypersensitivity reactions during anesthesia. Results from the ninth French survey (2005-2007). *Minerva Anesthesiol* 2012; 78: 868-78
31. Mertes PM, Laxenaire M-C, Alla F, Peranesthésiques GdEdRA: Anaphylactic and Anaphylactoid Reactions Occurring during Anesthesia in France in 1999-2000. *Anesthesiology* 2003; 99: 536-545
32. Shibutani K, Muraoka M, Shirasaki S, Kubal K, Sanchala VT, Gupte P: Do Changes in End-Tidal Pco2 Quantitatively Reflect Changes in Cardiac Output? *Anesth Analg* 1994; 79: 829-833

33. Isserles SA, Breen PH: Can Changes in End-Tidal Pco₂ Measure Changes in Cardiac Output? *Anesth Analg* 1991; 73: 808-814
34. Falk JL, Rackow EC, Weil MH: End-Tidal Carbon Dioxide Concentration during Cardiopulmonary Resuscitation. *N Engl J Med* 1988; 318: 607-611
35. Jin X, Weil MH, Tang W, Povoas H, Pernat A, Xie J, Bisera J: End-tidal carbon dioxide as a noninvasive indicator of cardiac index during circulatory shock. *Crit Care Med* 2000; 28: 2415-2419
36. Zheng F, Barthel G, Collange O, Montémont C, Thornton SN, Longrois D, Levy B, Audibert G, Malinovsky J-M, Mertes P-M: Methylene Blue and Epinephrine: A Synergetic Association for Anaphylactic Shock Treatment. *Crit Care Med* 2013; 41: 195-204
37. Davidson J, Zheng F, Tajima K, Barthel G, Alb I, Tabarna A, Thornton SN, Lambert M, Longrois D, Audibert G, Malinovsky J-M, Mertes P-M: Anaphylactic Shock Decreases Cerebral Blood Flow More Than What Would Be Expected From Severe Arterial Hypotension. *Shock* 2012; 38: 429-435
38. Dewachter P, Jouan-Hureau V, Franck P, Menu P, de Talancé N, Zannad F, Laxenaire M-C, Longrois D, Mertes PM: Anaphylactic Shock: A Form of Distributive Shock without Inhibition of Oxygen Consumption. *Anesthesiology* 2005; 103: 40-49
39. Sessler DI, Sigl JC, Kelley SD, Chamoun NG, Manberg PJ, Saager L, Kurz A, Greenwald S: Hospital Stay and Mortality Are Increased in Patients Having a "Triple Low" of Low Blood Pressure, Low Bispectral Index, and Low Minimum Alveolar Concentration of Volatile Anesthesia. *Anesthesiology* 2012; 116: 1195-1203
40. Willingham MD, Karren E, Shanks AM, O'Connor MF, Jacobsohn E, Kheterpal S, Avidan MS: Concurrence of Intraoperative Hypotension, Low Minimum Alveolar Concentration, and Low Bispectral Index Is Associated with Postoperative Death. *Anesthesiology* 2015; 123: 775-785
41. Kertai MD, White WD, Gan TJ: Cumulative Duration of "Triple Low" State of Low Blood Pressure, Low Bispectral Index, and Low Minimum Alveolar Concentration of Volatile Anesthesia Is Not Associated with Increased Mortality. *Anesthesiology* 2014; 121: 18-28
42. Mertes PM, Laxenaire MC, Lienhart A, Aberer W, Ring J, Pichler WJ, Demoly P, Working Group for the S, Enda, Hypersensitivity EIGoD: Reducing the risk of anaphylaxis during anaesthesia: guidelines for clinical practice. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2005; 15: 91-101
43. Dhami S, Panesar SS, Roberts G, Muraro A, Worm M, Bilò MB, Cardona V, Dubois AEJ, DunnGalvin A, Eigenmann P, Fernandez-Rivas M, Halken S, Lack G, Niggemann B, Rueff F, Santos AF, Vlieg-Boerstra B, Zolkipli ZQ, Sheikh A, the EFA, Anaphylaxis Guidelines G: Management of anaphylaxis: a systematic review. *Allergy* 2014; 69: 168-175
44. Sheikh A, Shehata YA, Brown SGA, Simons FER: Adrenaline for the treatment of anaphylaxis: cochrane systematic review. *Allergy* 2009; 64: 204-212
45. Vadas P, Perelman B: Effect of epinephrine on platelet-activating factor-stimulated human vascular smooth muscle cells. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1329-1333
46. Pumphrey: Lessons for management of anaphylaxis from a study of fatal reactions. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1144-1150
47. Pumphrey RSH, Gowland MH: Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom, 1999-2006. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1018-1019
48. Bock SA, Muñoz-Furlong A, Sampson HA: Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 191-193
49. Bock SA, Muñoz-Furlong A, Sampson HA: Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1016-1018
50. SFAR, SFA: Reducing the risk of anaphylaxis during anaesthesia. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 2011; 30: 212-222

51. Lavonas EJ, Drennan IR, Gabrielli A, Heffner AC, Hoyte CO, Orkin AM, Sawyer KN, Donnino MW: Part 10: Special Circumstances of Resuscitation: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2015; 132: S501-S518
52. Kroigaard M, Garvey LH, Gillberg L, Johansson SG, Mosbech H, Florvaag E, Harboe T, Eriksson LI, Dahlgren G, Seeman-Lodding H, Takala R, Wattwil M, Hirlekar G, Dahlen B, Guttormsen AB: Scandinavian Clinical Practice Guidelines on the diagnosis, management and follow-up of anaphylaxis during anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2007; 51: 655-70
53. McLean-Tooke AP, Bethune CA, Fay AC, Spickett GP: Adrenaline in the treatment of anaphylaxis: what is the evidence? *BMJ* 2003; 327: 1332-5
54. Hepner DL, Castells M, Mouton-Faivre C, Dewachter P: Anaphylaxis in the clinical setting of obstetric anesthesia: a literature review. *Anesth Analg* 2013; 117: 1357-67
55. Faye MDN, Fournier MDPDL, Balvay PDD, Thiam MSR, Orliaguet MDPDG, Clément MDPDO, Dewachter MDPDP: Macromolecular Capillary Leakage Is Involved in the Onset of Anaphylactic Hypotension. *Anesthesiology* 2012; 117: 1072-1079
56. Clarke R, Sadleir P, Van Niekerk AW, Platt P: Quantification of volume loss and haemodynamic changes of Gelofusine-induced anaphylaxis during cardiopulmonary bypass. *Anaesth Intensive Care* 2011; 39: 492-5
57. Perel P, Roberts I, Ker K: Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 28: CD000567
58. Tajima K, Zheng F, Collange O, Barthel G, Thornton SN, Longrois D, Levy B, Audibert G, Malinovsky JM, Mertes PM: 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. *Anaesth Intensive Care* 2013; 41: 765-73
59. Harper NJN, Dixon T, Dugué P, Edgar DM, Fay A, Gooi HC, Herriot R, Hopkins P, Hunter JM, Mirakian R, Pumphrey RSH, Seneviratne SL, Walls AF, Williams P, Wildsmith JA, Wood P, Nasser AS, Powell RK, Mirakhur R, Soar J, Executive Officers A, Party MotW: Suspected Anaphylactic Reactions Associated with Anaesthesia. *Anaesthesia* 2009; 64: 199-211
60. Kroigaard M, Garvey LH, Gillberg L, Johansson SGO, Mosbech H, Florvaag E, Harboe T, Eriksson LI, Dahlgren G, Seeman-Lodding H, Takala R, Wattwil M, Hirlekar G, Dahlén B, Guttormsen AB: Scandinavian Clinical Practice Guidelines on the diagnosis, management and follow-up of anaphylaxis during anaesthesia*. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2007; 51: 655-670
61. Reitter M, Petitpain N, Latache C, Cottin J, Massy N, Demoly P, Gillet P, Mertes PM, the French Network of Regional Pharmacovigilance C: Fatal anaphylaxis with neuromuscular blocking agents: a risk factor and management analysis. *Allergy* 2014; 69: 954-959
62. Lee S, Hess EP, Nestler DM, Bellamkonda Athmaram VR, Bellolio MF, Decker WW, Li JT, Hagan JB, Manivannan V, Vukov SC, Campbell RL: Antihypertensive medication use is associated with increased organ system involvement and hospitalization in emergency department patients with anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 1103-8
63. Nurmatov UB, Rhatigan E, Simons FER, Sheikh A: H2-antihistamines for the treatment of anaphylaxis with and without shock: a systematic review. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014; 112: 126-131
64. Choo KJL, Simons FER, Sheikh A: Glucocorticoids for the treatment of anaphylaxis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 18: CD007596.
65. Simons FER, Arduso LRF, Bilò MB, El-Gamal YM, Ledford DK, Ring J, Sanchez-Borges M, Senna GE, Sheikh A, Thong BY: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines: Summary. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 587-593.e22

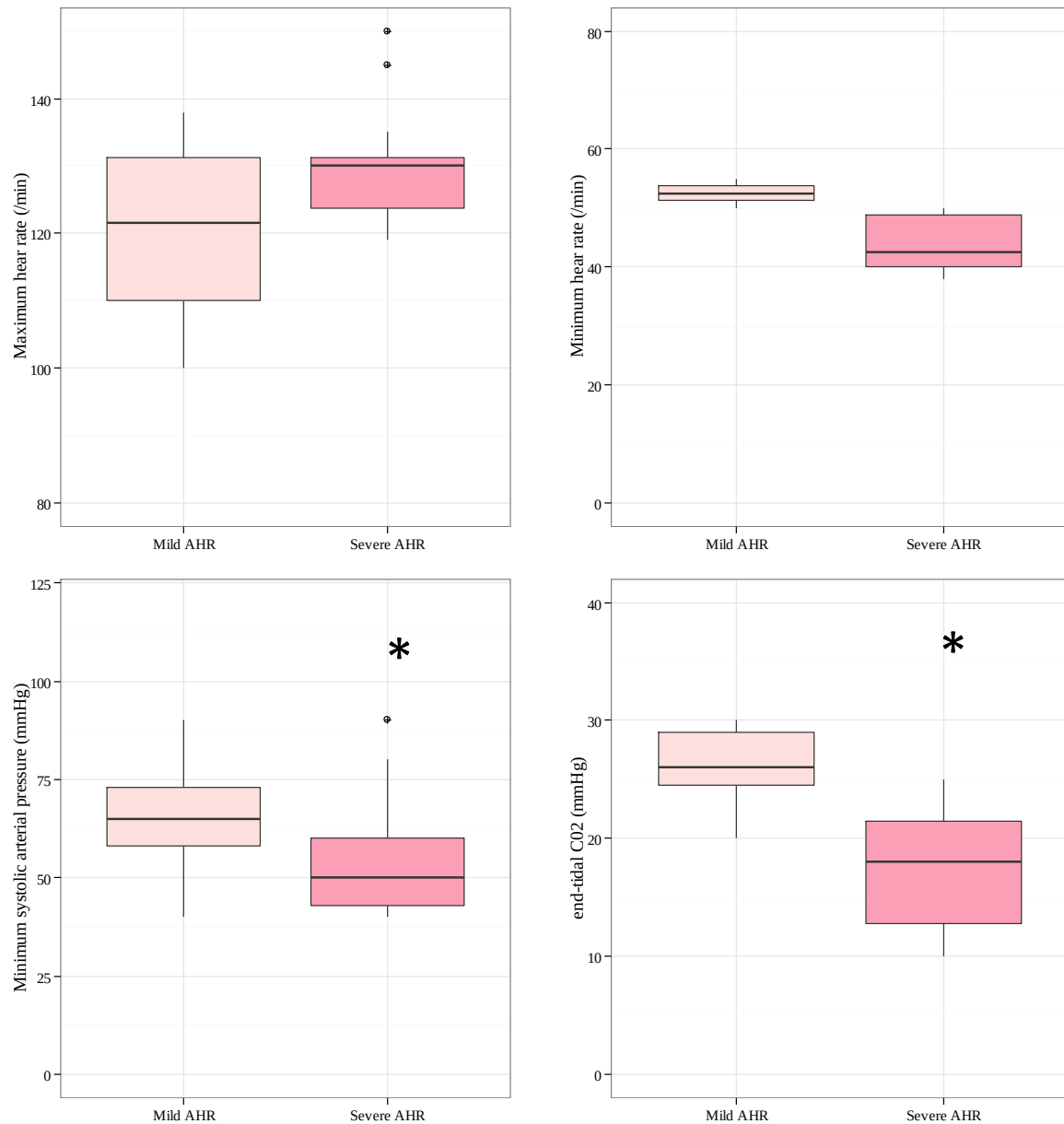


Figure 1: Clinical parameters comparing mild allergic hypersensitivity reaction (AHR) to severe AHR. Boxplot representations of heart rate, systolic arterial pressure and end-tidal CO₂. Only statistical differences are indicated (*:p<0.05; Mann & Whitney U test). Of note, analyses could not be performed for minimum peripheral oxygen saturation, as only two data points were available in the « mild AHR » group. Although there was a statistical difference between groups for minimum systolic arterial pressure values (p=0.01), only etCO₂ was able to distinguish between mild and severe groups (p=0.002) with a very low overlap.

Table1. Patients and surgery characteristics

Variable	Patients (n=86)
Female gender	62%
Age (years)	57 [40;66]
Previous general anaesthesia	84%
Medication (ACEI/ARA/BB/CI)	22%
History of allergy	
Drugs	13%
Latex	2%
Food	7%
Hymenoptera venom	3%
Pollen/Moth/Animals/Mold	15%
Asthma	12%
Atopy	21%
Type of surgery	
Cardio-thoracic, vascular	20%
Maxillo-facial	8%
Orthopedic Neurosurgery	20%
Visceral, Urologic, Gynecologic	52%
Scheduled surgery	92%
Surgery with a context of infection	2.3%
NMBA used during surgery	
Succinylcholine	42%
Atracurium	41%
Rocuronium	3.5%

Values are expressed as percentages or as median [25th-75th percentile].

ACEI: Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitor. ARA: Angiotensin II Receptor Antagonist. BB: Beta-blocker. CI: Calcium channel inhibitor. NMBA: Neuro-muscular Blocking Agent.

Table 2. Clinical signs (and numeric values) during allergic hypersensitivity reaction according to the severity and therapeutics used during the reaction.

Clinical/Hemodynamic signs	Cases (n=86)	Grade 1 (n=7)	Grade 2 (n=36)	Grade 3 (n=33)	Grade 4 (n=10)	P
Erythema	72%	100%	75%	70%	50%	0.16 *
Tachycardia	51%	14%	50%	70%	20%	0.006 *
Maximum HR, /min (43/17)	130(119;136)		130(115;137)	130(124;131)	170(170;170)	0.20 #
Bradycardia	16%	0%	8%	21%	40%	0.06 *
Minimum HR, /min (14/6)	47(40;50)		52(51;54)	40(39;45)	45(42;48)	0.28 #
Arrhythmia	13%	0%	3%	15%	50%	0.002 *
Hypotension	81%	0%	75%	100%	100%	< 0.0001*
Minimum SAP value, mmHg (70/21)	58(48;65)		65(58;73)	50(48;60) ◇	45(40;73)	0.03 #
Bronchospasm	32%	0%	33%	30%	60%	0.07 *
Hypoxemia	28%	0%	8%	48%	50%	0.0001 *
Minimum SpO ₂ value, % (24/9)	85(82;89)		91(90;92)	87(82;89)	76(70;82)●	0.04 #
Hypocapnia	38%	0%	17%	57%	80%	< 0.0001*
Minimum etCO ₂ , mmHg (33/7)	20(14;25)		26(24;29)	19(17;24) ◇	11(10;18)●	0.01 #
Cardiac arrest	12%	0%	0%	0%	100%	< 0.0001*
Delay between anaesthesia induction and first signs of the reaction (min)	5[5;10]	5[2;5]	10[5;10]	5[5;15]	5[3.5;17]	0.34 #
Delay between first signs of the reaction and treatment initiation (min)	0[0;2]	0[0;2]	0[0;0]	1[0;2]	1[0;4]	0.06 #
Therapeutic interventions						
Epinephrine IV alone	17%	0%	0%	30%	50%	< 0.0001*
Cumulative doses of epinephrine (mg)	2.5[0.95;6]	NA	NA	1.3[0.5;2]	8[3;11]	0.04 #
Norepinephrine IV alone	2%	0%	0%	6%	0%	0.5 *
Cumulative doses of norepinephrine IV (mg)	1.7[1.6;1.8]	NA	NA	1.7[1.6;1.9]	NA	NA
Epinephrine IV and Norepinephrine IV	6%	0%	0%	12%	10%	0.13 *
Cumulative doses of epinephrine IV (mg)	5[2;5]	NA	NA	3.7[1.5;16]	5[5;5]	1 #
Ephedrine and/or phenylephrine IV alone	22%	0%	53%	0%	0%	< 0.0001*
Ephedrine and/or phenylephrine IV, then epinephrine and/or norepinephrine IV	26%	0%	3%	51%	40%	< 0.0001*
Cumulative doses of epinephrine IV (mg)	0.5[0.3;3]	NA	0.1[0.1;0]	0.45[0.3;1]	10.6[1;27]	0.14 #
Atropine IV	8%	0%	5%	9%	20%	0.42 *
Cumulative doses of atropine IV (mg)	1[1;1]	NA	1[1;1]	1[1;1]	NA	NA
Beta2-adrenergic agonist IV/inhaled	13%	0%	14%	12%	20%	0.78 *
Glucocorticoids	23%	28%	22%	27%	20%	0.72 *
Histamine receptor antagonists	1%	14%	0%	0%	0%	0.08 *
Fluid resuscitation with crystalloids	55%	14%	47%	70%	70%	0.02 *
Cumulative volume of crystalloids (l)	1[0.725;1.75]	2[2;2]	0.75[0.5;1]	1.5[1;2]	1[1;1.375]	0.05 #
Fluid resuscitation with colloids	22%	0%	11%	42%	10%	0.006 *
Cumulative volume of colloids (m)	0.5[0.5;1]	NA	650[500;850]	500[500;1000]	500[500;500]	0.7 #
Evolution						
Surgery cancelled	16%	0%	14%	24%	10%	0.45 *
Admission to ICU	16%	28%	14%	15%	20%	0.7 *

Values are expressed as percentages or as median [25th-75th percentile] when appropriate. In column 1, within the brackets are expressed the number of observations / the number of missing values.

Analyses were performed with a post-hoc Dunn test with Bonferroni correction. ◇ represented a significant difference between grade 2 and grade 3. ● represented a difference between grade 3 and grade 4.

etCO₂: end-tidal CO₂. HR: Heart Rate. ICU: Intensive Care Unit. IV: Intravenous. SAP: Systolic arterial Pressure. SpO₂: Photoplethysmographic oxygen saturation.

Kruskal Wallis test. * Exact Fisher test.

Table 3. Demographic and shock characteristics of the three fatal cases.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Gender	Female	Male	Female
Age (years)	90	76	67
Urgent surgery	No	No	Yes
Beta-blocker treatment	Yes	No	Yes
Clinical signs			
Erythema	No	Yes	No
Tachycardia	No	No	No
Bradycardia	No	No	No
Arrhythmia	No	Yes	No
Arterial hypotension	Yes	Yes	Yes
Bronchospasm	No	No	Yes
Hypoxia	No	Yes	Yes
Hypocapnia	Yes	Yes	Yes
Minimal value of etCO ₂ (mmHg)	15	10	10
Delay between anaesthesia induction and first signs of the reaction (min)	20	3	10
Delay between first signs of the reaction and treatment initiation (min)	0	0	0
Therapeutic interventions			
Epinephrine IV alone	Yes	No	No
Cumulative doses of epinephrine IV	8mg	NA	NA
Ephedrine and/or phenylephrine IV, then epinephrine IV	No	Yes	Yes
Cumulative doses of epinephrine IV	NA	20mg	1.3mg
Beta2 agonist IV	No	No	No
Glucocorticoids IV	No	No	No
Volume expansion	No	No	Yes
Delay between shock and death (day post shock)	1 day	4 days	2 days

Patient 3 received 1000ml of crystalloids plus 500ml of colloid. IV: Intravenous. etCO₂: end tidal CO₂.
 NA: Non Applicable.

SYNTHESE DES CONJUGUES PROTEINE-CURARE POUR L'ANALYSE DES IGG ANTI-AQ PAR ELISA

La première étape de mon projet de thèse avait comme objectif la recherche d'IgG circulantes anti-AQ des patients de l'étude NASA. Pour y parvenir, nous avons choisi d'utiliser la méthode ELISA (« Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay »), pour sa sensibilité, sa reproductibilité et sa faisabilité.

Lors des RHA peropératoires aux curares, les trois molécules les plus impliquées sont : succinylcholine (33.4%), rocuronium (29.3%) et atracurium (19.3%) (Figure 1).[78] Ces trois curares sont les plus fréquemment utilisés en pratique anesthésique et correspondent à ceux qui ont été administrés aux patients de l'étude NASA. Il n'existe pas de tests ELISA commerciaux permettant la détection d'anticorps anti-curares. Nous avons développé un ELISA direct reposant sur deux familles de nouveaux conjugués protéine-curare, molécules clés dans différentes étapes du test:

- a. Des dérivés de curare antigéniques destinés à être adsorbés au fond des plaques ELISA pour l'étude de leur reconnaissance par les sera de patients.

Des premiers tests ne nous ont pas permis d'adsorber directement les curares sur les plastiques de plaques dites « ELISA » (MaxiSorp, Fisher Scientific®), même si plusieurs conditions ont été testées : plaques aux propriétés d'adsorption différentes (PolySorp, Fisher Scientific®) ou adsorption intermédiaire avec une protéine à pH acide. Il a donc été nécessaire de préparer des dérivés de curares capables de former des dépôts stables dans les plaques ELISA. Pour cette application, nous avons choisi de coupler les curares à de la BSA ou de l'HSA (Bovine / Human Serum Albumin).

- b. Des dérivés de curare immunogéniques destinés à obtenir un sérum polyclonal murin comme contrôle positif.

En effet, des contrôles positifs pour nos expériences sont essentiels d'une part pour valider le test de détection, d'autre part pour l'utiliser en tant que référence interne sur chaque plaque ou set de plaques utilisés un jour particulier. A cette fin, nous avons choisi d'immuniser des souris contre un curare pour obtenir du sérum murin polyclonal contenant des IgG réactives contre ce même curare, alors même que les curares ne sont pas directement immunogènes [78]. Afin de pallier l'absence d'immunogénicité des curares, nous avons couplé ces molécules à une protéine porteuse largement utilisée pour des applications vaccinales, la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin).

Chaque curare possède, à pH physiologique, deux groupements AQ, qui constituent (théoriquement) leurs épitopes immunogènes communs. Il est admis que ce double groupement AQ est à l'origine non seulement des propriétés effectrices des curares au niveau de la jonction neuro-musculaire mais également de leur potentiel allergique. Pour chaque curare, nous avons conçu l'ensemble des conjugués de façon à conserver l'accessibilité stérique d'au moins l'un des groupements AQ pour leur

interaction avec les anticorps.

La synthèse des différents conjugués a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Sylvie Bay (unité de Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur).

Préambule

Notre unité de recherche a importé des souris transgéniques de l'unité du Pr Michel Cogné (Université de Limoges, France) qui produisent des IgG chimériques souris-homme : ces souris, appelées « gammaprim », possèdent des loci sauvages codant pour les régions variables des immunoglobulines (régions VDJ) et la chaîne légère des immunoglobulines (IgL), mais un locus modifié codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines (IgH). La modification porte sur le remplacement de la région permettant le switch vers les IgM ($S\mu$) par le gène codant la chaîne lourde des IgG1 humaines ($\gamma 1$). Ces souris produisent ainsi des IgG chimériques souris-homme ayant pour région constante (région Fc) la séquence des IgG1 humaines, détectables par les mêmes anticorps secondaires anti-IgG humaine que ceux que nous utilisons pour la révélation des ELISA anti-curares dans l'analyse des sera de patients.

Les résultats ELISA qui vont être présentés ci-dessous ont tous été obtenus par ELISA soustractif en soustrayant au signal obtenu envers le conjugué curare-protéine porteuse le signal obtenu envers la protéine porteuse seule. L'anticorps de révélation est un anti-hIgG couplé à l'HRP (Horseradish peroxidase) à la concentration de 1/20 000.

1 Synthèse des intermédiaires des curaress

1.1 Synthèse du dérivé du rocuronium

Le rocuronium appartient à la famille des stéroïdes qui se caractérise par un squelette carboné de type cyclopentanophénanthrène hydrogéné (Figure 7). Le rocuronium dispose d'un groupement OH réactif en position C3 du cycle A (Figure 1). L'ajout d'anhydride succinique sur le rocuronium, catalysé par la diméthylaminopyridine, a permis de fonctionnaliser ce curare avec un acide carboxylique, par le biais d'un bras espaceur (Figure 8). Cette réaction a été suivie par chromatographie sur couche mince (CCM). La purification par chromatographie sur une colonne de phase inverse C18 (élution des fractions selon leur polarité) a conduit au produit rocuronium-COOH. L'identité et la pureté du produit ont été confirmées par la combinaison de plusieurs techniques d'analyses: CCM, résonance magnétique nucléaire RMN), spectrométrie de masse (l'analyse du spectre RMN a été réalisée par Frederic Bonhomme de l'Unité de Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur [150]). Le rendement de la réaction n'a pas pu être précisément calculé car seule une fraction du composé a été purifiée, permettant de réaliser les couplages ultérieurs. Tel que réalisé, le rendement de la réaction est actuellement de 36% mais peut être optimisé par purification de l'ensemble du composé ainsi qu'en

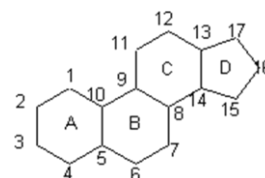


Figure 7 : Squelette commun des stéroïdes.

L'ajout de ce bras fonctionnalisé permet certes de conserver les deux groupements AQ de la molécule princeps, mais il modifie l'environnement du groupement morpholinium en position C2 du cycle A. Ceci peut avoir un impact négatif sur l'efficacité de la reconnaissance par des anticorps [66, 151], élément à prendre en compte pour l'interprétation des résultats ultérieurs. Il faut noter cependant que notre stratégie de synthèse permet de conserver au moins un AQ bien accessible, i.e. le pyrrolidinium en position C16 du cycle D.

1.2 Synthèse du dérivé de la succinylcholine

La succinylcholine ne possède malheureusement aucun groupement réactif permettant le couplage direct aux protéines porteuses. Nous avons tiré avantage de sa symétrie et utilisé une héli-molécule pour aboutir à la succinyl-monocholine, fonctionnalisée avec un acide carboxylique [152].

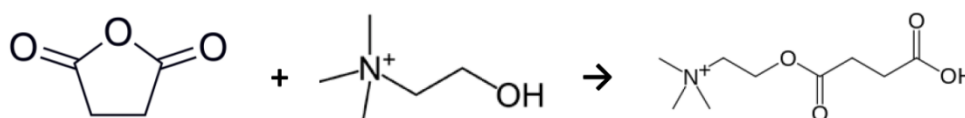


Figure 9 : Synthèse de la succinyl-monocholine : mise en présence d'anhydride succinique et de choline.

Le chauffage de choline en présence d'anhydride succinique à 140°C a conduit au dérivé carboxylé avec un rendement de 93% (Figure 9). Les analyses en spectrométrie de masse et en RMN (Figure 10) confirment la présence de succinyl-monocholine pur.



Figure 10 : Spectre RMN de à la succinyl-monocholine.

2 Couplage protéique

2.1 Généralités

La réaction de couplage entre les curares et les protéines porteuses repose sur l'activation préliminaire du groupement carboxyle des dérivés de curares par un agent de couplage, l'EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide), permettant dans un second temps le couplage lui-même avec les groupements amines de la BSA/HSA ou de la KLH (Figure 11). Un lien amide covalent stable est alors obtenu entre le curare et la protéine. Un agent stabilisant, du sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide), a été utilisé lors de la phase d'activation du groupement carboxyle. Pour permettre les réactions de couplage, les calculs d'équivalent ont été effectués à partir de la protéine porteuse, en prenant en compte la présence de 58 et 59 lysines sur la BSA et l'HSA. Ainsi, une réaction de rocuronium-COOH a 3 équivalents aura pour une molarité X de BSA une molarité de rocuronium-COOH $58 * 3 * X$.

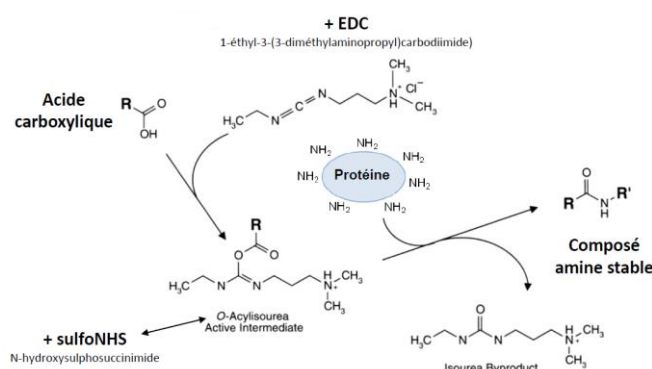


Figure 11 : Schéma de la réaction de couplage amine-ester [153].

2.2 Couplage protéique du rocuronium-COOH

Les premières réactions de synthèse de rocuronium-COOH puis de couplage avec de la BSA et de la KLH ont été réalisées par Caitlin Gillis alors qu'elle était étudiante en thèse dans l'unité. Son premier conjugué a été préparé avec un protocole contenant 11 équivalents de rocuronium-COOH par molécule de BSA (rocuronium(« 11eq »)-BSA). Celui-ci m'a permis de débiter les analyses de présence d'IgG anti-rocuronium dans les sera des patients de l'étude NASA (Figure 12A). Malheureusement, à ce stade, nous n'avons pas pu mesurer le nombre de molécules couplées par protéine porteuse. La réaction réalisée par Caitlin Gillis initialement n'a jamais pu être reproduite à cause de l'apparition d'un précipité massif. Pour minimiser cette précipitation probablement due à une trop forte densité de curare sur la protéine, j'ai diminué le réactif à 1 équivalent de rocuronium-COOH, mais le conjugué obtenu (rocuronium(« 1eq »)-BSA), n'a pas permis de reproduire les résultats précédemment obtenus (Figure 12B).

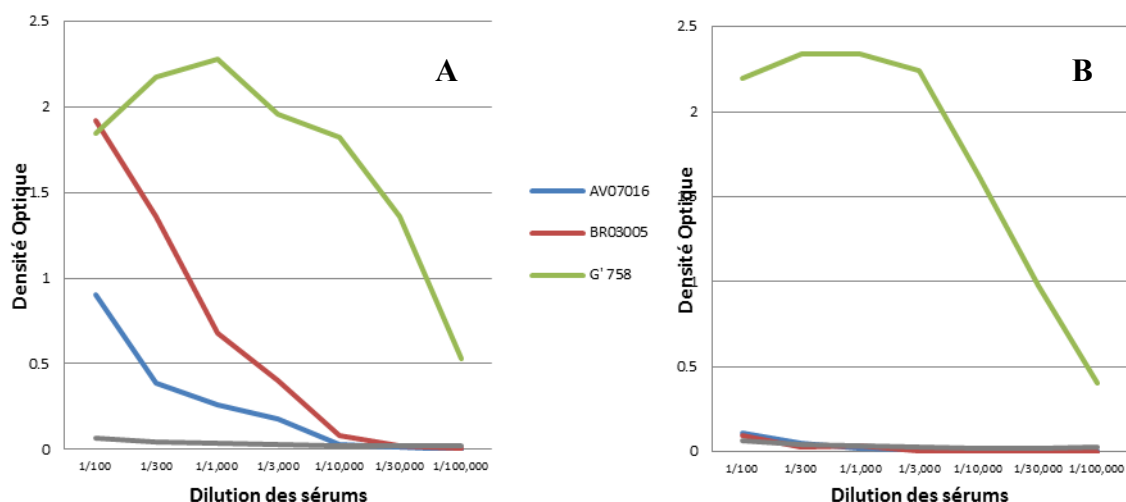


Figure 12 : ELISA IgG humaines anti-rocuronium. (A) Analyses réalisées avec le conjugué rocuronium(« 11eq »)-BSA ; (B) Analyses réalisées avec le conjugué rocuronium(« 1eq »)-BSA. Le contrôle positif (courbe verte) est un sérum de souris gammaprim immunisée par du KLH-rocuronium (produisant des IgG1 humaines anti-Rocuronium). Le contrôle négatif (courbe grise) est un sérum de souris gammaprim non immunisée. Les courbes bleues et rouges représentent les mêmes patients qu'analysés en A.

Les résultats obtenus avec rocuronium(« 11eq »)-BSA (Figure 12A) et rocuronium(« 1eq »)-BSA (Figure 12B) montrent que les concentrations d'anticorps anti-rocuronium présentes dans le sérum des souris gammaprim immunisées sont suffisamment élevées pour que la détection par ELISA soit similaire, quel que soit le niveau de couplage de molécules de curares sur la protéine porteuse. En revanche, les sérums des patients ne reconnaissent pas le rocuronium(« 1eq »)-BSA. La densité de molécules de curare couplées par molécule de BSA semble donc déterminante pour la détection des IgG anti-curare dans le sérum des patients (Tableau 4).

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des différences de protocoles des couplages réalisés.

Conjugué	Tampon de dilution	Contrôle du pH	Précipité (délai d'apparition)	Ratio molaire curare/protéine ^a	Reconnaissance, en ELISA ^b
rocuronium(« 11eq »)-BSA	PBS	Non	Non	Inconnu	Oui
rocuronium(« 1eq »)-BSA	PBS	Non	Non	4	Non
rocuronium(« 1eq »)-HSA	PBS	Non	Non	9.5	Non
rocuronium(« 5eq »)-HSA	PBS	Non	Oui, 15 minutes	Non applicable	Non applicable
rocuronium(« 4eq »)-HSA	MES	Oui	Oui, pendant dialyse	19.2	Oui
rocuronium(« 5eq »)-HSA	MES	Oui	Oui, à 1h30	22.1	Oui

^a Le nombre de curare par protéine porteuse est évalué par MALDI-TOF MS.

^b La capacité des sera de 2 patients sélectionnés à reconnaître les conjugués curare est analysée par ELISA.

Afin d'optimiser le protocole, et de mesurer précisément l'efficacité de couplage, j'ai développé des échanges avec les chercheurs de l'UPR 2301 du CNRS au sein de l'Institut de Chimie des Substances

Naturelles à Gif sur Yvette. Ceux-ci ont effectué des analyses des conjugués curare-protéine par spectrométrie de masse MALDI-TOF (« Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of flight »). Cette technique repose sur un spectromètre de masse avec une source d'ionisation laser assistée par matrice et un analyseur à temps de vol. Les échantillons sont déposés sur une matrice que des tirs lasers pulsés viennent désorber, entraînant une ionisation de l'échantillon par transfert de charge. Soumises à des différences de potentiels, les molécules ionisées sont accélérées puis transférées dans l'analyseur TOF qui va permettre leur séparation en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Les ions de rapport m/z les plus petits arriveront en premier au détecteur, qui enregistrera un signal, sous forme d'un spectre de masse. Cette technique analytique bénéficie d'une meilleure résolution qu'une analyse par spectrométrie de masse seule. La technique la plus sensible pour mesure de masse résolutive est l'electrospray. Malheureusement, les essais avec cette technique ont été infructueux sur nos couplages à cause de l'hétérogénéité des échantillons. Le conjugué Rocuronium(« 1eq »)-BSA (Figure 12B) a permis en fait le couplage de quatre molécules de rocuronium-COOH par molécules de BSA (Figure 13). Ce taux est relativement faible car la BSA contient 59 sites NH_2 de couplages potentiels.

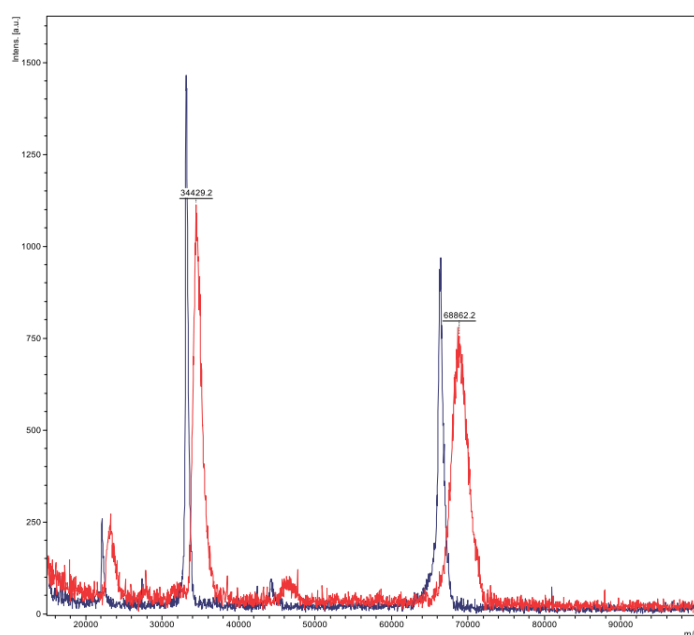


Figure 13 : Spectres MALDI-TOF de la BSA (ligne bleue) et du conjugué rocuronium(«1eq»)-BSA (ligne rouge). Le delta de masse correspond à 4 molécules de rocuronium-COOH par molécule de BSA.

Bien qu'il s'agisse d'une réaction chimique assez classique, le couplage du rocuronium-COOH était confronté à l'apparition d'un précipité blanc assez dense, et ce de façon plus ou moins rapide (Tableau 4). Comme attendu, plus le nombre d'équivalents de rocuronium-COOH par rapport à la protéine porteuse était élevé (dans un objectif d'augmenter la quantité de rocuronium fixée par molécule de protéine), plus le précipité était dense et apparaissait rapidement. Ainsi, la réaction réalisée avec cinq équivalents de rocuronium-COOH entraînait un précipité massif et quasi-total dès la mise en présence des réactifs. L'hypothèse est que, dans ces conditions de réaction, l'adjonction d'une quantité supérieure à un équivalent de rocuronium-COOH à la BSA entraînait une déstabilisation du conjugué,

corrélée en quantité et en vitesse à la concentration de rocuronium-COOH.

L'objectif à ce stade était donc d'obtenir le meilleur compromis pour la densité du rocuronium au sein du conjugué : suffisamment importante pour son antigénicité mais pas trop élevée de façon à garantir sa stabilité. Dans ce but, j'ai d'une part changé la molécule porteuse en travaillant sur l'HSA. D'autre part, j'ai optimisé les conditions de couplage. En effet, même si la BSA et l'HSA sont deux molécules qui possèdent 76% d'homologie de séquence, certaines de leurs caractéristiques diffèrent [154]. Lorsqu'elle est activée, la BSA présente plus d'auto-agrégation que l'HSA [155]. Différentes études spectroscopiques ont également montré que la liaison de petites molécules est responsable de forces intra-moléculaires pouvant entraîner des changements conformationnels de la protéine [154]. L'HSA contient 58 sites NH_2 . Le même protocole à un équivalent de rocuronium-COOH a néanmoins permis de coupler 9.5 molécules de rocuronium-COOH par molécule d'HSA (rocuronium(« 1eq »)-HSA) (Figure 14), soit deux fois plus que sur la BSA en utilisant le même protocole, et sans engendrer de précipités. A cinq équivalents, bien que le précipité apparaisse de façon légèrement différée (15 minutes), il entraîne la majorité de la protéine, avec une protéine indosable (Tableau 4).

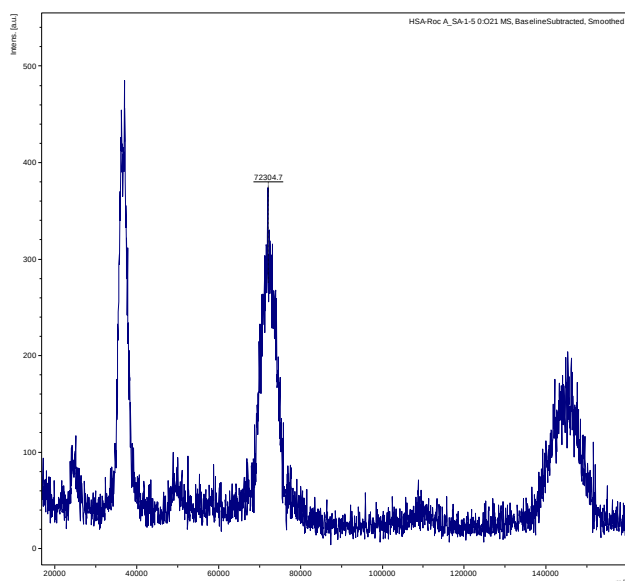


Figure 14 : Spectre MALDI-TOF du conjugué rocuronium(«1eq»)-HSA.
Le delta de masse correspond à 9.5 molécules de rocuronium-COOH par molécule de HSA.

En s'appuyant sur la littérature, notamment des couplages de nanoparticules, j'ai également proposé la modification de plusieurs paramètres [153, 156, 157] :

- Augmentation de la quantité de sulfo-NHS, jusqu'à une quantité molaire supérieure à celle du rocuronium-COOH, afin d'améliorer la stabilité de l'intermédiaire réactionnel [158-161].
- Modification du tampon de la réaction. Le protocole initial utilisait du PBS à pH 7.2 tout au long de la réaction. J'ai choisi d'effectuer la première phase d'activation du rocuronium-COOH par l'EDC dans un tampon MES (MES 0.1M + NaCl 0.5M, pH 5.6) [156]. Le pH de cette solution a ensuite été amené à 7.2, avant de l'ajouter à la solution de la protéine porteuse (elle-même toujours diluée dans du PBS à pH 7.2).
- Contrôle et ajustement du pH au cours de la seconde phase de la réaction car la précipitation

des conjugués est largement liée au pH.

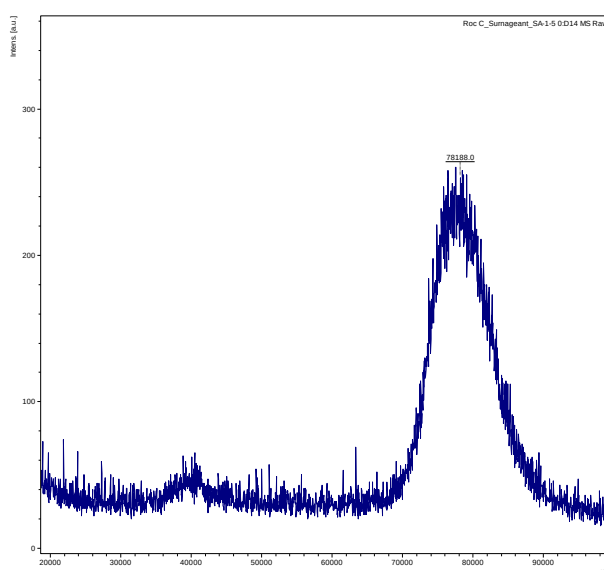


Figure 15 : Spectre MALDI-TOF du conjugué Rocuronium(« 4eq »)-HSA dans le protocole amélioré.
Le delta de masse correspond à 19.1 molécules de rocuronium-COOH par molécule d'HSA.

Grâce aux différentes améliorations apportées au protocole, les réactions réalisées à quatre et cinq équivalents de rocuronium-COOH ont permis d'obtenir des conjugués HSA couplés respectivement avec 19.2 et 22.1 molécules de rocuronium-COOH (Figure 15). Lorsque l'on observe les différents spectres MALDI-TOF, on remarque aisément que plus la quantité de rocuronium-COOH est élevée, moins le spectre est fin. Lorsque la densité est faible, le pic est remarquablement étroit démontrant une dispersion très limitée du taux moyen de couplage. Par exemple, pour le rocuronium(« 1eq »)-BSA, les molécules de BSA sont couplées avec 3 à 5 molécules de rocuronium avec une moyenne à 4, ce qui entraîne peu de différence de masse et donc une base du pic étroite (Figure 13). Par contre, lorsque la densité du curare est élevée, il y a plus de dispersion des moyennes de molécules couplées par protéines porteuses entraînant une distribution des masses et une base du pic plus larges. Les conjugués issus de ces deux couplages ont permis de reproduire les résultats ELISA obtenus avec le sérum des patients : identification des mêmes sérums « positifs » et « négatifs » (Figure 16).

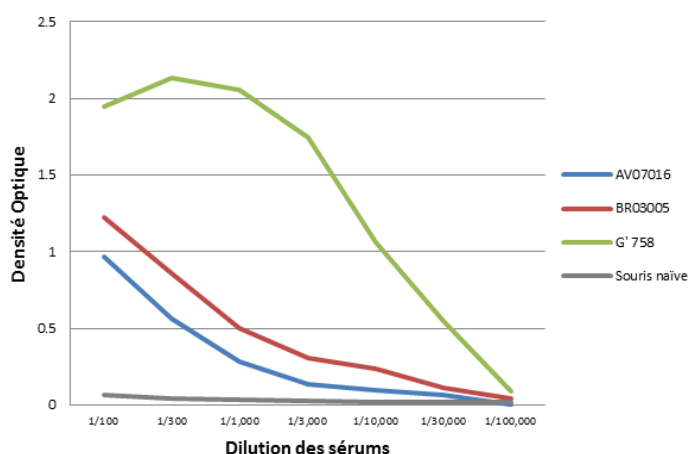


Figure 16 : ELISA IgG humains anti-rocuronium, réalisée avec le conjugué rocuronium(« 5eq »)-HSA. Le contrôle positif (courbe verte) est un sérum de souris numéro G'758, qui est une souris humanisée produisant des IgG1 humaines et immunisée par du rocuronium. Le contrôle négatif (courbe grise) est un sérum de souris humanisée non immunisée. Les courbes bleues et rouges représentent deux des quatre patients présentant des IgG anti-rocuronium.

Les modifications du protocole ont donc permis d'améliorer la stabilité des intermédiaires réactionnels et du conjugué final. Le changement pour du tampon MES semble avoir favorisé un intermédiaire plus stable. La seconde phase de la réaction a été réalisée dans une solution contenant pour moitié du PBS et pour moitié du MES au pouvoir tampon supérieur, limitant ainsi les variations de pH au cours de la formation de conjugués. Les résultats des tests ELISA valident également la présomption initiale, à savoir que la capacité à détecter une « positivité » pour un sérum de patient donné est directement lié à la densité de molécules de curares à la surface de la protéine porteuse.

2.3 Couplage protéique de la succinylmonocholine

Grâce aux améliorations du protocole décrites en 2.2, les couplages avec BSA puis avec HSA ont été rapidement performants. Comme attendu, les densités moyennes obtenues sont supérieures à celles des conjugués rocuronium, en raison de la taille nettement plus faible de la succinyl-monocholine. Le protocole originel à 1 équivalent avait permis de coupler 18.5 molécules de succinylmonocholine par molécule de BSA.

Les couplages avec de l'HSA dans le protocole amélioré ont permis de coupler à 1, 5 et 10 équivalents respectivement une moyenne de 12.7, 32.7 et 42.3 molécules de succinylmonocholine par molécule de HSA en moyenne (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). En considérant un patient qui présentait un signal positif en ELISA IgG anti-succinylmonocholine, on observe un effet dose du taux de couplage (et donc de groupements AQ présentés) et de l'intensité du signal (Figure 17). Un couplage ≤ 16 est insuffisant pour une détection positive, alors qu'un couplage >32 molécules de succinylmonocholine par molécule d'HSA semble donner une réponse maximale, au plateau (au moins pour le patient DC09001).

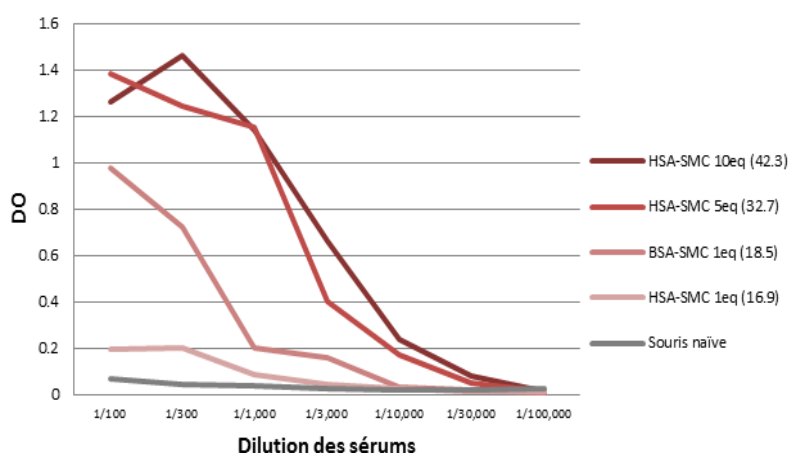


Figure 17 : ELISA IgG anti-succinylmonocholine du patient DC09001, en faisant absorber différents conjugués sur la plaque ELISA. Entre parenthèses, sont indiquées les quantités moyennes de succinylmonocholine couplées par molécule de protéines nortenses.

3 Conclusion

L'optimisation du protocole, ainsi que les analyses ont permis d'obtenir des couplages protéiques efficaces, avec un contrôle qualité des conjugués finaux. Ces éléments constituent des atouts

importants pour le développement d'un test ELISA fiable et robuste. L'obtention d'un sérum polyclonal murin grâce à la série de conjugués KLH nous a permis de valider la fiabilité et la robustesse de notre test ELISA. Chez l'homme, l'effet dose du nombre de molécules de curare couplées et de l'intensité du signal par ELISA soutiennent l'hypothèse de ce travail de thèse : existence d'IgG anti-curare chez des patients ayant souffert d'une RHA peropératoire.

ARTICLE 3

Specific IgG are associated with clinical severity of Neuro-Muscular Blocking Agent-dependent Anaphylaxis

AUTHORS (WILL BE DECIDED BY THE COPIL OF THE NASA STUDY): A. GOUEL-CHÉRON *ET AL*

WORD COUNT: 6314 WORDS

Key words

Anaphylaxis, Human, IgG, IgE, ELISA, ImmunoCAP, NMBA, Quaternary Ammonium

ABBREVIATIONS USED

AHR: Acute Hypersensitivity Reaction
ASA: Active Systemic Anaphylaxis
AU: Arbitrary Unit
BAT: Basophil Activation Test
BSA: Bovine Serum Albumin
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HSA: Human Serum Albumin
Ig: Immunoglobulin
KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin
MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MNR: Magnetic Nuclear Resonance
NMBA: Neuro-Muscular Blocking Agent
PAF: Platelet Activating Factor
PBS: Phosphate Buffered Saline
PSA: Passive Systemic Anaphylaxis
QA: Quaternary Ammonium
QAM: Quaternary Ammonium Morphine
sIg: specific Immunoglobulin
SMC: Succinylmonocholine
ST: Skin Test

INTRODUCTION

Anaphylaxis is the most severe form of acute hypersensitivity reactions (AHR) whose incidence increases worldwide and that can be of fatal consequence. Intra-anesthetic AHR are relatively rare (1:3,000 to 1:20,000 patients that are subject to anesthesia)¹ but potentially very serious (4.1% mortality rate).² Neuromuscular blocking agents (NMBA) are responsible for 60% of the intra-anesthetic AHR in France.^{3, 4} The current paradigm states that AHR is mediated by a pathway involving allergen/antigen-specific IgE, which leads to the release of preformed and/or newly synthesized mediators by mast cells and basophils in a patient sensitized to that particular allergen/antigen. Those mediators are thought to be responsible for the clinical signs of the reaction. Thus, the recommended allergology investigations of the reaction include dosage in serum of allergen-specific serum IgE (sIgE) and of mast cell-secreted mediators tryptase and histamine, skin tests (ST) to the suspected culprit agents (only during the allergology-anesthesia visit 6 to 8 weeks post-reaction), and cellular assays, *i.e.* *ex vivo* basophil activation test (BAT) in the presence of the suspected compound.⁵ Based on the medical history of the patients and on the results of these immunological tests, the allergologist and/or the anesthetist will draw conclusions and recommendations for the patient on the possibility to use, or the definitive ban to use, that specific anesthetic drug.⁶

AHR against drugs of the NMBA family are peculiar as they have been reported in patients with no previous exposure to NMBA, and that cross-reactions to various NMBA exist.⁷ NMBA share indeed a common antigenic structure composed of two quaternary ammonium (QA) groups that have been shown to be responsible for their “allergenic” properties (Figure 1A).⁸ Current dosage and identification of NMBA-specific IgE involve NMBA mimetopes containing an AQ structure; *e.g.* automatic immunofluorescence assays using the ImmunoCAP method (Phadia®, Uppsala, Sweden) are based on a morphine derivative which contains a single ammonium group (Figure 1A), termed quaternary ammonium morphine (QAM). The QAM assay has been validated in clinical practice for suspected NMBA hypersensitivity.⁹⁻¹¹ Nevertheless, in approximately 20% of cases, the highly suggestive clinical history does not correlate QAM assay results, mediator measurements and immunological tests performed, suggesting the existence of other pathways and mechanisms leading to NMBA-AHR.¹¹

Experimental models of anaphylaxis support the existence of other pathways than the IgE-mast cell/basophil-histamine pathway for the induction of anaphylaxis. Two main protocols have been employed to induce experimentally anaphylaxis: passive systemic anaphylaxis (PSA) is elicited by injection of antigen-specific antibodies followed 2-24 hours later by the injection of the same antigen; active systemic anaphylaxis (ASA) is elicited by antigen challenge in mice previously immunized with the same antigen with or without adjuvant. As expected, IgE-induced PSA in mice is dependent on mast cells, the expression of the high-affinity IgE receptor FcεRI and histamine. IgG1-, IgG2a- and

IgG2b-induced PSA all rely predominantly on the expression of the activating IgG receptor FcγRIII, on neutrophils, and on both histamine and platelet-activating factor (PAF). In addition, basophils (and possibly mast cells) contribute to IgG1- and IgG2b-induced PSA, whereas monocytes/macrophages contribute to IgG2a- and IgG2b-induced PSA.¹²⁻¹⁴ ASA models that generate a polyclonal antibody response against allergen resembles human anaphylaxis and, in particular, drug-induced anaphylaxis. Surprisingly, neither IgE, nor FcεRI, nor mast cells, nor basophils, nor both cells are mandatory for the induction of ASA in mice.¹⁵ In wt mice, neutrophils, the two activating IgG receptors FcγRIII and FcγRIV, and PAF contribute predominantly to anaphylaxis.¹⁶ PAF is also responsible for anaphylaxis induction in mice expressing either the human activating IgG receptors hFcγRI/CD64 or hFcγRIIA/CD32A (in place of all endogenous activating IgG receptors), with a contribution of neutrophils in both cases, but of monocytes/macrophages only in the latter.^{17, 18} Finally in a novel knock-in mouse model of the hFcγR locus in place of the mouse FcγR locus, anaphylaxis relied predominantly on neutrophils and hFcγRIIA, and on both histamine and PAF.¹⁹ Supporting a role for PAF in anaphylactic reactions in the clinical setting, serum PAF levels (but not histamine levels) correlate with the severity of anaphylactic shocks.²⁰ Human neutrophils express activating IgG receptors hFcγRIIA and hFcγRIIIB, and produce PAF in response to IgG receptor aggregation by immune complexes made of antigen-specific IgG and antigen.²¹

Here we propose to analyze the existence, nature and pathological nature of NMBA-specific antibodies of the IgG class in patients that suffered from anaphylaxis to NMBA as a model of drug-induced anaphylaxis. As detection and dosage of anti-NMBA antibodies are restricted in the clinical practice to IgE antibodies, we designed novel ELISA and purification methods for the detection and isolation of anti-NMBA IgG antibodies. We obtained serum samples from the cohort of the multicenter “NASA” study (*“Neutrophils Activation in Systemic Anaphylaxis”*) that focused on demonstrating in humans the existence of a neutrophil-FcγR-PAF pathway in patients suffering from intra-anesthetic AHR caused by NMBA. In this ancillary study, entitled IPAAQ (*“Identification and Pathogenicity of Antibodies against Quaternary Ammonium”*), we compared NMBA-specific ELISA and ImmunoCAP for three different NMBAs, and established conditions for the purification of Rocuronium-specific IgG antibodies from patient samples, and identification of IgG subclasses among them. This study provides evidence of anti-NMBA IgGs that may explain anaphylaxis induction in patients with no positive immunological tests, i.e. no sIgE, negative BAT, negative ST.

METHODS

Main study design

The NASA study was multicenter and involved 11 anesthesia and intensive care departments in the Ile-de-France region in France. The purpose of the NASA study was to evaluate the role of neutrophils during AHR to NMBA in humans through a case / control design, with 6-8 weeks follow-up in cases. We included from October 2012 to June 2014 any patient aged over 18 years with clinical signs consistent with intra-anesthetic AHR to NMBA whatever the grade of the reaction. As cases patients were not in a medical and psychological state to provide consent to participate to the study during occurrence of the AHR, their consent was obtained as soon as they were judged able to understand, allowing further investigations. If the patients did not recover the day after the AHR, consent was obtained from a next of kin. Non-inclusion criteria were the absence of consent. As recommended, cases patients benefited from an allergology-anesthesia visit 6-8 weeks following occurrence of the AHR, in order to identify the culprit agent.²²

For each case, one control was included until June 2015, in two centers (Bichat-Claude Bernard Hospital, Paris, and Beaujon Hospital, Clichy, France). Controls patients were ≥ 18 years of age and hospitalized for a surgical intervention necessitating NMBA injection, without developing an AHR. They were informed of the details of the study and had consented to participate in the study before surgery. They were paired to cases based on five criteria: 1/ type of surgery, 2/ infectious status, 3/ age (with more or less five years to the matched case), 4/ gender, 5/ pharmacological class of the NMBA used for surgery. For control patients, the study lasted only the day of surgery.

Clinical and biological data were collected for all cases and controls. Data collection comprised demographic (age and gender) and anesthesia/surgery characteristics (type, NMBA used, status of infection, scheduled or urgent surgery), medical information (history of atopic events, asthma, allergy to food, drugs or other compounds, comorbidity factors and surgeries, previous chronic drug treatments with focus on beta-blockers, angiotensin-converting-enzyme inhibitor and calcium-channel blockers, drugs known to alter the response to AHR). For cases, all clinical signs of the AHR, their chronology and outcome after the shock were recorded. All patients who had signs consistent with an AHR were treated following the French and International practice guidelines.^{5, 22-24} Information on interventions/drugs initiated in the operating room before occurrence of the first clinical sign of AHR was collected, as well as the specific treatment of the AHR. Patients were retrospectively classified in severity grade according to the Ring and Messmer classification by two clinician experts.²⁵ A severe AHR was defined as a grade 3 or 4 (*i.e.* a severe organ failure or a cardiac/respiratory arrest).

The protocol was approved by a local ethic comity (comity for the protection of Individuals "Ile-de-France X"). It was prospectively registered at ClinicalTrials.gov (Identifier: NCT0163722). Storage and exploitation of the samples of the different anonymized patients were allowed. The biological collection was approved and labeled by the National Health Authority. These collections had also been registered within the French Ministry of Research and ARH ("Agences Régionales de l'Hospitalisation").

Ancillary studies design

The IPAAQ study (*"Identification and Pathogenicity of Antibodies against Quaternary Ammonium"*) was an ancillary study that focused on the analyses of NMBA-sIgG. Specific signed consent was obtained from the case patients during the Allergology-anesthesia visit in order to obtain an additional blood sample of 10ml on "dry" tube. Another ancillary study entitled NASAmAbs (*"NASA monoclonal Antibodies"*) enabled the selection of one volunteer patient from the NASA cohort with high NMBA-sIgG titer that was asked to make a blood donation of 250ml after signed consent. These two ancillary studies were submitted and approved by the local ethic committee (numbers 2013-fev-13163 and 2015-juillet-13950).

Biological exploration of the acute hypersensitivity reaction

As recommended by International/National Guidelines on management of intra-anesthetic AHR^{22, 23, 26}, a venous blood sample was collected 30 minutes following the onset of the AHR when the patient's condition had been stabilized, two hours after the AHR and during the allergology-anesthesia visit 6-8 weeks post-AHR. For the NASA study, two additional blood samples of 10ml each (one in lithium heparinate for the cell-based study and one on "dry" tube) were collected 30 minutes after the onset of AHR and during the allergology-anesthesia visit (with one supplemental "dry" tube in the latter case for the patients included in the IPAAQ ancillary study). Serum samples were immediately extracted from the "dry" tubes to allow the constitution of a serum repository and further retrospective experiments. The time points "30 minutes after AHR" will be referred to as V1 and time point during the allergology-anesthesia visit as V2. Controls only had blood samples collected specifically for this study following the injection of NMBA and before surgical incisions, to mimic the chronology of blood sampling in cases patients.

The following mediators were assayed as previously described¹¹, immediately following the AHR and during the allergology-anesthesia visit: histamine (EIA, Immunotech, Beckman Coulter), tryptase (ImmunoCAP c250, Phadia), QAM-sIgE (N<0.10 kU/L) (ImmunoCAP c260, Phadia) and succinylcholine-sIgE (N<0.10 kU/L) (ImmunoCAP c202, Phadia). Tryptase levels were considered

increased when greater than $(1.2 \times [\text{baseline tryptase level}] + 2\mu\text{g/L})$ as recently suggested.^{27, 28} A histamine concentration above 20 nmol/L was considered significantly increased.

During the allergology-anesthesia visit, immediate readings of intra-dermal tests were performed on the forearms and arms of the patients. Results were interpreted after 20 minutes using as internal controls histamine (positive control) and saline (negative control). Skin tests included drugs used during general anesthesia, in particular of the NMBA family, with different dilutions as recommended by the practice guidelines²⁹, but also, depending on the cases, other perioperative compounds/substances (antibiotics, volume expansion solutions, antiseptics...). A latex prick test was systematically performed in all the patients.

NMBA-sIgG and sIgE measurements by ImmunoCAP or ELISA

Phadia provided anti-rocuronium-specific IgE and anti-atracurium-specific IgE ImmunoCAP systems, and detection reagents to adapt the standard QAM-sIgE detection to a QAM-sIgG detection, including hapten-carrier coupled BSA-QAM.

As NMBA cannot be adsorbed directly on ELISA microtitre plates, we performed a hapten-carrier coupling through an amino-ester reaction using as the carrier protein, either KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) or BSA/HSA (Bovine/Human Serum Albumin) (Figure 1). First, we produced succinylcholine- and rocuronium-derivatives that possess a carboxyl group. For that purpose, we modified the rocuronium molecule by adding a carboxyl group and, for succinylcholine, we synthesized a half-molecule, termed succinylmonocholine³⁰ (see supplementary methods and supplementary Figure 1). These NMBA-derivatives could be coupled to carrier protein (see supplementary methods). In order to generate polyclonal serum containing anti-NMBA human IgG antibodies, we immunized transgenic mice able to produce human IgG1 antibodies (gammaprim mice) with KLH-NMBA. BSA-NMBA or HSA-NMBA were used in ELISA experiments as coating reagents. Thus, the ELISA (and the ImmunoCAP) experiments referred as anti-succinylcholine and anti-rocuronium will be performed using BSA/HSA-succinylmonocholine and BSA/HSA-rocuronium derivative reagent respectively (the atracurium ImmunoCAP is also using an atracurium derivative constituted with half of the molecule).

Microtiter plates (96 wells, Nunc Maxisorp, Sigma-Aldrich®, Munich, Germany) were devised in two parts: the first was coated with BSA and the second with previously described BSA coupled to NMBA-derivatives at defined concentrations (coating buffer: carbonate buffer pH 9.6). Plates were incubated at room temperature for two hours. All subsequent incubations steps were performed by washing three times manually with PBS 1X + Tween 0.05% (PBS-T). Plates were blocked overnight at 4°C with PBS-T + fetal beef serum ultra-low IgG 10%. All the subsequent steps were performed at room temperature. Each serum sample was exposed to a range of dilutions in PBS-T + BSA 2%,

started at 1/100 for human serum or at 1 µg/ml for antibodies, then a 3-fold lower for a total of seven dilution steps. Each serum sample was analyzed twice, once for BSA alone and the second for BSA coupled to NMBA-derivatives, and were incubated for two hours. Internal negative and positive controls (see supplementary methods) were added to all test plates to define a background value and a “value 1” in arbitrary units (AU), respectively. Detection antibodies for human IgG (Horseradish Peroxidase [HRP] conjugated to anti-human IgG, Bethyl[®], Montgomery, United States; diluted in PBS-T + BSA 2%) was incubated during one hour. The substrate solution (SIGMAFAST-OPD [o-Phenylenediamine dihydrochloride], Sigma-Aldrich[®], Munich, Germany) was freshly prepared according to manufacturer’s recommendations. To develop the plate, this solution was added to the plate, stored in the dark until the reaction occurred. The reaction was stopped with H₂SO₄ 2N. Absorbance was measured at 492nm and 620nm. The lower detection limit was set as two times the background absorbance value of the buffer control. The background absorbance measured in wells coated with BSA only was subtracted from value measured in hapten-BSA coated wells, to obtain the specific anti-hapten (NMBA) signal.

Note: due to serum quantity issues, ImmunoCAP and ELISA measurements could not be performed on the same time point: ImmunoCAP was performed at the V1 time point; ELISA at the V2 time point.

Statistical analyses

The number of patients to include in the NASA study had been calculated based on the primary endpoint. In order to observe a difference of 50% in the mean percentage of activated neutrophils between cases and control patients, with a type II error of 10 % and a type I error of 5%, the minimum number of patients per group was 79. We finally included 86 cases patients. Variables were described according to their distribution as appropriate (median and interquartile range for variables with non-Gaussian distributions; frequency and percentage for category criteria). Comparisons were respectively performed with a Mann & Whitney *U* test or an exact Fisher test. An analysis in sub-groups of patients has been performed, according to the severity of the AHR or to the NMBA infused. Statistical tests were bilateral and the risk of first degree was fixed at 5%. Statistical analyses were performed with R version 3.0.2 software (R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

Patient's inclusion and clinical presentation of the acute hypersensitivity reaction

From October 2012 until June 2014, 101 cases patients were included. 15 had to be excluded because of absence of inclusion criteria or of consent. We were finally able to include 86 cases and 86 control patients in the NASA study (Figure 2). Among them, 66 were included in the IPAAQ ancillary study, with available blood samples. One patient aged 17 benefited from a special consent from her parents. For controls, two deviations to the protocols had to be done, in order to match with the infectious status criterion. The characteristics of the cases and control patients are presented in Table 1. There were no differences between cases and control patients, except for the prevalence of food allergy, that was significantly ($p=0.03$) higher among the cases patients. Seven (8%) of them suffered from a grade 1 AHR, 36 (42%) a grade 2, 33 (38%) a grade 3 and 10 (12%) a grade 4. When considering mild versus severe AHRs, there was 43 patients by group. Considering the NMBA used during surgery, although a majority of patients received only one agent, some of them received both succinylcholine and atracurium (respectively 14% and 8% for cases and controls patients) and one control patient received both rocuronium and atracurium (Table 1).

Immunologic exploration

Out of the 86 cases, 74 benefited from the allergology-anesthesiology visit (nine patients were lost to follow-up and three died). Among the 74 cases patients, 43 (58%) had positive ST: 38 (88%) to one or several NMBA, 3 (7%) to beta-lactams, one (2.5%) to modified fluid gelatin (Plasmion, Fresenius®) and one (2.5%) to midazolam. The median histamine and tryptase concentrations were 54 [10;100] nmol/L and 16.2 [5;38] µg/L respectively. According to criteria mentioned above, 55 (64%) patients had increased tryptase and 49 (57%) increased histamine (histamine levels could not be measured in 5 (6%) patients because of a hemolysis of blood samples), with only 3 (3%) patients positive for histamine only. Among all cases with a ST investigation, only 18 had neither a positive ST nor an elevated tryptase or histamine.

Mimotope QAM-sIgE and QAM-sIgG measurements by ImmunoCAP and ELISA

Dosage of QAM-sIgE was significantly higher in patients compared to controls, and in severe AHR patients compared to mild AHR patients. When setting the threshold of positivity at 0.35 kU/L, only 6 controls tested positive versus 33 in mild+severe patients (Figure 3). Among those, 29 patients had received succinylcholine during anesthesia; 4 patients had received atracurium but were among the less positive QAM-sIgE values (i.e. between 0.12 and 0.56 kU/L; Supplementary Figure 2). Sub-analyses with the patients that had received rocuronium were not performed, as only three of such

cases were included in the study. Among controls, maximum detection values reached 3 kU/L, whereas among patients, they reached 80 kU/L, with 50% of positive patients > 3 kU/L, suggesting that a QAM-sIgE dosage value >3 kU/mL may be predictive of a risk of anaphylaxis to NMBA.

Dosage of QAM-sIgG was significantly higher in severe AHR patients compared to controls or compared to mild AHR patients using both techniques, ImmunoCAP and ELISA (Figure 3). ImmunoCAP QAM-sIgG was higher in controls compared to mild AHR patients, and inversely, ELISA QAM-sIgG lower in controls compared to mild AHR patients. QAM-sIgG can thus be detected at a high frequency in controls and patients, and irrespectively of the NMBA administered during anesthesia (Supplementary Figure 2). Using both detection methods, the spread of QAM-sIgG values was important in each group, and the overlap among groups suggesting that this parameter cannot be used as a predictive value for risk of NMBA anaphylaxis. Finally, the concentrations of QAM-sIgG were also significantly higher in patients that had received succinylcholine compared to those that had received atracurium group (data not shown & Supplementary Figure 2). Thus, even though no predictive value of risk of NMBA-anaphylaxis can be proposed for QAM-sIgG, high values correlate with severe anaphylaxis cases.

NMBA-specific IgE and IgG measurements by ImmunoCAP and ELISA

None of the controls were detected positive for succinylcholine-sIgE, whereas 20 patients were positive: 18 severe and 2 mild AHR patients. Dosage of succinylcholine-sIgE in mild AHR patients was weakly increased compared to controls, but was highly increased in severe AHR patients compared to other two groups (Figure 3B). Supporting these results, 17 patients that had positive succinylcholine-sIgE received succinylcholine during anesthesia. Only two patients that had received atracurium and one that had received rocuronium tested positive for succinylcholine-sIgE (Supplementary Figure 2), indicative of cross-reaction between NMBA and/or of patients with hypersensitivity to several NMBA. Most controls and patients were detected positive for succinylcholine-sIgG with both techniques. The large spread of values among controls restricts usage of succinylcholine-sIgG dosage as a predictive value of succinylcholine-anaphylaxis. No difference among the three groups was observed using succinylcholine-based ELISA, and succinylcholine-based ImmunoCAP showed weakly higher dosage among severe AHR patients compared to controls and mild AHR patients. In addition, the succinylcholine-sIgG dosage was not correlated to the NMBA infused during anesthesia (Supplementary Figure 2). Thus elevated succinylcholine-sIgE values, but not elevated succinylcholine-sIgG values, may be considered a predictive value of risk to succinylcholine-anaphylaxis.

Rocuronium-sIgE values in severe and mild AHR patients were significantly increased compared to controls, and among each other. However, the three patients that had received rocuronium

during anesthesia were not among the highest detected values, and not considered positive compared to threshold values published in the literature ($\geq 0.13\text{kU/L}$ using ImmunoCAP³¹) (Figure 3C). Rocuronium-sIgG values measured by ImmunoCAP could not discriminate between controls and patients, even though severe AHR patients had slightly higher IgG titers than mild AHR patients. However, rocuronium-sIgG values measured by ELISA were significantly increased in both patient groups compared to controls, but not among each other. Using both techniques, one can consider that most values are low/background and that mainly four values are “high” per technique. The four highest rocuronium-sIgG values measured by ELISA ($>0.8\text{ A.U.}$) include patients that received either succinylcholine or atracurium, whereas the four highest values measured by ImmunoCAP ($>20\text{ mg/L}$) correspond to two controls that received atracurium (without developing anaphylactic symptoms) and to two patients that received either succinylcholine or atracurium. No differences of rocuronium-sIgG dosage could be detected between the patients that had received atracurium or succinylcholine during anesthesia. By ELISA, the three patients infused with rocuronium displayed high IgG titers, suggesting an involvement of the IgG pathway in rocuronium-anaphylaxis.

Anti-atracurium antibodies were only detected using ImmunoCAP, as no method could be identified to bind atracurium to a carrier protein or to bind atracurium to the surface of an ELISA plate. Atracurium-sIgE values were slightly higher in mild and severe AHR patients compared to controls, but not among each other (Supplementary Figure 3). Nevertheless, as previous studies had defined a threshold for atracurium-sIgE positivity of 0.35kU/L ³¹, only one severe AHR patient who did not receive atracurium but succinylcholine can be considered positive for atracurium-sIgE. Atracurium-sIgG values showed no differences among the three groups, with five control patients displaying the highest values (Supplementary Figure 3). Importantly, none of the patients that received atracurium were tested positive in either dosage. Thus, neither atracurium-sIgE nor atracurium-sIgG detection demonstrates capacity to discriminate among patient groups and between the NMBA used during anesthesia.

We investigated the specificity of these tests using inhibition-ELISA in the presence of free NMBA or analogues. Rocuronium-sIgG ELISA was dose-dependently inhibited by free rocuronium, but not by 5- α -dihydro-testostérone that has an identical chemical structure than rocuronium except for the ammonium groups (Figure 4A). At the same concentration, free succinylcholine inhibited rocuronium-sIgG ELISA to a lesser (>5 -fold) extent than free rocuronium. Similarly, succinylcholine-sIgG ELISA was dose-dependently inhibited by free succinylcholine, but not by diisopentyl succinate (Figure 4B). At the same concentration, free rocuronium or free atracurium inhibited succinylcholine-sIgG ELISA to a lesser (>5 -fold) extent than free rocuronium. Therefore, both rocuronium-sIgG ELISA and succinylcholine-sIgG ELISA could be dose-dependently inhibited by their respective free NMBA. That other NMBA inhibit to a lesser extent these ELISA may be attributable to cross-reactivity among anti-NMBA IgG.

Identification of anti-rocuronium IgG from an NMBA-anaphylaxis patient

Among the anti-NMBA IgG considered, anti-rocuronium IgG detected by ELISA had a predictive value for some at-risk individuals (Figure 3C). As this test identified four positive patients, we sought to obtain additional serum from those patients (under ancillary study “NASAmAbs”) to perform anti-rocuronium IgG purification and subsequent analyses of their specificity for NMBA, their distribution among IgG subclasses, their ability to form immune complexes with NMBA, and the ability of these IgG-NMBA complexes to bind and activate IgG receptor-expressing cells. We could include only one patient (female, 43-years old) that had suffered from a grade 2 AHR after receiving atracurium, and that had positive (>0.8 A.U.) rocuronium-IgG ELISA results. Her clinical picture classified her as “IgE anaphylaxis” patient, as both tryptase and atracurium skin tests were positive (plus a positive mivacurium skin test), whereas histamine and QAM-sIgE ImmunoCAP were negative. She was found to consistently have low values in ImmunoCAP-based QAM-sIgG (2.4 mg/L), atracurium-sIgG (2.38mg/L), succinylcholine-sIgG (1.25 mg/L) and rocuronium-sIgG (4.67 mg/L) that we identified here as being non-predictive tests for being at-risk to NMBA-anaphylaxis. However, this patient was detected positive in ELISA-based anti-IgG NMBA (0.91 A.U.), supporting the initial hypothesis of the NASA study that anti-NMBA IgG may be responsible for some/most NMBA-induced anaphylactic events.

IgG fractions obtained from serum fractionation on HSA-rocuronium-bound sepharose tested positive in rocuronium-sIgG ELISA, at 10-fold lower dilutions than the serum before purification, whereas the serum after purification was negative, indicating exhaustion of rocuronium-sIgG in the serum (Figure 5A). We extrapolated from the quantity of anti-rocuronium purified IgG per ml of serum that initial concentration was approximately 2 μ g/ml. Importantly, rocuronium-sIgG ELISA results using these purified fractions could be inhibited by free rocuronium, but not by its analogue, and poorly by free succinylcholine (Figure 5B), reminiscent of results obtained using non-purified serum for NASA patients (Figure 3C). In addition, the anti-rocuronium IgG fractions tested negative in rocuronium-sIgE by ELISA (data not shown), demonstrating that ELISA and inhibition ELISA results cannot be attributed to contaminating IgE antibodies among IgG. Electrophoresis analysis (SDS-PAGE) of the purified fractions was in agreement with human IgG at ≈ 150 kD and with glycine present in the elution buffer at 55kD (Supplementary Figure 5C). Anti-rocuronium IgG fractions were tested by ELISA against a panel of common antigens and allergens to determine possible cross-reactivity or even polyreactivity. Only antigens containing an ammonium group gave positive results, *i.e.* BSA/HSA-rocuronium, KLH/HSA-succinylcholine, BSA-QAM, BSA-DNP and BSA-TNP (2,4-Dinitrophenyl and 2,4-Trinitrophenyl, respectively) but not carrier proteins alone (KLH, BSA, HSA) nor major clinical allergens such as amoxicillin, peanut extract, Bet v 1 or chicken egg albumin (OVA) (Figure 5D). Anti-rocuronium-purified IgG were bound by transfectants cells expressing the human high-affinity activating IgG receptor hFc γ RI/CD64, demonstrating that these fractions contained

structurally intact IgG, and other IgG subclasses than IgG2 that are not bound by this receptor (Figure 5E). Incubation of anti-rocuronium IgG with HSA-rocuronium, but not with HSA, enabled human low-affinity IgG receptor hFcγRIIIA/CD16A(V₁₅₈) expressed by transfectants cells to bind anti-rocuronium IgG, demonstrating that anti-rocuronium IgG formed immune complexes with HSA-rocuronium, but not with HSA (Figure 5F).

DISCUSSION

Etiologic diagnosis of intra-anesthetic AHR is based on medical history and immunologic explorations of the IgE-mast cell-histamine pathway, including ST, concentration of tryptase and histamine mediators, sIgE measurement and BAT.²² However, an IgE mediated pathway is not confirmed in 20% to 33% of the reported cases considered to be consistent with an AHR.^{4, 32-34} This may be explained by the involvement of an alternative pathway which is not explored by these tests, as hypothesized by animal models.^{16-18, 35} The purpose of the NASA study was to evaluate the contribution of neutrophils and NMBA-sIgG in AHR caused by NMBA. Among the case patients included in the NASA study, 62% were females with a median age of 57, which is in accordance with previous epidemiologic studies.⁴ The results presented in this manuscript highlight the presence of NMBA-sIgG in the serum samples of patients, and a propensity of rocuronium-anaphylaxis cases to be linked to IgG. Purified anti-rocuronium IgG were not contaminated by IgE antibodies, bound none of the tested unrelated allergens and showed increased specificity for rocuronium than other NMBA in competition assays. Importantly, they could form immune complexes with rocuronium *in vitro*, suggesting the same ability *in vivo*. To our knowledge, this is the first study reporting concomitant assessment of sIgE and sIgG against NMBA (rocuronium, succinylcholine and atracurium) and QAM, and the achievement of purified rocuronium-sIgG from a patient who had an intra-anesthetic AHR. Finally, our study suggests that the nature or chemical class of NMBA determines the pathway of anaphylaxis: IgE-pathway in succinylcholine-anaphylaxis, IgG-pathway in rocuronium-anaphylaxis, and mixed pathway (half of them being non-classified) in atracurium-anaphylaxis that may highlight a predominant histamine liberating action of this drug.

QA groups have long been shown to be responsible for the allergenic properties of NMBA.⁸ The QAM-sIgE and succinylcholine-sIgE assays have been validated in clinical practice¹¹, but are highly criticized, mainly in regard to their low sensitivities.³¹ The same issues are reported with rocuronium-sIgE and atracurium-sIgE assays, which are only available for research purposes.^{36, 37} Recommendations suggest their usage only in cases of negative skin test in a highly suggestive clinical form of AHR and not as an individual risk marker, as some studies have reported the safe use of rocuronium in patients who displayed a positive rocuronium-sIgE immunoassay.³⁸ Indeed, NMBA-sIgE ImmunoCAP have a sensitivity from 28.6%^{31, 33} to 91%^{37, 39} and a specificity from 85.7%³¹ to 100%^{31, 39}. QAM-sIgE sensitivity varies from 14.2%³¹ to 68%³⁷ and specificity from 85.7%³¹ to 100%³⁹. It has been suggested that the QAM-sIgE may be relevant for the detection of succinylcholine and rocuronium-sIgE, but not atracurium-sIgE^{31, 36}, which is partly in agreement with our results that succinylcholine-sIgE is predictive, but not rocuronium-sIgE. Indeed, QAM-sIgE and succinylcholine-sIgE assays allowed for the identification of sIgE predominantly or exclusively, respectively, in patients compared to controls, with a difference between groups (Figure 3A-B). The more severe the AHR was, the higher the sIgE-measured values were. All but one of the 25 patients

with a positive succinylcholine-sIgE were positive for QAM-sIgE ImmunoCAP assay, underlying the cross-reactivity of the sIgE identified on this curare mimetope. When using the thresholds previously published for rocuronium (≥ 0.13 kU/L) and atracurium (≥ 0.35 kU/L) sIgE ImmunoCAP³¹, respectively 90 sera (27 controls and 63 patients with 50% having a positive NMBA ST) were tested positive, which underlines issues regarding specificity of the first test and sensitivity of the second (Figure 4C and supplemental Figure 3 and 4). Thus, sIgE detection for rocuronium or atracurium does not appear relevant for clinical practice.

IgG against QAM, succinylcholine and rocuronium could be detected in the serum samples of the patients and controls of the NASA study whether using ImmunoCAP or ELISA, suggesting the presence of NMBA-specific IgG and/or cross-reactive antibodies with an affinity for QA-containing molecules. Because ImmunoCAP was performed on V1 samples and ELISA on V2 samples, no correlation test between the two techniques could be performed. Importantly, among the severe AHR patients, 10 (91%) of the 11 patients with the highest QAM-sIgG values in ImmunoCAP performed on V1 samples were also the highest values in ELISA performed on the V2 samples, suggesting long-lasting anti-NMBA IgG production in patients and potential correlation between the two techniques. Inhibition ELISA however revealed a high specificity of the antibodies towards NMBA and not towards chemical analogues, with nevertheless cross-reactivity among NMBA. Altogether these results strongly support the existence of anti-NMBA specific antibodies that may recognize NMBA through recognition of their ammonium groups.

The analysis of the results provided by sIgG assays are challenging as, to our knowledge, no such experiments have been reported before and thus no thresholds have been set. Moreover, a gold standard test to validate an IgG-mediated pathway, such as skin tests for validating an IgE-mediated pathway, has not been proposed. When considering results using the morphine mimetope, QAM-sIgG measurements were significantly different among groups and correlate with severity. An unpublished study (Chollet-Martin *et al*, personal communication) on a cohort including healthy controls and intra-anesthetic AHR patients (without restriction to any culprit allergen) has defined a threshold of 2 mg/L for QAM-sIgG ImmunoCAP positivity. When applying this threshold value, 70% of the patients that suffered from a severe AHR (30/43) were considered QAM-sIgG positive, but also 49% (49/86) in the control group. Similarly, when applying the threshold value, 42% (18/43) of the patients that suffered from a severe AHR were considered QAM-sIgE positive. In the severe AHR group, 14 patients fall into both categories, having positive QAM-sIgE and positive QAM-sIgG. However, considering the low sensitivity of the QAM-sIgE immunoassay, we also considered a positive ST and an elevated tryptase to assess an IgE-pathway. In the severe AHR group, 35/43 patients had an IgE-pathway, representing 81% (35/43) of severe NMBA-induced AHR. Thus, 74% (26/35) of patients characterized as demonstrating clinical evidence of a “classical” IgE-pathway in severe-NMBA-anaphylaxis also present evidence of a “non-classical” IgG-pathway, the relative importance of each

still remaining unknown. This study also identifies 62% (5/8) of severe AHR patients without positive IgE-pathway markers but with high QAM-sIgG either by ELISA or by ImmunoCap, suggesting that some patients may experience NMBA-anaphylaxis uniquely through an IgG-pathway.

Whereas the results of the QAM-sIgG assays were in accordance with each other, this may not be the case for succinylcholine-sIgG. Indeed, a large number of patients displayed succinylcholine-sIgG by ELISA, without any difference between groups. By ImmunoCAP, the incidence of succinylcholine-sIgG was higher in the control than in the severe AHR patients group, highlighting issues about the specificity of this test. Surprisingly, the two control patients who displayed the highest succinylcholine-sIgG ImmunoCAP values also displayed the highest values in all the sIgG ImmunoCAP assays. Unfortunately, they were not included in the ELISA assay, as they did not match patients included in the IPAAQ ancillary study. As QA are presents on a large number of molecules in the environment, such as cosmetics, house products, disinfectants, or drugs such as pholcodine, these products are thought to be responsible for the immunization of the patients against NMBA.^{7, 40-42} The antibodies identified and suspected to be responsible for the induction of the AHR may not be specifically targeted against NMBA but against other compounds that share chemical structure analogy. Thus, the succinylcholine-sIgG assays may not be specific and recognize others compounds, rendering this assay neither valid nor informative for clinical practice. When considering rocuronium-sIgG measurements, although a large majority of patients were negative by ELISA, the ELISA assay discriminated four positive patients at a positivity threshold of 0.8 A.U. (Figure 4C) and the ImmunoCAP assay two positive controls and two positive patients at a positivity threshold of 20mg/L. For rocuronium-sIgG detection, we conclude that ImmunoCAP should not be applied, as only ELISA enabled to identify retrospectively the three rocuronium-anaphylaxis patients of the cohort. The rocuronium ELISA also enabled the identification of four high sIgG titers patients, mainly one atracurium-anaphylaxis patient from which we could purify anti-rocuronium IgG.

This study also allows analyzing the detection of anti-NMBA IgE or IgG antibodies of the NASA patient cohort according to the NMBA infused. To address this question, we focused on patients infused with a single NMBA. When considering the 36 only-succinylcholine-infused patients, only four (11%) of them did not display an IgE-mediated pathway marker (ST or elevated tryptase), a large majority of them also presenting with positive QAM-sIgG dosage, as discussed earlier in the paragraph above. In contrast, among the 35 only-atracurium-infused patients, 17 (49%) had no IgE-pathway marker. Six of those (35%) had positive QAM-sIgG by ImmunoCAP. These discrepancies according to the NMBA infused raise two main hypotheses. First, the chemical structure of NMBA dictates the immune response: no antibody response or an antibody response, and if so an IgE response, an IgG response, or both. Atracurium and QAM are for example highly different in their chemical structure, which could explain the inability of the atracurium-specific antibodies (if such antibodies exist) to recognize the QAM antigen. However, this is in contrast with the very low

incidence of succinylcholine-sIgE among the patients that received atracurium. Indeed, the atracurium antibodies may recognize the “simple” epitope provided by a single carbohydrate chain linked to a QA group. Second, we may hypothesize that the pathophysiology of shock is different dependent of different NMBA molecules. Whereas succinylcholine-AHR may be caused by an antibody-mediated reaction (IgE and/or IgG), atracurium-AHR may in 50% of cases involve another mechanism such as severe non-antibody mediated mast cell activation or complement activation.⁴³ Consistent with this hypothesis, when considering the clinical signs of the AHR according to the NMBA received, there was a significant difference regarding hypoxemia and hypocapnia (defined respectively as an end tidal CO₂ under 34 mmHg and a peripheral oxygen saturation under 94%) that were more frequent with succinylcholine infusion than atracurium infusion (respectively p=0.0001 and p=0.007, Fisher exact test). We recently suggested that hypocapnia may be a severity marker of intra-anesthetic AHR to NMBA (Gouel-Cheron *et al*, under submission). Together with the results from sIgE and sIgG evaluations, these considerations suggests that patients who received succinylcholine would suffer a higher severity reaction with detectable specific sIgE and sIgG (probably both contributing to the reaction) than patients who received atracurium, whose AHR-induced mechanisms may not entirely or even not at all rely on antibodies.

The purification processes we developed were successful for the identification of rocuronium-sIgG, without contamination by rocuronium-sIgE. The rocuronium-sIgGs were cross-reactive against other compounds with QA groups, but not toward clinically relevant allergens such as peanut extract, amoxicillin or Bet v 1 (Figure 5D). Rocuronium-sIgG antibodies were able to bind as monomers to the high-affinity human IgG receptor hFcγRI/CD64 and as immune complexes with rocuronium to the low-affinity human IgG receptor hFcγRIIIA/CD16A(V₁₅₈). These results demonstrate that these IgG antibody fractions contained structurally intact IgG, and other IgG subclasses than IgG2 that are not bound by hFcγRI. They also demonstrate that anti-rocuronium IgG formed immune complexes with rocuronium, suggestive of a similar mechanism *in vivo*, leading to hFcγR-expressing cells, like neutrophils and monocytes as proposed by animal models of anaphylaxis.

In conclusion, our data indicate that NMBA-sIgG may participate in the severity of NMBA-AHR, potentially amplifying the IgE pathway induced by the presence of anti-NMBA IgE antibodies in the same patients (with a severe AHR). These results are supported by the ability of purified rocuronium-sIgG to bind not only rocuronium, but most NMBA and QA-containing molecules, and thus to generate NMBA-anti-NMBA immune complexes *in vivo*. Analysis of the distribution of specific-NMBA IgG among IgG subclasses may help to understand the sensitization mechanism of these patients that were not exposed to NMBA before. Finally this study suggests that the chemical structure of a given NMBA may dictate the mechanism of anaphylaxis to this particular NMBA: IgE-pathway for succinylcholine, IgG-pathway for rocuronium and probable histamino liberating mechanisms for atracurium.

REFERENCES

1. Mertes PM, Alla F, Tréchet P, Auroy Y, Jouglu E. Anaphylaxis during anesthesia in France: An 8-year national survey. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:366-73.
2. Reitter M, Petitpain N, Latache C, Cottin J, Massy N, Demoly P, et al. Fatal anaphylaxis with neuromuscular blocking agents: a risk factor and management analysis. *Allergy* 2014; 69:954-9.
3. Dong SW, Mertes PM, Petitpain N, Hasdenteufel F, Malinovsky JM, Gerap. Hypersensitivity reactions during anesthesia. Results from the ninth French survey (2005-2007). *Minerva Anesthesiol* 2012; 78:868-78.
4. Mertes PM, Laxenaire M-C, Alla F, Peranesthésiques GdEdRA. Anaphylactic and Anaphylactoid Reactions Occurring during Anesthesia in France in 1999–2000. *Anesthesiology* 2003; 99:536-45.
5. Longrois D, Lejus C, Constant I, Bruyère M, Mertes PM. Traitement des réactions anaphylactiques survenant en cours d'anesthésie et en particulier du choc anaphylactique. *Ann Fr Anesth Reanim* 2011; 30:312-22.
6. Ebo DG, Fisher MM, Hagendorens MM, Bridts CH, Stevens WJ. Anaphylaxis during anaesthesia: diagnostic approach. *Allergy* 2007; 62:471-87.
7. Mertes PM, Aimone-Gastin I, Gueant-Rodriguez RM, Mouton-Faivre C, Audibert G, O'Brien J, et al. Hypersensitivity reactions to neuromuscular blocking agents. *Curr Pharm Des* 2008; 14:2809-25.
8. Baldo BA, Fisher MM. Substituted ammonium ions as allergenic determinants in drug allergy. *Nature* 1983; 306:262-4.
9. Fisher MM, Baldo BA. Immunoassays in the diagnosis of anaphylaxis to neuromuscular blocking drugs: the value of morphine for the detection of IgE antibodies in allergic subjects. *Anaesth Intensive Care* 2000; 28:167-70.
10. Florvaag E, Johansson SGO, Öman H, Venemalm L, Degerbeck F, Dybendal T, et al. Prevalence of IgE antibodies to morphine. Relation to the high and low incidences of NMBA anaphylaxis in Norway and Sweden, respectively. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49:437-44.
11. Laroche D, Chollet-Martin S, Leturgie P, Malzac L, Vergnaud MC, Neukirch C, et al. Evaluation of a new routine diagnostic test for immunoglobulin e sensitization to neuromuscular blocking agents. *Anesthesiology* 2011; 114:91-7.
12. Tsujimura Y, Obata K, Mukai K, Shindou H, Yoshida M, Nishikado H, et al. Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity* 2008; 28:581-9.
13. Hazenbos WLW, Gessner JE, Hofhuis FMA, Kuipers H, Meyer D, Heijnen IAFM, et al. Impaired IgG-Dependent Anaphylaxis and Arthus Reaction in FcγRIII (CD16) Deficient Mice. *Immunity* 1996; 5:181-8.
14. Beutier H, Gillis CM, Iannascoli B, Godon O, England P, Sibilano R, et al. IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2016.
15. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 2012; 119:5640-9.
16. Jonsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, Van Rooijen N, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest* 2011; 121:1484-96.
17. Jönsson F, Mancardi DA, Zhao W, Kita Y, Iannascoli B, Khun H, et al. Human FcγRIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood* 2012; 119:2533-44.
18. Mancardi DA, Albanesi M, Jönsson F, Iannascoli B, Van Rooijen N, Kang X, et al. The high-affinity human IgG receptor FcγRI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis and anti-tumor immunotherapy. *Blood* 2013.
19. Gillis CM, Jönsson F, Mancardi DA, Tu N, Beutier H, Van Rooijen N, et al. Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2016.
20. Vadas P, Gold M, Perelman B, Liss GM, Lack G, Blyth T, et al. Platelet-Activating Factor, PAF Acetylhydrolase, and Severe Anaphylaxis. *N Engl J Med* 2008; 358:28-35.

21. Jouvin-Marche E, Ninio E, Beaurain G, Tence M, Niaudet P, Benveniste J. Biosynthesis of Paf-acether (platelet-activating factor). VII. Precursors of Paf-acether and acetyl-transferase activity in human leukocytes. *J Immunol* 1984; 133:892-8.
22. Mertes PM, Malinovsky JM, Jouffroy L, Working Group of the S, Sfa, Aberer W, et al. Reducing the risk of anaphylaxis during anesthesia: 2011 updated guidelines for clinical practice. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011; 21:442-53.
23. Gouel-Chéron A, Harpan A, Mertes P-M, Longrois D. Management of anaphylactic shock in the operating room. *Presse Med* 2016; 45:774–83.
24. Simons FER, Ebisawa M, Sanchez-Borges M, Thong BY, Worm M, Tanno LK, et al. 2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines. *World Allergy Organ J* 2015; 8:32.
25. Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *The Lancet* 1977; 309:466-9.
26. Simons FER, Arduzzo LRF, Dimov V, Ebisawa M, El-Gamal YM, Lockey RF, et al. World Allergy Organization Anaphylaxis Guidelines: 2013 Update of the Evidence Base. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 162:193-204.
27. Sprung J, Weingarten TN, Schwartz LB. Presence or Absence of Elevated Acute Total Serum Tryptase by Itself Is Not a Definitive Marker for an Allergic Reaction. *Anesthesiology* 2015; 122:713-4.
28. Valent P, Akin C, Arock M, Brockow K, Butterfield JH, Carter MC, et al. Definitions, Criteria and Global Classification of Mast Cell Disorders with Special Reference to Mast Cell Activation Syndromes: A Consensus Proposal. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 157:215-25.
29. Mertes PM, Lambert M, Guéant-Rodriguez RM, Aimone-Gastin I, Mouton-Faivre C, Moneret-Vautrin DA, et al. Perioperative Anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009; 29:429-51.
30. Doge G, Pohloudek-Fabini R, Kottke D. [Analysis and stability of suxamethonium chloride. 1. Detection and quantitative determination of the intact active agent with its degradation products]. *Pharmazie* 1982; 37:708-11.
31. Uyttebroek AP, Sabato V, Bridts CH, De Clerck LS, Ebo DG. Immunoglobulin E antibodies to atracurium: a new diagnostic tool? *Clin Exp Allergy* 2015; 45:485-7.
32. Laxenaire MC, Mertes PM. Anaphylaxis during anaesthesia. Results of a two-year survey in France. *Br J Anaesth* 2001; 87:549-58.
33. Harboe MDT, Guttormsen MDPDAnne B, Irgens MSA, Dybendal MSPDT, Florvaag MDPDE. Anaphylaxis during Anesthesia in NorwayA 6-Year Single-center Follow-up Study. *Anesthesiology* 2005; 102:897-903.
34. Leysen J, Bridts CH, De Clerck LS, Vercauteren M, Lambert J, Weyler JJ, et al. Allergy to rocuronium: from clinical suspicion to correct diagnosis. *Allergy* 2011; 66:1014-9.
35. Finkelman FD, Khoudoun MV, Strait R. Human IgE-independent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137:1674-80.
36. Decuyper II, Ebo DG, Uyttebroek AP, Hagendorens MM, Faber MA, Bridts CH, et al. Quantification of specific IgE antibodies in immediate drug hypersensitivity: More shortcomings than potentials? *Clin Chim Acta* 2016; 460:184-9.
37. Leysen J, Uyttebroek A, Sabato V, Bridts CH, De Clerck LS, Ebo DG. Predictive value of allergy tests for neuromuscular blocking agents: tackling an unmet need. *Clin Exp Allergy* 2014; 44:1069-75.
38. Leysen J, Sabato V, Bridts C, Ebo DG. Is the use of NMBA dissuaded in individuals who display positive sIgE to QAS? *Clin Exp Allergy* 2014; 44:458-.
39. Ebo MDPDDidier G, Venemalm PDL, Bridts MLTChris H, Degerbeck MSF, Hagberg MSH, De Clerck MDPDLuc S, et al. Immunoglobulin E Antibodies to Rocuronium: A New Diagnostic Tool. *Anesthesiology* 2007; 107:253-9–9.
40. Baldo BA, Fisher MM, Pham NH. On the origin and specificity of antibodies to neuromuscular blocking (muscle relaxant) drugs: an immunochemical perspective. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:325-44.

41. Dong S, Acouetey DS, Guéant-Rodriguez RM, Zmirou-Navier D, Rémen T, Blanca M, et al. Prevalence of IgE against neuromuscular blocking agents in hairdressers and bakers. *Clin Exp Allergy* 2013; 43:1256-62.
42. Baldo BA, Fisher MM. Anaphylaxis to muscle relaxant drugs: cross-reactivity and molecular basis of binding of IgE antibodies detected by radioimmunoassay. *Mol Immunol* 1983; 20:1393-400.
43. Gaudenzio N, Sibilano R, Marichal T, Starkl P, Reber LL, Cenac N, et al. Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies. *J Clin Invest* 2016; 126.
44. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 2009; 113:3716-25.

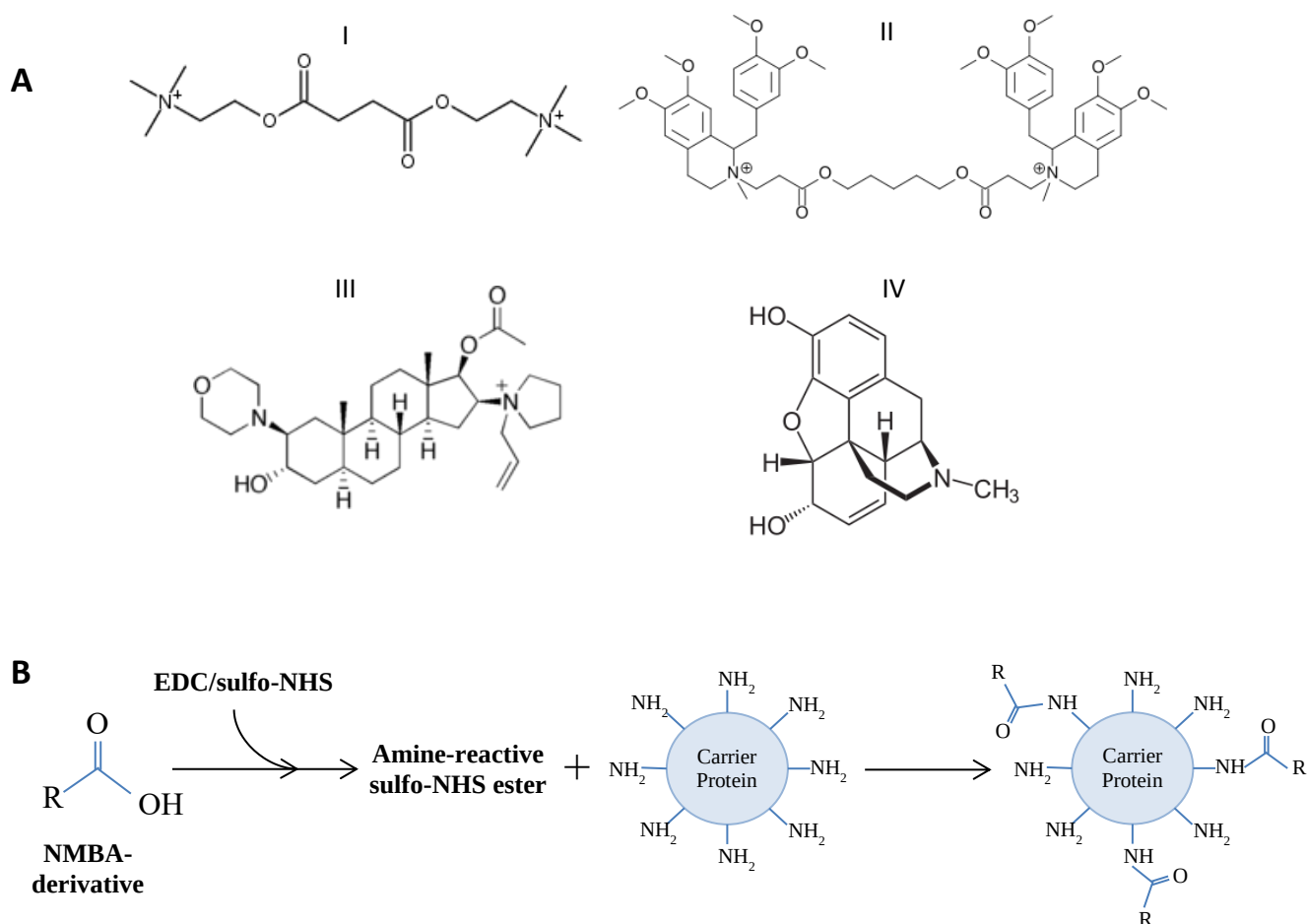


Figure 1: Chemical structure of the NMBA and carrier protein to NMBA coupling protocol.

A/Chemical structures of the three NMBA infused in the patients of the NASA study and of the QAM used to detect specific IgE in the ImmunoCAP system: I/Succinylcholine, II/Atracurium, III/Rocuronium and IV/QAM. B/Schematic representation of protein coupling to neuro-muscular blocking agents (NMBA) derivatives. Carrier proteins were bovine/human serum albumin or keyhole limpet hemocyanin. EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. sulfoNHS: *N*-hydroxysulphosuccinimide.

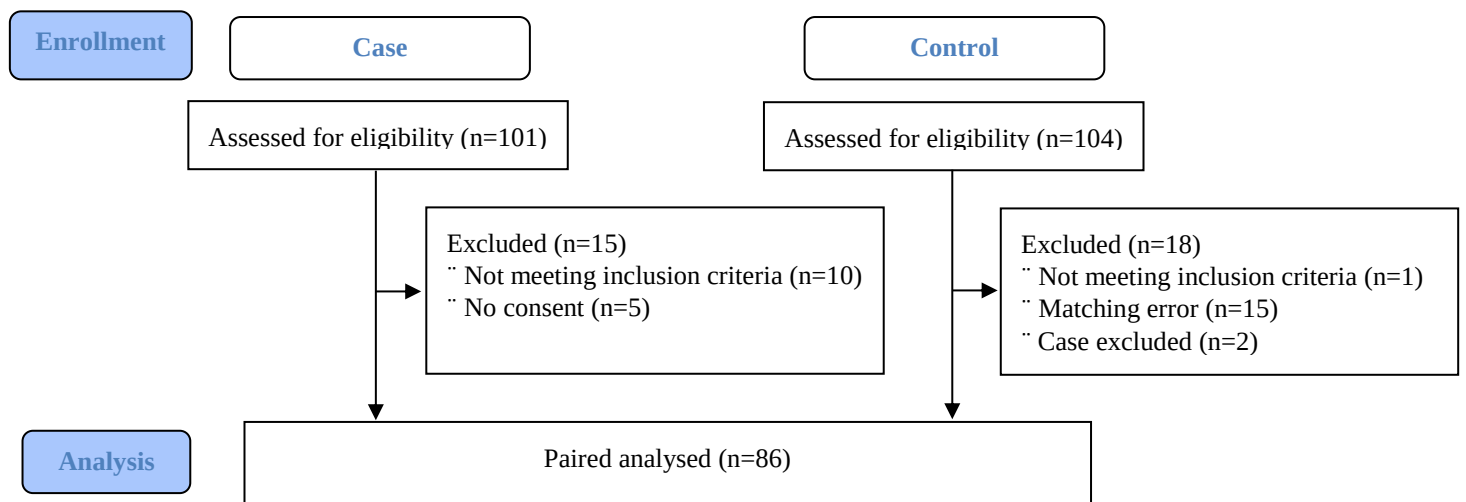
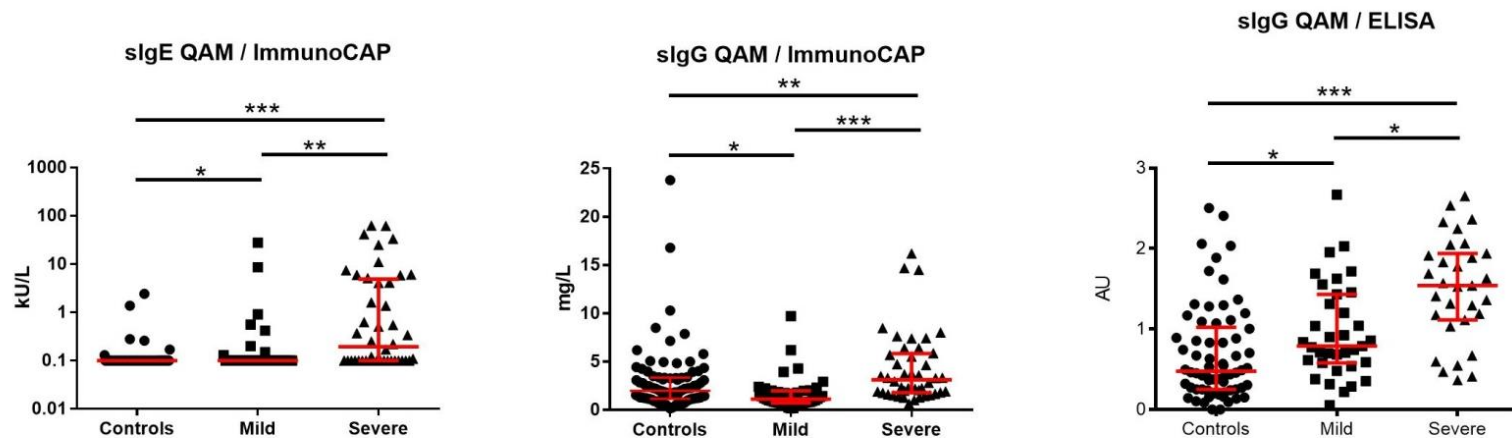
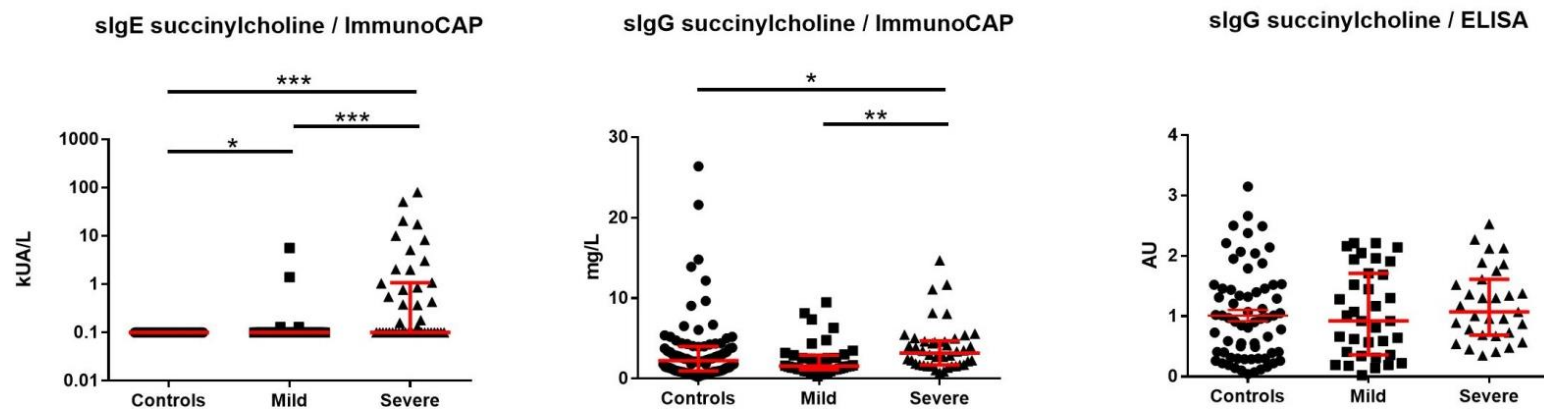


Figure 2: Flowchart of the NASA study.

A



B



C

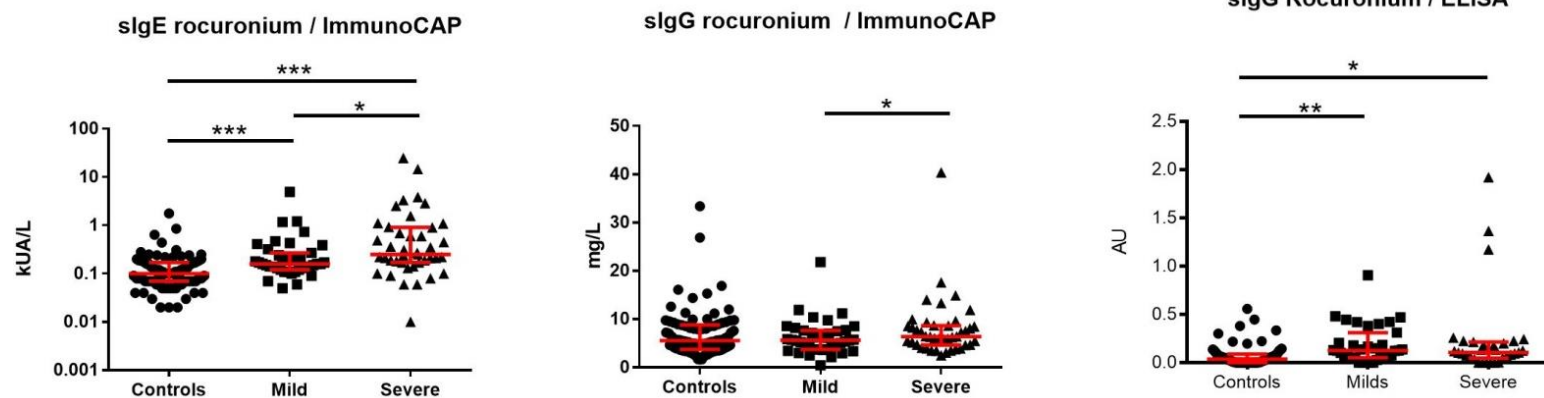


Figure 3: Mimotope and NMBA-specific IgE and IgG measurements by ImmunoCAP and ELISA. A/QAM, B/Succinylcholine, C/Rocuronium. Analyses were performed using the Mann & Whitney U test. * $p < 0.05$. ** $p < 0.001$. *** $p < 0.0001$

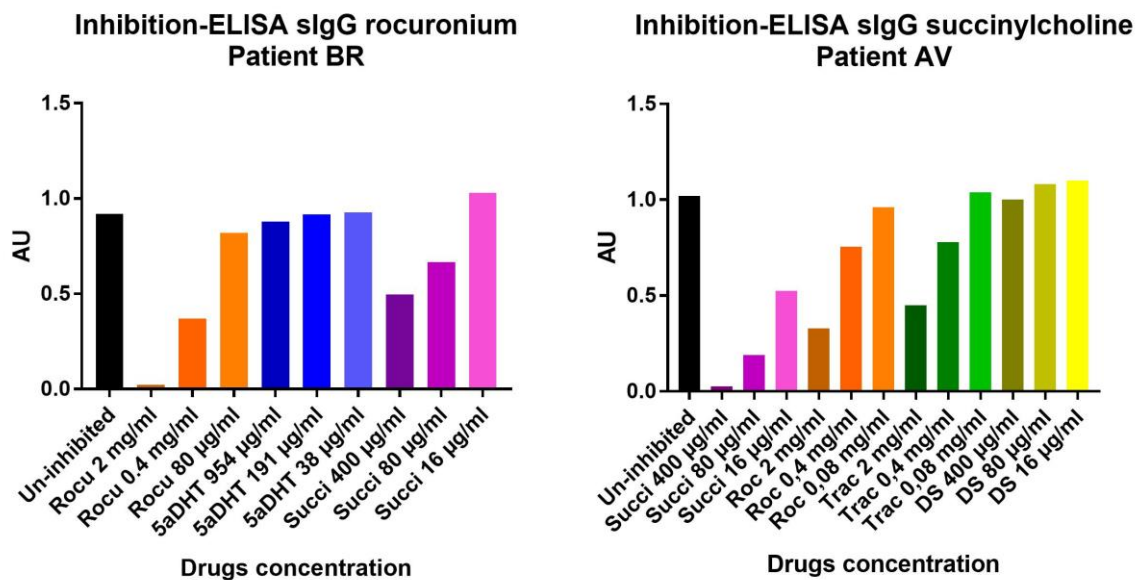
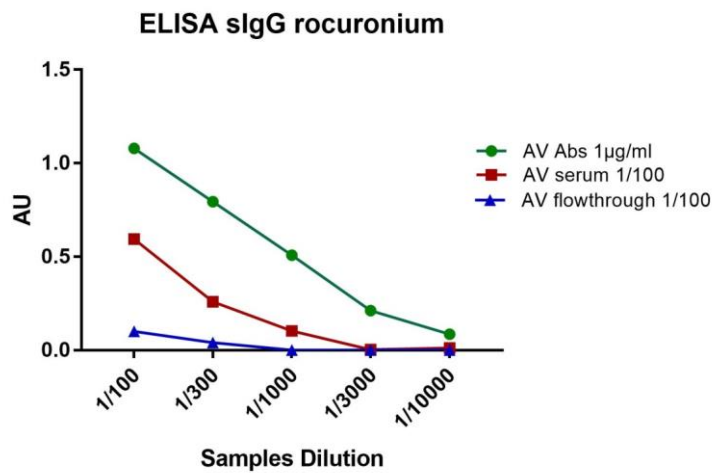
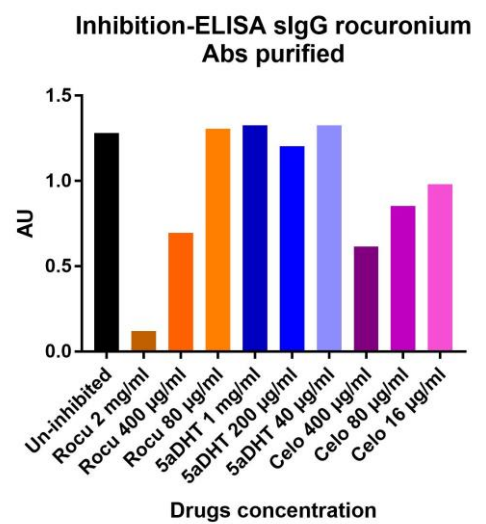


Figure 4: The succinylcholine and rocuronium-sIgG detected by ELISA are specific to NMBA. Inhibition ELISA performed on two human samples diluted at 1/100. A/ELISA sIgG-rocuronium (patient BR), B/ELISA sIgG-succinylcholine (patient AV). Succi: Succinylcholine, Atra: Atracurium, Rocu: Rocuronium, 5aDHT: 5-alpha-dihydro-testosterone, DS: Diisopentyl succinate.

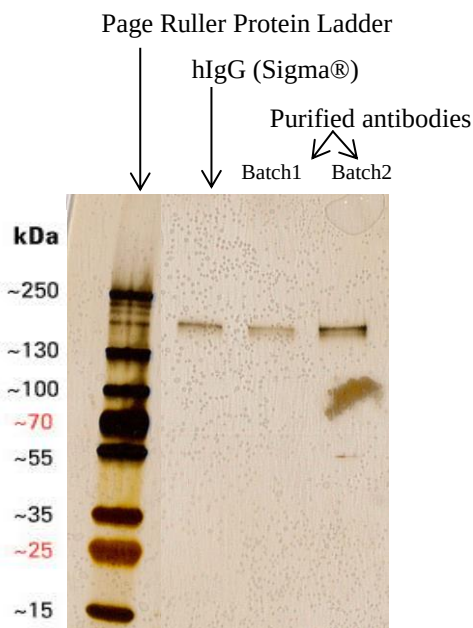
A



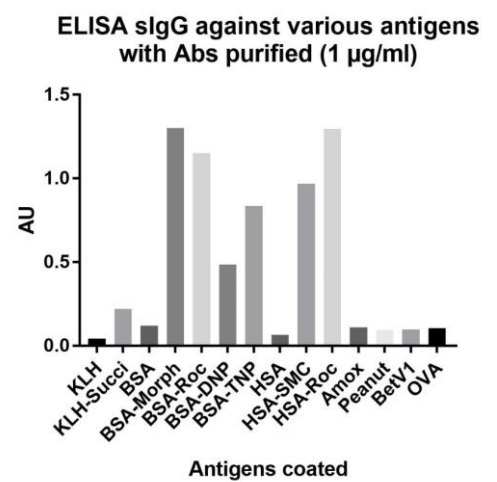
B



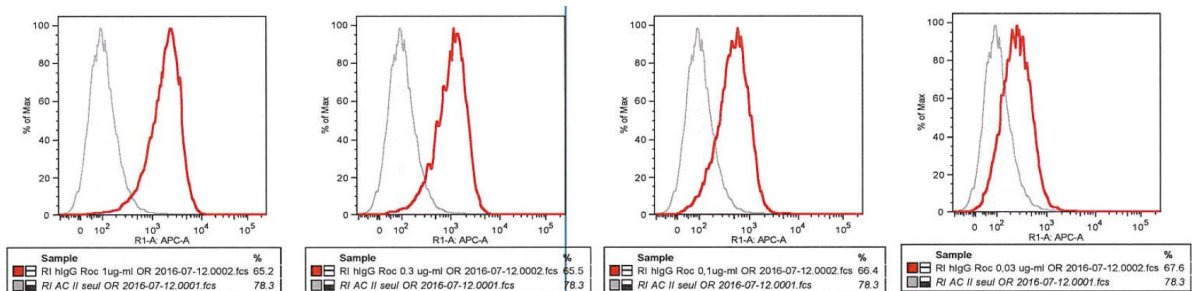
C



D



E



F

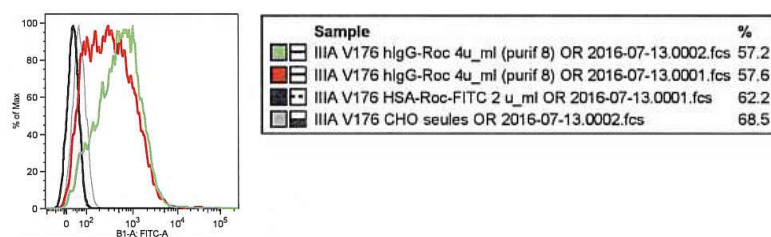


Figure 5: IgG fractions obtained from serum fractionation were rocuronium specific IgG which had the ability to formed immune complexes with HSA-rocuronium and to fix IgG receptors.

A/Rocuronium-sIgG ELISA. The red line represents the serum of the patient before fractionation, the blue line the flowthrough of the serum after fractionation and the green line the purified antibodies (dilution started at 1 µg/ml with a 3-fold dilution). B/Rocuronium-sIgG inhibition-ELISA with 1µg/ml concentration of purified antibodies with decreasing concentrations of free NMBA or of analogues. Inhibition was obtained in a dose-dependent manner by free rocuronium or to a less extent by other NMBSA, but not the analogue. C/Electrophoresis analysis of the purified fractions with the SDS-PAGE: protein ladder, commercial human IgG and two batches of the purified antibodies. Results are in agreement with human IgG at $\approx 150\text{kD}$ and with glycine at 55kD present in the elution buffer. D/ELISA against a panel of common antigens: the purified antibodies were tested (concentration 1 µg/ml) on different antigens plate-bounded (all at the same concentrations of protein carrier), with positive results only to agents containing ammonium group. E/Bind of anti-rocuronium-purified IgG to transfectants cells expressing the human high-affinity activating IgG receptor hFcγRI/CD64. F/Bond of immune complexes of anti-rocuronium IgG with HSA-rocuronium, but not with HAS to transfectants cells expressing the human low-affinity IgG receptor hFcγRIIIA/CD16A(V₁₅₈).

SUPPLEMENTARY METHODS

Derivative-NMBA synthesis

The rocuronium molecule possesses a hydroxyl group link to the third carbon of the steroid architecture. Succinic anhydride was added to rocuronium anhydride in the presence of dimethylaminopyridine in pyridine. After overnight agitation at room temperature under argon, the pyridine solvent was removed by vacuum evaporation. After purification by column chromatography, we obtained a stable rocuronium-derivative that possesses a carboxyl group (Supplementary Figure 1A) which was confirmed by mass spectrometry and MNR analysis.

To realize the succinylcholine-sIgG ELISA, we decided to use the half-molecule of succinylcholine, which is succinylmonocholine (SMC). In a one-step production based on a protocol previously published³⁰, choline chloride and succinic anhydride were heat up until 140°C to obtain a sticky compound. After an overnight resting under argon, pure SMC was obtained, confirmed by mass spectrometry and RMN analysis with a yield of the reaction of 93.4% (Supplementary Figure 1B).

Protein coupling protocol

All the quantities of the products used in the protocol are related to the carrier protein. To achieve the conjugation of the NMBA-derivatives to the carrier proteins, we added first the NMBA-derivatives (1 until 10 equivalent) to the coupling agent EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide) (100 equivalent) in the presence of sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) (1000 equivalent or more, in order to be higher to the molarity of EDC) in MES buffer 0.1M + NaCl 0.5M at pH 5.6. After 5 minutes stirring at room temperature (without a magnet bar), pH was increased until 7.2 with NaOH 2N. The mixed solution was progressively added to the carrier protein, diluted in PBS 1X pH 7.2. After three hours of gentle agitation at room temperature, the conjugated proteins were dialyzed in PBS 1X. Exact measurement of the concentration of the conjugated proteins was achieved by amino-acid analysis which is performed, after hydrolysis of the protein, by an analysis of the different picks of each amino acid in MNR. The amount of NMBA-derivatives coupled to BSA or HSA was evaluated by a MALDI-TOF mass spectrometry analysis (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation” associated to a “Time of Flight” measurement). Yields of the coupling for BSA and KLH were 76% and 93% respectively.

Generation of negative and positive controls for NMBA-sIgG ELISA

To allow reproducibility, internal negative and positive controls were added to all test plates. We used a model of humanized mice producing human IgG1 instead of mice IgM through a class-switch recombination modification (from Pr. Michel Cogné, Limoges, France; unpublished data). These human IgG1 are detectable by the detection antibody used in the ELISA experiments. After

immunization with KLH-rocuronium, they produced human rocuronium-sIgG, that cross-react with succinylcholine (our results, unpublished data). These immunized or non-immunized mice sera provided us respectively the positive and the negative value on our ELISA experiments.

Antibodies purification

To extract the specific antibodies against rocuronium, we used CNBr-Activated sepharose 4 Fast Flow (General Electrics[®], Buckinghamshire, England). We performed two different coupling experiments: one with BSA and the other with BSA-rocuronium. The sepharose beads were washed five times with a solution of HCl 10^{-3} M then two times in PBS 1X. The coupling solutions (i.e. BSA or BSA-rocuronium) were added with a ratio of coupling solution/medium of 1 and incubated overnight. After coupling, non-reacted groups on the sepharose beads were blocked with glycine 0.2M pH 8.0 during six hours. Washing steps used twice alternatively a low pH buffer (0.1M acetate buffer + 0.5M NaCl, pH 3.0) and a high pH buffer (0.1 M Tris buffer + 0.5M NaCl, pH 8.0). Coupled sepharose beads were stored in a 0.2M borate buffer + 0.15M NaCl, pH 8.0.

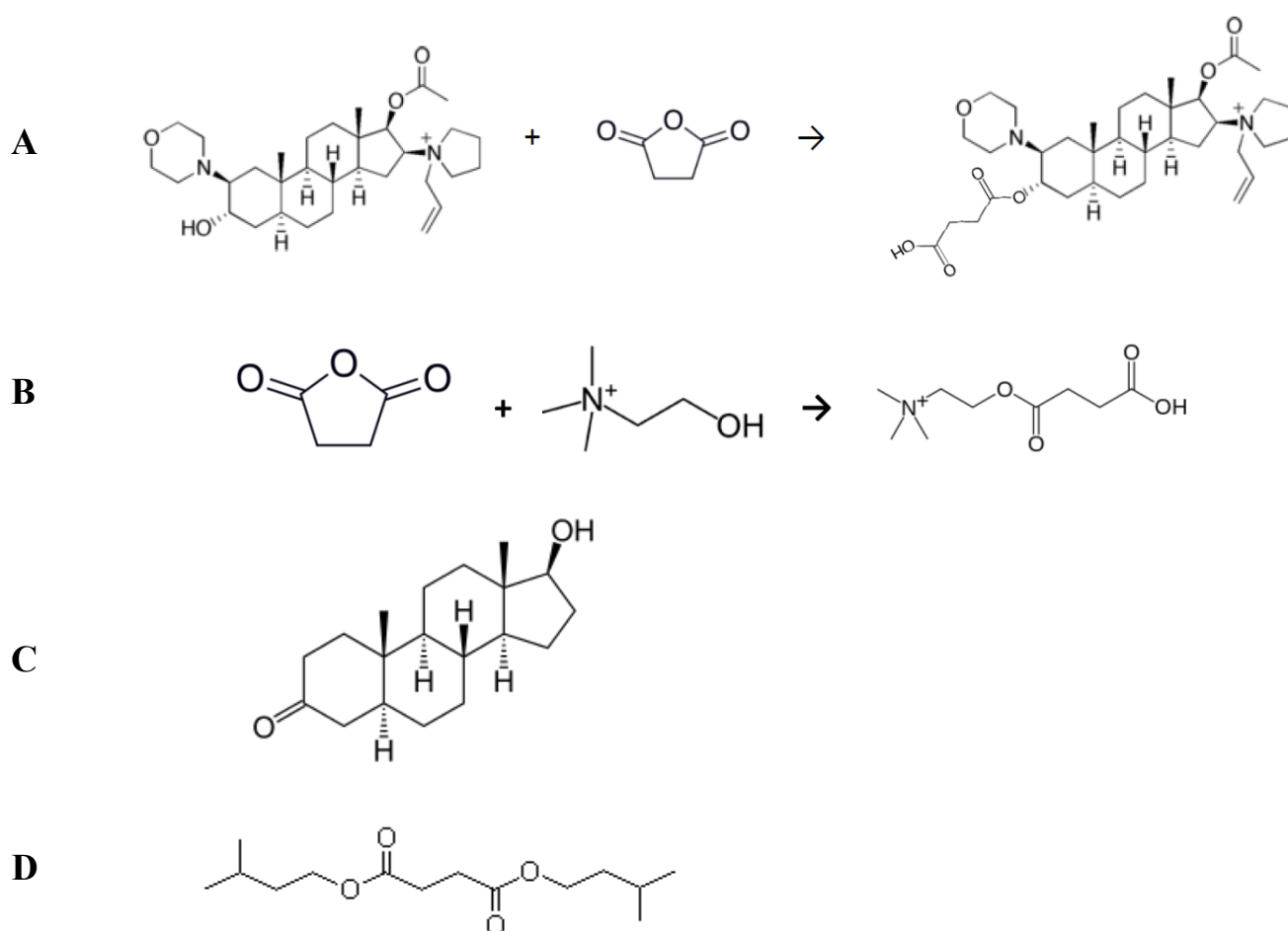
To extract the antibodies, BSA and BSA-Rocuronium sepharose beads were separately packed in Poly-Pred Chromatography Columns (Bio-Rad[®], Hercules, California, US) and washed with PBS 1X with a volume hundred-fold higher than the column. Human serum, after centrifugation and filtration with a 0.45 μ m filter, was passed twice through the column constituted of packed BSA-sepharose beads. The flow-through serum was then incubated overnight on the BSA-rocuronium sepharose beads with agitation. After withdrawal of the serum, the column was washed with PBS 1X with the same volume than previously. Elution was performed with 0.12 M glycine buffer, pH 3.0. Elution fraction was immediately buffered with 10% of 0.1M Tris, pH 8.0. The BSA-rocuronium sepharose beads were washed with the same volume of elution buffer, then PBS 1X, then placed in the previous described borate buffer. These four steps (washing, elution, washing and storage) were performed equally with the BSA sepharose beads. Antibodies were dialyzed in TRIS buffer 0.1M, pH 8.0, as suggested after Dynamic Light Scattering analysis performed by the biophysics platform of the Pasteur Institute on our samples.

Antibodies, reagents, and cells

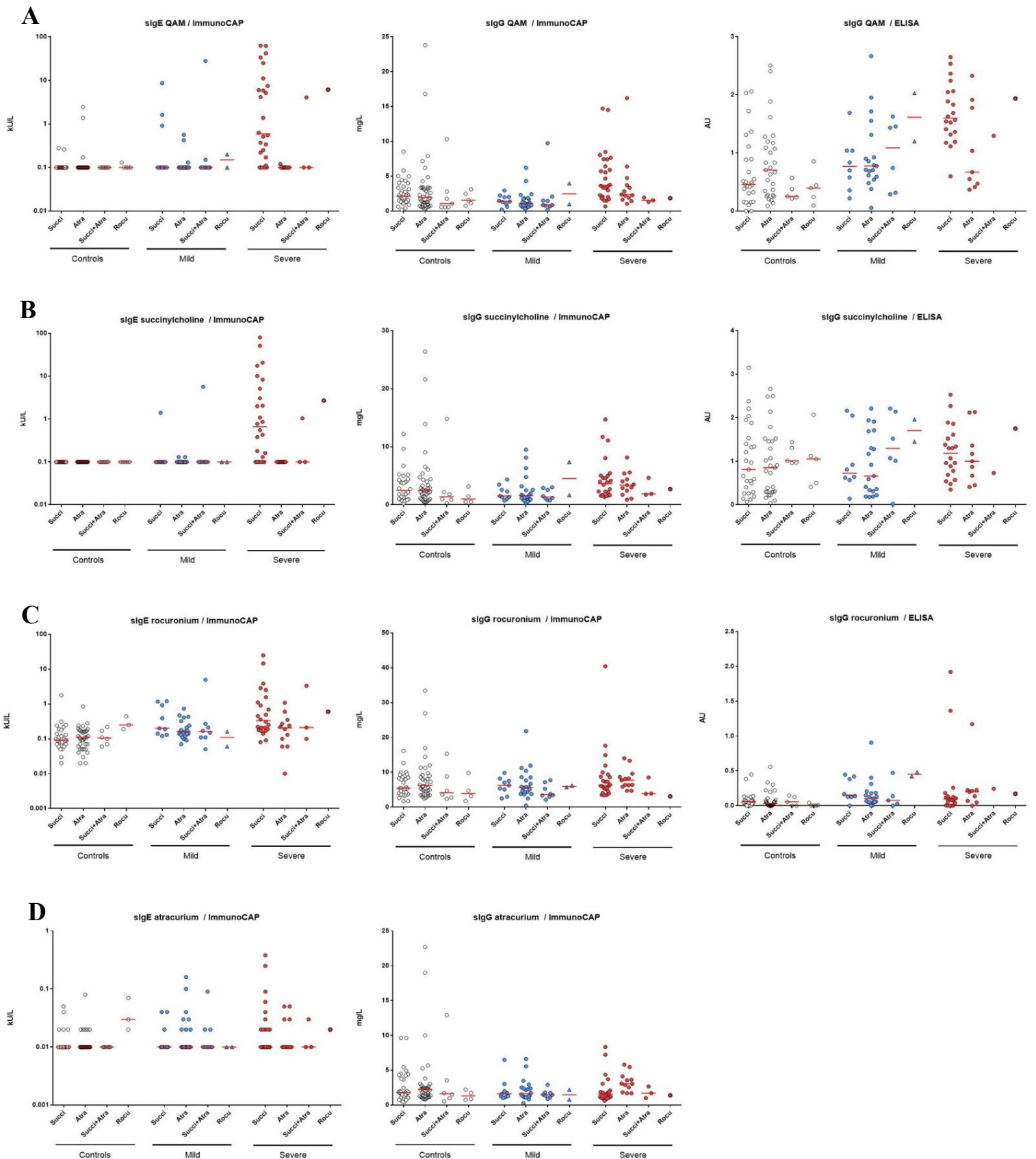
BSA, HSA, dried rocuronium, EDC, sulfo-NHS and 5-alpha-dihydrotestosterone were obtained from Sigma-Aldrich. Diisopentyl succinate was from Ak Scientific. KLH was from ThermoFisher. Soluble succinylcholine, rocuronium and atracurium were respectively from Biocodex, MSD France and GlaxoSmithKline. We used CHO transfectant cells expressing comparable levels of FLAG-tagged human IgG receptors variants, as previously described.⁴⁴

Flow cytometry analyses

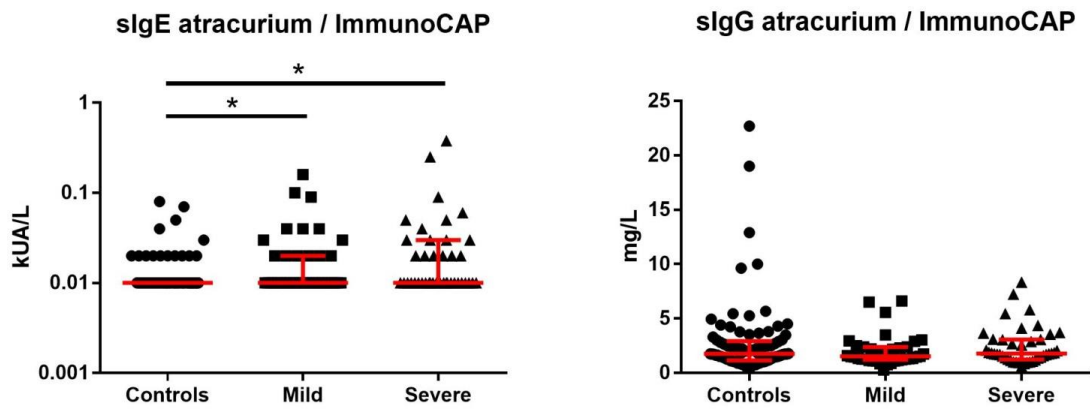
To analyze the ability of the purified antibodies to fix human IgG receptors in a monomeric form, we incubated hFcγRI CHO transfectant cells during 15 minutes at 4°C with the antibodies. After two washing steps with MACS buffer, cells were incubated during 30 minutes at 4°C with a secondary antibody (Goat anti-Human IgG (H+L), Alexa Fluor® 647, ThermoFisher) allowing FACS analysis after additional washing steps. For Immune Complexes (IC) fixation, hFcγRIIIA V158 CHO transfectant cells were incubated during 30 minutes at 4°C with preformed IC (made of rocuronium-sIgG 4 µg/ml and HSA-Rocuronium-FITC labeled 2 µg/ml agitated during 30 minutes at 37°C). After two washing steps with MACS buffer, fixations were analyzed by FACS (Supplemental Figure 6).



Supplementary Figure 1: Protocols of NMBA-derivative synthesis and chemical structure of the analogues. A/Succinic anhydride was added to rocuronium anhydride in the presence of dimethylaminopyradine in pyridine to allow the production of a stable rocuronium-derivative that possesses a carboxyl group. B/Heat up of choline chloride and succinic anhydride leads to the synthesis of succinylmonocholine. Chemical structure of the analogues of rocuronium and succinylcholine: C/5 α dihydrotestosterone and D/Diisopentyl succinate.



Supplementary Figure 2: Specific antibodies displayed different incidences according to the neuromuscular blocking agent infused. Evaluation of sIgE and sIgG ImmunoCAP and ELISA measurement against A/QAM, B/Succinylcholine, C/Rocuronium and D/Atracurium according to the NMBA infused during anesthesia and according to the severity group.



Supplementary Figure 3: ImmunoCAP measurement of sIgE and sIgG against atracurium.
 Analyses were performed using the Mann & Whitney *U* test. * $p < 0.05$.

DISCUSSION

1 Endotype et phénotype des réactions aiguës d'hypersensibilité

L'allergie et les pathologies atopiques sont devenues un problème majeur de santé publique, avec une incidence croissante depuis les 20 dernières années. Devant ces enjeux, des efforts en termes de caractérisation des pathologies concernées ont été réalisés. Le problème majeur constitué par les allergies est leur absence de prévisibilité et leur variabilité intra et inter-individuelle. On parle d'endotype pour décrire les mécanismes physiopathologiques d'une pathologie, alors que le phénotype représente l'expression clinique d'une maladie. Plusieurs endotypes peuvent avoir un même phénotype, et inversement. A ce jour, il n'existe pas d'endotype défini décrit précisément dans la littérature concernant les pathologies allergiques, hormis pour certaines catégories d'asthme [162]. Certaines équipes préfèrent même évoquer un « endotype complexe » soulignant l'ensemble des interactions et facteurs contribuant au développement d'une pathologie allergique (Figure 18) [163]. Les explorations allergologiques classiques analysent un nombre limité d'éléments de l'endotype (comme les IgE ou les mastocytes via les tests cutanés). Hors ces éléments ne sont qu'un fragment de l'endotype et ne permettent pas toujours de faire le diagnostic positif avec identification de l'allergène responsable d'un phénotype. Certaines hypothèses à l'origine de cette distinction endotype/phénotype dans l'allergie font l'objet de cette section.

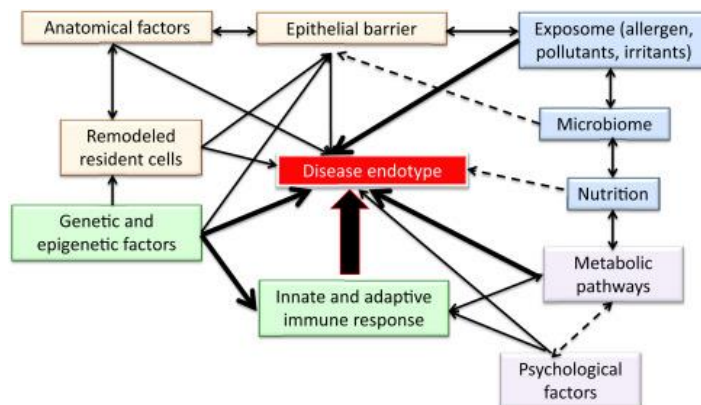


Figure 18 : Facteurs intervenant dans l'endotype d'une pathologie allergique [163].

1.1 Présence d'anticorps et manifestation clinique d'hypersensibilité

La présence et la quantité d'IgE spécifiques ne sont pas les seuls facteurs intervenant aussi bien *in vitro* dans la libération d'histamine par des basophiles humains [164] qu'*in vivo* dans les manifestations clinique chez l'homme. De même, la présence de tests cutanés positifs n'est pas strictement corrélée avec une expression clinique de l'allergie [165]. C'est pour cela que d'après l'ensemble des recommandations internationales, le diagnostic d'allergie est établi d'après les résultats

des explorations *in vitro* et/ou *in vivo* mais en prenant en compte l'anamnèse et les signes cliniques. La seule information « présence d'IgE » n'est donc ni la seule composante d'un endotype ni la seule condition suffisante à l'induction d'une manifestation clinique.

Les études s'accordent pour affirmer que la sensibilisation à des antigènes de l'environnement augmente avec l'âge (Figure 19A) [1, 166]. Hors cette évolution n'est pas en faveur d'une relation entre sensibilisation IgE et certaines pathologies atopiques dont l'incidence est décroissante avec l'âge, comme l'eczéma, l'asthme ou la dermatite atopique, faisant donc débat dans la littérature (Figure 19B) [2, 166]. Dans l'allergie alimentaire, les données épidémiologiques concordent avec une sensibilisation plus importante dans l'enfance ainsi qu'une incidence de l'allergie alimentaire environ 2,6 fois plus fréquente chez l'enfant [167], avec également un sur-risque d'anaphylaxie [168].

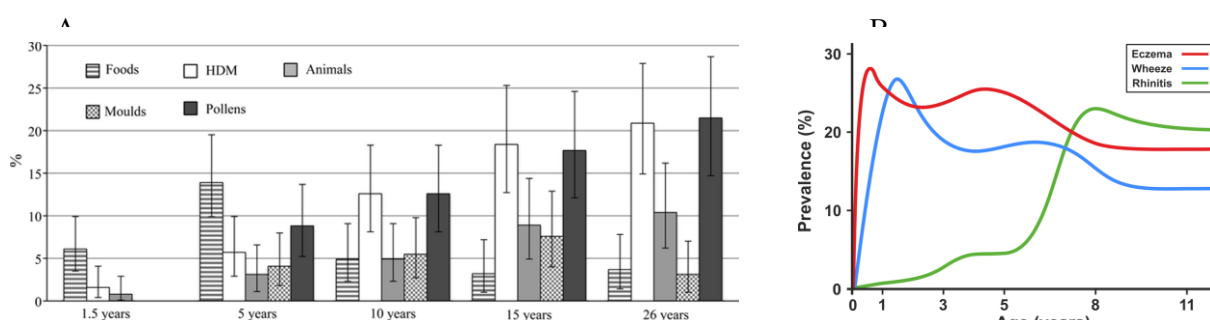


Figure 19 : A/ Sensibilisation en fonction de l'âge dans une cohorte de 193 patients, définie par la présence d'IgE spécifiques supérieures à 0.35 kU/l. Foods = œufs, lait de vache. HDM (House Dust Mite) = Acariens. Animals = chien, chat, cheval. Moulds = moisissures. Pollen = bouleau, ambroisie, herbe. [1], avec autorisation. B / Prévalence de l'eczéma, de l'asthme et de la rhinite dans des données combinées provenant de deux cohortes incluant au total 9801 enfants. [2], avec autorisation.

1.2.1 Hypothèse hygiéniste dans le développement de l'allergie

L'hypothèse hygiéniste suggère que la diminution de l'incidence des infections pendant l'enfance favorise le développement de pathologies auto-immunes et d'allergies [169]. Toutes les pathologies atopiques semblent concernées, mais aussi le diabète de type 1, qui surviendrait de façon plus précoce, ou la sclérose multiple. Cette hypothèse a été basée notamment sur des modèles animaux, mais aussi sur des analyses épidémiologiques réalisées sur des populations humaines ayant migrées: des populations dans un environnement peu allergique devenaient allergiques dès la première génération dans un environnement avec une incidence forte d'allergies. Les études épidémiologiques montrent des relations inversement proportionnelles entre l'incidence de l'allergie et les infections chez l'enfant (notamment par le virus de l'hépatite A, les parasitoses et les gastroentérites aiguës). Parmi les autres facteurs pouvant influencer l'augmentation de l'incidence/prévalence des allergies, ont été évoqués l'amélioration des conditions sanitaires (et donc la diminution de l'exposition précoce à différents allergènes), les facteurs socio-économiques (relation proportionnelle entre le PIB et l'incidence de l'asthme), la pollution aérienne, l'exposition au tabac, l'alimentation maternelle pendant la vie in-utero mais aussi individuelle (avec un effet du microbiote intestinal sur le développement du système

immunitaire et l'intégrité de la barrière intestinale) ou encore une trop faible exposition à la vitamineD.

Pour étayer cette hypothèse, des études épidémiologiques multicentriques internationales ont été réalisées. Une exposition précoce, même anténatale, à une vie à la ferme permettait de diminuer l'incidence de l'asthme, du rhume des foins et de l'immunisation à des allergènes aériens (acariens, graminées, bouleau, poils de chat, vache) [170, 171]. De plus, la prévalence d'IgE dirigées contre « Fel d 1 » (glycoprotéine *fel d1*, sécrétée par les glandes lacrymales, sébacées, salivaires et péri-anales des chats), responsable d'allergie aux chats et d'asthme, était plus importante parmi les familles ne possédant pas de chats dans leur foyer, suggérant que l'exposition précoce à cet allergène induisait une tolérance immunitaire ne passant pas par les IgE [172]. Récemment, une étude israélienne a montré qu'une exposition précoce répétée à des extraits de cacahuète chez des nouveau-nés à risque diminuait le risque de développement de pathologies atopiques [173].

1.2.2 Epigénétique et allergie

L'épigénétique étudie les modifications de l'ADN, induites par l'environnement, responsables de modifications d'expression des gènes, transmises au cours des divisions cellulaires (et donc au cours de la reproduction), réversibles mais dont certaines peuvent être pérennes, sans modifications de la séquence de l'ADN. A l'origine de l'hypothèse d'une implication épigénétique dans l'allergie, se trouvent les études épidémiologiques suggérant une incidence plus importante des pathologies atopiques ou des sensibilisations/allergies alimentaires parmi les enfants nés en automne ou en hiver [174]. Récemment, des chercheurs ont montré que la saison de naissance, et donc l'environnement, entraîneraient des différences de méthylation de l'ADN, acquises en post-natal, reliées à une prédisposition au développement de pathologies atopiques [175]. De nombreuses modifications épigénétiques, toutes distinctes, ont été identifiées dans l'allergie alimentaire [176-178], l'asthme allergique [179] ou l'eczéma [180]. L'épigénétique n'est probablement qu'une des expressions d'une influence environnementale majeure. Plus que ces modifications, je pense que les expositions précoces aux pathogènes, microbiens ou non, sont déterminantes sur le développement des pathologies atopiques.

Ensemble, ces données soutiennent un rôle effectif de l'environnement dans la participation aux endotypes complexes de l'allergie. Comme évoqué précédemment, la liste des facteurs impliqués est extrêmement longue. Il est très probable que ceux-ci aient des répercussions, tant sur l'endotype que sur le phénotype du choc des patients analysés dans l'étude NASA. Celle-ci n'ayant pas été conçue dans cet objectif, la seule conclusion que nous pouvons raisonnablement faire est que les facteurs environnementaux ont probablement une influence dans les réactions observées chez nos patients, sans que nous ne puissions en évaluer leurs effets.

1.3 Affinité des anticorps et déclenchement d'une réaction d'hypersensibilité

Lors de la maturation des lymphocytes B produisant des anticorps spécifiques, l'augmentation d'affinité de ces anticorps pour leur cible (un antigène par exemple) est une étape majeure. La réponse immunitaire chez l'homme est, par essence, polyclonale : production et sécrétion d'anticorps dont chacun a sa propre affinité pour l'antigène. Ceci conduit à des répertoires d'anticorps différents, même s'ils sont dirigés contre le même antigène. Il est de plus reconnu qu'une exposition antigénique peut entraîner non seulement la production d'IgE mais aussi d'IgG spécifiques. Le rôle des IgE par rapport au rôle des IgG dans l'allergie fait débat dans la littérature [181, 182]. Chez des patients présentant un asthme allergique, la quantité d'IgG spécifiques étaient 10 à 500 fois supérieure à celle des IgE spécifiques [183, 184]. Néanmoins, le fait que les IgG soient protégées du catabolisme par le récepteur FcRn, alors que les IgE ne le sont pas, peut expliquer cette différence quantitative. En effet, la demi-vie d'une IgG sérique est estimée entre 14 et 21 jours alors que celle de l'IgE sérique est estimée entre 2 et 4 jours. L'absence totale d'IgE ou d'IgG spécifiques anti-allergène est donc nettement plus informative qu'une différence de concentration sérique entre ces deux classes d'anticorps.

L'affinité d'un anticorps se mesure par sa constante d'association K_A pour un antigène donné ou par sa constante de dissociation K_D (l'une étant l'inverse de l'autre). Plus la constante de dissociation est forte, plus l'affinité est faible, et inversement. Une forte ou une faible affinité des anticorps pour leur antigène cible pourrait être responsable de la présence ou de l'absence d'effets cliniques lors de l'introduction de l'antigène. Beaucoup d'études s'accordent pour dire qu'en plus de l'affinité, la diversité du répertoire IgE, et donc d'épitopes reconnus, est associée à une influence plus importante sur la symptomatologie clinique [185-188]. La spécificité et la diversité du répertoire des IgG anti-AQ, et notamment de son acquisition, font l'objet de la section 2 de cette discussion.

La présence d'IgE spécifiques d'un allergène est nécessaire à l'induction d'une activation des cellules effectrices/cibles exprimant des récepteurs pour les IgE (FcεRI) en présence de cet allergène. Ainsi, chez des patients asthmatiques ou allergiques aux acariens (antigène « Der p 2 »), la sensibilité des basophiles humains (définie comme la concentration la plus faible d'antigène capable d'induire la libération d'une concentration donnée d'histamine) était associée à l'affinité des IgE spécifiques présentes dans le sérum/plasma de ces patients. La réactivité des basophiles (définie comme la concentration maximale d'histamine libérée par une concentration donnée d'antigène) n'était pas influencée par les modifications d'affinité des IgE vis à vis de l'allergène [189, 190]. De façon intéressante, la présence d'une seule IgE de haute affinité était nécessaire pour former un complexe capable d'activer les basophiles. De même, il a été proposé que l'affinité des IgE soit associée à la positivité des tests cutanés chez des patients allergiques à l'ambrosie et aux acariens [191]. Il semble donc que des IgE de forte affinité mais en faibles quantités soient suffisantes à l'induction d'une réaction allergique, même si les dosages sériques ne permettant pas d'évaluer ce paramètre. Si l'affinité des IgE joue un rôle limitant dans l'induction de la réaction clinique, on peut envisager son

rôle important dans la distinction endotype/phénotype en distinguant des patients sensibilisés des patients allergiques.

La grande majorité des études ont démontré une affinité des IgE pour l'allergène supérieure à celle des IgG, avec des facteurs allant de 10 à 10 000 en fonction des études, concernant : l'ambroisie (antigène « Amb a 5 » et « Amb a 1 ») [192, 193], le pollen (antigène « Phl p 5a »), le bouleau (antigène « Bet v 1a ») [194], ou les poils et squames de vache [183, 184]. Cependant, la très grande supériorité en termes de concentration sérique des IgG par rapport aux IgE (1000-10000 fois) pourrait compenser les différences d'affinité observées dans la littérature entre ces deux types d'anticorps, sauf si un « seuil » d'affinité existe pour chaque antigène (voir paragraphe précédent) et détermine si une interaction antigène-anticorps résulte en une activation cellulaire. Cette question n'est à ce jour pas résolue et nécessite probablement l'application de technologies à haut-débit de caractérisation des anticorps circulants afin d'y répondre [195].

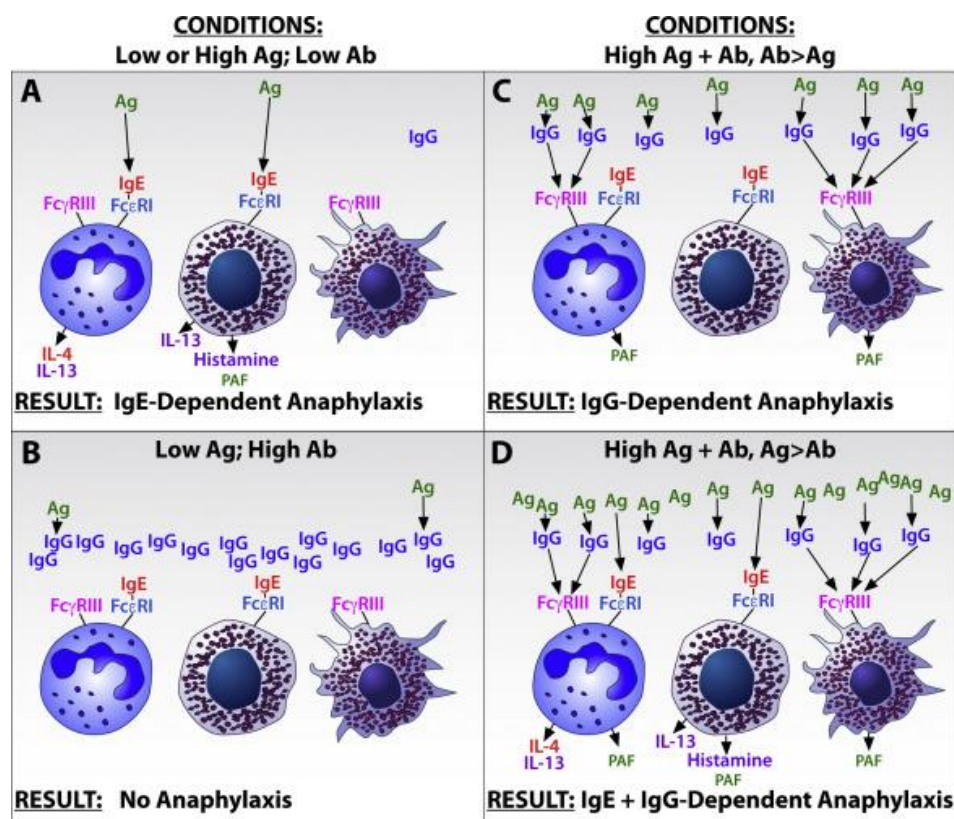


Figure 20 : Représentation schématique du rôle des concentrations relatives en antigènes (Ag) et en anticorps (Ab) déterminant une réaction d'hypersensibilité IgE et/ou IgG-médiée [79], avec autorisation.

Finkelman *et al* ont proposé quatre situations déterminant l'induction d'une voie IgE et/ou IgG-médiée aboutissant à une réaction anaphylactique (Figure 20) : A/ une faible exposition à l'allergène (Ag) d'un patient ayant peu d'anticorps anti-allergène entraîne une réaction de type IgE, B/ une faible exposition à l'allergène d'un patient ayant eu une forte induction d'anticorps ne va pas générer de réaction clinique : l'allergène est « absorbé » par l'excès d'anticorps, C/ l'exposition forte à l'allergène et la forte présence d'anticorps entraînent une réaction de type IgG, D/ une exposition très forte à

l'allergène et une forte présence d'anticorps, mais avec une concentration supérieure d'allergènes, permet une réaction mixte IgE et IgG, car tous les allergènes ne sont pas « absorbés » par les IgG, et permettent aux IgE d'en capter [79]. La prise en considération dans ce modèle de l'affinité des IgG complexifie l'analyse et rend une réaction IgG médiée encore plus rare. En effet, si l'affinité des IgG est très faible, la situation C va plutôt engendrer une réaction de type IgE. Une réaction médiée par les IgG n'apparaîtrait donc chez l'homme que si, non seulement les quantités d'anticorps et d'antigènes sont élevées, mais aussi si l'affinité des IgG est forte.

Comme évoqué précédemment, la réponse immunitaire chez l'homme se caractérise par un répertoire d'anticorps polyclonaux d'affinités différentes. Au sein d'un même individu, se pose alors la question des relations entre manifestations cliniques et affinité des différents isotypes et sous-classes pour l'allergène. En analysant les patients avec une allergie aux protéines de lait de vache, les patients devenus tolérants aux protéines chauffées (ce qui est considéré comme une forme de désensibilisation) avaient des concentrations d'IgE spécifiques supérieures aux patients devenus tolérants, mais leurs concentrations en IgG4 spécifiques étaient comparables. Par contre, les patients allergiques avaient des IgE qui possédaient non seulement un répertoire plus large, mais également une affinité supérieure, celle-ci étant associée à la sévérité clinique de leur pathologie [196]. De façon comparable, au cours d'un suivi pendant neuf ans, des enfants devenus tolérants aux protéines de lait de vache présentaient une réduction d'affinité et de diversité du répertoire des IgE spécifiques de façon concomitante à une augmentation de l'affinité et du répertoire des IgG4 spécifiques [197]. Dans le cadre de l'allergie à l'ambrosie, des auteurs ont analysé les caractéristiques d'IgE, d'IgG1 et d'IgG4 spécifiques parmi des patients atopiques avec ou sans allergie à l'ambrosie (groupes A et B) et des patients non atopiques (groupe C) [193]. Les patients des trois groupes présentaient des IgG spécifiques, alors que seuls les patients du groupe A avaient des IgE spécifiques. Dans le groupe A, les IgE spécifiques étaient de très haute affinité alors que les IgG1 et IgG4 avaient une affinité 10 fois inférieure. Les affinités des IgG4 des groupes B et C étaient supérieures à celles du groupe A. Les IgG1 spécifiques du groupe C avaient une affinité comparable aux IgE spécifiques du groupe A. Néanmoins, le fait que ces études soient réalisées à partir de sérum de patients, contenant donc des IgG polyclonaux, pourrait expliquer ces résultats, ce d'autant que les concentrations d'IgG spécifiques ne sont pas évaluées. Par ailleurs, il s'agit principalement d'études d'immunofluorescence d'inhibition, sans vraie mesure des KD ou KA. Ce sont ces hypothèses qui ont conduit à proposer l'éviction alimentaire comme stratégie thérapeutique dans l'allergie. Après primo-immunisation, les lymphocytes B mémoires spécifiques sont présents dans la circulation permettant, lors de la réintroduction de l'allergène, une réponse plus rapide avec production d'anticorps d'affinité croissante. L'éviction alimentaire permettait en évitant de nouvelles stimulations des lymphocytes B de diminuer l'affinité des anticorps et ainsi l'intensité des réactions cliniques. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'efficacité des thérapies de désensibilisation puisse passer, non seulement par la production d'IgG4, mais aussi par des

modifications des affinités entre isotypes. La compétition entre IgE et IgG de faibles ou de fortes affinités pourrait être responsable des manifestations cliniques observées.

Ces considérations sur les différences d'affinités entre classes d'anticorps et la reconnaissance croisée d'épitopes avec une répercussion clinique notamment au cours de la désensibilisation, qu'elle soit spontanée ou médicale, soulèvent quelques questions quant aux patients de l'étude NASA/IPAAQ. Dans l'étude NASA, la quasi-totalité des patients présentent des IgG anti-SMC, sans distinctions ni entre patients témoins et patients cas, ni en fonction des grades des réactions observées, ce qui pourrait être expliqué par l'hypothèse d'une faible affinité de ces IgG. La présence d'IgG anti-SMC ne générerait d'effet clinique lors de l'introduction de l'allergène que chez les patients ayant des anticorps de haute affinité, ce qui ne peut être évalué de manière discriminative aisément par des tests ELISA. Il serait donc intéressant de caractériser les IgG anti-curare des patients cas ou témoins (qui en ont les titres les plus élevés) : l'idéal serait d'obtenir une quantité de sérum suffisante de sérum pour purifier les anticorps afin de réaliser les études de leurs propriétés même si ces études portent sur des lots d'IgG purifiés polyclonaux: site de liaison, affinité, sous-classes... On pourrait en effet faire l'hypothèse que l'absence de réactions cliniques chez les patients avec des fortes concentrations d'IgG anti-SMC puisse être liée à une sous-classe majoritaire d'IgG4 jouant un rôle protecteur comme cela est proposé lors de la désensibilisation allergique. On pourrait également supposer un déséquilibre entre IgG1/3 et IgG4 anti-curare entre les patients cas de grades 1 ($\text{IgG4} > \text{IgG1/3}$) par rapport à ceux de grades 4 ($\text{IgG1/3} > \text{IgG4}$), ce qui contribuerait à la gravité de la manifestation clinique. D'autre part, l'acquisition d'anticorps de haute affinité se faisant au cours de la maturation de la réponse immune, on peut supposer que le développement d'une haute affinité en réponse à des stimulations antigéniques répétées se fasse de façon parallèle pour les IgE et pour les IgG. La présence d'une haute affinité participerait donc à la gravité de la manifestation clinique, tant en augmentant la stimulation de la voie IgE que celle de la voie IgG dans les situations de fortes présences en allergène et en anticorps (situations C et D de la Figure 20).

Au bloc opératoire, la raison pour laquelle un patient va présenter un choc grave, un arrêt cardio-circulatoire, un bronchospasme ou juste un érythème représente une réelle interrogation en pratique clinique. Pouvoir explorer les spécificités des anticorps d'un patient permettrait peut-être de relier ces informations à une définition mécanistique des événements cellulaires conduisant au choc anaphylactique de ce patient. De nombreuses interrogations persistent quant aux différents signes cliniques observés lors des RAH et à leurs mécanismes sous-jacents. Ainsi, alors que 95% des patients de l'étude NASA présentent des manifestations hémodynamiques (définies par tachycardie, bradycardie ou hypotension artérielle), seuls 33% et 32% dans nos deux cohortes indépendantes de patients (respectivement NASA et dans l'étude sur le lien bronchospasme et asthme au cours des RAH) présentent un bronchospasme [198]. L'une des hypothèses apportées dans la discussion de ce dernier était la possibilité d'un rôle particulier des curares au niveau des récepteurs muscariniques

bronchiques. Or, l'absence d'une incidence plus élevée dans une étude conçue pour inclure des patients avec une réaction aux curares (étude NASA) ne semble pas soutenir cette hypothèse. Lors des RAH aux anticorps thérapeutiques, des réactions différentes ont été rapportées pour des mêmes patients mais à des moments différents. Il est cependant probable que certains médiateurs soient plus ou moins impliqués dans certaines manifestations cliniques, nécessitant des explorations physiopathologiques sur les médiateurs lipidiques (PAF, leukotrienes, ...) et protéiques (enzymes, cytokines, chemokines) responsables et/ou favorisant les chocs.

2 Sensibilisation aux ammoniums quaternaires : l'hypothèse de l'environnement

Les différentes séries rapportent que 40 à 50% des patients en Australie [51] et 19% en France [199] présentant une RAH aux curares n'y avaient jamais été exposés. Cette constatation s'opposant au dogme en immunologie de la primo-exposition responsable de la production d'anticorps spécifiques, l'hypothèse d'une sensibilisation par des composés de l'environnement a été développée dès le début des années 1980. Elle se base notamment sur les capacités de sensibilisation via la peau ou les muqueuses démontrées tant pour la cacahuète [200], la viande via les piqures de tique [201, 202], que pour les vaccins [203-205].

2.1 La présence des groupements ammonium quaternaires dans l'environnement

De par la présence d'une charge électrique positive, les AQ possèdent des propriétés tensio-actives importantes. Cela leur confère également un pouvoir bactéricide, fongicide, virucide, voire algicide. Au niveau bactérien, l'action se fait par adsorption au niveau de l'enveloppe externe des bactéries à gram positif qui est chargée négativement (ils ont une activité moindre sur les bactéries à gram négatif). Ces différentes caractéristiques expliquent leur utilisation large tant dans les nettoyants ménagers comme industriels, les antiseptiques hospitaliers (de surface tout comme des instruments médicaux) que dans des antiseptiques cutané-muqueux (peau saine avant chirurgie par exemple comme peau lésée), dans des sprays antiseptiques nasaux/oraux ou même dans des pastilles antiseptiques pour la gorge. L'utilisation comme conservateur explique également leur abondance dans les cosmétiques, les préparations pharmaceutiques ou les médicaments [38].

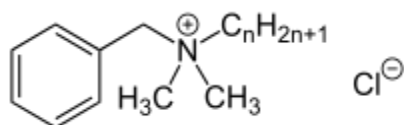


Figure 21 : Formule chimique du chlorure de benzalkonium.

Le chlorure de benzalkonium est l'un des composés le plus répandu (Figure 21). Il est notamment retrouvé dans des collyres ophtalmiques, des solutions de conservation de lentilles, des antiseptiques nasaux, des bains de bouches, des crèmes spermicides, des antiseptiques cutanés ou des agents de

stérilisation d'instruments médicaux.

Pour exemple, la marque Anios® qui est largement présente dans le milieu hospitalier comporte des composés porteurs de groupements AQ dans la grande majorité de ses produits. La large présence de ces composés dans l'environnement et la possibilité d'immunisation par voie cutanée, muqueuse comme aérienne pourrait donc expliquer la présence d'anticorps anti-AQ chez des patients n'ayant jamais reçu de curares. Dans l'étude NASA, 85% des patients avaient déjà subi une anesthésie générale. Il est très rarement possible d'obtenir par les patients l'information « exposition antérieure aux curares ». Cependant, on peut supposer que celle-ci soit relativement élevée compte-tenu de la très large utilisation des curares lors d'une anesthésie générale. Cette proportion élevée de pré-exposition est donc en accord avec ce qui avait été précédemment décrit dans la population française.

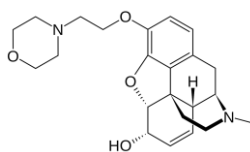


Figure 22 : Structure chimique de la pholcodine.

Une autre hypothèse avancée quant à la sensibilisation aux AQ est liée à la présence de pholcodine (Figure 22), un dérivé de morphine, dans la composition de sirops anti-tussifs, dont l'efficacité est reconnue, particulièrement chez les enfants. Son rôle comme agent de sensibilisation aux curares a été suggéré à partir d'études épidémiologiques comparatives révélant une incidence 10 fois supérieure en Norvège qu'en Suède de l'incidence des RAH aux curares et de la présence d'IgE anti-AQ [54]. Son retrait du marché en Norvège a permis une diminution de l'incidence des chocs anaphylactiques aux curares [206], les auteurs recommandant l'éviction des sirops en contenant dans d'autres pays [207]. L'étude multicentrique ALPHO (« Allergy to Neuromuscular Blocking Agents and Pholcodine Exposure ») est en cours afin d'évaluer ces relations en France. Les détracteurs de l'hypothèse de la pholcodine soulignent l'absence de démonstration de réels liens biologiques directs dans une étude purement épidémiologique, ainsi que l'absence de corrélation entre présence d'IgE anti-AQ et risque allergique [208, 209]. Il est à noter que ces études ne considèrent pas la possibilité de participation des IgG anti-AQ, ce qui diminue la portée de cette absence de corrélation entre IgE anti-AQ et risque allergique. De même, les opposants de l'hypothèse environnementale de sensibilisation aux AQ soulignent la rareté des réactions allergiques directes aux produits ménagers ainsi que des allergies à la morphine. Cependant, afin de développer une réaction allergique, qu'elle soit IgE ou IgG, une certaine quantité d'exposition à l'antigène/allergène est nécessaire. Il est probable que les doses environnementales d'AQ ne suffisent pas à induire des symptômes cliniquement détectables. Cependant, comme lors des désensibilisations, on peut envisager qu'une exposition répétée et régulière puisse augmenter les concentrations et les affinités des anticorps, conduisant donc à une manifestation clinique lors de l'introduction d'une quantité suffisante d'antigène, comme lors d'une

anesthésie générale. Concernant la morphine, les opioïdes sont des médicaments histaminolibérateurs non spécifiques, pouvant également entraîner, via la stimulation du système nerveux parasympathique, une bradycardie et une hypotension artérielle, pouvant rendre difficile la distinction entre réactions d'hypersensibilité allergique et non allergique. Les allergies vraies à la morphine sont extrêmement rares, sans que les raisons n'en soient élucidées [210]. C'est cette rareté qui rend possible l'utilisation de la morphine comme antigène de détection des anticorps anti-AQ. Les propriétés histaminolibératrices de la morphine sont par ailleurs responsables de grandes difficultés diagnostiques des vraies allergies IgE-médiées à la morphine avec une insuffisance diagnostique des tests cutanés [211]. Bien que la physiopathologie reste à déterminer, l'hypothèse environnementale de l'immunisation aux AQ semble donc argumentée.

2.2 L'identification d'anticorps anti-ammonium quaternaires et des réactions croisées

De nombreuses études rapportent l'existence de réactions croisées entre des anticorps de patients ayant présenté des RAH aux curares et des composés porteurs de groupements ammonium tertiaires ou AQ. Ces réactions croisées sont largement décrites au sein de la famille des curares [56, 77, 212]. Des IgE anti-succinylcholine identifiées chez des patients après survenue d'un choc anaphylactique à ce curare avaient des réactions croisées à cinq substances riches en AQ (trois cosmétiques et deux désinfectants contenant cetrimide et benzalkonium) [213]. Récemment, une étude a mis en évidence une concentration environ cinq fois supérieure d'IgE anti-AQ (mesurée par méthode de radio-immunoassay à la choline, avec inhibition spécifique par la succinylcholine) chez des coiffeurs (exposés notamment aux chlorures de benzalkonium et aux polyquaternium) par rapport à des professions de boulangers/pâtisseries ou à une population contrôle [214]. Une cohorte française de 258 patients rapporte une incidence de 9% de sensibilisation IgE aux AQ (TC et/ou IgE anti-AQ positifs), parmi lesquels 67% avaient des antécédents d'anesthésie générale mais un seul avait présenté une RAH aux curares [215]. L'étude NASA est concordante avec, parmi les témoins inclus, 6% présentant une immunisation de type IgE aux AQ. Les concentrations d'IgG anti-AQ sont difficiles à évaluer compte-tenu de l'absence de valeur seuil établie. L'équipe du Pr Sylvie Chollet-Martin (Hôpital Bichat et Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry) a établi une valeur seuil à 3 mg/ml d'après une analyse par courbe ROC (« Receiver Operating Characteristic ») sur une cohorte de patients ayant présenté une RAH aux curares et des patients sains (données non publiées). En prenant en compte cette valeur seuil, 31% des patients cas comme des témoins de l'étude NASA présentent des IgG anti-AQ.

Notre unité a utilisé un modèle de souris produisant des IgG1 humaines à la place des IgM de souris, appelées Gammaprim (provenance : Pr Michel Cogné, Université de Limoges ; non publié), immunisées contre le rocuronium. Ces souris présentaient toutes des IgG1 humaines anti-rocuronium mais leur concentration pouvait varier d'un facteur 1000 d'une souris à l'autre. Ces hIgG1 anti-rocuronium présentaient toutes des réactions croisées d'amplitude variable avec la succinylcholine.

Sur les six souris testées, seule une présentait une réaction croisée avec l'atracurium. Ces observations sont intéressantes, car elles suggèrent que, même dans un modèle standardisé avec des animaux nourris et élevés de façon identiques, exposés aux mêmes composés, au patrimoine génétique identique, la réponse anticorps varie, tant dans son amplitude que dans l'importance de son répertoire. Le développement d'un modèle de choc anaphylactique au rocuronium chez ses souris est en cours de développement dans notre unité. Il serait intéressant d'y évaluer la sévérité du choc en fonction des caractéristiques observées des hIgG1 anti-curare, tant en intensité qu'en réactions croisées.

Chez des patients présentant une allergie documentée par tests cutanés et/ou test d'activation de basophiles (TAB) aux quinolones (molécules porteuses d'au moins deux groupements ammonium tertiaire), une immunisation croisée aux AQ était retrouvée chez 53% des patients [216]. Lors des tests ELISA d'inhibitions effectués sur les IgG anti-curares identifiées dans l'étude NASA/IPAAQ, une inhibition spécifique du signal était obtenue de façon concentration dépendante avec le curare concerné et non avec son analogue (molécule chimique de même configuration mais ne comportant pas de groupement AQ ; ex : rocuronium et 5-alpha-dihydrotestostérone). Une analyse spécifique a été réalisée pour le rocuronium à pH 9.6 pour induire la présence de groupements tertiaires, permettant d'observer également une inhibition dose dépendante du signal (ce qui est en accord avec des précédentes publications sur la reconnaissance des AT comme des AQ par ces anticorps) [43, 45]. Le suggamadex (Bridion®) est une cyclodextrine dont l'une des propriétés est la réversion de la curarisation induite par le rocuronium par encapsulation lors des anesthésies générales [217]. Il serait intéressant d'utiliser du suggamadex lors des ELISA d'inhibition des IgG anti-rocuronium purifiées (article n°2), pour rechercher si cette encapsulation bloque également la reconnaissance par les IgG anti-rocuronium des groupements AQ du Rocuronium.

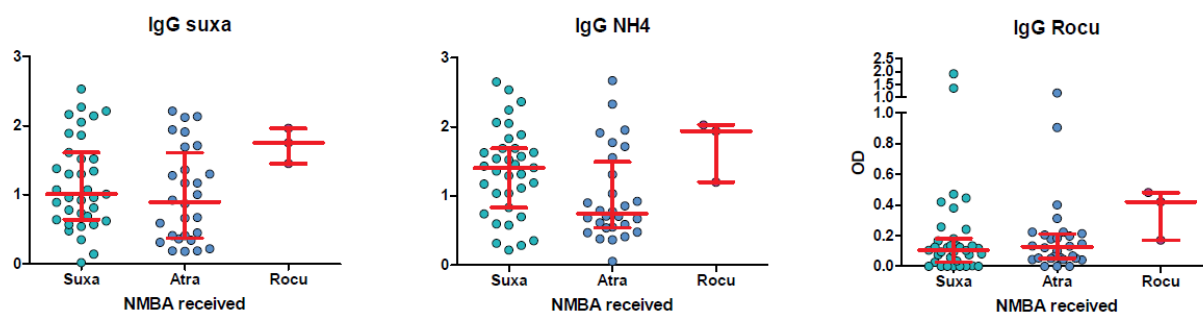


Figure 23 : Représentations des ELISA IgG anti-succinylcholine, anti-AQ et anti-rocuronium en fonction du curare administré (à la dilution de 1/100).

Les IgG identifiées chez les patients de l'étude NASA présentent également d'importantes réactions croisées, les ELISA anti-SMC ou anti-AQ n'étant pas différent que le patient ait reçu de la succinylcholine ou de l'atracurium (tous patients cas confondus, résultats identiques par mesure ImmunoCAP) (Figure 23). La quasi-totalité des patients présentent des IgG anti-SMC, sans distinctions ni entre patients témoins et patients cas, ni en fonction des grades des réactions observées. La SMC greffée sur la BSA étant constituée uniquement d'une courte chaîne carbonée avec un

groupement AQ (Figure 9) pourrait représenter un épitope largement présent et reconnu par une réaction croisée d'anticorps résultant d'une sensibilisation contre un autre antigène présentant un groupement similaire. Lors de la réalisation des ELISA d'inhibition, le sérum du patient ou les anticorps purifiés sont incubés dans les puits des plaques en même temps qu'un curare à une concentration donnée. Il s'agit d'un test de compétition pour les anticorps entre l'antigène adsorbé sur la plaque et l'antigène soluble. Les tests ELISA d'inhibition avec la SMC réalisés dans l'étude NASA/IPAAQ sont consistants avec une reconnaissance spécifique des groupements AQ. Cependant, ils sont peu spécifiques compte-tenu des structures chimiques non spécifiques de la succinylcholine et de son héli-molécule. La SMC représente donc un outil de travail imparfait pour la détection d'anticorps anti-curare, puisqu'elle ne contient que la moitié de la structure de la succinylcholine. Cette limite des ELISA IgG anti-SMC est d'autant plus évidente quand on la compare à la capacité discriminative de l'ELISA IgG anti-rocuronium. Ce dernier permet d'identifier quatre patients parmi toute la cohorte, significativement positifs, alors même que ces patients n'avaient pas reçu de rocuronium.. Lors des tests ELISA de spécificité réalisés sur les anticorps purifiés anti-rocuronium, seuls les antigènes adsorbés porteurs de groupements AQ présentaient une réponse IgG positive : le dérivé morphinique, la succinylcholine et le rocuronium, mais aussi le DNP (2,4,6-Dinitrophenyl) et le TNP (2,4,6-Trinitrophenyl), tous couplés à différentes protéines porteuses (BSA, HSA ou KLH). Inversement, le bouleau, les extraits de cacahuète, l'amoxicilline ou les protéines porteuses seules étaient négatifs. Les IgG purifiés anti-rocuronium dans notre étude sont donc spécifiques du curare avec une réaction croisée pour les groupements AQ d'autres molécules.

Dans l'étude NASA/IPAAQ, des réactions croisées sont identifiées pour les IgE mesurées par ImmunoCap. Les IgE spécifiques des patients ayant présenté une RAH après administration de succinylcholine sont polyréactifs, tant sur la succinylcholine, l'AQ que le rocuronium (mesure par immunoCAP). L'ImmunoCAP anti-atracurium ne semble pas être spécifique, aussi bien en fonction du curare administré que de la gravité (Figure 24). En revanche, les patients ayant présenté une RAH après administration d'atracurium semblent avoir des niveaux d'IgE très faibles, avec une très faible polyréactivité.

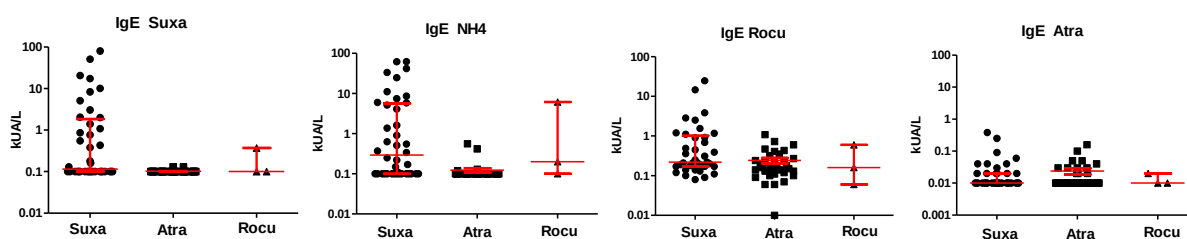


Figure 24 : Représentations des ImmunoCap IgG anti-succinylcholine, anti-AQ, anti-rocuronium et anti-atracurium en fonction du curare administré.

Alors que chez les patients de la cohorte NASA ayant présenté une RAH à la succinylcholine les IgE et IgG anti-curares identifiées sont polyréactives, ceux ayant présenté une RAH à l'atracurium ont

principalement des IgG polyréactives et des concentrations très faibles en IgE. Le test de référence pour le diagnostic d'allergie aux curares est le test cutané, notamment à cause de la faible sensibilité des dosages in vitro d'IgE spécifiques et de l'utilisation du dérivé de la morphine dans sa réalisation. Cependant, si on utilise comme critères de mécanisme IgE-dépendant un test cutané positif et/ou une tryptase positive (selon les critères diagnostics récents [35]), 44% des patients ayant présenté une RAH à l'atracurium présentent une voie IgE-médiée contre 67% pour les patients ayant reçu de la succinylcholine (Tableau 5). Soit respectivement 56% versus 33% des patients qui auraient donc soit une voie IgG médiée exclusive soit une absence de diagnostic (sans différence entre les incidences de grades de choc dans cette sous-population). Ces observations pourraient tout d'abord être liées à l'échantillonnage de patients dans la cohorte ou à la sensibilité des tests utilisés. L'atracurium ayant des propriétés histamino-libératrices non spécifiques pourraient induire des signes évocateurs sans réaction allergique vraie. Les types et contenus des granules libérées après activation des mastocytes dépendent en effet du stimulus initial, l'engagement du FcεRI engendrant des granules au contenu inflammatoire associées à des manifestations systémiques, alors que d'autres entraînent la libération de granules à effet local [218]. L'histamino-libération non spécifique ne pourrait être responsable de défaillance d'organe, de bronchospasme ou d'arrêt circulatoire, comme c'est le cas pour certains des patients ayant reçu de l'atracurium sans diagnostic IgE (grades 3-4). On pourrait également supposer que la sensibilisation à l'atracurium, qui a une composition chimique éloignée de la succinylcholine, puisse se faire par des composés de l'environnement différents, plus enclins à l'induction d'une immunisation de type IgG. Cette hypothèse est difficile à explorer mais si cette hypothèse était validée, l'analyse des patients ayant présenté une RAH à l'atracurium pourrait être particulièrement intéressante dans un objectif d'études des réactions aux curares IgG-médiées.

Tableau 5 : Résultats des explorations des tests cutanés et de la tryptase des patients de l'étude NASA, selon le curare administré.

	Test cutané aux curares positif et tryptase positive (n=29)	Test cutané aux curares positif et tryptase négative (n=11)	Test cutané aux curares négatif et Tryptase positive (n=7)	Test cutané aux bêta-lactamines positif (n=6)	Autres (n=33)
Patients ayant reçu de l'atracurium (n=47)	5	8	5	6	23
Patients ayant reçu de la succinylcholine (n=48)	23	5	3	2	15
Patients ayant reçu du rocuronium (n=3)	2	0	0	0	1

Ensemble, ces résultats de l'étude NASA confirment la co-existence d'IgE et d'IgG anti-curares chez les patients étudiés ; les deux types d'anticorps présentant des réactions croisées aux curares mais également aux molécules porteuses de groupements AQ. Les résultats obtenus par les ELISA IgG anti-QAM et anti-rocuronium sont particulièrement intéressants, même si une meilleure caractérisation de

ces anticorps, notamment en termes d'affinité, permettrait d'aider à l'exploration de leur implication dans la physiopathologie des RAH.

3 Participation des IgG et des polynucléaires neutrophiles dans les réactions d'hypersensibilité aiguë peropératoires

3.1 Apport des modèles animaux

Les études physiopathologiques sur l'anaphylaxie sont difficiles à conduire chez l'homme à cause de l'imprévisibilité de survenue des RHA ainsi que des délais très variables entre exposition à l'allergène, le début des manifestations cliniques et la récupération d'échantillons biologiques qui permettent de confirmer la RHA et la/les substances responsables mais aussi de réaliser des analyses biologiques supplémentaires. Les modèles animaux, malgré toutes leurs limites, sont donc une étape importante dans l'amélioration des connaissances des mécanismes physiopathologiques, notamment grâce à l'existence de souris transgéniques. Les IgG et leurs récepteurs partagent certaines analogies entre l'homme et la souris mais diffèrent également par certains aspects (voir détails en Annexe 3). Comme précédemment évoqué, l'anaphylaxie peut être induite de deux façons chez la souris : l'anaphylaxie systémique passive (PSA), où un anticorps spécifique est administré (24-48 heures pour les IgE ou 2-3 heures pour les IgG) avant induction d'une éventuelle anaphylaxie par injection intraveineuse de ce même antigène/allergène et l'ASA (voir Section 3). La survenue d'une anaphylaxie est évaluée par mesure de la température rectale (et par l'amplitude de l'hypothermie induite) et par analyse du comportement de la souris.

Chez la souris, l'induction de PSA par les IgE est dépendante des IgE, du mFcεRI [219], des mastocytes [220] et de l'histamine [221]. L'induction de PSA par des IgE ou des IgG entraîne une anaphylaxie de même sévérité. Chez la souris, la réponse immunitaire induite par des antigènes peptidiques produit principalement des IgG1 qui peuvent se fixer sur les récepteurs activateurs de faible affinité mFcγRIII, présents à la surface d'un grand nombre de cellules myéloïdes [222], et sur les récepteurs inhibiteurs de faible affinité mFcγRIIB [142]. L'induction de PSA par les IgG1 était inhibée chez des souris déficientes en mFcγRIII, avec une contribution du mFcγRIIB suggérant une implication de ces deux récepteurs. L'induction de PSA par les IgG1 n'était pas inhibée chez les souris déficientes en mastocytes [220] ou en basophiles [223], suggérant une implication d'autres types cellulaires dans ce modèle. Les PN murins expriment deux types de récepteurs activateurs aux IgG, les mFcγRIII et mFcγRIV, alors que les mastocytes et les basophiles n'expriment que le mFcγRIII comme récepteurs activateurs. Les études ont montré que le modèle de PSA induite par les IgG2 était dépendant des PN via l'activation du mFcγRIV [81]. Ces résultats suggèrent donc un rôle d'autres types cellulaires, et notamment des PN, dans l'anaphylaxie (voir revue en Annexe 3).

En effet, ni les IgE [224], ni le mFcεRI [220], ni les mastocytes [219, 225], ni les basophiles, ni les deux types cellulaires [225] ne sont nécessaires à l'induction de l'ASA chez la souris. Alors que chez des souris sauvages, l'ASA induite après immunisation par BSA est létale, celle-ci est abolie chez des souris déficientes en récepteurs aux IgG, et plus particulièrement après traitement par des anticorps bloquant spécifiquement mFcγRIII et mFcγRIV. Chez des souris déficientes pour 5 FcR (5-KO) qui n'expriment qu'un seul récepteur activateur pour les IgG, mFcγRIV, exprimé uniquement par les monocytes/macrophages et les PN, une ASA se développe avec la même intensité et avec une mortalité identique aux souris sauvages [226]. Chez ces souris n'exprimant pas de FcR activateurs, le transfert de PN murins ou humains restaure le choc anaphylactique, avec une contribution plus modeste des basophiles mise en évidence [227]. Dans un autre modèle, l'ASA était médiée par l'activation des monocytes/macrophages via mFcγRIII [228].

Ces modèles ont bien sûr d'importantes limites, ne serait-ce que par l'absence de profils d'expression des hFcγR sur les différents types cellulaires superposables entre l'homme et la souris transgénique. De plus, la présence d'un seul récepteur au lieu des sept exprimés chez l'homme ne peut refléter la complexité du modèle humain, ce surtout en l'absence du récepteur inhibiteur. Du point de vue du clinicien, les rapports des doses administrées entre l'homme et la souris peuvent paraître stupéfiants. Après enquête dans notre unité, la plupart des chercheurs utilisent dans le modèle d'ASA une immunisation par injection intra-péritonéale de 10μg d'antigène (pour l'ovalbumine, la BSA, ou du KLH-rocuronium) associé à un adjuvant, ce qui rapporté au poids de la souris fait 0.5 mg/kg. Quant à l'induction de l'anaphylaxie, elle est déclenchée le plus souvent par injection de 500μg par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, soit 25mg/kg ! Pour les modèles d'ASA aux extraits de cacahuète, l'immunisation est obtenue par gavage par voie orale de 10mg (soit 500 mg/kg) avec induction de l'ASA par injection par voie intrapéritonéale de 5mg (soit 250 mg/kg). Ces doses sont considérables, même comparées aux injections intraveineuses pour induction de l'anesthésie chez l'homme où la dose recommandée de succinylcholine par exemple est de 1mg/kg. Cependant, pour l'infliximab, les posologies sont de 3 à 5 mg/kg (selon les indications) par voie intraveineuse à des fréquences variables suivant les pathologies, étant donc supérieures (mais sans adjuvant) aux doses d'immunisation chez la souris. Comme évoqué précédemment (Figure 20), la présence conjointe de grande quantité d'antigènes et d'anticorps est connue pour induire une voie IgG médiée, ce d'autant que les souris ont le plus souvent été immunisées avec un adjuvant favorisant la production d'IgG1 ou d'IgG2a. Ces situations ne reflètent donc que partiellement la physiopathologie humaine. En effet, une souris qui bénéficie d'une immunisation est élevée dans un environnement contrôlé avec une alimentation stricte et n'est donc stimulée que par un seul antigène. Une équipe de chercheurs de l'université de Stanford a ainsi récemment fait une analogie entre le système immunitaire d'une souris de laboratoire et celui d'un nouveau-né à cause de son absence d'exposition à des pathogènes [229, 230] ! Lors de l'induction du choc anaphylactique, la souris possède une grande quantité d'anticorps spécifiques

disponibles. Inversement, non seulement la date de la primo-exposition chez l'homme n'est pas évaluable et est probablement ancienne, mais de plus il n'a pas subi de « rappels » pour augmenter le taux d'anticorps et il a été exposé à de nombreux autres antigènes. Une étude dans notre unité, réalisée par Carlos Castillon, étudiant en thèse, montre que, chez la souris, lors d'une première série d'immunisation avec un antigène suivi d'une seconde série d'immunisation avec un autre antigène, il y a une disparition quasi-totale des plasmocytes spécifiques du premier antigène dans la rate à la fin de la seconde série. La capacité d'induction d'ASA au premier antigène n'a pas encore été évaluée dans ce modèle. Cependant, rapporté à l'homme, il reflète bien la faible quantité de plasmocytes producteurs d'IgG spécifiques à distance de l'immunisation. Malgré toutes ces limites, l'intérêt de ces modèles est justement d'exagérer les mécanismes afin d'observer un effet biologique exacerbé. Si le modèle utilisé produisait IgE et IgG et impliquait plusieurs types cellulaires, on ne conclurait que difficilement à une participation des IgG. Au contraire, ces études suggèrent un mécanisme IgG tout en reconnaissant qu'elles apparaissent dans certaines circonstances chez la souris. Enfin, la mise en perspective de ces résultats par rapport aux études sur le PAF et sur les RHA aux anticorps thérapeutiques chez l'homme (Section 3) permettent de proposer une hypothèse soutenue par différentes approches.

3.2 Relation IgG spécifiques et sévérité de la réaction d'hypersensibilité aiguë

Afin de tenter de répondre aux problématiques exposées précédemment, nous avons conçu l'étude NASA afin d'évaluer la contribution des PN et des IgG dans un modèle de RHA médicamenteuse (plus particulièrement aux curares) chez l'homme. Lorsqu'une cellule est activée par la dimérisation des récepteurs Fc γ R ou Fc ϵ R après fixation de complexes immuns anticorps/antigène, ceux-ci sont internalisés, entraînant une diminution de l'expression des récepteurs à la surface de la cellule. Les expériences suivantes ont été réalisées par Friederike Jönsson, qui est chargée de recherche CNRS dans notre unité, sur les échantillons sanguins prélevés à 30 minutes du choc des patients de l'étude NASA. L'expression du hFc ϵ RI à la surface des basophiles était diminuée de façon significative, avec association entre la diminution de l'expression et la sévérité du choc, suggérant l'activation de ces cellules par les IgE (Figure 25A). A la surface des PN, l'expression des récepteurs activateurs hFc γ RIIA était diminuée de façon significative, avec également association avec le stade de gravité de la RHA (Figure 25D). De façon intéressante, l'expression de ce récepteur n'était pas diminuée à la surface des monocytes suggérant donc une implication particulière des PN (Figure 25B). De plus, l'expression du second récepteur activateur exprimé de façon constitutive sur les PN (hFc γ RIIIB) était également diminuée de façon significative chez les patients ayant les RHA les plus sévères (Figure 25C). L'activation des PN par interactions avec d'autres cellules, comme les mastocytes ou lors d'un processus inflammatoire via le relargage de cytokines, entraîne une baisse d'expression de nombreux récepteurs [231], semblant cependant épargner les hFc γ RIIA [232].

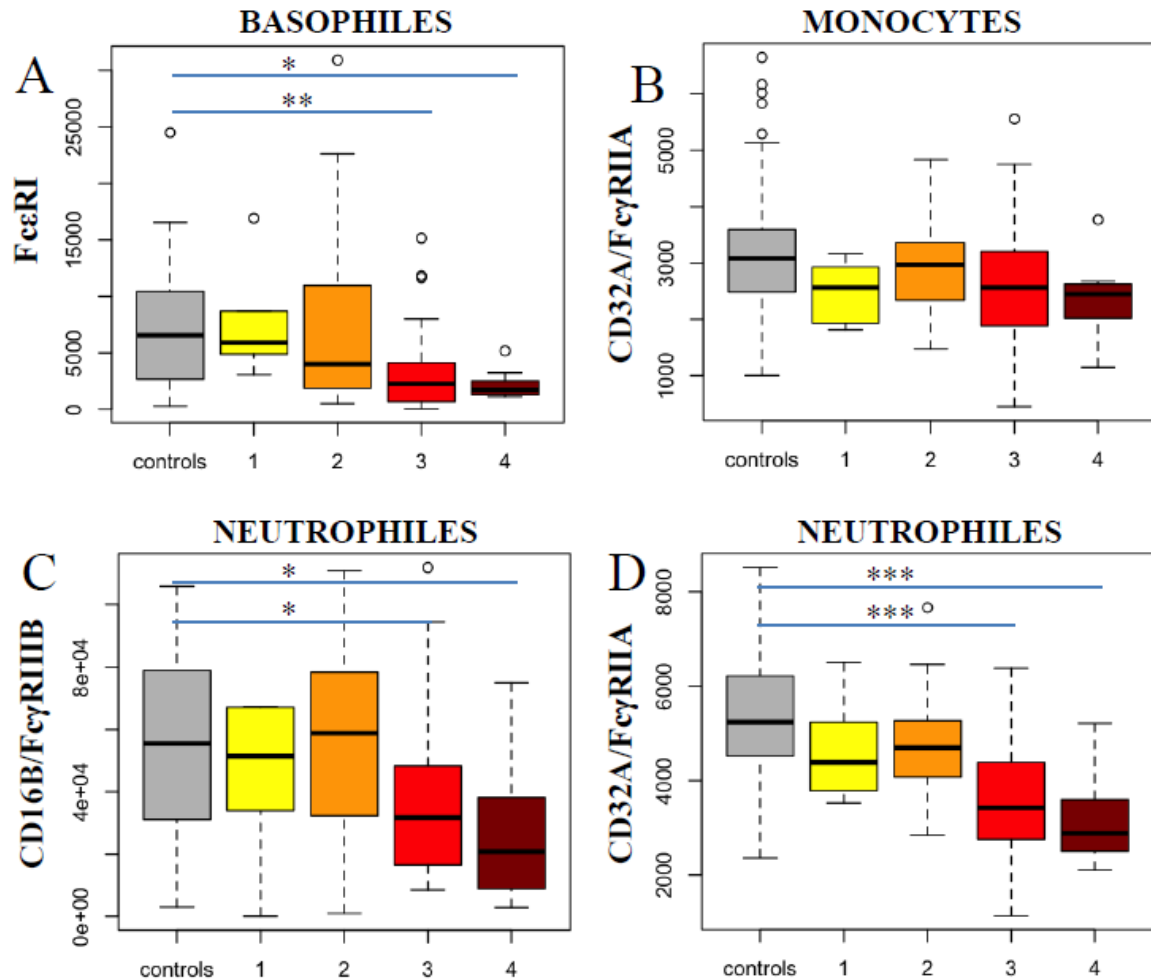


Figure 25 : Expression du hFcεRI A/sur les polynucléaires éosinophiles, du FcγRIIA sur B/les monocytes et C/les PN et D/du FcγRIIIB sur les PN des patients cas de l'étude NASA 30 minutes après le choc, et des patients témoins, mesurée par cytométrie en flux, avec représentation en fonction des grades de choc.

Des analyses rétrospectives ont été réalisées par Luc de Chaisemartin, MCUPH, et Vanessa Granger, étudiante en thèse, dans le service d'Immunologie de l'Hôpital Bichat – Claude Bernard mettant en évidence une diminution significative de l'activité de la PAF-AH corrélée avec la sévérité de la RHA , venant corroborer les études publiées par Vadas et al [92, 93]. La diminution de l'expression des récepteurs aux IgE sur les basophiles et des récepteurs aux IgG sur les PN, associée à une présence significativement plus élevée d'IgE anti-QAM et d'IgG anti-QAM chez les patients ayant présenté une RHA sévère, suggère la présence d'une implication des deux voies IgE- et IgG- médiée chez ces patients.

3.3 Neutrophil Extracellular Traps

Alors que les PN jouent un rôle essentiel dans la réponse anti-infectieuse et la résolution de l'inflammation, les médiateurs qu'ils libèrent sont également toxiques pour l'environnement local [233]. La formation de réseaux extracellulaires par les neutrophiles principalement, mais aussi par les

mastocytes et les éosinophiles, constitue un mécanisme récemment découvert de l'immunité innée [234-237]. Au cours de ce phénomène appelé nétose, qui dépend de l'explosion oxydative, les PN libèrent des filaments d'ADN extracellulaires (Neutrophil Extracellular Traps ou NETs) dont la première propriété rapportée est de piéger les microorganismes. Ces filaments de chromatine sont parsemés de protéines issues des différents compartiments cellulaires (noyau, cytoplasme, granulations...). La citrullination des histones est la signature biologique de la nétose et est indispensable au déenroulement de la chromatine [238, 239]. La translocation nucléaire de myéloperoxydase (MPO) et d'élastase provenant des granulations est également essentielle, afin de permettre les modifications enzymatiques à l'origine de l'extrusion d'ADN hors de la cellule [240]. Récemment, des observations dynamiques *in vivo* ont suggéré que les PN porteurs de NETs conserveraient leurs capacités migratoires en étant donc délétères à distance [241, 242]. A ce jour, la fonction physiologique la mieux connue des NETs semble être leur capacité à piéger et détruire les microorganismes grâce à la forte concentration locale de composants antimicrobiens, en particulier des protéases [243, 244]. Ils peuvent également présenter un rôle pathologique, en étant impliqués dans la genèse et l'entretien de maladies auto-immunes comme les vascularites ou le lupus systémique [245-248], mais aussi avec une toxicité cellulaire et tissulaire dans le sepsis ou les hépatopathies aiguës [249-251]. L'un des organes les plus exposés aux NETs semble être le poumon, comme dans le syndrome de détresse respiratoire aigu ou le TRALI (« Transfusion Related Acute Lung Injury », qui est une détresse respiratoire aiguë causée par des transfusions sanguines) [252-255].

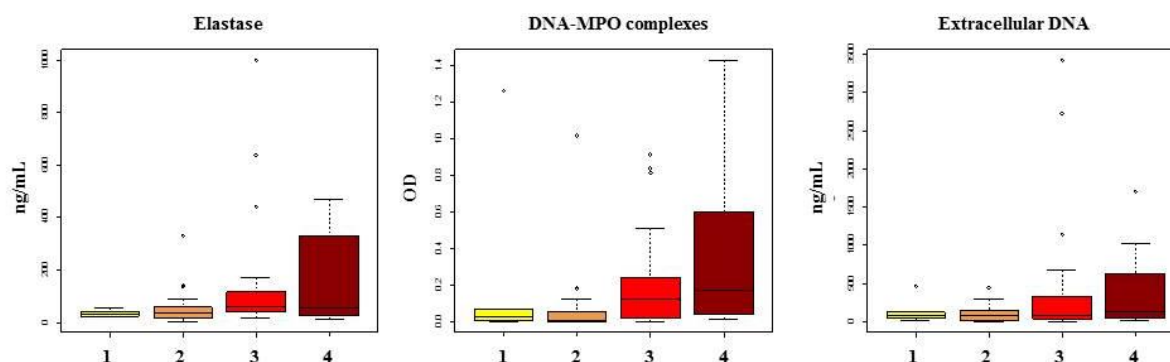


Figure 26 : Mesure de la libération de NETs chez les patients de l'étude NASA en fonction du stade de gravité de la RHA.

Chez la souris, l'engagement des FcγR exprimés à la surface des PN par des complexes immuns IgG/antigène induit la formation de NETs [256]. Chez des patients de l'étude NASA, une libération de NETs a été mise en évidence, avec une corrélation entre l'intensité de la libération, quel que soit le marqueur utilisé (élastase, MPO, ou mesure d'ADN extracellulaires), et la sévérité de la RHA (

Figure 26), apportant un argument supplémentaire quant à l'activation des PN dans les RHA. Sur le plan clinique, la présence de NETs était uniquement associée à la survenue d'un arrêt cardiaque, c'est à dire à la survenue d'un grade 4. Dans l'étude NASA, l'incidence du bronchospasme était de 32%,

soit 28 patients, en accord avec la littérature. Au cours d'un modèle expérimental de choc anaphylactique, une infiltration pulmonaire de neutrophiles a été observée [257]. Comme évoqué précédemment, la survenue d'un bronchospasme au cours d'une RHA ne semble pas reposer sur les mêmes mécanismes physiopathologiques que la pathologie asthmatique. Le poumon étant l'une des cibles des NETs, il pourrait être intéressant d'étudier dans un modèle animal si la présence de NETs au niveau pulmonaire pourrait expliquer l'incidence du bronchospasme, notamment à cause d'une toxicité cellulaire et tissulaire locale.

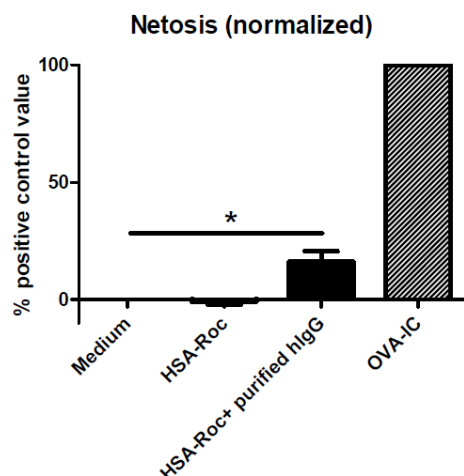


Figure 27 : Evaluation de la libération de NETs par des PN humains en réponse au stimulus représenté par des complexes immuns Anticorps anti-rocuronium purifiés / HSA-Rocuronium. Le medium correspond à la stimulation par la solution de dilution seule, l'HSA-Rocuronium au signal non spécifique de l'antigène seul sur les PN humains, la 3^{ème} mesure correspond à nos complexes immuns d'intérêt, et la 4^{ème} au contrôle positif de complexes immuns IgG anti-ovalbumine / ovalbumine.

Grâce à des expériences réalisées par Luc de Chaisemartin, à la Faculté de Pharmacie de Chatenay Malabry, nous avons pu analyser la libération de NETs par des PN humains purifiés en réponse au stimulus représenté par des complexes immuns Anticorps anti-rocuronium purifiés / HSA-rocuronium (Figure 27). Celle-ci était présente avec une différence significative par rapport au bruit de fond (résultats basés sur 4 expériences, à partir d'un même lot de purification d'anticorps). D'autres analyses sont prévues, avec la mesure de médiateurs comme l'élastase ou de réactifs de l'oxygène, ainsi que la vérification de la reproductibilité de ces résultats à partir d'autres anticorps purifiés. Les NETs générés par les complexes immuns produits à partir des anticorps anti-rocuronium purifiés sont inférieurs à ceux induits en réponse au stimulus représenté par les complexes immuns IgG anti-ovalbumine / ovalbumine. Cependant, ces derniers sont des anticorps monoclonaux, hautement spécifiques, de haute affinité, produits dans le laboratoire de Luc de Chaisemartin rendant les comparaisons difficiles. Comme évoqué précédemment, les PN peuvent être activés indirectement. Ces résultats sont des arguments en faveur de l'hypothèse que les IgG identifiées sont capables d'activer directement les PN, et donc de façon plus élargie dans l'implication potentielle des PN via les IgG spécifiques dans les manifestations cliniques des RHA médicamenteuses sévères.

L'activation directe des PN par les complexes immuns anticorps anti-rocuronium purifiés / HSA-rocuronium est en cours de mise au point dans notre unité, pour évaluer l'expression, en réponse à ce stimulus, de certains marqueurs de surface, comme le CD11b et le CD62L, ainsi que la production de ROS. Dans le cadre de la caractérisation des anticorps purifiés, il est prévu d'évaluer la répartition en

sous-classes, [258]. Les analyses de sous-classes étant techniquement difficiles, nos résultats seront à pondérer par un biais possible induit par notre système de purification d'anticorps ou à cause des anticorps secondaires anti-sous-classes, dont la spécificité est souvent insuffisante (nous en avons à ce jour déjà testé trois sans succès). Chez la souris, l'induction de PSA par les différentes sous-classes d'IgG est sous la dépendance de types cellulaires et de médiateurs différents [259]. Les résultats très préliminaires de l'étude NASA/IPAAQ semblent indiquer une proportion importante d'IgG3 (environ 1/3), le reste semblant constituer d'IgG1. Ces expériences doivent être optimisées et validées très prochainement afin de permettre d'évaluer, en fonction des sous-classes majoritaires, les différents types cellulaires chez l'homme qui pourraient être impliqués dans les RHA impliquant des IgG.

3.4 Interactions plaquettes et IgG

Dans un modèle d'ASA (immunisation à la caséine dans l'alum), une neutropénie et une thrombocytopénie profonde était observée, en corrélation avec la sévérité de la réaction [257]. Des études réalisées par Héloïse Beutier, étudiante en thèse dans notre unité, dans un modèle de souris transgéniques exprimant uniquement le hFcγRIIA, seul récepteur activateur humain des IgG exprimés à la surface des plaquettes, montrent une thrombocytopénie majeure induite par l'anaphylaxie passive chez la souris. Les plaquettes de ces souris transgéniques sont capables *in vivo* de fixer les IgG sous formes de complexes immuns [260]. *Ex vivo*, les plaquettes humaines, via le hFcγRIIA, sont capables d'internaliser ces complexes immuns permettant une présentation secondaire aux phagocytes pour permettre l'élimination de ces complexes [260]. Au cours du sepsis, il a été démontré que les plaquettes étaient impliquées dans la présentation et l'élimination des pathogènes avec une association entre thrombopénie et mortalité au cours du sepsis sévère [261-263]. Les plaquettes sont participant donc au transport et à la présentation des anticorps pour permettre leur clairance, quitte à entraîner la destruction des plaquettes [264]. Des analyses préliminaires de l'étude NASA sur les numérations plaquettaires réalisées par Friederike Jönsson montrent également une thrombocytopénie chez les patients, avec une association avec la sévérité de la réaction observée. La principale hypothèse est qu'au cours des RHA sévères, les plaquettes sont activées par les complexes immuns, entraînant la libération de médiateurs comme le PAF et de nombreux médiateurs lipidiques, stimulent la production de NETs par les neutrophiles, participant ainsi à la sévérité de la manifestation clinique.

3.5 Patients de l'étude NASA sans marqueurs d'activation de la voie IgE

Dans l'étude NASA, la classification des patients a été particulièrement difficile. Il n'y en a en effet pas de consensus dans la littérature sur la définition d'un mécanisme IgE-médié. Si la libération d'histamine suite à l'activation directe des mastocytes par des substances pharmacologiques (vancomycine, morphine ou atracurium) ne fait pas débat, celle de tryptase est controversée [265, 266]. Dans une étude de 2003, dans le diagnostic de RHA peropératoire IgE médiée (critère diagnostic

reposant sur un test cutané positif), la VPP de la tryptase était de 92.6% et sa VPN de 54.3%. L'histamine possédant une demi-vie très courte, et les délais d'obtention des échantillons n'étant pas tous identiques dans l'étude NASA, celle-ci n'a pas été considérée pour la classification sur l'existence d'une voie IgE-médiée des patients NASA. Ont été considérés comme RHA avec une voie IgE-médiée les patients qui ont présenté un test cutané positif à un agent auquel ils ont été exposés, une tryptase élevée (par rapport à la valeur de base [35]) ou, pour les patients n'ayant pas eu de consultation d'allergo-anesthésie, une tryptase supérieure à 14 µg/L selon les anciennes recommandations [267]. Ce dernier critère a été pris en compte devant les valeurs extrêmement élevées de tryptase des six patients concernés (médiane à 127 µg/L [51 ; 274]), associées à des IgE anti-QAM positives pour cinq d'entre eux.

Au total, 31 patients n'avaient, selon ces critères, pas de marqueurs d'une voie IgE-médiée (Figure 28). Les valeurs d'histamine de ces patients étaient faibles, avec une médiane à 11.1 nmol/L [6.2 ; 17.2] (seuls cinq patients présentaient une valeur supérieure à 20 nmol/L, sans IgE anti-QAM associées). Les caractéristiques démographiques de patients avec ou sans voie IgE-médiée n'étaient pas différentes, tant en ce qui concerne l'âge, le sexe que les antécédents. Sur le plan clinique, la présence d'un marqueur de la voie IgE était associé à la survenue d'une RHA grave ($p=0.02$, test exact de Fisher), avec notamment une hypocapnie, une hypoxie ($p<0.0001$, test exact de Fisher) et une hypotension artérielle ($p=0.004$, test exact de Fisher).

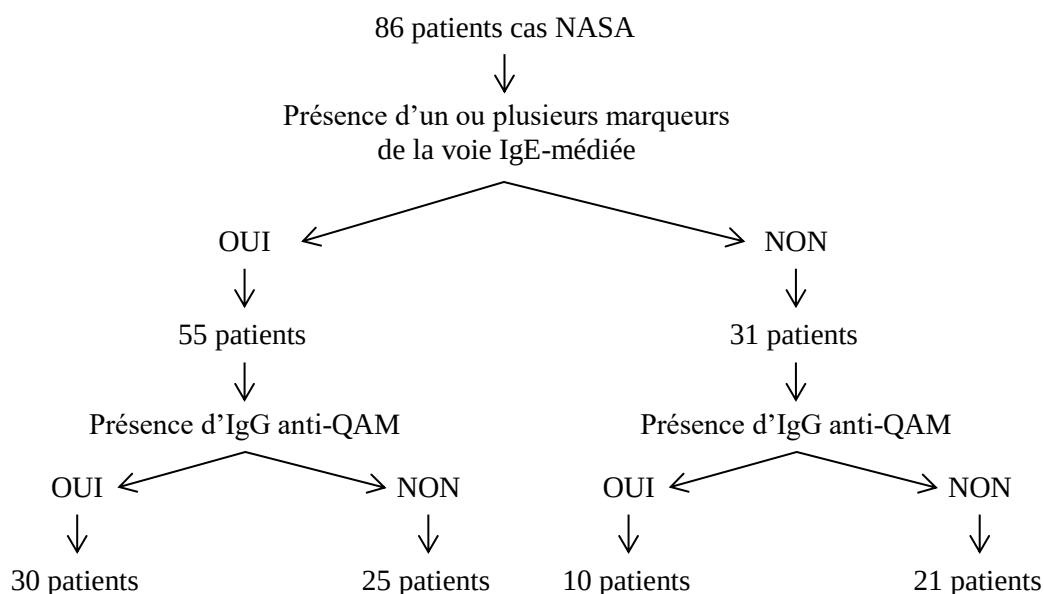


Figure 28 : Flowchart des patients cas de l'étude NASA en fonction de l'identification d'un mécanisme IgE-médié et de la détection d'IgG anti-QAM par ImmunoCAP.

Comme évoqué précédemment, l'incidence des RHA sévères parmi les patients sans voie IgE documentée n'était pas négligeable puisque 8 patients (soit 19%) ont présenté une RHA grade 3 ou un grade 4. La présence d'une RHA à la succinylcholine était supérieure dans le groupe IgE-médié, alors

que l'injection d'atracurium était supérieure dans le groupe non IgE-médié. De façon intéressante, la survenue d'une RHA sans marqueur de la voie IgE ne corrèle pas avec une augmentation des marqueurs IgG. En effet, parmi les 31 patients sans marqueurs d'une voie IgE médiée, non seulement les IgG anti-QAM par ELISA et par ImmunoCAP étaient inférieurs ($p=0.003$, test *U* de Mann & Whitney), mais aussi l'expression de hFcγRIIA et hFcγRIIIB à la surface des PN était également supérieure ($p=0.03$, test *U* de Mann & Whitney) par rapport au groupe avec voie IgE médiée. Même en considérant les 10 patients avec des IgG anti-QAM positifs (seuil à 2 mg/L), l'expression de hFcγRIIA et de hFcγRIIIB à la surface des PN n'était pas différente par rapport aux patients sans IgG anti-QAM.

Au sein des patients inclus dans l'étude NASA, les RHA survenant en l'absence de marqueurs d'une voie IgE-médiée ne semblent donc pas être associées à la présence exclusive d'une voie IgG-médiée d'après les marqueurs étudiés. Confirmant les résultats de l'article 3, les RHA induites par l'atracurium sont plus fréquentes dans ces réactions non-IgE médiées. On ne peut évoquer une erreur de diagnostic avec une incidence aussi importante, ce d'autant devant la présence de RHA de grades 3 ou 4. D'autres mécanismes n'ont pas été recherchés dans l'étude NASA, notamment l'influence du complément, pouvant peut-être expliquer ces RHA atypiques.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En explorant sous différents aspects les RHA peropératoires, ce travail de thèse a permis de répondre à quelques questions mais en a soulevé beaucoup d'autres dans un même temps. Alors qu'un antécédent d'asthme est un facteur de risque de mortalité au cours des RHA, il ne semble pas être responsable d'une survenue d'un bronchospasme dans la symptomatologie clinique peropératoire. Cela souligne, chez les patients asthmatiques, la nécessité d'évoquer rapidement le diagnostic de RHA devant l'apparition d'un bronchospasme et d'inciter à l'administration d'adrénaline le cas échéant. En vue d'un diagnostic rapide, nous avons également identifié une valeur de CO₂ télé-expiratoire inférieure à 20 mmHg comme un marqueur de sévérité devant faire évoquer, dans un contexte clinique, une RHA de grade 3 ou 4. Même si des validations dans d'autres cohortes sont nécessaires, ces aides au diagnostic rapide des formes sévères de RHA sont essentielles, car la rapidité d'instauration du diagnostic et du traitement spécifique conditionne le pronostic des patients.

De façon intéressante, sur le plan mécanistique, ces RHA sévères sont associées à la présence d'anticorps spécifiques IgE et IgG. Nous avons en effet démontré que non seulement les IgG spécifiques sont présentes au cours des RHA, mais qu'ils sont aussi associées à des formes sévères et sont capables d'activer les PN après avoir été purifiés. Ces résultats, associés à ceux de l'activation des PN au cours des RHA, évoquent fortement l'implication des PN et des IgG dans les manifestations sévères. Il est possible que la prévalence élevée des IgG anti-QAM sans effet pathologique au cours des RHA modérées soit liée à une affinité plus faible de ces anticorps, cette hypothèse restant à confirmer. La distinction de deux types de RHA, notamment en fonction du curare administré, soulève des interrogations tant sur le plan physiopathologique que sur le plan clinique. Le caractère plus sévère des RHA à la succinylcholine devrait-il inciter les cliniciens à une prise en charge plus agressive ou à tester des traitements anti-PAF si le rôle des IgG et des PN devait être confirmé ? Il serait intéressant de réaliser une étude au même design que l'étude NASA mais incluant des patients bénéficiant de l'injection d'anticorps thérapeutiques afin d'évaluer la contribution des différents types d'anticorps et de cellules dans les réactions observées. Il est peu probable que dans les allergies alimentaires, où les allergènes sont en faibles quantités, les IgG soient impliqués, même si une telle présomption doit être vérifiée. Il semble que l'on puisse distinguer plusieurs mécanismes des RHA en fonction du curare administré : succinylcholine (et probablement rocuronium) engendrant dans la grande majorité des cas des réactions médiées par les anticorps et atracurium avec 50% de réactions médiées par les anticorps et 50% non encore identifiées. Un nombre important de RHA à l'atracurium reste donc toujours non caractérisé sur le plan physiopathologique, ainsi que les patients sans mécanisme IgE et/ou IgG mis en évidence, représentant tout de même un quart des patients de la cohorte de l'étude NASA.

RÉFÉRENCES

1. Nissen, S.P., et al., *The natural course of sensitization and allergic diseases from childhood to adulthood*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2013. **24**(6): p. 549-555.
2. Belgrave, D.C.M., et al., *Developmental Profiles of Eczema, Wheeze, and Rhinitis: Two Population-Based Birth Cohort Studies*. *PLoS Med*, 2014. **11**(10): p. e1001748.
3. Johansson, S.G.O., et al., *A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force*. *Allergy*, 2001. **56**(9): p. 813-824.
4. Simons, F.E.R., et al., *2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines*. *World Allergy Organ J*, 2015. **8**(1): p. 32.
5. Mertes, P.M., et al., *Anaphylaxis during anesthesia in France: An 8-year national survey*. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. **128**(2): p. 366-373.
6. Mertes, P.M., et al., *Quelle est la réalité du risque allergique en anesthésie ? Méthodologie de surveillance des événements rares. Classification. Incidence. Aspects cliniques (immédiats et retardés). Morbidité-mortalité. Substances responsables*. *Ann Fr Anesth Reanim*, 2011. **30**(3): p. 223-239.
7. Reitter, M., et al., *Fatal anaphylaxis with neuromuscular blocking agents: a risk factor and management analysis*. *Allergy*, 2014. **69**(7): p. 954-959.
8. Dong, S.W., et al., *Hypersensitivity reactions during anesthesia. Results from the ninth French survey (2005-2007)*. *Minerva Anesthesiol*, 2012. **78**(8): p. 868-78.
9. Mertes, P.M., et al., *Anaphylactic and Anaphylactoid Reactions Occurring during Anesthesia in France in 1999-2000*. *Anesthesiology*, 2003. **99**(3): p. 536-545.
10. Laxenaire, M.C. and P.M. Mertes, *Anaphylaxis during anaesthesia. Results of a two-year survey in France*. *Br J Anaesth*, 2001. **87**(4): p. 549-58.
11. Chiriac, A.-M. and P. Demoly, *Allergie et curares*. *Presse Med*, 2016. **45**(9): p. 768-773.
12. Abdallah, C., *Perioperative chlorhexidine allergy: Is it serious?* *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 2015. **31**(2): p. 152-4.
13. Hagau, N., et al., *Is a positive history of non-anaesthetic drug allergy a predictive factor for positive allergy tests to anaesthetics?* *Br J Clin Pharmacol*, 2012. **73**(3): p. 460-466.
14. Sampson, H.A., et al., *Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: Summary report—Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(2): p. 391-397.
15. Gouel-Chéron, A., et al., *Management of anaphylactic shock in the operating room*. *Presse Med*, 2016. **45**(9): p. 774-783.
16. SFAR and SFA, *Reducing the risk of anaphylaxis during anaesthesia*. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 2011. **30**(3): p. 212-222.
17. Lavonas, E.J., et al., *Part 10: Special Circumstances of Resuscitation: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care*. *Circulation*, 2015. **132**(18 suppl 2): p. S501-S518.
18. Dhami, S., et al., *Management of anaphylaxis: a systematic review*. *Allergy*, 2014. **69**(2): p. 168-175.
19. Mertes, P.M., et al., *Reducing the risk of anaphylaxis during anesthesia: 2011 updated guidelines for clinical practice*. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2011. **21**(6): p. 442-53.
20. Tajima, K., 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*. *Anaesth Intensive Care*, 2013. **41**(6): p. 765-73.
21. Currie, M., et al., *Crisis management during anaesthesia: anaphylaxis and allergy*. *Qual Saf Health*

- Care, 2005. **14**(3): p. e19-e19.
22. Garvey, L.H., et al., *Treatment with epinephrine (adrenaline) in suspected anaphylaxis during anesthesia in Denmark*. Anesthesiology, 2011. **115**(1): p. 111-6.
 23. Xu, Y.S., et al., *Anaphylaxis-related deaths in Ontario: a retrospective review of cases from 1986 to 2011*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2014. **10**(1): p. 1-8.
 24. Sampson, H.A., L. Mendelson, and J.P. Rosen, *Fatal and Near-Fatal Anaphylactic Reactions to Food in Children and Adolescents*. N Engl J Med, 1992. **327**(6): p. 380-384.
 25. Settipane, G.A., *Anaphylactic Deaths in Asthmatic Patients*. Allergy Asthma Proc, 1989. **10**(4): p. 271-274.
 26. Fleming, J.T., et al., *Early Treatment of Food-Induced Anaphylaxis with Epinephrine Is Associated with a Lower Risk of Hospitalization*. J Allergy Clin Immunol Pract, 2015. **3**(1): p. 57-62.
 27. Vadas, P. and B. Perelman, *Effect of epinephrine on platelet-activating factor-stimulated human vascular smooth muscle cells*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(5): p. 1329-1333.
 28. Longrois, D., et al., *Traitement des réactions anaphylactiques survenant en cours d'anesthésie et en particulier du choc anaphylactique*. Ann Fr Anesth Reanim, 2011. **30**(3): p. 312-322.
 29. Platt, P.R., et al., *Efficacy of sugammadex in rocuronium-induced or antibiotic-induced anaphylaxis. A case-control study*. Anaesthesia, 2015. **70**(11): p. 1264-7.
 30. Moneret-Vautrin, D.A. and G. Kanny, *Anaphylaxis to muscle relaxants: rational for skin tests*. Allerg Immunol (Paris), 2002. **34**(7): p. 233-40.
 31. SFAR and SFA, *Prévention du risque allergique peranesthésique. Texte court*. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation, 2011. **30**(3): p. 212-222.
 32. Harper, N.J.N., et al., *Suspected Anaphylactic Reactions Associated with Anaesthesia*. Anaesthesia, 2009. **64**(2): p. 199-211.
 33. Lafuente, A., et al., *Early skin testing is effective for diagnosis of hypersensitivity reactions occurring during anesthesia*. Allergy, 2013. **68**(6): p. 820-822.
 34. Galli, S.J., *Pathogenesis and management of anaphylaxis: current status and future challenges*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(3): p. 571-4.
 35. Sprung, J., T.N. Weingarten, and L.B. Schwartz, *Presence or Absence of Elevated Acute Total Serum Tryptase by Itself Is Not a Definitive Marker for an Allergic Reaction*. Anesthesiology, 2015. **122**(3): p. 713-714.
 36. Guttormsen, A.B., et al., *No consumption of IgE antibody in serum during allergic drug anaphylaxis*. Allergy, 2007. **62**(11): p. 1326-1330.
 37. Laroche, D., et al., *Early diagnosis of anaphylactic reactions to neuromuscular blocking drugs*. Br J Anaesth, 1992. **69**(6): p. 611-614.
 38. Mertes, P.M., et al., *Hypersensitivity reactions to neuromuscular blocking agents*. Curr Pharm Des, 2008. **14**(27): p. 2809-25.
 39. Leysen, J., et al., *Predictive value of allergy tests for neuromuscular blocking agents: tackling an unmet need*. Clin Exp Allergy, 2014. **44**(8): p. 1069-1075.
 40. Moneret-Vautrin, D.A., et al., *[The value of prick tests in the detection of anaphylaxis caused by muscle relaxants]*. Ann Fr Anesth Reanim, 1987. **6**(4): p. 352-5.
 41. Baldo, B.A. and M.M. Fisher, *Substituted ammonium ions as allergenic determinants in drug allergy*. Nature, 1983. **306**(5940): p. 262-4.
 42. Harle, D.G., B.A. Baldo, and M.M. Fisher, *Detection of IgE antibodies to suxamethonium after anaphylactoid reactions during anaesthesia*. The Lancet, 1984. **1**(8383): p. 930-2.
 43. Baldo, B.A. and M.M. Fisher, *Anaphylaxis to muscle relaxant drugs: cross-reactivity and molecular basis of binding of IgE antibodies detected by radioimmunoassay*. Mol Immunol, 1983. **20**(12): p. 1393-400.

44. Vervloet, D., et al., *Anaphylactic reactions to suxamethonium prevention of mediator release by choline*. J Allergy Clin Immunol, 1985. **76**(2 Pt 1): p. 222-5.
45. Baldo, B.A., D.G. Harle, and M.M. Fisher, *In vitro diagnosis and studies on the mechanism(s) of anaphylactoid reactions to muscle relaxant drugs*. Ann Fr Anesth Reanim, 1985. **4**(2): p. 139-145.
46. Gueant, J.L., et al., *Evaluation of a new reactive solid phase for radioimmunoassay of serum specific IgE against muscle relaxant drugs*. Allergy, 1991. **46**(6): p. 452-8.
47. Harle, D.G., B.A. Baldo, and M.M. Fisher, *Immunoassays employing substituted ammonium compounds other than neuromuscular blocking drugs to increase the detection of IgE antibodies to these drugs*. Mol Immunol, 1990. **27**(10): p. 1039-45.
48. Harle, D.G., B.A. Baldo, and M.M. Fisher, *Assays for, and cross-reactivities of, IgE antibodies to the muscle relaxants gallamine, decamethonium and succinylcholine (suxamethonium)*. J Immunol Methods, 1985. **78**(2): p. 293-305.
49. Guilloux, L., et al., *A new radioimmunoassay using a commercially available solid support for the detection of IgE antibodies against muscle relaxants*. J Allergy Clin Immunol, 1992. **90**(2): p. 153-159.
50. Guilloux, L., et al., *Histamine release assay and radioimmunoassay for the detection of IgE antibodies against neuromuscular blocking drugs*. Ann Fr Anesth Reanim, 1993. **12**(2): p. 182-6.
51. Baldo, B.A., M.M. Fisher, and N.H. Pham, *On the origin and specificity of antibodies to neuromuscular blocking (muscle relaxant) drugs: an immunochemical perspective*. Clin Exp Allergy, 2009. **39**(3): p. 325-344.
52. Baldo, P.D.Brian A., *Relevance and Value of a Morphine Immunoassay as a Diagnostic Aid for Neuromuscular Blocking Drug-induced Anaphylaxis*. Anesthesiology, 2011. **115**(3): p. 657-659.
53. Fisher, M.M. and B.A. Baldo, *Immunoassays in the diagnosis of anaphylaxis to neuromuscular blocking drugs: the value of morphine for the detection of IgE antibodies in allergic subjects*. Anaesth Intensive Care, 2000. **28**(2): p. 167-70.
54. Florvaag, E., et al., *Prevalence of IgE antibodies to morphine. Relation to the high and low incidences of NMBA anaphylaxis in Norway and Sweden, respectively*. Acta Anaesthesiol Scand, 2005. **49**(4): p. 437-444.
55. Laroche, D., et al., *Evaluation of a new routine diagnostic test for immunoglobulin e sensitization to neuromuscular blocking agents*. Anesthesiology, 2011. **114**(1): p. 91-7.
56. Ebo, M.D.P.D.Didier G., et al., *Immunoglobulin E Antibodies to Rocuronium: A New Diagnostic Tool*. Anesthesiology, 2007. **107**(2): p. 253-259-253-259.
57. SFAR, *Reducing the risk of anaphylaxis during anaesthesia. Abbreviated text*. Ann Fr Anesth Reanim, 2002. **21 Suppl 1**: p. 7s-23s.
58. Baldo, B.A. and N.H. Pham, *Structure-Activity Studies on Drug-Induced Anaphylactic Reactions*. Chem Res Toxicol, 1994. **7**(6): p. 703-721.
59. Didier, A., et al., *Role of the quaternary ammonium ion determinants in allergy to muscle relaxants*. J Allergy Clin Immunol, 1987. **79**(4): p. 578-84.
60. Magnan, A., et al., *[Mechanisms of allergic reactions occurring during anaesthesia]*. Ann Fr Anesth Reanim, 2011. **30**(3): p. 240-5.
61. Lien, C.A., et al., *The Cardiovascular Effects and Histamine-releasing Properties of 51W89 in Patients Receiving Nitrous Oxide/Opioid/Barbiturate Anesthesia*. Anesthesiology, 1995. **82**(5): p. 1131-1138.
62. Harle, D.G., B.A. Baldo, and M.M. Fisher, *Inhibition of histamine-N-methyltransferase activity by neuromuscular blocking drugs*. Agents Actions, 1985. **17**(1): p. 27-31.
63. Futo, J., J.P. Kupferberg, and J. Moss, *Inhibition of histamine N-methyltransferase (HNMT) in vitro by neuromuscular relaxants*. Biochem Pharmacol, 1990. **39**(3): p. 415-420.
64. Ebo, D.G., et al., *Anaphylaxis during anaesthesia: diagnostic approach*. Allergy, 2007. **62**(5): p. 471-87.
65. Lavaud, F., C. Mouton, and C. Ponvert, *Les tests cutanés dans le bilan diagnostique des réactions*

- d'hypersensibilité peranesthésiques*. Ann Fr Anesth Reanim, 2011. **30**(3): p. 264-279.
66. Moneret-Vautrin, D.A., *Test cutanés pour le diagnostic d'allergie aux curares*. Ann Fr Anesth Reanim, 2002. **21**, **Supplement 1**(0): p. 97-107.
 67. Ramirez, L.F., et al., *Negative predictive value of skin tests to neuromuscular blocking agents*. Allergy, 2012. **67**(3): p. 439-441.
 68. Levy, J.H., et al., *Weal and flare responses to intradermal rocuronium and cisatracurium in humans†*. Br J Anaesth, 2000. **85**(6): p. 844-849.
 69. Dhonneur, G., et al., *Skin Sensitivity to Rocuronium and Vecuronium: A Randomized Controlled Prick-Testing Study in Healthy Volunteers*. Anesth Analg, 2004. **98**(4): p. 986-989.
 70. Dewachter, P., et al., *Intérêt des tests cutanés pour le choix d'un curare après une réaction anaphylactique*. Ann Fr Anesth Reanim, 2005. **24**(5): p. 543-546.
 71. Fisher, M.M., D. Merefieid, and B. Baldo, *Failure to prevent an anaphylactic reaction to a second neuromuscular blocking drug during anaesthesia*. Br J Anaesth, 1999. **82**(5): p. 770-3.
 72. Thacker, M.A. and F.M. Davis, *Subsequent general anaesthesia in patients with a history of previous anaphylactoid/anaphylactic reaction to muscle relaxant*. Anaesth Intensive Care, 1999. **27**(2): p. 190-3.
 73. Decuyper, I.I., et al., *Quantification of specific IgE antibodies in immediate drug hypersensitivity: More shortcomings than potentials?* Clinica Chimica Acta, 2016. **460**: p. 184-189.
 74. Abuaf, N., et al., *Validation of a flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of muscle relaxant allergy*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(2): p. 411-418.
 75. Kvedariene, V., et al., *Diagnosis of neuromuscular blocking agent hypersensitivity reactions using cytofluorimetric analysis of basophils*. Allergy, 2006. **61**(3): p. 311-315.
 76. Leysen, J., et al., *Allergy to rocuronium: from clinical suspicion to correct diagnosis*. Allergy, 2011. **66**(8): p. 1014-1019.
 77. Uyttendaele, A.P., et al., *Immunoglobulin E antibodies to atracurium: a new diagnostic tool?* Clin Exp Allergy, 2015. **45**(2): p. 485-487.
 78. Mertes, P.M., et al., *Épidémiologie des réactions d'hypersensibilité immédiates peranesthésiques chez l'adulte et l'enfant: Bilan de huit années d'enquête du Gerap*. Rev Allergol Immuno Clin, 2008. **48**(3): p. 217-221.
 79. Finkelman, F.D., M.V. Khodoun, and R. Strait, *Human IgE-independent systemic anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(6): p. 1674-80.
 80. Gillis, C.M., A. Gouel-Chéron, and P. Bruhns, *Anaphylaxis (Immediate Hypersensitivity): From Old to New Mechanisms*, in *Compendium of Inflammatory Diseases*, M. Parnham, Editor. 2016, Springer Basel: Basel. p. 1-12.
 81. Jonsson, F., et al., *Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis*. J Clin Invest, 2011. **121**(4): p. 1484-96.
 82. Heijnen, I.A., et al., *Antigen targeting to myeloid-specific human Fc gamma RI/CD64 triggers enhanced antibody responses in transgenic mice*. J Clin Invest, 1996. **97**(2): p. 331-338.
 83. Smith, P., et al., *Mouse model recapitulating human Fcγ receptor structural and functional diversity*. Proc Natl Acad Sci, 2012. **109**(16): p. 6181-6186.
 84. Mancardi, D.A., et al., *The high-affinity human IgG receptor FcγRI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis and anti-tumor immunotherapy*. Blood, 2013.
 85. Gillis, C.M., et al., *Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice*. J Allergy Clin Immunol, 2016.
 86. Jouvin-Marche, E., et al., *Biosynthesis of Paf-acether (platelet-activating factor). VII. Precursors of Paf-acether and acetyl-transferase activity in human leukocytes*. J Immunol, 1984. **133**(2): p. 892-8.
 87. Finkelman, F.D., et al., *Molecular mechanisms of anaphylaxis: Lessons from studies with murine*

- models*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **115**(3): p. 449-457.
88. Schwartz, L.B., *Mediators of human mast cells and human mast cell subsets*. Ann Allergy, 1987. **58**(4): p. 226-35.
 89. Finkelman, F.D., *Anaphylaxis: Lessons from mouse models*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(3): p. 506-515.
 90. Ishii, S., et al., *Impaired Anaphylactic Responses with Intact Sensitivity to Endotoxin in Mice Lacking a Platelet-activating Factor Receptor*. J Exp Med, 1998. **187**(11): p. 1779-1788.
 91. Fukuda, Y., et al., *Effect of human plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in two anaphylactic shock models*. Eur J Pharmacol, 2000. **390**(1-2): p. 203-207.
 92. Vadas, P., et al., *Platelet-Activating Factor, PAF Acetylhydrolase, and Severe Anaphylaxis*. N Engl J Med, 2008. **358**(1): p. 28-35.
 93. Vadas, P., B. Perelman, and G. Liss, *Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol, 2012.
 94. Kajiwar, N., et al., *Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(5): p. 1137-1145.
 95. Teillaud, J.-L., *Qu'est-ce qu'une biothérapie ? L'exemple des anticorps monoclonaux*. Presse Med, 2009. **38**(5): p. 825-831.
 96. Demoly, P., *Allergies aux médicaments des biothérapies : les données épidémiologiques*. Rev Allergol, 2009. **49**(3): p. 264-271.
 97. Fréling, E., et al., *IgE antibodies and skin tests in immediate hypersensitivity reactions to infliximab in inflammatory bowel disease: impact on infliximab retreatment*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2015. **27**(10): p. 1200-1208.
 98. Cheifetz, A., et al., *The Incidence and Management of Infusion Reactions to Infliximab: A Large Center Experience*. Am J Gastroenterol, 2003. **98**(6): p. 1315-1324.
 99. Matucci, A., et al., *Allergological in vitro and in vivo evaluation of patients with hypersensitivity reactions to infliximab*. Clin Exp Allergy, 2013. **43**(6): p. 659-664.
 100. Vultaggio, A., et al., *Anti-infliximab IgE and non-IgE antibodies and induction of infusion-related severe anaphylactic reactions*. Allergy, 2010. **65**(5): p. 657-661.
 101. Kent, P.D., et al., *Bullous skin lesions following infliximab infusion in a patient with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(8): p. 2257-2258.
 102. Baert, F., et al., *Influence of Immunogenicity on the Long-Term Efficacy of Infliximab in Crohn's Disease*. N Engl J Med, 2003. **348**(7): p. 601-608.
 103. Campi, P., et al., *Hypersensitivity reactions to biological agents with special emphasis on tumor necrosis factor- α antagonists*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2007. **7**(5): p. 393-403.
 104. Wolbink, G.J., et al., *Development of anti-infliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(3): p. 711-715.
 105. Miele, E., et al., *Human Antichimeric Antibody in Children and Young Adults with Inflammatory Bowel Disease Receiving Infliximab*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2004. **38**(5): p. 502-508.
 106. Bendtzen, K., et al., *Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor α inhibitor infliximab*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(12): p. 3782-3789.
 107. Murdaca, G., et al., *Immunogenicity of infliximab and adalimumab: what is its role in hypersensitivity and modulation of therapeutic efficacy and safety?* Expert Opin Drug Saf, 2016. **15**(1): p. 43-52.
 108. Duburque, C., et al., *Successful induction of tolerance to infliximab in patients with Crohn's disease and prior severe infusion reactions*. Aliment Pharmacol Ther, 2006. **24**(5): p. 851-858.
 109. Puchner, T.C., et al., *Successful Desensitization and Therapeutic Use of Infliximab in Adult and Pediatric*

- Crohn's Disease Patients With Prior Anaphylactic Reaction*. *Inflamm Bowel Dis*, 2001. **7**(1): p. 34-37.
110. Lelong, J., et al., *Desensitisation to infliximab in patients with Crohn's disease*. *Rev Mal Respir*, 2005. **22**(2 Pt 1): p. 239-46.
 111. Maini, R.N., et al., *Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(9): p. 1552-1563.
 112. Jani, M., et al., *Clinical Utility of Random Anti-Tumor Necrosis Factor Drug-Level Testing and Measurement of Antidrug Antibodies on the Long-Term Treatment Response in Rheumatoid Arthritis*. *Arthritis Rheumatol*, 2015. **67**(8): p. 2011-2019.
 113. Bartelds, G.M., et al., *DEvelopment of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up*. *JAMA*, 2011. **305**(14): p. 1460-1468.
 114. Padlan, E.A., *Anatomy of the antibody molecule*. *Mol Immunol*, 1994. **31**(3): p. 169-217.
 115. Liu, H. and K. May, *Disulfide bond structures of IgG molecules*. *mAbs*, 2012. **4**(1): p. 17-23.
 116. Schroeder Jr, H.W. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2, Supplement 2): p. S41-S52.
 117. Sib  ril, S., et al., *Molecular aspects of human Fc  R interactions with IgG: Functional and therapeutic consequences*. *Immunol Lett*, 2006. **106**(2): p. 111-118.
 118. Vidarsson, G., G. Dekkers, and T. Rispens, *IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions*. *Front Immunol*, 2014. **5**.
 119. Jefferis, R., *Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics*. *Arch Biochem Biophys*, 2012. **526**(2): p. 159-166.
 120. Pumphrey, R., *Computer models of the human immunoglobulins shape and segmental flexibility*. *Immunol Today*, 1986. **7**(6): p. 174-178.
 121. Roux, K.H., L. Strelets, and T.E. Michaelsen, *Flexibility of human IgG subclasses*. *J Immunol*, 1997. **159**(7): p. 3372-82.
 122. Irani, V., et al., *Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases*. *Mol Immunol*, 2015. **67**(2, Part A): p. 171-182.
 123. Siber, G.R., et al., *Correlation between Serum IgG-2 Concentrations and the Antibody Response to Bacterial Polysaccharide Antigens*. *N Engl J Med*, 1980. **303**(4): p. 178-182.
 124. de la Torre, M.C., et al., *IgG2 as an independent risk factor for mortality in patients with community-acquired pneumonia*. *J Crit Care*, 2016. **35**: p. 115-119.
 125. Bruhns, P., et al., *Specificity and affinity of human Fc  gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses*. *Blood*, 2009. **113**(16): p. 3716-25.
 126. Salfeld, J.G., *Isotype selection in antibody engineering*. *Nat Biotech*, 2007. **25**(12): p. 1369-1372.
 127. Leroy, E.M., et al., *Early immune responses accompanying human asymptomatic Ebola infections*. *Clin Exp Immunol*, 2001. **124**(3): p. 453-460.
 128. Raux, M., et al., *IgG Subclass Distribution in Serum and Various Mucosal Fluids of HIV Type 1-Infected Subjects*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000. **16**(6): p. 583-594.
 129. Schuurman, J., et al., *Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: it has two different antigen-combining sites*. *Immunology*, 1999. **97**(4): p. 693-698.
 130. Schuurman, J., et al., *The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds*. *Mol Immunol*, 2001. **38**(1): p. 1-8.
 131. Aalberse, R.C. and J. Schuurman, *IgG4 breaking the rules*. *Immunology*, 2002. **105**(1): p. 9-19.
 132. Rispens, T., T.H. den Bleker, and R.C. Aalberse, *Hybrid IgG4/IgG4 Fc antibodies form upon 'Fab-arm' exchange as demonstrated by SDS-PAGE or size-exclusion chromatography*. *Mol Immunol*, 2010. **47**(7-

- 8): p. 1592-1594.
133. Kamisawa, T., et al., *IgG4-related disease*. The Lancet, 2015. **385**(9976): p. 1460-1471.
 134. Stone, J.H., Y. Zen, and V. Deshpande, *IgG4-related disease*. N Engl J Med, 2012. **366**.
 135. Platts-Mills, T., et al., *Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study*. The Lancet, 2001. **357**(9258): p. 752-756.
 136. Matsui, E.C., et al., *Mouse allergen-specific immunoglobulin G and immunoglobulin G4 and allergic symptoms in immunoglobulin E-sensitized laboratory animal workers*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(10): p. 1347-1353.
 137. James, L.K. and S.R. Durham, *Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(7): p. 1074-1088.
 138. Javier, F.C., III, C.M. Moore, and R.U. Sorensen, *Distribution of primary immunodeficiency diseases diagnosed in a pediatric tertiary hospital*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **84**(1): p. 25-30.
 139. Plebani, A., et al., *Extensive deletion of immunoglobulin heavy chain constant region genes in the absence of recurrent infections: when is IgG subclass deficiency clinically relevant?* Clin Immunol Immunopathol, 1993. **68**(1): p. 46-50.
 140. Depiero, A., et al., *Immunologic compensation in a patient with a large IgH constant region deletion*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(6): p. 1051-1055.
 141. Bruhns, P., *Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models*. Blood, 2012. **119**(24): p. 5640-5649.
 142. Bruhns, P. and F. Jönsson, *Mouse and human FcR effector functions*. Immunol Rev, 2015. **268**(1): p. 25-51.
 143. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fc[gamma] receptors as regulators of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 34-47.
 144. Gillis, C.M., et al., *Contribution of human FcγRs to disease with evidence from human polymorphisms and transgenic animal studies*. Front Immunol, 2014. **5**.
 145. Smith, K.G.C. and M.R. Clatworthy, *Fc[gamma]RIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 328-343.
 146. West, A.P. and P.J. Bjorkman, *Crystal Structure and Immunoglobulin G Binding Properties of the Human Major Histocompatibility Complex-Related Fc Receptor*. Biochemistry, 2000. **39**(32): p. 9698-9708.
 147. Stapleton, N.M., et al., *Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 599.
 148. Foss, S., et al., *TRIM21: a cytosolic Fc receptor with broad antibody isotype specificity*. Immunol Rev, 2015. **268**(1): p. 328-339.
 149. Wilson, T.J., A. Fuchs, and M. Colonna, *Cutting edge: human FcRL4 and FcRL5 are receptors for IgA and IgG*. J Immunol, 2012. **188**(10): p. 4741-5.
 150. Fielding, L., *¹H and ¹³C NMR studies of some steroidal neuromuscular blocking drugs: solution conformations and dynamics*. Magnetic Resonance in Chemistry, 1998. **36**(6): p. 387-397.
 151. Baldo, B.A. and N.H. Pham, *Anaphylaxis to neuromuscular blocking drugs*, in *Drug allergy. Clinical aspects, diagnosis, mechanisms, structure-activity relationships*. . 2013, Springer: New York. p. 239-273.
 152. Doge, G., R. Pohloudek-Fabini, and D. Kottke, *[Analysis and stability of suxamethonium chloride. 1. Detection and quantitative determination of the intact active agent with its degradation products]*. Pharmazie, 1982. **37**(10): p. 708-11.
 153. Hermanson, G.T., *Chapter 19 - Vaccines and Immunogen Conjugates*, in *Bioconjugate Techniques (Third edition)*. 2013, Academic Press: Boston. p. 839-865.
 154. Gelamo, E.L., et al., *Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic*

- surfactants: spectroscopy and modelling*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1594**(1): p. 84-99.
155. McKeon, K.D. and B.J. Love, *The Presence of Adsorbed Proteins on Particles Increases Aggregated Particle Sedimentation, as Measured by a Light Scattering Technique*. J Adhesion, 2008. **84**(7): p. 664-674.
 156. Conde, J., et al., *Revisiting 30 years of Biofunctionalization and Surface Chemistry of Inorganic Nanoparticles for Nanomedicine*. Front Chem, 2014. **2**.
 157. Vashist, S.K., *Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications*. Diagnostics, 2012. **2**(3): p. 23-33.
 158. Sam, S., et al., *Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces*. Langmuir, 2010. **26**(2): p. 809-814.
 159. Shen, H., A.M. Jawaid, and P.T. Snee, *Poly(ethylene glycol) Carbodiimide Coupling Reagents for the Biological and Chemical Functionalization of Water-Soluble Nanoparticles*. ACS Nano, 2009. **3**(4): p. 915-923.
 160. Nakajima, N. and Y. Ikada, *Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media*. Bioconjug Chem, 1995. **6**(1): p. 123-30.
 161. Jang, L.-S. and H.-K. Keng, *Modified fabrication process of protein chips using a short-chain self-assembled monolayer*. Biomed Microdevices, 2008. **10**(2): p. 203-211.
 162. Agache, I.O., *From phenotypes to endotypes to asthma treatment*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2013. **13**(3): p. 249-256.
 163. Agache, I. and C.A. Akdis, *Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine*. Allergol Int, 2016. **65**(3): p. 243-252.
 164. Zeiss, C.R., et al., *The quantification of IgE antibody specific for ragweed Antigen E (AgE) from the basophil surface in patients with ragweed pollenosis*. Immunology, 1978. **35**(2): p. 237-246.
 165. Lindblad, J.H. and R.S. Farr, *The incidence of positive intradermal reactions and the demonstration of skin sensitizing antibody to extracts of ragweed and dust in humans without history of rhinitis or asthma*. J Allergy, 1961. **32**: p. 392-401.
 166. Schoos, A.M., et al., *Atopic endotype in childhood*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(3): p. 844-51 e4.
 167. Moneret-Vautrin, A., *Epidemiology of food allergy*. Rev Allergol Immuno Clin, 2008(48): p. 171-178.
 168. Sampson, H.A., *Food allergy: Past, present and future*. Allergol Int, 2016. **65**(4): p. 363-369.
 169. Okada, H., et al., *The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update*. Clin Exp Immunol, 2010. **160**(1): p. 1-9.
 170. Ege, M.J., et al., *Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(4): p. 817-823.
 171. Riedler, J., et al., *Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey*. The Lancet, 2001. **358**(9288): p. 1129-1133.
 172. Perzanowski, M.S., et al., *Effect of Cat and Dog Ownership on Sensitization and Development of Asthma among Preteenage Children*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(5): p. 696-702.
 173. Du Toit, G., et al., *Effect of Avoidance on Peanut Allergy after Early Peanut Consumption*. N Engl J Med, 2016. **374**: p. 1435-1443.
 174. Bjerke, T., et al., *Several genetic and environmental factors influence cord blood IgE concentration*. Pediatr Allergy Immunol, 1994. **5**(2): p. 88-94.
 175. Lockett, G.A., et al., *Association of season of birth with DNA methylation and allergic disease*. Allergy, 2016. **71**(9): p. 1314-1324.
 176. Martino, D., et al., *Epigenome-wide association study reveals longitudinally stable DNA methylation differences in CD4+ T cells from children with IgE-mediated food allergy*. Epigenetics, 2014. **9**(7): p. 998-

1006.

177. Martino, D., et al., *Blood DNA methylation biomarkers predict clinical reactivity in food-sensitized infants*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **135**(5): p. 1319-1328.e12.
178. Liang, L., et al., *An epigenome-wide association study of total serum immunoglobulin E concentration*. Nature, 2015. **520**(7549): p. 670-674.
179. Yang, I.V., et al., *DNA methylation and childhood asthma in the inner city*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **136**(1): p. 69-80.
180. Quraishi, B.M., et al., *Identifying CpG sites associated with eczema via random forest screening of epigenome-scale DNA methylation*. Clinical Epigenetics, 2015. **7**(1): p. 68.
181. Jarolim, E., et al., *IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of Betula verrucosa**. Allergy, 1989. **44**(6): p. 385-395.
182. Aalberse, R., *Specific IgE and IgG Responses in Atopic versus Nonatopic Subjects*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(supplement_2): p. S124-S127.
183. Prahl, P. and E. Nexø, *Human serum IgE against two major allergens from cow hair and dander. Determination of affinity and quantity of antigen-specific IgE*. Allergy, 1982. **37**(1): p. 49-54.
184. Prahl, P., et al., *Estimation of Affinity and Quantity of Human Antigen-Specific Serum IgG (Blocking Antibodies)*. Allergy, 1981. **36**(8): p. 555-560.
185. Vereda, A., et al., *Identification of IgE sequential epitopes of lentil (Len c 1) by means of peptide microarray immunoassay*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(3): p. 596-601.e1.
186. Ayuso, R., et al., *Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than by adults suggests that shrimp sensitization decreases with age*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(6): p. 1286-1293.e3.
187. Hazebrouck, S., et al., *Goat's milk allergy without cow's milk allergy: suppression of non-cross-reactive epitopes on caprine β -casein*. Clin Exp Allergy, 2014. **44**(4): p. 602-610.
188. Dery-Papini, S., et al., *Immunoglobulin-E-binding epitopes of wheat allergens in patients with food allergy to wheat and in mice experimentally sensitized to wheat proteins*. Clin Exp Allergy, 2011. **41**: p. 1478-1492.
189. Mita, H., H. Yasueda, and K. Akiyama, *Affinity of IgE antibody to antigen influences allergen-induced histamine release*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(11): p. 1583-1589.
190. Christensen, L.H., et al., *Several distinct properties of the IgE repertoire determine effector cell degranulation in response to allergen challenge*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(2): p. 298-304.
191. Pierson-Mullany, L.K., et al., *Evidence of an affinity threshold for IgE-allergen binding in the percutaneous skin test reaction*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(1): p. 107-116.
192. Kim, K.-E., et al., *The affinity of allergen specific IgE and the competition between IgE and IgG for the allergen in Amb a V sensitive individuals*. Mol Immunol, 1996. **33**(10): p. 873-880.
193. Jackola, D.R., et al., *Variable binding affinities for allergen suggest a 'selective competition' among immunoglobulins in atopic and non-atopic humans*. Mol Immunol, 2002. **39**(5-6): p. 367-377.
194. Hantusch, B., et al., *Affinity determinations of purified IgE and IgG antibodies against the major pollen allergens Phl p 5a and Bet v 1a: Discrepancy between IgE and IgG binding strength*. Immunol Lett, 2005. **97**(1): p. 81-89.
195. DeKosky, B.J., et al., *Large-scale sequence and structural comparisons of human naive and antigen-experienced antibody repertoires*. Proc Natl Acad Sci, 2016. **113**(19): p. E2636-E2645.
196. Wang, J., et al., *Correlation of IgE/IgG(4) milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(3): p. 695-702.e6.
197. Savilahti, E.M., et al., *Early recovery from cow's milk allergy is associated with decreasing IgE and increasing IgG4 binding to cow's milk epitopes*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(6): p. 1315-1321.e9.
198. Gouel-Chéron, A., et al., *Anaphylactic bronchospasm during general anesthesia is not related to*

- asthma*. Allergy, 2015. **70**(4): p. 453-456.
199. Mertes, P.M. and M.C. Laxenaire, *Épidémiologie des réactions anaphylactiques et anaphylactoïdes peranesthésiques en France. Septième enquête multicentrique (Janvier 2001–Décembre 2002)*. Ann Fr Anesth Reanim, 2004. **23**(12): p. 1133-1143.
 200. Brough, H.A., et al., *Peanut allergy: Effect of environmental peanut exposure in children with filaggrin loss-of-function mutations*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **134**(4): p. 867-875.e1.
 201. Steinke, J.W., T.A.E. Platts-Mills, and S.P. Commins, *The alpha-gal story: Lessons learned from connecting the dots*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **135**(3): p. 589-596.
 202. Sicherer, S.H. and H.A. Sampson, *Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(2): p. 291-307.e5.
 203. Ishii, Y., et al., *A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial infection*. J Control Release, 2008. **131**(2): p. 113-120.
 204. Matsuo, K., et al., *Analysis of Transcutaneous Antigenic Protein Delivery by a Hydrogel Patch Formulation*. J Pharm Sci, 2013. **102**(6): p. 1936-1947.
 205. Hirobe, S., et al., *Clinical study of transcutaneous vaccination using a hydrogel patch for tetanus and diphtheria*. Vaccine, 2012. **30**(10): p. 1847-1854.
 206. Florvaag, E., et al., *IgE-sensitization to the cough suppressant pholcodine and the effects of its withdrawal from the Norwegian market*. Allergy, 2011. **66**(7): p. 955-960.
 207. Harboe, T., et al., *Pholcodine exposure raises serum IgE in patients with previous anaphylaxis to neuromuscular blocking agents*. Allergy, 2007. **62**(12): p. 1445-1450.
 208. Dewachter, P., C. Mouton-Faivre, and D.L. Hepner, *Perioperative Anaphylaxis: What Should Be Known?* Curr Allergy Asthma Rep, 2015. **15**(5): p. 1-10.
 209. Agency, E.M., *Questions and answers on the review of the marketing authorisations for medicines containing pholcodine. Outcome of a procedure under Article 31 of Directive 2001/83/EC as amended*. 2012.
 210. Baldo, B.A. and N.H. Pham, *Histamine-releasing and allergenic properties of opioid analgesic drugs: resolving the two*. Anaesth Intensive Care, 2012. **40**(2): p. 216-35.
 211. Nasser, S.M.S. and P.W. Ewan, *Opiate-sensitivity: clinical characteristics and the role of skin prick testing*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(7): p. 1014-1020.
 212. Dybendal, T., et al., *Screening for mast cell tryptase and serum IgE antibodies in 18 patients with anaphylactic shock during general anaesthesia*. Acta Anaesthesiol Scand, 2003. **47**(10): p. 1211-1218.
 213. Weston, A. and E.S. Assem, *Possible link between anaphylactoid reactions to anaesthetics and chemicals in cosmetics and biocides*. Agents Actions, 1994. **41 Spec No**: p. C138-9.
 214. Dong, S., et al., *Prevalence of IgE against neuromuscular blocking agents in hairdressers and bakers*. Clin Exp Allergy, 2013. **43**(11): p. 1256-1262.
 215. Porri, F., et al., *Prevalence of muscle relaxant sensitivity in a general population: implications for a preoperative screening*. Clin Exp Allergy, 1999. **29**(1): p. 72-5.
 216. Rouzaire, P., et al., *Immediate Allergic Hypersensitivity to Quinolones Associates with Neuromuscular Blocking Agent Sensitization*. J Allergy Clin Immunol Pract, 2013. **1**(3): p. 273-279.e1.
 217. McDonnell, N.J., et al., *Sugammadex in the management of rocuronium-induced anaphylaxis*. Br J Anaesth, 2011. **106**(2): p. 199-201.
 218. Gaudenzio, N., et al., *Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies*. J Clin Invest, 2016. **126**(10).
 219. Dombrowicz, D., et al., *Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene*. Cell, 1993. **75**(5): p. 969-76.
 220. Miyajima, I., et al., *Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc*

- gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis.* J Clin Invest, 1997. **99**(5): p. 901-14.
221. Galli, S.J., *Pathogenesis and management of anaphylaxis: Current status and future challenges.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(3): p. 571-574.
 222. Hazenbos, W.L., et al., *Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice.* Immunity, 1996. **5**(2): p. 181-8.
 223. Ohnmacht, C., et al., *Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths.* Immunity, 2010. **33**(3): p. 364-74.
 224. Oettgen, H.C., et al., *Active anaphylaxis in IgE-deficient mice.* Nature, 1994. **370**(6488): p. 367-70.
 225. Tsujimura, Y., et al., *Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis.* Immunity, 2008. **28**(4): p. 581-9.
 226. Nimmerjahn, F., et al., *Fc gamma RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity.* Immunity, 2005. **23**(1): p. 41-51.
 227. Jönsson, F., et al., *Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis.* J Clin Invest, 2011.
 228. Strait, R.T., et al., *Pathways of anaphylaxis in the mouse.* J Allergy Clin Immunol, 2002. **109**(4): p. 658-68.
 229. Reardon, S., *Dirty room-mates make lab mice more useful.* Nature, 2016. **532**(7599): p. 294-5.
 230. Beura, L.K., et al., *Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice.* Nature, 2016. **532**(7600): p. 512-516.
 231. Kihl, J., et al., *Increased expression of surface activation markers on neutrophils following migration into the nasal lumen.* Clin Exp Allergy, 2003. **33**(8): p. 1141-1146.
 232. Kuijpers, T., et al., *Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation.* Blood, 1991. **78**(4): p. 1105-1111.
 233. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes.* Immunity, 2010. **33**(5): p. 657-70.
 234. Brinkmann, V. and A. Zychlinsky, *Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin?* J Cell Biol, 2012. **198**(5): p. 773-783.
 235. Wartha, F. and B. Henriques-Normark, *ETosis: a novel cell death pathway.* Sci Signal, 2008. **1**(21): p. pe25.
 236. von Kockritz-Blickwede, M., et al., *Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation.* Blood, 2008. **111**(6): p. 3070-80.
 237. de Chaisemartin, L., G. Hayem, and S. Chollet-Martin, *Quand les neutrophiles jettent leurs filets.* Revue du Rhumatisme, 2013. **80**(2): p. 102-105.
 238. Li, P., et al., *PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps.* J Exp Med, 2010. **207**(9): p. 1853-62.
 239. Neeli, I. and M. Radic, *Knotting the NETs: Analyzing histone modifications in neutrophil extracellular traps.* Arthritis Res Ther, 2012. **14**(2): p. 115.
 240. Papayannopoulos, V., et al., *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps.* J Cell Biol, 2010. **191**(3): p. 677-91.
 241. Chen, K., et al., *Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by Fc gamma RIIB but induces neutrophil extracellular traps via Fc gamma RIIA in vivo.* Blood, 2012.
 242. Yipp, B.G., et al., *Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo.* Nat Med, 2012.
 243. Brinkmann, V. and A. Zychlinsky, *Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin?* J Cell Biol, 2012. **198**(5): p. 773-83.

244. Kaplan, M.J. and M. Radic, *Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2689-95.
245. Garcia-Romo, G.S., et al., *Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus*. Sci Transl Med, 2011. **3**(73): p. 73ra20.
246. Villanueva, E., et al., *Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 538-552.
247. Leffler, J., et al., *Neutrophil Extracellular Traps That Are Not Degraded in Systemic Lupus Erythematosus Activate Complement Exacerbating the Disease*. J Immunol, 2012. **188**(7): p. 3522-3531.
248. Nakazawa, D., et al., *Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(11): p. 3779-87.
249. Villanueva, E., et al., *Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2012. **187**(1): p. 538-52.
250. Xu, J., et al., *Extracellular histones are major mediators of death in sepsis*. Nat Med, 2009. **15**(11): p. 1318-21.
251. Keshari, R.S., et al., *Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48111.
252. Dworski, R., et al., *Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(5): p. 1260-1266.
253. Narasaraaju, T., et al., *Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis*. Am J Pathol, 2011. **179**(1): p. 199-210.
254. Caudrillier, A., et al., *Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury*. J Clin Invest, 2012. **122**(7): p. 2661-71.
255. Thomas, G.M., et al., *Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice*. Blood, 2012. **119**(26): p. 6335-43.
256. Chen, K., et al., *Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo*. Blood, 2012. **120**(22): p. 4421-4431.
257. Krishnamurthy, D., et al., *Monitoring neutrophils and platelets during casein-induced anaphylaxis in an experimental BALB/c mouse model*. Clin Exp Allergy, 2012. **42**(7): p. 1119-1128.
258. Aucouturier, P., *Revoir le dosage des sous-classes d'IgG*. Presse Med, 2013. **42**(3): p. 253-257.
259. Beutier, H., et al., *IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice*. J Allergy Clin Immunol, 2016.
260. Huang, Z.-Y., et al., *Human platelet FcγRIIA and phagocytes in immune-complex clearance*. Mol Immunol, 2011. **48**(4): p. 691-696.
261. Vanderschueren, S., et al., *Thrombocytopenia and prognosis in intensive care*. Crit Care Med, 2000. **28**(6): p. 1871-1876.
262. Moreau, D., et al., *Platelet Count Decline: An Early Prognostic Marker in Critically Ill Patients With Prolonged ICU Stays*. Chest, 2007. **131**(6): p. 1735-1741.
263. Akca, S., et al., *Time course of platelet counts in critically ill patients*. Crit Care Med, 2002. **30**(4): p. 753-756.
264. Habets, K.L.L., T.W.J. Huizinga, and R.E.M. Toes, *Platelets and autoimmunity*. Eur J Clin Invest, 2013. **43**(7): p. 746-757.
265. Veien, M., et al., *Mechanisms of nonimmunological histamine and tryptase release from human cutaneous mast cells*. Anesthesiology, 2000. **92**(4): p. 1074-81.
266. Renz, C.L., et al., *Tryptase levels are not increased during vancomycin-induced anaphylactoid reactions*.

Anesthesiology, 1998. **89**(3): p. 620-5.

267. Laroche, D. and B. Debaene, *Moyens diagnostiques des réactions immédiates*. Ann Fr Anesth Reanim, 2011. **30**(3): p. 280-293.

ANNEXES

1 Revue de littérature : Contribution of human FcγRs to disease with evidence from human polymorphisms and transgenic animal studies

Caitlin M Gillis^{*}, Aurélie Gouel-Chéron^{*}, Friederike Jönsson[§], Pierre Bruhns[§]

^{*}Equal contributors. [§]Co-senior authors.

Frontiers in Immunology, 2014 May;30(5)254

2 Revue de littérature : Management of anaphylactic shock in the operating room

Aurélie Gouel-Chéron, Adela Harpan, Paul-Michel Mertes, Dan Longrois

La Presse Medicale. 2016 Sep;45(9):774-83

3 Chapitre de livre : Anaphylaxis (Immediate hypersensitivity): from old to new mechanisms

Caitlin M Gillis, Aurélie Gouel-Chéron, Pierre Bruhns

In: Parnham M, editor. *Compendium of Inflammatory Diseases*.

Basel: Springer Basel; 2016. p. 1-12.



Contribution of human FcγRs to disease with evidence from human polymorphisms and transgenic animal studies

Caitlin Gillis^{1,2†}, Aurélie Gouel-Chéron^{1,2,3†}, Friederike Jönsson^{1,2*†} and Pierre Bruhns^{1,2*†}

¹ Laboratoire Anticorps en Thérapie et Pathologie, Département d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France

² U760, INSERM, Paris, France

³ Department of Anesthesia and Intensive Care, Hospital of Bichat-Claude Bernard, Public Assistance-Hospitals of Paris, Paris, France

Edited by:

Jan Terje Andersen, Oslo University Hospital, Norway

Reviewed by:

Beatrice Jahn-Schmid, Medical

University of Vienna, Austria

Sylvie Fournel, Strasbourg University, France

*Correspondence:

Friederike Jönsson and Pierre Bruhns, Laboratoire Anticorps en Thérapie et Pathologie, Département d'Immunologie, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, Paris 75015, France

e-mail: joensson@pasteur.fr;

bruhns@pasteur.fr

[†] Caitlin Gillis and Aurélie

Gouel-Chéron have contributed equally to this work.

[†] Friederike Jönsson and Pierre

Bruhns are Co-senior authors.

The biological activities of human IgG antibodies predominantly rely on a family of receptors for the Fc portion of IgG, FcγRs: FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB, FcRL5, FcRn, and TRIM21. All FcγRs bind IgG at the cell surface, except FcRn and TRIM21 that bind IgG once internalized. The affinity of FcγRs for IgG is determined by polymorphisms of human FcγRs and ranges from 2×10^4 to 8×10^7 M⁻¹. The biological functions of FcγRs extend from cellular activation or inhibition, IgG-internalization/endocytosis/phagocytosis to IgG transport and recycling. This review focuses on human FcγRs and intends to present an overview of the current understanding of how these receptors may contribute to various pathologies. It will define FcγRs and their polymorphic variants, their affinity for human IgG subclasses, and review the associations found between FcγR polymorphisms and human pathologies. It will also describe the human FcγR-transgenic mice that have been used to study the role of these receptors in autoimmune, inflammatory, and allergic disease models.

Keywords: IgG receptors, transgenic mice, anaphylaxis, autoimmune diseases, genetic polymorphisms and disease association, human IgG receptors

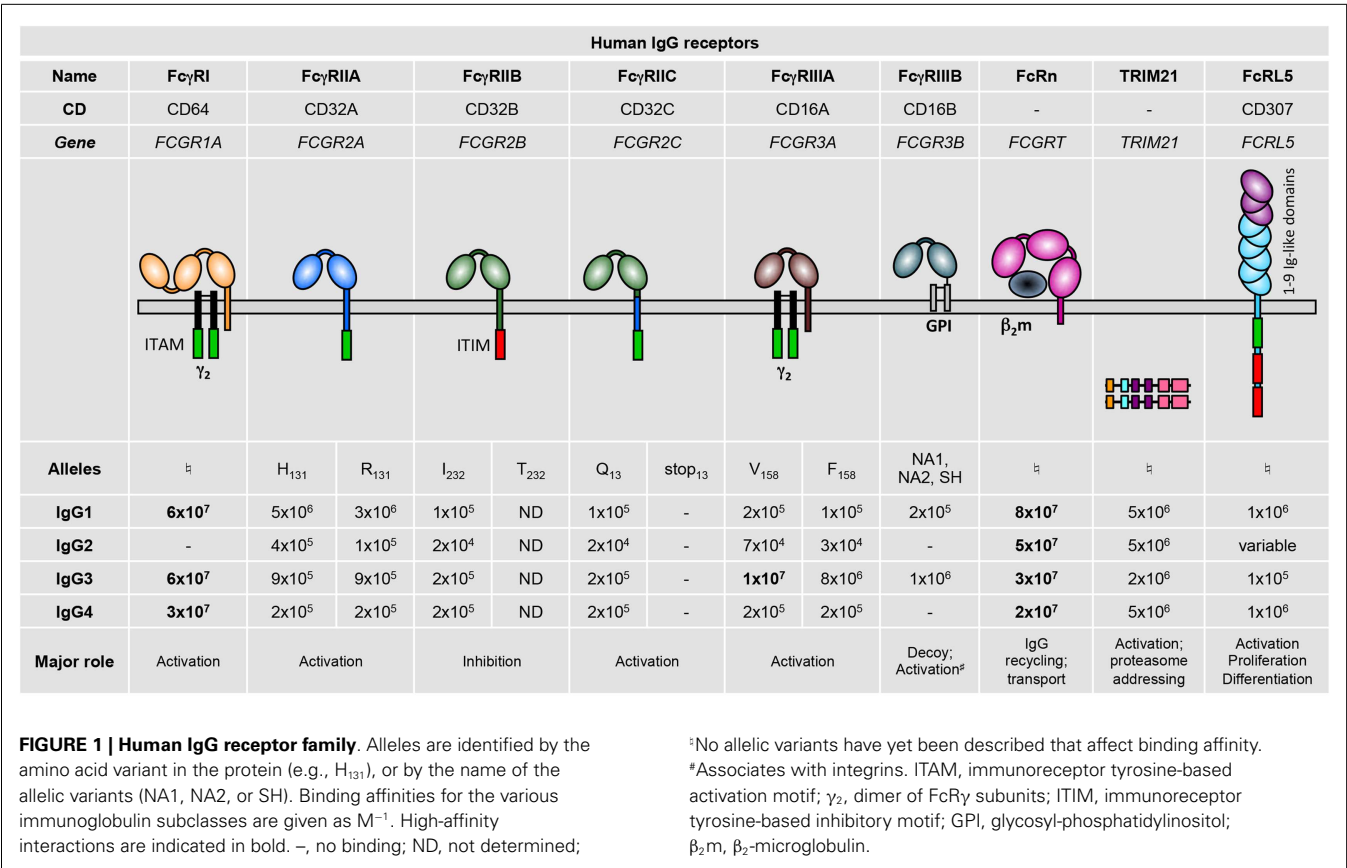
INTRODUCTION ON HUMAN FcγRs: DEFINITION AND BASIC FUNCTIONS

Human myeloid cells, NK cells, and B cells are equipped with a variety of receptors that enable their interaction with monomeric or aggregated immunoglobulins, antigen-antibody immune complexes, and opsonized (antibody-coated) particles, cells, or surfaces. Most of these receptors bind the Fc portion of immunoglobulins (receptors for the Fc portion of immunoglobulins, FcR) and endow these cells with the capacity to interact with IgM, IgA, IgG, and/or IgE. This review will focus on IgG-binding human FcRs, FcγRs.

Humans express nine FcγRs: the six classical FcγRs, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA, and FcγRIIIB; as well as FcRn, FcRL5 (1, 2), and TRIM21 (3) (**Figure 1**). These FcγRs all bind IgG on the surface of the cells expressing them, except FcRn (4, 5) and TRIM21 (6, 7) that bind IgG once internalized. Notably, all IgG receptors bind at least two human IgG subclasses, albeit with varying binding affinity: the association constants (K_A) of IgG-FcγR interactions range from 8×10^7 down to 2×10^4 M⁻¹ (8) (**Figure 1**). Historically, FcγRs were categorized as either *low-affinity* receptors that can only bind IgG when present in an immune complex, aggregated, or opsonized; or *high-affinity* receptors that can also bind free or monomeric IgG. This terminology has become rather obsolete considering reports of high- and low-affinity interactions for a single receptor toward

different Ig subclasses. Furthermore, although the prevailing belief was that occupancy of high-affinity receptors with pre-bound monomeric IgG prevents their participation in immediate IgG-dependent reactions; this has recently been refuted *in vivo* (9). Adding to this complexity, human FcγR polymorphisms that modulate affinity for some human IgG subclasses have been described (8) (refer to part 2; **Figure 1**).

Human FcγR expression on different cell types has been fairly comprehensively described, mostly by the use of FcγR-specific monoclonal antibodies (mAb) but also from data using mRNA profiling (**Figure 2**). Generally, the following observations can be made: hFcγRI (CD64) is restricted to monocytes/macrophages and dendritic cells and is inducibly expressed on neutrophils (10) and mast cells (11); hFcγRIIA (CD32A) is expressed on all myeloid cells but not on lymphocytes; hFcγRIIB (CD32B) is expressed at high levels only on B cells (12) and basophils (13). It is also expressed on tissue macrophages and dendritic cells (12), but only at low levels on 20% of circulating monocytes and 4% of circulating neutrophils (12, 14), and is not expressed on primary skin mast cells (15); hFcγRIIC (CD32C; refer to Section "Human FcγR Polymorphisms" for its "stop13" polymorphism) is expressed on NK cells (16), monocytes, and neutrophils (17); hFcγRIIIA (CD16A) is expressed on NK cells and monocytes/macrophages; hFcγRIIIB (CD16B) is highly expressed on neutrophils and at low levels on some basophils (18). TRIM21 (aka Ro52) was described



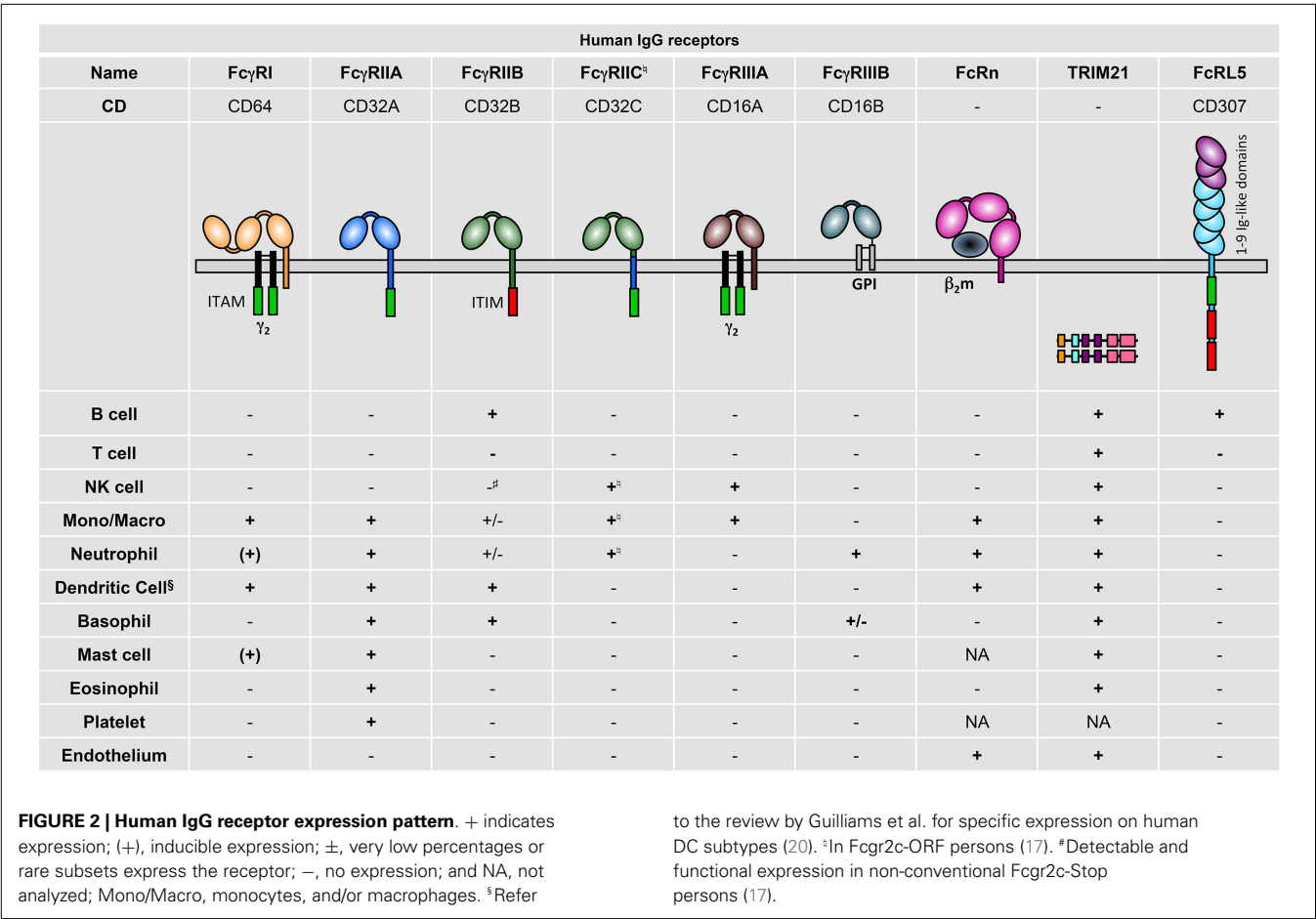
to be widely expressed among lymphoid and myeloid populations, but also on endothelial cells (19). FCRL5 has been reported to be restricted to B cells (2).

These expression patterns highlight that hFcγRIIA is the only activating IgG receptor constitutively expressed by mast cells, basophils, neutrophils, and eosinophils, and that FCRL5 is the only activating IgG receptor constitutively expressed by B cells. Importantly, signal transduction events induced by human activating IgG receptors may be negatively regulated by hFcγRIIB only in B cells, dendritic cells, and basophils, and rare fractions of monocytes and neutrophils. Indeed, mast cells, NK cells, and most neutrophils and monocytes do not express this inhibitory receptor. hFcRn has been reported in dendritic cells, monocytes/macrophages (21), neutrophils (22), and endothelial cells (23), but expression on platelets and mast cells has not been examined so far.

These patterns correspond to the expression of FcγRs in healthy individuals. These may be modified during pathological conditions or following therapeutic treatments. Certain cytokines for example have been reported to up-regulate or down-regulate some hFcγRs; e.g., B cells express higher levels of hFcγRIIB following IFN-γ but lower levels following IL-4 stimulation, whereas opposite effects have been reported for monocytes [reviewed in Ref. (24)]. On the latter cells, expression of hFcγRIIA is increased following IFN-γ and decreased following IL-4 stimulation (25). IL-3 stimulation, however, induces higher expression of both receptors (activating hFcγRIIA and inhibitory hFcγRIIB) on basophils

(13). Mucosal mast cells express hFcγRI upon IFN-γ stimulation (11). Surprisingly, IL-3 stimulation of primary monocytes did not modify hFcγRI expression, but increased its ability to bind IgG-immune complexes and to induce intracellular activation signals (26).

Activating FcγRs signal through an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) that is either present in their intracytoplasmic domain or in associated signaling subunits, such as the Fcγ chain (Figure 1), the FcRβ chain (exclusively in mast cells and basophils), or the CD3ζ chain (exclusively in NK cells). These ITAM-containing structures allow FcγRs, once aggregated by multimeric ligands, to activate signaling cascades via SRC family kinases and spleen tyrosine kinase (SYK) leading to cell activation, cytokine/chemokine production, and cell migration (27–29). The inhibitory receptor FcγRIIB possesses instead an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its intracytoplasmic domain (30), which allows this receptor, once co-engaged with an activating FcγR, to recruit the inositol polyphosphate-5-phosphatase SHIP1 (31) that counteracts the signaling cascades initiated by activating FcγRs (24). FCRL5 possesses both an ITAM and two ITIMs; however, it has been reported to exert mainly negative regulatory functions (32). IgG receptors devoid of both ITAM and ITIM may induce cell activation by associating with other receptors at the cell membrane, for example the glycosylphosphatidylinositol-anchored FcγRIIIB (33, 34) associates with integrins (35); or by activating transcription pathways or proteasome-related mechanisms as does TRIM21 (7, 36).



Internalization of antibodies, and of the antigens they are bound to, represents the only shared function of IgG receptors expressed at the cell surface (that is, all except FcRn and TRIM21), whether ITAM-bearing, ITIM-bearing, or neither. FcγRs thereby enable antigen capture and internalization by all FcγR-expressing nucleated cells, as well as phagocytosis of opsonized bacteria, viruses, or cells by phagocytes. FcRn is the only receptor enabling transcytosis of IgG or IgG-IC by polarized cells (23). Enhanced uptake of antibody-bound antigen enables antigen-presenting cells to activate antigen-specific T cells considerably more efficiently than free antigen (37), signifying the pivotal role of FcγRs in the initial phase of humoral and cellular immune responses. Receptors that bind IgG only when it has already been internalized, FcRn (the topic of this review series) and the ubiquitously expressed intracellular receptor TRIM21, may possibly contribute to this phenomenon [reviewed in Ref. (20)].

HUMAN FcγR POLYMORPHISMS
DEFINITIONS

The multiplicity of human FcγRs (Figure 1) is increased by a series of genetic polymorphisms, for which we will describe herein only those leading to known functional modifications. These are summarized in Table 1.

FcγRIIA

A polymorphism resulting in the presence of a histidine or an arginine residue at position 131 may also be referred to

as low-responder (H₁₃₁) or high-responder (R₁₃₁) (38). The FcγRIIA-H₁₃₁ allotype was originally reported to allow binding to IgG2 (53), subject to ethnic variation (54, 55), and was later described to also have increased binding for IgG3 (39). More recently, we have identified that only the binding to IgG1 and IgG2 are increased for H₁₃₁ compared to R₁₃₁ (8).

A novel splice variant of FCGR2A, FcγRIIA-exon 6*, containing an expressed cryptic exon 6* was identified in 2013 (41), and is associated with increased neutrophil sensitivity to IgG stimulation (56).

FcγRIIB

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at positions 386 [IIB-386 (G/c)] and 120 [IIB-120 (T/a)], collectively constitute the 2B.4 promoter haplotype, which displays increased binding capacity for transcription factors GATA4 and Yin-Yang1, resulting in increased promoter activity and higher expression of FcγRIIB on monocytes, B lymphocytes, neutrophils, and myeloid DCs (24, 42).

A polymorphism encoding an isoleucine to threonine substitution at position 232 in the transmembrane domain of FcγRIIB (T₂₃₂) may disable receptor function via exclusion from lipid rafts (43, 57).

FcγRIIC

In 20% of individuals FCGR2C encodes for a glutamine at position 13 (Q₁₃ or ORF) and FcγRIIC is expressed; but in 80% of

Table 1 | Summary of human FcγR polymorphisms.

Receptor	Variant	Effect	Reference
FcγRIIA	H/R ₁₃₁	H ₁₃₁ : ↗ binding of IgG2 and IgG1 ↗ Immune complex-opsonization	(8, 38–40)
	FcγRIIA-exon 6*	↗ Activation following IgG stimulation	(41)
FcγRIIB	–386G/c –120T/a	↗ promoter activity: thus, ↗ FcγRIIB expression	(24, 42)
	I/T ₂₃₂	T ₂₃₂ : ↘ inhibitory function	(43)
FcγRIIC	Q/stop ₁₃	Q ₁₃ : expression on NK cells, monocytes, neutrophils ↗ IgG-induced cell activation	(17)
	CNV	Correlation with protein expression levels	(44)
FcγRIIIA	V/F ₁₅₈	V ₁₅₈ : ↗ binding to IgG1, IgG2, IgG3 ↗ Cell activation	(8, 45, 46)
	CNV	Correlation with protein expression levels; impaired NK cell cytotoxic function	(47)
FcγRIIIB	NA1/NA2/SH	NA1: ↗ phagocytosis of IgG-immune complexes SH: ↗ FcγRIIIB expression levels	(48–51)
	CNV	Correlation with protein expression levels	(52)

individuals a SNP generates a stop codon (stop₁₃), in which case *FCGR2C* represents a pseudogene (16).

A subset of individuals carrying *FCGR2C-ORF* do not express FcγRIIC due to splice-site mutations and loss of exon 7. Inversely, this polymorphism leads to the expression of inhibitory hFcγRIIB expression on NK cells that has been shown to negatively regulate IgG-induced NK cell activation (17).

FcγRIIIA

A SNP determines the presence of a valine or phenylalanine at position 158 (45). The FcγRIIIA-V₁₅₈ variant demonstrates increased affinity for IgG1, IgG2, and IgG3, and increased IgG-induced cell activation and elimination of immune complexes (8, 46, 58).

FcγRIIIB

FcγRIIIB bears the neutrophil antigen (NA) in its membrane-distal Ig-like domain, generating three variants termed NA1 (R₃₆ N₆₅ A₇₈ D₈₂ V₁₀₆), NA2 (S₃₆ S₆₅ A₇₈ N₈₂ I₁₀₆) (48, 59), and SH (S₃₆ S₆₅ D₇₈ N₈₂ I₁₀₆) (50) that do not demonstrate detectable differences in affinity for hIgG subclasses (8). The NA1 allotype was, however, reported to increase phagocytosis of IgG-opsonized particles (49). The SH allotype has been associated with higher FcγRIIIB expression levels (51).

Gene copy number variation (CNV)

Recognized as an important indicator for inter-individual differences, can alter the expression of activating IgG receptors. The balance between activating and inhibitory FcγRs can therefore be perturbed, altering cellular responses toward IgG-immune complexes. CNV of *FCGR2C*, *FCGR3A*, and *FCGR3B* (Table 1) have been shown to correlate with protein expression levels. Duplications of the gene encoding *FCGR3B* can lead to the expression of the three different FcγRIIIB variants (NA1, NA2, and SH) in a single individual (51). CNV in *FCGR3A* (deletion of one allele) correlated with a reduced expression of FcγRIIIA on NK cells and

impaired cytotoxic function (47). Deletion of a large portion of the *FCGR* locus, including *FCGR2C* and *FCGR3B*, also resulted in abnormal expression of FcγRIIB on NK cells, presumably due to deletion of upstream regulatory elements. Expression of this inhibitory receptor enabled negative regulation of IgG-induced NK cell activation (17). To the extent of our knowledge, CNV of the *FCGR2A* and *FCGR2B* genes have not been reported (47).

ASSOCIATION WITH DISEASE SUSCEPTIBILITY AND/OR SUCCESS OF ANTIBODY-BASED THERAPIES

Several *FCGR* polymorphisms modify the affinity between FcγRs and human IgG, and therefore the efficacy of immune complex clearance can be affected. Reduced immune complex clearance is indeed a risk factor for diseases like Systemic Lupus Erythematosus and Wegener's granulomatosis (60, 61). Other polymorphisms may favor detrimental inflammatory responses and thus predispose to autoimmunity. Diseases that have been associated with FcγR polymorphisms are presented in Table 1.

FcγR polymorphisms may also influence patients' response to treatment with intravenous immunoglobulin and therapeutic mAb. Almost all mAb used in therapy are based on human IgG1 antibodies, either chimeric mouse/human or fully human, allowing their interaction with all human FcγRs (8, 62). The first report to assess the predictive value of FcγR polymorphisms in responses to antibody therapies associated homozygous *FCGR3A-V/V*₁₅₈ individuals with better clinical responses to anti-CD20 therapy (Rituximab) in the treatment of non-Hodgkin lymphomas (63). Homozygous *FCGR3A-V/V*₁₅₈ individuals have since been found to have improved biological responses to anti-CD20 therapy in immune thrombocytopenia (64) and rheumatoid arthritis (RA) (65); and anti-TNF-α therapy (Infliximab) to treat Crohn's disease (66, 67); compared to carriers of one or two *FCGR3A-F*₁₅₈ alleles. In arthritis patients, however, findings are controversial regarding the association of *FCGR3A* polymorphisms with clinical response to TNF-α inhibitors (infliximab, adalimumab,

etanercept): although one study describes a better clinical response in *FCGR3A*-F/F₁₅₈ patients (68); another, larger study with a more homogenous patient cohort found no association (69). Homozygous *FCGR3A*-V/V₁₅₈ individuals were more likely to experience complete remission from immune thrombocytopenia following medication, but conversely remission rates after splenectomy were higher in homozygous *FCGR3A*-F/F₁₅₈ or heterozygous individuals (70). The *FCGR2A*-H131 variant associates with susceptibility to Kawasaki Disease (Table 1), whereas responsiveness to IVIG therapy in Kawasaki Disease patients is strongly associated with the *FCGR3B* genotype: the NA1 variant significantly decreases the odds of an appropriate clinical outcome (71). Similarly, CNV of both *FCGR3B* and *FCGR2C* were associated with Kawasaki Disease susceptibility and influenced IVIG treatment response (72). Furthermore, the *FCGR2B* minor alleles (IIB-386c and IIB-120a) conferring increased promoter activity were positively correlated to IVIG therapeutic response, although with limited statistical power over a small sample size (73). Each of these genetic associations is also constrained by unequal polymorphic variation between the different ethnic groups studied.

Altogether, particular FcγR polymorphisms have been described to be associated with the induction or severity of antibody-related disease, or patient responsiveness to antibody-based therapies. Nonetheless one should keep in mind that most FcγR-encoding genes are located within the 1q23 locus (*FCGR2A*, *FCGR3A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3B*) and may display a high degree of linkage disequilibrium, as reported for *FCGR2A* and *FCGR3A* (74) and for *FCGR2C* and *FCGR3B* (44). Association studies of FcγR-encoding genes should therefore include analyses of all FcγR-encoding genes from the 1q23 locus, and not focus on one particular gene.

IN VIVO ROLES OF HUMAN FcγRS: LESSONS FROM MOUSE MODELS¹

TRANSGENIC MOUSE MODELS EXPRESSING hFcγR(s)

Transgenic mouse studies have greatly enhanced our understanding of the *in vivo* function of hFcγRs. In particular, these studies have highlighted the respective contributions of hFcγRs to antibody-mediated inflammatory and allergic diseases (refer to Section “Understanding the Role of hFcγRs *In vivo* Using Transgenic Mouse Models: Illustrated in Autoimmune, Inflammatory, and Allergic Diseases”). Over the last two decades, various transgenic mouse strains have been generated that carry single or multiple hFcγR-encoding genes (Table 2). Transgenic strains were initially generated on a wild-type mouse background; however, later studies have examined transgene expression in mice deficient for multiple endogenous mFcγRs, to specifically study the function of the transgenic human receptor.

The common approach to reproduce hFcγR expression patterns in mice is to use the genuine human promoter to drive transgene expression (Table 2). Whereas this strategy was successful for hFcγRIIA^{tg} and hFcγRIIIB^{tg} mice, both hFcγRI^{tg} mice and hFcγRIIB^{tg} mice exhibit somewhat abnormal expression [discussed in Ref. (62)]. hFcγRI^{tg} mice, for example, constitutively

express substantial amounts of this receptor on neutrophils (37), while in humans hFcγRI is only inducibly expressed on neutrophils in contexts of inflammation, infection and during particular therapies [reviewed in Ref. (62)]. An alternative strategy consists of using a cell-specific promoter to drive hFcγR expression. hFcγRIIA^{tg}, hFcγRIIIB^{tg}, or double-transgenic mice were generated using the human MRP8 promoter to express these receptors on neutrophils and, abnormally for hFcγRIIIB, on a proportion of monocytes (34). Finally, efforts made to cross the five single hFcγR-transgenic mouse strains with mFcγR^{null} mice – lacking mFcγRI, IIB, III, and IV – yielded a mouse model expressing most human IgG receptors – hFcγRI, IIA, IIB, IIIA, and IIIB – that preserves most human expression patterns (119) (Table 2).

UNDERSTANDING THE ROLE OF hFcγRS *IN VIVO* USING TRANSGENIC MOUSE MODELS: ILLUSTRATED IN AUTOIMMUNE, INFLAMMATORY, AND ALLERGIC DISEASES

FcR-mediated uptake of immune complexes and subsequent antigen presentation is a critical aspect of the immune response to foreign pathogens. Targeting of antigen to hFcγRI in hFcγRI^{tg} mice induced a strong antibody response, suggesting that hFcγRI on myeloid cells is capable of mediating antigen uptake and presentation *in vivo* (37, 120, 121). Various studies have demonstrated the capacity for hFcγRI and hFcγRIIA to mediate cytotoxicity in the form of anti-tumor activity when engaged by bi-specific antibodies or antibodies with enhanced FcR binding, highlighting the effectiveness of such engineered antibody therapeutics *in vivo* (122–125). The role of FcγR in mediating anti-tumor therapies has recently been well-reviewed elsewhere (126, 127) and will not be discussed further in this review. hFcγR-transgenic mice have been useful both in understanding the *in vivo* function of these receptors and dissecting pathological mechanisms of disease; for illustration this section will describe results obtained in models of autoimmune thrombocytopenia, anaphylaxis, inflammation, and RA. Clearly, the biological responses to immobilized IgG are a function of their location, structure, and deposition, determining the subsequent recruitment and FcγR-mediated activation of immune cells: hFcγR-transgenic mice can assist us also in understanding the cell-specific role of FcγR in recruitment and immune complex clearance.

Autoimmune thrombocytopenia

Mice deficient for the FcRγ-subunit that is necessary for the expression of all mouse activating FcγRs are resistant to antibody-mediated platelet destruction, demonstrating the importance of activating FcγRs in this model of autoimmune thrombocytopenia (128). Using transgenic mice, both hFcγRI and hFcγRIIA were found to be independently sufficient for platelet clearance (9, 129). In hFcγRI^{tg} mice, thrombocytopenia was mediated by monocyte/macrophages outside of the spleen (9), whereas in hFcγRIIA^{tg} mice, splenectomy was found to provoke a more severe phenotype of thrombosis and systemic shock when thrombocytopenia was induced by activating anti-platelet antibodies (130). Importantly, hFcγRIIA is the only FcγR expressed on platelets, in humans and hFcγRIIA^{tg} mice. It is likely, therefore, that the presence of this FcγR on the platelets themselves contributes to antibody-induced intravascular platelet activation that is most efficiently resolved

¹ Note: for the sake of clarity, this section will use the terminology “hFcγR” for human IgG receptors, and “mFcγR” for mouse IgG receptors.

Table 2 | Association of FcγRs receptor variants with chronic inflammatory or immunological diseases.

Gene	SNP	Disease	Reference
<i>FCGR2A</i>	H ₁₃₁	GBS, Kawasaki disease, idiopathic pulmonary fibrosis, and, for homozygous genotypes, MG, and children chronic ITP	(75–79)
	R ₁₃₁	Bronchial asthma and allergic rhinitis, Still disease, Behçet's disease, refractory ITP, WG, MS, SLE, lupus nephritis, antiphospholipid syndrome, giant cell arteritis, rheumatic fever, ITP, and IgA nephropathy	(55, 60, 80–94)
	FcγRIIIa-exon 6*	Anaphylaxis in patients with hypogammaglobulinemia, common variable immunodeficiency	(41)
<i>FCGR2B</i>	T ₂₃₂	SLE, anti-GBM disease	(57, 95–99).
	–386C/–120A	SLE, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy	(42, 100, 101)
<i>FCGR2C</i>	CNV	ITP, Kawasaki disease	(44, 72)
<i>FCGR3A</i>	F ₁₅₈	SLE, Crohn's disease, Behçet's disease, severe GBS, bullous pemphigoid, WG relapses, RA, and for homozygotes, chronic ITP, and nephritis	(45, 60, 67, 70, 77, 93, 102–105)
	V ₁₅₈	For homozygotes: RA susceptibility and severity, idiopathic inflammatory myopathies, and IgA nephropathy	(90, 106–108)
	CNV	Anti-GBM disease, RA	(109, 110)
<i>FCGR3B</i>	NA1	For homozygotes: anti-neutrophil cytoplasmic antigen systemic vasculitis, chronic ITP in children, and severe course of MG	(75, 77, 111, 112)
	NA2	SLE, severe GBS, Behçet's disease, IgA nephropathy, and MS	(85, 93, 105, 111, 113)
	SH	Alloimmune neonatal neutropenia, transfusion reactions	(50)
	CNV	Glomerulonephritis, SLE, systemic autoimmunity, RA, idiopathic pulmonary fibrosis, systemic sclerosis, and Kawasaki disease	(52, 72, 114–118)

GBM, glomerular basement membrane; GBS, Guillain-Barré syndrome; ITP, idiopathic thrombocytopenic purpura; MG, myasthenia gravis; MS, multiple sclerosis; RA, rheumatoid arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus; SNP, single nuclear polymorphism; WG, Wegener's granulomatosis.

by phagocytes in the spleen. These findings have implications for understanding human immune-mediated thrombocytopenic disorders, such as heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis (HIT/T), a serious complication arising from the clinical use of heparin. Using hFcγRIIA^{tg} mice it was identified that antibodies against heparin–platelet factor 4 complexes are responsible for hFcγRIIA-mediated platelet activation, thrombocytopenia, and thrombi formation in the lung vasculature (131, 132). Similarly, thromboembolic complications from the use of monoclonal antibody therapies may be a result of hFcγRIIA-dependent platelet activation due to circulating immune complexes (133, 134). Another important outcome of these mouse studies is that the density of hFcγRIIA expression in the transgenic animal affects the severity of antibody-induced disease (130), which has critical ramifications for understanding differences in immune reactions between individuals. Finally, a therapeutic intervention targeting the hFcγRIIA-signaling pathway proved successful for the prevention of thrombocytopenia in hFcγRIIA^{tg} mice (135).

Anaphylactic reactions

Individuals who have developed antibodies against a given allergen can, upon re-exposure, develop a severe systemic allergic reaction (anaphylaxis). Allergen re-exposure induces the rapid formation of immune complexes that leads to cellular activation and release of vasoactive mediators, which drives the phenotype of systemic shock, including symptoms of hypotension and respiratory distress. Although anaphylaxis is classically attributed to an IgE-mediated mast cell-dependent paradigm of allergic reactivity, the same systemic symptoms can be reproduced experimentally

in mice by the transfer of specific IgG antibodies and allergen, of preformed immune complexes (passive systemic anaphylaxis, PSA), or by repeated immunization with an antigen prior to challenge (active systemic anaphylaxis, ASA). hFcγRI and hFcγRIIA expressed in transgenic mice were each individually sufficient to mediate PSA, the symptoms of which may be alleviated by pre-treatment with blocking antibodies (9, 136). PSA mediated by hFcγRIIA was found to be independent of mast cells and basophils, but rather dependent on neutrophils and monocytes/macrophages (136). Furthermore, hFcγRI and hFcγRIIA were identified as each individually sufficient to mediate ASA in transgenic mice, resulting in both hypothermia and death (9, 136). hFcγRI-dependent ASA required neutrophils and the release of platelet activating factor (9). These data demonstrate that hFcγR expressed on neutrophils and monocytes can mediate fatal anaphylactic reactions *in vivo*. Furthermore, in hFcγRI^{tg}IIA^{tg}IIB^{tg}IIIA^{tg}IIIB^{tg} mice (on the mFcγR^{null} background), administration of aggregated IgG was sufficient to trigger anaphylaxis (119). In addition, directly targeting either hFcγRI or hFcγRIIA by injection of agonistic mAb could induce anaphylaxis in transgenic mice (9, 136). Altogether, these data support the notion that anaphylaxis may also occur in humans in an hFcγR-dependent manner when allergen-specific IgGs are produced by an individual.

Immune complex induced inflammation

The formation of immune complexes is a hallmark of many human diseases, and their accumulation is an important trigger of inflammation-induced tissue damage. Pathogenic antibodies may bind directly to host cells, or immune complexes may deposit

within tissues and trigger activation of local or circulating hFcγR-expressing cells. Using hFcγRIIA^{tg} mice, it was demonstrated that hFcγRIIA expressed on skin mast cells could trigger their activation following intradermal injection of immune complexes resulting in an inflammatory reaction in the skin (136). Inflammation of the airways due to local formation of immune complexes is characterized by granulocyte infiltration, elevated levels of myeloperoxidase, and subsequent damage to the lung epithelium, mimicking symptoms of asthmatic disease in humans. Whereas Fcγ-subunit^{-/-} mice are resistant to IC-induced airway inflammation, transgenic expression of either hFcγRI or hFcγRIIA was sufficient to restore this antibody-mediated pathology (9, 136).

Rheumatoid arthritis

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease in which the formation of immune complexes within the joints drives an inflammatory pathology. Autoantibodies directed against joint proteins such as collagen type II or glucose-6-phosphate isomerase (GPI) are found in RA patients, and the arthritis pathology may be modeled in mice by either active immunization with joint-associated components or by passive antibody transfer. hFcRn^{tg} mice provided direct evidence for the role of this receptor in serum persistence and transport of antibodies into tissues (23). Indeed, mFcRn^{-/-} mice are resistant to passive arthritis induction, and transgenic expression of hFcRn could restore arthritis susceptibility (137, 138); suggesting that greater IgG serum persistence may have implications for many autoimmune and inflammatory conditions (139). Surprisingly, transgenic expression of hFcγRIIA-R₁₃₁ on a wild-type mouse background was associated with the spontaneous development of an RA-like joint pathology (140). Expression of hFcγRIIA indeed renders mice highly susceptible to various models of arthritis (140, 141), even if its expression is purposely restricted to neutrophils (142). Small inhibitors designed to bind antagonistically to hFcγRIIA were found to be protective (143), proposing a hFcγR-targeted therapy for RA. Besides hFcγRIIA^{tg} mice, other hFcγR-transgenic mice do not exhibit spontaneous joint inflammation. Nevertheless, hFcγRI^{tg} mice demonstrated that this receptor is sufficient to mediate arthritis induction in transgenic mice, dependent on the presence of both neutrophils and monocytes/macrophages (9). Therapeutic elimination of inflammatory macrophages by an hFcγRI-targeting immunotoxin inhibited the progression of experimental arthritis in hFcγRI^{tg} rats (144), and resolved cutaneous inflammation (145).

Cell-specific function of FcγR

Studies using hFcγR^{tg} mice have enabled the description of specific *in vivo* functions not only for these IgG receptors, but also the cells that express them. Neutrophils are a particularly relevant example: the two main human neutrophil IgG receptors, hFcγRIIA and hFcγRIIIB, were found to individually and cooperatively promote IC-induced neutrophil recruitment and accumulation in the tissues. hFcγRIIA alone, however, promoted associated injury and inflammation in multiple models of antibody-dependent autoimmunity. Importantly, neutrophil recruitment occurred despite the absence of FcγR expression on other cell types such as mast cells and macrophages, indicating a prominent role for hFcγRs on neutrophils in IC-induced recruitment (34). Furthermore,

specialized functions may be attributed to these two neutrophil FcγR: hFcγRIIIB seems to play an important role in homeostatic clearance of immune complexes deposited within the vasculature, whereas in a complex environment of immune complex deposition within the tissue and the vasculature, hFcγRIIA was required for the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) (146). Collectively, these data in hFcγR^{tg} mice demonstrate the value of a transgenic approach to appreciate the role of human FcγR and the cells expressing them.

FINAL CONSIDERATIONS

Although, it is tempting to draw conclusions from genetic association studies performed in humans, it would be overreaching to delineate causal relationships between particular FcγR variants and antibody-mediated human disease. Importantly, all the human FcγR-transgenic mouse strains that have been reported express a single polymorphic variant of each FcγR (Table 3). Thus, no comprehensive study can compare today the properties of a given polymorphism in mouse models of disease. Novel mouse models based on the exchange of the entire FCGR locus with that of humans may allow these comparison studies, or transgenic/knock-in mice expressing different polymorphic variants than the transgenic mice already reported, but remain to be generated. Still, when taking into account published data from both humans and animal models (referenced in Tables 2 and 3) several parallel observations have been described:

- Expression of hFcγRIIA (R₁₃₁) renders mice susceptible to arthritis and autoimmune pathologies including thrombocytopenia (Table 3); and expression of hFcγRIIA-R₁₃₁ allotype is similarly associated with inflammatory diseases, thrombocytopenia, and autoimmunity in humans (Table 2). The FcγRIIA-exon 6* polymorphic variant, which confers increased neutrophil sensitivity to IgG stimulation (Table 1) was also associated with anaphylactic responses in patients upon IVIG therapy (Table 2); consistent with data obtained in hFcγRIIA^{tg} mice indicating that neutrophils can contribute to IgG-dependant anaphylaxis mediated by FcγRIIA.
- The NA1 allotypic variant of FcγRIIIB confers increased phagocytosis of IgG-immune complexes, and is associated with thrombocytopenia in humans; whereas FcγRIIIB-NA2 and CNV are associated with inflammatory and autoimmune conditions characterized by immune complex deposition. These data are congruent with findings in NA2-hFcγRIIIB^{tg} mice (Table 2), demonstrating an important role for this receptor in mediating neutrophil recruitment as well as homeostatic clearance of immune complexes.

While genetic association studies identify important risk factors and inform on the involvement of FcγR in human disease; hFcγR^{tg} mice allow us to more precisely dissect pathological mechanisms, and describe the role of human FcγR and the cells expressing them in various clinically relevant pathologies. Together, these data in humans and transgenic models highlight the contribution of hFcγR to antibody-mediated diseases, and open avenues for understanding pathogenic mechanisms. Such data will continue

Table 3 | hFcγR-transgenic mouse models: description and main results obtained.

Promoter	Expression	Variant	Strain	<i>In vivo</i> findings	Reference	
CD64 (hFcγRI)						
FCGR1	Monocytes, macrophages, DCs, neutrophils		FVB/N	Bi-specific mAb-dependent hFcγRI-triggered killing (<i>in vitro</i>)	(122)	
			FVB/N	Anti-hFcγRI mAb immunization elicits higher Ab responses	(37)	
			FVB/N	hFcγRI-mediated binding and phagocytosis of opsonized RBCs	(147)	
			?	Antigen targeting to hFcγRI increased vaccination potency	(120)	
			FVB/N	Weak antigen targeting to hFcγRI enhances immunogenicity	(121)	
			FVB/N	Immunotoxin targeting of hFcγRI reduces inflammation	(145)	
			5KO (B6 F6)	hFcγRI-dependent arthritis, thrombocytopenia, airway inflammation, and anaphylaxis (PSA and ASA)	(9)	
CD32A (hFcγRIIA)						
FCGR2A	Monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, basophils, mast cells, DCs, megakaryocyte, platelets	R ₁₃₁	FcRγ ^{−/−} (B6xSJL)	Immune thrombocytopenia can be induced via hFcγRIIA	(129)	
			FcRγ ^{−/−} (B6)	hFcγRIIA-dependent thrombosis and shock	(130)	
			hPF4 ^{tg} (B6)	hFcγRIIA-dependent Heparin-induced thrombocytopenia	(131)	
			C57BL/6	Increased active and passive collagen-induced arthritis	(140)	
			FcRγ ^{−/−} (B6xSJL)	hFcγRIIA mediates experimental immune hemolytic anemia	(148)	
			hPF4 ^{tg} lo/hi (B6)	PF4-hFcγRIIA-dependent Heparin-induced thrombocytopenia	(132)	
			C57BL/6 × SJL F ₁	hFcγRIIA-dependent platelet activation by Bevacizumab IC	(133)	
			C57BL/6 × SJL F ₁	Small chemical entities inhibit collagen-induced arthritis	(143)	
			C57BL/6 × SJL F ₁	hFcγRIIA-dependent platelet activation by CD40L IC	(134)	
			C57BL/6 × SJL F ₁	Increased sensitivity to autoimmune arthritis	(141)	
			C57BL/6	Inhibition of hFcγRIIA-signaling pathway to inhibit thrombosis and thrombocytopenia	(135)	
				FcRγ ^{−/−} ,5KO	hFcγRIIA induces anaphylaxis and airway inflammation	(136)
				C57BL/6J	hFcγRIIA cooperates with integrin signaling in platelets	(149)
MRP8	Neutrophils, some monocytes	R ₁₃₁	FcγR ^{−/−}	hFcγRIIA-dependent nephritis, Arthus reaction, neutrophil recruitment and tissue injury	(34)	
			FcγR ^{−/−}	Neutrophil hFcγRIIA is sufficient for arthritis induction	(142)	
			FcγR ^{−/−}	hFcγRIIA-dependent NETosis in Arthus reaction	(146)	
CD32B (hFcγRIIB)						
FCGR2B	B cells, splenic CD11c DCs, monocytes, neutrophils, eosinophils	I ₂₃₂	C57Bl/6	Crosslinking hFcγRIIB and CD19 suppresses humoral immunity in systemic lupus erythematosus	(150)	
			FcRγ ^{−/−} or FcγRIIB ^{−/−}	hFcγRIIB-enhanced immunostimulatory and anti-tumor activity of chimeric mouse–human agonistic anti-CD40 Abs	(151)	
			CD40 ^{−/−}	Anti-tumor activity of agonistic anti-TNFR Abs requires differential hFcγRIIB coengagement	(152)	
CD16A (hFcγRIIIA)						
FCGR3A	NK cells, macrophages	F ₁₅₈	B6xCBAFI	Promoter/expression analysis	(153)	
?	NK cells and ?	?	SCID	Glycoengineering of a humanized anti-EGFR Ab leads to enhanced ADCC through hFcγRIIIA	(125)	
CD16B (hFcγRIIIB)						
FCGR3B	Neutrophils	?	B6xCBAFI	Promoter/expression analysis	(153)	
MRP8	Neutrophils, some monocytes	NA2	FcRγ ^{−/−}	hFcγRIIIB is sufficient for NTS nephritis, cutaneous RPA reaction and promotes neutrophil recruitment	(34)	
			FcRγ ^{−/−}	hFcγRIIIB mediates neutrophil tethering to intravascular immune complexes and their uptake	(146)	
CD32A (hFcγRIIA) + CD16B (hFcγRIIIB)						
MRP8	Neutrophils, some monocytes	IIA: R ₁₃₁ IIIB:NA2	FcRγ ^{−/−}	hFcγRIIA and hFcγRIIIB cooperate to induce nephritis and cutaneous Arthus reaction	(34)	

(Continued)

Table 3 | Continued

Promoter	Expression	Variant	Strain	<i>In vivo</i> findings	Reference
FcγR-HUMANIZED MICE (INTERCROSS OF hFcγRI^{tg}, IIA^{tg}, IIB^{tg}, IIIA^{tg} AND IIIB^{tg} MICE)					
<i>FCGR1</i>	Please refer to single	I	mFcγRI ^{-/-}	Antibody-mediated FcγR-dependent cell depletion (B cells, T	(119)
<i>FCGR2A</i>	transgenic mice	IIA-R ₁₃₁	mFcγRIIB ^{-/-}	cells, platelets), and B16-F10 lung metastasis clearance	
<i>FCGR2B</i>		IIB-I ₂₃₂	mFcγRIII ^{-/-}	FcγR-mediated IC-induced systemic anaphylaxis	
<i>FCGR3A</i>		IIIA-F ₁₅₈	mFcγRIV ^{-/-}		
<i>FCGR3B</i>		IIIB-?			
hFcRn					
<i>FCGRT</i>	Intestine and ?		mFcRn ^{-/-}	hFcRn expression restores serum half life of hIgG in mFcRn ^{-/-}	(154)
			mFcRn ^{-/-} ; mFcRn ^{-/-}	hIgG with engineered high FcRn binding affinity has enhanced	(137)
			FcγRIIB ^{-/-}	half life <i>in vivo</i> ; inhibition of the binding of pathogenic Abs to	
			mFcRn ^{-/-}	hFcRn ameliorates arthritis	
			mβ2m ^{-/-}	Blocking hFcRn using a peptide antagonist increases hIgG	(155)
			hFcRn ^{tg} hβ2m ^{tg}	catabolism	
			6KO (B6 F6)	hFcRn restores arthritis susceptibility in 6KO mice	(138)

?, information unavailable in the original publication.

to impact on therapeutic choices and potentially identify new interventional targets.

ACKNOWLEDGMENTS

Works of our laboratory discussed in this review were supported by the Institut Pasteur, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Agence Nationale pour la Recherche (grant GENOPAT-09-GENO-014-01), the Société Française d'Allergologie (SFA), and the company Balsan. Caitlin Gillis is a scholar of the Pasteur Paris University International Doctoral Program (PPUIDP) and received a stipend from the Institut Carnot Pasteur Maladies Infectieuses. Friederike Jönsson is a *chargé de recherche* (Investigator) at the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

REFERENCES

- Wilson TJ, Fuchs A, Colonna M. Cutting edge: human FcRL4 and FcRL5 are receptors for IgA and IgG. *J Immunol* (2012) **188**:4741–5. doi:10.4049/jimmunol.1102651
- Franco A, Damdinsuren B, Ise T, Dement-Brown J, Li H, Nagata S, et al. Human Fc receptor-like 5 binds intact IgG via mechanisms distinct from those of Fc receptors. *J Immunol* (2013) **190**:5739–46. doi:10.4049/jimmunol.1202860
- Yang Y, Eversole T, Lee DJ, Sontheimer RD, Capra JD. Protein-protein interactions between native Ro52 and immunoglobulin G heavy chain. *Scand J Immunol* (1999) **49**:620–8. doi:10.1046/j.1365-3083.1999.00547.x
- Simister NE, Mostov KE. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* (1989) **337**:184–7. doi:10.1038/337184a0
- Ober RJ, Martinez C, Vaccaro C, Zhou J, Ward ES. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J Immunol* (2004) **172**:2021–9. doi:10.4049/jimmunol.172.4.2021
- James LC, Keeble AH, Khan Z, Rhodes DA, Trowsdale J. Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) **104**:6200–5. doi:10.1073/pnas.0609174104
- Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR, Towers GJ, Johnson CM, James LC. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**:19985–90. doi:10.1073/pnas.1014074107
- Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fc[gamma] receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* (2009) **113**:3716–25. doi:10.1182/blood-2008-09-179754
- Mancardi DA, Albanesi M, Jonsson F, Iannascoli B, van Rooijen N, Kang X, et al. The high-affinity human IgG receptor FcgammaRI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis, and antitumor immunotherapy. *Blood* (2013) **121**:1563–73. doi:10.1182/blood-2012-07-442541
- Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu Rev Immunol* (1991) **9**:457–92. doi:10.1146/annurev.iy.09.040191.002325
- Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: up-regulation by IFN-gamma. *J Immunol* (2000) **164**:4332–9. doi:10.4049/jimmunol.164.8.4332
- Veri MC, Gorlatov S, Li H, Burke S, Johnson S, Stavenhagen J, et al. Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcgamma-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcgamma-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology* (2007) **121**:392–404. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02588.x
- Cassard L, Jonsson F, Arnaud S, Daeron M. Fcgamma receptors inhibit mouse and human basophil activation. *J Immunol* (2012) **189**:2995–3006. doi:10.4049/jimmunol.1200968
- Magnusson SE, Engstrom M, Jacob U, Ulfgren AK, Kleinau S. High synovial expression of the inhibitory FcgammaRIIB in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* (2007) **9**:R51. doi:10.1186/ar2206
- Zhao W, Kepley CL, Morel PA, Okumoto LM, Fukuoka Y, Schwartz LB. Fc gamma RIIa, not Fc gamma RIIb, is constitutively and functionally expressed on skin-derived human mast cells. *J Immunol* (2006) **177**:694–701. doi:10.4049/jimmunol.177.1.694
- Metes D, Ernst LK, Chambers WH, Sulica A, Herberman RB, Morel PA. Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the FcgammaRIIC gene. *Blood* (1998) **91**:2369–80.
- van der Heijden J, Breunis WB, Geissler J, De Boer M, van den Berg TK, Kuijpers TW. Phenotypic variation in IgG receptors by nonclassical FCGR2C alleles. *J Immunol* (2012) **188**:1318–24. doi:10.4049/jimmunol.1003945
- Meknache N, Jönsson F, Laurent J, Guinépain MT, Daéron M. Human basophils express the glycosylphosphatidylinositol-anchored low-affinity IgG receptor Fc[gamma]RIIB (CD16B). *J Immunol* (2009) **182**:2542–50. doi:10.4049/jimmunol.0801665
- Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, Ambrosi A, Higgs R, Quintana FJ, et al. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by dysregulating the IL-23-Th17 pathway. *J Exp Med* (2009) **206**:1661–71. doi:10.1084/jem.20090585

20. Guillems M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol* (2014) **14**:94–108. doi:10.1038/nri3582
21. Zhu X, Meng G, Dickinson BL, Li X, Mizoguchi E, Miao L, et al. MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol* (2001) **166**:3266–76. doi:10.4049/jimmunol.166.5.3266
22. Vidarsson G, Stermerding AM, Stapleton NM, Spliethoff SE, Janssen H, Rebers FE, et al. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood* (2006) **108**:3573–9. doi:10.1182/blood-2006-05-024539
23. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* (2007) **7**:715–25. doi:10.1038/nri2155
24. Smith KG, Clatworthy MR. FcγRIIb in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol* (2010) **10**:328–43. doi:10.1038/nri2762
25. Pricop L, Redecha P, Teillaud JL, Frey J, Fridman WH, Sautes-Fridman C, et al. Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol* (2001) **166**:531–7. doi:10.4049/jimmunol.166.1.531
26. van der Poel CE, Karssemeijer RA, Boross P, van der Linden JA, Blokland M, van de Winkel JG, et al. Cytokine-induced immune complex binding to the high-affinity IgG receptor, FcγRI, in the presence of monomeric IgG. *Blood* (2010) **116**:5327–33. doi:10.1182/blood-2010-04-280214
27. Daéron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* (1997) **15**:203–34. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.203
28. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* (2008) **8**:34–47. doi:10.1038/nri2206
29. Blank U, Launay P, Benhamou M, Monteiro RC. Inhibitory ITAMs as novel regulators of immunity. *Immunol Rev* (2009) **232**:59–71. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00832.x
30. Amigorena S, Bonnerot C, Drake JR, Choquet D, Hunziker W, Guillet JG, et al. Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* (1992) **256**:1808–12. doi:10.1126/science.1535455
31. Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch JV. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(γ)RIIb. *Nature* (1996) **383**:263–6. doi:10.1038/383263a0
32. Zhu Z, Li R, Li H, Zhou T, Davis RS. FCRL5 exerts binary and compartment-specific influence on innate-like B-cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) **110**:E1282–90. doi:10.1073/pnas.1215156110
33. Kimberly RP, Ahlstrom JW, Click ME, Edberg JC. The glycosyl phosphatidylinositol-linked Fc gamma RIIPMN mediates transmembrane signaling events distinct from Fc gamma RII. *J Exp Med* (1990) **171**:1239–55. doi:10.1084/jem.171.4.1239
34. Tsuboi N, Asano K, Lauterbach M, Mayadas TN. Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity* (2008) **28**:833–46. doi:10.1016/j.immuni.2008.04.013
35. Todd RF III, Petty HR. Beta 2 (CD11/CD18) integrins can serve as signaling partners for other leukocyte receptors. *J Lab Clin Med* (1997) **129**:492–8. doi:10.1016/S0022-2143(97)90003-2
36. McEwan WA, Tam JC, Watkinson RE, Bidgood SR, Mallery DL, James LC. Intracellular antibody-bound pathogens stimulate immune signaling via the Fc receptor TRIM21. *Nat Immunol* (2013) **14**:327–36. doi:10.1038/ni.2548
37. Heijnen IA, van Vugt MJ, Fanger NA, Graziano RF, De Wit TP, Hofhuis FM, et al. Antigen targeting to myeloid-specific human Fc gamma RI/CD64 triggers enhanced antibody responses in transgenic mice. *J Clin Invest* (1996) **97**:331–8. doi:10.1172/JCI118420
38. Warmerdam PA, van de Winkel JG, Gosselin EJ, Capel PJ. Molecular basis for a polymorphism of human Fc gamma receptor II (CD32). *J Exp Med* (1990) **172**:19–25. doi:10.1084/jem.172.1.19
39. Parren PW, Warmerdam PA, Boeijs LC, Arts J, Westerdaal NA, Vlug A, et al. On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc gamma RIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J Clin Invest* (1992) **90**:1537–46. doi:10.1172/JCI116022
40. Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, Kimberly RP. Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest* (1992) **89**:1274–81. doi:10.1172/JCI115712
41. van der Heijden J, Geissler J, van Mirre E, van Deuren M, van der Meer JW, Salama A, et al. A novel splice variant of FcγRIIa: a risk factor for anaphylaxis in patients with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* (2013) **131**(1408–1416):e1405. doi:10.1016/j.jaci.2013.02.009
42. Su K, Wu J, Edberg JC, Li X, Ferguson P, Cooper GS, et al. A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing FcγRIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. I. Regulatory FCGR2B polymorphisms and their association with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* (2004) **172**:7186–91. doi:10.4049/jimmunol.172.11.7186
43. Li X, Wu J, Carter RH, Edberg JC, Su K, Cooper GS, et al. A novel polymorphism in the Fcγ receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. *Arthritis Rheum* (2003) **48**:3242–52. doi:10.1002/art.11313
44. Breunis WB, van Mirre E, Bruin M, Geissler J, De Boer M, Peters M, et al. Copy number variation of the activating FCGR2C gene predisposes to idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* (2008) **111**:1029–38. doi:10.1182/blood-2007-03-079913
45. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, et al. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest* (1997) **100**:1059–70. doi:10.1172/JCI119616
46. Ferrara C, Stuart F, Sondermann P, Brunner P, Umana P. The carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J Biol Chem* (2006) **281**:5032–6. doi:10.1074/jbc.M510171200
47. Breunis WB, van Mirre E, Geissler J, Laddach N, Wolbink G, van der Schoot E, et al. Copy number variation at the FCGR locus includes FCGR3A, FCGR2C and FCGR3B but not FCGR2A and FCGR2B. *Hum Mutat* (2009) **30**:E640–50. doi:10.1002/humu.20997
48. Ory PA, Clark MR, Kwok EE, Clarkson SB, Goldstein IM. Sequences of complementary DNAs that encode the NA1 and NA2 forms of Fc receptor III on human neutrophils. *J Clin Invest* (1989) **84**:1688–91. doi:10.1172/JCI114350
49. Salmon JE, Edberg JC, Kimberly RP. Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest* (1990) **85**:1287–95. doi:10.1172/JCI114566
50. Bux J, Stein EL, Bierling P, Fromont P, Clay M, Stroncek D, et al. Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fc gamma receptor IIb. *Blood* (1997) **89**:1027–34.
51. Koene HR, Kleijer M, Roos D, De Haas M, Von Dem Borne AEGK. FcγRIIb gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct FcγRIIb genes in NA(1+;2+)(SH+) individuals. *Blood* (1998) **91**:673–9.
52. Willcocks LC, Lyons PA, Clatworthy MR, Robinson JI, Yang W, Newland SA, et al. Copy number of FCGR3B, which is associated with systemic lupus erythematosus, correlates with protein expression and immune complex uptake. *J Exp Med* (2008) **205**:1573–82. doi:10.1084/jem.20072413
53. Warmerdam PA, van de Winkel JG, Vlug A, Westerdaal NA, Capel PJ. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol* (1991) **147**:1338–43.
54. Osborne JM, Chacko GW, Brandt JT, Anderson CL. Ethnic variation in frequency of an allelic polymorphism of human Fc gamma RIIA determined with allele specific oligonucleotide probes. *J Immunol Methods* (1994) **173**:207–17. doi:10.1016/0022-1759(94)90299-2
55. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, Leitman SF, Goldin LR, Huppi K, et al. Variant genotypes of the low-affinity Fcγ receptors in two control populations and a review of low-affinity Fcγ receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood* (1999) **94**:4220–32.
56. van der Heijden J, Nagelkerke S, Zhao X, Geissler J, Rispen T, van den Berg TK, et al. Haplotypes of FcγRIIa and FcγRIIb polymorphic variants influence IgG-mediated responses in neutrophils. *J Immunol* (2014) **192**(6):2715–21. doi:10.4049/jimmunol.1203570
57. Floto RA, Clatworthy MR, Heilbronn KR, Rosner DR, Macary PA, Rankin A, et al. Loss of function of a lupus-associated Fc[gamma]RIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat Med* (2005) **11**:1056–8. doi:10.1038/nm1288
58. Takai T. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J Clin Immunol* (2005) **25**:1–18. doi:10.1007/s10875-005-0353-8
59. Huizinga T, Kleijer M, Tetteroo P, Roos D, Von Dem Borne A. Biallelic neutrophil Na-antigen system is associated with a polymorphism on the phosphoinositol-linked Fc gamma receptor III (CD16). *Blood* (1990) **75**:213–7.

60. Dijkstra-Ham HM, Scheepers RHM, Oost WW, Stegeman CA, van der Pol WL, Sluiter WJ, et al. Fcγ receptor polymorphisms in Wegener's granulomatosis: risk factors for disease relapse. *Arthritis Rheum* (1999) **42**:1823–7. doi:10.1002/1529-0131(199909)42:9<1823::AID-ANR5>3.0.CO;2-X
61. Dijkstra-Ham HM, Bijl M, Fijnheer R, Scheepers RHM, Oost WW, Jansen MD, et al. Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum* (2000) **43**:2793–800. doi:10.1002/1529-0131(200012)43:12<2793::AID-ANR20>3.0.CO;2-6
62. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* (2012) **119**:5640–9. doi:10.1182/blood-2012-01-380121
63. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* (2002) **99**:754–8. doi:10.1182/blood.V99.3.754
64. Cooper N, Stasi R, Cunningham-Rundles S, Cesarman E, McFarland JG, Bussell JB. Platelet-associated antibodies, cellular immunity and FCGR3a genotype influence the response to rituximab in immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* (2012) **158**:539–47. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09184.x
65. Ruysen-Witrand A, Rouanet S, Combe B, Dougados M, Le Loët X, Sibilia J, et al. Fcγ receptor type IIIa polymorphism influences treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Ann Rheum Dis* (2012) **71**:875–7. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200337
66. Louis E, El Ghoul Z, Vermeire S, Dall'ozzo S, Rutgeerts P, Paintaud G, et al. Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* (2004) **19**:511–9. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.01871.x
67. Moroi R, Endo K, Kinouchi Y, Shiga H, Kakuta Y, Kuroha M, et al. FCGR3A-158 polymorphism influences the biological response to infliximab in Crohn's disease through affecting the ADCC activity. *Immunogenetics* (2013) **65**:265–71. doi:10.1007/s00251-013-0679-8
68. Tutuncu Z, Kavanaugh A, Zvaifler N, Corr M, Deutsch R, Boyle D. Fcγ receptor type IIIa polymorphisms influence treatment outcomes in patients with inflammatory arthritis treated with tumor necrosis factor α-blocking agents. *Arthritis Rheum* (2005) **52**:2693–6. doi:10.1002/art.21266
69. Kastbom A, Bratt J, Ernestam S, Lampa J, Padyukov L, Söderkvist P, et al. Fcγ receptor type IIIa genotype and response to tumor necrosis factor α-blocking agents in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2007) **56**:448–52. doi:10.1002/art.22390
70. Fujimoto T-T, Inoue M, Shimomura T, Fujimura K. Involvement of Fcγ receptor polymorphism in the therapeutic response of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* (2001) **115**:125–30. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.03109.x
71. Shrestha S, Wiener H, Shendre A, Kaslow RA, Wu J, Olson A, et al. Role of activating FcγR gene polymorphisms in Kawasaki disease susceptibility and intravenous immunoglobulin response. *Circ Cardiovasc Genet* (2012) **5**:309–16. doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.962464
72. Makowsky R, Wiener HW, Ptacek TS, Silva M, Shendre A, Edberg JC, et al. FcγRIIIa gene copy number in Kawasaki disease and intravenous immunoglobulin treatment response. *Pharmacogenet Genomics* (2013) **23**:455–62. doi:10.1097/FPC.0b013e328363686e
73. Shrestha S, Wiener HW, Olson AK, Edberg JC, Bowles NE, Patel H, et al. Functional FCGR2B gene variants influence intravenous immunoglobulin response in patients with Kawasaki disease. *J Allergy Clin Immunol* (2011) **128**:677–80. doi:10.1016/j.jaci.2011.04.027
74. Lejeune J, Thibault G, Ternant D, Cartron G, Watier H, Ohresser M. Evidence for linkage disequilibrium between FcγRIIIa-V158F and FcγRIIIa-H131R polymorphisms in white patients, and for an FcγRIIIa-restricted influence on the response to therapeutic antibodies. *J Clin Oncol* (2008) **26**:5489–91. doi:10.1200/JCO.2008.19.4118
75. Raknes G, Skeie GO, Gilhus NE, Aadland S, Vedeler C. FcγRIIIa and FcγRIIIB polymorphisms in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* (1998) **81**:173–6. doi:10.1016/S0165-5728(97)00174-4
76. van der Pol W-L, van den Berg LH, Scheepers RHM, van der Bom JG, van Doorn PA, van Koningsveld R, et al. IgG receptor IIa alleles determine susceptibility and severity of Guillain-Barré syndrome. *Neurology* (2000) **54**:1661–5. doi:10.1212/WNL.54.8.1661
77. Foster CB, Zhu S, Erichsen HC, Lehrnbecher T, Hart ES, Choi E, et al. Polymorphisms in inflammatory cytokines and Fcγ receptors in childhood chronic immune thrombocytopenic purpura: a pilot study. *Br J Haematol* (2001) **113**:596–9. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.02807.x
78. Bournazos S, Grinfeld J, Alexander K, Murchison J, Wallace W, McFarlane P, et al. Association of FcγRIIIa R131H polymorphism with idiopathic pulmonary fibrosis severity and progression. *BMC Pulm Med* (2010) **10**:51. doi:10.1186/1471-2466-10-51
79. Khor CC, Davila S, Breunis WB, Lee Y-C, Shimizu C, Wright VJ, et al. Genome-wide association study identifies FCGR2A as a susceptibility locus for Kawasaki disease. *Nat Genet* (2011) **43**:1241–6. doi:10.1038/ng.981
80. Sanders LAM, van de Winkel JGJ, Rijkers GT, Voorhorst-Ogink MM, De Haas M, Capel PJA, et al. Fcα receptor Iia (Cd32) heterogeneity in patients with recurrent bacterial respiratory tract infections. *J Infect Dis* (1994) **170**:854–61. doi:10.1093/infdis/170.4.854
81. Duits AJ, Bootsma H, Derksen RH, Spronk PE, Kater L, Kallenberg CG, et al. Skewed distribution of IgG Fc receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* (1995) **38**:1832–6. doi:10.1002/art.1780381217
82. Edberg JC, Wainstein E, Wu J, Csernok E, Sneller MC, Hoffman GS, et al. Analysis of FcγRIII gene polymorphisms in Wegener's granulomatosis. *Exp Clin Immunogenet* (1997) **14**:183–95.
83. Haseley LA, Wisniewski JJ, Denburg MR, Michael-Grossman AR, Ginzler EM, Gourley MF, et al. Antibodies to C1q in systemic lupus erythematosus: characteristics and relation to Fc gamma RIIA alleles. *Kidney Int* (1997) **52**:1375–80. doi:10.1038/ki.1997.464
84. Williams Y, Lynch S, McCann S, Smith O, Feighery C, Whelan A. Correlation of platelet FcγRIIIa polymorphism in refractory idiopathic (immune) thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* (1998) **101**:779–82. doi:10.1046/j.1365-2141.1998.00802.x
85. Myhr K-M, Raknes G, Nyland H, Vedeler C. Immunoglobulin G Fc-receptor (FcγR) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS. *Neurology* (1999) **52**:1771. doi:10.1212/WNL.52.9.1771
86. Norsworthy P, Theodoridis E, Botto M, Athanassiou P, Beynon H, Gordon C, et al. Overrepresentation of the Fcγ receptor type IIA R131/R131 genotype in Caucasoid systemic lupus erythematosus patients with autoantibodies to C1q and glomerulonephritis. *Arthritis Rheum* (1999) **42**:1828–32. doi:10.1002/1529-0131(199909)42:9<1828::AID-ANR6>3.0.CO;2-F
87. Yun HR, Koh HK, Kim SS, Chung WT, Kim DW, Hong KP, et al. FcγRIIIa/IIIA polymorphism and its association with clinical manifestations in Korean lupus patients. *Lupus* (2001) **10**:466–72. doi:10.1191/096120301678416015
88. Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JPA. Role of the Fcγ receptor IIa polymorphism in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Arthritis Rheum* (2002) **46**:1563–71. doi:10.1002/art.10306
89. Karassa FB, Bijl M, Davies KA, Kallenberg CGM, Khamashta MA, Manger K, et al. Role of the Fcγ receptor IIa polymorphism in the antiphospholipid syndrome: an international meta-analysis. *Arthritis Rheum* (2003) **48**:1930–8. doi:10.1002/art.11059
90. Tanaka Y, Suzuki Y, Tsuge T, Kanamaru Y, Horikoshi S, Monteiro RC, et al. FcγRIIIa-131R allele and FcγRIIIa-176V/V genotype are risk factors for progression of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* (2005) **20**:2439–45. doi:10.1093/ndt/gfi043
91. Morgan AW, Robinson JJ, Barrett JH, Martin J, Walker A, Babbage SJ, et al. Association of FCGR2A and FCGR2A-FCGR3A haplotypes with susceptibility to giant cell arteritis. *Arthritis Res Ther* (2006) **8**:R109. doi:10.1186/ar1996
92. Gulen F, Tanac R, Altinoz S, Berdeli A, Zeyrek D, Koksoy H, et al. The FcγRIIIa polymorphism in Turkish children with asthma bronchial and allergic rhinitis. *Clin Biochem* (2007) **40**:392–6. doi:10.1016/j.clinbiochem.2006.11.014
93. Aksu K, Kitapcioglu G, Keser G, Berdeli A, Karabulut G, Kobak S, et al. FcγRIIIa, IIa and IIIB gene polymorphisms in Behcet's disease: do they have any clinical implications? *Clin Exp Rheumatol* (2008) **26**:S77–83.
94. Woo J-H, Sung Y-K, Lee J-S, Chung WT, Choe J-Y, Song GG, et al. Association of Fcγ receptor polymorphisms with adult onset still's disease in Korea. *J Rheumatol* (2009) **36**:347–50. doi:10.3899/jrheum.071254
95. Kyogoku C, Dijkstra-Ham HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, et al. Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic

- lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum* (2002) **46**:1242–54. doi:10.1002/art.10257
96. Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Sutthipinittharm P, et al. Association of Fcγ receptor IIb and IIb polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* (2003) **61**:374–83. doi:10.1034/j.1399-0039.2003.00047.x
 97. Kono H, Kyogoku C, Suzuki T, Tsuchiya N, Honda H, Yamamoto K, et al. FcγRIIb Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum Mol Genet* (2005) **14**:2881–92. doi:10.1093/hmg/ddi320
 98. Willcocks LC, Carr EJ, Niederer HA, Rayner TF, Williams TN, Yang W, et al. A defunctioning polymorphism in FCGR2B is associated with protection against malaria but susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**:7881–5. doi:10.1073/pnas.0915133107
 99. Zhou X-J, Lv J-C, Yu L, Cui Z, Zhao J, Yang R, et al. FCGR2B gene polymorphism rather than FCGR2A, FCGR3A and FCGR3B is associated with anti-GBM disease in Chinese. *Nephrol Dial Transplant* (2010) **25**:97–101. doi:10.1093/ndt/gfp374
 100. Blank M, Stefanescu R, Masuda E, Marti F, King P, Redecha P, et al. Decreased transcription of the human FCGR2B gene mediated by the -343 G/C promoter polymorphism and association with systemic lupus erythematosus. *Hum Genet* (2005) **117**:220–7. doi:10.1007/s00439-005-1302-3
 101. Tackenberg B, Jelcic I, Baerenwaldt A, Oertel WH, Sommer N, Nimmerjahn F, et al. Impaired inhibitory Fcγ receptor IIb expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) **106**:4788–92. doi:10.1073/pnas.0807319106
 102. Koene HR, Kleijer M, Swaak AJ, Sullivan KE, Bijl M, Petri MA, et al. The Fc gammaRIIIA-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (1998) **41**:1813–8. doi:10.1002/1529-0131(199810)41:10<1813::AID-ART13>3.3.CO;2-Y
 103. Nieto A, Cáliz R, Pascual M, Matarán L, García S, Martín J. Involvement of Fcγ receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2000) **43**:735–9. doi:10.1002/1529-0131(200004)43:4<735::AID-ANR3>3.0.CO;2-Q
 104. Edberg JC, Langefeld CD, Wu J, Moser KL, Kaufman KM, Kelly J, et al. Genetic linkage and association of Fcγ receptor IIIA (CD16A) on chromosome 1q23 with human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2002) **46**:2132–40. doi:10.1002/art.10438
 105. van Sorge NM, van der Pol WL, Jansen MD, Geleijns KPW, Kalmijn S, Hughes RAC, et al. Severity of Guillain-Barré syndrome is associated with Fcγ receptor III polymorphisms. *J Neuroimmunol* (2005) **162**:157–64. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.01.016
 106. Morgan AW, Griffiths B, Ponchel F, Montague BMN, Ali M, Gardner PP, et al. Fcγ receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups. *Arthritis Rheum* (2000) **43**:2328–34. doi:10.1002/1529-0131(200010)43:10<2328::AID-ANR21>3.0.CO;2-Z
 107. Lee YH, Ji JD, Song GG. Associations between FCGR3A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta analysis. *J Rheumatol* (2008) **35**:2129–35. doi:10.3899/jrheum.080186
 108. Bronner IM, Hoogendijk JE, De Visser M, van de Vlekkert J, Badrising UA, Wintzen AR, et al. Association of the leukocyte immunoglobulin G (Fcγ) receptor IIIa-158V/F polymorphism with inflammatory myopathies in Dutch patients. *Tissue Antigens* (2009) **73**:586–9. doi:10.1111/j.1399-0039.2009.01236.x
 109. Thabet MM, Huizinga TWJ, Marques RB, Stoeken-Rijsbergen G, Bakker AM, Kurreeman FA, et al. Contribution of Fcγ receptor IIIA gene 158V/F polymorphism and copy number variation to the risk of ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2009) **68**:1775–80. doi:10.1136/ard.2008.099309
 110. Zhou X-J, Lv J-C, Bu D-F, Yu L, Yang Y-R, Zhao J, et al. Copy number variation of FCGR3A rather than FCGR3B and FCGR2B is associated with susceptibility to anti-GBM disease. *Int Immunol* (2010) **22**:45–51. doi:10.1093/intimm/dxp113
 111. Hatta Y, Tsuchiya N, Ohashi J, Matsushita M, Fujiwara K, Hagiwara K, et al. Association of Fc gamma receptor IIIB, but not of Fc gamma receptor IIA and IIIA polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun* (1999) **1**:53–60. doi:10.1038/sj.gene.6363639
 112. Tse WY, Abadeh S, Jefferis R, Savage CO, Adu D. Neutrophil Fcγ-maRIIIb allelic polymorphism in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-positive systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* (2000) **119**:574–7. doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01182.x
 113. Xu G, He Q, Shou Z, Wang H, Zhang X, Wang Y, et al. NA1/NA2 heterozygote of Fcγ3b is a risk factor for progression of IgA nephropathy in Chinese. *J Clin Lab Anal* (2007) **21**:298–302. doi:10.1002/jcla.20189
 114. Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, et al. Copy number polymorphism in Fcγr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* (2006) **439**:851–5. doi:10.1038/nature04489
 115. Fanciulli M, Norsworthy PJ, Petretto E, Dong R, Harper L, Kamesh L, et al. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat Genet* (2007) **39**:721–3. doi:10.1038/ng2046
 116. Bournazos S, Bournazou I, Murchison JT, Wallace WA, McFarlane P, Hirani N, et al. Copy number variation of <i>FCGR3B</i> is associated with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration* (2011) **81**:142–9. doi:10.1159/000321997
 117. Graf SW, Lester S, Nossent JC, Hill CL, Proudman SM, Lee A, et al. Low copy number of the FCGR3B gene and rheumatoid arthritis: a case-control study and meta-analysis. *Arthritis Res Ther* (2012) **14**:R28. doi:10.1186/ar3731
 118. McKinney C, Broen JCA, Vonk MC, Beretta L, Hesselstrand R, Hunzelmann N, et al. Evidence that deletion at FCGR3B is a risk factor for systemic sclerosis. *Genes Immun* (2012) **13**:458–60. doi:10.1038/gene.2012.15
 119. Smith P, Dilillo DJ, Bournazos S, Li F, Ravetch JV. Mouse model recapitulating human Fcγamma receptor structural and functional diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) **109**(16):6181–6. doi:10.1073/pnas.1203954109
 120. Guyre PM, Graziano RF, Goldstein J, Wallace PK, Morganeli PM, Wardwell K, et al. Increased potency of Fc-receptor-targeted antigens. *Cancer Immunol Immunother* (1997) **45**:146–8. doi:10.1007/s002620050418
 121. Keler T, Guyre PM, Vitale LA, Sundarapandian K, van de Winkel JG, Deo YM, et al. Targeting weak antigens to CD64 elicits potent humoral responses in human CD64 transgenic mice. *J Immunol* (2000) **165**:6738–42. doi:10.4049/jimmunol.165.12.6738
 122. Heijnen IA, van de Winkel JG. A human Fc gamma RI/CD64 transgenic model for in vivo analysis of (bispecific) antibody therapeutics. *J Hematother* (1995) **4**:351–6. doi:10.1089/scd.1.1995.4.351
 123. Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, Rankin CT, Li H, Burke S, et al. Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcγamma receptors. *Cancer Res* (2007) **67**:8882–90. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0696
 124. Junttila TT, Parsons K, Olsson C, Lu Y, Xin Y, Theriault J, et al. Superior in vivo efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Cancer Res* (2010) **70**:4481–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3704
 125. Gerdes CA, Nicolini VG, Herter S, van Puijenbroek E, Lang S, Roemmele M, et al. GA201 (RG7160): a novel, humanized, glycoengineered anti-EGFR antibody with enhanced ADCC and superior in vivo efficacy compared with cetuximab. *Clin Cancer Res* (2013) **19**:1126–38. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0989
 126. Kim JM, Ashkenazi A. Fcγgamma receptors enable anticancer action of proapoptotic and immune-modulatory antibodies. *J Exp Med* (2013) **210**:1647–51. doi:10.1084/jem.20131625
 127. Mellor JD, Brown MP, Irving HR, Zalberg JR, Dobrovic A. A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *J Hematol Oncol* (2013) **6**:1. doi:10.1186/1756-8722-6-1
 128. Clynes R, Ravetch JV. Cytotoxic antibodies trigger inflammation through Fc receptors. *Immunity* (1995) **3**:21–6. doi:10.1016/1074-7613(95)90155-8
 129. McKenzie SE, Taylor SM, Malladi P, Yuhani H, Cassel DL, Chien P, et al. The role of the human Fc receptor Fc gamma RIIA in the immune clearance of platelets: a transgenic mouse model. *J Immunol* (1999) **162**:4311–8.
 130. Taylor SM, Reilly MP, Schreiber AD, Chien P, Tuckosh JR, McKenzie SE. Thrombosis and shock induced by activating antiplatelet antibodies in human Fc gamma RIIA transgenic mice: the interplay among antibody, spleen, and Fc receptor. *Blood* (2000) **96**:4254–60.
 131. Reilly MP, Taylor SM, Hartman NK, Arepally GM, Sachais BS, Cines DB, et al. Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcγgammaRIIA. *Blood* (2001) **98**:2442–7. doi:10.1182/blood.V98.8.2442

132. Rauova L, Zhai L, Kowalska MA, Arepally GM, Cines DB, Poncz M. Role of platelet surface PF4 antigenic complexes in heparin-induced thrombocytopenia pathogenesis: diagnostic and therapeutic implications. *Blood* (2006) **107**:2346–53. doi:10.1182/blood-2005-08-3122
133. Meyer T, Robles-Carrillo L, Robson T, Langer F, Desai H, Davila M, et al. Bevacizumab immune complexes activate platelets and induce thrombosis in FcGR2A transgenic mice. *J Thromb Haemost* (2009) **7**:171–81. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03212.x
134. Robles-Carrillo L, Meyer T, Hatfield M, Desai H, Davila M, Langer F, et al. Anti-CD40L immune complexes potentially activate platelets in vitro and cause thrombosis in FcGR2A transgenic mice. *J Immunol* (2010) **185**:1577–83. doi:10.4049/jimmunol.0903888
135. Stolla M, Stefanini L, Andre P, Ouellette TD, Reilly MP, McKenzie SE, et al. CalDAG-GEFI deficiency protects mice in a novel model of Fcγamma RIIA-mediated thrombosis and thrombocytopenia. *Blood* (2011) **118**:1113–20. doi:10.1182/blood-2011-03-342352
136. Jönsson F, Mancardi DA, Zhao W, Kita Y, Iannascoli B, Khun H, et al. Human Fcγamma RIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood* (2012) **119**:2533–44. doi:10.1182/blood-2011-07-367334
137. Petkova SB, Akilesh S, Sproule TJ, Christianson GJ, Al Khabbaz H, Brown AC, et al. Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. *Int Immunol* (2006) **18**:1759–69. doi:10.1093/intimm/dx1110
138. Mancardi DA, Jönsson F, Iannascoli B, Khun H, van Rooijen N, Huerre M, et al. The murine high-affinity IgG receptor Fc(γ)RIV is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* (2011) **186**:1899–903. doi:10.4049/jimmunol.1003642
139. Christianson GJ, Blankenburg RL, Duffy TM, Panka D, Roths JB, Marshak-Rothstein A, et al. beta2-microglobulin dependence of the lupus-like autoimmune syndrome of MRL-lpr mice. *J Immunol* (1996) **156**:4932–9.
140. Tan Sardjono C, Mottram PL, van de Velde NC, Powell MS, Power D, Slocombe RF, et al. Development of spontaneous multisystem autoimmune disease and hypersensitivity to antibody-induced inflammation in Fcγamma receptor IIa-transgenic mice. *Arthritis Rheum* (2005) **52**:3220–9. doi:10.1002/art.21344
141. van de Velde NC, Mottram PL, Powell MS, Lim B, Holmdahl R, Hogarth PM. Transgenic mice expressing human Fcγgamma RIIa have enhanced sensitivity to induced autoimmune arthritis as well as elevated Th17 cells. *Immunol Lett* (2010) **130**:82–8. doi:10.1016/j.imlet.2009.12.005
142. Tsuboi N, Hernandez T, Li X, Nishi H, Cullere X, Mekala D, et al. Regulation of human neutrophil Fcγgamma receptor IIa by C5a receptor promotes inflammatory arthritis in mice. *Arthritis Rheum* (2011) **63**:467–78. doi:10.1002/art.30141
143. Pietersz GA, Mottram PL, van de Velde NC, Sardjono CT, Esparon S, Ramsland PA, et al. Inhibition of destructive autoimmune arthritis in Fcγgamma RIIa transgenic mice by small chemical entities. *Immunol Cell Biol* (2009) **87**:3–12. doi:10.1038/icb.2008.82
144. van Vuuren AJ, van Roon JA, Walraven V, Stuij I, Harmsen MC, McLaughlin PM, et al. CD64-directed immunotoxin inhibits arthritis in a novel CD64 transgenic rat model. *J Immunol* (2006) **176**:5833–8. doi:10.4049/jimmunol.176.10.5833
145. Thepen T, van Vuuren AJ, Kiekens RC, Damen CA, Vooijs WC, van de Winkel JG. Resolution of cutaneous inflammation after local elimination of macrophages. *Nat Biotechnol* (2000) **18**:48–51. doi:10.1038/71908
146. Chen K, Nishi H, Travers R, Tsuboi N, Martinod K, Wagner DD, et al. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by Fcγgamma RIIIB but induces neutrophil extracellular traps via Fcγgamma RIIA in vivo. *Blood* (2012) **120**:4421–31. doi:10.1182/blood-2011-12-401133
147. van Vugt MJ, Heijnen AF, Capel PJ, Park SY, Ra C, Saito T, et al. FcR gamma-chain is essential for both surface expression and function of human Fc gamma RI (CD64) in vivo. *Blood* (1996) **87**:3593–9.
148. van Royen-Kerkhof A, Sanders EA, Walraven V, Voorhorst-Ogink M, Saeland E, Teeling JL, et al. A novel human CD32 mAb blocks experimental immune haemolytic anaemia in Fcγgamma RIIA transgenic mice. *Br J Haematol* (2005) **130**:130–7. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05571.x
149. Zhi H, Rauova L, Hayes V, Gao C, Boylan B, Newman DK, et al. Cooperative integrin/ITAM signaling in platelets enhances thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood* (2013) **121**:1858–67. doi:10.1182/blood-2012-07-443325
150. Horton HM, Chu SY, Ortiz EC, Pong E, Cemerski S, Leung IW, et al. Antibody-mediated coengagement of Fcγgamma RIIb and B cell receptor complex suppresses humoral immunity in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* (2011) **186**:4223–33. doi:10.4049/jimmunol.1003412
151. Li F, Ravetch JV. Inhibitory Fcγgamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. *Science* (2011) **333**:1030–4. doi:10.1126/science.1206954
152. Li F, Ravetch JV. Antitumor activities of agonistic anti-TNFR antibodies require differential Fcγgamma RIIb coengagement in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) **110**:19501–6. doi:10.1073/pnas.1319502110
153. Li M, Wirthmueller U, Ravetch JV. Reconstitution of human Fc gamma RIII cell type specificity in transgenic mice. *J Exp Med* (1996) **183**:1259–63. doi:10.1084/jem.183.3.1259
154. Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, Brown AC, Akilesh S, Jung N, et al. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J Immunol* (2003) **170**:3528–33. doi:10.4049/jimmunol.170.7.3528
155. Mezo AR, McDonnell KA, Hehir CA, Low SC, Palombella VJ, Stattel JM, et al. Reduction of IgG in nonhuman primates by a peptide antagonist of the neonatal Fc receptor FcRn. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) **105**:2337–42. doi:10.1073/pnas.0708960105

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 11 March 2014; paper pending published: 29 March 2014; accepted: 14 May 2014; published online: 30 May 2014.

Citation: Gillis C, Gouel-Chéron A, Jönsson F and Bruhns P (2014) Contribution of human FcγRs to disease with evidence from human polymorphisms and transgenic animal studies. *Front. Immunol.* 5:254. doi: 10.3389/fimmu.2014.00254

This article was submitted to Immunotherapies and Vaccines, a section of the journal *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2014 Gillis, Gouel-Chéron, Jönsson and Bruhns. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Management of anaphylactic shock in the operating room

Aurélie Gouel-Chéron^{1,2}, Adela Harpan¹, Paul-Michel Mertes³, Dan Longrois^{1,4}

Available online: 18 May 2016

1. AP-HP, hôpital Bichat-Claude-Bernard, département d'anesthésie-réanimation, 46, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France
2. Institut Pasteur, Inserm U1222, unité anticorps en thérapie et pathologie, Paris, France
3. CHU de Strasbourg, nouvel hôpital Civil, département d'anesthésie-réanimation chirurgicale, 1, place de L'Hôpital, BP426, 67091 Strasbourg cedex, France
4. Hôpital Bichat-Claude-Bernard, Inserm U1148, Paris, France

Correspondence:

Dan Longrois, AP-HP, hôpital Bichat-Claude-Bernard, département d'anesthésie-réanimation, 46, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France.
dan.longrois@aphp.fr

■ Key points

Diagnosis of anaphylactic shock occurring during anesthesia is challenging because of altered clinical signs and confounding diagnoses (e.g. arterial hypotension).

A major sign of clinical severity in the presence of arterial hypotension is a low end-tidal CO₂ concentration (below 20 mmHg).

Acute hemoconcentration (increase of hemoglobin concentrations) is highly suggestive of vascular leak triggered by anaphylactic shock.

Guidelines for management of anaphylactic shock occurring during anesthesia are based on withdrawal of the suspected allergen, airway control, increased cardiac preload by the Trendelenbourg position and volume expansion, epinephrine, glucocorticoids and monitoring for 24 hours, although evidence for the efficacy of these therapeutic interventions is absent or very weak.

Refractory anaphylactic shock although not defined could be characterized by persistent clinical signs after more than 10 minutes of adequately managed resuscitation. It should trigger enhanced cardiac monitoring through echocardiography to detect primary myocardial dysfunction and alert for extracorporeal life support.

Drugs that may be used for refractory anaphylactic shock in addition to epinephrine are glucagon, norepinephrine, vasopressin, methylene blue but there are only animal studies where these drugs were compared to epinephrine.

Follow-up after resuscitation includes patient information on the drugs given before occurrence of clinical signs, scheduled allergology investigation, pharmacovigilance report and recovery of the conclusions of allergology investigation with clear decisions on the identification of the culprit agent and subsequent avoidance. All these conclusions have to be traced in the medical record and shared with the patient.

■ Points essentiels

Prise en charge du choc anaphylactique au bloc opératoire

Le diagnostic clinique de choc anaphylactique per-anesthésique peut être difficile à poser, du fait de l'atténuation des signes cliniques ainsi que de l'importante incidence des diagnostics différentiels (comme l'hypotension artérielle).

L'un des principaux signes de gravité clinique en association avec une hypotension artérielle est une diminution de la fraction expirée de CO₂ (inférieure à 20 mmHg).

L'hémoconcentration aiguë (élévation de l'hémoglobininémie) est hautement suggestive d'une fuite capillaire induite par le choc anaphylactique.

Les recommandations pour la prise en charge du choc anaphylactique pendant une anesthésie reposent sur le retrait de l'allergène suspecté, le contrôle des voies aériennes supérieures, l'élévation de la précharge par la position de Trendelenbourg et l'expansion volémique, l'adrénaline, les glucocorticoïdes et le monitoring pendant 24 heures.

En absence de définition précise, le diagnostic de choc anaphylactique réfractaire peut être évoqué devant la persistance des signes cliniques 10 minutes après l'initiation de thérapeutiques selon les recommandations. Cela doit inciter au monitoring de la fonction cardiaque par échocardiographie afin de détecter des dysfonctions primaires et d'alerter les équipes d'assistance circulatoire.

Bien que basées sur des études réalisées chez l'animal, les alternatives thérapeutiques à l'adrénaline lors d'un choc anaphylactique réfractaire sont le glucagon, la noradrénaline, la vasopressine et le bleu de méthylène.

Après la réanimation, le suivi du patient doit comprendre l'information du patient sur les médicaments possiblement incriminés, la date du rendez-vous d'allergo-anesthésie, la signalisation de l'évènement à la pharmacovigilance ainsi que la récupération des résultats des investigations allergologiques avec les conclusions claires sur l'agent responsable et les conduites à tenir. Ces résultats doivent être notifiés dans le dossier médical du patient.

Definition

Anaphylaxis has been defined in 2006 as "a serious allergic reaction that is rapid in onset and may cause death" [1]. The clinical criteria for diagnosing anaphylaxis have been recently revised (*table I*). The severity of anaphylactic reactions can vary

from minor to death as classified by Ring and Messmer in 1977 (*table II*) [2]. The occurrence of an anaphylactic reaction during anesthesia increases the diagnostic difficulties because of:

- the absence of some clinical signs, such as anxiety, dyspnea, abdominal pain;
- the impossibility to detect existing signs (erythema) if surgical dressing covers the patient;
- major signs of anaphylactic shock (AS) (e.g. arterial hypotension, tachycardia) can have many other causes during anesthesia and surgery;
- anesthesia per se alters the compensatory mechanisms that an awake individual would mobilize during an anaphylactic reaction.

This could explain the much higher fatality rate of AS during anesthesia (4.1%) [3], as compared to that of patients admitted to emergency departments for anaphylaxis (approximately 0.7/million population) [4].

The specificities of anaphylaxis/AS during anesthesia and surgery, the object of this article, are related to the fact that within minutes, the anesthesiologist must recognize signs of anaphylaxis that can also much more frequently occur because of other causes (e.g. arterial hypotension), evaluate the severity of these

Glossary

ACLS	advanced cardiovascular life support
AS	anaphylactic shock
ECLS	extracorporeal life support
ECPR	extracorporeal cardiopulmonary resuscitation
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
etCO ₂	end-tidal CO ₂
Ig	immunoglobulin
IV	intravenous
LV	LEFT Ventricular
NMBA	neuromuscular blocking agent
NO	nitric oxide
PAF	platelet activating factor
PHT	pulmonary hypertension
SVR	systemic vascular resistance

TABLE I

Clinical criteria for diagnosing anaphylaxis [1]

Anaphylaxis is highly likely when any one of the following 3 criteria are fulfilled

Acute onset of an illness (minutes to several hours) with involvement of the skin, mucosal tissue, or both (e.g., generalized hives, pruritus or flushing, swollen lips-tongue-uvula) and at least one of the following

Respiratory compromise (e.g., dyspnea, wheeze-bronchospasm, stridor, reduced PEF, hypoxemia)

Reduced BP or associated symptoms of end-organ dysfunction (e.g., hypotonia [collapse], syncope, incontinence)

Two or more of the following that occur rapidly after exposure to a likely allergen for that patient (minutes to several hours)

Involvement of the skin-mucosal tissue (e.g., generalized hives, itch-flush, swollen lips-tongue-uvula)

Respiratory compromise (e.g., dyspnea, wheeze-bronchospasm, stridor, reduced PEF, hypoxemia)

Reduced BP or associated symptoms (e.g., hypotonia [collapse], syncope, incontinence)

Persistent gastrointestinal symptoms (e.g., crampy abdominal pain, vomiting)

Reduced BP after exposure to known allergen for that patient (minutes to several hours)

Infants and children: low systolic BP (age specific) or greater than 30% decrease in systolic BP¹

Adults: systolic BP of less than 90 mmHg or greater than 30% decrease from that person's baseline

PEF: peak expiratory flow; BP: blood pressure.

¹Low systolic BP for children is defined as less than 70 mmHg until 1 year, less than 70 mmHg from 1 to 10 years, and less than 90 mmHg from 11 to 17 years.

TABLE II

Severity scale of anaphylactic shock, according to the Ring and Messmer classification [2]

Grade	Symptoms
I	Skin symptoms: erythema, urticaria localized or extended with or without angioedema
II	Moderated organ failure: arterial hypotension, tachycardia, cough, dyspnea, wheezing, digestive troubles (nausea, vomiting, diarrhea)
III	Severe organ failure: hemodynamic collapse, cardiac arrhythmia, bronchospasm, severe digestive signs
IV	Cardiac or respiratory arrest

reactions, make differential and positive diagnosis, identify the possible allergen (based on epidemiology and the chronology of suspected allergen administration for that patient), initiate therapy, titrate it in order to avoid severe side effects (e.g. for catecholamines), evaluate the efficacy (or lack) of therapy and initiate the positive diagnostic approach. In cases of refractory AS or cardiac arrest, last resort rescue measures such as extracorporeal life support (ECLS) must be rapidly initiated. Finally, a major challenge is the fact that the evidence for all therapeutic measures recommended in AS (epinephrine, histamine receptors antagonists, glucocorticoids) is absent of very weak (see for a review [5]).

The purposes of this article are:

- to review the pathophysiology of AS with a focus on the clinical signs and therapeutic decisions (as opposed to mediators and mechanisms that are only helpful a posteriori but not during the resuscitation of AS);
- to briefly review the international guidelines on therapy of AS occurring during anesthesia and surgery;

- to provide a Diagnostic and Therapeutic Pathway Checklist that could be helpful upon occurrence of AS.

Epidemiology of AS occurring during anesthesia and surgery

Globally, the incidence of allergy is increasing worldwide with the lifetime risk of anaphylaxis being at least 1.6% [4]. The incidence of perioperative anaphylaxis is estimated between 1/10,000 and 1/20,000 anesthesia procedures [6]. Translated to individual practice when performing 1500 anesthetic procedures a year, an anesthesiologist has a probability of seeing a case of severe anaphylaxis in his/her practice every 5–10 years. Acquisition and preservation of clinical skills for such rare events is challenging. For comparison, the incidence of severe arterial hypotension (defined as a decrease of more than 50% of systolic/mean arterial pressure) occurs in approximately 5–10% of anesthetic procedures. These major differences in incidence may explain the delayed diagnosis of AS during anesthesia.

The most frequent allergens responsible for AS during anesthesia are neuromuscular blocking agents (NMBA) (40–60% of the cases) followed by latex (20%), antibiotics (18%), opioids/colloids (2–3%) and hypnotics (1%) [7,8]. Chlorhexidine is also increasingly recognized as an allergen [9]. These epidemiology data are important when attempting to identify the possible allergen.

Among the NMBA, suxamethonium is the most frequently incriminated (61%), followed by atracurium (20%), cis-atracurium (6%), vecuronium (5%) and rocuronium (4%) (proportion in consideration of the market share) [7]. Cross-reactivity between NMBAs is observed in 50–75% of the cases, mostly with the steroids drugs. A large number of AS related to NMBA occurred in patients who had never been previously exposed to NMBA (previous exposure being most frequently suspected based on a history of surgical/anesthetic procedures). Substituted ions ammoniums have long been considered as the most likely epitope for the binding of specific immunoglobulin E. The main hypothesis for the sensitization is the exposure to compound with a tertiary or quaternary ammonium, such as cough syrup with pholcodine [10], cosmetics, household products, disinfectants, food or industrial materials [11]. The important message from this information is that first time exposure to an allergen (because of cross-reactivity) is consistent with the diagnosis of AS.

Physiopathology

In humans, the predominant organs affected by life threatening anaphylaxis are the respiratory and the cardiovascular systems [12]. For those reasons, anaphylaxis might be particularly severe in patients with underlying cardiovascular diseases, although the presence of profound myocardial depression has also been described in healthy patients [13,14].

Cardiac anaphylaxis

"Cardiac anaphylaxis" is a term not properly defined in the literature. It may refer either to:

- the mainly or isolated cardiac manifestations of anaphylaxis without the other cardinal signs;
- documented transient or persistent alteration of myocardial systolic function (several cases of allergy to protamine have revealed acute right ventricular failure secondary to highly increased pulmonary vascular resistance attributed to platelet activating factor [PAF]) [15];
- severe cardiac complications (e.g. myocardial infarction, refractory cardiac arrest) following AS and resuscitation with epinephrine.

Classical or reverse Takotsubo syndromes have been reported after resuscitation of AS [16,17].

The Kounis syndrome refers to allergy-associated acute coronary syndrome [18]. Type I is a vasospasm in healthy coronary arteries; type II a destabilization of a previously present coronary

atheroma plaque; type III an intrastent thrombosis [18,19]. Anaphylaxis mediators can either trigger cardiac complications (as suggested by Kounis) or reveal subclinical cardiac pathologies. The weight of evidence is that anaphylaxis reveals subclinical cardiac diseases. This could explain why patients with documented cardiac diseases are at increased risk of death upon occurrence of AS [3]. Whatever the mechanisms, myocardial damages detected by increased cardiac troponin concentrations have been reported [18]. There is convincing evidence that cardiac manifestations of AS are not limited to Kounis syndrome and this is why we prefer the term "cardiac anaphylaxis".

Low cardiac output during AS related to decreased preload

Classically, AS presents as partially and rapidly overlapping pathophysiological mechanisms [20]. Initially a distributive shock, characterized by reduced systemic vascular resistance (SVR), low left ventricular (LV) afterload and tachycardia can be observed although this may be very transient. Secondly, volume loss due to increased capillary permeability decreases venous return and cardiac flow, corresponding to a hypovolemic shock. In this case, the heart should be "empty".

Other mechanisms of low cardiac output during AS

Alteration of the systolic/diastolic myocardial function

Alteration of the systolic/diastolic myocardial function, either from the onset of AS or following initiation of its therapy, could occur, even in healthy hearts through several mechanisms (figure 1):

- epicardial coronary vasospasm secondary to cardiac mast cells degranulation (histamine in patients with vasospastic angina [21], prostaglandin D2 [PGD2], angiotensin II, leukotrienes) with subsequent myocardial ischemia;
- a direct negative inotropic effects of some mediators (lipid mediators such as leukotrienes or prostaglandins [22,23]);
- secondary to treatment (epinephrine, other vasoconstrictors) either by coronary vasoconstriction or increased myocardial oxygen consumption.

It is probable that in patients with previous cardiac diseases, the presence of an increased number of mast cells within the cardiac tissue [24] increases both the concentrations of mediators within the myocardial tissue and the consequences of their secretion as well as lower the tolerance to arterial hypotension and treatment of AS.

Pulmonary hypertension and right ventricular failure

The major model for this presentation is the AS induced by protamine, which incidence is around 0.19% [25]. The most common factor predisposing to an anaphylactic reaction to protamine sulfate is prior treatment with neutral protamine hagedorn. Protamine sulfate is used in order to reverse the anticoagulant effects of heparin, mainly after bypass for cardiac surgery. Protamine has major systemic side effects: drop of SVR leading to hypotension, increased myocardial oxygen

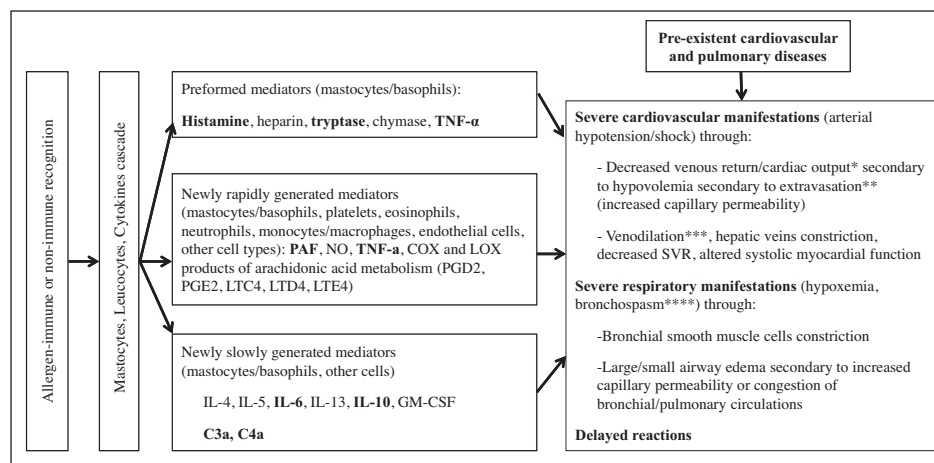


FIGURE 1

Simplified diagram of the cell types and non-cellular mediators involved in the clinical manifestations of severe forms of anaphylaxis

The main mechanisms of cardiovascular and respiratory manifestations of severe forms of anaphylaxis documented in humans (and also of delayed reactions) are statistically related (although not causally demonstrated) to the mediators in bold characters (modified from [60]). Pathophysiologic mechanisms and mediators described in animal models but not documented in humans are not represented. Signs that can facilitate diagnosis: *: decreased end-tidal CO₂; **: hemoconcentration as attested by acutely increased hemoglobin values; ***: decreased cardiac filling pressures except in patients with pre-existent cardiac disease; ****: increased airway pressure values. Abbreviations: TNF- α : tumor necrosis factor alpha; PAF: platelet activating factors; NO: nitric oxide; COX: cyclooxygenase; LOX: lipoxygenase; PG: prostaglandin; LT: leukotriens; IL: interleukin; GM-CSF: granulocyte/monocyte cell stem factor; C3a/C4a: respective complement fraction.

consumption, cardiac output, and heart rate. It can also lead to catastrophic pulmonary vasoconstriction and be responsible for anaphylactoid reactions [15]. Protamine is a major vasodilator agent, through the activation of the endothelium-derived relaxing factor (EDRF)/nitric oxide (NO) (EDRF/NO). The major hypothesis to the pulmonary vasoconstriction induced by histamine is the release of thromboxane or others constrictive autoids in individuals who lose the ability of releasing EDRF/NO in the pulmonary circulation because of pre-existent lesions or reperfusion lesion in the pulmonary endothelium, which induces catastrophic pulmonary vasoconstriction and pulmonary hypertension (PHT) [15]. Severe PHT leads very quickly to right ventricular failure, which requires an immediate treatment.

Evaluation of fluid loss

There are few pathognomonic signs of anaphylaxis. In this context, one could assert that acute hemoconcentration as assessed by the increase concentration of hemoglobin (in the absence of acute diuresis) is highly suggestive of the occurrence of anaphylaxis (and vascular leak). Consequently, correction of hemoconcentration may attest the efficacy of volume expansion. This has been demonstrated by our group in an animal study [26].

Altered cerebral blood flow

Whereas cerebral blood flow is conserved during pharmacologically-induced arterial hypotension, one study showed a linear relationship between cerebral cortical blood flow and blood pressure during hypotension in AS in a rat model [27]. AS

resulted in severe impairment of cerebral blood flow and oxygenation, beyond what could be expected from the level of arterial hypotension. It was also demonstrated that for comparable effects on correction of arterial hypotension, the use of epinephrine was associated with better brain oxygenation (at least initially) as compared to the use of arginine vasopressin. This was interpreted as potentially related to the beta2-adrenergic vasodilatory cerebral effect of epinephrine [28]. These observations probably reflect the specific pathophysiology of AS and suggest that therapeutic goals during AS may go beyond correction of severe arterial hypotension especially in patients with pre-existent alterations of cerebral circulation reserve (i.e. stenosis on cerebral arteries).

Other clinical signs (bronchospasm or digestive signs)

One of the ways of performing differential/positive diagnoses of AS is to interpret the clinical signs by taking into account the patient's medical history. In this context, our group has investigated the hypothesis that a documented history of asthma (past or active) could be associated with an increased probability of having bronchospasm occurring during AS [29]. Such a hypothesis would have credibility based on the common mechanisms that underlie asthma and bronchospasm during anaphylaxis. During AS with a hemodynamic component, this associations does not exist and this probably reflects the complexity of bronchospasm (congestion of the bronchial wall) as a predominant mechanism [29]. Persistent gastrointestinal symptoms

(e.g., crampy abdominal pain, vomiting) are criteria of anaphylaxis, as defined by [30]. Under anesthesia, patients can not report them. However, vomiting might be a sign of severity, as related to the drop of arterial blood pressure.

Consequences for clinical practice

In clinical practice, many of the cardiac risk factors may be unknown and therefore the relevant messages are as follows:

- isolated/predominant cardiac signs (arrhythmia, ST segment modifications, hemodynamic signs of altered systolic function, echocardiographically-documented alteration of systolic function or increased cardiac troponin concentrations) can be the only/major manifestation of anaphylaxis;
- in a clinically "complete" picture of anaphylaxis, inefficient therapy with the classical regimen (volume loading, epinephrine) may be explained by myocardial contractile dysfunction or increased right ventricle afterload and this must be documented by echocardiography (either transthoracic or transoesophageal);
- the documentation of severe myocardial dysfunction or refractory cardiac arrest should be treated promptly with ECLS, although this technique is still controversial [3], at least in hospitals that perform cardiothoracic surgical procedures.

Occurrence of cardiac complications during/after AS must also trigger post-event investigations to find a previously undiagnosed cardiac disease (the most frequent being coronary atheroma given the present of mast cells in the atheroma plaque) [31].

International guidelines for the treatment of anaphylactic shock

The American Heart Association and the French society of anesthesiology and intensive care published recommendations about the treatment of AS [5,32-34]. The most difficult issue before initiating treatment is recognition of AS as the cause of the alteration of cardiovascular/respiratory functions. There are several clues to early recognition of AS:

- the concomitant occurrence of skin, however inconstant, cardiovascular and respiratory signs minutes after infusion of a substance documented to provoke AS;
- the presence of arterial hypotension and very low concentrations of end-tidal CO₂ (etCO₂).

Although there are no specific prospective data on this topic, values below 20 mmHg just after insertion of tracheal tube with a plateau (that are the proof of acceptable bronchial permeability) are major signs of the severity of arterial hypotension related to the decrease in cardiac output. We proposed a diagnostic and treatment pathway checklist for AS, inspired by the model from trauma resuscitation (table III).

Every patient with suspected AS has to be closely monitored. The first step is to retrieve the suspected agent immediately. Direct antagonisation (through chemical interactions) has been described for protamine anaphylaxis with heparin being able to

create complexes with protamine. Reports on rocuronium AS withdrawn with sugammadex are controversial [35].

After having informed the surgical and anesthesia teams and increased the inspired oxygen fraction to 1, the specific treatment will be guided by the severity of the reaction (table II). In grade I reaction, these actions might be enough. Whatever grade is considered, the use of H₂-antihistamines is not based on solid evidence [5]. Although there are no human trials establishing the role of epinephrine or preferred route of administration in AS [5], epinephrine should be administered in grade II or III by intravenous (IV) bolus infusion every 1 or 2 minutes of 10 µg or 100 µg respectively, until mean arterial pressure is higher than 60 mmHg. A continuous IV infusion of epinephrine at 0.05–0.1 µg/kg/min might be useful and should be started immediately in severe forms. Pathophysiologic arguments favor the continuous infusion because of the modulatory effects of epinephrine on the release of mediators. Intramuscular administration is also possible (0.2 to 0.5 mg), preferably in the vastus lateralis muscle if accessible and should be repeated every 5–10 minutes in the absence of clinical improvement (i.e. correction of arterial hypotension). Aggressive fluid resuscitation with crystalloids has to be continued to counter the vasogenic shock until hemodynamic stability [32,33]. Volume loss can concern up to 70% of the blood volume [36]. As colloids have been shown to be more effective than crystalloids in a rat model [37], colloids could be useful if the cumulative volume of crystalloids is above 30 mL/kg. If a colloid was already infused before the occurrence of signs of AS, that type of colloids should not be used for resuscitation of AS, because it has to be considered as a potential allergen. For patients under β-blockers, epinephrine may need to be increased (first IV bolus of 100 µg followed by bolus of 1 to 5 mg every 1–2 minutes). Glucagon could be proposed (1–2 mg IV every 5 minutes, and if necessary continuous infusion of 5–15 µg/min or 0.3–1 mg/h).

In severe forms, advanced airway management should not be delayed (if not already secured) and might need endotracheal intubation, given the potential for the rapid development of oropharyngeal or laryngeal edema. Beta2-adrenergic agonists, such as salbutamol, relieve bronchospasm (but not upper airway obstruction or shock). They could be delivered by inhalation or IV in case of severe form (bolus of 100–200 µg and, if necessary, continuous IV infusion of 5–25 µg/min). However, the intravenous administration should be avoided in case of hypotension because it may increase the severity of the shock.

Grade IV anaphylaxis reaction, i.e. cardiac arrest secondary to anaphylaxis, should be treated with standard advanced cardiovascular life support (ACLS): upper airway management, mechanical ventilation, cardiopulmonary resuscitation/chest compression, fluid challenge, epinephrine by IV bolus (1 mg every 1–2 minutes) and infusion.

Corticosteroids (hydrocortisone 200 mg every 6 hours) are used to decrease the late manifestations of anaphylaxis but the

TABLE III

Diagnostic and treatment pathway checklist for anaphylactic shock (issued from the model from trauma resuscitation)

	Yes	No	N/A	Reasons for variance
Initial diagnostic phase				
Several clinical signs consistent with AS	☐	☐	☐	
Suspected substance identified and stopped	☐	☐	☐	
Severity (grade) of AS according to severity defined	☐	☐	☐	
Initial therapy				
Time count initiated from the first signs	☐	☐	☐	
Airway control and $\text{FiO}_2 = 1$	☐	☐	☐	
Volume expansion initiated	☐	☐	☐	
Trendelenbourg position or other (e.g. pregnant patient)	☐	☐	☐	
Injection of epinephrine titrated on initial severity of hemodynamic alterations and response to therapy	☐	☐	☐	
Bronchodilator given and adjustment of ventilation to avoid hypoventilation/hypercapnia if severe bronchospasm	☐	☐	☐	
ACLS initiated if cardiac arrest recognized	☐	☐	☐	
Histamine receptors antagonists	☐	☐	☐	
Corticoids	☐	☐	☐	
Consider antagonist (e.g. heparin for protamine, sugammadex for rocuronium)	☐	☐	☐	
After 10 minutes from start of resuscitation, consider diagnosis of refractory anaphylactic shock				
Consider echocardiography	☐	☐	☐	
Consider alerting the ECLS team	☐	☐	☐	
Decisions on the procedure for which the patient was anaesthetized	☐	☐	☐	
Blood samples for histamine, tryptase and other laboratory measurements	☐	☐	☐	
Second line measures (first 24 h)				
Monitoring in ICU/PACU for 24 hours	☐	☐	☐	
Subsequent blood samples	☐	☐	☐	
Documents provided to the patient concerning suspected drugs/substances until the allergy investigation confirms it	☐	☐	☐	
Events/therapy traced in the medical/anaesthesia files	☐	☐	☐	
Allergology follow-up visit scheduled	☐	☐	☐	
Pharmacovigilance report	☐	☐	☐	
Results of allergology investigation obtained	☐	☐	☐	
Results traced in the medical/anaesthesia records and recommendations for future anesthesia traced	☐	☐	☐	
Patient informed on the decisions/diagnosis. Card and recommendations provided in a written document to the patient	☐	☐	☐	

AS: anaphylactic shock; ECLS: extracorporeal life support; ICU/PACU: intensive/peri-anesthesiology care unit.

evidence base is absent [5]. After recovery, a close monitoring has to be maintained during 24 hours, because of the risk of a second late manifestation (bi-phasic evolution).

Refractory anaphylactic shock

There are no universally accepted definitions of refractory AS [38]. In the literature, lack of effect of as little as 100 µg of epinephrine is diagnosed as refractory AS. From the point of view of timing of resuscitation, more than 10 minutes of adequately managed resuscitation (volume expansion, more than 1 mg of epinephrine) [39] could be the trigger to initiate

transoesophageal echocardiography (see previous discussion of "cardiac anaphylaxis"), potential use of alternatives to epinephrine and to initiate the alerts on the ECLS teams given the fact that even when ECLS is available in an institution, it requires a minimum of 20 minutes before insertion and effective cardiovascular support.

Vasopressin

Arginine vasopressin is a potent vasoconstricting substance that has been in the focus of interest in the treatment of cardiac arrest during several years. It has been integrated into the ACLS

resuscitation guidelines as an alternative vasopressive agent in the treatment of cardiac arrest. It has also been reported for treating catecholamine resistant hypotension during cardiopulmonary bypass and septic shock [40]. Moreover, it has been suggested that vasopressin enhances the effects of α -adrenergic stimulation in animals and human both in vitro and in vivo [41]. In an experimental setting, Tsuda et al. demonstrated that the addition of vasopressin to epinephrine reverses histamine-induced vasodilatation of human internal mammary arteries [42]. The hypothesis is that epinephrine only partially reverses histamine-induced vasodilatation, whereas vasopressin, methylene blue, and drugs involved in the inhibition of NO and prostaglandin generation lead to a complete reversal of the vascular relaxation [42].

Vasopressin has been successfully used in few patients with anaphylaxis (with or without cardiac arrest): cardiac arrest after insects' stings [43], refractory hypotension to phenylephrine after aprotinin anaphylaxis during cardiac surgery [44], several surgeries [45–47]. Doses reported were very different in those studies, from 2 IU IV to 40 IU plus infusion. In animal models, vasopressin has similar systemic effects than epinephrine but delays restoration of cerebral tissue oxygen pressure as compared to epinephrine [27,28]. The clinical consequences of these results are not known but underline the importance of taking into consideration regional circulations when assessing the efficacy of vasoconstrictors used in the resuscitation of AS.

Methylene blue

Methylene blue has been proposed during AS as it blocks accumulation of cGMP (guanylate monophosphate) by competitively inhibiting the enzyme guanylate cyclase. Methylene blue increases SVR and reverses shock in animal models [15,48]. In the previous experimental study of Tsuda et al. reported, methylene blue, L-NMA, and indomethacin were only partially effective [42], suggesting that they may offer a potential complementarily therapeutic option in the treatment of histamine-induced vasodilatory shock. It has indeed been reported in numerous cases of vasoplegia after cardiac surgery and cardiopulmonary bypass [49–51]. Some reports provide descriptions of severe refractory anaphylaxis, in which the use of methylene blue was associated with a significant clinical response [15,48,52,53]. In a rat model, the association of methylene blue to epinephrine was the best treatment to restore hemodynamic stability and to prevent brain ischemia [38].

Other alpha-agonists

For refractory hemodynamic shock or cardiac arrest to epinephrine, norepinephrine, terlipressine, metaraminol, or methoxamine may be considered [5]. No randomized controlled trials have evaluated epinephrine versus the use of those drugs for cardiac arrest due to anaphylaxis.

Extracorporeal life support

In case of refractory cardiac arrest, ECLS must be considered as it delivers the best cardiac flow, myocardial perfusion and aortic pressure. Even in the absence of sufficient evidence of extracorporeal cardiopulmonary resuscitation efficacy for patients with cardiac arrest, the American Heart Association guidelines update for cardiopulmonary resuscitation considered the possibility of extracorporeal cardiopulmonary resuscitation during cardiac arrest, but only in cases where it can be rapidly implemented and for select patients with a reversible suspected etiology of the cardiac arrest [54].

ECLS has been successful in isolated case reports of refractory AS to conventional treatment before cardiac surgery [55], cholecystectomy [56], liver transplantation [57] or during coronary intervention [58]. It has also been reported in an Australian series of 23 patients in charge for cardiac surgery, all of whom (except one) recovered successfully from surgery after the instauration of ECLS [59]. Its efficacy in this indication is still under discussion [3], explaining that use of these advanced techniques may only be considered in clinical situations where the required professional skills and equipment are immediately available.

Conclusion

Perioperative AS is life threatening with a mortality rate of 4.1%. Thus, although it may be challenging because of altered signs, an early diagnosis of AS is essential to recognize clinical severity signs and to initiate therapy. The cardiovascular system is one of the predominant organ affected by a perioperative AS. Whatever mechanisms are involved, this explains why the time frame of the AS can be so quick and dramatic for the evolution of the patient, moreover when associated with decreased cerebral blood flow and bronchospasm. Recommended treatments are mainly based on retrieval of the culprit agent, epinephrine and volume expansion. Others treatment, such as vasopressin, methylene blue or ECLS, need to be also considered and would benefit from multicentric studies. Thanks to better knowledge of pathophysiology of AS from animal models and in humans, some specific treatment targeted against the mediators involved such as PAF might also be of interest in few years. none.

Acknowledgments: A. Gouel-Cheron is supported by a "poste d'accueil AP-HP, Institut Pasteur".

Disclosure of interest: the authors declare that they have no competing interest.

References

- [1] Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF, Bock SA, Branum A, et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report — Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:391-7.
- [2] Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet* 1977;309:466-9.
- [3] Reitter M, Petitpain N, Latache C, Cottin J, Massy N, Demoly P, et al. Fatal anaphylaxis with neuromuscular blocking agents: a risk factor and management analysis. *Allergy* 2014;69:954-9.
- [4] Simons FER, Ebisawa M, Sanchez-Borges M, Thong BY, Worm M, Tanno LK, et al. 2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines. *World Allergy Org J* 2015;8:32.
- [5] Dhami S, Panesar SS, Roberts G, Muraro A, Worm M, Bilò MB, et al. Management of anaphylaxis: a systematic review. *Allergy* 2014;69:168-75.
- [6] Mertes PM, Alla F, Tréchet P, Auroy Y, Jouglia E. Anaphylaxis during anesthesia in France: an 8-year national survey. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:366-73.
- [7] Dong SW, Mertes PM, Petitpain N, Hasdentteufel F, Malinovsky JM, Gerap. Hypersensitivity reactions during anesthesia. Results from the ninth French survey (2005-2007). *Minerva Anestesiol* 2012;78:868-78.
- [8] Mertes PM, Laxenaire M-C, Alla F. Pernaesthésiques GdEdRA. Anaphylactic and anaphylactoid reactions occurring during anesthesia in France in 1999-2000. *Anesthesiology* 2003;99:536-45.
- [9] Abdallah C. Perioperative chlorhexidine allergy: is it serious? *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 2015;31:152-4.
- [10] Florvaag E, Johansson SGO. The Pholcodine Story. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009;29:419-27.
- [11] Mertes PM, Aimone-Gastin I, Gueant-Rodriguez RM, Mouton-Faivre C, Audibert G, O'Brien J, et al. Hypersensitivity reactions to neuromuscular blocking agents. *Curr Pharm Des* 2008;14:2809-25.
- [12] Greenberger PA, Rotskoff BD, Lifschultz B. Fatal anaphylaxis: postmortem findings and associated comorbid diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:252-7.
- [13] Wittstein IS, Thieman DR, Lima JA, Baughman KL, Schulman SP, Gerstenblith G, et al. Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress. *N Engl J Med* 2005;352:539-48.
- [14] Raper RF, Fisher MM. Profound reversible myocardial depression after anaphylaxis. *Lancet* 1988;331:386-8.
- [15] Viaro F, Dalio MB, Evora Md PRB. Catastrophic cardiovascular adverse reactions to protamine are nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate dependent and endothelium mediated: should methylene blue be the treatment of choice? *Chest* 2002;122:1061-6.
- [16] Soufras GD, Kounis NG. Adrenaline administration for anaphylaxis and the risk of takotsubo and Kounis syndrome. *Int J Cardiol* 2013;166:281-2.
- [17] Khoeiry G, Abi Rafeh N, Azab B, Markman E, Waked A, Aboujaili G, et al. Reverse takotsubo cardiomyopathy in the setting of anaphylaxis treated with high-dose intravenous epinephrine. *J Emerg Med* 2013;44:96-9.
- [18] Kounis NG, Mazarakis A, Bardousis C, Patouras N. The heart and coronary arteries as primary target in severe allergic reactions: cardiac troponins and the Kounis hypersensitivity-associated acute coronary syndrome. *Int J Cardiol* 2015;198:83-4.
- [19] Memon S, Chhabra L, Masrur S, Parker MW. Allergic acute coronary syndrome (Kounis syndrome). *Proc Baylor Univ Med Cent* 2015;28:358-62.
- [20] Nicolas F, Villers D, Blanloeil Y. Hemodynamic pattern in anaphylactic shock with cardiac arrest. *Crit Care Med* 1984;12:144-5.
- [21] Stern S, Bayes de Luna A. Coronary artery spasm: a 2009 update. *Circulation* 2009;119:2531-4.
- [22] Mink S, Becker A, Sharma S, Unruh H, Duke K, Kepron W. Role of autacoids in cardiovascular collapse in anaphylactic shock in anaesthetized dogs. *Cardiovasc Res* 1999;43:173-82.
- [23] Morel DR, Skoskiewicz M, Robinson DR, Bloch KJ, Hoaglin DC, Zapol WM. Leukotrienes, thromboxane A2, and prostaglandins during systemic anaphylaxis in sheep. *Am J Physiol* 1991;261:H782-92.
- [24] Genovese A, Rossi FW, Spadaro G, Galdiero MR, Marone G. Human cardiac mast cells in anaphylaxis. *Chem Immunol Allergy* 2010;95:98-109.
- [25] Nybo M, Madsen JS. Serious anaphylactic reactions due to protamine sulfate: a systematic literature review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;103:192-6.
- [26] Boura C, Caron A, Longrois D, Mertes PM, Labrude P, Menu P. Volume expansion with modified hemoglobin solution, colloids, or crystalloid after hemorrhagic shock in rabbits: effects in skeletal muscle oxygen pressure and use versus arterial blood velocity and resistance. *Shock* 2003;19:176-82.
- [27] Davidson J, Zheng F, Tajima K, Barthel G, Alb I, Tabarna A, et al. Anaphylactic shock decreases cerebral blood flow more than what would be expected from severe arterial hypotension. *Shock* 2012;38:429-35.
- [28] Zheng F, Collange O, Davidson J, Barthel G, Oulehri W, Thornton SN, 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. *Eur J Anaesthesiol* 2015;32:563-70.
- [29] Gouel-Chéron A, Neukirch C, Aubier B, Montravers P, Nicaise P, Chollet-Martin S, et al. Anaphylactic bronchospasm during general anesthesia is not related to asthma. *Allergy* 2015;70:453-6.
- [30] Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Bock SA, Schmitt C, Bass R, Chowdhury BA, et al. Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:584-91.
- [31] Shi G-P, Bot I, Kovanen PT. Mast cells in human and experimental cardiometabolic diseases. *Nat Rev Cardiol* 2015;12:643-58.
- [32] SFAR, SFA. Reducing the risk of anaphylaxis during anaesthesia. *Ann Fr Anesth Reanim* 2011;30:212-22.
- [33] Lavonas EJ, Drennan IR, Gabrielli A, Heffner AC, Hoyte CO, Orkin AM, et al. Part 10: special circumstances of resuscitation: 2015 American Heart Association guidelines update for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care. *Circulation* 2015;132:S501-18.
- [34] Mertes PM, Malinovsky JM, Jouffroy L, Working Group of the S, Sfa, Aberer W, et al. Reducing the risk of anaphylaxis during anesthesia: 2011 updated guidelines for clinical practice. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011;21:442-53.
- [35] Platt PR, Clarke RC, Johnson GH, Sadleir PH. Efficacy of sugammadex in rocuronium-induced or antibiotic-induced anaphylaxis. A case-control study. *Anaesthesia* 2015;70:1264-7.
- [36] Clarke R, Sadleir P, Van Niekerk AW, Platt P. Quantification of volume loss and haemodynamic changes of Gelofusine-induced anaphylaxis during cardiopulmonary bypass. *Anaesth Intensive Care* 2011;39:492-5.
- [37] Tajima K, Zheng F, Collange O, Barthel G, Thornton SN, Longrois D, 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. *Anaesth Intensive Care* 2013;41:765-73.
- [38] Zheng F, Barthel G, Collange O, Montémont C, Thornton SN, Longrois D, et al. Methylene blue and epinephrine: a synergistic association for anaphylactic shock treatment. *Crit Care Med* 2013;41:195-204.
- [39] Garvey LH, Belhage B, Kroigaard M, Husum B, Malling HJ, Mosbech H. Treatment with

- epinephrine (adrenaline) in suspected anaphylaxis during anesthesia in Denmark. *Anesthesiology* 2011;115:111-6.
- [40] Talbot MP, Tremblay I, Denault AY, Bélisle S. Vasopressin for refractory hypotension during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:401-2.
- [41] Medina P, Acuña A, Martínez-León JB, Otero E, Vila JM, Aldasoro M, et al. Arginine vasopressin enhances sympathetic constriction through the v1 vasopressin receptor in human saphenous vein. *Circulation* 1998; 97:865-70.
- [42] Tsuda A, Tanaka KA, Huraux C, Szlam F, Sato N, Yamaguchi K, et al. The in vitro reversal of histamine-induced vasodilation in the human internal mammary artery. *Anesth Analg* 2001; 93:1453-9.
- [43] Kill C, Wranze E, Wulf H. Successful treatment of severe anaphylactic shock with vasopressin. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;134: 260-1.
- [44] Williams S, Denault A, Pellerin M, Martineau R. Vasopressin for treatment of shock following aprotinin administration. *Can J Anesth* 2004;51:169-72.
- [45] Hussain AM, Yousuf B, Khan MA, Khan FH, Khan FA. Vasopressin for the management of catecholamine-resistant anaphylactic shock. *Singapore Med J* 2008;49:e225-8.
- [46] Schummer C, Wirsing M, Schummer W. The pivotal role of vasopressin in refractory anaphylactic shock. *Anesth Analg* 2008;107: 620-4.
- [47] Dunser MW, Mayr AJ, Ulmer H, Ritsch N, Knotzer H, Pajk W, et al. The effects of vasopressin on systemic hemodynamics in catecholamine-resistant septic and postcardiotomy shock: a retrospective analysis. *Anesth Analg* 2001;93:7-13.
- [48] Evora PRB, Simon MR. Role of nitric oxide production in anaphylaxis and its relevance for the treatment of anaphylactic hypotension with methylene blue. *Ann Allerg Asthma Immunol* 2007;99:306-13.
- [49] Leyh RG, Kofidis T, Strüber M, Fischer S, Knobloch K, Wachsmann B, et al. Methylene blue: the drug of choice for catecholamine-refractory vasoplegia after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125: 1426-31.
- [50] Levin RL, Degrange MA, Bruno GF, Del Mazo CD, Taborda DJ, Griotti JJ, et al. Methylene blue reduces mortality and morbidity in vasoplegic patients after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2004;77:496-9.
- [51] Evora PRB, Levin RL. Methylene blue as drug of choice for catecholamine-refractory vasoplegia after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:895-6.
- [52] Del Duca D, Sheth SS, Clarke AE, Lachapelle KJ, Ergina PL. Use of methylene blue for catecholamine-refractory vasoplegia from protamine and aprotinin. *Ann Thorac Surg* 2009;87:640-2.
- [53] Weissgerber AJ. Methylene blue for refractory hypotension: a case report. *AANA J* 2008;76: 271-4.
- [54] Brooks SC, Anderson ML, Bruder E, Daya MR, Gaffney A, Otto CW, et al. Part 6: alternative techniques and ancillary devices for cardiopulmonary resuscitation: 2015 American Heart Association guidelines update for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care. *Circulation* 2015;132: S436-43.
- [55] Allen SJ, Gallagher A, Paxton LD. Anaphylaxis to rocuronium. *Anaesthesia* 2000;55:1223-4.
- [56] Lafforgue E, Sleth JC, Pluskwa F, Saizy C. Choc peranesthésique d'étiologie probablement anaphylactique à l'atracurium traité avec succès par circulation extracorporelle. *Ann Fr Anesth Reanim* 2005;24:551-5.
- [57] Lee S-Y, Chang C-C, Peng C-M, Lin Y-K, Cheng S-B, Shen C-H. Successful extracorporeal resuscitation after perioperative anaphylactic shock during living donor liver transplantation. *Asian J Surg* 2015.
- [58] Chengot T, Goncalves J, Marzo K. Back from irreversibility: use of percutaneous cardiopulmonary bypass for treatment of shock from refractory anaphylaxis during coronary intervention. *J Invasive Cardiol* 2009;21: e97-100.
- [59] Ford SA, Kam PCA, Baldo BA, Fisher MM. Anaphylactic or anaphylactoid reactions in patients undergoing cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2001;15:684-8.
- [60] Brown SGA. The pathophysiology of shock in anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007;27:165-75.

Anaphylaxis (Immediate Hypersensitivity): From Old to New Mechanisms

Caitlin M. Gillis^{1,2,3}, Aurélie Gouel-Chéron^{1,2,3} and Pierre Bruhns^{1,2}

¹Institut Pasteur, Department of Immunology, Unit of Antibodies in Therapy and Pathology, Paris, France

²INSERM, U1222, Paris, France

³Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Synonyms

Allergic shock; Systemic type I immediate hypersensitivity reaction

Anaphylaxis: Definition and Historical Perspectives

Anaphylaxis is a severe and potentially fatal systemic allergic reaction that occurs immediately after contact with the provocative substance (allergen). The most common causative agents are food and drugs; however, an equivalently large proportion of cases (20 %) are idiopathic. Although there continues to be a dramatic increase in prevalence of anaphylaxis worldwide (Koplin et al. 2011), our understanding of the responsible immune mechanisms remains incomplete. As a clinical condition, variable

presentation and heterogeneity in terminology, criteria, and definitions have led to inconsistent diagnoses of anaphylaxis, and further confound attempts to understand the underlying pathogenesis. Recent efforts to define the diagnostic criteria for an anaphylactic reaction consider the involvement of multiple organ systems: primarily the skin or mucosal tissue, since 80 % of cases experience cutaneous symptoms such as hives, itch, or flush, with simultaneous respiratory or cardiovascular compromise, or persistent gastrointestinal symptoms.

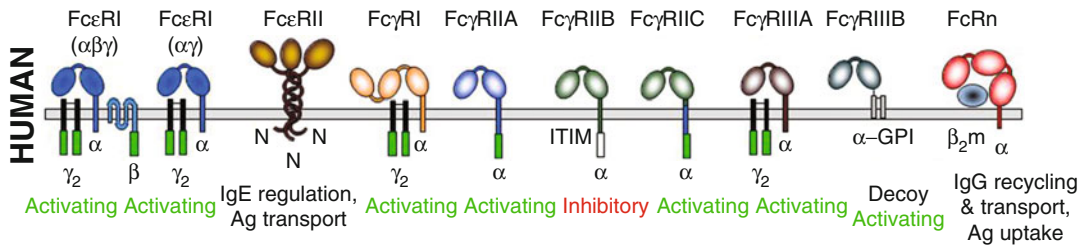
The classical paradigm considers anaphylaxis to be an immediate hypersensitivity reaction to an allergen mediated by IgE antibodies, in a patient previously sensitized to that particular antigen, resulting in the release of granular mediators by mast cells and basophils. These mediators induce vasodilatation, increased vascular permeability, and bronchoconstriction, leading to a state of “shock”: a drop in arterial pressure, tachycardia, bronchospasm, and digestive troubles. Death can result from subsequent cardiac failure, asphyxia, or pulmonary edema following major bronchospasm with respiratory distress. Altogether, current treatments for allergic anaphylaxis remain primarily limited to prophylactic allergen avoidance and medications to reverse the physiological effects of mediator release, such as adrenaline. It is therefore necessary to understand the underlying immune mechanisms, to target these pathways to alleviate shock or even ameliorate the allergic state of the individual.

Our understanding of the phenomenon of anaphylaxis began with the findings of Nobel prize-winner Charles Richet and Paul Portier in 1902, working with toxins isolated from the sea anemone *Actinia sulcata* (reviewed by Cohen and Zelaya-Quesada (2002)). They found that dogs which had recovered from receiving an injection of the toxin experienced sudden and fatal reactions after subsequent injection, even at a weaker dose. Others had previously observed that injection of a foreign protein into laboratory animals, although initially well tolerated, upon repeat injection may give rise to unanticipated adverse effects, systemic shock, and death. Indeed, 63 years earlier Magendie had noted that rabbits developed sudden and fatal collapse upon repeated injection of egg albumen. Portier and Richet identified these reactions that they observed in dogs to be a result of a pathological phenomenon behaving in a similar yet opposite manner to immunity. The initial inoculation, rather than inducing antigen tolerance as expected, specifically sensitized the animals to subsequent exposure. Richet coined the term “aphylaxis,” to indicate a lack of protection, a term subsequently modified to anaphylaxis for the sake of euphony. In 1907 Richet went on to observe that the serum of inoculated dogs contained anaphylactogenic properties, and that transferring blood from an affected animal to a healthy one could elicit hypersensitivity in the recipient.

The passive transmission of hypersensitivity was recapitulated in humans in 1921: conceived as a test for patient allergy, Prausnitz and Küstner demonstrated that a serum factor or “reagin” from an allergic patient could transfer antigen sensitivity when injected intradermally into a healthy recipient, manifesting as a skin reaction after challenge with the antigen in question (Prausnitz and Küstner 1921). Indeed, the Prausnitz-Küstner reaction (P-K test) was thereafter used not only as an assay for patients’ allergic status but also as a test to determine the component of serum responsible for sensitization. New analytical methods for serum protein fractionation facilitated the identification of the “reaginic” portion of allergic serum as a new

immunoglobulin class, subsequently designated to be IgE (Ishizaka et al. 1966). At the same time, an IgE-producing myeloma was identified, and this myeloma-derived IgE protein was demonstrated to block the induction of a Prausnitz-Küstner reaction if injected prior to sensitization with allergic serum, providing the experimental proof that this was an IgE-mediated phenomenon. Furthermore, the Fc fragment of the myeloma protein was sufficient to inhibit the P-K test, indicating that the reaction proceeds through binding to Fc receptors. Indeed the high-affinity FcεRI is expressed on mast cells in the skin, and receptor-mediated mast cell activation leading to degranulation and histamine release can induce local inflammation. The current consensus of anaphylaxis induction is that upon antigen sensitization, specific IgE antibodies are produced and bind to FcεRI expressed on mast cells and basophils. When an individual is reexposed to the allergen, the binding of antigen to these specific IgE-prebound receptors leads to rapid cellular activation and the release of preformed mediators, such as histamine and mast cell-specific proteases, chemokines, and cytokines, which mediate anaphylactic symptoms and shock. The mechanisms controlling antigen sensitization, or the induction of an allergic state, remain incompletely defined.

The discovery of IgE was critical to advances in the field of allergy: antigen-dependent activation of tissue mast cells that have specific IgE bound to their surface is the central event in many acute allergic reactions (Galli 2005). Importantly, however, the P-K test exemplifies a passive cutaneous model of anaphylaxis, with a specific sensitization protocol and route of allergen exposure. Anaphylaxis may result from exposure at cutaneous surfaces (insect stings), at mucosal linings (gut epithelium) and on a systemic level (injectable drugs). Considering that food and drug exposure accounts for the majority of anaphylactic reactions, and studies have indicated that drug-induced anaphylaxis is the most common cause of anaphylaxis fatalities, it is necessary to understand the immunological mechanisms underlying these systemic reactions. Indeed IgE represents only a very minor proportion of the total systemic



Anaphylaxis (Immediate Hypersensitivity): From Old to New Mechanisms, Fig. 1 Human IgE and IgG receptors. Schematic representation of human FcRs at the

cell membrane (gray bar) and their association or not to the FcRγ-chain dimer (black). ITAMs are represented by green boxes and ITIMs by a white box

immunoglobulin, present in the serum at concentrations less than 0.002 mg/mL, and with a very short half-life of several hours in circulation. IgG on the other hand is the most dominant antibody subclass and exhibits the highest synthetic rate and longest biological half-life: IgG antibodies are present at serum concentrations of 5–12 mg/mL with a half-life of 14–21 days. Both IgE and IgG have been implicated as mediators of anaphylactic events. Mast cells and basophils express IgG receptors as well as IgE receptors, and furthermore other antibody receptor-expressing cell types have the capacity to produce vasoactive mediators.

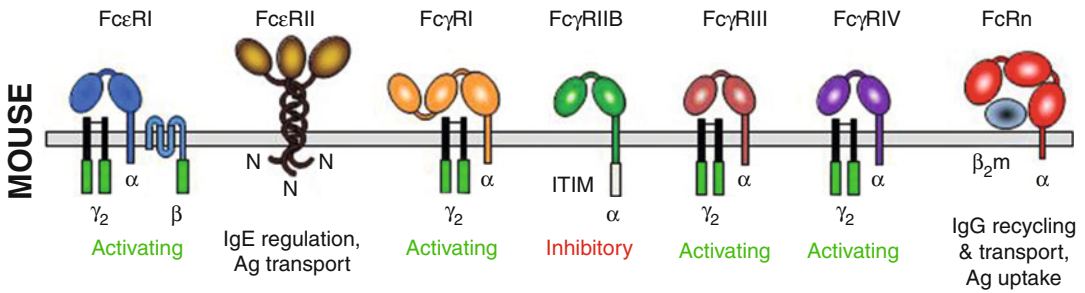
Structure and Functions

Antibodies and their receptors: The immunoglobulin protein backbone consists of two identical heavy and two identical light chains. The amino-terminal regions of the heavy and light chains exhibit highly variable amino acid composition, and these variable regions are involved in antigen binding and determine the specificity of the antibody. Five classes of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM, IgD, and IgE) have been distinguished on the basis of antigenic determinants in regions of highly conserved amino acid sequences in the constant regions of their heavy chains. Four distinct heavy chain subgroups of human IgG are defined as IgG subclasses 1, 2, 3, and 4 based on their relative concentration in normal serum. The “constant” regions of the antibody heavy chain determine their effector functions: complement fixation and ability to cross

membranes and to bind to antibody receptors (FcR).

FcR induce biological responses within the cell via activating or inhibitory signaling motifs contained within the cytoplasmic portion of the receptor molecule, or associated signaling chains. Upon binding of antigen-antibody complexes, receptor aggregation triggers intracellular signaling pathways in a process referred to as receptor cross-linking. Humans express a single high-affinity activating receptor for IgE (hFcεRI), several activating receptors for IgG (hFcγRI, hFcγRIIA, hFcγRIIC, and hFcγRIIIA), a single inhibitory IgG receptor (hFcγRIIB), and a glycosphosphatidylinositol-linked receptor hFcγRIIIB (Fig. 1). Mice express both IgE and IgG immunoglobulins; however, the murine antibody receptor family is not a replicate of the human (Fig. 2). In both species, each of these receptors exhibits differential affinity for their respective antibody binding (Table 1) and variable expression on different cellular subsets (Table 2; Bruhns 2012). Interestingly, inhibitory mFcγRIIB and activating mFcγRIII and mFcγRIV in the mouse also have low affinity for binding IgE (Mancardi et al. 2008).

Studies of anaphylaxis in human patients are extremely difficult due to the rapid rate of onset and lethal potential of the reaction, as well as large variability in the type and amount of allergen and route of exposure. Early treatment of shock is essential, and agents such as adrenaline can mask subsequent signs and symptoms. The investigation of anaphylaxis in the clinic has also been severely impeded by the difficulties in diagnosis and absence of reliable laboratory



Anaphylaxis (Immediate Hypersensitivity): From Old to New Mechanisms, Fig. 2 Mouse IgE and IgG receptors. Schematic representation of mouse FcRs at the

cell membrane (gray bar) and their association or not to the FcRγ-chain dimer (black). ITAMs are represented by green boxes and ITIMs by a white box

biomarkers to confirm the clinical impression. Therefore, to elucidate the underlying cellular and molecular mechanisms of the anaphylactic reaction, while avoiding the complications of clinical studies, several animal models of anaphylaxis have been developed. Genetically modified mice, including gene-deficient or knockout (KO) strains, have enabled the identification of different ligands, receptors, and cells necessary for the induction of anaphylaxis in specific experimental protocols. While results obtained in animal models are not necessarily applicable to humans, they provide a framework for understanding the mechanisms at work.

IgE-induced passive systemic anaphylaxis (PSA) is elicited by injecting mice systemically with IgE antibodies 24–48 h before an intravenous (i.v.) challenge with specific antigen. The anaphylactic shock which develops within minutes can be easily assessed by monitoring the decrease in body temperature. IgE-induced PSA observed in wild-type (wt) mice was abrogated in mice deficient for mFcεRI, the high-affinity IgE receptor expressed by mast cells and basophils (Dombrowicz et al. 1993) and in mast cell-deficient W/W^v mice (Miyajima et al. 1997). It was also abrogated in histidine decarboxylase-deficient mice, which lack histamine, and in mice injected with histamine receptor antagonists. Furthermore, an i.v. injection of histamine alone can induce anaphylactic symptoms in mice. These findings altogether demonstrate the mandatory role of mFcεRI and mast cells in IgE-induced PSA and emphasize the contribution of

histamine, contained within mast cell granules, which are rapidly released upon the cross-linking of IgE molecules bound to the mast cell surface via mFcεRI. This IgE-dependent mechanism mediated by mast cells and the release of histamine has been widely accepted as the paradigm of the anaphylactic reaction (reviewed by Galli (2005)).

IgG-induced PSA is elicited by injecting mice systemically with IgG antibodies 2–24 h before an i.v. challenge with specific antigen. Alternatively, preformed IgG-immune complexes (IC), consisting of antibody bound to soluble antigen, can be injected i.v. Both IgE- and IgG-induced PSA develop with similar symptoms and comparable kinetics.

IgG1 is the dominant antibody subclass raised during humoral responses to protein antigens in mice, and passively administered IgG1-IC are sufficient to induce anaphylaxis. The low-affinity IgG receptor mFcγRIII is the only activating FcγR in mice that can bind mouse IgG1 (Table 1), and since mFcγRIII can mediate mast cell activation in vitro and passive cutaneous anaphylaxis in vivo, these receptors are considered to mediate IgG1-induced PSA. Indeed, IgG1-induced PSA was abrogated in mFcγRIII-deficient mice. Inhibitory mFcγRIIB that binds mouse IgG1 negatively regulates mFcγRIII-dependent IgG1-induced PSA (reviewed by Bruhns (2012)).

Surprisingly, IgG1-induced PSA was not abrogated in mast cell-deficient mice (Miyajima et al. 1997) and although reportedly absent in

Anaphylaxis (Immediate Hypersensitivity): From Old to New Mechanisms, Table 1 *Affinity of binding of human and murine Fc receptors to IgG and IgE subclasses*

Ig subclass	hFcγRI (CD64)	hFcγRIIA (CD32A)	hFcγRIIB (CD32B)	hFcγRIIC (CD32C)	hFcγRIIA (CD16A)	hFcγRIIB (CD16B)	hFcεRI
hIgG1	++	+	+	+	+	+	–
hIgG2	–	+	+/–	+/–	+	–	–
hIgG3	++	+	+	+	++	+	–
hIgG4	++	+	+	+	+	–	–
hIgE	–	–	–	–	–		++
mlgG1	–	+	–	–	–	–	–
mlgG2a	+	+	+/–	+/–	+	–	–
mlgG2b	+	+	+	+	?	–	–
mlgG3	+	–	–	–	–	–	–
mlgE	–	–	–	–	–	–	++
Ig subclass	mFcγRI	mFcγRIIB	mFcγRIII	mFcγRIV			mFcεRI
hIgG1	++	+	+	+			–
hIgG2	–	+	+	+			–
hIgG3	++	+	+	+			–
hIgG4	++	+	+	+			–
hIgE	–	–	–	–			–
mlgG1	–	+	+	–			–
mlgG2a	++	+	+	++			–
mlgG2b	+	+	+	++			–
mlgG3	+	–	–	–			–
mlgE	–	+/–	+/–	+			++

++ : High-affinity binding

+ : low-affinity binding

+/- : weak/barely detectable binding

– : no binding

wild-type mice after basophil depletion (Tsujiura et al. 2008), IgG1-induced PSA was normal in genetically basophil-deficient mice (Ohnmacht et al. 2010). These data suggest that mFcγRIII-expressing cells other than mast cells and basophils can contribute to IgG1-induced PSA.

Neutrophils can contribute to IgG-induced PSA: in a model of polyclonal IgG-induced PSA, neutrophil depletion was sufficient to

abrogate the reaction (Jönsson et al. 2011). Whereas mouse mast cells and basophils express mFcγRIII as their only activating FcγR, mouse neutrophils express both mFcγRIII and mFcγRI-V. Neutrophils are also necessary for IgG2-induced PSA mediated via mFcγRIV. Upon activation, mouse neutrophils and basophils rapidly release granular mediators, including histamine, but also lipid-derived mediators such as platelet-activating factor (PAF). Like histamine,

Anaphylaxis (Immediate Hypersensitivity): From Old to New Mechanisms, Table 2 *Human and mouse FcR expression pattern*

HUMAN	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIB	FcγRIIC*	FcγRIIIA	FcγRIIIB	FcRn	FcεRI
B cell	–	–	+	–	–	–	–	–
T cell	–	–	–	–	–	–	–	–
NK cell	–	–	**	+	+	–	–	–
Monocyte/Macro.	+	+	+/-	+	+	–	+	++
Neutrophil	(+)	+	+/-	+	–	+	+	++
Dendritic cell	+	+	+	–	–	–	+	–
Basophil	–	+	+	–	–	+/-	–	+
Mast cell	(+)	+	–	–	–	–	–	+
Eosinophil	–	+	–	–	–	–	–	+
Endothelium	–	–	–	–	–	–	+	–
Platelet	–	+	–	–	–	–	?	–
Intestine epithelium	–	–	–	–	–	–	–	–
Syncytiotrophoblast	–	–	–	–	–	–	+	–

MOUSE	FcγRI	FcγRIIB	FcγRIII	FcγRIV	FcRn	FcεRI
B cell	–	+	–	–	+ [†]	–
T cell	–	–	–	–	–	–
NK cell	–	–	+	–	–	–
Monocyte/Macro.	–	+	+	+	+	–
Neutrophil	–	+	+	+	+	–
Dendritic cell	+ [§]	+	+	–	+	–
Basophil	–	+	+	–	–	+
Mast cell	–	+	+	–	?	+
Eosinophil	–	+	+	–	–	–
Endothelium	–	–	–	–	+	–
Intestine epithelium	–	–	–	–	+	–

(+) : Inducible expression

+/- : Some subsets express the receptor

* : In *Fcgr2c*-ORF individuals** : Detectable and functional expression in non-conventional *Fcgr2c*-Stop individuals

‡ : In atopic/allergic individuals

§ : Monocyte-derived dendritic cells, but not conventional dendritic cells

† : On splenic B cells only

PAF can reproduce the clinical signs of anaphylactic shock when injected into naive animals, and PAF, but not histamine, was shown to be responsible for IgG1-induced PSA and IgG2-induced PSA. Altogether these findings indicate that IgG1-IC and IgG2-IC induce anaphylaxis mediated by the release of PAF, probably by aggregating mFcγRIII on basophils and mFcγRIII and mFcγRIV on neutrophils (reviewed by Bruhns (2012) and summarized in Table 3).

Active systemic anaphylaxis (ASA) is elicited by injection of allergen/antigen into mice immunized with the same allergen/antigen and is therefore a better model of anaphylaxis that arises in humans who have been previously sensitized to a specific allergen. Different routes of exposure will mimic different human pathologies: in particular, intravenous antigen challenge resembles drug-induced anaphylaxis. Although similar symptoms develop during ASA and PSA, a greater proportion of animals die during

Anaphylaxis (Immediate Hypersensitivity): From Old to New Mechanisms, Table 3 *Contribution of specific pathways to experimental anaphylaxis models.* A pathway is represented by a cell type, the antibody class, and the mediator released. ASA models describe BSA-immunized mice challenged with BSA (BSA-ASA) and goat IgG anti-mouse IgD-immunized mice challenged with goat IgG. If identified, the responsible FcRs are indicated

	PSA			ASA	
	IgE	IgG1	IgG2b	BSA	Goat IgG anti-IgD
Mast cell / IgE / Histamine	YES (FcεRI)	NO	<i>n.a.</i>	NO	NO
Basophil / IgG / PAF	NO	<i>disputed</i>	<i>n.a.</i>	YES (FcγRIII)	<i>n.a.</i>
Macrophage / IgG / PAF	NO	NO	<i>n.a.</i>	NO	YES
Neutrophil / IgG / PAF	?	NO	YES (FcγRIV)	YES (FcγRIII+IV)	NO

n.a. : not analyzed.

ASA. Perhaps unsurprisingly, however, results obtained from active models of anaphylaxis do not correlate with most results from passive models. Neither IgE nor mFcεRI, mast cells, basophils, nor both cells are mandatory for the induction of ASA (reviewed by Bruhns (2012)).

Antibody-dependent ASA develops in mice that have been immunized with protein antigen (bovine serum albumin, BSA) in Freund's adjuvant prior to intravenous challenge: BSA-ASA is lethal in wt mice but does not affect mice that lack expression of activating FcRs. Studies using this model have demonstrated important roles for IgG, neutrophils, and PAF in the induction of ASA. Even though antigen-specific IgG and IgE are both present in immunized mice at the time of challenge, the IgG receptors mFcγRIII and mFcγRIV are responsible for ASA induction, demonstrated by the abolition of the reaction in mice treated with mFcγRIII- and mFcγRIV-specific blocking antibodies. Neutrophils were the dominant cell type responsible for the induction of shock, since neutrophil depletion prevented ASA-associated death, while basophils played a minor role: the contribution of basophils was observable only in the absence of

neutrophils. Importantly, the transfer of human neutrophils restored ASA in resistant mice (Jönsson et al. 2011). In an alternate model of ASA induced by i.v. injection of goat IgG in mice immunized with goat IgG anti-mouse IgD (GaMD-ASA), the reaction was determined to proceed via mFcγRIII, monocyte/macrophage activation, and the release of PAF (Strait et al. 2002). Although a role for monocytes/macrophages was not detectable in BSA-ASA, PAF receptor antagonists also strongly inhibited BSA-ASA, while a histamine receptor antagonist had little effect. Altogether, data from these animal models support a mandatory role for IgG and IgG receptors in ASA and the downstream production of PAF that mediates the physiological symptoms (summarized in Table 3).

Intestinal models of anaphylaxis to food have been difficult to develop with the elicitation of systemic symptoms. Studies in the mouse intestine examining local allergic manifestations in response to food allergens have highlighted the contribution of classical mast cell- and IgE-mediated mechanisms. A recent study of a murine model of oral antigen-induced anaphylaxis with intestinal and systemic symptoms

found that some symptoms, namely, diarrhea and hypothermia, were attenuated in mFcεRI-deficient mice compared to controls. The severity of these symptoms was also found to correlate with levels of intestinal mast cells. Airway hyper-responsiveness, however, occurred independently of the IgE/mFcεRI/mast cell pathway (Ahrens et al. 2012). Most animal models of food allergy involve the generation of both antigen-specific IgE and IgG; however, the specific role of IgG in these models has not been well addressed.

Deleterious Effects of Activated Neutrophils: A Role for Extracellular Traps in Anaphylaxis?

If neutrophils are activated during anaphylactic shock in patients, they may also contribute to the deleterious pulmonary and cardiovascular symptoms of the shock. Indeed, while neutrophils play an essential role in fighting infection and in the resolution of inflammation, neutrophil-derived products such as reactive oxygen species, proteases, lipid mediators, and pro-inflammatory cytokines can induce tissue damage and toxicity in the local environment (Borregaard 2010). Tissue pathology induced by these mediators has been associated with the clinical manifestation of other acute inflammatory reactions, including acute respiratory distress syndrome of the adult, acute alcoholic hepatitis, and heat shock. Neutrophils, as well as mast cells and eosinophils, may contribute to tissue pathology under conditions of inflammation by the formation of extracellular traps. These filamentous structures consist of a backbone of DNA, and histones presenting numerous granular mediators are extruded following cell activation and constitute a novel death mechanism called NETosis. Whereas the role of NETs (Neutrophil Extracellular Traps) in the anti-infectious response is well documented, the interactions of NETs with the cellular environment of the host are little understood. Some reports, however, describe a deleterious effect of NETs constituents for tissues, in particular of histones on endothelial cells during sepsis, of proteases on bronchial epithelia in asthma, or of procoagulation molecules that induce thrombosis. It can be hypothesized that during a severe

systemic anaphylactic reaction, NETs may be released by neutrophils following their activation by IgG receptors in the presence of allergen and specific IgG; these NETs cause damage to tissues, endothelial surfaces, and vasculature and may contribute to respiratory distress.

Pathological Relevance

Clinical Aspects

Anaphylactic reactions are unpredictable and life-threatening and therefore represent an emergency situation for medical staff. As discussed above, there are a great variety of eliciting compounds to which allergic individuals can be exposed via different routes of contact and at varying distances from hospital and treatment, rendering clinical studies difficult to conduct. In cases of anaphylaxis arising in a clinical setting, however, more homogenous groups of patients may facilitate clinical studies. Immediate hypersensitivity reactions during the perioperative period have been reported with increasing frequency in most developed countries and may be attributable to anesthetic drugs, antibiotics, latex, antiseptics, radiocontrast agents, colloids for intravascular volume expansion, blood products, or disinfectants. The most common causes of anaphylaxis in this setting are neuromuscular blocking agents (60–70 %) followed by latex (12–18 %) and antibiotics (8–15 %) (Mertes et al. 2011).

Any suspected anaphylactic reaction must be investigated to provide precise recommendations for future procedures. The severity of anaphylaxis can vary from a simple cutaneous rash to cardiac failure and eventually death. Reactions are therefore classified as a function of their severity: grade 1, generalized cutaneous signs; grade 2, moderate cardiovascular or bronchial dysfunction that does not require a specific treatment; grade 3, dysfunction with vital threat that would not have receded in the absence of symptomatic treatment; grade 4, cardiorespiratory arrest; and grade 5, corresponding to death. Cutaneous signs may be absent in more severe grades

of anaphylaxis or appear only when an adequate perfusion pressure has been reestablished.

Since the classical immunological mechanism of anaphylaxis implies the immediate release of mediators by mast cells and basophils sensitized by specific IgE (Galli 2005), when anaphylactic shock is suspected in the clinic, levels of circulating histamine and of tryptase (a mast cell-specific protease) are measured to confirm the diagnosis. If the patient survives the shock, immunological tests are performed during a physician's appointment 6–8 weeks later. To identify the allergenic compound the patient reacted against, these tests include skin tests (prick test and/or intradermal test), measurement of allergen-specific IgE in the patient's serum, and ex vivo basophil degranulation in the presence of the "suspected allergen." In view of the patient's medical history and the results of the immunological tests, recommendations to avoid the "suspected allergen" may be given to the patient to prevent future occurrences of anaphylaxis. Clinical reactions observed can, however, also be a result of nonimmune-mediated events, such as the nonspecific release of histamine, a phenomenon referred to as an "anaphylactoid" reaction, and reportedly accounting for 30–40 % of hypersensitivity reactions. The use of the term "anaphylactoid," however, is discouraged by the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Clinically, these two terms are indistinguishable in presentation, and rather such a distinction disregards the potential contribution of as yet unrecognized immunological mechanisms to the anaphylactic response, or processes for which reliable laboratory biomarkers are not yet established.

None of the cutaneous or immunological tests performed reach a sensitivity or specificity of 100 %. The situation is particularly difficult with drugs in the neuromuscular blocking drug family because anaphylactic shocks to neuromuscular blocking drugs have been reported in patients that have never received them before, and cross-reactions to various neuromuscular blocking drugs exist (Mertes et al. 2008). To comfort a diagnosis of neuromuscular blocking drug-induced anaphylaxis, the following set of

immunological tests have to be positive: skin test, presence of specific IgE, and ex vivo basophil activation in the presence of neuromuscular blocking drugs. Specific neuromuscular blocking drug-reactive IgE can be quantified using a chemical structure, a quaternary ammonium, which represents a common antigenic determinant of the family of neuromuscular blocking agents (e.g., suxamethonium, rocuronium). Yet in around 10 % of cases of anaphylaxis to neuromuscular blocking drugs, the clinical reaction does not correlate with the levels of mediators in the serum (histamine and tryptase) and the immunological tests performed, suggesting another mechanism leading to anaphylactic shocks (Laroche et al. 2011). In agreement with this, animal models suggest that antibodies other than IgE and, probably, cell populations other than mast cells and basophils can mediate anaphylaxis.

Data published by different groups on different animal models of anaphylaxis (refer to Structure and Function) compile a rather complicated picture on the different cell types, antibody receptors, and mediators involved in systemic anaphylaxis. That neither mast cells nor IgE, but rather neutrophils and/or macrophages and IgG, contribute to some of these models is unexpected and opens novel areas of research in human anaphylaxis. That PAF is a major responsible mediator for active systemic anaphylaxis in murine models should prompt a reevaluation of the contribution of PAF to human anaphylaxis. In two human studies, serum PAF concentrations were shown to correlate with the severity of anaphylactic shocks (Vadas et al. 2008; 2013). Certainly, clinical application of the findings of animal models requires close consideration of the appropriateness of the model used; in particular, human anaphylactic reactions are essentially always "active." In order to be better able to extrapolate to the human conditions, efforts have been made to develop humanized models of anaphylaxis, by using mice expressing human IgE or IgG receptors.

“Humanized” Models of Anaphylaxis

The role of the human high-affinity receptor for IgE, hFcεRI, was first investigated in IgE-PSA in the mouse. Mice deficient for mFcεRI and transgenic for hFcεRI developed IgE-PSA, but not mice that did not carry the human transgene (Dombrowicz et al. 1996). This pioneering work demonstrated that anaphylaxis could be reconstituted in an “FcR-humanized” mouse. Notably, however, this reaction was dependent on the injection of antigen-specific mouse IgE that bound to hFcεRI in vivo.

Recently, the transfer of human neutrophils has been reported to restore anaphylaxis in anaphylaxis-resistant mice, that is, mice deficient for activating FcRs (Jönsson et al. 2011). Human neutrophils from normal donors constitutively express the low-affinity activating IgG receptor hFcγRIIA: hFcγRIIA is the most widely expressed FcR in humans (Tan Sardjono et al. 2005), possesses its own activating motif in its intracytoplasmic domain, and is not associated to the FcRγ subunit that enables the other activating IgG (and IgE) receptors to signal (Fig. 1). hFcγRIIA binds all four human IgG subclasses (Bruhns et al. 2009), as well as mouse IgG1, IgG2a, and IgG2b subclasses (Jönsson et al. 2012). Mice transgenic for the *Fcgr2a* gene have been generated that recapitulate the expression of hFcγRIIA in humans (McKenzie et al. 1999). hFcγRIIA was found to be sufficient to induce fatal ASA when expressed on a transgenic mouse background deficient in endogenous murine FcR. hFcγRIIA-dependent IgG-induced PSA relied on neutrophils and monocyte/macrophages, but not on mast cells and basophils. Human mast cells, monocytes, and neutrophils can produce anaphylactogenic mediators following hFcγRIIA engagement. hFcγRIIA may therefore contribute to allergic reactions and anaphylaxis in humans (Jönsson et al. 2012).

Human neutrophils from atopic and allergic patients also express hFcεRI (Gounni et al. 2001). Neutrophils may therefore contribute with mast cells and basophils to IgE-dependent allergic reactions in these individuals. In addition, neutrophils can express the activating high-affinity IgG receptor hFcγRI under several

pathological (e.g., multiple myeloma, rheumatoid arthritis, bacterial infection, sepsis, and inflammatory bowel disease) and therapeutic conditions (e.g., treatment with recombinant G-CSF or chemotherapy). Mice transgenic for the *Fcgr1a* gene have been generated that recapitulate the expression of hFcγRI in humans (Heijnen et al. 1996). hFcγRI was found to be sufficient to induce IgG-induced PSA and fatal ASA when expressed on a transgenic mouse background deficient in several endogenous murine FcRs. hFcγRI-dependent ASA relied on neutrophils, but not on monocyte/macrophages. Human neutrophils can produce anaphylactogenic mediators following hFcγRI engagement, and hFcγRI-dependent ASA was strongly inhibited following treatment with PAF receptor antagonists. hFcγRI may therefore contribute to allergic reactions and anaphylaxis in humans that express this high-affinity IgG receptor on their neutrophils (Mancardi et al. 2013).

Thus, like mouse IgE receptor mFcεRI and mouse IgG receptors mFcγRIII and mFcγRIV, human IgE receptor hFcεRI and human IgG receptors hFcγRIIA and hFcγRI are sufficient to trigger IgE- and IgG-induced systemic anaphylaxis, respectively, when expressed in mice. Yet these results have been obtained in mice expressing only one human hFcR, in the absence of inhibitory hFcγRIIB, and in the absence of other hFcγRs, that may regulate or contribute to anaphylaxis, respectively. If other hFcγRs play a role in anaphylaxis in humans, other cell types than those identified so far may contribute to, or even be responsible for, the induction of anaphylaxis. The use of mouse models expressing multiple or, preferably, all hFcγRs (Smith et al. 2012) may be necessary to fully understand their relative contribution to anaphylaxis and the role of the cells expressing them.

In addition, cross-species binding of mouse IgE or mouse IgG to hFcεRI and hFcγRI and hFcγRIIA enabled the use of mouse monoclonal antibodies to induce anaphylaxis in mice transgenic for these receptors (Dombrowicz et al. 1996; Jönsson et al. 2012; Mancardi et al. 2013). Several hFcγRs, however, do not bind (or very poorly) mouse IgG (Table 1). In particular, only hFcγRIIA cross-binds the

predominant mouse IgG subclass, mIgG1, whereas all human Fc γ Rs bind the predominant human IgG subclass, hIgG1 (Bruhns 2012). Of note, hFc γ RIIIB that is very highly expressed on human neutrophils does not detectably cross-bind mouse IgG. hFc γ RIIIB has nevertheless been reported to play specialized roles in these cells using murine models transgenic for this human receptor, demonstrating expression on neutrophils, as well as on monocytes (Chen et al. 2012; Tsuboi et al. 2008). Investigating the role of most human hFc γ Rs in anaphylaxis in mouse models using mouse IgG may therefore lead to conclusions irrelevant to human physiology of hFc γ Rs and of human IgG. Models integrating mice expressing hFc γ R and producing human/chimeric IgG would be more physiologically relevant, but no report of this kind has been made so far.

Interactions with Other Processes and Drugs

Atopic individuals, such as those with asthma or other allergies, are identified to be at high risk of anaphylactic episodes. Overall, anaphylaxis is more common in females than in males, yet for unknown reasons 95 % of deaths from insect sting anaphylaxis occur in males. Patterns of exposure influence relative anaphylaxis risk: seasonal changes in insect populations relate to risk of insect sting anaphylaxis, multiple surgery procedures increase risk factors for allergic perioperative reactions, and professional exposure to latex increases predisposition to latex allergies. Other medications can predispose to anaphylaxis or interfere with treatment, for example, β -blockers can interfere with the action of adrenaline and increase severity of symptoms or duration of the reaction. Delayed access to adrenaline is a consistent risk factor for fatalities following anaphylaxis. Deficiencies in PAF acetylhydrolase, the enzyme that degrades PAF, were found to inversely correlate with anaphylaxis severity (Vadas et al. 2008), which emphasises a contribution of this mediator to human anaphylactic reactions.

Cross-References

- ▶ Allergic Disorders
- ▶ Anti-histamines
- ▶ Basophils
- ▶ Cell Signaling in Neutrophils
- ▶ Immunoglobulin Receptors and Inflammation
- ▶ ITAM Regulatory Receptors
- ▶ Mast Cells
- ▶ Monoclonal Antibody Technology
- ▶ Neutrophil Netosis

References

- Ahrens, R., Osterfeld, H., Wu, D., Chen, C. Y., Arumugam, M., Groschwitz, K., Strait, R., Wang, Y. H., Finkelman, F. D., & Hogan, S. P. (2012). Intestinal mast cell levels control severity of oral antigen-induced anaphylaxis in mice. *The American Journal of Pathology*, 180(4), 1535–1546.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33(5), 657–670.
- Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*, 119(24), 5640–5649.
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., & Daeron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fc{gamma} receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113, 3716–3725.
- Chen, K., Nishi, H., Travers, R., Tsuboi, N., Martinod, K., Wagner, D. D., Stan, R., Croce, K., & Mayadas, T. N. (2012). Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcgammaRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcgammaRIIA in vivo. *Blood*, 120(22), 4421–4431.
- Cohen, S. G., & Zelaya-Quesada, M. (2002). Portier, Richet, and the discovery of anaphylaxis: A centennial. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(2), 331–336.
- Dombrowicz, D., Flamand, V., Brigman, K. K., Koller, B. H., & Kinet, J. P. (1993). Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell*, 75(5), 969–976.
- Dombrowicz, D., Brini, A. T., Flamand, V., Hicks, E., Snouwaert, J. N., Kinet, J. P., & Koller, B. H. (1996). Anaphylaxis mediated through a humanized high affinity IgE receptor. *Journal of Immunology*, 157(4), 1645–1651.
- Galli, S. J. (2005). Pathogenesis and management of anaphylaxis: Current status and future challenges. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(3), 571–574.

- Gounni, A. S., Lamkhieoued, B., Koussih, L., Ra, C., Renzi, P. M., & Hamid, Q. (2001). Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): Role in asthma. *FASEB Journal*, 15(6), 940–949.
- Heijnen, I. A., van Vugt, M. J., Fanger, N. A., Graziano, R. F., de Wit, T. P., Hofhuis, F. M., Guyre, P. M., Capel, P. J., Verbeek, J. S., & van de Winkel, J. G. (1996). Antigen targeting to myeloid-specific human Fc gamma RI/CD64 triggers enhanced antibody responses in transgenic mice. *Journal of Clinical Investigation*, 97(2), 331–338.
- Ishizaka, K., Ishizaka, T., & Hornbrook, M. M. (1966). Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *Journal of Immunology*, 97(6), 840–853.
- Jönsson, F., Mancardi, D. A., Kita, Y., Karasuyama, H., Iannascoli, B., Van Rooijen, N., Shimizu, T., Daëron, M., & Bruhns, P. (2011). Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1484–1496.
- Jönsson, F., Mancardi, D. A., Zhao, W., Kita, Y., Iannascoli, B., Khun, H., van Rooijen, N., Shimizu, T., Schwartz, L. B., Daëron, M., & Bruhns, P. (2012). Human Fc gamma RIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood*, 119(11), 2533–2544.
- Koplin, J. J., Martin, P. E., & Allen, K. J. (2011). An update on epidemiology of anaphylaxis in children and adults. [Review]. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 11(5), 492–496.
- Laroche, D., Chollet-Martin, S., Leturgie, P., Malzac, L., Vergnaud, M. C., Neukirch, C., Venemalm, L., Gueant, J. L., & Roland, P. N. (2011). Evaluation of a new routine diagnostic test for immunoglobulin e sensitization to neuromuscular blocking agents. *Anesthesiology*, 114(1), 91–97.
- Mancardi, D. A., Iannascoli, B., Hoos, S., England, P., Daëron, M., & Bruhns, P. (2008). Fc gamma RIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage Fc epsilon RI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 118(11), 3738–3750.
- Mancardi, D. A., M. Albanesi, F. Jonsson, B. Iannascoli, N. Van Rooijen, X. Kang, P. England, M. Daëron and P. Bruhns (2013). The high-affinity human IgG receptor Fc gamma RI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis, and antitumor immunotherapy. *Blood* 121(9): 1563–1573.
- McKenzie, S. E., Taylor, S. M., Malladi, P., Yuhan, H., Cassel, D. L., Chien, P., Schwartz, E., Schreiber, A. D., Surrey, S., & Reilly, M. P. (1999). The role of the human Fc receptor Fc gamma RIIA in the immune clearance of platelets: A transgenic mouse model. *Journal of Immunology*, 162(7), 4311–4318.
- Mertes, P. M., Aimone-Gastin, I., Gueant-Rodriguez, R. M., Mouton-Faivre, C., Audibert, G., O'Brien, J., Frendt, D., Brezeanu, M., Bouaziz, H., & Gueant, J. L. (2008). Hypersensitivity reactions to neuromuscular blocking agents. *Current Pharmaceutical Design*, 14(27), 2809–2825.
- Mertes, P. M., Alla, F., Trechot, P., Auroy, Y., & Jouglu, E. (2011). Anaphylaxis during anesthesia in France: An 8-year national survey. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(2), 366–373.
- Miyajima, I., Dombrowicz, D., Martin, T. R., Ravetch, J. V., Kinet, J. P., & Galli, S. J. (1997). Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gamma RIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *Journal of Clinical Investigation*, 99(5), 901–914.
- Ohnmacht, C., Schwartz, C., Panzer, M., Schiedewitz, I., Naumann, R., & Voehringer, D. (2010). Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths. *Immunity*, 33(3), 364–374.
- Prausnitz, C., & Küstner, H. (1921). Studien über die Ueberempfindlichkeit. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 86, 160–169.
- Smith, P., D. J. DiLillo, S. Bournazos, F. Li and J. V. Ravetch (2012). Mouse model recapitulating human Fc gamma receptor structural and functional diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(16): 6181–6186.
- Strait, R. T., Morris, S. C., Yang, M., Qu, X. W., & Finkelman, F. D. (2002). Pathways of anaphylaxis in the mouse. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(4), 658–668.
- Tan Sardjono, C., Mottram, P. L., van de Velde, N. C., Powell, M. S., Power, D., Slcombe, R. F., Wicks, I. P., Campbell, I. K., McKenzie, S. E., Brooks, M., Stevenson, A. W., & Hogarth, P. M. (2005). Development of spontaneous multisystem autoimmune disease and hypersensitivity to antibody-induced inflammation in Fc gamma receptor IIa-transgenic mice. *Arthritis and Rheumatism*, 52(10), 3220–3229.
- Tsuboi, N., Asano, K., Lauterbach, M., & Mayadas, T. N. (2008). Human neutrophil Fc gamma receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity*, 28(6), 833–846.
- Tsujimura, Y., Obata, K., Mukai, K., Shindou, H., Yoshida, M., Nishikado, H., Kawano, Y., Minegishi, Y., Shimizu, T., & Karasuyama, H. (2008). Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity*, 28(4), 581–589.
- Vadas, P., Gold, M., Perelman, B., Liss, G. M., Lack, G., Blyth, T., Simons, F. E., Simons, K. J., Cass, D., & Yeung, J. (2008). Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *New England Journal of Medicine*, 358(1), 28–35.
- Vadas P, Perelman B, Liss G. Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131:144–9.